

食物および飼料連鎖におけるナノサイエンスおよび ナノテクノロジー適用のリスクアセスメント指針

欧州食品安全行政庁（EFSA）科学委員会、イタリア・パルマ

訳注：東京理科大学 小林 剛

原文は

Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and
nanotechnologies in the food and feed chain

EFSA Journal 2011;9(5):2140 [36 pp.]

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2140.htm>

要約

欧州食品安全行政庁（EFSA：European Food Safety Authority）は、食品および飼料連鎖におけるナノサイエンスや ナノテクノロジーの適用に由来するリスクの可能性の評価について、実用的なアプローチを開発した。本ガイダンスは、(1)食品添加物類・酵素類・香料類・食品接触材料類・新規食品類・飼料添加物類・農薬類に用いる加工ナノマテリアルの物理化学的特性の要件 (2)一般的には、*in vitro* 遺伝毒性・吸収・分布・代謝・排泄・げっ歯類の反復投与 90 日間経口毒性研究における情報を含み、ナノ特性に由来するハザードの確認と特性解明についてのテストアプローチを示している。このガイダンスでは、食品接触材料類から加工ナノマテリアルの移動がないことを示すデータにより、それによる暴露がないことが立証されている場合や、加工ナノマテリアルそのものの吸収が無く、完全に分解/溶解が実証されている場合についての情報は少ないことを認めている。本ガイダンスは、リスクアセスメントを実施するには不確実性を含むことを示している。この領域は急速に発展しているため、このガイダンス文書は、適切な場合には改訂されるであろう。©欧州食品安全行政庁 2011

KEY WORDS

加工ナノマテリアル・食品・飼料・ナノサイエンス・ナノテクノロジー・リスクアセスメント

サマリー

欧州委員会の要請により、科学委員会は食品および飼料へのナノサイエンスおよびナノテクノロジーの適用を含む安全アセスメントのガイダンス文書の作成を求められた。この科学意見は、食物および飼料連鎖（食品添加物類・酵素類・香料類・食品接触材料類・新規食品類・飼料添加物類・農薬類を含む）における加工ナノマテリアル（ENM）の利用を含む適用のリスクアセスメントの実用的なガイダンス（ENM ガイダンスと称する）を示している。

リスクアセスメント・パラダイム（ハザード確認・暴露アセスメントによるハザードの特性解明・リスクの特性解明）は、これらの適用に適切である。従って、リスクアセスメントを実施するために、リスクアセッサに対して、種々の段階について適切なデータや情報を利用し得るようにすべきである。

ENM の適切な特性解明は、食品/飼料製品およびテスト条件下における特性と物理化学的様態の実証に不可欠である。物理化学パラメーターは、種々の環境内で変化するため、ENM の特性解明は、理想的には、次の五つの段階、すなわち、製造（初期の新鮮な状態）段階、食品/飼料製品で使用する段階、食品/飼料マトリックス中での存在段階、毒性テスト段階、生物学的液体・組織中での存在段階における実施が望ましい。

ENM のリスクは、その化学成分・物理-化学特性・組織との相互作用・暴露レベルにより決定される。その物理-化学特性の解明は ENM の同定と、ENM ガイダンスが適切であるか否かの決定に必要である。ENM ガイダンスが適用可能であれば、テストからの結果は、暴露アセスメントと組み合わせて、ハザード評価の情報をもたらし、リスクの特性解明の基礎を形成するであろう。吸収 (Adsorption)・分布(Distribution)・代謝(Metabolism)・排泄(Excretion)の (ADME) パラメーターは、ENM の化学的組成のほか物理-化学的特性（例えば、サイズ・形状・溶解性・表面電荷・表面活性など）の双方により影響を受けるように見える。

ナノマテリアルの詳細なリスクアセスメントを開始する前に、使用計画からの暴露シナリオの概要を予測すべきである。これらの暴露シナリオは、ハザードの特性解明の範囲の決定に寄与し、リスクアセスメントに必要な暴露アセスメントのパラメーターを示すであろう。

毒性テストアプローチには、6種類のケースの概要が示される。ENM の使用が、ENM の存在を生じさせない、あるいは、食品/飼料における分解/溶解産物を示す証拠が確認

された場合には、追加的なテストは全く不要である。食品/飼料において、ENMが摂取以前に非ナノ形状への変質を完了していると判断された場合には、特異的に意図された使用についての非ナノ形状についてのEFSAのガイダンスを適用すべきである。ENMが胃腸管内において、吸収されずに完全な溶解/分解が実証された場合には、ハザードの確認および特性解明は、非ナノ形状物質のデータ（入手できる場合は）に依存可能である。同一物質の非ナノ形状について、食品/飼料マトリックスおよび胃腸液中に存続するENMの一部あるいはすべての情報が入手できる場合には、ADMEの情報の比較、非ナノ形状のADMEの毒性および遺伝毒性、ENMの反復投与90日経口毒性研究および遺伝毒性情報に基づくテストアプローチが推奨される。非ナノ形状について、食品/飼料マトリックスおよび胃腸液中に存続するENMの一部あるいはすべての情報が入手できない場合には、ENMの毒性テストへのアプローチは、ナノ特性を考慮した現行のENMガイダンスの修正による使用を意図した関連のEFSAガイダンスに準拠すべきである。

ENMについての適切な*in vitro*および*in vitro*研究は、ハザードの確認と用量-反応関係データの取得のために実施すべきである。ナノ形状物質について用いられている一部のテストモデルおよび標準テストプロトコールは、ENMのテストとして必ずしも適切あるいは最適ではないであろう。これらの問題に対応するため、現在、科学界の努力が進行中である。

暴露アセスメントにおけるENMの定量の出発点では、現在、食品/飼料への添加物質の量あるいは接触量に依存しなければならない。添加ENMの当初の特性解明には、暴露アセスメントにおける推測の利用が可能であるが、食品/飼料マトリックス中に存在するENMの量の測定が望ましい。現在は、ENMをその場でルーチンに測定できず、暴露アセスメントとしては不正確である。暴露データを欠き、食品/飼料マトリックス中のナノ形状物質の測定が不可能であるため、添加されたすべてのENMは、ENMの構造/特性は未決定のままで、毒性研究において用いられる構造/特性との関連付けは困難であるが、現在は、ナノ形状として摂取され吸収されると推定すべきである。

ENMの同定・特性解明・検出に関する不確実性は、ENMのすべての適用・側面・特性に対応する適切で信頼性の高いテスト方法の欠落に関連している。同様に、現在の標準的な生物学的および毒性学的テスト方法の適用性については、多くの不確実性が存在している。これらの理由から、このENMガイダンスは、経験と取得した知識により更新が必要であろう。本領域は急速に発展しているため、このガイダンス文書は、適切な場合には改訂されるであろう。

目次

要約

サマリー

表目次

欧州委員会（EC）により示されたバックグラウンド

欧州委員会により示された参照事項

ガイダンス

1. Introduction

1.1 加工ナノマテリアル（ENM）の用語

2. ENM 評価についての一般的考察

3. ENM の特性解明

3.1. ENM の同定・検出・特性解明についての要件

3.1.1. 食品/飼料関連の適用に使用前の ENM の特性解明

3.1.2. 食品/飼料関連の適用における ENM の特性解明

3.1.3. 毒性テストにおける ENM の特性解明

3.1.4. 生物学的液体と組織中に存在する ENM の特性解明

3.2. 特性解明方法についての機能クライテリア

4. 暴露シナリオ

5. ハザードの確認および特性解明

5.1. 一般的考察

5.2. 毒性テストの概要

5.3. *In vitro* 研究

5.3.1. *In vitro* 消化研究

5.3.2. *In vitro* 遺伝毒性研究

5.3.3. その他の *in vitro* 研究

5.4. *In vivo* 研究

5.4.1. *In vivo* 研究における ENM の投与

5.4.2. ADME 研究

5.4.3. *In vivo* 反復投与 90 日間経口毒性研究

5.4.4. その他の *in vivo* 毒性テスト

5.4.5. *In vivo* 遺伝毒性テスト

6. 暴露アセスメント

7. リスクの特性解明

8. 不確実性分析

8.1. ENM の物理－化学的特性解明における不確実性

8.2. ENM のハザード特性解明における不確実性

8.3. 暴露アセスメントにおける不確実性

8.4. リスクの特性解明における不確実性

結論

参照文献

付属資料 A 現在使用されている特性解明方法

用語および略語

欧州委員会 (EC) により示されたバックグラウンド

2009年2月10日、欧州食品安全行政庁 (EFSA) は、「食品および飼料の安全におけるナノサイエンスおよび ナノテクノロジーより浮上するリスク」についての科学的見解を採択した。この見解の中では、「食品および飼料における現行のガイダンス文書は加工ナノマテリアル (ENM) には対応していない」と特記されている。

