

研究課題名：食品用途となるナノマテリアルの曝露による毒性評価に関する研究

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

分担研究者：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

協力研究者：大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官

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曝露状況やリスク評価に関する国際動向を調査することを目的とする。平成 30 年度は、欧州食品安全機関（EFSA）主催の「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アセスメントに関する科学ネットワーク（FSA 科学ネットワーク会議）」に関する調査を行い、リスクアセスメントに関する改定ガイダンスに対するケーススタディおよびガイダンスの実用性への議論について調査した。また、「食品添加物および食品に添加する栄養源に関する科学パネル（ANS パネル）」より、二酸化ケイ素の再評価、ケイ酸カルシウム・ケイ酸マグネシウム・三ケイ酸マグネシウム及びタルクの再評価、銀ヒドロゾルの安全性および生物学的利用能に係る科学的意見書についての情報収集を行った。その結果、改定ガイドラインについては EU 各国により、特に、物理化学的特性評価に関するガイダンスの修正は有用となる可能性があるものと判断されていた。また、既存物質の再評価では、既存の評価は有効ではないことが確認されたが、ナノを含むものとしての評価としては情報が足りないことが示唆されていた。EFSA のナノ成分を含有する既存物質の評価を議論からは、ナノ材料の物理化学的な特性評価や、毒性学的評価などの科学的知見についての情報は未だ不足していることが示され、今後もさらなる情報収集が必要であると考えられた。

A. 研究目的

近年、ナノマテリアルを用いた材料は、日焼け止め製品としての化粧品や、塗料・抗菌雑貨など家庭用品の他、電子材料などの産業分野において、消費者に幅広く利用されており、今後、更なる応用が期待されている。一方、ナノマテリアルの安全性に対する懸念は年々高まってきており、健康影響への可能性が指摘されている。しかし、現状では、ナノマテリアルの安全性や曝露などに関する科学的知見に乏しいことから、有害性に関する研究が積極的に進められている。一方、欧州連合

では、ナノ材料の安全性のデータの届出・登録の義務化への整備が進められており、米国においても EPA を主体に規制および監視を検討している。国内においては、カーボンナノチューブ等で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。また、ナノテクノロジーの応用により食品・食品容器分野において積極的な利用が期待され、食品添加物や食品サプリメントなどへの使用が増えてきている。H30 年度は、昨年度に続き、EFSA が 2010 年から主催している EFSA 科学ネットワーク会議の議論に関する調査および食品

添加物および食品に添加する栄養源に関する科学パネル (ANS パネル) より、ナノ成分を含有する既存物質に係る科学的意見書について調査を実施した。

A. 研究方法

EFSA が主催している「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アセスメントに関する科学ネットワーク (Science network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed: FSA 科学ネットワーク会議):第 8 回会議、2018 年 7 月、開催国・首都:イタリア・ローマ)」に関する調査を実施した。また、「食品添加物および食品に添加する栄養源に関する科学パネル (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food : ANS パネル)」より、ナノ成分を含有する既存物質:①二酸化ケイ素の再評価、②ケイ酸カルシウム・ケイ酸マグネシウム・三ケイ酸マグネシウム及びタルクの再評価、③銀ヒドロゾルの安全性および生物学的利用能に係る科学的意見書について調査を実施した。

B. 研究結果

2. 第 8 回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アセスメント (EFSA 科学ネットワーク)

食品および飼料分野におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーの実用性についてのリスクアセスメントに関するガイダンス: ケーススタディおよびガイダンスへの実用性

今回の会議では、2018 年 7 月 4 日に公開された「食物と飼料分野におけるナノサイエンスとナノテクノロジーの応用へのリスクアセスメントに関するガイダンス: 第一部、ヒトおよび動物の健康」の試験的運用段階について紹介し、今後のガイダンスの実用化に向けた議論が行われた。2018 年 7 月に EFSA は、ナノサイエンスおよびナノテクノロジー事業の運用に向けた安全性についての評価方法に関するガイダンスを発表し

た。このガイダンスは、必要とする試験の種類や、適用可能な方法に関する実用的な提案を収載している。尚、このガイダンスは、2011 年のガイダンスの公表以降に得られた新たな知見と加え、詳細で且つ具体的な分析法や分解法や、*in vivo/in vitro* による生物学的試験法を用いた体系的な評価指針を示している。

