

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

1. 背景と目的

ナノマテリアルのリスクは、通常の化学物質と同様にその化学組成、物理化学的特性、組織との相互作用、および曝露レベルと曝露時の環境により決定される。しかし、ナノマテリアルは、従来の化学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。例えば、ナノ粒子として吸収された場合に、通常の化学物質と内部曝露の分布や生体成分との反応性、生体内動態等が異なったり、体内ナノ粒子の長期的な残留性を示したりするような場合には、ナノに特異的な試験の実施が考慮されるべきかもしれない。しかし、ナノマテリアルの種類や多様性のため、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新規物質として規制対象と位置づけ、工業用の化学物質の登録制度だけでなく、欧州食品安全機関（EFSA）が2011年に公表した最初の食品分野におけるナノマテリアルの安全性評価法ガイダンスの制定を始めとして、積極的な食品中のナノマテリアルの安全性評価法の確立に向けた活動を進めてきている。その後ガイダンスは、2021年に改定され、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リスク評価上の重要事項として位置づけられ、さらにそのナノ粒子の特性評価を補完するための技術的ガイダンスが公表された。食品分野での使用に関しては、その安全性を評価するために各種安全性試験をする前に、初期段階で考慮すべき一般的な評価検討項目がいくつかある。物理化学的特性は、材料をナノ粒子として識別するために必要であるが、曝露環境における物理化学的特性も重要である。例えば、ナノマテリアルが分解や溶解などによってナノ粒子としての性質を失った場合、対応する物質の非ナノ粒子形態のものと異なる毒性学的リスクを示すとは考えられない。このような曝露状態が証明される場合は、通常の曝露評価基準を適用することで十分であると考えられる。

一方、この安全性評価における最初のステップである曝露特性に基づいた分析法に関しては、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、食品や消化液中などの複合成分中におけるナノ粒子の分析法は未だ発展途上である。現に最近のEFSAの動きとしては、2021年に公表した2つのナノガイダンスを実際に適用するための検証を進めており、ナノ特有の特性評価における課題を特定しており、実際の適用事例を通して得られた様々な改善要素に基づき、ガイダンス文書の更新作業に取りかかった状況でもある。

本ナノ粒子の安全性評価に関する骨子案では、現在行われている各食品分野における安全性評価対象物質あるいは製剤において、ナノ粒子成分が意図的あるいは非意図的に含まれることが想定される場合に、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すると共に、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ている。しかし、上述のように先行している欧州の動きも流動的であることに加え、未だ挑戦的な評価分野であることから、今後も随時改定していく必要があると思われる。また、本骨子案には現時点の分析技術において曝露評価の論点となる事項に関する補足事項も付記しており、将来に向けた実用的な課題への足がかりになることも期待している。

2. 基本的な評価の考え方

(1) 適用範囲

現在、我が国にはナノマテリアルに関する公式な定義は存在せず、従ってナノマテリアルを含む食品やナノテクノロジーを適用した食品に関しての正式な定義は存在しない。しかし、ナノサイズの特徴を活かした製品は生産あるいは輸入され流通しており、国際的には製品管理などのために定義が定められている。本骨子案における安全性評価の考え方は、基本的に意図的なナノマテリアルを利用、あるいは添加した場合におけるナノ粒子物質を評価することを目的としているが、従来の材料に関するものであっても、ナノマテリアルの定義に相当するナノサイズ粒子を含む可能性がある状況を踏まえ、ナノマテリアル特有の性質を持つと考えられる粒子等を含む可能性のある物質も評価対象とする。

評価に際しては、ナノマテリアルの定義が必要となるが、食品分野において現時点で国際的に認知されている欧州の新食品規制のナノマテリアルの定義を準用することとする。産業用ナノマテリアルの定義としては、意図的に製造された材料であって、一つ以上の次元で100 nm以下のオーダーのサイズを有するもの、または個別の機能部分が内部または表面にもち、その多くが一つ以上の次元で100 nm以下のオーダーのサイズを有するもので構成されるもの、また100 nmオーダー以上のサイズを有する可能性があったとしてもナノスケールの特性を保持する構造、凝集体または凝集体を含むものをいう。ナノスケールの特性としては、評価すべき物質の大きな比表面積に関連した特性および/または、同じ物質の非ナノ形状のものとは異なる特定の物理化学的特性（表面コーティング、表面機能化、コア/シェル構造、カプセル化等も含む）が知られている。

