

食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

令和 7 年度 分担研究報告書

食品及び食品用容器包装に使用されるナノマテリアル等の新規素材の
安全性評価に関する研究

分担課題 ナノマテリアルを含む新規素材の毒性試験法に関する国際動向調査

研究分担者 大野 彰子

国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部 主任研究官

研究要旨

欧州において食品用途のナノマテリアル（以下、NMs）は新規物質と認識され、安全性評価に関する法整備が進められている。NMs は、その特異な物理化学的性質から、従来の材料とは異なる潜在的な有害性が懸念されている。そのため、特に経口または経皮暴露が想定される食品および食品用容器包装用の新規ナノ素材については、そのナノ特性を踏まえた新たなリスク評価手法の確立が求められている。

本研究は、食品関連分野における NMs 等の新規素材の毒性試験法に関する国際動向を調査することを目的とする。本調査においては、安全性評価方法、評価データ、並びに関連する国際的な動向に関する情報を集積し、適切な毒性評価法の提案、および特性に応じた試験上の考慮事項を整理する。令和 7 年度は、初期評価的観点から免疫毒性に焦点をあて、2021 年 7 月に EFSA が発行した“Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health”（Nano-RA に関するガイダンス）の内容を中心に、欧州食品分野における全身毒性に関する評価手法について整理した。また、EFSA が 2025 年 6 月に開催した EFSA ワークショップの議論、6 月に開催された OECD ナノマテリアル作業部会において、NMs の評価に関する国際的な動向について調査を実施した。

A. 研究目的

食品・飼料分野におけるナノマテリアル（以下、NMs）の応用が進む中、その健康影響評価とリスク管理は重要な課題であり、欧州食品安全機関（EFSA）のガイダンス等に基づく国際的な安全基準への対応が求められている。本研究の目的は、食品関連分野で使用・混入の可能性がある NMs 等の新規素材に関し、安全性評価の国際動向調査および試験法の様々な考慮事項を整理する。

令和 7 年度は、初期評価的観点から「全身毒性」に焦点を当て、EFSA ガイダンスで示されている段階的な毒性試験フレームワークや *in vitro* / *in vivo* 試験法に関する国際動向を調査・整理し、国内の評価基盤構築に資する知見を収集した。

B. 研究方法

初期評価的観点から全身毒性（ADME、反復投与毒性、生殖発生毒性等）についての評価手法に関する情報収集を実施する

ため、2021 年 7 月に EFSA が発行した “Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health” (以下、「EFSA ナノガイダンス」) の記載内容を中心に、欧州食品分野における全身毒性の評価手法について整理を行った。また、NMs 評価に関する国際的な最新動向を把握するため、2025 年 6 月に開催された EFSA ワークショップでの議論および同月に開催された OECD ナノマテリアル作業部会における情報収集を併せて実施した。
(倫理面への配慮) 特になし

C. 研究結果

C.1. EFSA ナノガイダンスにおける毒性試験法に関する情報収集

EFSA ナノガイダンスにおける健康影響評価のスキームでは、NMs の物理化学的性状を基盤とし、粒子の大きさや消化管内での挙動を解析し、消化管からの吸収性を否定できない場合は、全身影響を評価することを基本とする段階的評価スキームが設定されていた (図 1)。STEP 1 から STEP 4 は以下の項目について評価することになっており、各ステップでの評価結果に従って次の STEP に進むスキームで明記されていた。

<各ステップの説明>

- ー STEP 1: ナノ特有の評価を必要とする材料の同定と物理化学的特性評価
- ー STEP 2: *in vitro* 消化試験
 - ・ STEP 2A: 既存情報のレビュー
 - ・ STEP 2B: *in vitro* データの新規取得
- ー STEP 3: *in vivo* 試験
 - ・ STEP 3A: *in vivo* 予備試験
 - ・ STEP 3B: *in vivo* 試験
- ー STEP 4: 対象を絞った詳細試験

各ステップにおける評価フローと全身毒性の位置づけを以下に示す。

- ・ **STEP 1 (初期判断)** 物理化学的特性等の検討を行い、次ステップ以降の NMs 特有の評価に進むべきか否かを判断する。

- ・ **STEP 2 (*in vitro* 評価および判断)** 物理化学的特性や毒性データに関する既存情報をレビューし、必要に応じて *in vitro* 試験データを新規取得した上で、STEP 3 (*in vivo* 試験) の実施要否を判断する。大半のケースで STEP 3 への移行が必要と予想されるが、「*in vitro* 試験で毒性影響が認められない」かつ「リソソーム環境や消化管シミュレーション下での *in vitro* 分解・溶解速度が速い」等の条件を満たす場合は、例外的に *in vivo* 試験が免除される場合がある (EFSA が個別判断)。

- ・ **STEP 3 (*in vivo* 標準評価)** 14 日間の予備試験を実施した後、改良型 90 日間反復投与毒性試験 (OECD TG 408) を課し、必要に応じて *in vivo* 遺伝毒性試験を追加する。

- ・ **STEP 4 (対象を絞った詳細試験)** STEP 3 までの結果からさらに詳細な検証が必要と判断された場合、トキシコキネティクス (以下、TK) 試験 (ヒト試験を含む)、生殖発生毒性、免疫毒性、神経毒性、変異原性、発がん性、内分泌攪乱作用、および腸内細菌叢への影響など、対象を絞った詳細な試験へと移行する。

以上の評価スキームにおいて、ADME、反復投与毒性、生殖発生毒性等を含む「全身毒性」の評価は STEP 3 以降に位置づけられている。そのため、本調査では STEP 3 以降で実施される各試験について、ステップごとにその概要および技術的課題を取りまとめた。