更に、このガイダンスでは、EFSA に付託された新規食品、食品接触材料、食品および飼料添加物、農薬などの分野を網羅しており、全ての関係事業者、特に、リスクアセスメントの評価者やリスク管理者および申請者を対象としたナノテクノロジーに関連する申請書類の作成に関する必要な情報を提供している。将来的に、このガイダンスは、新規食品、食品/飼料添加物、殺生物剤、殺虫剤および食品接触材料の各分野で適応されるナノコンポジットやナノカプセルにおける評価にも考慮される可能性がある。また、データギャップを補完するための *read-across* 法への適応の可能性として、ナノマテリアルの *in vitro* 試験に関する一般的な問題についても述べられており、*in vitro* 消化試験、トキシコキネティクス、遺伝毒性に関する内容や、作用機序 (MOA) やキーイベント (KE)、AOP 解明への必要性についても議論されている。さらにガイダンスでは、リスクキャラクターゼーションと不確実性の分析へのアプローチを提案し、この分野のさらなる研究のための勧告も提唱している。

また、2019 年には、食品および飼料分野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環境リスク評価に焦点を当てた第 2 のガイダンスの策定を予定している。尚、このガイダンスの試験的な運用は 2019 年末まで続き、2020 年にはリバイズされて公表される予定である。

EU 加盟国における活動

EFSA: EFSA ガイダンスでどのように解釈されているかについて、食品添加物の再評価と新たな評価の例について議論していた。専門家らは、粒

子状である任意の物質において、ナノ範囲を含む粒径の物理化学的特性評価をどのような方法論で適用すべきかということ論点としていた。EFSA ガイダンスでは、粒径分布は複数の独立した技術（そのうちの1つは電子顕微鏡による測定方法：EM）で決定することを推奨している。ワーキンググループのメンバーは、粒径分布は粒子材料の物理化学的特性評価の一環として、EMを使用したデータ情報の必要性について議論していた。

以下、幾つかの論点が示されている。

- ▶ 溶解度：溶解速度が非常によく特徴付けられている場合には粒子状についてのEMのデータは必要としない。また、ガイダンスのセクション4.3.3で説明したように、ナノ粒子の「溶解度」と「分散」の間に違いがあることも重要である（例：シリカは水に溶けると云われているが、EMでの測定では粒子が分散して浮遊していることがわかる）。
- ▶ その他の技術について：NanoDefineプロジェクトによる評価スキームは、粒子状物質の物理化学的特性評価にアプローチするためのスクリーニング方法の選択肢について提供している。例えば、動的光散乱法（DLS）は、材料が多分散系ではない場合に限り使用できるが、材料が多分散の場合、大きい粒子については検出可能であるが、小さい粒子については検出できず、粒子径の大きさに依存することから、本測定手法は適さないとしている。従って、EMのデータが提供されていない場合、この点について考慮する必要がある。実際、高溶解性を有するナノマテリアルを除き（上の箇条書きの項目を参照）、EM情報が必要であるという結論に向けた議論が行われた。
- ▶ 腸管細胞への取り込みについて：この問題を取り上げるには科学的知見が必要となるが、250nm前後のナノ材料では腸管細胞による取り込みが異なるため、精密なサイズの測定が

重要となる。また、粒子のサイズと形状はEMでしか見ることができないことから、粒状材料の粒度分布を特徴付けるための標準的なアプローチとしてEMの必要性を裏付けるものである。

専門家らは、EFSAに提出された申請書類に評価される物質の物理的特性評価の一環として、また、消費者への安全性の観点からも粒度分布に関する適切なデータの提供への重要性について改めて表明しているものであった。

ベルギー：最近発表されたEFSAガイダンスに沿って実施した二酸化チタン（E171）と銀（E174）中のナノサイズ粒子の割合を特徴付ける分析方法論についての検証の結果と実用化に関する結果が報告された。その研究結果は、ガイダンスの分析手法が食品添加物とこれらの食品添加物を含む市販製品を特徴付けるものであると示唆していた。銀のデータの結果では、2つの異なる粒子を有し、銀（E174）を処理することにより、銀ナノ粒子の形成が誘導された。また、二酸化チタン（E171）のデータ結果では、食品への添加の前後で幾つかのタイプの二酸化チタンのナノサイズ粒子を有することが実証されたことを報告していた。

