

## 令和4～6年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

研究課題名 (研究項目名)	食品中に存在するナノ粒子のリスク評価手法に関する研究 (課題番号：JPCAFSC20222207) (食品分野におけるナノ粒子のリスク評価手法検討に関する研究 )
主任研究者	研究者名：広瀬明彦 所属機関：一般財団法人化学物質評価研究機構

## I 研究期間及び研究目的等

## 1 研究期間

令和4年度～令和6年度（3年間）

## 2 研究目的

ナノマテリアルは、従来の物質とは異なる物理化学的性質によりこれまでとは異なる有害性をもたらす懸念も指摘されているが、その安全性を網羅的に評価するための国際的に標準化された手法は未だ確立されていない。しかし、欧州ではナノマテリアルを新規物質として規制対象と位置づけ、食品分野への適用に関する安全性評価法ガイダンスなどの整備を積極的に進めている。一方、欧州食品安全機関（EFSA）の最近の食品用途の二酸化チタンの評価では、製品そのものは欧州のナノマテリアルの定義には合致しないものの、ナノ粒子成分を含む二酸化チタンの遺伝毒性の懸念が論点となっている。つまり規制上の定義に限定されず、食品中に含まれる可能性のあるすべてのナノ粒子の安全性に関して定量的なリスク評価を行うことが必要となっている。現にEFSAの最新のリスク評価ガイダンスでは、食品中のナノ粒子成分の測定や体内への吸収性の評価は重要事項として位置づけられている。しかし、原料としてのナノマテリアルの分析はよく研究されているが、食品や消化液中におけるナノ粒子の分析法は未だ発展途上である。そこで本研究では、食品中のナノ粒子のリスク評価にとって最も重要な課題である、食品中のナノ粒子分析を行うための現実的な課題整理や実際の分析手法を用いた実験的試行に焦点当てつつ、食品中存在するナノ粒子の分析法の注意事項と食品中のナノ粒子のリスク評価の留意事項の基本的な考え方骨子案を取り纏めることを目的とする。（※化学物質・製品そのものを示すときは「ナノマテリアル」、分析対象を示すときは「ナノ粒子」として表現する。）

## 3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
I 食品中のナノ粒子分析に適用可能なリスク評価手法の整理と課題抽出及び基本原則の提案	(1) 食品中のナノ粒子のリスク評価手法の情報整理と課題抽出及び基本原則の提案	広瀬明彦（一般財団法人化学物質評価研究機構）、鈴木美成（国立医薬品食品衛生研究所）、穂山浩（星薬科大学）
	(2) 食品中のナノ粒子分析に関する情報整理と課題抽出及び基本原則への付記の作成	広瀬明彦（一般財団法人化学物質評価研究機構）、鈴木美成（国立医薬品食品衛生研究所）、穂山浩（星薬科大学）

II 食品中のナノ粒子成分の粒子分布分析に関するケーススタディ	(1)質量分析法を用いた食品中のナノ粒子成分の粒子分布分析に関するケーススタディ	鈴木美成(国立医薬品食品衛生研究所)
	(2)光学系分析法を用いた食品中のナノ粒子成分の粒子分布分析に関するケーススタディ	穉山浩(星薬科大学)

#### 4 倫理面への配慮について

本研究は、ナノ粒子の物理化学的な分析手法の開発、改良および情報収集に関する研究のため倫理面の問題は含まれない。

## II 研究内容及び成果等

### 1 研究項目：食品中のナノ粒子に適用可能なリスク評価手法の整理と課題抽出及び基本原則の提案

- (1) 個別課題：食品中のナノ粒子のリスク評価手法の情報整理と課題抽出及び基本原則の提案（研究担当者名：広瀬明彦（所属機関名：一般財団法人化学物質評価研究機構）、研究担当者名：鈴木美成（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）、研究担当者名：穂山浩（所属機関名：星薬科大学））

本研究課題では欧州で公表された最新のナノマテリアルの評価ガイダンス<sup>1)</sup>とその補完手引きである技術的要件に関するガイダンス<sup>2)</sup>（技術ガイダンス）に採用されている分析手法を基本として、食品中あるいは多媒体中で計測したナノ粒子の分析手法やその解析結果に関する文献情報や技術文書等から分析手法毎にその利点や欠点等を整理すると共に、リスク評価に必要な食品中や消化管内でのナノ粒子分析を推定するためのデータの意義等について取り纏めを行う。令和4および5年度年度は、EFSAナノマテリアルの評価ガイダンスのリスク体系の調査を行うと共にEFSAにおける評価事例の整理、欧州における食品用途に使用されているナノマテリアルの状況についての情報収集を行った（広瀬）。令和5および6年度には、ナノ粒子の割合の存在を評価するための技術的要件に関するガイダンス（技術ガイダンス）におけるナノマテリアルに特有の評価の必要性を判断する分析法とリスク評価の要点について取り纏めた（広瀬）。一方、上記の知見と個別課題(2)の結果を考慮して、分析法の課題等の観点を考慮に入れてリスク評価に関する一般事項や留意点をまとめた食品中のナノ粒子のリスク評価に対する基本的な考え方の骨子案の作成を行った（広瀬、鈴木、穂山）。

- 1) EFSA. Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health. EFSA Journal. 2021;19(8):6769. doi:10.2903/j.efsa.2021.6768.
- 2) EFSA. Guidance on technical requirements for regulated food and feed product applications to establish the presence of small particles including nanoparticles. EFSA Journal. 2021;19(8):6769. doi:10.2903/j.efsa.2021.6769.

#### ① EFSAのナノマテリアルのリスク評価の概要：

EFSAでは、分解や溶解などによってその特徴を失ったものについては、非ナノマテリアル形態のものとは異なる挙動を示さないであろうと推定している。一方、経口摂取されるナノマテリアルに関する安全性の懸念点として、主に消化器系を迂回しナノ粒子が臓器や他の組織に移動する可能性や、消化管に局所的に悪影響を及ぼすことなどが挙げられている。そのうえで、EFSAは図 1に示すような、STEP1～4にわたる段階的リスク評価の枠組みを提示している。

- STEP 1：ナノマテリアルに特有の評価を必要とする材料の同定とその物理化学的特性評価
- STEP 2：*in vitro* 消化試験
- STEP 3：*in vivo* 試験
- STEP 4：対象を絞った詳細な試験

STEP1において物理化学的特性等の検討を行い、STEP2以降のナノマテリアルとしての特性を考慮した評価に進むべきかが判断される。STEP2では、物理化学的特性・毒性データ等に関する既存情報のレビュー後、必要に応じて*in vitro*試験データを取得し、STEP3での*in vivo*データの取得要否を判断する。STEP 2 に移行したほとんどのケースでは、STEP 3 での試験が必要となることが予想される。しかし、*in vitro*試験では影響が示されず、リソソームや消化管状態での*in vitro*の分解が速い場合、*in vivo*の試験を免除することができる場合があり、そのようなケースではEFSAがケースバイケースで判断するとしている。STEP3に進んだ場合には、14日間の予備試験を実施した後、改訂90日間



能性を挙げている。*in vitro*および*in vivo*試験のいずれにおいても、ナノマテリアルを適切に媒体に分散させること、試薬あるいは媒体と被験物質との干渉・相互作用に関する事前検討・確認が試験の成立性を担保するうえで重要であるとの考え方が示されている。また*in vitro*試験に関しては、被験物質の細胞内在化を考慮した適切な試験系を選定することの重要性も強調されている。特に、メカニズム解明などを目的とする*in vitro*試験実施に際して、共培養系の消化管細胞モデルを選定することが望ましいこと、免疫細胞を用いた試験の重要性などを挙げている。Absorption（吸収）、Distribution（分布）、Metabolism（代謝）、Excretion（排泄）（ADME）の評価に関しては、原則的には経口投与試験を実施すべきとされている。これは、ナノマテリアルの経路間外挿に関する情報が乏しいという状況に基づいている。ADME試験を実施する際の困難な技術的課題としては、臓器、組織、その他生体試料中のナノ粒子の検出・濃度測定手法の確立が挙げられている。経口吸収、その他トキシコキネティクスプロセスを評価する際に用量と組織濃度の関係性を評価すべきとしている。ナノマテリアルに対するリードアクロスの適用可能性については、EFSAが都度判断することになるが、現時点では限定的であり、多くの場合、*in vitro*、*in vivo*でのデータ取得が必要であるとの考えを示している。リスク評価に際しては、ナノマテリアルが細胞内への取り込み・全身分布の後に粒子として吸収された部分がさらに溶解する可能性があるため、ナノマテリアルと溶解した化学種のADMEを網羅した詳細なトキシコキネティクス評価が不可欠であると述べている。また、同じ元素組成であっても製造工程の違いによって形状、サイズ、結晶形態、表面特性が異なるナノ粒子で構成されている場合には、ナノ粒子の種類ごとに特性を明記し、十分な評価がなされなければならないとしている。

## ② EFSAにおけるナノマテリアルの評価事例と食品分野に適用されている可能性のある物質リスト：

一方、実際のナノマテリアルにおける評価の論点の具体的な理解のため、EFSAによる過去のナノマテリアル評価事例から8物質（表1）について評価の要点を整理した（別添3）。しかし、各評価の結論は、“情報不足のために評価できない”、“イオンの溶出や遺伝毒性の情報の必要性が評価される”、“現状の利用あるいは溶出量から安全性の懸念が無い”というような評価状況で、二酸化チタン以外では殆どの評価書でナノマテリアルの特徴に応じた評価はなされていなかった。したがって、EFSAのガイドダンスが実際に用いられる評価事例は、今後の評価を待つ必要があるという状況である。

表1. EFSAにおけるナノマテリアル評価事例の一覧

用途	評価文書タイトル	評価対象物質
食品添加物	Scientific Opinion on the re-evaluation of iron oxides and hydroxides (E 172) as food additives	酸化鉄類及び水酸化鉄類(E 172)
食品接触物質	Safety assessment of the substance zinc oxide, nanoparticles, for use in food contact materials	酸化亜鉛ナノ粒子
食品添加物	Re-evaluation of silicon dioxide (E 551) as a food additive	二酸化ケイ素 (E551)
栄養補助食品への栄養目的	Safety and bioavailability of silver hydrosol as a source of silver added for nutritional purposes to food supplements	銀ハイドロゾル
乳幼児向け食品、特別な医療目的の食品、体	Scientific opinion on the evaluation of authorised ferric sodium EDTA as an ingredient in the context of Regulation (EC) 258/97 on novel foods and	EDTA第二鉄Na (Ferrazone®, Ferrazone XF®)

用途	評価文書タイトル	評価対象物質
重管理を目的とする完全な食事代替品	Regulation (EU) 609/2013 on food intended for infants and young children, food for special medical purposes and total diet replacement for weight control	
食品添加物	Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive	二酸化チタン (E171)
食品接触物質	Safety assessment of the substance silver nanoparticles for use in food contact materials	銀ナノ粒子
食品接触物質	Safety assessment of the substance fatty acid-coated nano precipitated calcium carbonate for use in plastic food contact materials	脂肪酸被覆ナノ沈降炭酸カルシウム

### ③ 食品分野に適用されている可能性のある物質の調査：

また、実際に使用されている食品の種類等についての情報収集調査の為、ナノマテリアル登録制度を有する国（フランス、ベルギー、デンマーク、ノルウェー、フィンランド）の中から登録物質の用途情報調査が可能な国を選定し、EUON（欧州連合・ナノマテリアルオブサーバトリー）の情報等を収集整理した。EUONがまとめているNational reporting schemes（（ナノマテリアルに関する）各国届出制度）において、ナノマテリアル登録制度を有する国として、フランス、ベルギー、デンマーク、ノルウェー、フィンランドの5カ国があるが、このうちインベントリの詳細情報確認が何らかの形で可能な国はフランスのみであった。そこで、フランスRapport R-nanoの最新版（2019年版）の附属書1に記載されている情報をもとに、登録情報で用途情報が食品分野に関するものとしてヒットした43物質が抽出された。43物質中、37物質にはPC27（植物保護製品）、SU1（農業、林業、漁業）の両方あるいはいずれかが付与された。また、43物質中、6物質はシリカ（ケイ素）を含む化合物であった。用途記述子SU4（食品製造）または食品・食品添加物等のアイテム名が付与されている物質は、iron hydroxide oxide（水酸化鉄）、Silicon dioxide（二酸化ケイ素）、titanium dioxide（二酸化チタン）、Silicic acid, aluminum sodium salt（アルミノケイ酸ナトリウム）、Silicic acid, calcium salt（ケイ酸カルシウム）であり、用途が幅広いSilicon dioxide（二酸化ケイ素）を除き、食品製造プロセスでの添加物用途が主体であると考えられた。

### ④ ナノ粒子の割合の存在を評価するための技術的要件に関するガイダンスにおける分析法の要点 ナノスケールの特性に関する特別な評価の必要性に関する前提：

ナノマテリアルの評価の前提として、評価材料／製品が以下のような評価結論に至った場合、「ナノマテリアル評価ガイダンス」に沿って、その特性に完全に対応する評価が必要となるとしている。

- ・ 新規食品規則（規則（EU）2015/2283）による工業用ナノマテリアルの定義を満たすもの
- ・ 食品接触材料の製造に使用される物質で、委員会規則（EU）10/2011の第9条(2)に従いナノフォームであるか、または欧州委員会規則（EC）No 450/2009の第5条(2)(c)(ii)に従い、大規模なものと著しく異なる機能的な物理的および化学的特性を示す粒子サイズに意図的に加工されたもの
- ・ [Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals](#)（REACH）規則の附

属書 I、II、III、VI、VII、VIII、IX、X、XI および XII を改正し、ナノ特有の明確化を導入する委員会規則 (EU) 2018/1881 および (EU) 2020/878 の規定に従った、ナノフォームからなる、またはナノフォームを含む植物保護製品の活性物質であるか、またはナノフォームの共配合剤を含む植物保護製品である；

- International Organization for Standardization (ISO) の定義に従ったナノ構造材料であり、大きな粒子で構成されていても、ナノスケールの特性を保持しているもの
- 技術ガイダンスに概説されたように、微小粒子から構成される、または微小粒子を一部含む場合、ただし、従来の評価が消費者に対するリスクに対処するのに十分であることを確認する情報である場合を除く。