従来の物質に関してもナノマテリアルの定義およびナノ特有の評価に関連する可能性があるナノスケールの外寸を持つ粒子を含む小粒子を含む可能性がある場合は対象とする。後述するナノマテリアルとして評価すべき基準をみたす微粒子を含むことが示された場合は本基本原則に従いナノマテリアルとしての評価の対象とする。尚、ナノスケールの特性は、ナノマテリアル物質の種類に関係なく物質の毒性およびトキシコキネティクスな挙動に影響を及ぼすことがあると考えられるため、現時点では原則的としてすべてのナノスケール特有の特性を有する材料に適用する。

(2) 安全性評価に際しての主な課題

ナノマテリアルを通常の化学物質と同様に安全性評価を行うことは必要であるが、さらに以下の観点からナノマテリアルに特有の評価を行うことが追加されるべきである。

- ナノマテリアルの化学組成が、毒性学的ハザードを示唆している場合（例えば有毒なイオンや分子の放出など）
- ナノマテリアルが、有害な影響（例えば、細胞膜の障害）の可能性を指摘する特定の形態的特徴（例えば、針状、硬い長繊維）を持っている場合
- ナノ粒子が体内への残留・蓄積の証拠がある場合
- ナノ粒子が、表面反応性、ラジカル形成の可能性、または他の表面特性（例えば、細胞への取り込みを促進、またはタンパク質性表面に起因するアレルギー性）を有する場合
- 表面改質/コーティング等も含め、従来の同等品とは異なるADME/生物学的動態を有する場合
- 安全性が評価されていない他の物質と一緒に運ぶための媒体として使用される場合
- 最終製品の使用により、消費者がナノ粒子に経口以外の曝露経路で吸入曝露あるいは全

身的に曝露される可能性がある場合

- 同じ材料の従来の形態にはない他の特徴的な特性、または新しい活性/機能を有している場合
- ナノマテリアルの特性、挙動、影響の変化を評価するための従来の比較対象がない場合
- 遺伝毒性の評価が不適切である様な場合（例えば、*in vitro* 試験で、試験懸濁液の安定性に関する情報、あるいは細胞内への曝露（内在化）できている証拠がないことなど）

以上の観点で安全性評価を行う場合には、従来の評価手法の変更（検体の分散方法や投与方法、曝露量の変更、測定手法の改良など）で対応できる場合もあるが、新規の評価手法を確立しなければならないこともある。これらの課題を解決するためにOECDやISO等の国際的な組織により、各種ガイドラインやガイダンス等の改訂・新規作成作業が行われており、これらの最新情報を随時取り入れていくことが求められる。

(3) 段階的評価フレームの必要性

ナノマテリアルの化学物質としての安全性評価に関しての全体的な評価フレームの骨格は、通常の化学物質を評価する場合と同様に行う事ができるが、前述したナノマテリアルに特有の性質を反映させる評価体系を導入するにあたり、リスクの大きさに応じて通常の化学物質の評価フレームに追加、修正等を行う事が効率的であると考えられる。特に、食品を介した経口摂取における曝露を対象とした評価においては、製品中にナノ粒子が存在したとしても、実際の喫食過程や消化管内における吸収過程において、ナノ粒子が溶解、あるいはナノサイズの粒子でなくなっている場合が想定される。このような場合は、通常の化学組成成分に応じた安全性評価手法で評価可能であると考えられる。また、既存の製品においてナノ粒子が存在することが明らかになった場合などにおいては、従来の評価結果がナノ粒子を含んだものであることが示され、かつナノ粒子によるリスクも適正に評価できた結果であることが示された場合には、新たに毒性評価を行う必要が無いと考えられる。食品中のナノ粒子の評価に関しては、その特性に基づく毒性試験を行う必要があるかどうかを評価する段階が重要である。一方で、消化管を経由してナノ粒子が体内に入る可能性を否定できない場合は、ナノマテリアルの特性を反映した曝露による毒性試験の実施が必要になると考えられる。その場合でもナノ粒子がどの程度吸収され、どのように体内に分布するかという情報は食品に限らずナノ粒子の毒性評価において重要である。初期的な毒性試験などにおいて、通常と異なる臓器や組織へ分布することが示されたり予測されたりする場合や、分布を明らかにできない場合においても、通常と異なる、あるいは新たな有害指標が示唆された場合は、追加の毒性試験が必要となると考えられる。以上の状況を鑑みると、リスクの大きさや種類に応じて、段階的な評価フレームを構築することが、効率的なナノ粒子の安全性評価に必要であると考えられる。