ポルトガル：ナノ粒子の数と金属の濃度の関係における金属ナノ粒子の外部および内部線量の信頼性に関する調査結果が報告された。ネットワーク会議では、金属濃度とナノ粒子の濃度の両方による内在化と細胞毒性の発現について議論され、この内容について推奨していた。しかし、この研究では、EMによる細胞内の濃度の定量化が安全性評価において一貫して要求する実施可能な方法にはならないことを示していた。

スロベニア：改定版のEFSAガイダンス文書に沿ったナノ粒子を含む二酸化チタンの食品接触材の安全性評価に関するケーススタディが報告された。ケーススタディは、酸性食物として3%酢酸の刺激により準セラミック焦げ付き防止の平鍋コーティングによるものと、機械的摩耗による

食物への二酸化チタンのナノ粒子の放出があり得ることを示唆していた。そこで、移行試験および機械的試験から入手可能な情報に基づき、放出された二酸化チタン粒子の消費者への曝露評価を実施した。その結果、ナノ粒子の合成法の瞬間気相生成法（Flash Creation Method:FCM）によって、ナノ粒子の放出に関連するリスクアセスメントのさらなる検討の必要性と、そこには多くの関連する不確実性（物理化学的特性評価、ハザード特性評価および曝露評価）への考慮に対する必要性が提唱されていた。

フィンランド：フィンランドのテクニカルリサーチセンター：Technical Research Center (VTT) でナノファイバーの生産について報告があった。ナノテクノロジーを応用した食品は、主にセルロース（添加剤 E460）マイクロフィブリルやナノフィブリルなどが挙げられ、様々な特性を有している。安全性評価に関するデータの作成には、様々なマトリックスからのナノセルロースまたは類似のナノ材料に対して分析が実施された。特に、*in vitro* 消化試験段階でのナノセルロース製品の安全性評価では、ナノセルロースはヒトの胃腸系では消化されないが、反芻動物の反すう胃（ルーメン）や実験用ラットの盲腸では微生物発酵を起こすことから、*in vitro* の消化試験における消化率の相違について考慮することが指摘されていた。従って、食品および飼料だけでなく食品包装材料にも使用されるナノセルロースや新規食品としてのマイクロセルロースにおいては、その他の規制製品と同様に、EFSA ガイダンスに沿った事前評価の必要性が提唱されていた。

ドイツ/フランス：ナノ粒子の腸管毒性および肝臓毒性を決定する要因を研究するためのドイツ及びフランスの二国間協力プロジェクト（SolNanoTox プロジェクト）の内容について報告が行われた。食品および包装に使用されている異なる溶解度特性を有する類似のナノ粒子の細胞への取り込みは、ナノ粒子の形状に依存し、その効果はイオン種により強くなる傾向があり、

特に、肝細胞は腸管細胞よりも影響が大きいことが示された。また、毒性作用に関しては、酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害および金属イオンの恒常性の乱れに由来するものと考えられた。ネットワーク会議では、作用機序（MoA）およびキーイベント（KE）への解明には、一般的な毒性のさらなる研究を必要とし、更に、オミックスへのアプローチは、有害性発現経路（AOP）の解明に役立つものであることが提唱された。現在、ナノ粒子に関する細胞内での変化については、利用可能なオミックスデータ、特にメタボロミクスを活用することで、定量的リスク評価はできないものの、より多くの情報が提供されることが示唆された。

オランダ：合成非晶質シリカ（SAS、SiO₂、E551）と二酸化チタン（TiO₂、E171）の2つの場合に適用した EFSA ガイダンスの段階的枠組みによるレトロスペクティブ評価について報告があった。このレトロスペクティブ評価では、利用可能な、又は利用できない情報について識別できたので、今回のガイダンスは適切に構成されており、ガイダンスに準拠することへの重要性を示していた。また、物理化学的な特徴付けは、ナノ材料を評価するための初期段階で非常に重要であると述べていた。