つまり、EFSA技術要件に関するガイダンスにおいては、新規の食品への適用や、人工ナノ材料の定義が直接的または間接的に適用される規制対象食品に対して従うべき曝露駆動型アプローチを提供している。「材料に微小粒子部分が含まれていない」、または「微小粒子部分が存在するが、従来のリスク評価でカバーされている」という2つの評価事象が評価の要となる。このいずれかが満たされていれば、ナノ特異の評価を免除される。ただし、懸濁液中に微小粒子を含まないことが確認され、「真の液体」または「完全に可溶化した固体」とみなすことができる場合はこの限りではない。通常の経口摂取条件 (37°C、1気圧) において、真の液体または完全に可溶化した物質は、従来の評価ガイダンスの適用範囲となる。そのため、材料が完全に溶解し、消費者が微小粒子に曝露されないことを証明しない限り、粒度分布を含む微小粒子の割合の特性評価はすべての場合に必要となる。

- 「材料に微小粒子部分が含まれていない」についての評価観点は以下のものである。
  - 食品物質の水への溶解度が33.3 g/L以上である。(OECD TG 105に従った溶解度試験が推奨される。この溶解度レベル以上では、食品マトリックスまたはGITのいずれかで完全に可溶化されることが期待される。33.3 g/Lは、国際的に合意された化学物質の標準試験に基づく)。
  - 水への物質の溶解速度の半減期が10分以下である。摂取後の溶解は、最大消費量レベルに類似した濃度の水への溶解速度アッセイにより測定されるべきである。(溶解速度の閾値は粒子が象徴の粘膜層の通過と細胞への取り込みに必要な時間であると考えられる。この時間以内に溶解すれば、粒子が生体内に曝露されないと考えられる。)
  - 液体形態で市販されている物質は、孔径が3–10 kDaのメンブランフィルターを通過されるかどうかで評価すべきである。さらに、電子顕微鏡を用いて物質収支の推定またはナノ粒子が存在しないことの検証を行うべきである。(液体食品中にナノ粒子が存在しないことの証明になる。)
- 「微小粒子部分が存在するが、従来のリスク評価でカバーされている」には以下の評価観点がある。
  - 食品中にナノ粒子が存在するか、または予想される場合、従来のリスク評価でカバーできるかどうかを評価する方法として、以下の段階的アプローチがある。
    - 粒径のスクリーニング段階として、材料の一片が少なくとも500 nm未満の粒子を10%未満(粒子数に基づく)含むかどうかを調べる。推奨される方法は、遠心液体沈降、粒子追跡分析、記述的EMである。(消化管からの粒子取り込みは、一般に250 nmまでのサイズで可

能であることがわかっている。実際、材料全体の通常のサイズ分布を仮定すると（従来の材料の最悪のシナリオ）、500 nm未満の粒子が10%以下であることは、ナノサイズ粒子（一から百nm）の割合が最小限であり、取り込みは無視できることを意味する。）

- 微小粒子の特徴付けとして、500 nm以下の画分のうち、その一片が250 nm以下の粒子を10%未満(粒子数に基づく)であるかどうかを調べる。光学的測定機器や質量分析機などによる定量測定が必要となるが、最終的な確認方法としては定量的電子顕微鏡法が推奨される。（500 nm以下の画分の10%は、現在利用可能なEM法で典型的な条件下で達成できる測定不確実性に基づく技術的閾値である。）

但し、選択した方法にかかわらず、分析試料の適切な分散が必要である。ナノ粒子は、その高い表面/体積比のために、弱い力を介してより大きなサイズの凝集体を形成するために一緒に付着する傾向が高い。したがって、凝集/脱凝集状態は、異なる物理的および生物学的条件に影響される動的なプロセスである。したがって、適切な分散を確保することは、ナノサイズの最悪のシナリオをテストするために重要である。

- ナノ粒子の毒性学的評価を実施する前段階において、既知のデータを利用する手法として、上記の基準を満たすことができない場合に、以下の2点を検討すべきである。
  - 既存の毒性学的試験データは、小粒子分画の潜在的な有害性を適切に扱っている:被験物質には小粒子分画が含まれる試験デザインが採用され、分散度/凝集度が小粒子分画を扱うのに十分であるか。（ナノマテリアル分画は、既に従来の試験でカバーされていることを示す）
  - 小粒子分画を含む物質の既存データによる補完。既存データにおいて小粒子分画に関するデータが提供されるべきである。類似物質の既存情報からのリードアクロスを適用することができる。従来の評価ギャップに対処するために小粒子分画に関する統合試験評価戦略（IATA）または補完的な評価を実施することができる。（利用可能なデータが小粒子分画の安全性に対処するためのデータギャップを埋めるために十分であることが必要である。）

- ナノ特有のリスク評価の必要性

最終的に、ナノ特有のリスク評価の必要性を除外するには不十分である場合、ナノ材料の潜在的な毒性に適切に対処すべきである。そのために、ナノマテリアルに関するリスク評価ガイダンスでは、以下の重要な要素を考慮することが必要となっている。

- OECDテストガイドライン及び他の試験プロトコルは、特にナノ材料の試験に適応させるべきである。
- Ames試験は、ナノ材料には適していないと考えられ、哺乳類細胞遺伝子突然変異テスト（OECD TG 476又は490）に置き換えるべきである。
- 選択した用量/濃度の妥当性を示すべきである。
- 可能であれば、対応する非ナノ材料に曝露された実験群を*in vitro*及び*in vivo*試験の両方に含めるべきである。
- 標的組織は標的細胞における曝露の確認を実証し、可能であれば適切な技術を用いて定量化すべきである。

⑤ 食品中のナノ粒子の安全性評価に関する基本原則の骨子案の作成：

令和4年度は、基本原則の大まかなフレームを立てるための目次案を設定し、令和5年度には骨子案の概要の作成を行い、令和6年度は骨子案の原案の作成とAppendixを行った。基本原則の骨子案の全体およびハザードの特定と特性解析、リスク評価の部分は広瀬が担当し、分析法に関する情報を基に分析法の部分は鈴木、穂山が担当した。食品中のナノ粒子の安全性評価に関する基本原則案の骨子案はリスク評価の概要や論点等を踏まえ表2に示すような構成で作成した（別添4）。本基本原則は従来の一般的な化学物質の評価基準やガイダンス等に加えて追加で考慮すべき論点や課題について整理して示すと共に、追加すべき検討項目や試験法の提案を、評価段階に応じて解説する構成とした。

表2. 食品中のナノ粒子の安全性評価に関する基本原則の骨子案

構成	項目	課題、留意事項など
1 背景と目的		
2 評価の基本的な考え方	1. 適用範囲 2. 安全性評価に際しての主な課題 3. 段階的評価フレームの必要性	EUの新食品規制の定義によるナノマテリアルを含むもの。 ナノ特有の評価条件の整理 段階的評価が必要な理由
3 評価の実手順 -段階的な評価方法-	(1) 安全性評価フレームの概要  (2)物理化学的特性の評価 (Step1)  (3)経口曝露評価 (Step2)  (4)in vitro試験 (Step3)  (5)in vivo試験 (Step4)  (6)詳細試験 (Step5)	曝露リスクおよびハザード同定と特性解析に対してナノ粒子を評価する際の段階的なステップを概説する。  リスク評価の前段階として、安全性評価を行う為に重要となる原料の物理化学的の適切な特性評価を行う  ナノマテリアルあるいはその溶解/分解生成物がナノ粒子のサイズで消化管中に残存しているかどうかを評価する  Step2においてナノ粒子成分が消化管内で腸管細胞に曝露する可能性があるか否定できない場合において、腸管吸収をとして体内に取り込まれた場合の生体内における影響を予備的に評価する  in vitro試験の結果から想定される生体影響をin vivoにおいて確認し、定量的なリスク評価を行う為に実施される。  Step4の試験結果に応じて、より高次の試験が行われ、得られたメカニズムおよび作用機序の検討結果が動物試験で観察された作用のヒトへの関連性の判断に用いられる詳細試験の実施が必要となる。
4 リスク判定	用量反応性の考察  リスクアセスメントパラダイム  不確実性分析	ナノマテリアルに特有の用量単位（重量、個数、表面積など）を考慮する。 製品の種類別に異なる物性情報に応じた個別評価を避けるための、効率的な評価作業スキームが必要となる。 ナノマテリアルを測定する際に特有の不確実性に留意する。
【Appendix】 粒子サイズ分析手法と評価の留意事項	A) ナノマテリアルとしての粒子の存在性を評価する際の留意点 B) 分散性を測定評価する際の留意点、	・ナノマテリアルに対する評価法を適用するかどうかを判断する際の留意点 ・光学的分析法と質量分析法において標準的に適用できる手法に関する留意点

(2) 個別課題：食品中のナノ粒子分析に関する情報整理と課題抽出（研究担当者名：鈴木美成（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）、研究担当者名：穂山浩（所属機関名：星薬科大学））

令和 4-6 年度には、EFSA のナノマテリアルの評価ガイダンスと技術的要件に関するガイダンスに引用されているナノマテリアルの分析方法について、その概要（広瀬）と一般的に使われる光学的な手法に基づく分析法の特徴を整理する（穂山）と共に、ガイダンスで引用されている引用文献の内 ISO 文書と具体的な分析法に関する文献（24 報）についての整理（鈴木）を行った。

#### ① 技術ガイダンスに記載されているナノマテリアルの物性に関する分析方法の概要：

ナノマテリアルのリスク評価ガイダンスに示されているように、材料が食品中または消化管内で完全に可溶化すると予想される場合、ナノスケールでのアセスメントは必要ないかもしれないが、そのための溶解度・溶解速度の基準を満たさない場合は、上述の基準を満たすかどうかを調べるための粒度分布に特性評価をする必要がある。その際の、評価試料の適切な分散状態を確保するために必要な推奨事項や、分析方法に関する概要が技術ガイダンスに示されている。

#### 試料調製のための分散プロトコール：

技術ガイダンス 3 章では材料の特性評価のための分散液調製に関して、最終的な液体分散液は微小分散粒子で構成される粒度分布になる必要があること、分散液の安定性（本ガイダンスでは最低30分間）が確保されるべきであることなどを挙げている。また、乾燥粉末の液体への分散手順については標準操作手順（SOP）の利用が困難であることから、媒体の選択、予備分散など分散作業に際して留意すべき一般的事項を示している。分散液調整の留意点としては、以下の点が挙げられており、その有効性を確認するためには、走査電子顕微鏡（SEM）や透過電子顕微鏡（TEM）、あるいは流動場分離法（FFF）、単粒子 ICP-MSの適用を推奨している。

- ・ 最終的な液体分散液は微小分散粒子で構成される粒度分布になる必要がある。
- ・ いわゆる膨潤性またはゲル化しやすいマテリアルの場合、粒度分布測定に用いる濃度は、ゲル形成が確実に回避されるよう、十分に低い範囲でなければならない。
- ・ 分散液はまた、十分に安定であること、すなわち一定の粒度分布パターンまたは最小限の再凝集を示し、粒度測定の実施や*in vitro*または*in vivo*の毒性試験への応用に必要な時間にわたって粒子の沈降を避ける必要がある。

#### 粒度分布の特性評価

技術ガイダンスは、粒度分布の特性評価を行う際の「微小粒子」の範囲の上限として500 nmを提案し、当該材料の少なくとも一つの寸法が500 nm未満の粒子を10%未満（個数ベース）しか含まないという説得力のある証拠を提供するものでなければならないとしている。

ナノマテリアルリスク評価ガイダンスの一章と7章に記載されているように、最小外形寸法250 nmまでの粒子が消化管に取り込まれる可能性がある。そこで技術ガイダンスでは、250 nmより小さな粒子をごくわずかしか含まない材料は、ナノ特有の観点での評価の必要性はないとし、粒子径計測上の技術的限界を考慮して不確実性係数2を適用し、500 nmを上限値としている。微粒子検出の方法としては、液相遠心沈降法、粒子軌跡解析、記述的電子顕微鏡法、ろ過と化学分析等の手法がある。

#### 微小粒子割合の特性評価

微小粒子（500 nm未満の粒子）の分画が予想される、あるいは特定された場合に、当該分画について微小粒子の粒度分布測定するための推奨方法として電子顕微鏡による測定を挙げている。電子顕微鏡を用いて当該微小粒子の割合の特徴を示さなければならないとしている。分析結果の記載に際し

ては、電子顕微鏡の測定に関連する各ISO文書に則ることを求めている。試料の状態によって特別な測定法を用いる場合も含め、測定法選定の妥当性、粒子径の検出限界、分散レベル等に関する十分な証拠が必要であるとしている。

ガイダンスでは、さらに実際に上市されるナノマテリアルが同一規格の中で分画や、結晶化度の違いなどのバリエーションを有する場合の留意点についても述べている。製造プロセスの異同に関わらず、異なる条件下若しくは異なる製造者による材料の製造は、材料の物理化学的特性を変化させる可能性がある。さらに、バッチ間の物理化学的特性に有意な差があることが示された場合には、異なる工程または条件により製造された材料の詳細な仕様を提供することが重要であるとしている。規格については、ナノ分画のサイズ／範囲、数量ベース、ナノに関連する物理化学パラメーターの記述と許容範囲に関する記載を含めることが求められている。また、製造バッチ間の仕様の差異の有無、差異がある場合に最悪のシナリオで安全性を評価できるような試料が選定されていること、混合物および製剤の場合、材料が混合物または製剤中にどのような形態で存在するかを示す記述（例：粉末、分散液）を提供すること等が記述されている。

