

食品由来ナノマテリアルのばく露評価に関する研究

研究分担者 鈴木美成 国立医薬品食品衛生研究所食品部 第四室長

研究要旨

一食分試料を用いて食品由来のナノマテリアルのばく露量をその粒径分布とともに評価することを目的とし、令和7年度は銀ナノ粒子を対象とした分析法の開発を行った。米ベース、麺ベース、パンベースの一食分試料をそれぞれ3種類購入し、混合したものを妥当性評価用の試料とした。妥当性評価用試料に公称粒径60 nmの銀ナノ粒子の標準溶液を添加し、前処理を行った後、銀ナノ粒子の数濃度、質量濃度、粒径分布を評価して、回収率とその不確かさを評価した。前処理には、パンクレアチンとリパーゼを用いた酵素消化を用い、得られた検液を単一粒子誘導結合プラズマ質量分析計 (spICP-MS) を用いて、数濃度、質量濃度、粒径分布を評価した。数濃度、質量濃度、平均粒径に対して、回収率 (81~108%) および相対不確かさ (<16.8%) を達成することが出来た。この結果は、技術仕様レベルのガイダンスや国際的な分析コミュニティが望ましい回収率の目安を満たしていた。また、分析の不確かさは、Horwitz式の修正式を用いて予測される再現性の目標値を満たしていた。以上の結果から、本研究で開発した分析法は、米ベース、麺ベース、パンベースいずれの妥当性評価用試料においても適用可能であり、これらの一食分試料中に含まれる銀ナノ粒子のばく露量推定に有用であることが示された。

研究協力者

張本雅恵・国立医薬品食品衛生研究所・食品部・
非常勤職員

A. 研究目的

ナノマテリアル (NM) は、その微細構造に由来する特異な物性を有し、従来材料では実現困難であった機能性を付与できることから、産業応用が急速に拡大している。しかしながら、ナノスケール特有の高い反応性や生体内動態の変化は、同一組成のバルク材料とは異なる毒性学的挙動を示す可能性がある。そのため、ナノマテリアルの安全性評価においては、従来の化学物質評価の枠組みに加え、粒子径、形状、表面修飾、凝集状態等を考慮した包括的評価が求められている。

NMには濃度、粒径分布、組成、分散性、結晶構造、凝集・集合性、表面修飾、表面電荷、多孔性等、多面的な特性を有する。そのため、これらの特性を評価するためには、その評価方法もその特性に合わせた分析手法を選択する必要がある。食品由来のばく露による健康リスク評価を念頭に置いた場合、そのばく露量を推定する必要がある、ばく露量を推定するには質量濃度を評価する

必要がある。また、NMの毒性はその粒径によって大きく異なるため、質量濃度とともに粒径分布も評価する必要があるだけでなく、NMであることを担保するため必須の評価項目と考えられる。

濃度と粒径を同時に評価できる手法として、誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を用いた単一粒子測定法 (single particle ICP-MS, spICP-MS) が注目されている。通常の ICP-MS では試料を完全に溶液化して平均的な信号を検出するのに対し、spICP-MSでは粒子のままプラズマに導入することで瞬間的に強いスパイク状の信号を検出する。スパイク状信号の強度は粒子に含まれる元素量に比例するため、ここから粒径を求めることができる。また、スパイク状信号の頻度は粒子の数濃度に比例するため、粒子数濃度を求めることが出来る。さらに、各粒子質量の総和を算出することで、粒子質量濃度も算出することが出来る。spICP-MSは、ナノ粒子を対象としたばく露評価に必要なこれらの情報を入手することが可能である。

現実的なばく露量を評価する方法として、マーケットマスケット方式のトータルダイエット研

究および陰膳法等がある。複数の食品(群)を分析するトータルダイエット研究では、各食品(群)の粒径分布を合成して解析する必要があるため、分析・解析ともに負担が大きい。陰膳法は、このような負担は小さいが、十分なサンプルサイズを確保するため調査協力者を確保することが困難であり、またその代表性を確保することも困難な場合が多い。そこで、本研究では一食分(Serving-size, SS) 試料を用いたばく露量推定を行うこととした。