EFSA ガイダンスでは、規制製品に関する他の EFSA ガイダンス文書の場合と同様に、毒性試験についても段階的なアプローチを推奨しているが、全ての段階への義務化はされていない。初期段階の試験結果について、目的とする用途への化合物の安全性について結論づけられるような十分なデータが提供されるのであれば、更なる試験の必要性はないとしている。これは動物実験の削減やコスト削減にも繋がるだけでなく、またナノ材料のリスクアセスメントに関して妥協するものでもないとしていた。

以上、今回の会議で EU 各国により議論された内容では、改定ガイドラインについて、特に、物理化学的特性評価に関するガイダンスの修正は

有用となる可能性があるものと結論づけていた。

2. 食品添加物としての二酸化ケイ素(E 551)の再評価

EFSA は、ANS パネルが行った食品添加物として使用される際の二酸化ケイ素(E 551)の安全性を再評価するための科学的意見について公表した。食品添加物の二酸化ケイ素 (E 551) として使用される合成非晶質シリカ粒子 (synthetic amorphous silica ; SAS) の形態は、製造過程に応じてヒュームドシリカ (乾式シリカ) および水和シリカ (沈殿シリカ、シリカゲルおよび含水シリカ) などが挙げられる。これら異なる形態を有する SAS の中でも、コロイダルシリカは食品添加物として認可されていない。1991 年に食品科学委員会(SCF)は二酸化ケイ素 (E551) とケイ酸塩類に対するグループの一日摂取許容量(ADI)を「設定不要」と定めている。しかし、生物学的試験や毒性学的試験で使用された SAS 物質は、物理学的な特性が異なっており、それらの特性について必ずしも十分に記載されていなかった。これまで二酸化ケイ素 (E551) は体内に吸収されにくいものと考えられていたが、一部の組織からケイ素含有物質(二酸化ケイ素と推定された場合もある)が検出された。ナノ二酸化ケイ素を用いた試験を含む亜慢性毒性試験、生殖毒性試験、発生毒性試験においては、試験数は少ないが有害影響を示さなかった。また、二酸化ケイ素 (E 551) は、遺伝毒性に関する懸念はないと報告されている。食品添加物の二酸化ケイ素 (E 551) 中にはナノ粒子が存在している可能性があるものの、ナノ二酸化ケイ素を用いた長期試験の情報がないことから、ANS パネルはナノ粒子の全粒子径範囲を含んでいない被験物質で得られた慢性毒性試験の結果を、現行の二酸化ケイ素 (E 551) の成分規格に適合する試料に外挿して推定することはできないものとした。また、推定される最大の曝露用量は、試験で確定された無毒性量(NOAELs)より少なくとも一桁低いものであった。

ANS パネルは以下のように推奨している。

- ▶ 欧州委員会は、食品添加物が主要な曝露源にならないように、二酸化ケイ素 (E551) の EU 規格の有害元素 (ヒ素、鉛、水銀およびカドミウム) に関して現行の上限値を引き下げるよう検討する。
- ▶ 欧州委員会は、二酸化ケイ素 (E 551) に対して現在の EU の仕様を改訂し、適切な統計的記述子 (例えば、範囲、中央値、四分位数) を使用し粒子径分布を特徴付けることや、食品添加物として使用される二酸化ケイ素 (E 551) 中に存在するナノ粒子(少なくとも一次元以上の外寸が 100 nm 未満) の数量および重量の割合について追加をする。さらに、適用される測定方法については、EFSA ガイダンス文書 (EFSA 科学委員会、2011a、b) に準拠するとした。

従って、ANS パネルは、現在の EU の成分規格では食品添加物として二酸化ケイ素 (E551) を正確に特徴づけるには不十分であると結論づけた。今後、粒子径分布の明確な特性評価の必要性が求められるとしている。また、利用可能なデータベースに基づく、報告されている使用方法と使用量では、二酸化ケイ素 (E551) の毒性を示す兆候は認められなかったとしている。今回、利用可能なデータベースが限られていたこともあり、ANS パネルは、現行の ADI を「設定不要」という状況については承認せず、二酸化ケイ素 (E551) の EU の規格を一部変更するよう勧告するよう結論付けている。