3. 評価の実施手順 –段階的な評価方法–

(1) 安全性評価フレームの概要

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アプローチとして、以下の段階的なステップを構築する。

- Step1：物理化学的特性の評価：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
- Step2：経口曝露評価：消化管を代表する条件下でのナノ粒子の非ナノ粒子形態への分解性を調査し、分解性試験を実施
- Step3：*In vitro*試験：利用可能なすべての情報を収集・レビューして一連の *in vitro* 試験を実施。ハザードを特定（細胞毒性、酸化ストレス、炎症及び胃腸のバリア性障害、ライソゾームでの分解性、*in vitro*遺伝毒性）。Step3bで追加の試験を行う必要性を確認
- Step4：*In vivo* 試験：ナノ粒子がどの程度組織に蓄積されるかを調査し、90日の反復投与毒性試験を実施（必要に応じて *in vivo* 遺伝毒性試験）
- Step5：詳細試験：90日間の毒性試験の結果でナノ材料の組織への蓄積が実証された場合、さらなる詳細な研究（例：ヒト動態データ、追加のトキシコキネティック研究、生殖・発達毒性、追加の免疫毒性、神経毒性、変異原性、発がん性、内分泌影響、腸内微生物への影響）を特定し、その試験を実施

(2) 物理化学的特性の評価（Step1）

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慎重に行う必要がある。また、食品の保管中や使用中、摂取後の材料や製品の特性変化を確認することも、吸収後の生体内分布、化学種の同定と定量的観点から体内の物質の挙動を測定することや、毒性学およびトキシコキネティクスに関する研究をするうえで重要な情報となる。各特性の項目は、以下の評価観点から必要、あるいは重要と思われるものを含むべきである。

- ナノマテリアル原料に特有の物理的および化学的特性の測定と評価（あるいは既存情報の入手）を行う。既存の製品との比較においては、一般の化学物質の特性を含めて、同一性の確認に対して多くの物理化学的パラメータを測定することが必要である。
- 安全性試験の前、中、後の評価に必要となる、*in vitro*試験で使用される試験媒体中の材料の物理化学的特性を評価する。
- *in vivo*試験で投与される製剤（例：飼料、飲料水）、およびトキシコキネティクスおよび毒性試験からの生物組織および体液中の物質を測定する際に必要となる物理化学的特性を評価する
- 製品の配合や生物学的マトリクスなどの複雑なマトリクスにおける材料の物理化学的特性を評価する。

表1には、現在、様々な国際的な専門家委員会やワーキンググループが、ナノマテリアルの安全性評価に重要なパラメータとして検討しているものを例示するが、現状では明確な項目リストを特定することは困難で決定的なリストは存在しない。物質によっては、すべてが測定可能と限らないが、毒性評価に重要な項目は可能な範囲で対応すると共に、その

項目の選択の理由や測定に関する不確実性も説明する必要がある。また、毒性試験結果を評価するうえで毒性試験の後のStepで必要となる可能性もあり得る。

表1 特性を把握するための項目

- 名称	- 表面積
- 説明	- 沸点
- 意図した用途	- 密度
- 材料構成物質と純度	- 空隙率
- 元素組成、材料全体の組成式または元素の相対量	- ダスティネス（粉体飛散性）
- 粒子径の 平均値および中央値 最小外形寸法とその粒子数に基づく粒度分布	- 製品の配合、配合媒体、分散剤（安定剤）、助剤、分散液中のナノマテリアル濃度
- 粒子形状 ナノマテリアルの形状、空隙率、アスペクト比、電顕像の記述	- 安定性
- 構造の説明、構造要素の（相対的な）厚みを含む	- pH
- 表面化学組成、粒子表面の基またはコーティングの組成の説明	- 溶解度
- 製造プロセス	- 溶解性／溶解速度
- 外観	- 分散性
	- 表面電荷
	- 凝集／凝結状態およびサイズ
	- 平均径、中央径、粒度分布のグラフ図
	- 反応性（該当する場合）