SS 試料を用いたばく露評価は、実際の消費単位(例: 1 食分、1 パック、1 皿分、1 本、1 カップなど) に相当する量を 1 試料として採取・分析する方法であり、食品ごとの平均濃度に基づくモデル推定とは異なり、実際の摂取形態を前提としたばく露量を直接測定できる点に優位性がある。また、食品容器包装から食品への移行について含めたばく露量として評価される。これにより、複数食品の混合や調理過程に伴う濃度変動を包含した統合的評価が可能となり、推定に伴う仮定の数を減らすことができる。

本研究では、NM として銀ナノ粒子 (Ag-NP) を対象とし、SS 試料の分析からばく露量分布およびその粒径分布を同時に評価することを目的とした。Ag-NP は、強い抗菌作用を背景として商業利用が進展しており、食品関連製品や日用品への応用例も多い。Ag-NP は溶出した銀イオンによる影響に加え、粒子そのものの挙動や生体内分布に起因する影響も指摘されており、バルク銀とは異なる観点からのリスク評価が必要とされている。しかし、その環境中動態や生体影響に関する科学的知見はなお十分とは言えず、ばく露実態の解明および安全性評価体系の整備が求められている。本年度は、SS 試料として 3 種類の主食(米ベース、パンベース、麺ベース) を対象とした分析法の開発を行った。

B. 研究方法

試薬

超純水は Milli Q Element A10 (メルク社製) により製造したもの(比抵抗 $>18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, TOC $<3 \text{ ppb}$) を使用した。硝酸 (1.42 Ultrapur-100)、過酸化水素水(Ultrapure) は関東化学株式会社から購入したものを使用した。多元素混合標準溶液として SPEX 社製の XSTC-622 と XSTC-1 を用い、一部の元素標準溶液にはシグマアルドリッチ社製 (1000 mg/L Be,

Ga, Y, In 標準溶液, Trace CERT) を用いた。

ナノ粒子測定には Tween-20 (分子生物学用、関東化学)、パンクレアチン (ブタ膵臓由来、シグマアルドリッチ)、リパーゼ (ブタ膵臓由来、シグマアルドリッチ)、 NaH_2PO_4 (特級、和光純薬)、水酸化ナトリウム (特級、和光純薬)、Ag-NP (粒径 60 nm、シグマアルドリッチ) を用いた。

分析機器

Ag-NP の分析には ICP-MS (iCAPQ, サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) を用いた。

SS 試料

米ベース、パンベース及び麺ベースの SS 試料について、小売店で弁当等の異なる 3 製品をそれぞれ購入し、フードプロセッサーを用いて各製品の可食部を均質化した。これの全量を混合し、再度均質化したものを妥当性評価用試料とした。

銀ナノ粒子の分析

試料 0.5 g を量り取り、酵素溶液 (3.0 mg/L パンクレアチン、3.0 g/L リパーゼ、0.2 mol/L NaH_2PO_4 , 0.2 mol/L NaOH, pH 7.4) 7.5 mL を添加し超音波バスにて 10 分間処理を行い、ヒートブロック上で 37°C 60 分加熱した。室温に戻した後、遠心分離 ($2600 \times g$, 30 分間) で得られた上清を 100 mL メスフラスコに移した。残渣に酵素溶液 7.5 mL をを加え同様に加熱・遠心分離を行い得られた上清を上記のメスフラスコに合わせた後、1% Tween-20 で定容した。溶存性の Ag を除くために、定容した溶液 10 mL を 50 kDa のカットオフ値の限外濾過フィルターを用いて Ag-NP 画分を分離した。回収した Ag-NP 画分は 50 mL メスフラスコに移し、1% Tween-20 で定容し、測定溶液とした。

測定溶液を適宜 1% Tween-20 で希釈した後、spICP-MS 法を用いて、Ag-NP の粒子数濃度、粒子質量濃度、単一粒子質量分布を測定した。spICP-MS 測定として、時間分解測定を行い、その際の信号の取り込み時間を 0.5 ms とし、1~5 分間の測定を行った。