3. 食品添加物としてのケイ酸カルシウム(E 552)、ケイ酸マグネシウム(E 553a(i))、三ケイ酸マグネシウム(E 553a(ii))及びタルク(E 553b)の再評価

EFSA は、ケイ酸塩類「ケイ酸カルシウム(E 552)、ケイ酸マグネシウム(E 553a(i))、三ケイ酸マグネシウム(E 553a(ii))」及びタルク(E 553b)の再評価に係る食品添加物及び食品に添加する

栄養源に関する科学委員会(ANS パネル)の科学的意見書(2018年6月28日採択)を公表した。1991年に食品科学委員会(SCF)は二酸化ケイ素

(E551)とケイ酸塩類に対するグループの一日摂取許容量(ADI)を「設定不要」と定めているが、ANS パネルは、食品添加物として使用される二酸化ケイ素 (E551) の安全性を再評価する科学的意見書を提出していたこともあり、同パネルは、ケイ酸塩類及びタルク (E553b) についても再評価を実施するとした。ケイ酸塩類及びタルク

(E553b) の体内動態に関する試験結果から、これらの物質は体内吸収が非常に低く、わずかに吸収されたケイ酸は尿中へ排泄されていると示された。また、ヒトを含めた一般動物においても、肝臓や腎臓への大きな蓄積は起きていないと評価している。毒性評価に関しては、これまでケイ酸カルシウム(E 552)、ケイ酸マグネシウム(E 553a(i))、及びタルク (E553b) の遺伝毒性、発生毒性は無く、また、三ケイ酸マグネシウム (E553a(ii)) は、何十年にも亘り、最大 4g/人/日の高用量で使用されているにも関わらず、欧州連合(EU)加盟国共有の医薬品副作用情報データベースには腎臓への影響に関する症例について報告されていない。

しかし、ANS パネルは、ラットの実験で、ケイ酸カルシウム (E552) 由来のケイ素の蓄積が報告されていることや、ケイ酸塩類及びタルク

(E553b) の亜慢性及び慢性毒性、発がん性、及び生殖毒性に関する信頼できるデータがないことを考慮すると、食品添加物として使用されるケイ酸塩類 (E552、E553a(i)、E553a(ii)) 及びタルク (E553b) の安全性について評価することはできないと結論付けている。また、リスクを特徴付ける最も代表的なものとして考えられる食品サプリメントの全てのケイ酸塩類(E552-553)に関する曝露量については、制酸剤として使用される三ケイ酸マグネシウム E553a(ii)の一日最大用量(4g/人/日)を下回るものであった。ANS パネルは、現在の毒性データベースにおける不確実性を

減らすことができるような幾つかの方法について指摘している。これらの方法は、食品添加物の申請のため EFSA のガイダンスの Tier 1 手法に推奨されている毒性学的試験では、適切に特徴付けられている材料を用いて実施されていると述べている。

ANS パネルは EU の成分規格書の改正のため、以下について推奨されている。

- 欧州委員会は、より良い定義に沿った分析、すなわち粒子径分布の特徴付けや、適切な統計学的記述子(例えば、範囲、中央値、四分位数)を用いる)、並びにナノ粒子(一次元以上の外径が 100nm 未満)の数量及び重量での割合に対する情報の追加を実施するため、ケイ酸塩類 (E 552、E 553a(i)、E 553a(ii))、及びタルク (E 553b) の EU の成分規格書を改正する。
- ナノ粒子サイズ分布の特徴に関して、適用される分析方法論は、食料と飼料分野におけるナノサイエンスとナノテクノロジー (EFSA 科学委員会、2018 年) への応用のリスクアセスメントに関する EFSA ガイダンスで推奨されているものに準拠する。
- 食品添加物に対して EFSA のガイダンス (EFSA ANS Panel, 2012) で説明されている Tier 1 手法に推奨されている毒性学的試験は、現行の毒性データベースの不確実性を減らすために適切に特徴付けた材料を用いて実施する。
- 提出されているほとんどのデータはタルク (E553b) のデータであるため、ケイ酸塩類 (E 552, E 553a(i)), E 553a(ii)) の実際の用法及び使用量に関する多くのデータを提出する必要がある。
- 欧州委員会は食品添加物が食品の毒性に対する主要な曝露源とならないように、ケイ酸塩類 (E552、E553a(i)、E553a(ii))、及びタルク (E553b) に関する EU の成分規格書の毒

