

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
総括研究報告書(令和7年度)

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

研究代表者 小川久美子

星薬科大学 毒性学研究室 教授

研究要旨

二酸化チタン (TiO_2) は医薬品添加剤、食品や化粧品など多様な用途で用いられているが、ナノ粒子 (少なくとも一次元が 100 nm 未満の粒子) を含む TiO_2 は EU において食品添加物としての使用が禁止されるなど、安全性が議論されている。そこで本研究では結晶子径の異なる TiO_2 を用いて、毒性影響および生体内動態について検討を行った。90 日間反復経口投与後に 8 週間の回復期間を置き、生体内に取り込まれた TiO_2 の排出性を検討した。その結果、90 日間の投与終了時および 8 週間休薬後のいずれの時点においても、全ての TiO_2 投与群で肝臓および全血中チタン量の増加は見られなかったことから、以前の実験で 180 nm 群に見られた肝臓中チタン濃度の増加は一貫して観察され得る頑健な所見ではなく、経口投与された TiO_2 の全身移行は結晶子径に関わらず極めて限定的であると考えられた。これに対して、パイエル板においては 8 週間投与休止後においても観察した全ての個体で TiO_2 粒子が観察された。一方で、粒子沈着部位における $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IFN-}\gamma$ および $\gamma\text{-H2AX}$ 等の免疫染色像は対照群と同様であり、長期間の TiO_2 粒子沈着に伴う過剰な免疫活性化や炎症誘発性 DNA 損傷を示す所見は見られなかった。これらの結果から、 TiO_2 は投与休止後も生体反応をほとんど誘導せずパイエル板に残存する一方で、肝臓および全身循環への移行は限定的であることが示され、パイエル板は TiO_2 を隔離する生物学的障壁として機能すると考えられた。

また、ナノ酸化チタンの安全性評価に資するデータを蓄積することを目的とし、ナノ酸化チタンの経皮/経口ばく露が食物アレルギーに与える影響を検討する。初年度の検討において、ナノ酸化チタンを抗原と同時に経皮的にばく露したマウスでは、リンパ節に局在する抗原提示細胞のサブポピュレーションに変化が生じることが確認された。この結果を踏まえ、ナノ酸化チタンを抗原と同時に経口摂取した際の影響について検討を行ったが、抗原を経口摂取した際に誘導される免疫寛容には有意な変化は認められなかった。しかし一方で、ナノ酸化チタンの経口摂取により一部の免疫細胞が影響を受ける懸念が示された。そこで今年度は、ナノ酸化チタンの経口摂取が食物アレルギーに及ぼす効果と、免疫細胞に与える影響について解析を実施した。その結果、ナノ酸化チタンの経口ばく露は、主要なバルクの免疫細胞集団に対して有意な影響を与えず、食物アレルギー症状についても顕著な増悪効果を示さないことが示唆された。しかし、抗原惹起による体温低下をわずかに抑制する傾向を認め、また、一部の免疫細胞ではサイトカインの産生が変動する可能性が示されたことから、ナノ酸化チタンが免疫系に及ぼす影響については、今後も詳細な科学的知見の集積が必要であると考えられた。

さらに、本研究では、食品関連分野におけるナノマテリアル (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した。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全身毒性に焦点をあて、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。

キーワード：ナノマテリアル、二酸化チタン、経口、経皮、毒性試験、国際動向

研究分担者：赤木純一

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

研究分担者：爲廣 紀正

国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長

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

研究協力者 田口 千恵

国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究
官

A. 研究目的

ナノマテリアル等の新規素材は、様々な用途での応用が期待される一方で、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。また、我々の実験動物を用いたナノ銀の先行研究でもサイズによって暴露後の生体反応が異なることが明らかとなった (Cho et al, J Toxicol Pathol. 2018)。近年、欧州食品安全機関の意見書に基づき、欧州委員会は酸化チタン(E171)の食品への添加を禁止した。しかし、酸化チタンは食品添加物のみならず様々な用途で用いられており、一律の禁止措置によって混乱が生じている。

本研究では、食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価方法及び評価データ、並びに関連する国際動向情報を蓄積し、適切な毒性評価法の提案及び特性に応じた試験上の考慮事項等の整理を目的とした。

我々のこれまでの研究で、結晶子径 6 nm のアナターゼ型二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子（二次粒子のメジアン径約 200 nm）をラットに 90 日間