***In vivo* 試験における試験溶液の調製 (EFSA ガイダンス §7.3.2.)**

セクション 7.3.2 には、毒性試験の設計において NM_s の物理化学的特性に対処するための、試験溶液調製に関する考慮事項が以下の通り規定されていた。

- ・ 均一・安定な分散プロトコルの必要性： NM_s は分散後に不安定化（凝集・沈降）を伴う傾向があるため、経口毒性試験における食品、飼料、飲料水、または投与媒体への分散において、均一かつ安定した分散を保証する効果的なプロトコルの策定が求められていた。これは、消化管吸収の最大化だけでなく、最悪の曝露シナリオにおける再現性を確保するために、高濃度の非凝集粒子を含む分散液を調製することを目的としていた。
- ・ 実際の曝露状況との整合性（凝集レベルの制御）： 一方で、安全性評価は実際の消費者の曝露実態に可能な限り即した条件下で実施する必要もあった。したがって、飼料に NM_s を混入する際の凝集レベルは、実際の食品中の凝集度と同等に制御することが求められていた。例えば、粉末を飼料へ直接混合することは過剰な凝集を招き実際の曝露条件に適合しないため、一度液体懸濁液を調製した後に均一混合するプロセスが推奨されていた。
- ・ 調製後の速やかな使用と実際の投与量の把握： 投与媒体中における NM_s の安定性および物理化学的特性は投与直前に評価する必要があるため、分散液は調製後速やかに使用しなければならない場合があった。さらに、ナノ粒子は投与容器や器具へ付着しやすく、実際の曝露

量を低下させるリスクがあるため、実際の投与量を厳密に把握することが重要とされていた。

- ・ 試験報告書への記載要件： 以上の観点を踏まえ、試験報告書には被験物質のナノ特性、分散プロトコル、凝集の程度、および分散安定性など、NM 特有の事項を詳細に記載する必要性が示されていた。なお、Particle-TR ガイダンス (EFSA 2021b) には、これらナノ特有の課題に関する報告方法の推奨事項をまとめた付属書が含まれていた。

<STEP 3A>

***in vivo* ADME 試験 (EFSA ガイダンス §7.6.2.)**

食品／飼料用途に関連するばく露経路に対するリスク評価を行うが、NM_s の経路間外挿についての情報はほとんど知られておらず、ばく露経路が異なれることで組織分布パターンも異なる可能性がある指摘されているので、原則的に経口投与による試験を実施すべきと述べられていた。そのため、文献情報等から経口ばく露による ADME に関する情報が得られない新規の NM_s については ADME 試験を実施し、TK パラメータを特徴付けるべきであり、OECD TG 417 は、ADME 試験を実施するための一般的な方法論を記載しており、これに EFSA ガイダンス セクション 7.3 に記載されたような修正を加え、ケースバイケースで実施されるべきであると記載されていた。

NM_s の ADME 試験には、体液、組織、排泄物中の NM_s の存在量を定量化すること、及び NM_s がどのような形態でこれらのコンパートメントに存在するかを特定することが重要である。そのためには、臓器、組織

及びその他の生体試料中の NMs またはその元素組成のいずれかを検出するための測定システムが不可欠であるが、NMs の血液、組織、排泄物中の NMs の濃度を測定し、それらが体内に存在する形態を確立することは、特に困難が伴う可能性が高い。セクション 5.3 で説明されているように、生体組織や飼料及び食品では、複雑なマトリクスが存在し、NMs の濃度が低いため、検出及び定量がより困難となる場合がある。特に、生体組織や食品等の複雑なマトリックス中には、ナノスケールを含む天然構造(バックグラウンド)が存在し、さらに NMs 自体が低濃度であるため、一般にその分離・検出・同定は困難であるとされていた。測定項目には化学組成、粒子径、形状のほか、表面改質等のパラメータが含まれていた。

バックグラウンドが極めて低い元素を含む無機 NMs においては、質量分析、原子吸光分析、X 線解析等の手法により、元素総量としての検出・定量が可能であったが、これらはナノサイズ以外の物質も反映してしまう課題が指摘されていた。そのため、マトリックスの特徴に応じて、spICP-MS によるサイズ分画測定や、試料のホモジナイズ・希釈によるマトリックス影響の排除など、より高感度な検出系での定量化に向けた工夫の必要性が示されていた。

また、より直接的な測定として、同位体や蛍光色素を用いた直接・間接標識(ラベリング)による検出手法が挙げられていた。しかし、全種類の NMs への放射化適用は非現実的であることに加え、ラベリング(例:特定の蛍光色素との結合)が NMs の疎水性・親水性を変化させるなど、物性や生物学的活性へ影響を及ぼすリスクに留意する必要性が指摘されていた。

***in vivo* 予備試験 (STEP 3A)**

STEP 3A における *in vivo* 予備試験(約 14 日間)は、標的ハザードの同定、および後続試験(STEP 3/4)において強毒性が预期される用量を回避した投与量範囲を決定すること、ならびに TK を評価することを目的として推奨されていた。

しかし、14 日間では NMs (以下、NMs)の吸収動態を正確に把握することが困難な場合があり、その際は直接 *in vivo* 試験(STEP 3B)への移行が可能とされていた。このような直接移行が考慮される具体的なケースとしては、①溶解速度が限定的であるために材料が粒子状のまま組織内に残留し、最終投与後の排出速度(クリアランスなど)の把握に長期間を要する場合、および②マクロファージのリソソーム内等での溶解・分解に伴い、潜在的毒性を有するイオンや分子の局所的放出が予想される場合、が挙げられていた。

また、ナノスケールの遊離粒子は、低曝露レベルでは実際の数が多くなる一方、高用量域では凝集体の形成により数が減少する特性がある。このように粒子の凝集が投与量に比例しない内部曝露を引き起こすリスクがあるため、TK 評価は「投与量と組織濃度との関係性」に基づいて実施する必要があるとされていた。さらに、NMs の吸収量を推定する際には、組織への分配量を考慮する必要があることから、マスバランス(物質収支)試験の実施が推奨されていた。

<STEP 3B>

改良型 90 日反復投与経口毒性試験 (EFSA ガイダンス §7.7.)

STEP 3B では、遺伝毒性および TK 評価

を局所・全身毒性試験によって補完することとされており、食品・飼料添加物や新規食品の各分野別ガイダンスが第一段階として求める 90 日間動物試験 (OECD TG 408) に対し、NMs の安全性評価では一連の特別な対応が必要とされていた。

まず、*in vivo* 毒性試験の最小要件として、ADME 評価用のサテライト群を組み込んだ改訂 90 日間毒性試験の実施が規定されていた。全身移行後の NMs の多くは単核食細胞系 (MPS) 組織に移行する可能性が高いため、造血系や炎症反応関連パラメータ、および MPS 関与部位・臓器への特段の配慮が求められる一方で、消化管、肝臓、脾臓、脳、生殖腺における局所的影響にも注意を払う必要があった。これに伴う病理組織学的検査は、組織内における NMs の存在や (細胞内) 分布を検出できる適切な技法と可能な限り組み合わせるべきであり、理想的には粒子の存在や組織・細胞内分布に関する定量的または半定量的な情報の取得が求められ、提供できない場合は報告書への正当な理由の記載が義務付けられていた。また、先行する STEP 3A の TK 試験で全身への移行性が否定された場合であっても、90 日間試験における消化管の病理組織学的検査による局所影響の検討は必須とされていた。なお、ADME 試験で吸収が確認され、他に追加試験の必要性がなく、各分野別ガイダンスの追加要求もない場合には、リスク評価の基準点 (POD) として NOAEL や BMDL (ベンチマーク線量信頼上限値) の適用が可能とされていた。