性元素(ヒ素、鉛、水銀)に対して現行の上限値を引き下げるよう検討する。

- ▶ 欧州委員会は E553b の EU 成分規格書にアルミニウム、ニッケル、フッ素及び結晶シリカ(アルファ水晶)の上限値の収載を検討する。

以上、ANS パネルは、ケイ酸塩類 (E552、E553a(i)、E553a(ii)) 及びタルク (E551) のグループ ADI にメカニズム的根拠は無く、1991 年に SCF が設定したグループ ADI は時代に即さないものであると位置づけられと共に、ADI を設定することが出来なかったと結論づけている。

4. 食品サプリメントに栄養目的で添加される銀源としての銀ヒドロゾルの安全性と生物学的利用能

EFSA は、ANS パネルが行ったフードサプリメントに栄養目的で添加される銀源としての銀ヒドロゾルの安全性と生物学的利用能に関する科学的意見書を公表した。銀ヒドロゾルは、USP 23 等級の水中の正電荷を帯びた銀イオンと銀金属粒子との混合物からなる懸濁液であり、総銀濃度は $10 \sim 27.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ の範囲である。透過型電子顕微鏡 (TEM) および原子間力顕微鏡 (AFM) によって行われた粒子サイズ分析に関する情報は、この材料がナノ範囲にあることを示したが、ナノ材料の評価のための特性評価は提供されておらず、どのナノ特性が評価にデータを必要とするかを確かめることは不可能であった。申請データからは、経口投与量は胃からの消失試験の結果として示されており、銀の全身吸収に関する情報は提供されていなかった。仮に、銀ヒドロゾルに由来する銀が体内吸収されるのであれば、銀ヒドロゾルの一般毒性試験が必要とされるが、申請データとしては急性毒性試験の情報と銀化合物(例えば銀塩類)で実施された毒物データのみであった。ANS パネルは、提出されたデータは、食品サプリメントに栄養目的とする銀の供給源とした銀ヒドロゾルの食品添加物に加えることへの安全性だけでなく、生物学的利用能の評価に

対しても不十分なものであるとして結論づけている。

C. 考察

2010 年、EFSA 科学委員会は、「食品および飼料の安全性に関するナノサイエンスおよびナノテクノロジーから生じる潜在的リスク」に関する科学的意見について議論し、この意見の中で EFSA 科学委員会は、EFSA は将来、申請の可能性のあるものについてケースバイケースで評価する立場にあり、リスクアセスメントに関する十分なデータが提出された場合にのみ結論づけることとしている。その後、EFSA 科学委員会は、欧州委員会からの依頼により、2011 年 4 月に「食料および飼料分野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」を公表し、さらに今回、2011 年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を作成した。しかし、ナノマテリアルの定義については、EC の定義との整合性とリスクアセスメントの重要な要素となるデータの検証に関する方法論が不足しており、未だに科学的に明確な判断が出来ていないことから、今後も検討の必要性があるとしている。第 8 回食料および飼料分野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会議において、ナノ材料についての物理化学的特性、曝露評価、およびハザードの同定に関する多くの洞察と関連性のある新たな科学的意見について議論されていた。特に、ナノスケールに関する粒径分布や形状などの測定で電子顕微鏡を用いた測定法 (EM 法) の重要性について議論されている。今回議論された EM 法を含め、100nm 未満のサイズのナノ材料の粒子の構成の割合や形状について、単一の測定法では、分析技術の不確実性や検出限界などの問題点があり、正確に測定することは難しく、複数の分析法を組み合わせるこ

とで、より精度をあげることが出来るものと考えられる。また、腸管細胞への取り込みに関する知見で、250nm 前後のナノ材料で異なるとしているが、100nm 以上の粒子に関するナノ材料のサイズの最大値についての指針やリスクについて示されていないことから、今後、明確にすべき課題と考えられた。