食品接触材料・酵素類・香料類・加工補助剤の委員 (CEF) および食品添加物・食品添加栄養素の委員 (ANS) は、ナノマテリアルのリスクの可能性の見地を反映して、食品添加物・食品接触材料・香料類・酵素類についてのガイダンス文書の更新を開始した。

動物飼料添加物・製品・物質の委員 (FEEDAP) は、既に、飼料添加物中の評価において、粒子サイズとそれらの影響を含めた。これより、新規の飼料添加物の適用には、粒子サイズについての章が含まれている。

現在の知識の状態は多くのギャップを含み、 ナノテクノロジーの食品関連の適用の多くについて、標準手法に準拠して、安全を確立するリスクアセッサーの業務を妨げているため、加工ナノマテリアルの安全面と、ナノテクノロジーベースのプロセスは、一貫性と包括的に対応が確保される。

この要請の目的は、リスクアセスメントのガイダンスを入手し、加工ナノマテリアルやその他の ナノテクノロジーのアセスメントと認可について、適切なアプローチを設定するために、利害関係者や規制担当者に必要な透明性をもたらすことである。

しかし、現状の知識においては、異なるリスクアセスメントアプローチについてのシナリオが存在するであろう。これらには、例えば、消費者の暴露がないことが確立されている適用 (例えば、ナノマテリアルの移動のない食品接触材料)、あるいは、溶解性、生物学的分解性、ナノスケールのバルク物質デリバリーシステム (例えば、ミセル類・ナノエマルジョン類・そのたのカプセル化) などが含まれる。

欧州委員会より示された参照事項

(1) EFSA は、食品/飼料（食品添加物類・酵素類・香料類・食品接触材料・新規食品・飼料添加物・農薬類を含む）へのナノサイエンスおよび ナノテクノロジーの適用を含む、安全アセスメントについてのガイダンス文書の作成を要請された。本文書は、現在の知識の範囲で可能な ナノテクノロジーの適用に関連する食品のリスクアセスメントについての実用的な勧告を示すであろう。知識が不十分な場合には、リスクアセスメントの実施において知ることが必要な最終影響やパラメーターを示すべきである。本ガイダンスでは、必要な場合には、結論的なリスクアセスメントの実施に充足すべき最終影響・テスト・データについての追加的要件を示すべきである。

本業務をサポートするため、EFSA は、欧州レベルの科学諮問機関（SCENIHR, SCCS, EMA, ECHA, ECDC, SCOEL, OSHA その他）、欧州連合加盟国、第三国、ナノマテリアル製品についての OECD 作業部会などにより、ナノテクノロジーのリスクアセスメントについて開発されたすべての関連文書を検討すべきである。

(2) 利害関係者との協議：提案されたガイダンス文書は、パブリック・コンサルテーションにかけるべきで、適切と見なされた場合には、その採択前に専門会合において利害関係者と討議する。

ガイダンス

1. Introduction

加工ナノマテリアル (ENM) についての本ガイダンスは、三つの主要な製品/適用のリスクアセスメント、すなわち、食品摂取 (ヒトあるいは動物による)、植物生産に用いる農業化学品類 (例えば、農薬類)、食品/飼料と接触する製品に組み込まれたナノマテリアル (例えば、包装材料) を扱っている。この ENM ガイダンスは、EFSA の付託事項 (食品添加物類・酵素類・香料類・食品接触材料類・新規食品類・飼料添加物・農薬類) に含まれるすべての食物および飼料連鎖におけるナノサイエンスおよび ナノテクノロジーの適用を包含している。

この ENM ガイダンスは、2009 年の 科学委員会の「食品および飼料安全についてのナノサイエンスと ナノテクノロジーから浮上するリスクの可能性」(EFSA, 2009a) の第 6 章 23 ページのタイトル「食品および飼料分野における ENM (加工ナノマテリアル) のリスクアセスメント (RA) についてのガイダンス」の見解により構築されている。その章では、食品および飼料分野における ENM のリスクアセスメントの実施方法の概要を示している。そのリスクアセスメント・パラダイム (暴露アセスメントと特性解明に次ぐハザードの確認・ハザードの特性解明) は、これらの適用に適切であり、それにより、リスクアセスメントを実施するため、リスクアセッサーに対して、種々の段階において、適切なデータや情報を提供すべきである。

一般原則として、種々の食品および飼料分野についての現行の EFSA ガイダンス文書および EC のガイドラインに規定されたテスト要件は、ENM の使用意図により適用し遵守すべきである。ENM のリスクアセスメントのテスト要件と手続きには、ENM ガイダンスで示した追加的な検討が求められる。また、本 ENM ガイダンスは、ENM の特異な特質と特性から浮上する物理-化学的特性解明の追加的なリスクアセスメントのニーズをカバーする目的を有している。特異な用途の ENM (例えば、農薬、食品接触材料、香料その他) についての関連 EFSA ガイダンス文書において明記された情報によるナノマテリアルの特性解明と特質に関連する特異な情報は、ケースバイケースのリスクアセスメントとして用いられた。EFSA ガイダンス文書は、www.efsa.europa.eu において、また、ガイダンス文書の編集は、EFSA の 2010 テクニカルレポート www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1518.pdf (EFSA, 2010a)で見出される。

ENM ガイダンスは、すべての利害関係者ら、例えば、応募者 (applicants) やリスクア

セッターを対象としている。この ENM ガイダンスの目的では、飼料中の ENM は、動物におけるインパクトはヒトの場合と似ているため、一般的に、食品と類似した扱いがされるであろう。

既に、少数の EFSA ガイダンス文書には、FEEDAP パネル（感覚添加物についての関係書類の作成についてのガイダンス）や CEF パネル（EFSA による、高活性あるいは高機能材料中に存在する高活性または高機能の物質や、食品接触を目的とした物品の安全性評価についての関連書類の意見具申のガイドライン）（EFSA, 2008a, 2010b）などからの、物質の「サイズ」のコンセプトが含まれている。

ENM ガイダンスは、また、リスクアセスメントについて、一部のデータ要件の主張の放棄の状況も確認している（例えば、ENM が摂取前に食品/飼料マトリックス中で許可された非ナノ形状に分解された場合など）。

In vivo テストアプローチの代替の開発は実質的に進展しているが、リスクアセスメントの目的に用いられる *in vivo* テストから必要とされる情報は、特異な最終影響についての信頼性の高い *in vitro* 方法は依然限定されている。リスクアセスメントにおける動物の使用は、実験研究をデザインする際に徹底的に検討し、申請者には、現存アプローチについて、動物テストの減少と精緻化、食品と飼料のリスクアセスメントの適応性について、科学委員会の意見との協議が勧告される（EFSA, 2009b）。

この ENM ガイダンスで概要を示されない追加的なアセスメント（例えば、効率性アセスメント）は、他の特異なガイダンス文書で規定されるか、法的に要請されていることを認識すべきである。

特定の ENM は、人工的あるいは天然のソース（源）から、廃棄処理の従来のプロセスを介して、汚染物質として食物/飼料連鎖に入る可能性がある。原則として、この ENM ガイダンスにおいて推奨されている ENM の毒性テストからのデータは、食品/飼料の汚染物質としての ENM からのヒトの健康リスクの評価にも用いることができる。