データ解析

鈴木ら¹⁾が開発した NanoQuant を用いて、spICP-MS で得られたデータを解析した。粒子イベント毎にスキャン時間、信号強度、滞在時間を

解析した。粒子の信号強度 (I_p , count) より、粒子ごとの質量 m_p は以下の式で算出した。

$$m_p = \frac{I_p}{R_{ion}} \times \frac{F\eta}{60}$$

ここで、 R_{ion} はイオン標準溶液の感度 ($\text{cps} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{L}$)、 F はサンプルの流量 (mL/min)、 η はネブライザーの輸送効率 (-) を示す。ネブライザーの輸送効率は、数ベースでの輸送効率 η_N と質量ベースの輸送効率 η_M をそれぞれ算出し、 η_N と η_M の平均値を η として用いた。 η_N は検出された粒子数と標準ナノ粒子溶液の総銀濃度から想定される数濃度との比から算出し、 η_M は密度から計算される1粒子当たりの理論的質量と輸送効率を1として算出した粒子ごとの質量の平均値との比から算出した。 η は、粒径 60 nm の銀ナノ粒子を用いて測定日ごとに算出した値を用いた。 η は概ね 10% 程度であった。

ナノ粒子の粒径 ϕ (nm) は粒子ごとの質量 m_p (fg) から算出した。

$$\phi = \sqrt[3]{\frac{6m_p}{\pi\rho\psi}} \times 10^4$$

ここで、 ρ は粒子の密度 (g/cm^3) を、 ψ は対象元素の粒子中の質量分率 (-) を示す。Ag-NP においては、 $\rho = 10.49$ (g/cm^3)、 $\psi = 1.0$ (-) の真球であると仮定して算出した。

ナノ粒子としての質量濃度 C_M は、粒子ごとの質量 m_p の総和として次のように算出した。

$$C_M = \frac{\sum m_p}{\eta \times F \times 10^4}$$

粒子の数濃度 C_N は単位時間当たりの粒子検出率 N_p (particle/min) を用いて以下のように算出した。

$$C_N = \frac{N_p}{\eta} \times \frac{1000}{F}$$

ブランク (1% Tween-20) の信号強度から算出した平均 + 3 σ に相当する信号強度は概ね 1 カウント (limit of diameter として約 10 nm) であった。しかしながら、偽陽性率を下げるため、信号強度の高さが 7 カウント以上 (概ね平均 + 20 σ) のものを粒子イベント由来の信号であると判断し解析に用いた。

妥当性評価

検液中の Ag 濃度が 50 ng/L となるように、

妥当性評価用試料に粒径 60 nm の Ag-NP を添加した後、上記の前処理を行い、分析の妥当性を評価した。

数濃度および質量濃度はスパイクした試料と妥当性評価用試料との差として評価し、粒径は添加した Ag-NP をカバーできる 40~80 nm の粒子を評価に用いた。なお、全ての結果は添加した標準物質の分析結果に対する比率として評価した。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

前処理方法の検討

研究分担者は、これまで魚介類を対象とした NM の含有量調査を実施してきた^{2), 3)}。既報^{2), 3)}では、タンパク質や脂質を酵素で消化するアプローチを NM 分析の前処理法として適用してきたが、SS 試料にはタンパク質や脂質以外の栄養素も多く含まれるため、他の酵素を用いた生体成分の消化を検討する必要がある。

そこで、残渣の量を比較することで、アミラーゼ処理の必要性について検討するため、人工唾液 (1.667 mg/mL NaCl, 0.5 mg/mL NaSCN, 1.833 mg/mL Na₂SO₄, 0.5 mg/mL NaHCO₃, 1.5 mg/mL KCl, 2.0 mg/mL KH₂PO₄, 0.5 mg/mL CaCl₂·2H₂O, 0.833 mg/mL α アミラーゼ, 0.333 mg/mL 尿酸, 0.033 mg/mL 尿素, 2.5 mg/mL ムチン) を調製した。この検討においては、溶液量の都合上、試料 0.5 g へ添加する酵素溶液の量を 5.0 mL に変更し、人工唾液の添加量は 2.5 mL とした。人工唾液と酵素溶液を同時に添加した場合と、人工唾液を添加 5 分後に酵素溶液を添加したものを、酵素溶液のみで処理した物と比較した。全ての過程においてヒートブロック上で 37°C で加熱し、酵素溶液を添加後は 60 分加熱した。