## ② 光学系の測定法の比較：

技術ガイダンスの中で、光学系の測定手法を用いて粒子を解析する分析法についての特徴と課題について整理した（表3）。

表3 光学系の測定法の原理と特徴の一覧

粒子測定法	原理	長所	短所
電子顕微鏡(SEM/TEM)	・ 電子線で試料表面をスキャン、または透過させ対象物の像を得る。	・ 粒子の形状や表面状態を確認するには有効。 等価面積径、フェレ径などの因子を測定可能	・ 大きな粒子や凝集塊に隠れた粒子は観察することができない→粒径分布算出などには不向き ・ 前処理の工程で乾燥による固定がある
光学顕微鏡	・ 一般的な光学顕微鏡。簡便だが倍率は低い。	・ 凝集塊の大きさの外観を把握するには有効	・ 形状の詳細は困難
動的光散乱法(DLS)	・ 液体中の粒子にレーザー光を当て、粒子のブラウン運動を検出する。運動の激しさは粒子径と相関するため、ここから粒子径を算出する。液体抵抗径における粒子の分散状態の参考として、透過率から濁度を算出できる。	・ 幅広い粒子径と濃度に対応できる。 ・ 10 nm 以上の粒子から対応可能	・ 全粒子を集団として測定するため、分解能と定量性に劣る。 ・ 1 μm 以上の大きな粒子を含む場合、沈降を無視できなくなる。 ・ 散乱強度に依存しやすい
分光光度計	・ 粒度分布を求められる手法ではないが、液中における粒子の分散状態の参考として、透過	・ 分散状態は濁度から算出されることが可能	・ 粒度分布、粒子径の測定は困難
レーザー回折・散乱法(LD)	・ 粒子に光を当てた際の回折・散乱光から得られるパターンを解析する。光散乱相当径率から濁度を算出できる。	・ 分散液中の粒子だけでなく、粉体であっても測定できる。 ・ 測定範囲が広く、再現性もよい。 ・ 操作が簡便で測定時間も短い(1分程度)。	・ 全粒子を集団として測定するため、分解能と定量性に劣る。 ・ 粒子の屈折率が必要サブミクロン粒子の精度がでない。機種により粒子径計算方法が異なる。
粒子軌跡解析法(PTA)	・ 液中でブラウン運動している粒子にレーザー光を当て、散乱光をカメラで撮影し、その軌跡を解析する。	・ 粒子個数が算出できる。	・ 50 nm 以下粒子密度、屈折率が必要 ・ サブミクロン粒子の測定時間が長い。吸光係

			数補正が必要な粒子は困難
遠心沈降法	・ 粒子懸濁液を高速で回転させて、粒子を遠心沈降させて計測時間を測定する	・ 安価で簡便である。	・ サブミクロン粒子の測定時間が長い。吸光係数補正が必要

### ③ 質量分析法の論文24報の概要整理：

技術ガイダンスで引用されているISO文書については、食品中ナノマテリアルの分析の観点から前処理・分析法・妥当性に分類し、また引用された分析法に関する論文24についての概要を以下のような形式（図2）で整理した。各論文の概要は別添5に記載したが、ISO文書は著作権の関係から各文書の分析手法上の分類のみを示した。

文献No.	89
文献情報	Verleyens E, De Temmerman P-J, Van Doren E, Francisco MAD and Mast J, 2014. Quantitative characterization of aggregated and agglomerated titanium dioxide nanomaterials by transmission electron microscopy.
文献DOI	<a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2014.03.010">http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2014.03.010</a>
論文の概要	1) 酸化チタンナノ粒子を用い、画像解析型TEMの定量解析性を検証した。 2) 平均径・真球度・凸性の数基準分布が得られた。平均径中央値は100nm以下であり、EC規定ナノ粒子(100nm以下)の分析に適している。 3) 数基準分布データは対数正規関数に近似された。関数を構成する因子がナノ粒子の特性を反映しており、粒子を見分ける手法になり得る。 4) 近似に反復曲線フィッティング法が用いられた。誤差算出が容易に。 5) 本手法は、in-vitro/-vivo試験ストック懸濁液の事前分析に活用できる。 6) <b>安定分散には、粒子の等電点と懸濁液pHに開きがあることが重要。</b>
分析対象	4種類の粉末状の酸化チタンナノ粒子 a) NM-102: アナターゼ型、表面被覆なし、b) NM-103: ルチル型、疎水表面被覆(Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> & ポリメチルシロキサン)、c) NM-104: ルチル型、親水表面被覆(Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> & グリセリン)、d) NM-105: ルチル/アナターゼ=14/86、表面被覆なし
食品からの抽出法	懸濁水の作製法（食品サンプルは無い） ・ 粉末を蒸留水に分散(2.56 mg/ml)させ、超音波処理16分間(13mm-horn型、40%振幅)
用いた分析手法	画像解析ソフト数設TEM（閾値基準[Threshold-based]検出を適用）
分析原理	数基準分布データを、反復曲線フィッティング法で近似
不確かさ	(記載なし)
新規性 解決した課題	1) 平均径・真球度・凸性各々について、数基準分布データが対数正規関数に近似され、各関数を構成する因子(モードと幅)が得られた。このモードと幅の関係性が、個々のナノ粒子特有の物理特性を反映しており、相違を見分けることにつながる。 ・ 表面被覆あり2種類同士；モードと幅の関係性が類似（3種データとも） ・ 表面被覆なし；被覆ありと比べ、関係性に明らかな違い 2) 反復曲線法(ソフトウェア使用)を採用。 ・ 分布のモード・幅・非対称性の誤差算出が容易。データを曲線として定めることで、近似が正確になる。 ・ 数基準分布の構成に使われるビン幅から、独立している。
利点	1) シリカナノ粒子を用いた検証(DeTemmerman；2012年)に次ぐもので、他種ナノ粒子への適用が期待できる。 2) DLSやNTAの光散乱法、CLSやBETの密度基準法では、パラメータは一種類しか測定できないが、TEM画像解析法では、分布に関する複数の関連パラメータを測定できる。
欠点	
分析における留意事項	1) 懸濁液作製時の容器材質が、酸化チタンナノ粒子の分散安定に影響。 a) 表面被覆なし粒子: ガラス製では、超音波後すぐ沈殿。PP製では安定。 b) 表面被覆あり粒子(アルミナ被覆): ガラス・PP製のいずれでも安定。 <b>※粒子の等電点と懸濁液pHに開きがあることが重要。</b>
備考	数基準分布の近似に対数正規関数が選択され、よい相関が得られた。しかし多峰分布などの場合には、他手法が選択され得る。

図2. 各引用論文の整理表のイメージ

### ④ 研究項目2で実施したケーススタディから得られた分析に関しての具体的な注意点

研究項目2におけるケーススタディ研究の実施を通してえられた、各分析法の流程について取り纏めた。

#### ➤ 光学系の分析法を用いる際の留意点

- ・ ナノ粒子の物理化学的特性である形状、平均粒子径、粒度分布、多分散指数、ゼータ電位などの特徴因子を調べるのが消化管からの吸収を考える上で重要。
- ・ 電子顕微鏡測定は、粒子の形状や分散状態を視覚的にとらえることができるが、大きな粒子と小さな粒子が混在すると小さな粒子が大きな粒子に隠れて計測されない問題点がある。

- 安全性を考える上では、人工消化液中での分散状態を調査する必要がある。
- 分散剤を入れた際の測定では電子顕微鏡（SEM・TEM）の測定が重要
- 電子顕微鏡の測定は水溶液中では困難、また視覚的にみれる部分を観察して全体を解析するので全体の粒度分布の測定が困難
- 比較的簡易に粒度分布、平均粒子径、多分散指数、ゼータ電位を測定できるのは動的光散乱法（DLS）あるいはレーザー回折（LD）が有効。
- 粒子軌跡解析法(PTA)は粒径 50 nm 以下の粒子は困難
- DLS はレイリー散乱光を検出する方法で粒子径が大きい粒子の強度が強く検出される傾向がある。
- LD はミー散乱の散乱パターンを平均化されるため、二峰性のパターンが平均化され、平均値がトップのブロード粒径分布になる可能性がある。
- 小角 X 線散乱法（SAXS）、X 線回折法（XRD）、誘導回折格子法（IG）、原子間力顕微鏡（AFM）などがあるがすべて高価な機器で簡単に測定は難しい。
- 
- 単一粒子誘導結合プラズマ質量分析法(spICP-MS)を用いてナノマテリアルを分析する際の留意点
  - 評価対象のナノマテリアルは溶液に分散させる必要がある。
  - spICP-MS の分析において、試料溶媒およびキャリア液の自由度は比較的高いが、一般的な ICP-MS 測定に準じた溶媒を用いる必要がある。標準的な装置では、有機溶媒の濃度は 10% 以下とし、フッ化水素酸の使用は避ける。
  - 単一粒子の信号を取得する際には、信号の取り逃しが発生しないように積分時間と整定時間を分析の目的に応じて最適化する必要がある。そのため、spICP-MS 分析には、高時間分解分析に対応している機器を用いるのが望ましい。
  - より小型のナノマテリアルを検出するためには、バックグラウンドの信号を可能な限り低減する必要がある。例えば、 $\leq 5$  カウント/積分時間が望ましい。
  - 検出可能な最小粒径は、分析対象元素により大きく異なる。また、組成や密度も影響する。
  - 質量の測定値から、密度及び組成の情報をを用いて粒径に換算するため、事前情報としてこれらの値を入手しておく必要がある。あるいは仮定した密度及び組成が妥当であることを示す必要がある。
  - 粒径分布とともに粒子の質量濃度および数濃度を評価することが可能であるが、粒子形状の情報を入手することは非常に困難である。
  - 同時に複数の粒子を計測する確率を小さくするため、適宜希釈する必要がある。
  - 他の分析法と比較して、比較的低濃度の試料を測定するため、よりコンタミネーションに留意する必要がある。
  - 信号強度のばらつきが粒径分布に加味されるため、他の分析法と比較して推定される粒径分布が広がる傾向がある。
- FFF を用いてナノマテリアルを分析する際の留意点
  - ナノマテリアルの素材ごとに分散条件および分離条件を検討する必要がある。そのため、人工消化液で処理したナノマテリアルに対して、適切な分析条件を確立できない可能性に留意が必要である。

- 膜（非対称フロー型 FFF, (AF4)）あるいはチャンネル（遠心型 FFF (CF3)）への吸着が顕著な場合があるため、留意が必要。
- 検出システムとの連携：多角度光散乱 (MALS)や DLS と連携することで、粒径分布の不確かさを改善できる。
- 検出システムとの連携：ICP-MS を検出器に用いることで、より低濃度の試料を分析できるとともに、定性的な評価も可能となる。
- 粒子径と保持時間の相関が保証される設定が必要である。とくに、FFF には、①ノーマル、②ステリック、③ハイパーレイヤーの 3 つの分離モードがあり、粒子径と保持時間の関係が分離モードで異なる点に留意が必要。

➤ spICP-MS に限定しない一般的な注意点

- 実験環境由来のナノマテリアルの混入に留意が必要である。特に素材の情報が入手できない分析法においては、異なる素材のナノマテリアルを評価してしまう可能性に留意が必要である。
- 分散剤の使用および超音波処理は粒径分布に影響を与えるため、ガイドラインで統一する必要あるいは典型的な条件を示す必要と考えられた。

## 2 研究項目：食品中のナノ粒子成分の粒子分布分析に関するケーススタディ

(1) 個別課題：質量分析法を用いた食品中のナノ粒子成分の粒子分布分析に関するケーススタディ(研究担当者名：鈴木美成(国立医薬品食品衛生研究所))

### 1) 二酸化チタンのケーススタディ

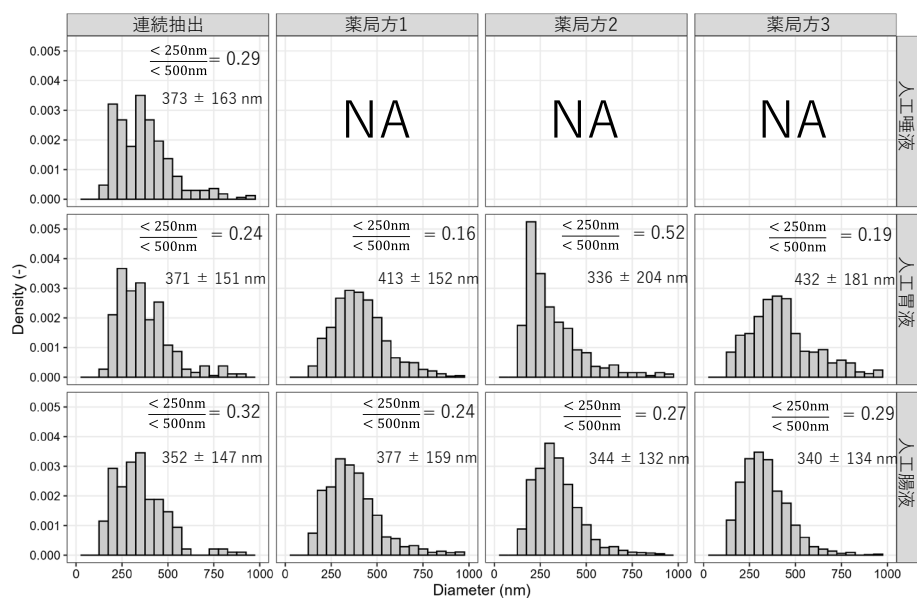
spICP-MSを用いて、単一溶媒や消化管液等に対して様々な分散手法を試行するために、食品添加物および工業用として使用されている二酸化チタン( $\text{TiO}_2$ )を入手した。50 mLメスフラスコを用いて粒径 500 nmの $\text{TiO}_2$ ナノ粒子 [ $\text{TiO}_2$ -NP(500)] 0.2% (w/v) を調製した後溶液を捨て、酸浴処理をしたものと、酸浴後に超音波洗浄を行ったものとを比較し、メスフラスコに残留した $\text{TiO}_2$ -NP(500)をspICP-MSで評価した。酸浴はメスフラスコを1 M硝酸に1時間浸漬し、超音波洗浄はメスフラスコに0.05% FL-70を50 mL添加し超音波処理を30分間行った。なお、分散剤として用いたFL-70にも $\text{TiO}_2$ -NPのコンタミネーションが確認されたため、限外濾過を行い、事前に洗浄したものをを用いた。洗浄方法およびメスフラスコの材質の違いを比較したところ、1時間の酸浴では $\text{TiO}_2$ -NPの洗浄には不十分であり、分散剤とともに超音波洗浄を行うのが有効であった。また、ガラスよりもプラスチック製容器の方が $\text{TiO}_2$ の残留が少ない傾向があり、容器の材質が $\text{TiO}_2$ -NPの分散安定に影響するという既報 (DOI: 10.1016/j.powtec.2014.03.010) の結果を支持するものと考えられた。

ついで、実験環境からのTi含有粒子のコンタミネーションを評価するため、試料 0.5 gを0.05% FL-70 50mL中で超音波処理(1時間)を行い、実験環境にある様々な材からTi含有粒子の溶出を評価した。概して、白い製品から多量のTi含有粒子が溶出する傾向にあり、これらの製品の着色剤などとして使用されている可能性が考えられた。また、分散する際にチタン合金製の超音波プローブを用いると、プローブから発生した微細なチタン含有粒子を計測してしまうため、分散方法としては不適切であると考えられた。他の粒径解析法と比較すると、spICP-MS法は低濃度の試料を測定することから、よりコンタミネーションに留意する必要がある。