ナノ粒子の溶解性および分散性の評価：

食品中のナノ粒子の評価においては、特に製造時、製品中、消化管中でのナノ粒子の分散性について評価することが、後段の安全性評価にとって重要となる。このStepにおける分散性と溶解性の評価は、原則的には食品中のナノ粒子存在形態（ナノ粒子が存在するか）を評価することを目的としているため、水あるいは食品そのものにおける溶解性と分散性を評価することが望まれる。しかし、一般的に実際の食品マトリックス中のナノマテリアルの特性を機器分析で評価することは困難であり、水あるいは疑似溶媒中での測定により特性評価を行わなければならない可能性がある。この段階での基本的なナノマテリアルの特性評価の情報、特に分散性の評価が必要となった場合の *in vitro* 及び *in vivo* 試験に供する検体の分散手法を検討する際にも重要な情報となる。また、場合によっては、次のStep2における経口曝露評価における消化管の条件化における溶解性の評価や分散性の評価をこのステップの評価としてとして取り入れることも可能である。いずれにしても、溶解性と分散性の評価は、後段のStep2における経口曝露評価の結果と総合的に判断する必要があり、ナノマテリアルとして評価すべきであるかどうかを見極める評価項目として重要である。

基本的な最初の評価ステップとしては、この段階では水を用いた溶解性試験の実施が推奨される。この段階で高い溶解／分解速度が証明されれば、従来の化学物質に適用される安全性評価ガイダンスに従うことができると考えられる。溶解性の評価法としては、OECD TG 105に従った溶解度試験が推奨される。

(3) 経口曝露評価 (Step2)

この評価段階では、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。消化管内の代表的な条件下で腸管による吸収直前の段階でナノ粒子に曝露されるかどうかを見極めることによって、ナノマテリアルに特有の安全性評価を実施するか、ナノ粒子が消化管中に存在する可能性が低いことをもって通常の化学物質の評価のガイダンスに従った評価を実施するかを判断を検証する試験を実施する。本評価法で示す試験が行えない場合や適切な評価結果が得られない場合は、理論的に存在する可能性のあるすべてのナノ粒子が消化管内に存在、摂取、吸収されると仮定して（ワ

ーストケースシナリオ) 後段の安全性評価を行うこととなる。

疑似消化液を用いた粒子サイズ分布の評価

食品中の微粒子のサイズが、消化管内でもナノサイズの粒径で存在するかどうかを胃液と腸液を模した疑似消化液中で、ナノ粒子のサイズを測定する試験の実施が必要であると考えられる。ナノサイズの粒子を含むか基準としては、まずスクリーニング的には500 nm以下の粒子が10%以上(粒子数として)であること、さらに500nm以下の粒子のうち250 nm以下の粒子が10%以上であることが判定要件として推奨される(判定方法の留意点はAppendixを参照)。尚、測定方法としては、電子顕微鏡、single particle ICP-MS、field-flow fractionation(FFF) ICP-MS、DLS、LD、PTAなどの様々な手法が存在するが、測定するナノ粒子の大きさのレンジや物理化学的な特性に応じて適切なものを選択する必要がある。サイズが数十nm以下になるような一次粒子を評価するには電子顕微鏡が好ましいとされるが、水溶液中の存在形態を直接評価できないことや測定操作の煩雑性、測定できる粒子サイズのレンジを考慮すると、最初の選択としては、DLSやICP-MSを使った評価法が適当であると考えられる。必要に応じて複数の測定手法を組み合わせることも有効である(これらの測定手法の留意点はAppendixを参照)。