この ENM ガイダンスにおいては、欧州委員会により示された参照事項には含まれていないため、環境上の検討や作業者らの暴露には対応していない。

この文書のパブリック・コンサルテーションは、2011年1月14日から2月25日の間に行われた。受け取ったコメントは検討され、適切な場合には組み込まれた。

加工ナノマテリアル (ENM) の用語

本ガイダンスの中で用いられる加工ナノマテリアル (ENM: engineered nanomaterial) の用語は、食品や飼料に使用するため、意図的あるいは非意図的 (製造工程により) に製造されたナノマテリアルを意味する。ナノマテリアルは、少なくとも一つのサイズ測定値が約 1~100 nm の間の物質を意味することは、一般的に容認されている (ISO, 2008; Lövenstam et al., 2010; SCENHIR, 2010)。この ENM ガイダンスにおいては、“engineered” (加工された) という用語は、他のレポート (例えば、SCENIHR, 2009, 2010) において用いられているように、“manufactured” (製造された) あるいは “processed” (加工処理された) と同様な語義である。

EU においては、ナノマテリアルの定義を目的とした法律的な討議が進行中であることを認識している。この ENM ガイダンスは、規制上の定義とは別個に記述されている。しかし、ENM ガイダンスで用いられた ENM の用語は、法律的な定義が同意された場合には、改訂する必要があるだろう。この ENM ガイダンスは、何らかの定義を示す意図は持っていない。

食品および飼料は、ナノスケールで個々に存在する内部構造を有する成分、例えば、天然に存在するリポソーム・ミセル・結晶などを含むであろう。しかし、ENM ガイダンスにおいては、「天然」成分は、ナノ特性を持つように意識的に製造された物質、例えば、カプセル化された高活性生物学的化合物の場合のみを対象としている。

「ナノマテリアル」の用語は、その構成部分による物質の分類であることに留意すべきである。それは特異的なリスクや、この物質がその構成部分またはより大きなサイズの相対物質と比較して、実際に、新しい危険特性を有することを必ずしも意味しない (SCENIHR, 2010)。

本 ENM ガイダンスにおいては、非ナノ形状 (non-nanoform) という用語は、イオン状あるいは分子状形状 (すなわち、一般的には、ナノ形状よりも小さい) またはバルク形状 (すなわち、一般的には、ナノ形状よりも大きい) のいずれかを意味する。

2. ENM 評価についての一般考察

この ENM ガイダンスでは、リスクアセスメントの完了に必要な各段階での情報とデータにおけるアプローチと評価を適用している (図 1 に略図)。実施するテストの決定は、

利用可能の既存情報の量と質と、データ創出に用いたテストの信頼性に依存する。利用可能の情報が全体として十分であると見なした場合には、リスクアセスメントの実施が可能であり、それ以上のテストは必要としない。しかし、情報が不十分と見なされた場合には、さらにテストが必要である。

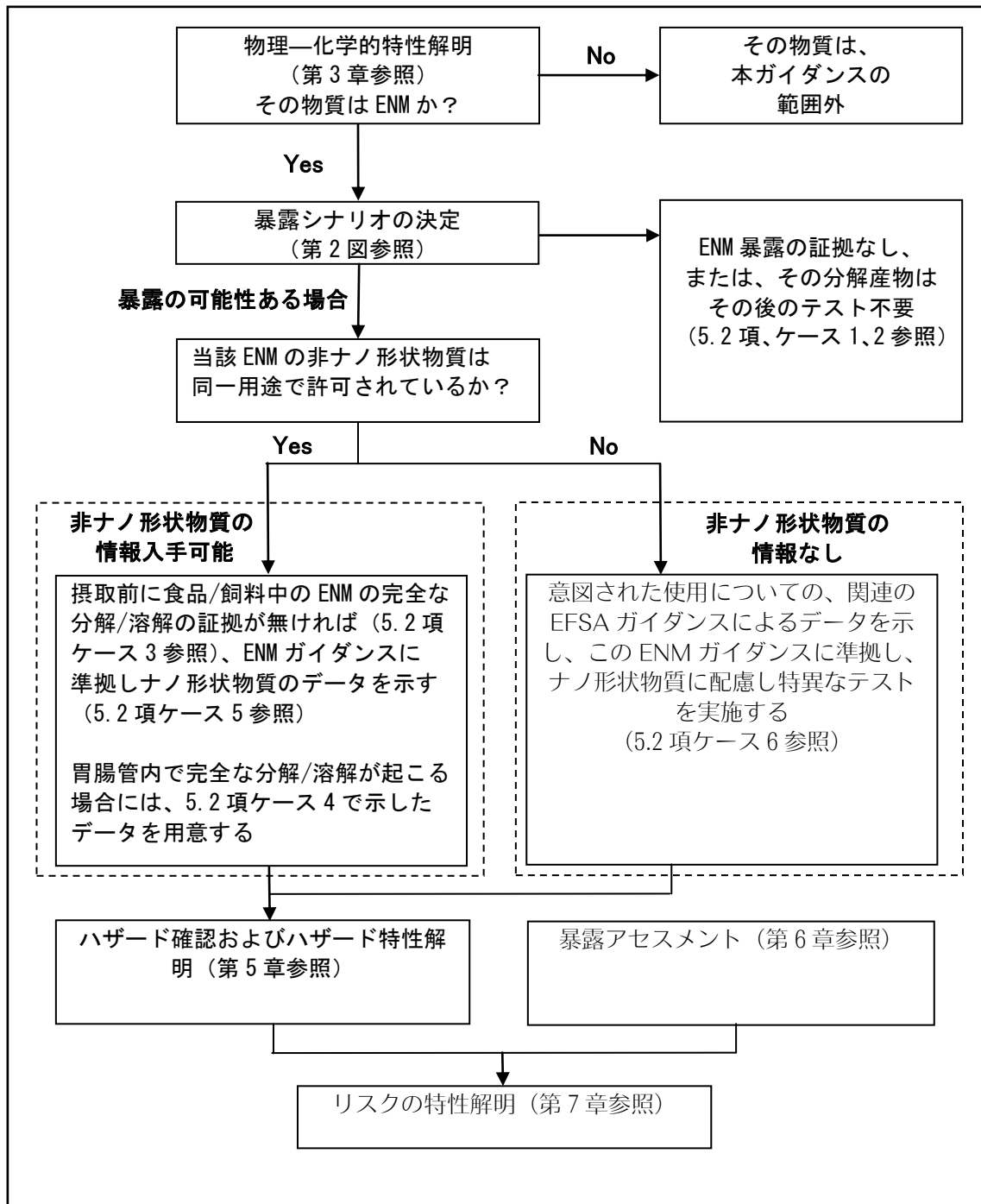


図 1. ENM のテストとリスクアセスメントの概略図

図1に示した ENM のリスクアセスメントの概要は、ENM と製造された ENM からの非ナノ形状物質についての特性と、データの入手可能性の差異による特性解明の状況に対応している。

ENM のリスクは、その化学組成・物理-化学的特性、組織との相互作用・暴露レベルのポテンシャルなどにより決定される。物理-化学的特性の解明は、ENM の同定に必要とされ、ENM ガイダンスを適用できるか否かを決定する。ENM ガイダンスが適用できる場合には、テストの結果は、暴露アセスメントと組み合わせて、ハザードアセスメントの情報をもたらし、リスクの特性解明のベースを形成するであろう。また、吸収・分布・代謝・排泄 (ADME) のパラメーターも、ENM の化学組成のほか物理-化学的特性 (例えば、サイズ・形状・溶解性・表面電荷・表面活性など) により影響を受けるであろう。

食品/飼料中で、同じ用途において許可された非ナノ形状の物質の場合 (ENM アセスメントについて用い得る情報が入手できる) には、ENM ガイダンスは、ENM とその意図する用途から浮上する追加的なハザードポテンシャルとリスクについてのデータの概要を目的としている。この状況下において、ENM と許可された非ナノ形状物質との差異の確認を重視したテスト戦略が開発されるであろう。次いで、この ENM についての補完的な情報により、非ナノ形状物質について入手できる情報との比較が可能である。この状況における下位の範疇は、使用意図が異なる場合には、ENM の早期アセスメントの際に生じる。

許可された非ナノ形状物質でない新規の ENM の状況においては、送付されたデータは、特異な意図の使用に関連する EFSA ガイダンスで手がけるテストに含める必要があり、ナノ形状物質の物理-化学特性についての追加データにより補完され、この ENM ガイダンスで示されたテストを受ける。