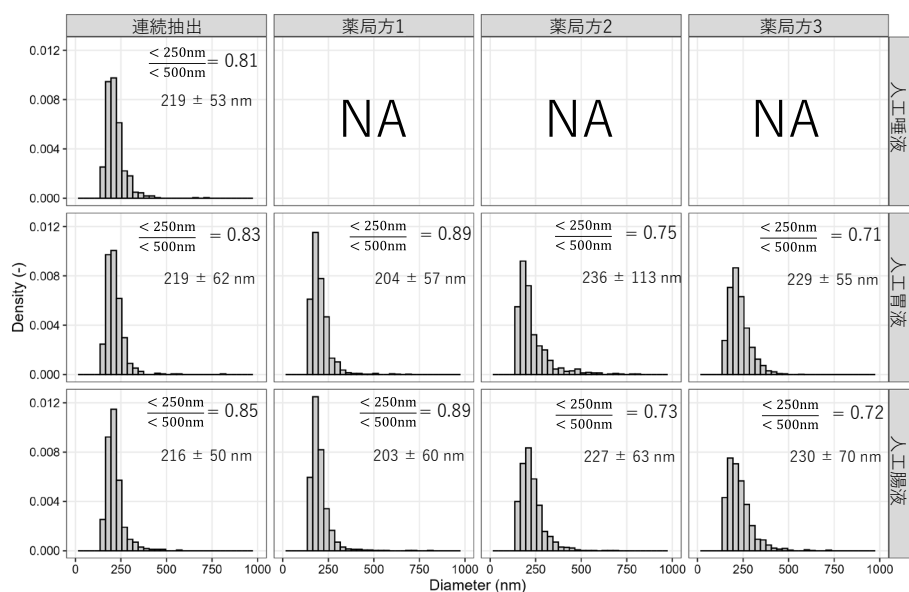
単一溶媒や消化管液等に対して様々な分散手法を試行するために、食品添加物および工業用として使用されている $\text{TiO}_2$ を入手した。前年度に確立したspICP-MS法を用いて入手した $\text{TiO}_2$ 試料の粒径分布を分析した。人工消化液を用いた前処理には、酸化アルミニウムナノ粒子に対して同様の検討を行ったSiegら(2017, DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b02729)の方法を参考にした(以降、連続抽出)。連続抽出に加えて、第18改正日本薬局方の製剤試験法-溶出試験を用いた検討も行った。その際には、希釈溶媒の種類と超音波処理の有無で以下の3つの方法を比較した。薬局方1(希釈溶媒: 0.05% FL-70, 超音波処理: 有り)、薬局方2(希釈溶媒: 人工消化液, 超音波処理: 有り)、薬局方3(希釈溶媒: 人工消化液, 超音波処理: 無し)。

食品添加物(Sample D)および工業用 $\text{TiO}_2$ (Sample I)の分析例を図に示す。Sample Dでは、抽出法・希釈溶媒の差異は粒径分布へほぼ影響しなかった。薬局方2を除いて、人工腸液中では<250 nm粒径の割合が大きかったことから、静電斥力が働かず粒子が凝集し沈降した可能性が考えられた。また、粒径分布の右裾が広いことも、凝集しやすい可能性を支持しているものと考えられた。

Sample Iの平均粒径は203~236 nmであり、Sample Dの粒径(336~432 nm)と比較すると小さかった。概して、工業用 $\text{TiO}_2$ の方が食品添加物用 $\text{TiO}_2$ より粒径が小さい傾向にあった。また、Sample Iでは人工消化液の差異や超音波処理の有無よりも分散媒の影響の方が大きいと考えられた。

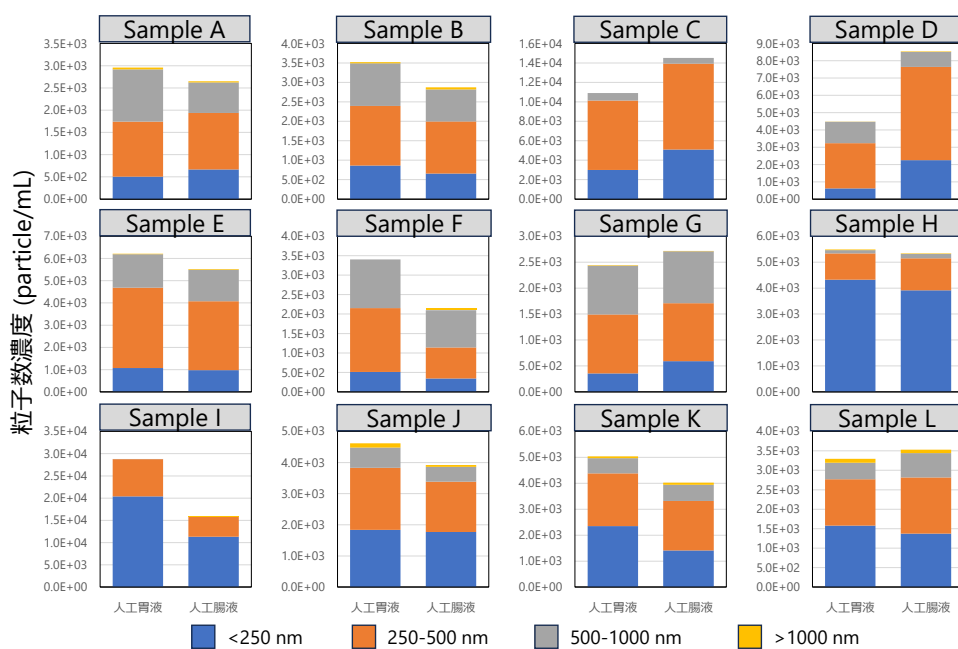


<図3. 質量分析法を用いた食品添加物用の二酸化チタン (Sample D) の粒径分布>

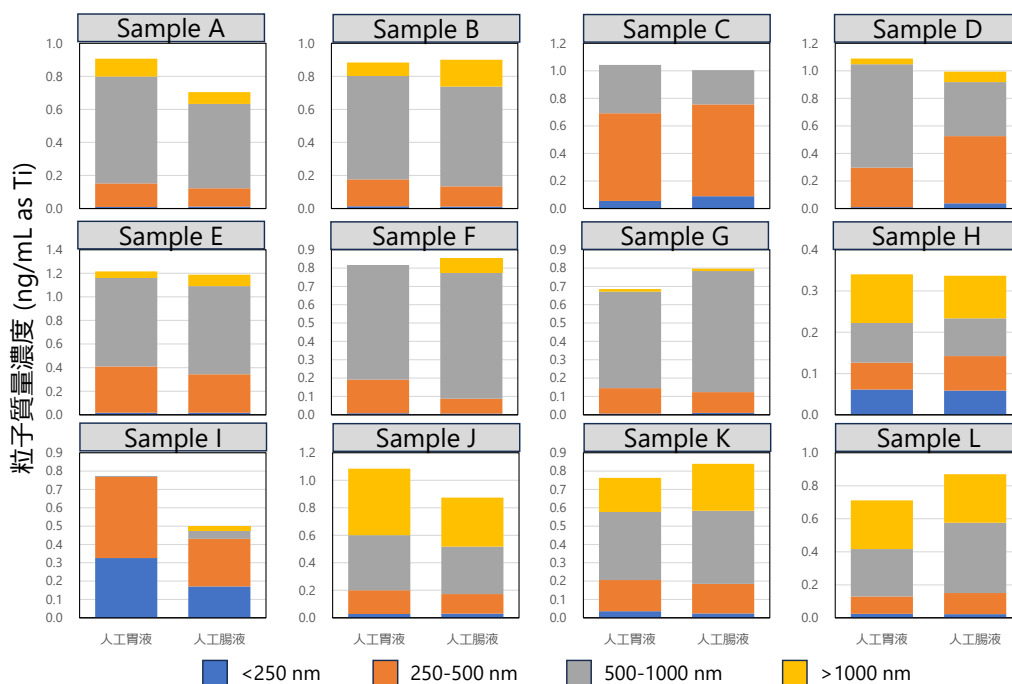


<図4. 質量分析法を用いた工業用の二酸化チタン (Sample I) の粒径分布>

人工消化液中での凝集あるいは沈降の程度を評価するため、粒子数濃度および粒子質量濃度を評価した。その際に、最もヒトの体内環境に近い条件である薬局方3で評価した。



<図5. 薬局方3を用いた人工消化液中での二酸化チタン数濃度の変化>



<図6. 薬局方3を用いた人工消化液中での二酸化チタン質量濃度の変化>

数濃度と質量濃度の差を比較すると、Sample A, I, Jは人工腸液で処理をすると大きな粒子が沈降することにより数濃度及び質量濃度ともに減少した。Sample B, E, F, Kでは、人工腸液で処理をすると

数濃度は減少する一方で質量濃度には大きな変化は認められなかったから、粒子が凝集するものの沈降までには至らないと考えられた。Sample CとDでは、数濃度が増加するものの質量濃度には大きな変化は認められなかったことから、人工胃液中では凝集するものの人工腸液中では凝集しにくかったと考えられた。spICP-MS法は、対象粒子中の元素濃度を定量するため、他の分析法では評価することが困難な数濃度と質量濃度を同時に評価することが可能である。そのため、本研究で示したように、溶液中での挙動を推測することが可能であった。

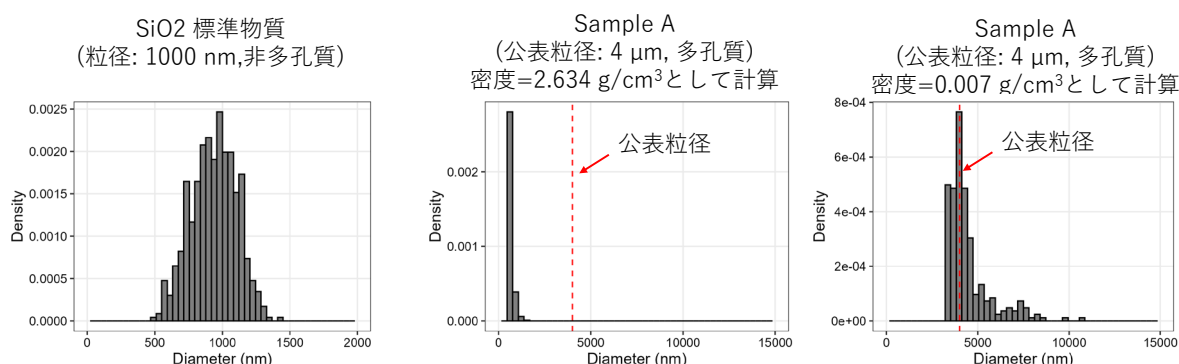
次に、実際の食品に含まれるTiO<sub>2</sub>の分析を試みた。試料1 gに0.05% (w/v) FL-70を10mL添加し、超音波処理を1時間行った。超音波処理後は、一晚常温で静置し上清を得た。得られた上清は適宜希釈し、15分間超音波処理を行ったものを検液とした。平均粒径が230~350 nmのTiO<sub>2</sub>粒子が検出され、250 nm以下の粒子を10%以上含んでいた。チョコレート菓子やグミには、インスタントラーメンや漬物よりも多くのTiO<sub>2</sub>粒子が含まれている傾向が認められた。spICP-MS法はナノ粒子原体だけでなく、食品に含有した微小チタン粒子に対しても適用可能であることが示された。

## 2) 二酸化ケイ素のケーススタディ

粒径が既知の非多孔質SiO<sub>2</sub>粒子の粒径分布をspICP-MSで測定したところ、推定された平均粒径(936 ± 167 nm)は公称粒径(976 ± 30 nm)と良い一致を示した。従って、spICP-MS法はTiO<sub>2</sub>粒子だけでなくSiO<sub>2</sub>粒子にも適用可能であることが示された。

次に、入手した5種類の二酸化ケイ素粒子について、公開されている情報を確認したところ全て多孔質粒子であると考えられた。従って、質量から粒径に換算するためには内部の空隙を含めた密度が必要である。公開されている粒径(μm)と比表面積(m<sup>2</sup>/g)の情報から空隙率を推定し、空隙を含めた粒子の密度を推定して粒径の算出に用いた。なお、推定されたかさ密度は非常に小さい値となったため、有効数字一桁に丸め、その際は切り上げを行った。なお、公開された情報が無かった試料については、他の試料の平均値を用いた。

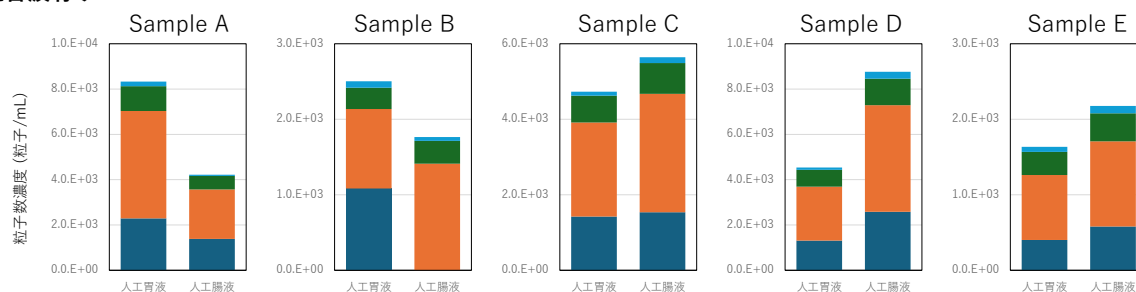
公表粒径が4 μmのSiO<sub>2</sub>粒子の結果を示す。非多孔質粒子として密度を2.634 g/cm<sup>3</sup>として計算した粒径は623±125 nmと公表粒径の20%より小さく推定されたのに対して、多孔質粒子として推定した密度である0.007 g/cm<sup>3</sup>を用いて計算した粒径は4.5 ± 1.1 μmと公表値と近い値を示した。改めて、spICP-MS法では、粒子の密度や質量分率の設定が適切でない適切な粒径を解析できないことが示された。