サテライト群における ADME 評価に関しては、2 週間の短期投与後および 90 日間試験終了時に NMs の組織分布を測定することとされ、望ましくは 2 週間投与後に 4

週間の排泄期間を設けた動物での組織分布測定も推奨されていた。一般に NMs は数分以内という極めて迅速な速度で組織に取り込まれるため、血中濃度情報の価値は限定的となる場合があるものの、半減期、AUC、バイオアベイラビリティ、 C_{max} 、 T_{max} といった TK 血漿パラメータの概算値を測定しておくことが推奨されていた。体内動態として、NMs は MPS に取り込まれるため一般に肝臓や脾臓へ分布し、腎臓、骨髄、肺、脳、心臓などへの分布は比較的少ないとされる一方で、腸壁内、特にパイエル板の上皮細胞や免疫担当 M 細胞における粒子の保持を識別することが重要な決定要因とされていた。したがって消化管においては、腸管関連リンパ組織 (GALT)、とりわけパイエル板と腸間膜リンパ節が、潜在的な NMs の蓄積やそれに伴う免疫反応に関与する重要部位として位置づけられていた (セクション 7.6)。

<STEP 4>

より高次の局所的及び全身的毒性試験 (EFSA ガイダンス §7.8.)

マテリアルの吸収に関する証拠および 90 日間反復投与毒性試験の結果は、高次の評価段階である STEP 4 へ移行するためのトリガーとして位置づけられていた。本ステップでは、規定された各エンドポイントに関する詳細な試験が実施されるが、メカニズムおよび作用機序の検討は、リスク評価の枠組み分析の一環として、試験動物で観察された毒性変化のヒトへの関連性を判断することを目的としていた。また、本ステップの試験において動物の主要組織から得られる NMs 濃度は、内部曝露に関する直接的な情報としてリスク判定に供されることとされていた。さらに、得られた組織の一部を

分析して特定の関連組織における NM_s 濃度を測定することは、試験結果のより確実な解釈や評価に活用可能であるとされていた。

ターゲットを絞った詳細な ADME 試験 (EFSA ガイダンス §7.6.3.)

STEP 4 においては、反復投与による影響、およびそれが NM_s の定常状態や蓄積へと至るか否かを評価するため、追加の TK 試験の必要性が示されていた。このような状況下では、実験動物において観察された動態をヒト試験で検証することが求められる可能性があり、さらに、年齢、生理状態、疾病状態などが NM_s の TK 挙動に影響を及ぼすことが懸念される場合にも、追加試験が必要とされるケースがあることが明記されていた。

慢性毒性及び発がん性 (EFSA ガイダンス §7.8.1.)

単一の種 (通常はラット) を用いて実施される慢性毒性試験 (OECD TG 452)、発がん性試験 (OECD TG 451)、あるいは慢性／発がん性併合試験 (OECD TG 453) の実施が可能であるとされていた。また、別の動物種における発がん性試験については、第一選択動物種で得られた結果が不明確な場合や、種特異的な知見、あるいは作用機序等を検証する目的において、必要となる可能性が示されていた。

生殖発生毒性 (EFSA ガイダンス §7.8.2.)

生殖発生毒性試験の実施要否については、既存情報や STEP 3 で得られた毒性データおよび TK 情報に基づき検討する必要性が示されており、NM_s によっては血液・精巢

関門や胎盤関門を通過するとの報告 (Brohi et al., 2017) も存在していた。STEP 4 において同試験の実施が必要となる具体的なケースとしては、STEP 3 の TK 試験により被験物質が実験動物またはヒトの全身に分布する可能性が疑われる場合や、全身的な影響がないと推定される物質であっても 90 日間反復経口投与毒性試験で生殖器官や関連パラメータへの影響が示された場合、さらには吸収が極めて低い事例であっても同 90 日試験の組織分布データから被験物質が生殖器官へ到達していることが示された場合が挙げられていた。また、利用可能な試験法としては出生前発生毒性試験 (OECD TG 414) や拡張一世代生殖毒性試験 (EOGRTS: OECD TG 443) が規定されており、より特異的なエンドポイントを予備評価するための追加群は定常的に EOGRTS へ組み込むべきとされていたほか、神経毒性および免疫毒性に関する十分な情報が揃っている場合には、EOGRTS の代わりに多世代試験を適用することも許容されていた。

免疫毒性 (EFSA ガイダンス §7.8.3.)

従来のバルク材料とは異なり、NM_s はハプテンとしてタンパク質と結合した後に免疫原性を獲得する可能性や、アジュバントとして作用する可能性が指摘されていた。例えば、アルミニウムの NM_s は非ナノサイズの同化合物とは異なる免疫学的影響を示す可能性があり、他の免疫原や抗原を粒子表面に結合させて免疫細胞へ運ぶ「トロイの木馬」として機能するケースも挙げられており、これらの免疫毒性に関する知見や評価法のガイダンスは WHO および IPCS の出版物 (WHO and IPCS, 2019) に記載さ

れていた。既存の 90 日間試験、慢性・発がん性試験、あるいは EOGRTS 試験には、免疫毒性や免疫調節作用の指標となる各種パラメータ（脾臓・胸腺の重量変化、骨髄・リンパ節・パイエル板等の病理組織学的変化、血清総タンパク、アルブミン／グロブリン比、総白血球数および分化白血球数など）の調査が含まれており、これらにより免疫系への影響が示された場合は、STEP 4 においてケースバイケースでメカニズムや生物学的意義を解明するための追加試験（特殊な機能的、機構的、疾患モデル的試験）を WHO および IPCS の原則に基づき検討する必要性が示されていた。なお、経口曝露後のアレルギー反応を評価するバリデートされた動物試験は未確立であるため、NMs 自体が潜在的アレルゲンである場合などは遺伝子組み換え作物に関する EFSA ガイダンスの原則（構造調査、*in silico*、IgE 結合、細胞ベースの方法、分析プロファイル技術、動物モデル等：EFSA GMO Panel, 2010; EFSA NDA Panel, 2014）に従い、複数の試験法を組み合わせた証拠の重み付け（Weight of Evidence）アプローチにより評価すべきとされていた。