反復経口投与試験したところ、投与に伴う有害影響は見られなかった一方で、凝集した TiO₂ 粒子の沈着が小腸パイエル板に認められたことから、経口摂取された TiO₂ が消化管から生体内に取り込まれることが示唆された (Akagi et al, Part Fibre Toxicol. 2023)。そこで本研究では結晶子径の異なる TiO₂ 粒子の生体内への取り込みと毒性影響を検討し、粒子径による生体影響の違いを明らかにすることを目的とする。令和 7 年度は、異なる結晶子径を持つ TiO₂ 粒子の消化管を介した組織への沈着について、13 週間の投与直後と、8 週間の投与休止後の TiO₂ 粒子の残存について量的・質的検討を行うとともに、免疫染色により免疫系の活性化シグナルの変動の有無について検討した。

また、

酸化チタンは着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・食品用容器包装に使用されているほか、多くの日焼け止め製品に配合されており、ばく露経路は経口に加え、経皮からの頻度も高い。ナノ酸化チタン経皮ばく露の影響に関しては、皮膚透過性試験や皮膚感作性試験等が行われているが、いずれも明らかな毒性作用は認められていない。他方、本課題の先行研究では、ナノ酸化チタンが食物アレルギーの経皮感作時に与える影響について検討し、粒子径 6 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンがモデル動物における抗原感作を増強すること、また、食物アレルギーモデルにおいて抗原摂食時にナノ酸化チタンが共存した場合、アレルギー症状が増強される可能性があること等を示している。

そこで、本分担課題では、安全性評価に資するデータの蓄積を目的とし、ナノ酸化チタン等が、経皮・経口ばく露による免疫系への影響を検討する。

令和7年度は、食物アレルギーモデルマウスにナノ酸化チタンを経口ばく露し、抗原惹起によるアレルギー症状に与える影響を検討した。

さらに、食品関連分野で使用・混入の可能性があるナノマテリアル（以下、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ことを目的とした。

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

B1. ナノ酸化チタン等ナノマテリアルの経口反復投与毒性と体内動態解析

B1-1. 生体内に取り込まれた TiO₂ の排出性検討のための反復経口投与

5 週齢の F344/DuCrj ラット雄 40 匹をジャクソン・ラボラトリー・ジャパンより購入し、基礎飼料（CRF-1；オリエンタル酵母工業，東京）および水道水にて 1 週間馴化飼育後、6 週齢で実験に供した。動物は温度 23±1℃、湿度 50±5%、換気回数 20 回/時、12 時間の明暗サイクルに制御されたバリアーシステムの飼育室で飼育した。床敷としてソフトチップ（三協ラボサービス，東京）を敷いたポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収容し、ケージおよび床敷を週 2 回の頻度で交換した。動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て、同所の定める「動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して行った。動物は投与開始日の各群の平均体重の標準偏差が最小になるように 1 群 10 匹からなる 4 群に分け、試験期間中は基礎飼料および水道水を自由摂取させた。

被験物質として、結晶子径 6、30、180 nm の TiO₂ を 1000 mg/kg 体重/日の用量で 13 週間強制経口投与した。投与は、ポリテトラフルオロエチレン製フレキシブルチューブ（長さ：85mm、外径：1.46mm、頭部：2.4 mm、フチガミ器械，向日）を用いて 0.2%リン酸水素二ナトリウムに懸

濁した TiO₂ を毎日 1 回投与した。実験期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重および摂餌量を週 1 回測定した。投与 90 日目に各群 5 匹をイソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った後、放血により安楽死させた。残りの 5 匹は 8 週間の投与休止を行った後、同様に剖検した。

B1-2. 肝臓中のチタン濃度再測定

肝臓、および全血中の Ti 濃度は一般財団法人日本食品分析センターに委託して、誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）により測定した。試料調製には硝酸を用いた Ultra WAVE 電子レンジ（マイルストーンゼネラル、川崎）消化を行った。チタンの汚染リスクを低下させるため分解液を PFA 製ビーカーに移し替えて濃縮を行い、その後 PP 製定容容器に移し替えを行なった。ICP-MS 測定は、Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて実施した。分析条件は、電波出力：1550W、キャリアガス：Ar、流量：15 L/min、コリジョンガス：O₂ (0.1 mL/min) + He (10 mL/min)、内部標準：¹⁰³Rh、ICP-MS 分析の対象元素は ⁴⁷Ti¹⁶O⁺であった。