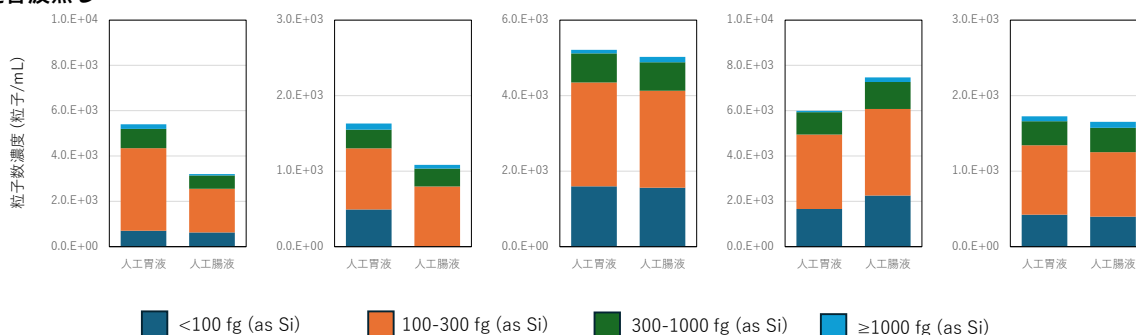
< 図7. spICP-MSを用いた二酸化ケイ素の粒径分布と密度パラメーターの影響 >

次に、薬局方2および薬局方3を用いた人工消化液中でのSiO<sub>2</sub>粒子の粒径分布についてその変化を比較した。入手した食品添加物用SiO<sub>2</sub>粒子については、密度情報の不確かさに伴って粒子径の推定には不確かさがあることから、ここでは単一粒子質量を基に分布の変化を比較した。

#### 超音波有り



#### 超音波無し



<図8. 薬局方3を用いた人工消化液中での二酸化ケイ素の粒子数濃度の変化>

Sample Bを除いて、人工胃液と人工腸液では粒径分布に顕著な差は認められなかった。清澄剤として使用されるSample AとBでは、人工腸液よりも人工胃液で処理した場合に粒子数濃度が高く、流動性改善を目的として使用されるSample C～Eでは、人工腸液で粒子濃度が高くなる傾向があった。概して、超音波処理の有無で粒径分布は大きく変わらなかったが、粒子の濃度は超音波処理をした方が高い傾向にあった。ストークスの式により、微小粒子が流体中を沈降する際の終端速度は粒径の二乗に比例するため、試験に用いたSiO<sub>2</sub>粒子の粒径はμmオーダーと比較的大きいため、超音波処理が粒子の沈降及び数濃度に影響を与えていると考えられた。

### 3) 食品中に含有されている白金ナノマテリアルの分析

”ナノ”+”プラチナ”をキーワードに検索した健康食品6商品について、プラチナナノ (Pt-NP) 粒子の解析を行った。Pt-NPの解析には、粉末/顆粒を超純水に溶解させたものを検液とした。カプセル製品はカプセル内の粉末/顆粒のみを供試した。水溶液製品は適宜超純水で希釈したものを測定した。健康食品からは平均粒径26～30 nmのPt-NPが検出されたが、イオン性のPtは検出されなかった。含有量が明記されている製品の内、1製品からはPtの信号が粒子としてもイオンとしても検出されなかった。また測定結果から推定されたPt含有量は表示値よりも低かったが、この原因としてspICP-MSの検出限界よりも小さいPt-NP (<22 nm) が評価されないことによる過小評価が原因と考えられた。

### 4) フィールドフローフラクシオネーションを用いた分析

FFFの適用についても検討を行った。CF3 については、人工消化液で処理を行ったTiO<sub>2</sub>およびSiO<sub>2</sub>ともに適切な分離条件を確立することは出来なかった。特にキャリアー液に人工腸液を用いた場合には、回収率が顕著に低下しチャンネルとの相互作用によるチャンネル内に保持されたまま溶出してこないことが原因と考えられた。そこで、人工消化液を用いずに、TiO<sub>2</sub>粒子の試料溶媒とキャリアー液について再検討した。試料溶媒には0.06% (w/w) ヘキサメタリン酸Naを、キャリアー液には0.005 % (w/w) FL-70を用いた。フラクトグラムの比較から、Sample Dの方がSample Aよりも溶出が早く質量が小さい可能性が示唆された。MALSによる回転半径の算出結果もこの推定を支持するものであった。条件は異なるものの、spICP-MSの結果と似た粒径が得られた。

AF4については、異なる粒径の粒子の分離は可能であったものの、粒子径を評価するにはMALSと連結する必要がある。AF4-MALSで白金ナノマテリアルが含まれているSample Cを測定したところ、保持時間 6分付近に回転半径が17 nm (粒径が34 nm) の粒子が検出され、保持時間15分以降では回転半径が20~190 nmの粒子 (粒径が40~380 nm) が検出された。これらのピークを分取してICP-MSで測定したところ、両ピーク共にブランクより大きな信号強度が得られたことから、白金を含有した粒子であると推察された。統計的に有意ではないが ( $p = 0.062$ )、AF4-MALSで6分付近に検出されたピークの粒径 ( $34.6 \pm 4.4$  nm) は、spICP-MSで測定した粒径 ( $26.6 \pm 4.4$  nm) よりも大きな値が得られた。spICP-MSではその原理上、粒子が不純物を含んでいる場合、粒子に空隙がある場合、表面処理をされた粒子の場合には、推定した粒径は過小評価となる。したがって、分析の不確かさだけでなく、分析原理に起因してspICP-MSでは粒径が過小評価されたと考えられた。また、このサンプルには、難消化デキストリンやSiO<sub>2</sub>粒子も含まれており、保持時間15分以降のピークはこれらの凝集体であると考えられた。

(2) 個別課題：光学系分析法を用いた食品中のナノ粒子成分の粒子分布分析に関するケーススタディ (研究担当者名：穂山浩 (星薬科大学))

#### 1). 二酸化チタンのケーススタディ(LDによる測定とDLSとの比較)

食品添加物として市販されている7種の二酸化チタンおよび工業用の5種のチタンに対して、人工胃液・人工腸液中 (日本薬局方崩壊溶出試験第一液を人工胃液、日本薬局方崩壊溶出試験第二液を人工腸液として利用) での粒度分布をLDとDLSの結果を比較した。試料は湯浴式の超音波分散器US-10PSで40分間分散させた。測定にあたっては、DLS測定時と同様に、生体内での挙動を考慮し、分散剤や超音波分散装置による分散は行わなかった。

食品添加物用二酸化チタンはピークが2つに分かれるものが多く、DLSで二峰性だったものはLDでも二峰性となる傾向があったが、例外も見られた (図8)。工業用の二酸化チタンはDLSではほぼすべてのサンプルで二峰以上の多峰性を示していた。LDにおいてもDLSほど明瞭ではないが、類似の多峰性を示すものが多く、完全な単一ピークのものは見られなかった (図9)。

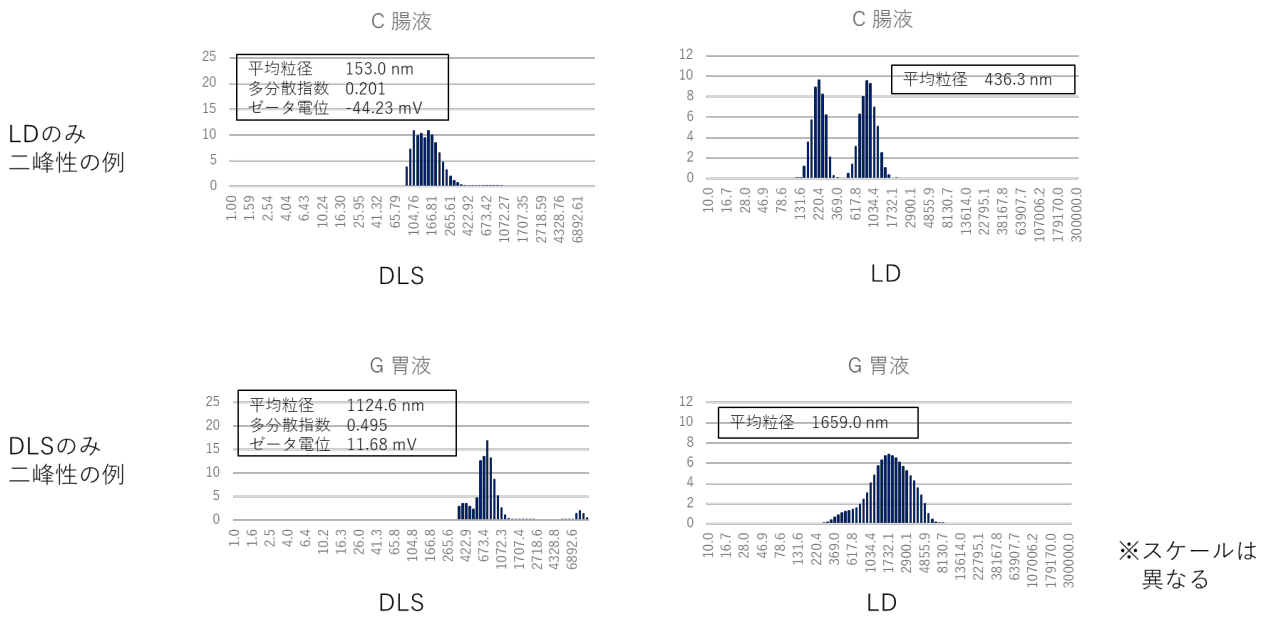


図8. 食品用二酸化チタンの粒度分布の一例

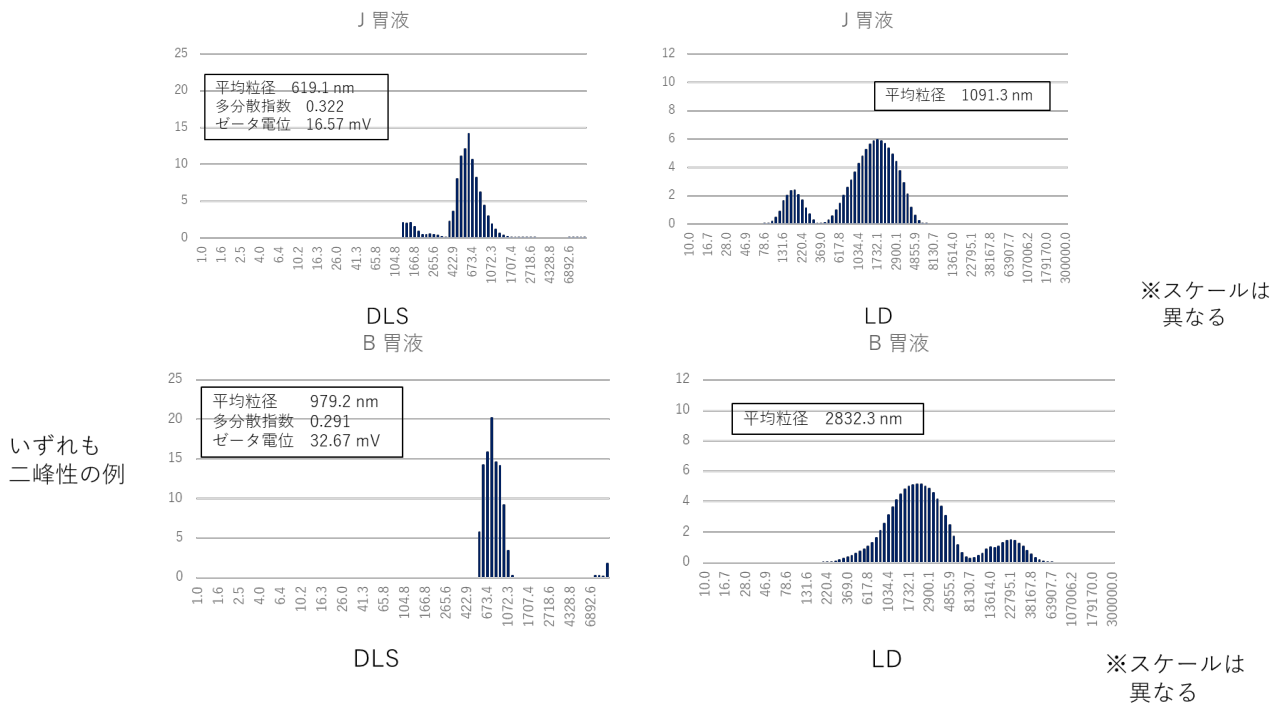


図9. 工業用二酸化チタンの粒度分布の一例

粒径に関しては、DLSに比べ、LDの方が大きく出やすい傾向がみられた。しかしサンプル間で比較すると、DLSで他のサンプルに比べ相対的に平均粒径の小さいサンプルは、LDでも平均粒径が小さいという相関は見られた。

今回の実験でEFSAのナノ粒子の定義に該当したものは、食品用においては37°CのDLSで2サンプル

ル、LDで2サンプル、25°CのDLSで4サンプル、LDで4サンプルであった(表4)。工業用においては37°CではDLSで2サンプル、LDで2サンプル、25°CではDLSで4サンプル、LDで4サンプルであった(表5)。

ただし、LDによる測定においては、DLSと同じ100 ppm条件では測定の目安とされる吸光度0.2を大きく上回ってしまい、信頼できるデータが得られないものが多数発生した。今後はサンプルを10 ppmに希釈するなど、測定条件の見直しを行ったうえで、再度検討を行いたい。

表4. 各サンプルに占める粒径500 nm以下および250 nm以下の粒子の割合(食品用二酸化チタン)  
【食品用】

37°C	DLS			LD			25°C	DLS			LD			
	509nm以下の 粒子の比率(%) ①	265nm以下の 粒子の比率(%) ②	①中の② の比率 (%)	503nm以下の 粒子の比率(%) ③	276nm以下の 粒子の比率(%) ④	③中の④ の比率 (%)		509nm以下の 粒子の比率(%) ①	265nm以下の 粒子の比率(%) ②	①中の② の比率 (%)	503nm以下の 粒子の比率(%) ③	276nm以下の 粒子の比率(%) ④	③中の④ の比率 (%)	
A	胃液	20.6	0.0	0.0	13.2	11.8	89.6★	胃液	24.3	0.0	0.0	14.8	14.3	96.4★
	腸液	49.0	3.2	6.6	2.3	0.1	2.9	腸液	47.0	0.0	0.0	1.2	0.7	59.2
B	胃液	0.0	0.0	0.0	2.7	0.2	6.2	胃液	33.9	0.0	0.0	12.0	11.2	93.1★
	腸液	23.0	0.0	0.0	0.2	0.1	33.3	腸液	10.3	0.0	0.0	1.6	0.1	6.4
C	胃液	2.3	0.0	0.0	2.7	1.3	46.9	胃液	0.0	0.0	0.0	2.7	1.0	38.4
	腸液	99.9	85.5	85.5★	79.8	75.2	94.2★	腸液	99.9	97.4	97.5★	46.4	43.5	93.8★
D	胃液	23.7	0.0	0.0	0.9	0.1	7.1	胃液	36.1	0.0	0.0	1.4	0.5	37.2
	腸液	93.6	5.4	5.8	35.5	31.0	87.5	腸液	97.2	41.4	42.6★	44.6	42.0	94.2★
E	胃液	15.5	0.0	0.0	3.8	1.0	26.2	胃液	53.5	7.1	13.2★	0.5	0.1	7.4
	腸液	36.7	0.0	0.0	3.8	1.0	26.1	腸液	77.6	0.0	0.0	42.0	0.3	4.0
F	胃液	0.0	0.0	0.0	1.2	0.7	58.4	胃液	51.6	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0
	腸液	68.0	8.4	12.4★	4.4	0.0	0.0	腸液	69.4	16.9	24.4★	8.2	0.3	17.9
G	胃液	15.4	0.0	0.0	4.5	0.1	1.5	胃液	54.6	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0
	腸液	20.5	0.0	0.0	2.5	0.8	30.7	腸液	55.9	0.0	0.0	1.9	1.1	23.7