消化管分解試験

この試験では、疑似消化液中でナノ粒子の存在が否定できない場合に、ヒトの消化管を想定した条件下でナノ粒子が消失する可能性を溶解性/溶解速度の測定を行って評価する。*in vitro* 消化モデルとしては、ワーストケース条件(摂食または絶食)を使用することが推奨される。溶出/溶解速度は、腸相で少なくとも4点の時間点(5、15、30 および60分)を含める必要がある。試験は3種類の濃度で実施し、中間濃度はヒトの曝露を代表する濃度であるべきである。溶質および分解生成物の粒度分布および濃度は、少なくとも電子顕微鏡法を用いるべきである。腸相での溶解/分解速度プロファイルが、時間の経過とともに粒子の存在が明らかに減少し、*in vitro*消化の開始時の粒子濃度と比較して材料の12%以下(質量ベース)が腸内消化の30分後に粒子として存在する場合、ナノ粒子は迅速に分解する高い溶解/分解度を有すると考えられる。

上記の試験を実施して、消化管中にナノ粒子が存在しない可能性が示唆されるか、高い溶解性あるいは分解速度を有することが示されれば、ナノ粒子は、生体内(特に消化管内)でナノ特有の関連挙動を示さないと予想され、従来の化学物質の評価手法で適切に評価可能になると考えられる。これ以降のナノマテリアルとして求められる安全性試験を必要としない。

(4) *In vitro*試験 (Step3)

この評価段階では、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ために必要である。既存の化学物質のガイダンスの評価目的によっては、この段階の評価結果をもって、後段の*in vivo*試験が不要となる可能性もある。また、*in vitro*試験では、ナノ粒子の細胞への取り込みを直接確認することや、毒性影響メカニズムの観点から評価することも可能であり、リスク判定の段階における定量的評価や試験および評価の統合的アプローチ(IATA)評価において、有用な情報を得ることが可能となる。通常の化学物質において適用されてきた試験、細胞毒性を評価する基本的な細胞毒性試験や想定される体内での毒性影響を評価できる*in vitro*試験は適用可能であるが、化学物質の分子よりはサイズの大きい不溶性の粒子を評価する為に後述する試験材料の分散性には留意する必要がある。腸管細胞を用いた*in vitro*吸収モデル試験は腸管吸収による体内曝露量の定量的な評価を可能とすることができることに加え、吸収後の体内動態や蓄積性、発

がん性などの慢性影響を評価する為に、マクロファージによる取り込み後の体内動態を評価するのに参考となるリソソーム分解試験、*in vitro*遺伝毒性試験の実施は、基本的に重要な評価項目であると考えられる。以下に、ナノマテリアルを評価する際の*in vitro*試験を行うにあたり留意する点を示す。

試験材料の分散性

有効かつ比較可能な結果を得るためには、毒性試験中および適用前の粒子状物質の適切な分散が不可欠である。分散プロトコールは、できるだけ非凝集・非凝結粒子からなる試料を得ることができれば効果的である。つまり、粒子サイズの測定や*in vitro*あるいは*in vivo*毒性試験の実施に必要な時間にわたって一定の粒度分布または最小限の再凝集を示す必要がある。しかし、材料によって物理化学的性状が異なるため、普遍的に適用可能な分散プロトコールは存在しない。分散手順の開発および検証のための一般的な手順や、多くのナノマテリアルのために開発された特定の分散プロトコールを参考とする。公開された分散プロトコールがない場合は、適用したプロトコールの分散効率と分散液の安定性を試験して文書化しておく必要がある。尚、この留意点は*in vivo*試験を行う際にも同様に重要である。

リソソーム分解試験

一旦体内に入ったナノ粒子は、簡単には排出されず、時間の経過とともに蓄積される場合がある。マクロファージがナノ粒子を取り込んだ後、マクロファージのリソソームが貪食されたナノ粒子と融合する。リソソーム条件下での安定性の評価は、ナノ粒子の生体内残留性と細胞内蓄積の可能性をスクリーニングするために重要である