B1-3. 免疫染色

肝臓および小腸の免疫染色では、pH 6.8 のクエン酸ナトリウム緩衝液（Daco）中でオートクレーブ（121℃、15 分）により抗原の賦活化を行なった。その後 3%過酸化水素水を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させ、10%ヤギ血清（γ-H2AX、TNF-α、および IFN-γ）または 10%ウサギ血清（IL-1β）を用いて室温で 30 分間ブロッキングした。一次抗体として γ-H2AX（Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA）：1000 倍希釈、IL-1β（Abcam, Cambridge, UK）：500 倍希釈、TNFα（Abcam）：200 倍希釈、IFN-γ（R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）：200 倍希釈を 4℃で一晩反応させ、適切な動物種のヒストファインシンプルステインラット MAX-PO を二次抗体として用い、3,3'-diaminobenzidine 化学発色により検出した。

B1-4. 統計学的処理

肝臓および全血中チタン濃度については Dunnett 検定により対照群と各被験物質投与群との間で有意水準 0.05 の両側検定により統計的有意差を判定した。統計解析には GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, United States) を使用した。

(倫理面への配慮)

動物実験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、国立医薬品食品衛生研究所実験動物倫理委員会の承認を得た上で、関係法令を遵守して実施した。動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置は倫理規定に十分配慮して熟練者が実施し、実験終了時、動物はすべてイソフルランの深吸入麻酔下で大動脈からの放血により安楽死させ、動物に与える苦痛を最小限に留めた。

B2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

試料及び試薬

被験物質としては、

表面未処理の酸化チタン C

(粒子径 6 nm・アナターゼ型)

を使用した。

抗原タンパク質としては、卵アレルゲンである卵白アルブミン (OVA; Sigma A5503) を用いた。その他の試薬は特級グレードのものを用了。

酸化チタンナノマテリアルの懸濁液調製

酸化チタンは、50 mg / mL の濃度で PBS に懸濁し、2.5 分間の超音波処理の後にボルテックスミキサーにより攪拌するというサイクルを 4 回繰り返し、最後に 25G 注射針付きのシリンジを用いて攪拌し均一化した。

ナノ酸化チタンの食物アレルギーに及ぼす影響に関する検討

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エ

スエルシー (株) より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業 (株))を給餌した。1 群の匹数は 6 匹とした。8 週齢時にゾンデを用いてナノ酸化チタンの経口投与を開始 (Day -7) した。9 週齢マウスの背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (2-4 µg / 50 µL) を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものをを用い、パッド部に 50 µL の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1 クールとし、4 クールの経皮感作を行った。Day-7 に部分採血し、Day 29 に OVA 50 mg を経口投与してアレルギー反応を惹起した。惹起 30 分間後にマウスの脾臓ならびにリンパ節を回収し、リンパ組織での免疫担当細胞の量的変動について FACS を用いて解析した。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計した。コントロール群 (V 群) を基準とした Dunnett の検定、あるいは Student t-test による OVA 投与群と OVA-ナノ酸化チタン投与群との有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理審査委員会の承認を得て行った。マウスへの検体の投与、採血等においては、動物の苦痛を最小限に留めるように努め、動物飼育・管理に当たっては研究所の動物施設利用規定に従った。

B3. 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

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 ナノガイドダンス」）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

C1. ナノ酸化チタン等ナノマテリアルの経口反復投与毒性と体内動態解析

C1-1. 異なる結晶子径の酸化チタンの 90 日間反復経口投与後の 8 週間投与休止による生体内に取り込まれた酸化チタンの排出性の検討

90 日間の強制経口投与期間、およびその後の 8 週間の投与休止期間において、体重及び摂餌量の変動は見られなかった。90 日間強制経口投与直後、および 8 週間の投与休止後の小腸パイエル板における TiO_2 粒子の沈着を光学顕微鏡下で検討したところ、8 週間投与休止後においても、パイエル板に TiO_2 粒子が観察され、その程度は 90 日間投与直後と同程度であった。

C1-2. 投与休止前後における肝臓および全血中のチタン濃度定量による全身循環移行の検討

生体内に取り込まれた TiO_2 の全身循環への移行を検討するため、肝臓及び全血のチタン濃度を測定した。その結果、90 日間投与直後、および 8 週間投与休止後のいずれにおいても投与に伴うチタン量の増加は見られなかった。