食品添加物の二酸化ケイ素 (E 551) として使用される合成非晶質シリカ粒子 (SAS) の形態は、製造過程に応じて乾式シリカや水和シリカなどが挙げられ、一次粒子から構成された凝集したナノサイズである。SAS (沈降シリカ) の一次粒子のサイズは、5~15 nm の範囲内であるが、これらの凝集体は、さらに凝集することでより大きな構造を形成する場合もあり、凝集体の大きさは通常100 nmより大きいとされる。しかし、一次粒子である SAS の凝集体は100 nm未満のサイズを含む可能性もあることから、ナノ材料の粒径の測定に対する様々な分析方法(動的光散乱

(DLS)、レーザー回折 (LD)、透過型電子顕微鏡 (TEM)、走査型電子顕微鏡 (SEM))への適応の可能性について述べているものの、明確な分析手法の選択については示されていない。また、毒性に関する情報の報告例は少ないが、ナノ二酸化ケイ素を用いた試験を含むような、亜慢性、生殖および発生毒性試験では、有害影響を示すような兆候は見られず、二酸化ケイ素 (E 551) に関しては、遺伝毒性の懸念はないとしている。従って、今回、食品添加物としての二酸化ケイ素 (E 551) の再評価では、二酸化ケイ素 (E 551) 中にナノ粒子が含まれている可能性があるものの、毒性データの情報不足から更なる毒性評価の必要性と、粒子径分布の解析では EU の成分規格に対して正確に特徴づけることが出来ていないとして、様々な分析手法の適応について検討する必要があると考えられた。

食品添加物としてのケイ酸塩類 (ケイ酸カルシウム : E552、ケイ酸マグネシウム : E553a (i)、三ケイ酸マグネシウム : E553a(ii)) およびタルク

(E553b)に関する再評価では、体内動態に関する試験結果から、これらの材料はほとんど体内に吸収されず、ヒトを含め一般動物では、肝臓、腎臓への大きな蓄積は起きないと評価している。毒性評価の結果から、ケイ酸塩類やタルクは毒性の低い物質であると考えられた。しかし、ケイ酸カルシウム (E552) でケイ素の蓄積がラットで報告されていることや、ケイ酸塩類およびタルクに関する毒性試験の信頼出来るデータ情報がないことを考慮すると、食品添加物として使用されるには安全性について正確に評価出来ないと指摘している。また、純度試験で示されるように毒性元素 (ヒ素、鉛、水銀) が含まれており、タルク (E553b) に関しては、アルミニウム、ニッケル、フッ素、結晶シリカも含まれていることから、EU の成分規格書の毒性元素の現行の上限値を引き下げることを推奨することで、主要な曝露源とならないように回避するための方策としているが、今回のケイ酸塩類とタルクの再評価では、ADI の設定は出来なかった。今後、これらの材料に含まれるナノ粒子のサイズ分布や粒子径を特徴付けるデータの必要性や、毒性試験情報を追加していくことが必要であると指摘されている。

銀ヒドロゾルは、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope; TEM) および原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope; AFM) によって測定した粒子サイズの分析 (粒子サイズおよびサイズ分布) に関する情報によって、その材料のサイズはナノの範囲内であると示唆している。しかし、ナノ材料のリスクアセスメントに対するEFSAガイダンスによっては、ナノ材料の十分な特性評価について提供していないことから、ナノ特有の特性評価に対する必要なデータして確かめることが出来ないとしている。研究報告によると、銀ヒドロゾルからの銀の体内吸収効率は経口投与量の53%程度であると示されているが、吸収を測定した訳でもなく、吸収したとした場合の十分な毒物学的な評価も報告されなかった。今後、さらなる特性解析のデータと毒性

試験評価について検討する必要があると考えられた。

EFSA の「食品添加物および食品に添加する栄養源に関する科学パネル (ANS パネル)」より、食品添加物として使用されるナノ成分を含有する既存物質の評価を議論からは、未だナノ材料の物理化学的な特性評価 (主に粒子径サイズの分析測定の手法) や、毒性学的評価などの科学的知見についての情報は不足していることが示され、今後もさらなる情報収集が必要であると考えられた。