食物/飼料連鎖の中で、使用が提案されている ENM テスト前の、最初の段階で、検討すべきいくつかの一般的局面がある。吸収と分布は、体内暴露をリードし、ENM の高度活性または体内移動のほか ENM の持続性などは精密テストの一般的な指標である。

適切なテスト戦略の決定に際しては、下記の毒性の可能性についての指標が挙げられる：

- ハイレベルの活性 (例えば、触媒的・化学的・生物学的)
- 複雑な形状 (例えば、強度の剛性、長い管状あるいは線維、高アスペクト比の)

ナノマテリアル、フラーレン、結晶構造、有孔性など)。核と種々の生物学的持続性の殻を有する ENM (例えば、多機能 ENM)

- 酵素・DNA・レセプターなどとの相互作用、「トロイの馬」(訳者注：巧妙に相手を陥れる罠) 効果
- 複雑な変質 (例えば、劣化、表面特性の変化、有孔性など) あるいは代謝産物 (例えば、コーティングの変化および喪失 (dynamic corona))
- 抗微生物剤としての利用を意図した ENM(例えば、胃腸内菌相への意図しない影響)

高度暴露の可能性についての指標は次の通り。

- 適用分野における多量の産出
- 生物体内におけるナノ形状物質の高度の移動 (内部暴露の確立) (例えば、マクロファージ経路の暴露；細胞膜通過の移動、血液-脳バリアおよび胎盤；ドラッグデリバリー・システムおよび移動ポテンシャル (例えば、浸透・収着・錯体生成など)
- 目標を対象とした、またはコントロールされた放出
- 持続性/安定性 (例えば、水・脂肪・体液中、溶解性/分解性の欠如)
- 生物学的蓄積

ナノ特性の検討および喪失状態における特異な暴露シナリオに基き、ENM の有害影響の可能性が低減すると見なされる指標が存在する。ナノ特性の完全な喪失の場合には、従来のリスクアセスメントへの依存が可能で、ナノに特異的なリスクアセスメントはもはや必要とされない。

次のパラメーターは、ナノ特性の喪失を示すであろう。

- 溶解レートの増加 (例えば、水・食品/飼料マトリックス・生体液などにおける)
- 非ナノ形状物質への分解産物への分解レートの増加 (例えば、生物学的あるいは光触媒)
- 強固に結合した凝集 (例えば、製造条件により決定された)、マトリックス中で固定した永続的な結合 (例えば、マトリックスの安定性、結合のタイプ、ライフサイクル末期のビヘイビアーなど)

表面におけるナノ構造の変更とナノ構造物質は、粒子類を放出せず、活性がないため、

一般には有害影響の可能性を減少させると見なされている（例えば、フィルターおよびプロセッシング器材として利用されるナノ細孔またはロータス効果(訳者注)構造体)。しかし、そのような適用における一部の例では、検討すべき問題が浮上する（例えば、機能上の失敗のインパクト）。

訳者注：ロータス効果 (lotus effect) とは、材料工学において、ハス科の植物に見られる自浄性を示す用語。

代謝および排泄パラメーターは、生物学的持続性の重要な指標である。食品/飼料の持続性は体内あるいは環境中で存続を継続する能力である。生物学的持続性は、生物学的システムから、物質/材料が、その溶解・代謝・分解/解毒・クリアランス（浄化）への移行に耐える能力を意味する。体内における生物学的持続性のナノマテリアルの滞留は生物学的蓄積を誘発する可能性がある。従って、ENM の生物学的持続性および蓄積を検討すべきである。

上記の考察とコンセプトは、次の各章において、さらに進展する。ENM の特性解明と確認については、第3章によりカバーされている。暴露シナリオは第4章に、暴露アセスメントは第6章で示した。ハザードの確認および特性解明と毒性テストについては、第5章で、また、リスクの特性解明は第7章、不確実性分析は第9章で検討している。

3. ENM の特性解明

ナノマテリアルの主要な物理的特性であるサイズの小さいことに加えて、多くのその他の物理化学的パラメーター（例えば、形状・溶解性・表面電荷・表面活性など）は、ENM の特性と生物学的影響の可能性の決定に重要である（Nel et al., 2006; SCENIHR, 2007; Siomn & Joner, 2008; Tiede, 2008; Nel et al., 2009; EFSA, 2009a; SCENIHR 2010; JRC, 2010）。

ENM の十分な特性解明は、その同定と食品/飼料製品中の物理-化学的性状とテスト条件に不可欠である。この情報は、テスト物質の代表性と意図した使用からの暴露の妥当性の評価に必要である。また、それは種々の製品におけるテスト物質（毒性を含む）とメーカー、異なる期間における類似テストなどの比較にも不可欠である。その種の情報は、将来において外挿あるいは比較評価手法 (read-cross procedure) の知識ベースに寄与するであろう。ENM の規格は、リスクアセスメントの結果（例えば、同一化学組成で異なるサイズや形状の ENMs は異なる毒性を示すであろう）に影響するため重要である。ENM の今後の許可はリスクアセスメントの結果に基くため、規格内の特性と

特質をテストすべきである。

リスクアセスメントの初期において、ENMの構造/特性が、食品/飼料マトリックスへの添加により影響される可能性があるか否かについて検討すべきである。添加あるいは製造により、ENMの形態が著しく変化する場合には、食品/飼料マトリックス中で得られたENMの構造によるテスト条件でのENMのテストの実施が重要である。

物理-化学パラメーターと特性解明方法の選定は、ENMの特性・機能性・利用意図に依存する。現在の知識ギャップは、ENMの特性について、優先的なパラメーターの最終候補名簿の確定を困難にしている。例えば、特異な形状のENM（例えば、硬い針状）が毒性の懸念を招く場合には、形状の決定は強制的な測定のパラメーターになるであろう。しかし、これはその他のケース、例えば球状で変形可能な構造（例えば、カプセル状やミセルなど）にとっては、さほど重要ではないであろう。

在来型の化学物質類については、物理-化学的パラメーターの最適の測定方法の選定は、ENMのタイプと測定環境（例えば、液体・食品マトリックス・食品包装など）に依存するであろう。例えば、金属ENMの化学的的特性解明は、有機性カプセルと比較して、異なる分析方法が必要であろう。このように、パラメーター/方法の選定は、ケースバイケースで行う必要がある。

ENMの物理-化学的パラメーターは種々の環境中で変化し、その特性解明は五つの段階で検討できる。すなわち、①製造段階（初期の新鮮な状態）②食品/飼料製品で使用する段階 ③食品/飼料マトリックス中での存在 ④毒性テスト段階 ⑤生物学的液体や組織中での存在段階。物理-化学的的特性解明の決定は、今後の実験デザインと暴露アセスメントに重要である。その場における食品/飼料マトリックス中のENMの特性解明と毒性テストは、毒性データの妥当性確保に最も重要と見なされている。さらに、生物学的液体や組織中に存在するENMの特性解明は、特にADME研究にとって重要である。しかし、特性解明はすべての状況において実行できるとは限らない。

テスト利用者は、詳細な方法とその性能特性の結果に基く利用の意図について、特異なENMの適切な分析方法を示すべきである（3.2項参照）。ENMの同定と特性解明について、情報を示すために適用される、現在利用できる方法の選定は、付属資料Aに述べた。複雑なマトリックスにおける同定と特性解明の方法は、開発中である。

3.1 ENMの同定・検出・特性解明の要件

性能・目的・意図する用途により決定されるように、ENMの最も顕著な特性は、表1

により記述し、関連パラメーターを決定すべきである。決定あるいは提示されなかった特性については、十分な根拠を示すべきである。

サイズのパラメーターについては、異なる測定テクニックにより得られた結果は、測定方法に適用された物理的原理により異なるため、常に、最少でも2種類の独立的な方法（その一つは電子顕微鏡）により測定すべきである（Domingo et al., 2009）。表1のパラメーターには、OECD ナノマテリアル製品作業部会の検討「代表的セットのナノマテリアルの安全テスト」の検討プロジェクトによるリストを含んでいる。OECDは、最近、ナノマテリアル製品のテストについてのガイダンスマニュアルの改訂版を発行している（OECD, 2010a）