神経毒性（EFSA ガイダンス §7.8.4.）

潜在的な神経毒性作用の指標については、改訂 90 日間毒性試験（STEP 3B）における臨床徴候、機能観察バッテリー、運動活性の変化、脳重量変化、病理組織学的変化などから得ることができ、ここで神経毒性の可能性が示唆された場合には、さらなる神経毒性試験（OECD TG 424; OECD TG 426）の実施を検討すべきであると言及されていた。

内分泌系への影響（EFSA ガイダンス §7.8.5.）

また、一部のナノ粒子が内分泌系（特に雌雄の生殖器系）に悪影響を及ぼす証拠は存在するものの（Iavicoli et al., 2013; Larson et al., 2014）、その作用機序は依然として未解明な部分が多く、さらなる調査が必要とされていた。この内分泌作用を調べる出発点は改訂 90 日毒性試験（OECD TG 408）の試験設計であり、評価にあたっては ECHA/EFSA のガイダンス（ECHA/EFSA, 2018）や OECD のガイダンス文書（OECD, 2018b）を考慮し、内分泌関連組織の剖検・病理組織評価や、オプションとしての発情周期の評価といった追加パラメータの導入が重要であると解説されていた。

腸内細菌叢に及ぼす影響（EFSA ガイダンス §7.8.6.）

ナノ粒子が腸内細菌叢に及ぼす影響に関しては、動物モデルを用いた *in vivo* 試験やヒト微生物叢を用いた *in vitro* 試験の報告数が増加しており（Lamas et al., 2020）、NMs が腸内微生物組成に影響を与える可能性が示されているものの、その基盤となるメカニズムやヒトの健康への影響には不明な点が多いとされていた（Bouwmeester et al., 2018）。特に抗菌作用を有する不溶性または難溶性の金属・金属酸化物等の NMs については、吸収を伴わない場合であっても微生物叢、粘液、および免疫の組成・機能への相互作用を考慮する必要性が指摘されていた（Lamas et al., 2020）。評価アプローチとしては、*in vitro* 腸管モデルから通常の動物モデル、さらには無菌モデルへと進む段階的手法が挙げられており、予備試験や改訂 90 日間 *in vivo* 試験を通じて腸内恒

常性への影響評価や微生物の不均衡に起因する全身の有害影響の特定が可能であるとされていた。また、ヒト微生物叢や NM_s 曝露により破壊された微生物叢を接種したげっ歯類モデルは、誘発された腸内細菌叢の特徴と関連疾患との因果関係を解明する有用なツールとして位置づけられていた。

リーダクロス (EFSA ガイダンス §7.9.)

同一の化学組成であっても粒子径、結晶形、形状、表面特性等の違いにより多様な形態が存在する NM_s のリスク評価において、既存のデータを用いて他形態のデータギャップを埋めるリーダクロスの適用可能性が示されていた。ただし、その科学的妥当性を担保するには、起源とターゲットとなる材料間で物理化学的特性や TK 的挙動、有害性ポテンシャルの類似性を詳細に実証する必要があるとされていた。現状ではデータギャップの存在からリーダクロスの適用性は限定的であり、立証には実験データの追加が必要となるケースが多いと予想されていた。そのため、物理化学的特性の変化が TK プロファイルや有害性に及ぼす影響を解明するための系統的な毒性試験の実施が推奨されており、リーダクロスの適応による動物試験の免除可否はケースバイケースで判断される方針が示されていた。

試験及び評価の統合的アプローチ (EFSA ガイダンス §7.10)

さらに、試験と評価の統合的アプローチ (IATA) の構築において、リスク評価への AOP (毒性発現経路) の活用が促進されていた。十分な安全性情報が得られることを前提に代替手法の適用が推奨されており、新しいアプローチや方法論 (NAM_s) の導入

は動物実験の削減や代替 (3Rs) の達成、および生体システムとの相互作用の理解に寄与するとされていた。NM_s は多様な物理化学的特性が曝露や TK、ハザードに複雑に影響するため、効率的な情報取得の必要性が高く、統合的試験戦略 (ITS) の概要開発が進められているものの、依然として知識ギャップが多く国際的な調和 (標準化) には至っていないため、ITS や AOP のさらなる開発と検証が必要であると結論づけられていた。

C.2. EFSA ワークショップにおける毒性試験法に関する討論の情報収集

2025 年 6 月 11 日および 12 日に開催された EFSA 主催のワークショップでは、2021 年公表の「ヒトと動物の健康のためのナノ物質リスク評価に関するガイダンス」と「粒子技術要件に関するガイダンス」を単一のガイダンスへ統合する計画が示され、最新の科学的知見を反映させるための議論が行われた。同ガイダンスの更新計画は 3 段階のフェーズからなり、第 1 段階で既存ガイダンスの統合と NAM_s の使用に関する明文化、第 2 段階で環境リスク評価や先端材料等の科学的更新、第 3 段階で EFSA の進行中プロジェクトから得られた NAM_s の実施知見の反映を行う作業計画が提示された。

ナノ材料の毒性評価における論点として、外部曝露量のみならず、体内に実際に取り込まれた粒子量である内部被ばくの定量化の重要性が強調された。特に遺伝毒性試験においては、曝露確認の欠落が偽陰性 (誤って陰性とみなされる可能性) を生み信頼性を損なうため、投与マトリックスによる分散・凝集性の変化や、高用量域での凝集に伴う吸収量減少のリスクを考慮した特性評価

が重要であるとされた。しかし、組織・臓器中の極微量な粒子測定には技術的限界があり、ICP-MS、単粒子 ICP-MS、電子顕微鏡 (STEM/SEM-EDX) 等の精密分析を用いても、前処理によるアーティファクトや有機系ナノ粒子の画像化・定量の困難さが課題として挙げられた。さらに、粒子の存在と細胞レベルでの毒性マーカー (例: γ H2AX) との因果関係立証の難しさや、組織全体の平均値ではパイエル板等の局所的な取り込みを見落とす懸念、および「検出限界未満」と「吸収ゼロ」の間の解釈のギャップなど、方法論の標準化と意思決定基準の整備の必要性が議論された。