表5. 各サンプルに占める粒径500 nm以下および250 nm以下の粒子の割合(工業用二酸化チタン)  
【工業用】

37°C	DLS			LD			25°C	DLS			LD			
	509nm以下の 粒子の比率(%) ①	265nm以下の 粒子の比率(%) ②	①中の② の比率 (%)	503nm以下の 粒子の比率(%) ③	276nm以下の 粒子の比率(%) ④	③中の④ の比率 (%)		509nm以下の 粒子の比率(%) ①	265nm以下の 粒子の比率(%) ②	①中の② の比率 (%)	503nm以下の 粒子の比率(%) ③	276nm以下の 粒子の比率(%) ④	③中の④ の比率 (%)	
H	胃液	75.1	48.8	65.0★	7.0	5.7	81.0	胃液	78.6	69.0	87.7★	7.4	5.8	78.4
	腸液	9.7	0.0	0.0	0.7	0.1	18.2	腸液	28.1	8.1	28.7★	2.6	1.2	44.3
I	胃液	35.0	0.0	0.0	2.9	0.8	27.6	胃液	49.3	29.1	58.9★	2.2	0.3	12.3
	腸液	57.8	25.9	44.7★	0.2	0.0	14.3	腸液	67.0	34.6	51.6★	0.3	0.0	10.0
J	胃液	86.1	0.0	0.0	14.6	13.0	89.3★	胃液	36.5	10.6	29.2★	17.1	15.7	91.8★
	腸液	67.0	26.3	39.2★	15.7	9.2	58.5★	腸液	84.0	13.9	16.6★	18.9	13.3	70.5★
K	胃液	82.2	0.0	0.0	29.7	27.4	92.2★	胃液	85.3	32.1	37.6★	20.4	18.1	88.7★
	腸液	49.7	6.3	12.6★	18.6	13.3	71.5★	腸液	72.4	1.8	2.5	17.1	12.6	73.5★
L	胃液	0.0	0.0	0.0	10.5	9.6	91.1★	胃液	29.2	0.3	1.0	7.4	6.5	87.8
	腸液	0.0	0.0	0.0	6.0	4.0	66.5	腸液	51.4	16.3	31.8★	6.8	5.4	79.0

※★…EFSAのナノ粒子の定義に該当

## 2). 二酸化ケイ素のケーススタディ(DLSとLDによる測定と比較)

食品用として市販されている5種の二酸化ケイ素(シリカ)に対して、二酸化チタンと同様の条件下での粒度分布をDLSおよびLDでの測定と比較を行った。このうち3種は乾燥剤として添加されるなど最終製品に残るものであり、残り2種はビールの澱下げなど生産工程で使用され、最終製品には残存し

ないものである。

この結果、DLSではほぼ全てのサンプルの平均粒子径が1.0~1.8 nmとなり、粒度分布も極端に小さな値に偏った。500~15000 nm付近に広く分布するLDとは大きく異なり、正常に測定できない可能性が疑われる結果となった(図10)。

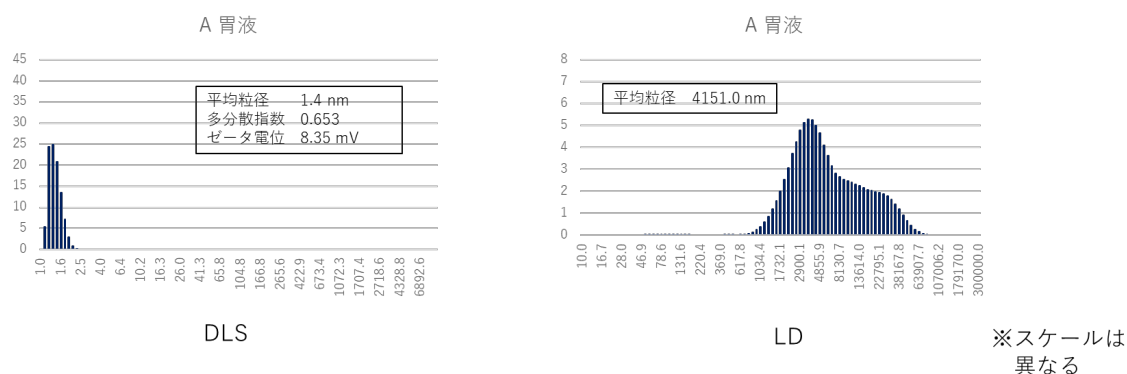


図10. シリカの粒度分布の一例

今回の結果では、DLSではすべての条件・サンプルにおいて、EFSAのナノ粒子の定義に当てはまることとなった。ただし、この値が真値であるかは疑わしい。LDは37°Cで1サンプル、25°Cで2サンプルが該当していた(表6)。

	37°C						25°C					
	DLS	DLS	DLS	LD	LD	LD	DLS	DLS	DLS	LD	LD	LD
	509nm以下の 粒子の比率 (%)①	265nm以下の 粒子の比率 (%)②	①中の② の比率 (%)	503nm以下の 粒子の比率 (%)③	276nm以下の 粒子の比率 (%)④	③中の④ の比率 (%)	509nm以下の 粒子の比率 (%)①	265nm以下の 粒子の比率 (%)②	①中の② の比率 (%)	503nm以下の 粒子の比率 (%)③	276nm以下の 粒子の比率 (%)④	③中の④ の比率 (%)
A 胃液	100.0	100.0	100.0★	0.2	0.2	98.0	100.0	100.0	100.0★	0.3	0.3	96.2
腸液	92.0	88.5	96.2★	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0★	0.6	0.8	100.0	
B 胃液	100.0	100.0	100.0★	0.4	0.3	71.3	100.0	100.0	100.0★	0.1	0.0	0.0
腸液	100.0	100.0	100.0★	0.5	0.5	93.3	100.0	100.0	100.0★	0.9	0.8	98.8
C 胃液	100.0	100.0	100.0★	0.1	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0★	0.8	0.8	96.3
腸液	100.0	100.0	100.0★	12.5	12.5	100.1★	100.0	100.0	100.0★	13.1	13.0	99.1★
D 胃液	100.0	100.0	100.0★	0.6	0.0	1.6	100.0	100.0	100.0★	36.5	36.5	100.0★
腸液	100.0	100.0	100.0★	0.2	0.2	98.6	100.0	100.0	100.0★	1.2	1.2	100.0
E 胃液	100.0	100.0	100.0★	0.0	0.0	0.0	80.0	80.0	100.0★	0.0	0.0	0.0
腸液	100.0	100.0	100.0★	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0★	0.6	0.6	100.0

※★…EFSAのナノ粒子の定義に該当

表6 各サンプルに占める粒径500 nm以下および250 nm以下の粒子の割合(シリカ)

### 3). リポソームのケーススタディ(DLS と LD による測定と比較)

O/W型エマルジョン(リポソーム)に対して、DLSおよびLDを用いて粒度分布を測定した。サンプルの組成は分散媒：70%グリセロール水 / 分散粒子：MCTオイル / 界面活性剤：レシチンまたはリゾレシチン(両者とも指定食品添加物)で、分散粒子であるMCTオイルが100 ppmになるよう人工胃液・人工腸液で希釈して用いた。

この結果、DLSにおいては、レシチンよりリゾレシチンで、人工胃液より人工腸液で、より分散す

る傾向がみられた。粒度分布に関しては、DLSは単峰性、LDは二峰性を示すものが多かった(図11)。

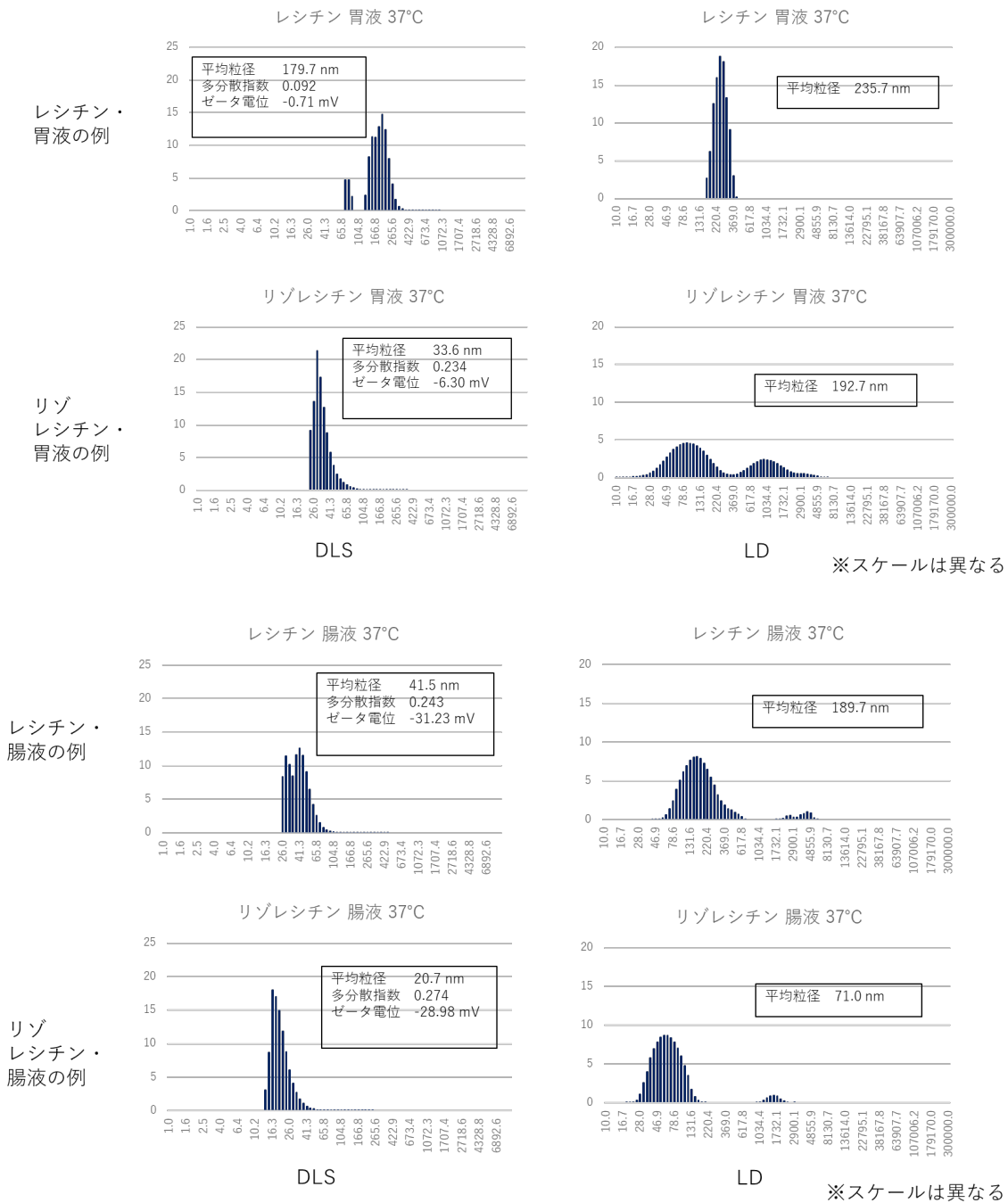


図11 リポソームの粒度分布の一例

また、LDは、DLSより全体的に大きな粒径を示したが、いずれの条件・測定方法においても、すべてのサンプルがナノ粒子に該当する結果となった（表7）。

37°C		DLS	DLS	DLS	LD	LD	LD
		509nm以下の 粒子の比率(%)①	265nm以下の 粒子の比率(%)②	①中の② の比率(%)	503nm以下の 粒子の比率(%)③	276nm以下の 粒子の比率(%)④	③中の④ の比率(%)
レシチン	胃液	100.0	97.3	97.4★	100.0	74.3	74.3★
	腸液	100.0	99.9	99.9★	93.4	82.3	88.1★
リゾ	胃液	100.0	99.9	99.9★	70.6	67.0	95.0★
レシチン	腸液	100.0	100.0	100.0★	95.3	95.3	100.0★
25°C		DLS	DLS	DLS	LD	LD	LD
		509nm以下の 粒子の比率(%)①	265nm以下の 粒子の比率(%)②	①中の② の比率(%)	503nm以下の 粒子の比率(%)③	276nm以下の 粒子の比率(%)④	③中の④ の比率(%)
レシチン	胃液	100.0	99.6	99.7★	91.1	60.4	66.3★
	腸液	100.0	99.9	99.9★	92.4	81.2	87.9★
リゾ	胃液	100.0	99.9	99.9★	58.2	55.6	95.5★
レシチン	腸液	100.0	100.0	100.0★	59.7	49.9	83.5★

※★…EFSAのナノ粒子の定義に該当

表7. 各サンプルに占める粒径500 nm以下および250 nm以下の粒子の割合（リポソーム）

#### 4). 二酸化チタンのケーススタディ(LDによる測定とDLSとの比較)

食品添加物として市販されている7種の二酸化チタンおよび工業用の5種の二酸化チタンに対して、これまでの検討では使用してこなかった分散剤と超音波を使用し、極力一次粒子もしくはそれに近い状態になるよう試みた状態でDLSでの測定を試みた。また、その結果を、分散剤と超音波を使用しなかった場合の結果と比較した。