3.1.1 食品/飼料関連への適用前における ENM の特性解明

食品/飼料関連への適用前における ENM の特性解明に関する情報は、表1において求められた、ナノに特異的な情報により補完された、次の利用意図分野において関連する EFSA ガイダンス文書に準拠すべきである

表1：ENMの特性説明および同定についてのパラメーター（付属資料A参照）

パラメーター	要件	内容
化学組成/同定	不可欠	純度・不純物の特性・コーティングまたは表面成分・カプセル化物質・加工化学物質・拡散剤・その他の成分、例えば安定化剤
粒子サイズ (一次/二次)	不可欠 (電子顕微鏡を含 め2方法)	一次粒子サイズ・サイズ範囲、数サイズ分布（出来れば、バッチによる変動を示す）。同じ情報は二次粒子類（例えば、凝集体や凝結が存在する場合に必要）。
物理的形状と形態	不可欠	物理的形状と結晶フェーズ/形状。情報は、ENMが、粒子・チューブ・棒などの形状、結晶またはアモルファスのいずれか、調製物は遊離（free）・凝結/凝固・粉末・懸濁・分散のいずれかを示すべきである。
粒子および質量濃度	不可欠：分散とドライパウダーの場合	分散の場合には粒子数および粒子質量濃度、ドライパウダーの場合には質量当りの濃度の情報。
比表面積	不可欠：ドライパウダーの場合	ENMの比表面積の情報。
界面化学	不可欠（表面改造のENMの場合）	表面反応性を改造する化学的/生化学的改造あるいは新規性能の付加を含むENM表面についての情報。
表面電荷	不可欠	ENMのゼータポテンシャルについての情報。
酸化還元ポテンシャル	不可欠：無機ENMの場合	酸化還元ポテンシャルについての情報。酸化還元ポテンシャル測定条件の報告必要。
溶解性および分配特性 ^a	不可欠	関連溶媒中のENMの溶解性およびそれらの水性和有機フェーズの間における分配（例えば、適切な場合におけるlog Kow）についての情報。
pH	不可欠：液体分散の場合	水性懸濁液のpH。
粘性	不可欠：液体分散の場合	液体分散の粘性の情報。
比重および流動比重	不可欠：顆粒状物質の場合	非製剤化ENMの比重/多孔率および流動比重についての情報。
埃っぽさ (Dustiness)	ドライパウダーでは不可欠	スパイス類・クリーマー類・スーパパウダーのような粉末製品の埃っぽさについての情報。
化学的反応性/触媒活性 ^b	不可欠	ENMおよびENMの表面コーティングに関連する化学的反応性あるいは触媒活性についての情報。
光触媒活性	光触媒物質には不可欠	食品包装・コーティング・印刷インク・内部反応に用いられる関連材料の光触媒活性についての情報。

a) 分散・溶液・溶解物：液体に導入された不溶解ENMは「分散」を形成し、液体とENMが共存する。実際の溶液中では溶解している（従って、存在しない）(OECD ENV/JM/MONO(2010)25参照)。

b) ENMに触媒特性がある場合には、酸化還元または他の反応に触媒作用を示し、触媒活性ENMが少量であっても、より大きな生物学的反応の発生を永続させるであろう。これより、基質を用いる従来の生化学反応と比較して、ENMの反応は触媒反応の永続が中心的存在になる。

ENMについては、物質の同定について示される明細事項(Specification)の範疇を明記すべきである。非ナノ形状ガイダンスに包含できる情報例には、次の事項（網羅的なりストとではないが）、すなわち、名称（一般あるいは商品名）、CAS ナンバー（入手可能の場合）、製造方法（沈殿・ガスフェーズ）、利用意図の詳細、適用に関連する食品/飼料における利用の理由、バッチ間の変動、安定性/保存期間などが含まれる。

3.1.2 ENM の食品/飼料関連への利用についての特性解明

食品/飼料に利用される前のENMの検出と特性解明は比較的簡単であるが、最終的に、食品/飼料製品で利用される場合においては、複雑なマトリックスの存在と、通常は、ENMの濃度が低いため、より問題がある。また、食品/飼料には、一部にナノスケールのサイズの範囲の広範囲の天然構造体が含まれるため、意図的に添加されたENMを分離し、検出し同定することを困難にしている。

食品/飼料マトリックス中の主要な有機（大）分子類の官能基（カルボキシル、ヒドロキシル、アミノ、スルフィドリル基）に対するENMの界面活性は、蛋白質類、脂質類、多糖類、核酸類、その他のバイオポリマー類との結合ポテンシャルを誘発するため考慮すべきである。一般的には、ENMは食品/飼料中では遊離形状では存在せず、食品/飼料成分と結合するであろう。蛋白質との相互作用では、その蛋白質とENMの蛋白質の挙動に影響を及ぼすENMを取巻く動的な「コロナ」(corona)を形成するであろう(EFSA, 2009a)。従って、食品/飼料中マトリックスのENMの検出と特性解明には、組み合わせた方法が必要とされるであろう。ENMの分析中に、食品マトリックスが干渉を生じさせた場合には、それは分解あるいは適切な生化学的・物理的・化学的方法によりENMから分離され、ENMの分析が可能であろう。例えば、ナノ分画の分離方法（例えば、Field Flow Fractionation）は、検出/特性解明の利用前に必要であろう。しかし、そのような分離段階ではENMの構造/特性を変化させるため、慎重に検討すべきである。

ENMの関連する触媒活性は、食品/飼料中のほか、摂取後の体内でも予期しない反応を誘発するため測定が必要である。そのような反応の例としては、食品/飼料中での活性ラジカル類、食品/飼料中での光反応、体内における生物学的プロセス、その他が発生するであろう。

3.1.3 毒性テストについての特性解明

ENMの毒性学的アセスメントについては、テストシステムに対してどのような形状のENMが存在するかを知ることが不可欠である。その上、テストシステムにおけるENMの特性解明は、FNMの特性と特質におけるテスト媒体/剤形（およびその構成）の影響を決定するため、また、毒性テストの結果の信頼性確認の決定と、暴露の起きた食品/飼料マトリックス中のENMとの比較を可能にするために重要である。

現在入手できる情報は、バッチ間の変動と経時変化（例えば、凝集/凝固、沈殿など）に対応し、特別な検討が必要である。

3.1.4 生物学的液体および組織中に存在する ENM の特性解明

ADME（吸収・分布・代謝・排泄）研究においては、血液・組織・排泄物中のENMの量を測定し、体内に存在するENMの形状を確認するのは、特に困難であろう。ENMの表面変質（例えば、蛋白質その他の生物学的分子類の付着ダイナミクス）は、ADMEに著しい影響を示すであろう。ADME研究においては、ナノマテリアルの検出と、臓器・組織・その他の生物学的サンプル中の元素組成の測定システムの入手が不可欠である（5.4.2項参照）。

3.2 特性解明についての性能クライテリア

ENMの初期製品（製造後の新鮮な状態の）、市販品組成、食品/飼料マトリックスに対する毒性テストシステムは、方法の性能クライテリアを厳守すべきである。特に、初期における新しい方法や新しい分析対象物の測定では、不確実性の高いことが多い。従って、この新しい分析分野においては、適用方法が目的に合致し、信頼できる結果が得られることの実証が不可欠と見なされている。テスト利用者は、適用する方法と性能について、適切な文書による立証が求められる。テスト方法の性能パラメーターは、多様なクライテリア（例えば、特異性・選択性・回復/現実や実際との一致（trueness）・反復性・再現性・検出/定量限界その他）について決定され文書が必要とされる。可能な場合には、現行のガイドライン（例えば、IUPAC(単一ラボラトリーの分析方法の信頼性確認についての統一ガイドライン、Pure and Applied Chemistry 74(5), 835-855(2002)); 欧州委員会決議 2002/657/EC)に配慮あるいは採用すべきである。また、テスト方法の性能ガイドラインの最新版に準拠すべきである。国際的に合意されたプロトコールとは異なる方法の利用も正当化される。テスト利用者は、規制機関は、ENMの詳細なモニタリング順守体制について、ルーチンな方法を体系的に必要とすることに気付いている。