また、酸化チタン (E171) を例とした組織内分布の議論では、ナノ粒子が小腸のパイエル板やM細胞へ局所的に集積する一方で、全身循環 (血液) からはほぼ検出されないという「局所的な高濃度」と「全身的には極微量」の二面性が毒性解釈を難しくしている現状が示された。感染症罹患時には免疫細胞を介して異なる移行経路をたどるなど、単純な吸収モデルでは説明できない複雑さも指摘された。共焦点顕微鏡や STEM/EDX を併用して細胞単位の粒子位置と DNA 損傷指標 (γ H2AX) を重ね合わせる高度な画像解析法が紹介されたものの、組織全体の平均値測定に対する批判や、有機系・生体系粒子への無機分析手法の不適用といった課題から、粒子の性質に応じたディシジョンツリー型アプローチの必要性が提起された。実務上の課題としては、現行ガイダンスにおける表面特性評価や電子顕微鏡、動的光散乱 (DLS) の適用条件の不明確さが指摘され、植物由来等の天然ナノ粒子の扱いを含め、新規食品等の審査におけるハードルとなっている現状が共有された。90 日間毒

性試験での超音波処理等の非現実的な分散条件の改善に向けた標準化試験計画書の必要性や、不必要な動物試験を回避するために NAMs を先行させる方針が確認された。さらに、FDA、SCCS、EFSA などの国際的な規制機関間における技術的方向性の相違を解消する規制調和の重要性が示され、EFSA 側からはヘルプライン設置や事前相談拡充など、利害関係者との連携強化案が提示された。

リスク評価戦略における NAMs の統合に関しては、3R 原則 (動物実験の改善、削減、代替) を遵守しつつ、既存の動物試験ガイドラインが利用できないナノ材料評価を補完する有効性が焦点となった。現在、OECD 試験ガイドラインに組み込まれている検証済み NAMs は限定的であるものの、規制用途において科学的に妥当な非ガイドライン手法の活用は可能であり、EFSA ナノガイダンス (2021a) でも統合的試験・評価アプローチ (IATA) および証拠の重み付け (WoE) の重要性が強調されている。この導入を推進するため、EFSA は欧州委員会合同研究センター (JRC) 等と連携した探索的プロジェクト「NAMs4NANO」を開始しており、EMA や米国 FDA の知見を活用した NAM の適格性評価システムの開発を進めていることが報告された。このシステムは専門家判断を基盤として NAMs の迅速な規制導入を支援するものである。参加者間の議論では、非ガイドライン NAMs の統合方法や利用障壁について話し合わせ、前処理や解析手順まで開示した再解析可能なデータ共有、sp-ICP MS や画像データへの AI 等の先端解析の活用、科学的妥当性と規制対応可能性を評価する資格認定システムの構築などが提案された。一方で、NAMs を GLP 環境

で実施する実現可能性や業界の関連コストといった実務面の負担とのバランスをどう折り合わせるかが現実的な課題として認識され、科学的に妥当な NAMs を迅速に受容するための資格認定システムへの支持が強調された。

C.3. OECD ナノマテリアル作業グループ (WPMN) における試験法関係の議題の情報収集

OECD の WPMN (ナノ材料作業部会) に関し、ナノ材料に関する様々なプロジェクト、ガイダンス文書、および試験ガイドラインの策定状況等を協議するため、2025 年 6 月 17 日から 18 日にかけて対面会合が開催された。同会合では、物理化学的特性、環境運命、ヒト健康影響に関する加盟各国の活動 (Tour de Table 文書) やプロジェクト方針のほか、試料調製・用量測定、グループ評価に関するガイダンスの進捗が議論された。さらに、ナノ材料のグループ化と先端材料への対応に関するイニシアチブ、安全で持続可能な設計 (SSbD) アプローチ、先端材料の早期認識・対応のためのシステムツールの開発状況が報告された。

食品関連の NM 評価における欧州の動向としては、EFSA (欧州食品安全機関) が 2021 年公表のナノガイダンスの実施に向けた活動を継続しており、実際の事例適用や利害関係者との協議に基づき、ナノ特有の評価課題に対応するためのガイダンス更新作業を開始したことが報告された。また、EFSA では動物実験代替法 (NAM) をナノ特異的リスク評価に統合することを目指す「NAMs4NANO」プロジェクトを、ドイツ、オランダ、イタリアの政府機関を中心に 3 つのロット構成で推進している。ドイツ連

邦リスク評価研究所 (BfR) が統括する第 1 ロットでは、EFSA の NAMs ロードマップを補完する 2 つの文書が発表され、最初の文書では分解・溶解、遺伝毒性、細胞毒性、酸化ストレス、炎症、バリア保全性を評価する規制関連 NAMs のレビューがなされ (Usmani et al. 2024)、第二の文書ではガイドライン未収載の NAM に対する適格性評価システムが提案された (Haase et al. 2024)。このシステムは、専門家パネルの意見に基づき NAM を「適格な用途」として定義することで、ケースバイケースの再評価を不要とし、規制当局による妥当性評価や最適化支援、規制実施を促進する実用的なツールとして位置づけられていた。

同じく BfR がコーディネートする第 2 ロットでは、既存評価のデータギャップ解消を目的に、酸化亜鉛、二酸化ケイ素、酸化鉄、ナノシルバー、酸化銅を対象とした 5 つのリスク評価ケーススタディが実施され、第 1 ロットのレビューに基づく NAMs の検証と適格性評価システムを用いた規制上の成熟度評価が進められた。第 3 ロットはイタリア国立衛生研究所 (ISS) の統括のもと、農薬活性物質を担持したナノキャリア (CS1)、ナノファイバー (CS2)、消化管内エージングの模倣方法論 (CS3)、脆弱な集団を代表する腸管バリアの疾患モデル (CS4)、および全身臓器の *in vitro* モデル (CS5) に関する 5 つの方法論的ケーススタディが実施された。また、オランダ公衆衛生研究所 (RIVM) も同プロジェクトに参画し、ナノ銀やナノファイバー、単純な生物モデルの (共同) 委員長として、リスク評価における関連問題を検証するための統合的アプローチ (IATA) の開発を主導していることが紹介された。