処理後の残渣の写真を図 1 に示す。残渣の量は同程度であったことから、人工唾液を用いた消化過程を追加する必要性は低いと判断できた。

妥当性評価の結果

代表的な分析結果として、米ベースの妥当性評価用試料に関する結果を図 2 に示す。スパイクした妥当性評価用試料における信号強度および粒径のヒストグラムは、標準溶液と妥当性評価用試料のヒストグラムを足し合わせたような結果であった。このことから、スパイクした Ag-NP と妥当性評価用試料に含まれている Ag-NP の粒径

は、ほとんど重複しておらず、40 nm を境に分けることで評価が可能であると考えられた。

各回収率をまとめた結果を図 3 に示す。米ベースの妥当性評価用試料では、質量濃度と平均粒径の回収率が高い結果となった。この原因として、米ベースの妥当性評価用試料には比較的大きな Ag-NP が検出されたことが関係していると考えられた。平均粒径を計算する対象粒子は、妥当性評価用試料由来のものかスパイク由来のものかを判別することは出来ない。そのため、比較的大きな Ag-NP が検出された米ベースの妥当性評価用試料においては平均粒径が多くなり、結果として質量濃度が大きく算出されたと考えられた。米ベースの妥当性評価用試料の数濃度は麺ベースの妥当性評価用試料と同程度であったにも拘らず、米ベースの妥当性評価用試料の質量濃度は麺ベースの妥当性評価用試料の 2.7 倍であったことも、上記の可能性を支持している。

数濃度はいずれの妥当性評価用試料においても 81.2~81.8%の回収率を示し、相対不確かさは 7.5~16.8%であった。質量濃度については、92.1~98.0%の回収率を示し、相対不確かさは 9.8~10.4%であった。平均粒径については、101.6~107.8%の回収率を示し、相対不確かさは 1.6~1.8%であった。数濃度に関しては、質量濃度よりも低い回収率となり、平均粒径は高めの値であった。これは分析法の性質上、複数の粒子が重複して検出される可能性があるため、数濃度は過小評価となり平均粒径は過大評価となる傾向がある。そのため、分析法の原理的には想定される結果であると考えられた。

NM 測定における国際的な妥当性評価の目標値は確立されていないが、技術仕様レベルのガイダンス (CEN/TS 17273:2019) として、70~120%程度の回収範囲が品質管理の目安とされている。これは、国際的な分析コミュニティが望ましい回収率の目安としている 80~120%の回収率ともほぼ一致している⁴⁾。本研究で得られた回収率は、数濃度、質量濃度、平均粒径のいずれも 80~120%の範囲内であり、国際的に受け入れられる範囲であると考えられた。

Horwitz 式の修正式を用いて予測される再現性は、0.1 mg/kg 以下の濃度では 22%であり (相対標準偏差として)、Thompson は適合性試験の基準として使用するのに適していると提案した⁵⁾。この基準は、Codex ガイドラインにも例示されている (例 : CX/MAS 16/37/5)。本研究で

得られた各種回収率の相対不確かさは 22%より小さく、十分な再現性があると判断された。

E. 結論

SS 試料を対象とした Ag-NP の分析法について検討した。リパーゼとパンクレアチンを用いた酵素分解により、適切な回収率 (81~108%) および相対不確かさ (<16.8%) を数濃度、質量濃度、平均粒径に対して達成することが出来た。また、この分析法は、米ベース、麺ベース、パンベースいずれの妥当性評価用試料においても適用可能であった。