標準参照物質は、分析方法のコントロールと性能の比較に不可欠である。しかし、ENM の分野で標準参照物質が存在するのは、サイズ測定の信頼性が確認されているシリカと金が入手できるのみである。シリカナノ粒子サイズ標準参照物質（IRMM-304 および ERM-FD100）は、欧州委員会標準参照物質・測定研究所共同研究センターから、また、金ナノ粒子（NIST RM 8011, 8012, 8013）は米国国立標準・技術研究所（NIST）から入手できる。その他の標準参照物質は、今後入手出ると期待されており、適正に利用すべきである。標準参照物質に加えて、欧州委員会共同研究センターでは、最近、25種のナノマテリアルから構成される保管機関の利用が可能になった。これらのナノマテリアルは、ラボラトリーがその結果を他のラボラトリーと比較するため、標準化された研究ツール/標準ポイントとして利用可能である。分析方法が比較的弱体である場合には、標準参照物質により多く依存せざるを得ない。正式に認定された標準参照物質がない場合には、自家製（self-generated）で適切に文書で立証された（documented）標準が用いられるであろう。

4. 暴露シナリオ

ナノマテリアルの詳細なリスクアセスメントを開始する前に、提起された用途からの暴露シナリオの概要を予測すべきである（図2参照）。これらの暴露シナリオは、ハザードの特性解明の範囲の決定に寄与し、リスクアセスメントに必要な暴露アセスメントのパラメーターを示すであろう。

ENM が食品/飼料に直接添加された場合には、ENM のタイプと量について確認すべきである。これらを知ることができれば、直接、暴露シナリオに進むことが可能である。その他の状況下では、食品/飼料中の ENM の同定と定量が必要である。ENM が食品/飼料のマトリックス中で完全に溶解されていることが実証された場合には、発生した分解産物（非ナノ形状分画）への暴露以外には、ヒトの暴露はないと考えられる。胃腸液中での完全な消化の場合には、局在的な暴露（例えば、上部消化器官）の検討が必要である（Holpuch et al., 2010）。

以上とは対照的に、ENM が間接的に存在する場合、例えば、ENM の非ナノ形状分解産物の移動や転移によるケースでは、飼料から動物経由の引継ぎ（carry over）の可能性が含まれ、そのタイプと量を決定すべきである。食品接触材料についての EFSA のガイダンス（EFSA, 2990c）は、移動のテストの情報を示している。食品/飼料中への移動と転移の範囲は、必要とされるハザードの特性解明と吸収・分布・代謝・排泄（ADME）についての有無と範囲を決定するであろう。用いられた分析方法の特性は、ガイダンス

第3章に準拠すべきである。もし、移動が存在した場合には、そのナノマテリアルについては、食品のシミュレーションあるいは食品/飼料マトリックス中での、追加的の物理-化学的特性解明を実施すべきである。また、ENM が食品または飼料中に移動しているケースでは、暴露アセスメントを行うべきである。

もし、食品/飼料マトリックス中の ENM の同定が不可能あるいは ENM の変質の指標が存在する場合には、暴露の起きた ENM の特性は理解できず、未確認あるいは変質とされ、最初に、食品/飼料に添加されたこと以外の ENM 暴露についての結論には到達できない（第6章参照）

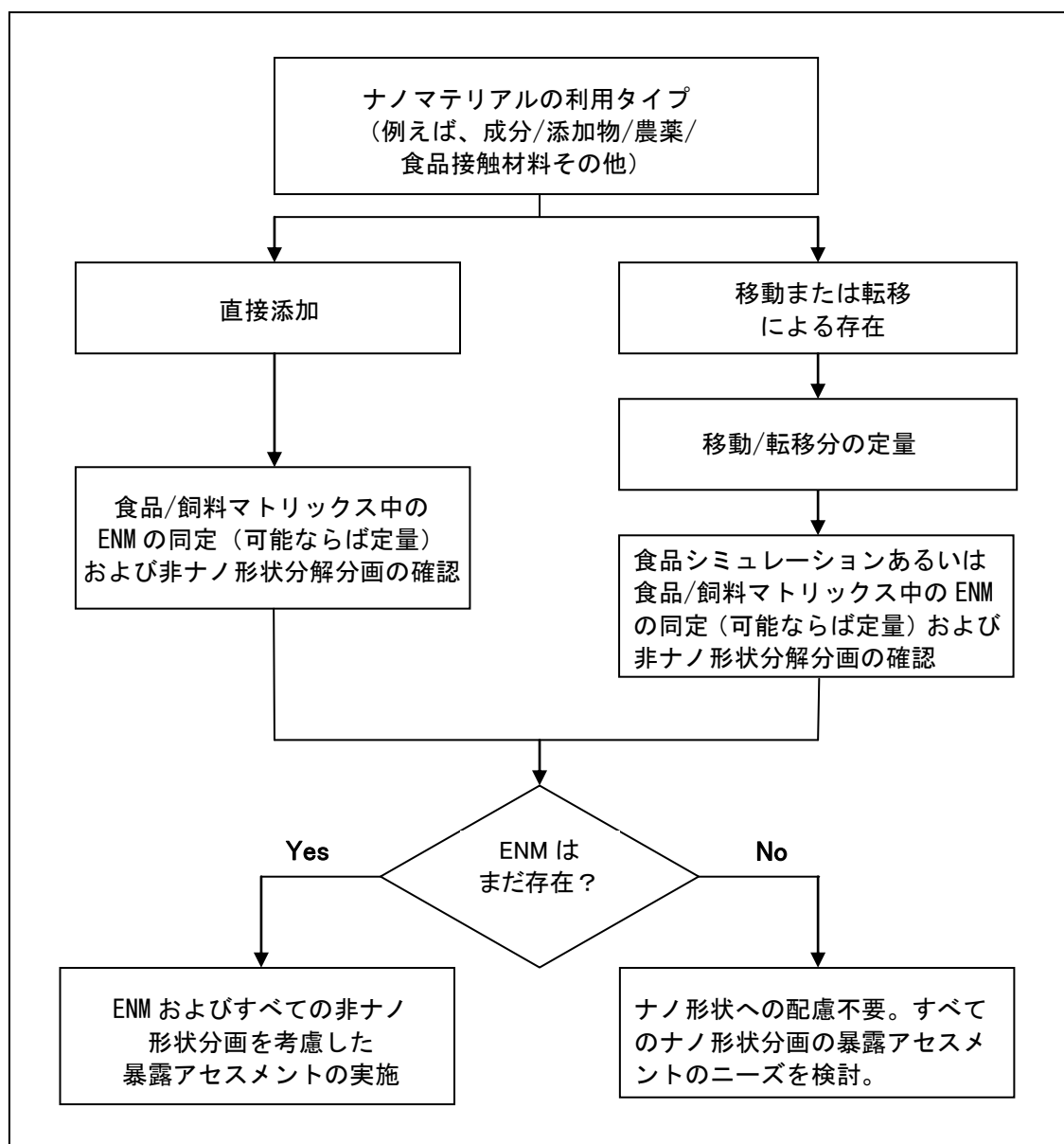


図2. 暴露シナリオ

5. ハザードの確認および特性解明

5.1 一般的考察

第1章から繰り返して述べているが、現行のEFSAガイダンス文書およびECガイドラインに規定された食品/飼料の意図的利用に対するテスト要件の原則はENMにも適用される。本章では、ENMの特異な特色と特質によって生じるハザードの確認および特性解明の概要を示す。ENMのハザード確認では、適切な*in vitro*および*in vivo*研究に着手し、ハザードの特性解明のため用量-反応データを入手すべきである。

現在、ENMの経口暴露、それらの吸収・分布・代謝・排泄(ADME)、その後の毒性について利用できるデータは極めて限定的である。ENMの毒性について入手できる情報の大部分は、EFSAの以前の見解(EFSA, 2009a)に示した通り、*in vitro*あるいは経口以外の暴露経路を用いた*in vivo*研究(例えば、吸入)から得られている。