C1-3. パイエル板における活性化マクロファージの指標としてのサイトカインの免疫染色

パイエル板に沈着した TiO_2 アグロメレートの一部ではマクロファージに貪食された像が見られたことから、マクロファージマーカーとして CD68、マクロファージ関連サイトカインとして IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ の発現を免疫染色により検

討した。その結果、粒子の局在と CD68 免疫染色像の共局在が見られたが、いずれの群においてもこれらのサイトカインの亢進は見られなかった。また、DNA 鎖切断マーカーである γ -H2AX の誘導も見られなかった。

C2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

食物アレルギーマウスモデルの抗原感作時のナノ酸化チタンによる影響に関する先行研究では、粒子径 6 nm・アナターゼ型(C)及び粒子径 15 nm・アナターゼ型並びに粒子径 15 nm・ルチル型のナノ酸化チタンが感作を増強すること、粒子径 30 nm 以上のナノ酸化チタンではそのような増強効果は見られないことが示されている。また、昨年度までの解析において、経皮感作時にナノ酸化チタン C（粒子径 6 nm・アナターゼ型）が共存すると、所属リンパ節に局在する細胞の割合が変化する傾向が認められており、経口ばく露により少しでもナノ酸化チタンが体内に取り込まれた場合、T 細胞からのサイトカイン量産生が変動するなど、免疫応答に何らかの影響を及ぼす可能性があると考えられた。

令和 7 年度においては、抗原経皮感作時に最も高いアジュバント活性が認められた酸化チタン C を対象として、経口から摂取した際食物アレルギー症状に与える影響について検討した。実験全体のスケジュールとして、各群は 1 群 6 匹とし、コントロール群(V 群)、OVA を経皮感作した OVA 群、そしてナノ酸化チタン C を段階的な濃度で経口投与し OVA を経皮感作した C 群（1・3 濃度：3 試験）の 3・5 群を設定した。4 週間に渡って OVA の経皮感作を継続した後、OVA 抗原を腹腔投与 (i.p.) してアナフィラキシー（能動的全身性アナフィラキシー）反応を惹起した。惹起後 30 分にわたり、アナフィラキシー症状のスコアリング及び直腸内体温の測定を行った。なお、感作の確認を目的として、血中抗体価を測定した。OVA の経皮感作を施したマウスでは、血中の総 IgE 値の上昇とともに OVA 特異的 IgE や OVA 特異的 IgG1 の値が V 群と比較して有為に増加した。ま

た、C 群では、OVA 群よりもさらに OVA 特異的 IgE が増加する傾向が示された。アナフィラキシー症状のスコアリングの結果、OVA 群は V 群と比較してアナフィラキシースコアが高く、OVA アレルギー症状を呈していることを確認した。C 群でも OVA 群と同等レベルのスコアの変動が認められ、酸化チタンの経口ばく露の有無による影響は確認されなかった。惹起後 30 分間の直腸内体温の変化として、A は経時的な体温変化、B は変化の最大値を示した。抗原惹起 30 分後、OVA 群は V 群と比較して直腸温が平均 3.4 °C 低下していた。C_{20mg} 群では、V 群と比較して直腸温が平均 2.5 °C 低下しており、OVA 群に比べ体温の低下が 0.9 °C 程度抑制される傾向を認めた。また、C_{6.7mg} 群でも、V 群比で平均 3.0 °C の直腸温の低下を示し、OVA 群の体温低下が 0.4 °C 程度抑制される傾向を認めた。異なる実験においても同様の効果が再現よく確認されており、ナノ酸化チタン C には濃度依存的に食物アレルギー症状を緩和する傾向があると示唆された。以上の結果から、ナノ酸化チタン C の経口摂取によって、軽微ながら食物アレルギー症状を抑制する可能性が示唆された。

脾臓 (SPL) や腸間膜リンパ節 (mLN) に局在する免疫細胞への影響に関する解析結果において、脾細胞については、CD11b および CD11c 陽性の単球、マクロファージ、B 細胞、マスト細胞等のいずれの細胞においても、群間で有意な増減を示す細胞集団は認められなかった。また、mLN における B 細胞集団や T 細胞集団にも有意な変動は認められず、IgE 産生 B 細胞や抗原刺激により IL-4 を産生する CD4⁺T 細胞においても、ナノ酸化チタン C 投与による影響は観察されなかった。一方、IL-17 を産生する CD4⁺T 細胞については、C 群において有為に増加することが確認された。これらの結果から、粒子径 6 nm のナノ酸化チタン C を消化管経由でばく露した場合において、免疫細胞集団全体に対する有意な影響は確認できないが、一部の特定細胞集団に対し影響を与える可能性が示唆された。