人工リソソーム液は、リソソーム内の無機的環境をシミュレートし（通常、加水分解酵素は含まれない）、pH 4.5~5.0 緩衝液とする。安定性を評価するためにリソソーム液中での溶解/分解速度を、3種類の濃度で異なる時間点（少なくとも4点）を考慮する。時間点は通常数時間の範囲であると予想され、72時間または96時間まで延長することができる。半減期が約24時間であることは、リソソーム液への溶解速度が速いことを示すと考えられている。

*In vitro*遺伝毒性試験の留意事項

ナノ粒子は、DNAとの直接的な相互作用、有糸分裂のプロセスの妨害、または活性酸素種の生成などによって、遺伝毒性障害を誘発する可能性がある。

*in vitro*遺伝毒性試験は、常に細胞への取り込みの評価を含むべきである。3つの重要な遺伝毒性エンドポイント（遺伝子変異、構造的および数的染色体異常）を考慮すべきである（但し、Ames試験については、食作用が存在しないため菌体へのナノ粒子の取り込みが期待できず、ナノ粒子の遺伝毒性を調べる方法として推奨されない）。Hprtおよびxpirt遺伝子を用いた*in vitro*哺乳類細胞遺伝子変異試験およびTK遺伝子を用いた*in vitro*哺乳類細胞遺伝子変異試験は適切であると考えられている。構造および数的染色体異常に関する試験は、有糸分裂時にDNAと接触しやすくするために、少なくとも1細胞周期をカバーする長時間の処理が望ましい。サイトカラシンBがエンドサイトーシスを阻害してナノ粒子の細胞取り込みを減少させるため、添加時期を遅らせる必要がある。光学的に活性なナノ粒子が小核の検出に干渉する可能性がある試験におけるS9-mixの使用は、ケースバイケースで評価する必要がある。

(5) *In vivo*試験 (Step4)

この評価段階では、*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。また、*in vitro*試験だけではナノ粒子による生体影響の可能性を否定できない際の確認試験としても必要となる場合がある。特に、*in vitro*遺伝毒性試験の結果のみで遺伝毒性が否定できない場合は、*in vivo*遺伝毒性試験の実施が必要とされることは、通常の化学物質の評価段階と同様に必須となる。ただし、他のト

キシコキネティクスまたは反復投与毒性試験から、標的組織（例えば*in vivo*小核試験における骨髄）がナノマテリアルおよび/またはその代謝物等に曝露されているという証拠が、*in vivo*遺伝毒性試験を評価する場合に必要となる。

一般的な*in vivo*による局所および全身毒性を評価する試験としては、改良型90日反復投与経口毒性試験が推奨される。または、*in vivo*のトキシコキネティクス試験を別に実施することで代替できる可能性もある。その際には、短期曝露で行われる試験の結果が長期間の反復曝露における体内動態も評価できる知見が得られることが望ましい。この試験の要件としては、ナノ粒子の体内への取り込みと組織分布、蓄積を評価するためのトキシコキネティクスを評価するサテライト群が必要とされる。また、ナノ粒子による影響を評価する際の留意点として、造血系、炎症反応に関連するパラメータ、および単核食細胞系に関与する組織／臓器（特に肝臓、脾臓、脳および生殖腺）に特別な注意を払う必要がある。病理組織学的検査は、組織内のナノ粒子の存在とその（細胞内）分布を検出するための適切な技法が選択される必要がある。トキシコキネティクス試験でナノマテリアルが全身利用されないことが示されたとしても、試験の消化管病理組織学的検査において消化管への局所的な悪影響も検討する必要がある。トキシコキネティクス試験により吸収されることが示され、他に追加試験の必要性が認められない場合、従来の化学物質によるガイダンスにおいて、さらなる試験が要求されない場合は、定量的なリスク評価において、本試験の結果を利用することが可能となると考えられる。一方、長期的な影響や特定の組織や臓器における影響の可能性が示唆された場合は、次の段階に進むための情報を得ることができる。

(6) 詳細試験 (Step5)