現時点における証拠では、不溶性/非分解性ENMは、非ナノ形状物質に、より似た影響を示す傾向が強い溶解性/分解性ENMとは異なり、イオン状・分子状・バルク状(すなわち、非ナノ形状)とは違う生物学的特性を示すことが多い(Auffan et al., 2009; EFSA, 2009)。

非ナノ形状物質に用いられているテストモデルやテストプロトコールの一部は、ENMのテストとしては必ずしも適切あるいは最適ではないと考えられ、研究社会は、現在、これらの問題への対応に努力している。従って、このENMガイダンスにおける毒性テストへのアプローチについては、将来出現する情報に考慮して、必要に応じた更新に託されている。

ハザード確認については、毒性と種々のドーズ・メトリックスとの関連性が、現在、科学社会で討議されており、質量に加えて、例えば、数濃度やトータル表面積など、いくつかのドーズ・メトリックスが検討されている。質量は便利なメトリックであるが、ENMの特性解明についての情報は、質量ドーズを他のメトリックス例えば表面積や粒子数への変換や、関連する場合には、非ナノ形状物質との比較も可能でなければならない。

テストに極めてハイドーズを用いた研究が発表されている。非現実的なハイドーズは、

その物質の固有の毒性に関連しない結果を誘発することがあるが、多量の投与では、そのようなことはない。従って、ドーズレベルの選定には慎重に検討し、選ばれたドーズについては正当な証拠を示すべきである。

他の食品成分（例えば、ビタミン類）に対するキャリアシステムとして用いられた ENM は、それらの食品成分の生物学的利用能（bioavailability）を増強するため、毒性の見地から、生物学的利用能の増強の影響を検討する必要がある。ナノスケール・デリバリーシステムの暴露アセスメントには、それ自身のナノキャリアアセスメントに加えて、カプセル化された生物学的活性化合物のほか、食品中の遊離状態での存在量が含まれる。このためには、これらの要件に、分析上の単離、検出および特性解明方法を適合させる必要がある。また、適切かつ可能な場合には、関連する化学成分の分析が必要であろう。

5.2 毒性テストの概要

毒性テスト戦略は、食品/飼料マトリックス中の ENM の存在により、また、適切な場合には、同一物質の非ナノ形状物質について入手可能な情報により決定される。この毒性テスト戦略については、6 種類の一般的ケースと毒性テストを、表 2 および図 3 において示した。ヒトおよび動物の暴露が予測されない ENM の利用（例えば、あるタイプの農薬類）については、関連の EFSA ガイダンスを、概説された考察と修正を適切に考慮し

た上で、テスト戦略に適用すべきである。

ケース 1 – 市販の調製品/規格品中での ENM の残留なし

適切な分析法により、ENM の非ナノ形状物質への完全な分解/溶解が実証され、証拠が確認された場合には、非ナノ形状物質に対して特異的に意図された利用についての EFSA ガイダンスを適用すべきで、この ENM ガイダンスはもはや適用されない。

ケース 2 – 食品接触物質からの移動なし（すなわち、暴露なし）

適切な分析方法により、移動のないことが明確に実証する証拠が示された場合には、食品経路の ENM への暴露はないとの情報に基くリスクアセスメントにより、毒性学的懸念は存在しない。

ケース 3 – ENM は、摂取前に食品/飼料マトリックス中で完全に変質

適切な分析方法により、ENM は食品/飼料マトリックス中で、摂取前に、非ナノ形状物質への変質が完了しているとの判断された明確な証拠が示された場合には、特異的な意図的利用についての非ナノ形状物質についての EFSA ガイダンスを適用すべきで、現行の

ENM ガイダンスはもはや適用されない。

ケース 4 – 消化時間中での変質

適切な分析方法により、ENM は胃腸管において完全に溶解/分解されていることを実証する明確な証拠が示された場合には、ハザードの確認と特性解明は、ENM の吸収が溶解/分解前に吸収の可能性が排除できる限り、非ナノ形状物質についてのデータ（入手できれば）への依存が可能である。*In vitro* 遺伝毒性により一般的に構成される限定的なテストセットにおいて、ENM の吸収がないことの明確な証拠が示された場合には *in vivo* の局所影響またはその他の適切な *in vivo* テストは十分と見なされるであろう。

溶解 ENM の全身影響のプロファイルは、可溶性（イオン状あるいは分子状）の形状物質と類似していると考えられている。もし、これが実証されれば、ENM についての、それ以上のテストは不要である。非ナノ形状物質のデータが得られない場合には、意図的利用についての関連の EFSA ガイダンスによる非ナノ形状物質のテストが必要とされる。

ケース 5 – 非ナノ形状物質について入手可能な情報

同一物質の非ナノ形状物質の情報が入手でき、食品/飼料中や胃腸液中に、ENM の一部あるいは全部が残留する場合には、非ナノ形状物質の ADME・毒性・遺伝毒性についての情報の比較に基づくテストアプローチが推奨される。最初の例としては、げっ歯類の ADME、90 日間経口毒性研究および ENM の遺伝毒性情報がある（5.3 および 5.4 項参照）。2 種類の形状物質からの ADME および毒性データの比較は、非ナノ形状物質とその ENM との挙動の差異が大きいかな否かを確認するためである。

–もし、認められた差異がハザードの増強を示す場合には、ADME や 90 日間および遺伝毒性テスト以上の毒性テストが必要であろう。

–もし、認められた差異がハザードの低減を示す場合には、それ以上のテストの要求は免除され、科学的に正当化されるであろう。

ケース 6 – 非ナノ形状物質についての情報なし

非ナノ形状物質についての情報がなく、食品/飼料中や胃腸液中に、ENM の一部あるいは全部が残留する場合には、ENM の毒性テストアプローチは、ナノ特性に配慮した現在の見解を修正した、意図的利用についての、関連の EFSA ガイダンスに準拠すべきである。ハザードの確認と特性解明について示された ENM 毒性テスト戦略は、ナノ特性を考慮している（5.3 および 5.4 項参照）。

表2. ENM 毒性テスト戦略

テストのタイプ	情報
<i>In vitro</i> 遺伝毒性	通常、ケース4に必要。ケース5および6に必要 (5.3.2 項参照)
ADME	通常、ケース4に必要。ケース5および6に必要 (5.4.1, 5.4.2 項参照)
げっ歯類における反復投与 90 日間 経口毒性研究	通常、ケース4に必要。ケース5および6に必要 (5.4.3 項参照)
<i>In vitro</i> 消化研究	通常、ケース3,4,5,6に必要 (5.31 項参照)
その他の <i>in vitro</i> テスト	スクリーニングおよびメカニズム情報に必要であろう (5.3.3 項参照)
生殖研究	必要であろう。または、特異なセクター規制あるいは EFSA ガイダンスにより必要(5.4.4 項参照)
発生毒性研究	必要であろう。または、特異なセクター規制あるいは EFSA ガイダンスにより必要(5.4.4 項参照)
<i>In vivo</i> 遺伝毒性テスト	必要であろう。または、特異なセクター規制あるいは EFSA ガイダンスにより必要(5.4.5 項参照)
慢性毒性/発ガン性研究	必要であろう。または、特異なセクター規制あるいは EFSA ガイダンスにより必要(5.4.4 項参照)
特異毒性テスト	必要であろう。または、特異なセクター規制あるいは EFSA ガイダンスにより必要(5.4.4 項参照)

5.3 *In vitro* 研究

In vitro 法の開発が進行中であるが、現在、ENM のハザードアセスメントに用い得る信頼性の高い方法は存在しない (Park et al., 2009)。しかし、*in vitro* テストはハザード (例えば、遺伝毒性) についての情報をもたらし、ENM の毒性可能性を示し、作用モードの解明に用いられるであろう。*In vitro* テストの主要な目的は、ENM の毒性スクリーニングと、生物学的反応および基底に存在するメカニズムの解明である。ENM の作用モードについての情報は有用であろう。例えば、活性酸素類の発生は、遺伝毒性やその他の毒性影響を予測できるであろう。