C3. 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

C3-1. 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。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>

- 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
- 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
- STEP 3: *in vivo* 試験
 - STEP 3A: *in vivo* 予備試験
 - STEP 3B: *in vivo* 試験
- 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 NM_s 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、NM_s の血液、組織、排泄物中の NM_s 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、複雑なマトリックスが存在し、NM_s の濃度が低いいため、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 NM_s 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 NM_s 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 NM_s 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 NM_s 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）において強毒性が予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 NM_s（以下、NM_s）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、NM_s 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、NM_s 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 NM_s 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 NM_s 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 NM_s 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 NM_s 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、NM_s 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、骨髓、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 NM_s 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 NM_s 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、NMs によっては血液・精巣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、NMs 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 NMs 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ギー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 (特に雌雄の生殖器官系) 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的危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 NMs 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。

リードアクロス（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 NMs 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ドア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ドア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、リードアクロスの適応

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（NAMs）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。NMs 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。

C3-2. 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 NAMs 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 NAMs 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「全体的には極微量」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-ICPMS 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。

C3-3. 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 NMs 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、バリア安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、「バルク化学用品」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

D1. ナノ酸化チタン等ナノマテリアルの経口反復投与毒性と体内動態解析

結晶子径の異なる TiO₂ (6、30、180 nm; いずれも NPs を含む) を 1000 mg/kg bw/day の用量で雄ラットに 90 日間強制経口投与し、8 週間の投与休止ののちに剖検を行ったところ、いずれの結晶子径の TiO₂ においても 90 日間強制経口投与後、及び 8 週間の投与休止期間のいずれもパイエル板に同程度の TiO₂ 凝集体の沈着が認められた。一方で、それらの粒子沈着部位の周辺において炎症などの生体反応は見られず、炎症性サイトカインの活性化も見られなかった。また、免疫誘発 DNA 損傷も見られなかった。以上より、パイエル板に長期間残存した TiO₂ は炎症や免疫反応を誘導しないと考えられた。

昨年度までに実施した 90 日間の反復投与によるチタン量定量では、結晶子径 180 nm の TiO₂ 投与群で肝臓チタン濃度の有意な増加が見られたが、本年度実施した回復実験に伴う肝臓及び全血のチタン量測定では、90 日間投与直後、および 8 週間投与休止後のいずれにおいても同様の結果は再現されなかった。これらの結果から、当該所見は一貫して観察される頑健な影響ではなく、経口投与された TiO₂ の全身移行は極めて限定的であると考えられた。

D2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

本研究班の目的は、食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等からばく露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータを蓄積することである。本分担研究では、化粧品等への配合とともに、着色ある

いは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタンが、免疫細胞に与える影響について検討した。

今年度は、ナノ酸化チタンの経口ばく露が免疫系に与える影響として、粒子径 6 nm のナノ酸化チタン C を経口投与した際の実験アレルギー症状の影響を OVA 経皮感作モデルを用いて検討した。その結果、総 IgE や IgG1 の血中濃度はいずれも、OVA 経皮感作により有意に上昇していた。C 群では OVA 群より OVA 特異的 IgE が高値傾向であり、この結果は、ナノ酸化チタン C の経口ばく露が、Th2 依存的な液性免疫応答に作用する可能性を示唆している。ただし、アナフィラキシー応答に対して C 群で顕著な増悪効果を示さないことを確認しており、この程度の特異的 IgE の増加が食物アレルギーなどの病態に対し実質的な影響を与えるかについては不確実性が残る。また、腸管では樹状細胞から産生される TGF- β により制御性 T 細胞が誘導され、食物抗原への免疫寛容が維持されるが、ナノ酸化チタン E171 による腸管での TGF- β の抑制効果 (Bruno L et al., Food Chem. Toxicol. 2023) とは異なり、少なくともナノ酸化チタン C の経口ばく露ではこの作用への直接的な介入はないものと考えられた。さらにこの結果は、昨年度の検討における、ナノ酸化チタン C の経口ばく露が経口免疫寛容に影響しないという結論を支持するものと考えられる。