F. 引用文献

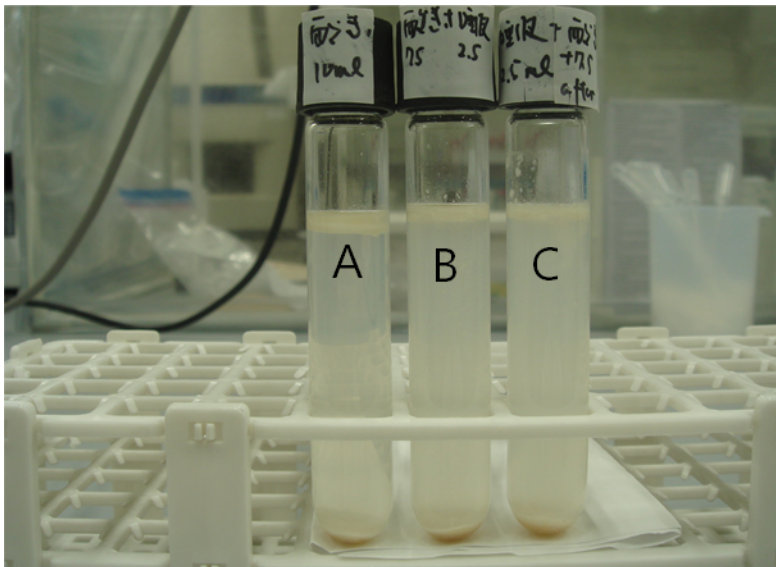
- 1) 鈴木敏弘, 山下修司, 吉國由希久, 平田岳史, ICP 質量分析装置を用いたナノ粒子測定用データ解析ソフト (NanoQuant) の開発. J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., **67**(5), 147–153 (2019).
- 2) Suzuki, Y., Harimoto, M., Takahashi, M., Akiyama, H., Hirose, A. and Tsutsumi, T., Analysis of Silver-containing Nanoparticles in Oysters Using Single-particle ICP-MS. J. Environ. Chem., **34**, 9–20 (2024).
- 3) Suzuki, Y., Kondo, M., Akiyama, H. and Ogra, Y., Presence of nano-sized mercury-containing particles in seafoods, and an estimate of dietary exposure. Environ. Pollut., **307**, 119555 (2022).
- 4) Laycock, A., Clark, N. J., Clough, R., Smith, R. and Handy, R. D., Determination of metallic nanoparticles in biological samples by single particle ICP-MS: a systematic review from sample collection to analysis. Environ. Sci. Nano, **9**(2), 420–453 (2022).
- 5) Thompson, M., Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. Analyst, **125**(3), 385–386 (2000).

G. 研究発表

該当なし

表 1 ICP-MS の分析条件

項目	ナノ粒子分析
RF power	1550 W
冷却ガス流量	14.0 L/min
ネブライザーガス流量	1.065 L/min
補助ガス流量	0.8 L/min
ネブライザー	PFA 同軸型
スプレーチャンバー	サイクロン型
サンプリング深さ	5.00 mm
セルガス流量	No gas
分析モード	時間分解分析
積分時間	0.0005 s
掃引数	-
繰り返し回数	-
分析時間	60 – 300 s
内部標準	なし
測定質量電荷比	^{107}Ag



- A : 酵素溶液
B : 人工唾液 + 酵素溶液
C : 人工唾液 + 酵素溶液 (5分後)