さらに、イタリアが主導する「経口摂取されたナノ材料の腸管 *in vitro* 試験に関するガイダンス文書 (Guidance Document for *in vitro* testing of the intestinal of ingested nanomaterials)」については、2026 年 4 月の承認に向けて策定が進められていた。同ガイダンス文書は、経口胃腸管 (OGI 管) における溶解等の生体変換プロセスを評価するための構造化された枠組みを提供するものであり、*in vitro* 消化モデルと腸管バリアモデルの選択および適用に関する実践的な推奨事項が組み込まれていた。その詳細として、第 2 章ではリスク評価や *in vitro* 試験用の前処理サンプル調製といった意図された用途に基づく *in vitro* 消化モデルの選択推奨事項が提供され、生理学的に関連するヒトの条件や検証済み模擬液の使用の重要性が強調されていた。続く第 3 章においては、*in vitro* 腸管バリアモデルの使用に関するガイダンスが示されており、NMs の取り込みと移行を調査するための適切なモデルとして三層培養モデル (Caco-2/HT29-MTX E12/Raji B 細胞) が提案されるとともに、データの再現性向上に向けた標準化の必要性が指摘されていた。

WPMN のサブグループである SGTA (試験及び評価の運営グループ) の進捗としては、サンプル調製と測定に関するガイダンス (GSPD) の最終ドラフトが承認され、その後 2025 年 8 月 4 日に公開された。併せて、化学物質のグループ評価に関する OECD ガイダンス (第 3 版) の改定状況が報告され、AOP、オミクス、HTS、(Q)SAR 等の最新のメカニズム情報を活用したグループ化手法の盛り込みやナノ材料への対応拡張が示された。ハザード評価作業グループ (WPHA) での最終化に向け、ドイツ、

オランダ、BIAC から提出された追加コメントに基づき、「バルク化学品」という曖昧な用語の使用回避や、現状の技術水準のレビュー文書である旨の明記がナノ材料セクション内になされることとなり、同ガイダンスは 2025 年 10 月 30 日に公開された。

D. 考察

NMs の毒性試験設計においては、媒体中における粒子の凝集や脱凝集といった動的な物理特性の制御、および経時的な安定性のモニタリングが最重要課題である。NMs は粒子濃度の上昇に伴い凝集が促進され、実際の個々のナノ粒子への曝露レベルが低下するという非線形性を示すため、リスク評価の観点からは、構成粒子が完全に分散した最も有害性が発現しやすい状態での試験実施が原則となる。一方、強い共有結合等で融合した会合体を対象とする場合は、通常の条件下で消費者が曝露する可能性のある最も解砕された状態での設計が必要となり、いずれのケースにおいても、適切な分散プロトコルの設定と結果の信頼性評価が不可欠である。用量指標としては、現時点で実用的な質量濃度を基本としつつも、必要に応じて個数粒度分布や密度、比表面積などの多角的な指標を考慮することが有効と考えられる。また、ヒトの予測最大曝露量や不確実性因子をカバーするための高用量設定と、用量依存的な凝集に伴う実際の粒子曝露量の低下という矛盾への対応は、安全性試験における大きな難題である。分散液の安定性評価や細胞・組織レベルでの実際の曝露確認を欠いた高用量試験は、ハザードの同定や特性解析において不十分となるリスクが高いため、バリデートされた標準操作手順書 (SOP) に基づく経時的なコロイド安定性の測定・報告や、各用量における分散度の個別評価

が極めて重要である。さらに、*in vivo* での TK 評価や *in vitro* での細胞内取り込みの直接確認を組み合わせることで、実際の曝露量を正確に推定し、結果の信頼性を高めるアプローチが強く推奨される。あわせて、NMs 特有の作用機序を解明するためには、対応する非ナノ材料（バルク体）を比較対照群として並行評価する試験デザインの構築が必要である。生体組織内における動的な現象として、粒子表面への生体分子コロナ（プロテインコロナ）の形成が粒子の凝集・沈降挙動やマクロファージを介したクリアランスに深く関与していることも重要視すべきである。現時点ではその測定や解釈に技術的限界が存在するものの、NMs の生物学的同一性を左右する要因として今後の評価において無視できない因子である。総じて、これらの複雑なナノ特有の因子を網羅した詳細な試験レポートは、規制的文脈での文献活用において不可欠であり、国際的な評価基盤の調和に向けて、提案されている最小限の情報基準（Minimal Information Standards）等に準拠した厳密なデータ記録と報告体制の確立が求められる。

2021 年に公表された主要ガイダンスを統合する EFSA の計画は、最新の科学的知見を反映させつつ規制評価を合理化する上で重要である。特に NAMs の段階的な明文化は、今後の国際的なナノ材料評価の基準になり得るため、その進捗を国内の評価基盤へ迅速に反映する体制の構築が必要である。これに関連し、ハザード評価における「内部曝露（組織・細胞内濃度）」の定量化は、遺伝毒性試験等の偽陰性を排除し信頼性を担保する上で不可欠と考えられる。しかし、極微量な粒子測定には技術的限界があり、組織全体の平均値解析では局所的な集積を見落とすリスクが懸念され

る。これに対し、細胞単位の粒子位置と DNA 損傷指標を重ね合わせる高度な画像解析や、粒子の特性に応じたディシジョンツリー型アプローチの導入は有効な解決策となり得る。

一方で、実務面では表面特性評価等の適用条件の曖昧さが審査の障壁となっている現状がある。90 日間毒性試験における非現実的な分散条件を改善し、実態に即した標準化試験計画書を整備することは急務である。また、国際機関間の規制調和や事前相談体制の拡充が強く望まれる。さらに、リスク評価への NAMs の統合は、3R 原則の遵守において必須の方向性である。検証済み手法が限定的な現状であっても、科学的妥当性のある非ガイドライン手法を統合的アプローチ（IATA）等で活用する重要性が示唆される。EFSA が推進する「NAM の適格性評価システム」は、専門家判断を基盤にケースバイケースの再評価を不要とし、迅速な規制導入を支援するツールとして期待される。今後は、データ共有や先端解析の適合が課題となるが、GLP 対応や業界のコスト負担といった実務面とのバランスを考慮し、科学的妥当性と受容環境の整備を両立させることが求められる。

国際的な枠組みに目を向けると、OECD の WPMN による試料調製やグループ評価に関する国際ガイダンスの改定は、ナノ・先端材料におけるリスク評価の国際調和を牽引するものとして高く評価される。特に「化学物質のグループ評価に関する OECD ガイダンス（第 3 版）」に AOP やオミクス等の最新メカニズム情報が統合され、ナノ材料対応が拡張されたことは、効率的なリードアクロス推進に強固な科学的基盤を提供するものである。また、曖昧な用語を排し、技術水準のレビュー文書としての位置づけを明確にした点も、規制文