この結果、分散剤・超音波処理を行った試料の粒径は500～1000 nm付近に集中した。

粒度分布に関しては、食品用・工業用ともに処理なしの状態が多峰性を示した試料でも、処理を行うと単峰性を示すものが複数見られた。ヒストグラムから、凝集して1000 nm以上の大きな粒子を形成していたものが、処理によって分散したことが考えられる。

また、処理なしの段階で人工胃液より人工腸液条件下での粒径が大きい、逆に人工腸液より人工胃液条件下での粒径が大きいといった傾向は、処理を行っても同様の傾向がみられた。

食品用は処理なしのものに比べ、粒径は小さくなる傾向がみられた（表8）。

また、粒度分布については、処理なしの結果が多峰性だった試料でも、処理を行ったものは単峰性またはそれに近い結果を示すものが多かった(図12)。

37°C	DLS		25°C	DLS	
	平均粒径(nm)	多分散指数		平均粒径(nm)	多分散指数
A	胃液	596.8	胃液	575.9	0.271
	腸液	928.8	腸液	946.6	0.424
B	胃液	685.2	胃液	693.1	0.178
	腸液	703.8	腸液	1040.6	0.397
C	胃液	1810.1	胃液	1623.9	0.66
	腸液	185.0	腸液	207.6	0.144
D	胃液	612.6	胃液	561.5	0.266
	腸液	223.9	腸液	219.4	0
E	胃液	398.2	胃液	324.5	0.032
	腸液	309.7	腸液	168.1	0
F	胃液	830.8	胃液	662.0	0.287
	腸液	664.0	腸液	632.5	0.277
G	胃液	792.5	胃液	1072.8	0.214
	腸液	694.9	腸液	925.9	0.355

表8. 食品用二酸化チタン (分散剤・超音波あり)の平均粒径と多分散指数

分散剤  
+  
超音波

処理  
なし

処理  
あり

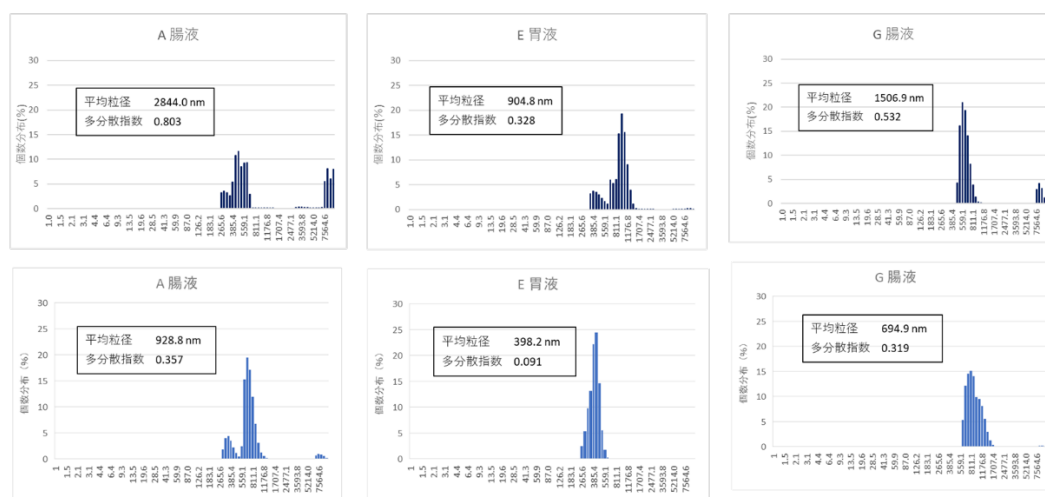


図12 食品用二酸化チタンの粒度分布の比較<<一例>>

工業用は試料H、I(人工胃液・人工腸液いずれも)など処理なしの状態で大きな平均粒径を示したものは、処理ありの結果で顕著に小さな粒径を示したが、もともと平均粒径が1000 nmだった試料については、わずかに小さくなったものの、食品用ほど大きな変化は見られなかった(表9)。

粒度分布は単峰性をとるものと多峰性をとるものの両方がみられた(図13)。

37°C			25°C		
	DLS	DLS		DLS	DLS
	平均粒径(nm)	多分散指数		平均粒径(nm)	多分散指数
H	胃液	61.3	H	胃液	65.0
	腸液	122.8		腸液	127.7
I	胃液	1183.6	I	胃液	719.3
	腸液	182.5		腸液	150.3
J	胃液	528.0	J	胃液	358.0
	腸液	433.8		腸液	367.4
K	胃液	617.4	K	胃液	644.0
	腸液	277.2		腸液	347.2
L	胃液	555.6	L	胃液	550.4
	腸液	346.4		腸液	404.1

表9. 工業用二酸化チタン(分散剤・超音波あり)の平均粒径と多分散指数

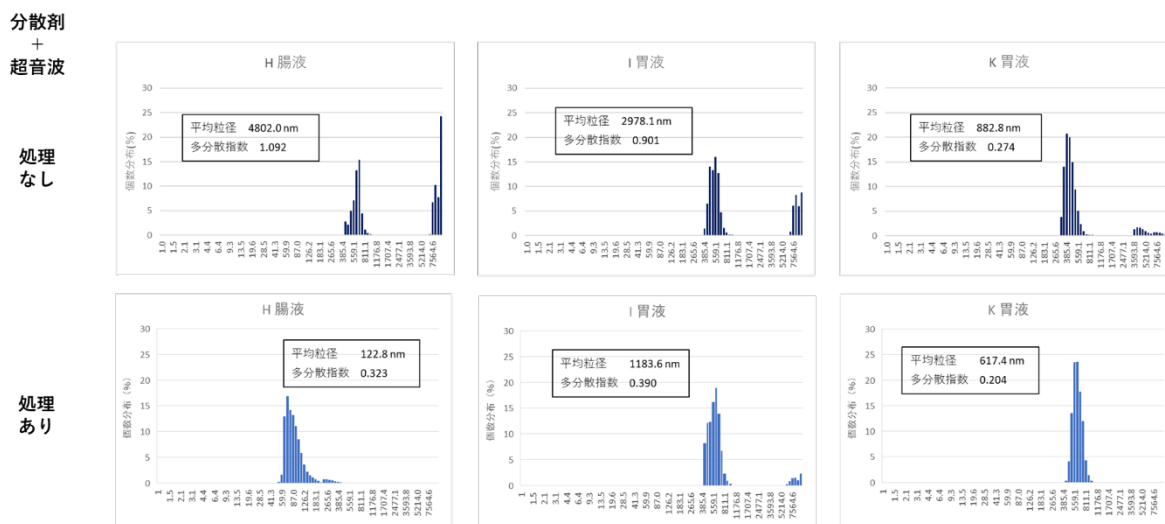


図13 工業用二酸化チタンの粒度分布の比較<<一例>>

### 光学系分析法の総括

今回の結果より、二酸化チタンにおいては測定可能な濃度の範囲が広いDLSの方がより簡便に測定ができ、シリカにおいてはLDの方が信頼できる値を得られるということが分かった。また、リポソームについても、DLSとLDとでは若干異なる傾向を示した。これらの結果から、複数の分析法を用いて測定することが安全性評価において重要であると考えられる。

### 3 研究全体の成果、考察及び結論

ナノマテリアルは、従来の物質とは異なる物理化学的性質によりこれまでとは異なる有害性をもたらす懸念も指摘されているが、その安全性を網羅的に評価するための国際的に標準化された手法は未だ確立されていない。一方、欧州ではナノマテリアルを化学物質の登録システムに取り込んだことに加え、EFSA では食品関連分への適用に関するリスク評価ガイダンスの整備を進化させている。我が国においては、明示的にナノ粒子の入った食品を評価するスキームは構築されていない。そこで、本研究では、EFSA のリスク評価ガイダンスを基本として、食品中のナノ粒子のリスク評価にとって最も重要な課題である食品中のナノ粒子分析を行うための現実的な課題整理や実際の分析手法を用いた実験的試行に焦点当てつつ、食品中のナノ粒子のリスク評価の留意事項の基本的な考え方の骨子案とナノ粒子の分析法の注意事項を取り纏めることを目的とした。

まず、EFSA のガイダンスの基本的な概念の調査と欧州における食品分野でのナノマテリアルのリスク評価状況について調整を行った。また、ナノマテリアル特有のリスク評価の適用の有無を判断するためのキーとなる分析法の実用性を検証するために、二酸化チタンや二酸化ケイ素を用いて人工消化液中における分散性を評価するケーススタディを行った。これらの調査情報や研究成果を基に、食品中のナノ粒子の安全性評価に関する基本原則の骨子案と留意事項を作成した。参考とする EFSA のガイダンスにおいては、ナノマテリアルが消化管から吸収される前に、分解や溶解などによってナノ粒子の特徴を失ったものについては、既存の化学物質に対する評価ガイダンスが有効であるという判断に基づき、段階的なリスク評価（物性評価、*in vitro* 評価、*in vivo* 評価、詳細評価）の枠組みが設定されていた。一方、EFSA におけるナノマテリアルに関しての最近の評価は、いくつか知られているが、まだ、ナノマテリアルに特有のリスク評価が行われた事例はなかった。さらに、欧州におけるナノマテリアルの登録システムを調査したところでは、食品分野に適用されている可能性のある物質は、水酸化鉄、二酸化ケイ素、二酸化チタン、アルミノケイ酸ナトリウム、ケイ酸カルシウムが主要な物質であり、用途が幅広い二酸化ケイ素を除き、食品製造プロセスでの添加物用途が主体であると考えられた。つまり、欧州においても食品関連の用途に使用されるナノマテリアルの本格的な運用はまだ行われていない実態が示された。

EFSA のナノマテリアルのリスク評価は、曝露に依存した段階的アプローチをとっており、最初にステップで消化管に吸収する前にナノ粒子として存在するかどうか大きな判断の分かれ目になっている。吸収前に可溶化して粒子画分がなくなってしまうか、250 nm 以上の粒子は消化管からの吸収が殆ど行われぬという知見に基づき、それより小さい微粒子確認の存在が否定されれば、ナノマテリアルに特有の評価は必要なく、従来の評価基準で評価可能とする判断の段階が最もクリティカルな評価段階となっている。そこで、この評価ステップに注目して、一般的に粒子を分析できる機器を用いて、質量分析法を用いた手法と光学系分析法を用いた手法で、測定における実用上の課題を抽出するためのケーススタディを行った。

質量分析法によるケーススタディでは、spICP-MS を用いて二酸化チタンと二酸化ケイ素を用いて、Sieg らの方法による連続人工抽出法（人工唾液、人工胃液、人工腸液）及び日本薬局方溶出試験液中の分散状態を測定した。食品添加物用の二酸化チタン 7 試料と工業用の二酸化チタン 5 試料を用いた検討を行った。TiO<sub>2</sub> 粒子においては、抽出法・希釈溶媒の差異は粒径分布へほぼ影響しなかったが、人工腸液中では <250 nm 粒径の割合が大きくなってことから、静電斥力が働かず粒子が凝集し沈降した可能性が考えられた。また、spICP-MS 法は実際の食品中の TiO<sub>2</sub> 粒子を測定することも可能であったが、実験環境にある様々な材、特に白い製品には TiO<sub>2</sub> が使用されており、測定環境でのコンタミネ

ーションに十分注意する必要が明らかとなった。一方、5種類のSiO<sub>2</sub>粒子について解析を行ったところ、入手したSiO<sub>2</sub>粒子が多孔質粒子であったため、粒子の密度や質量分率の設定を適切にするためには、空隙率を推定して空隙を含めた粒子の密度を推定して粒径の算出を行う必要の重要性が確認された。澄清剤として使用される2サンプルでは、人工腸液よりも人工胃液で処理した場合に粒子数濃度が高く、流動性改善を目的として使用される3サンプルでは、人工腸液で粒子濃度が高くなる傾向があった。食品中の分析としては、健康食品6商品について、プラチナナノ(Pt-NP)粒子の解析を行い、一製品以外から平均粒径26~30 nmのPt-NPが検出された。さらに、装置としては、まだ一般的ではないが最新の分離法であるFFFを用いた分析の検討も行った。その結果、CF3については、人工消化液で処理を行ったTiO<sub>2</sub>およびSiO<sub>2</sub>ともに、キャリアー液の人工腸液による回収率の顕著に低下が影響したと考えられ、適切な分離条件を確立することはできなかった。AF4については、異なる粒径の粒子の分離は可能であったものの、粒径を評価するにはMALSと連結する必要があると考えられた。

光学系分析法によるケーススタディでは、食品添加物として市販されている7種の二酸化チタンおよび工業用の5種のチタンに対して、人工胃液・人工腸液中での粒度分布をLDとDLSで測定しその結果を比較した。測定にあたっては、生体内での挙動を考慮し分散剤や超音波分散装置による分散は行わなかった。粒径に関しては、DLSに比べ、LDの方が大きく出やすい傾向がみられた。しかしサンプル間で比較すると、DLSで他のサンプルに比べ相対的に平均粒径の小さいサンプルは、LDでも平均粒径が小さいという相関は見られた。一方、分散剤の使用と超音波処理の分散への影響をDLSで確認したところ、分散剤・超音波処理を行った試料の粒径は500~1000 nm付近に集中した。粒度分布に関しては、食品用・工業用ともに処理なしの状態が多峰性を示した試料でも処理により単峰性を示す傾向が示された。処理なしの段階で人工胃液より人工腸液条件下での粒径が大きい、逆に人工腸液より人工胃液条件下での粒径が大きいといった傾向は、処理を行っても同様の傾向がみられた。また、食品用として市販されている5種の二酸化ケイ素(シリカ)に対して、二酸化チタンと同様の条件下での粒度分布をDLSおよびLDでの測定と比較を行った。その結果、DLSではほぼ全てのサンプルの平均粒径が1.0~1.8 nmとなり、粒度分布も極端に小さな値に偏った。500~15000 nm付近に広く分布するLDとは大きく異なっており、DLSでは正常に測定できない可能性が疑われた。さらに、O/W型エマルジョン(リポソーム)に対して、DLSおよびLDを用いて粒度分布を測定した結果では、レシチンよりリゾレシチンで、人工胃液より人工腸液で、より分散する傾向がみられた。LD法では、DLS法より全体的に大きな粒径を示す傾向があったが、いずれの条件・測定方法においても、すべてのサンプルが250 nm以下の粒子を多く含みナノ粒子と評価するものに該当する結果となった。以上の結果より、二酸化チタンにおいては測定可能な濃度の範囲が広いDLSの方がより簡便に測定ができ、シリカにおいてはLDの方が信頼できる値を得られ、リポソームについてもDLSとLDとでは若干異なる傾向を示した。これらの結果から、複数の分析法を用いて測定することが安全性評価において重要であると考えられた。