SPL 及び mLN における免疫細胞の解析では、CD11b/CD11c 陽性単球、マクロファージ、B 細胞等のいずれの細胞においても、群間で有意な変動は認められなかった。加えて、IgE 産生 B 細胞や IL-4 産生 CD4⁺T 細胞といったサブポピュレーションについても有意な影響は確認されなかった。経口投与されたナノ酸化チタン粒子は消化管からの吸収が限られており、肝臓や腸間膜リンパ節においてもごくわずかに検出されるに過ぎないことが報告 (Jun-ichi A et al., Part Fibre Toxicol. 2023, Liesbeth G et al., Part Fibre Toxicol. 2014) されており、本試験結果もそれらの結果と大筋で整合するものと考えられる。但し、今年度の検討において IL-17 産生 CD4⁺T 細胞の

ような一部の細胞集団が C 群で有意に増加することを確認しており、わずかな生体内への取り込みによっても影響を受ける細胞が存在する可能性が示唆された。

他方、既報の報告において、食品添加物グレードのナノ酸化チタンが TGF- β や IL-10 の産生を抑制し、OVA の免疫寛容を阻害することや、DSS 誘発性大腸炎では、ナノ酸化チタンの長期経口ばく露が mLN の CD4⁺T 細胞、制御性 T 細胞、マクロファージを減少させ、腸管免疫バランスを乱す可能性が報告 (Wei M et al., J Agric. Food Chem. 2019) されている。これらの試験と本試験の相違は、生物種を含む評価モデルの違いや酸化チタンの種類に依存した粒子の物理化学特性の違い、そしてばく露期間の違いに起因する可能性があり、今後も引き続き生体内での影響について詳細な検討を進めるべきと考えられる。

D3. 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

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ドランスの改定は、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える。

E. 結論

E1. ナノ酸化チタン等ナノマテリアルの経口反復投与毒性と体内動態解析

TiO₂ は投与休止後もパイエル板に残存するが、それによる炎症や免疫反応の誘導は認められず、毒性影響は誘発しないと考えられた。さらに、経口摂取した TiO₂ は肝臓および全身循環にはほとんど移行が見られなかった。以上の結果から、パイエル板は TiO₂ を隔離する防壁として機能すると考えられた。

E2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

化粧品等への配合とともに着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタンに関する安全性評価に資するデータを蓄積するため、ナノ酸化チタンの

免疫細胞に与える影響について検討した。粒子径 6nm のナノ酸化チタン C の経口摂取は、免疫細胞集団全体に対して有意な影響を与えず、食物アレルギー症状に対しても顕著な増悪効果を示さないことが示唆された。検討した項目の中には、軽微なアレルギー症状の改善傾向が観察されたものの、その効果は限定的であり、現時点では食品衛生上のリスクとして評価すべき明確な根拠は得られなかった。今後は、より長期なばく露や、免疫抑制作用に対する詳細な解析することで、食品添加物や化粧品としての安全性評価の精度を高める科学的知見の集積が必要であると考えられる。

E3. 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

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. Toxicokinetics 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

なし（投稿準備中）

F.2 学会発表

国内学会発表

1. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. 異なる結晶子径の二酸化チタン粒子の90日間反復経口投与によるラット小腸パイエル板における免疫毒性影響の検討 第52回日本毒性学会学術年会 2025年7月4日, 宜野湾
2. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 松

下幸平, 豊田武士, 小川久美子. 反復経口投与によりラット小腸パイエル板に取り込まれた二酸化チタンによる免疫毒性影響の検討. 第32回日本免疫毒性学会学術年会 2025年9月5日, 岐阜

3. 赤木純一, 水田保子, 畠山瑞穂, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. ラットを用いたさまざまな結晶子径の二酸化チタンの反復経口投与毒性の検討. 第8回医薬品毒性機序研究会 2025年12月11日, 札幌
4. 赤木純一, 水田保子, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. F344ラットへの反復経口投与によりパイエル板に沈着した二酸化チタン粒子の投与休止後の動態の検討. 第42回日本毒性病理学会学術集会. 2026年1月22日, 名古屋
5. 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 NMJs 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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)
9. 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)

10. 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)
11. 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)

国際学会発表

1. 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)
2. Jun-ichi Akagi, Yasuko Mizuta, Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Kumiko Ogawa. Characterization of remaining titanium dioxide in Peyer's patches of rats after subchronic oral exposure. The Society of Toxicology 65th Annual Meeting. 2026年3月24日, San Diego, USA

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