この評価段階では、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を判断するのに用いられる詳細試験の実施として必要となる。これらの試験における動物の主要組織に存在するナノ粒子の濃度に関する情報は、リスク判定に必要となる。新規の添加物評価など既存の化学物質の評価ガイダンスでは必須となる試験項目もあるが、通常の評価ガイダンスでは必須ではない場合においても追加を検討すべき試験として、以下に示す試験が検討される。

追加で検討される試験 (Step4でトリガーとなる所見)

- 慢性毒性試験および発がん性試験 (90日間試験の組織分布データ)
- 生殖発生毒性試験 (特に被験物質が生殖器官に到達することが示された場合)
- 以下に示す試験は、(Step4でその兆候が示唆された場合や特定の臓器への蓄積性が示された場合、ナノ粒子の特性から推定されるエンドポイントに応じて) その実施を検討する。
 - ◇ 免疫毒性試験およびアレルゲン性試験 (ナノマテリアルは感作性物質のアジュバントとして作用することもある。また、他の免疫原／抗原を免疫細胞に運ぶことで「トロイの木馬」として機能する可能性を検証する。)
 - ◇ 神経毒性試験 (臨床徴候、機能観察バッテリー、明らかな毒性がない場合の脳重量、病理組織学的変化などを検証する)
 - ◇ 内分泌作用および内分泌関連のエンドポイントを評価する試験 (内分泌関連組織の病理組織評価) および発情周期の評価等を検証する)
 - ◇ 腸内細菌叢に及ぼす影響 (ナノ粒子が腸内細菌叢に与える影響を調べる動物モデルを用いた試験やヒトの微生物叢に与える影響を調べる*in vitro*試験の実施を検討する。抗菌作用を有し、腸内微生物叢、粘液および免疫の組成と機能に対する相互作用と影響の可能性を考慮する)

4. リスク判定

概念的には、ナノマテリアルのリスク評価フレームは従来の化学物質とリスク評価フレームと同様に、ハザード評価と曝露評価に基づいて行われる。しかし、ナノマテリアルのハザードと曝露評価を統合する際には、以下のような特別な留意事項がある。

- 定量的なハザード評価において、有害性や生体反応性が、従来の化学物質のように重量に基づく曝露量に相関するよりも、表面積や表面活性、形状に依存した物性などのナノマテリアルに特有の曝露指標を考慮する必要がある。
- 評価対象となるナノマテリアルが、同じ元素組成でありながら形状、サイズ、結晶形態および/または表面特性が異なるナノ粒子で構成されている場合、異なる製造工程で得られたナノ粒子の種類ごとに、それらが有するハザード特性を評価しなければならない。
- ナノ特有の評価を必要とする微小粒子を含む従来型材料については、リスク評価では、市販のマテリアルとナノスケール特性を有する画分の両方を考慮する必要がある。
- 曝露評価とリスク評価では、消化管からの取り込みがナノサイズ画分に限定される場合等の単純な定量評価にとどまらず、部分的な分解などの結果、複数の種類の粒子や可溶化物質等の同時曝露を評価する場合も想定され、リスク評価の複雑性に基づいた不確実性に関する説明と評価が必要となる。
- さらに細胞内への取り込みと全身への分布の後、粒子として吸収された部分のさらなる溶解が起こる可能性があるため、ナノ粒子と溶解した化学物質の体内動態に関するトキシコキネティクス評価が不可欠となる。
- 上記に関しての十分な情報がない場合、リスク評価には保守的なアプローチを用いるべきである。

新しいリスクアセスメントパラダイムの必要性

リードアクロス：

ナノマテリアルのリスク評価で特に問題となるのは、特定のナノマテリアルが同じ化学成分であっても異なる粒子径、結晶形、粒子形状、表面特性などの観点から、多様な形態で開発される可能性がある点である。科学的根拠に基づくグループ化とリードアクロスの手法を用いた評価の枠組みはリスク評価を効率化することができると考えられる。そのためには評価対象となるナノマテリアルの毒性影響を予測するのに十分類似していることを示す特性を実証する必要がある。物理化学的特性だけでなくトキシコキネティクスな挙動や有害性に関連する側面に関する詳細な情報が必要となる。しかし、リードアクロスの手法により、類似物質に対して追加の安全性試験を免除するために受け入れられるかどうかは、ケースバイケースの評価となる。