書の正確性を担保する上で重要と考えられる。

欧州の「NAMs4NANO」プロジェクトは、独・蘭・伊の政府機関が連携し、理論レビューからケーススタディ、先進的方法論の構築までを包括している点で極めて先進的である。なかでも提案された「NAMの適格性評価システム」は、特定の規制コンテキストにおける信頼性を専門家パネルが担保する仕組みであり、ケースバイケースの再評価に伴うリソースの浪費を防ぎ、規制実施を促進する実用ツールになり得る。さらに、消化管内エージングの模倣や腸管バリア疾患モデルの構築などは、実際の生理条件を高精度に反映した有害性評価を可能にするものであり、国内の評価体系に代替法をインテグレートしていく上での重要なベンチマークになると推察される。また、イタリアが主導し 2026 年 4 月開催のテストガイドラインプログラム各国調整官作業部会 (WNT: Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines programme) での承認に向けて策定が進む「経口摂取されたナノ材料の腸管 *in vitro* 試験に関するガイダンス文書」は、経口胃腸管における生体変換プロセスを評価する枠組みであり、今後の重要な技術的指針となることが期待される。生理的条件を重視した消化モデルの選択や、三層培養モデルを用いた取り込み・移行調査は、データの再現性向上と方法論の標準化を大きく前進させる要素である。今後は、これら国際的な適格性評価の知見や標準化プロトコルを我が国の規制現場へ調和・導入していくことが課題であり、国際連携を通じた技術的検証と規制実装の議論を加速させることが不可欠であると考えられる。

E. 結論

今後の欧米における食品関連物質の NMs 評価動向は、これまでの網羅的なハザード同定から、動的な分散・凝集特性を制御した高精度な *in vitro* / *in vivo* 試験デザインの構築や、最新の生体変換プロセスを反映した次世代腸管バリアモデルの標準化へと移行していくものと考えられる。さらに、国際機関における規制調和の進展に伴い、NAMs を統合的試験・評価アプローチ (IATA) へ実装するための適格性評価システムの運用や、毒性発現経路 (AOP) を活用した効率的なグループ化 (リードアクロス) の具現化に関する議論が中心となっていくことが見込まれる。したがって、我が国における新規素材の安全性評価基盤の整備に向けては、これら国際的な技術水準の更新や標準化プロトコルの動向を迅速に捉え、国内の審査・評価体系へと調和・導入していくための技術的検証を加速させることが極めて重要であると考えられる。

<参考文献>

- Bouwmeester H, *et al.*, 2018. Effects of food-borne nanomaterials on gastrointestinal tissues and microbiota. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, e1481.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1481>
- Brohi RD, *et al.*, 2017. Toxicity of nanoparticles on the reproductive system in animal models: a Review. *Front Pharmacol*, 8, 606.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00606>
- ECHA, 2017. Guidance on information requirements and chemical safety assessment: Appendix R7-1 for nanomaterials. Version 2.0.
- ECHA/EFSA, 2018. Guidance for the identification of endocrine disruptors. *EFSA J*, 16(6):5311.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5311>
- EFSA GMO Panel, 2010. Scientific opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and

- feed. *EFSA J*, 8(7):1700.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1700>
- EFSA NDA Panel, 2014. Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purpose. *EFSA J*, 12(11):3894.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3894>
- EFSA Scientific Committee, 2021a. Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health. *EFSA J*, 19(8):6768.
- EFSA Scientific Committee, 2021b. Guidance on technical requirements for regulated food and feed product applications to establish the presence of small particles. *EFSA J*, 19(8):6769.
- Faria M, *et al.*, 2018. Minimum information reporting in bio–nano experimental literature. *Nat Nanotech*, 13, 777–785.
<https://doi.org/10.1038/s41565-018-0246-4>
- Haase A, *et al.*, 2024. Proposal for a fit for purpose qualification system for New Approach Methodologies (NAMs) in the food and feed sector. *EFSA supporting pub*, 21(9):EN-9008.
doi:10.2903/sp.efsa.2024.EN-9008
- Iavicoli I, *et al.*, 2013. The Effects of Nanomaterials as Endocrine Disruptors. *Int J Mol Sci*, 14, 16732–16801.
- Lamas B, *et al.*, 2020. Impacts of foodborne inorganic nanoparticles on the gut microbiota-immune axis. *Part Fibre Toxicol*, 17, 19.
<https://doi.org/10.1186/s12989-020-00349-z>
- Landsiedel R, *et al.*, 2012. Toxicology/biokinetics of nanomaterials. *Arch Toxicol*, 86, 1021–1060. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0858-7>
- Larson JK, *et al.*, 2014. Engineered nanomaterials: an emerging class of novel endocrine disruptors. *Biol Reprod*, 91, 20.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116244>
- Meek ME, *et al.*, 2013. New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS framework on mode of action/species concordance analysis. *J Appl Toxicol*, 34, 1–18.
<https://doi.org/10.1002/jat.2949>
- OECD, 1997. Test No. 424: Neurotoxicity Study in Rodents. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.
<https://doi.org/10.1787/9789264071025-en>
- OECD, 2001. Test No. 414: Prenatal Development Toxicity Study. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.
<https://doi.org/10.1787/9789264070820-en>
- OECD, 2007. Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.
<https://doi.org/10.1787/9789264067394-en>
- OECD, 2009a. Test No. 451: Carcinogenicity Studies. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.
<https://doi.org/10.1787/9789264071186-en>
- OECD, 2009b. Test No. 452: Chronic Toxicity Studies. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.
<https://doi.org/10.1787/9789264071209-en>
- OECD, 2009c. Test No. 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.
<https://doi.org/10.1787/9789264071223-en>
- OECD, 2010. Test No. 417: Toxicokinetics. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.
<https://doi.org/10.1787/9789264070882-en>
- OECD, 2012. Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.
<https://doi.org/10.1787/9789264185371-en>
- OECD, 2017. Recommendation of the Council on the Safety Testing and Assessment of Manufactured Nanomaterials. *OECD/LEGAL/0400*.
- OECD, 2018a. Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*.
<https://doi.org/10.1787/9789264070707-en>
- OECD, 2018b. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. *OECD Series on Testing and Assessment*.
<https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>
- SCCS, 2019. Guidance on the Safety Assessment of Nanomaterials in Cosmetics. SCCS/1611/19.
- Usmani SM, *et al.*, 2024. Review of New Approach Methodologies for Application in Risk Assessment of Nanoparticles in the Food and Feed Sector. *EFSA supporting pub*, 21(9):EN-8826.
doi:10.2903/sp.efsa.2024.EN-8826
- WHO and IPCS, 2019. Principles and methods to assess the risk of immunotoxicity

associated with exposure to nanomaterials.
Environmental Health Criteria, 244.