D. 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曝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、平成 30 年度は、29 年度に引き続き欧州食品安全機関(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「食品および飼料分野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」を作成しており、2018 年のナノマテリアルの科学ネットワーク会議では、ガイダンスの実用化に向けたパブコメのドラフトへの議論や、リスクアセスメントに関する改定ガイダンスに対するケーススタディおよびガイダンスの実用性について議論されていた。改定ガイドラインについては、データの検証に関する方法論の不足など、若干の懸念点はあるものの、EU 各国により、特に、ナノ粒子を特徴付ける物理化学的特性評価に関するガイダンスの修正は有用となる可能性があるものと判断された。EFSA では、ナノマテリアルを含む可能性のある既存添加物の再評価を行ってきており、二酸化ケイ素、ケイ酸塩類とタルクでは、ADI を設定することが出来なかった。また、銀ヒドロゾルに関しては、食品添加物に加えることに対する安全性と生物学的利用能を評価する

にはデータが不十分のために ADI を設定しなかった。今回、調査を実施した既存物質の再評価では、既存の評価は有効ではないことが確認されたが、ナノを含むものとしての評価としては情報が足りないことが示唆されている。EFSA のナノ成分を含有する既存物質の評価を議論からは、ナノ材料の物理化学的な特性評価や、毒性学的評価などの科学的知見についての情報は未だ不足していることが示され、今後もさらなる情報収集が必要であると考えられた。

E. 研究発表

(論文発表)

- Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, 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. Cancer Sci.* 109(7):2164-2177. 2018
- El-Gazzar AM, Abdelgied M, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigo M, Naiki A, Takahashi S, Takase H, Hirose A, Kannno J, Elokke OS, Nazem AM, Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats. *Arch Toxicol.* 93:49-59. 2018.
- Liao D, Wang Q, He J, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Futakuchi M, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Xu J, Tsuda H. Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Chem Res Toxicol.* 31(10):1025-1031. 2018.
- Sakamoto Y, Hojo M, Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A, Inomata A, Suzuki T, Nakae D. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* 43(10):587-600. 2018.

(学会発表)

- Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M.,

Naiki-Ito A., Abdelhamed M., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Takahashi S., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers are possibly carcinogenic in male Fisher 344 rats.

54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018) (September 2018 Brussels, Belgium)

Hirose A., Hojo M., Kobayashi N., Impact of sample preparation of MWCNT for developmental toxicity by intratracheal instillation. *The 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC2018)* (April 2018 Belgrade, Serbia)

Hojo M, Kobayashi N, Hasegawa Y, Sakamoto Y, Murakami S, Yamamoto Y, Tada Y, Maeno A, Kubo Y, Ando H, Shimizu M, Taquahashi Y, Suzuki T, Nakae D, Hirose A: Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. *54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018)* (September 2018 Brussels, Belgium)

Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A, Yoshida H, Kurokawa M. Effects of double-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. *54th Congress of the European Societies of Toxicology*, (September 2018 Brussels, Belgium)

Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Hirabayashi Y, Hirose A, Kanno J. Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System. *58th Annual Meeting of the Society of Toxicology*, (March 11-14, 2019, Baltimore)

坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴

子, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を単回経気管噴霧投与した後終生飼育したラットの肺および中皮組織における増殖性病変の発生. 第45回日本毒理学学会学術年会 (2018年7月大阪)

坂本義光, 多田幸恵, 北條幹, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 中江大: ラットにおいてDHPNで誘発されたメソテリン陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性状. 第35回日本毒理学病理学会学術集会 (2019年1月東京)

津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬明彦, 管野純. ナノマテリアルの気管支内投与による毒性と発がん性の簡易検出システムの開発 第45回日本毒理学学会学術年会 大阪 2018年7月

津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬明彦, 管野純. ナノマテリアル特にカーボンナノチューブによる肺・胸膜中皮障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 試験法の開発 第45回日本毒理学学会学術年会 (2018年7月大阪)

北條幹, 小林憲弘, 長谷川悠子, 安藤弘, 久保喜一, 海鉾藤文, 田中和良, 五十嵐海, 村上詩歩, 多田幸恵, 生嶋清美, 湯澤勝廣, 坂本義光, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 高橋祐次, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブのマウス気管内投与による発生毒性と肺の炎症との関連性. 第45回日本毒理学学会学術年会 (2018年7月大阪)

F. 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)