図 1 前処理法間における残渣量の比較

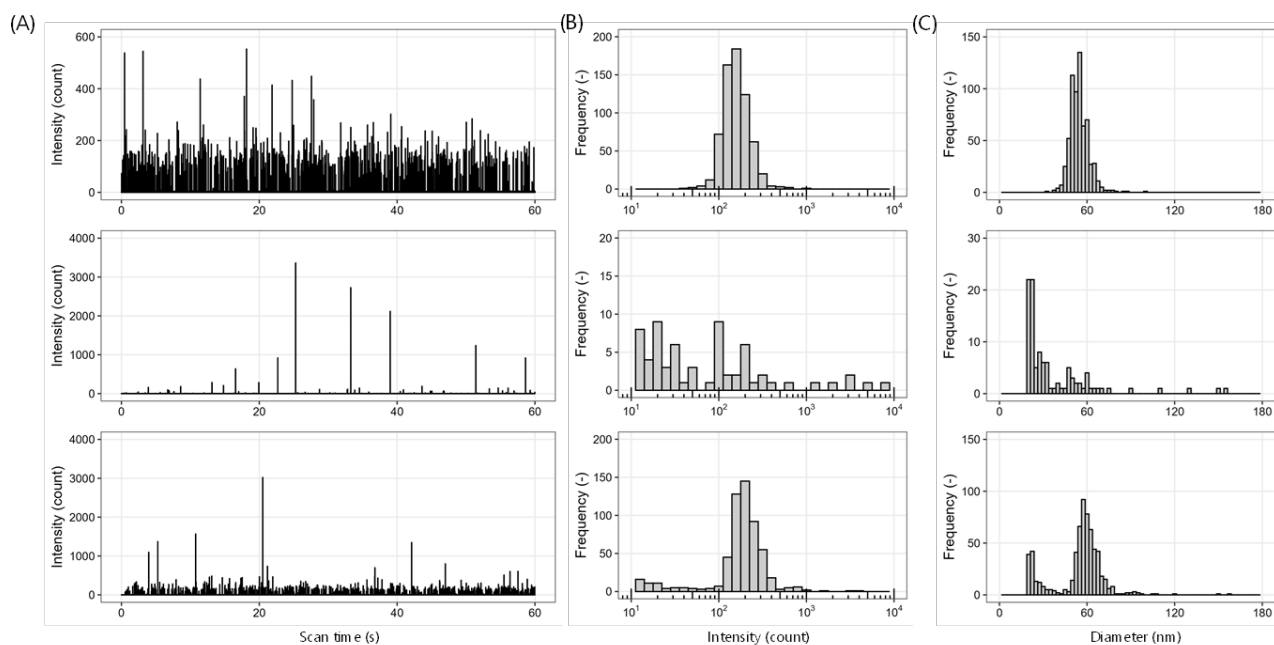


図 2 米ベースの妥当性評価用試料における Ag-NP の添加回収試験

(A) time-scan データ、(B) 粒子イベントの信号強度分布、(C) 粒径分布

上段は標準溶液、中段は妥当性評価用試料、下段はスパイクした妥当性評価用試料

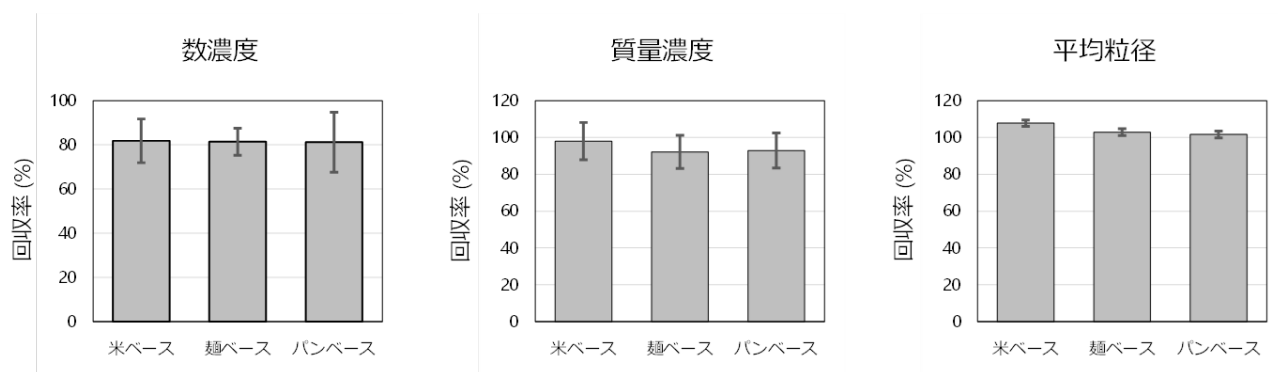


図 3 3 種類の妥当性評価用試料における Ag-NP の添加回収試験の結果
エラーバーは合成不確かさを示す。