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Ishigamori R, Ohno A, Fukuhara K, Hasegawa S, Totsuka Y, Genotoxicity assessment of mesoporous silica and graphene oxide in GDL1 cells. *Genes Environ.* 2026;48:2.
<https://doi.org/10.1186/s41021-025-00350-y>

F.2 学会発表

1. 大野彰子, 赤木純一, 爲廣紀正, 広瀬明彦, 小川久美子: 食品等に含まれる NMs に関する国際的な安全性評価への取り組み, 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.4, 沖縄)
2. Ohno A, Okiyama Y, Iijima K, Ashikaga T: Relationship analysis between the effects of MWCNTs on THP-1 cells and their physical properties, American Chemical Society (ACS) Fall 2025 (2025.8.19, Washington DC, USA)
3. 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: イオン溶出および細胞内取り込みに着目した酸化亜鉛ナノ粒子による THP-1 細胞活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1, 横浜)
4. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: シリカナノ粒子による THP-1 細胞活性化における酸化ストレスと吸着イオンの影響, 日本動物実験代替法学

会 第 38 回大会 (2025.11.2, 横浜)

5. 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: イオン溶出および細胞内取り込みに着目した酸化亜鉛ナノ粒子による THP-1 細胞活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1, 横浜)
6. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: シリカナノ粒子による THP-1 細胞活性化における酸化ストレスと吸着イオンの影響, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.2, 横浜)
7. 石ヶ守 里加子, 大野 彰子, 戸塚 ゆ加里, マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンストマテリアルの包括的毒性評価, 日本環境変異原ゲノム学会大 54 回大会 (2025.11.22, 静岡)
8. 大野彰子, アドバンストマテリアルを利用した医薬品・医療機器等の安全性評価に資する研究, 第 10 回日本医療研究開発機構レギュラトリーサイエンス公開シンポジウム (2025.12.3, 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

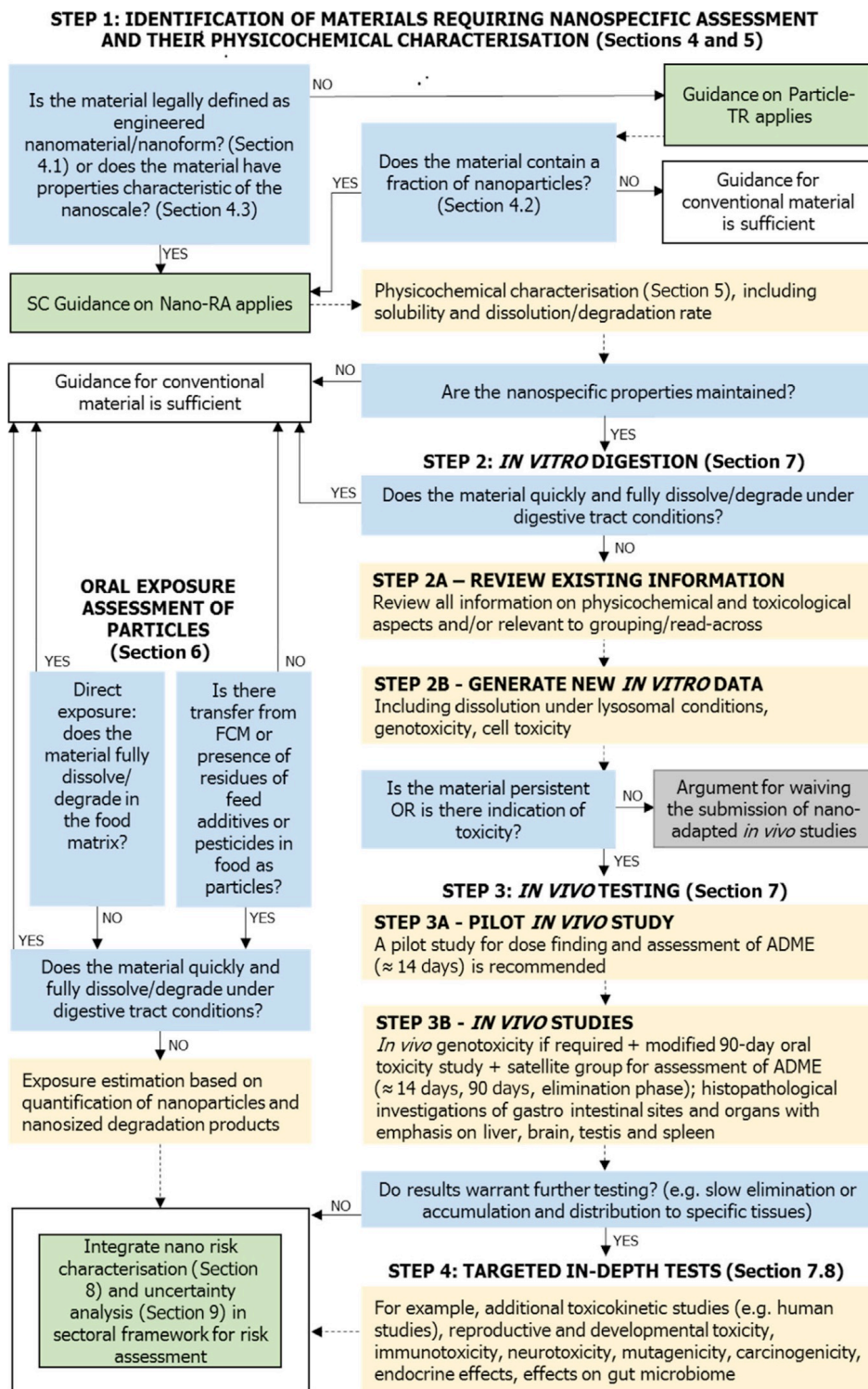


図 1. Schematic outline for the implementation of the SC Guidance on Nano-RA
(EFSA ナノガイダンスの Figure 2 より)