試験および評価の統合的アプローチ (IATA)：

従来の材料の評価において開発されてきた試験と評価の統合的アプローチ (IATA) は、ナノマテリアルに特有の評価を実施するためのAOP (有害性転帰) の使用に基づいて利用することが可能であると考えられている。ナノマテリアルの評価に特有のAOPを開発し、仮説主導型のIATAを策定するためには、例えば、以下のような観点について検証することが重要となる。

- 腸管吸収される際の化学形態の検証 (ナノ粒子のままの吸収か、イオンまたは分子の形での吸収か)
- 腸管細胞内でのナノ粒子の挙動の検証。(通常の化学物質の代謝経路に組み込まれて全身に分布するのか。腸管細胞内に蓄積されるか等)
- 傍細胞吸収の経路を通しての全身循環および標的臓器へ移行に関する検証。
- マクロファージ系食細胞による取り込みを介した全身への分布の検証。
- ナノ粒子の取り込み、蓄積、排泄に関する各プロセスを制御しているレベルの検証。通常の化学物質との比較の検証。
- 炎症、酸化ストレスなどの有害な転帰をもたらす生物学的反応事象の特定。

欧州やOECDなどの国際機関では、これらの新規の評価評手法（NAM）を用いて、動物実験に依存しないリスク評価の開発をナノマテリアルの評価体系に積極的に導入しようとしている。

不確実性分析

ナノマテリアルのリスク評価においては、物理化学的な測定手法や有害性評価方法についての必要となる技術は依然発展段階であり、国際的な標準化についても進行中のものが多くある状況から、その評価過程においては、通常の化学物質の評価とは異なる不確実性が存在しており、透明性の観点から不確実性の内容は評価文書に記載する必要がある。

ナノマテリアルの物理化学的特性評価における測定の不確実性

- ・ 測定結果の不確かさは、ナノマテリアル特性評価の分析プロセス、すなわちサンプリング、試料調製、機器分析、データ処理、結果の評価において生じる。
- ・ 例えば、粒度分布は装置の不確かさだけでなく、凝集・沈殿などの影響も受けることがある。

ナノマテリアルの曝露評価における不確実性

- ・ 食品および飼料の用途においてナノマテリアルの存在形態を特徴付けることができない場合、曝露評価の不確実性が増大することになる。不確実性情報は、溶解度および分解試験および*in vitro*消化管消化およびリソソーム液における安定性などから得られ評価文書に含める必要がある。

ナノマテリアルの有害性評価における不確実性

- ・ 既存の毒性試験法は、ナノマテリアルの試験にはまだ十分に適応されていないため、特別な不確実性が生じる。一方で試験法の標準化についてはOECD 試験ガイドラインが今後、整備されていくことが予想されている。
- ・ 既存の試験法で検出できないナノマテリアルに特有の毒性作用が存在する可能性がある。新たなエンドポイントに対する試験法開発を検討する必要があるかもしれない。

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

Step1及びStep2において、食品が消化管で吸収される直前の状態において、「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つの評価事象を評価することが安全性評価の要となる。このいずれかが満たされていれば、ナノマテリアル特有の評価段階を免除できる。

- 「材料に微小粒子部分が含まれていない」ことを判断する際の留意点
 - 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。)
 - 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。(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。)
 - 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」ことを判断する際の留意点
 - 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。材料全体の通常のサイズ分布を仮定すると500 nm未満の粒子が10%以下であることは、ナノサイズ粒子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ており、試験デザインが採用されており、分散度/凝集度が小粒子分画を扱うのに十分であるかどうか。（ナノ粒子分画は、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。既存データで小粒子分画に関するデータが提供されている。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。）

B) 分散性を測定評価する際の留意点、

標準的な分析手法として光学的分析法と質量分析法を適用する際の留意点

● 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こと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。
- 調べる粒子に適切な分散剤を選択することが重要である。
- 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、また視覚的にみら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と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適切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。
 - より小型のナノ粒子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、 ≤ 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 (AF4) あるいはチャンネル (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) や動的光散乱 (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がある。あるいは典型的な条件を示す必要と考えられた。