上記の調査結果、およびケーススタディの検討結果を踏まえ、“食品中のナノ粒子の安全性評価に関する基本原則の骨子案と留意事項”(別添4)を作成した。基本構成は、1章「背景と目的」、2章「評価の基本的な考え方」、3章「評価の実施手順」、4「リスク判定」、「Appendix」とした。2の評価の基本的な考え方では、適用範囲や評価上課題、段階的フレームの必要性で概論を記した後に、3章において、段階的フレームの各Stepにおける課題や有意事項を纏める形式とした。段階的フレームは野方式はEFSAのガイダンスと同様であるが、ナノ材料が消化管で吸収の可能性があるかどうかを判定するStepで段階を区切るものとし、Step2の経口曝露評価において消化管でのナノ粒子の残留性を評価し、Step3に進むか、通常の化学物質としての評価ガイダンスに進むかの判断を行う形式とした。

Step 4以降は、基本的にEFSAの評価ガイダンスを踏襲している。Step2による評価が重要であることを鑑み、今回のケーススタディで得られた知見を留意事項として「Appendix」に纏めた。

EFSA が 2021 年に公表したナノマテリアル評価ガイダンス及び技術ガイダンスについては、本格的な実施にむけた活動を継続している。2024 年 6 月の OECD のナノマテリアル作業会合時点では、いくつかの課題（例えば、ナノ粒子の凝集における食品マトリックスの影響、飼料添加物の安全性評価に必要な方法）を特定しており、ナノマテリアル評価ガイダンスの適用事例と利害関係者との協議で得られた改善点に基づき、ガイダンス文書を更新する準備を開始した状況である。つまり、近いうちにさらなる改訂版が作成される可能性があることになり、今回作成した基本原則も状況に实际的な運用を開始する際までには状況に応じて随時、改良していく必要性の有るガイダンスとしての位置づけになる可能性がある。また、本研究では二酸化チタンや二酸化ケイ素を中心とした無機系のナノマテリアルをモデル化合物として分析法の留意点の洗い出しを行ったが、リポソーム系などの有機系ナノマテリアルについては、消化酵素なども含んだ消化管内での分解・溶解性の検討が必要となる点については、検討できていない。さらに、ナノマテリアルに特有の評価を必要とする Step3 以降の生物学的評価試験における評価実施例は、国際的にもまだ殆どない状況で理想的な基本原則しか示せていないと考えられる。一方、欧州では動物福祉に基づきナノマテリアルの評価に対しても率先して、NAM (New Approach Method) などの動物実験代替試験法を取り入れる状況にあり、EFSA を含む欧州の評価機関が連携して NAMs4NANO という EU プロジェクトを実施している。特に、STEP3 以降で必要とされる *in vitro* 試験の開発や、*in vivo* 試験の代替化、基本原則の 4 章にも記した“試験および評価の統合的アプローチ (IATA)”で動物試験を用いない評価法の開発やケーススタディを進めており、Step 3 以降の評価法は新たな評価の枠組みとして再整理されていく可能性があると考えられる。本観点においても、国際的な評価手法の進展に応じて今回作成した骨子案は逐次改定していくべきであると思われる。

### III 本研究を基にした論文等

#### 1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

Suzuki Y, Harimoto M, Takahashi M, Akiyama H, Hirose A, Tsutsumi T., Analysis of Silver-containing Nanoparticles in Oysters Using Single-particle ICP-MS. J Environ Chem. 34:9-20 (2024).

#### 2 本研究を基にした学会発表の実績

Hirose A, Shimomura W, Miki N, Ito R, Iwasaki Y, Suzuki Y, Akiyama H. Assessment of particle size distribution of titanium dioxide for food additives in the artificial digestion solution (Abst. No. 3618). Society of Toxicology 63rd Annual Meeting, Salt Lake City, US, 2024.3.10-14.

鈴木美成、張本雅恵、穂山浩、広瀬明彦、堤智昭、食品中二酸化チタン粒子のリスクをナノマテリアルとして再評価すべきか？ - 人工消化液を用いた検討 - 、第32回環境化学討論会（第3回環境化学物質合同大会）、広島、2024.7.5.

Hirose A, Harimoto M, Takahashi M, Tsutsumi T, Akiyama H, Suzuki Y. Assessment of TiO<sub>2</sub> particle size distribution in artificial digestion solutions using single-particle ICP-MS. 58<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Copenhagen, Denmark, 2024.9.18-11.

下村 亘、松島崇大、三木奈津子、伊藤里恵、岩崎雄介、鈴木美成、広瀬明彦、穠山 浩、動的光散乱法とレーザー回折法を用いた食品添加物の二酸化チタンの粒径解析および検討について、日本食品衛生学会第120会学術講演会、愛知、2024. 11.6

穠山浩、光学機器を用いた評価方法について（シンポジウム2：ナノマテリアルの安全性）、日本食品化学学会 第40回食品化学シンポジウム、川崎、2024.11.15

鈴木美成、質量分析などを用いた評価方法について（シンポジウム2：ナノマテリアルの安全性）、日本食品化学学会 第40回食品化学シンポジウム、川崎、2024.11.15

広瀬明彦、光ナノマテリアルの安全性評価について（シンポジウム2：ナノマテリアルの安全性）、日本食品化学学会 第40回食品化学シンポジウム、川崎、2024.11.15

### 3 特許権等の出願・申請等の状況

該当無し

### 4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物

該当無し

### 5 その他（各種受賞、プレスリリース等）

該当無し

## IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

### 1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
食品中のナノ粒子分析に適用可能なリスク評価手法の整理と課題抽出及び基本原則の提案	4	EFSA のナノマテリアルの評価ガイダンスに記載されているリスク評価概要を整理した結果、EFSA の技術要件に関するガイダンスの技術文書における、評価すべきナノマテリアルの特徴の判定基準における課題等も追加整理して、現時点での安全性評価に関する骨子案の素案を作成した。さらに、ケーススタディから得られる実質的な課題についての整理と骨子への付録部分の作成し、当初の目標をほぼ達成できていると考えられる。
食品中のナノ粒子成分の粒子分布分析に関するケーススタディ	4	質量分析法を用いたケーススタディにおいて、二酸化チタンおよび二酸化ケイ素について測定を行った。二酸化チタンにおいては、粒径分布に加えて数濃度および質量濃度を定量化することで、分散/凝集/沈降状態を推定することが可能であった。また、二酸化ケイ素においては検出可能な粒子径が 350 nm 以上であり、EFSA のガイダンスに沿った評価を行うこと

		は困難であった。一方、光学系分析法を用いたケーススタディでは、二酸化チタンにおいては測定可能な粒径や濃度の範囲が広い DLS の方が簡便に測定可能であり、人工胃液より人工腸液の方が分散することが判明した。シリカにおいては LD の方が幅広い粒径のアル値を得られるということが分かった。また、リポソームについても、DLS と LD とでは若干異なる傾向を示した。これらの結果から、複数の分析法について、各々の特徴に合わせて測定することの重要性と、具体的な課題の抽出等も行う事ができており、現時点での目標をほぼ達成できていると考えられる。
--	--	---

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

## 2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	4	評価の骨子案の作成やケーススタディ等の分析法に関して当初の目標をほぼ達成していると考えられる。
(2) 研究成果の有用性	4	食品経由のナノ粒子のリスク評価のための段階的なステップの設定や、各々の段階において考慮すべき論点を纏めることに加え、分析法に関しての具体的な技術的課題を浮き彫りにすることができており、食品中のナノ粒子の安全性を評価する際に評価の基本原則と留意すべき評価観点が参照できるようになっている。
<p>総合コメント</p> <p>食品中のナノ粒子の安全性評価に対する基本原則の骨子案の作成と食品中のナノ粒子の消化管内での残存性を測定、評価する際の技術的な課題も骨子案に追加でき、目標を概ね達成することができた。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。  
本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。

(別添1)

## 研究成果の概要 (和文)

本研究では、EFSAのリスク評価ガイダンスを基本として、食品中のナノ粒子のリスク評価にとって最も重要な課題である食品中のナノ粒子分析を行うための現実的な課題整理や実際の分析手法を用いた実験的試行に焦点当てつつ、食品中のナノ粒子のリスク評価の留意事項の基本的な考え方の骨子案とナノ粒子の分析法の注意事項を取り纏めることを目的とした。基本的な考え方の整理としては、欧州の評価状況とEFSAのガイダンスの構成を調査し、分析法における留意事項を纏めるために、二酸化チタンや二酸化ケイ素を用い人工消化液中での分散性を評価するケーススタディを行った。単一粒子誘導結合プラズマ質量分析法では、人工消化液中での粒子の凝集性が測定環境でのコンタミネーション、粒子密度の設定などが評価に影響することが分かった。また、動的光散乱法は小粒径の検出に優れる一方、レーザー回折法は広範な粒径分布の把握に適しており、両者の併用が有効であることが示唆された。これらの知見をもとに、食品中ナノ粒子の安全性評価に関する基本原則案を作成し、構成は、1章「背景と目的」、2章「評価の基本的な考え方」、3章「評価の実施手順」、4章「リスク判定」、および「Appendix」からなる内容とした。現在、EFSAのガイダンスの改訂作業が予定されており、本研究の骨子案も国際的動向に応じて更新が必要である。

(別添2)

### 研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Research on risk assessment methods for nanoparticles in food
Research project number	JPCAFSC20222207
Research period	FY 2022 – 2024
Name of principal research investigator (PI)	Akihiko Hirose

#### Abstract/Summary

The purpose of this study was to prepare a draft outline of the basic concept of the points to be considered in the risk assessment of nanoparticles in food and to summarize the points to be considered in the analytical method for nanoparticles.

First, we surveyed the evaluation status in Europe and the EFSA guidance, and summarized that the evaluation guidance for nanomaterials adopts a stepwise evaluation (consisting of physical properties evaluation, *in vitro*, *in vivo*, and detailed evaluation), where the junction point of evaluation is whether nanoparticles are degraded and dissolved in the digestive tract. In addition, a case study was conducted to examine the practicality of analytical methods to determine whether nanomaterial-specific evaluations are necessary. Dispersibility evaluations of titanium dioxide and silicon dioxide in artificial digestive solutions were conducted. Based on this information, a draft set of basic principles for the safety evaluation of nanoparticles in foods in Japan was developed.

The case studies primarily evaluated the dispersion of titanium dioxide and silicon dioxide. spICP-MS validation confirmed the challenges of particle aggregation in artificial gastric and intestinal juices and contamination in the measurement environment, as well as the importance of setting particle density. The presence of nanoparticles in food products could also be measured with this method. The limitations of the field flow fractionation method were further analyzed. Case studies in optical analysis suggested that dynamic light scattering is superior for detecting small particles, while laser diffraction is suitable for determining a wide range of particle size distributions, and that a combination of both methods is effective.

Based on these results, we developed a framework for the safety evaluation of nanoparticles in foods using a stepwise evaluation frame. In particular, we set a stage to determine whether or not nanomaterial-specific evaluation is necessary by dividing the stage by the evaluation of nanoparticle persistence in the gastrointestinal tract. In addition, findings from the case studies were added as points to be noted in the Appendix.

EFSA plans to revise the guidance in the future, Europe is actively introducing alternative methods of NAMs (New Assessment methods) to animal testing, and it is expected that new evaluation frameworks including IATA approach may be developed in the future. Therefore, this draft framework will need to be revised according to the latest international trends.

This report provides outcome of the captioned research programme funded by Food Safety Commission Japan (FSCJ). This is not a formal publication of FSCJ and is neither for sale nor for use in conjunction with commercial purpose. All rights are reserved by FSCJ. The view expressed in this report does not imply any opinion on the part of FSCJ.

1. List of papers published on the basis of this research

- 1) Suzuki Y, Harimoto M, Takahashi M, Akiyama H, Hirose A, Tsutsumi T., Analysis of Silver-containing Nanoparticles in Oysters Using Single-particle ICP-MS. J Environ Chem. 34:9-20 (2024).

2. List of presentations based on this research

- 1) Hirose A, Shimomura W, Miki N, Ito R, Iwasaki Y, Suzuki Y, Akiyama H. Assessment of particle size distribution of titanium dioxide for food additives in the artificial digestion solution (Abst. No. 3618). Society of Toxicology 63rd Annual Meeting, Salt Lake City, US, 2024.3.10-14.
- 2) Suzuki Y, Harimoto M, Akiyama H, Hirose A, Tsutsumi T, Should the risk of titanium dioxide particles in food be reevaluated as a nanomaterial? – A study using artificial digestive fluid –, The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Japan Society for Environmental Chemistry, (The 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Environmental Toxicology), Hiroshima, 2024.7.5.
- 3) Hirose A, Harimoto M, Takahashi M, Tsutsumi T, Akiyama H, Suzuki Y. Assessment of TiO<sub>2</sub> particle size distribution in artificial digestion solutions using single-particle ICP-MS. 58th Congress of the European Societies of Toxicology, Copenhagen, Denmark, 2024.9.18-11.
- 4) Shimomura S, Matsushima, Miki N, Ito R, Iwasaki, Suzuki Y, Akiyama H, Analysis and evaluation of titanium dioxide particle size in food additives using dynamic light scattering and laser diffraction methods, The 120th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society for Food Hygiene and Safety, Aichi, 2024.11.6.
- 5) Akiyama H, Evaluation methods using optical equipment (Symposium 2: Safety of Nanomaterials), The 40<sup>th</sup> Symposium of Food Chemistry, Japanese Society of Food Chemistry, Kawasaki, 2024.11.15.
- 6) Suzuki Y, Evaluation method using mass spectrometry, etc. (Symposium 2: Safety of Nanomaterials), The 40<sup>th</sup> Symposium of Food Chemistry, Japanese Society of Food Chemistry, Kawasaki, 2024.11.15.
- 7) Hirose A, Safety Evaluation of Nanomaterials (Symposium 2: Safety of Nanomaterials), The 40<sup>th</sup> Symposium of Food Chemistry, Japanese Society of Food Chemistry, Kawasaki, 2024.11.15.

3. The number and summary of patents and patent applications

None

4. Others (awards, press releases, software and database construction)

None