In vitro テストについては、テストシステムの適合性、ENM の構造と特性を変化させる ENM と *in vitro* 培養基成分 (例えば、成長因子、蛋白質、栄養素など) との相互作用、細胞の ENM 取り込みについての培養基成分の影響、細胞中への ENM の取り込みを可能にするための処理時間の延長などの点に留意すべきである (Doak et al., 2009; Stone et al., 2009; Donaldson et al., 2010)。*In vitro* モデルへの生物学的液 (例えば、唾液・胃腸内液・粘液・血漿・リンパ液など) の利用を検討すべきである。また、陰性および陽性対照として何を用いるべきかの検討が必要である。さらに、毒性が知られている ENM 内に存在する不純物を検討する必要がある (第3章参照)。そのほか、*in vitro* アッセイのデータ読み取りシステムによる ENM の干渉の可能性についても検討すべきである。

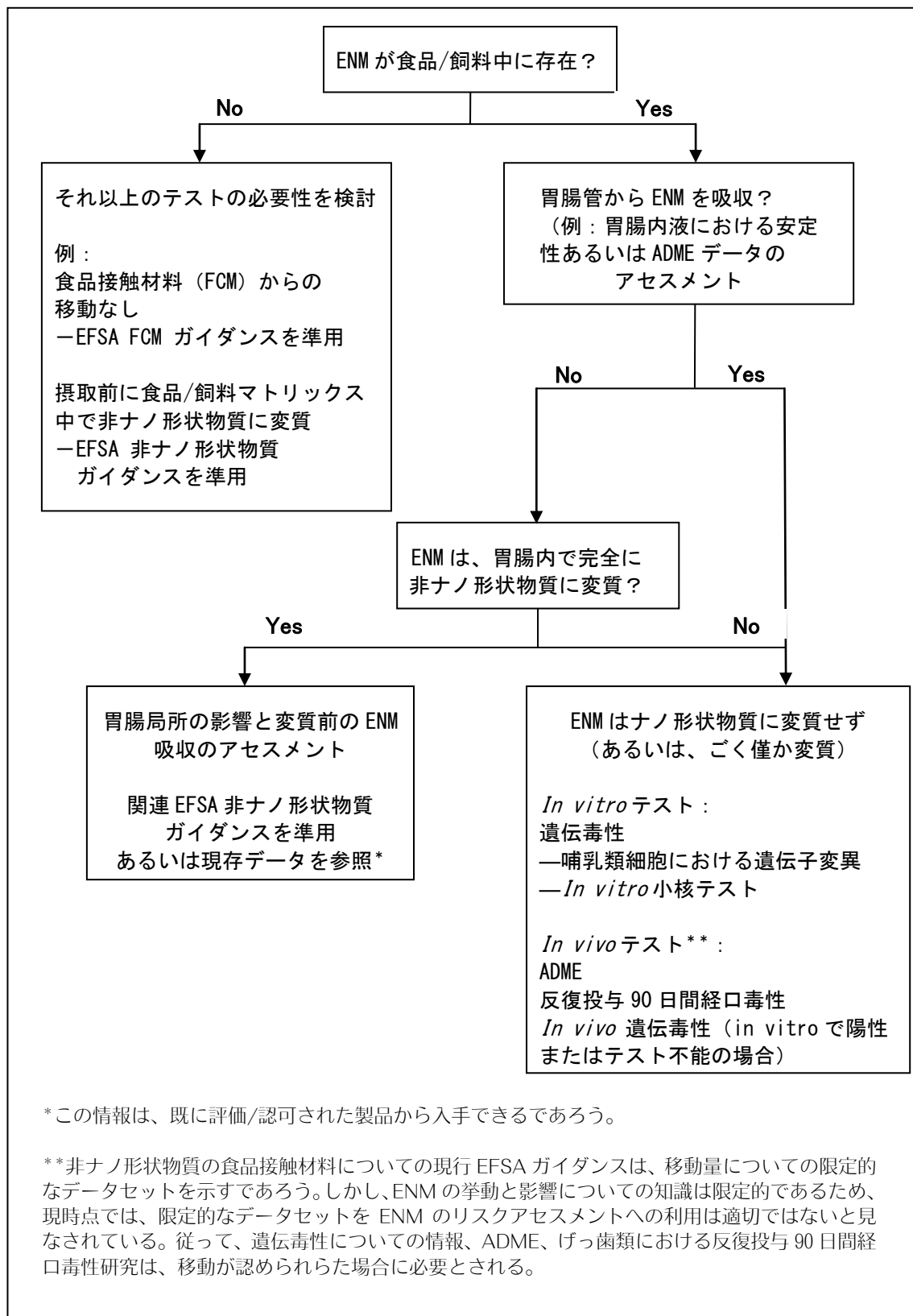


図3： 毒性テストの決定木（decision tree）

5.3.1 *In vitro* 消化研究

In vitro 消化研究は、ENMの溶解/分解を実証するために用いることができる。これらのケースでは、これ以上のテストはごく限定されるか、あるいは必要としない。これには種々のモデルが利用でき、その大多数は、ナノマテリアルの放出あるいは溶解を評価するようデザインされている (Oomen et al., 2002; Dressman et al., 1998; Krul et al., 2000; Brandon et al., 2006)。*In vitro* 消化モデルにおいては、ヒトの胃腸管の状態、すなわち温度・混合・通過時間・胆汁などその他の成分などがシュミレートされる。*In vitro* 消化モデルは、種々の経口消化化合物、例えば、土壌からの汚染物質類 (Oomen et al., 2003; Van de Wiele et al., 2007)、食品汚染物質 (Dall' Asta et al., 2010; Vansantvoort et al., 2005)、食品変異原物質 (Kurl et al., 2000)、食品成分 (Blanquet-Diot et al., 2009; Tydeman et al., 2010)、玩具中の汚染物質類 (Brandon et al., 2006)、医薬品類 (Dressman et al., 1998; Kostewicz et al., 2002; Blanquet et al., 2004) などの放出を決定するために適用される。これらのモデルのヒトの胃腸管へのシミュレーションの程度は、極めて単純なものから精緻なレベルまで変動が見られる。ナノマテリアルの溶解と分解について、*in vitro* モデルの差が結論にどの程度の差異をもたらすかについては、未だ研究されていない。

5.3.2 *In vitro* 遺伝毒性テスト

適当な組合せの *in vitro* 遺伝毒性テストの選定には、三つの重要な遺伝毒性の最終影響 (遺伝子変異、構造的および数的染色体異常) を検討すべきである。

細菌復帰変異原アッセイは、通常、遺伝子変異の検出に推奨され、また、科学界遺伝毒性テスト戦略も含まれる。しかし、ENMは細菌の細胞膜を貫通できず (Landsiedel et al., 2009)、細菌細胞は哺乳類細胞とは異なり、粒子類を貪食できないため、ENMの遺伝毒性の検出への細菌復帰変異原アッセイの利用は、適切であるとは見なされない。

下記の *in vitro* テストは、食品中への ENM の添加あるいは移動の場合に必要とされる。

1. 哺乳類細胞における遺伝子突然変異誘発テスト (コロニー・サイジングによるマウスリンパ腫 *tk* アッセイが望ましい) (OECD テストガイドライン 476)
2. *In vitro* 小核アッセイ (OECD テストガイドライン 487)

上記の中核セットからの逸脱を正当化する状況 (例えば、*in vitro* に添加できない、マトリックス中の ENM のテストが必要な場合) は存在するであろう。そのようなケースでは、科学的正当化は追加的なタイプの考察あるいは *in vivo* 研究を必要とするであろう。

う。特定のケース（例えば、活性酸素類・溶解性 ENM・極めて小さい ENM の誘発）においては、細菌復帰変異原アッセイテストは有益であろう。

もし、*in vitro* テストの少なくとも一つが陽性の結果を示す、あるいは *in vitro* で ENM のテストが不可能の場合には、*in vitro* および *in vivo* 遺伝毒性テストが必要である (5.4.5 項参照)。*In vitro* テストの双方が陰性の場合で、活性酸素類発生の徴候がある場合にも、*in vivo* 遺伝毒性テストを検討すべきである (5.4.5 項参照)。

5.3.3. その他の *in vitro* 研究

In vitro テストは、例えば、ENM の内部暴露、毒性、作用機序（例えば、細胞毒性・酸化ストレス・炎症や免疫毒性の可能性など）などの追加的考察をもたらすであろう。*In vivo* 経路による経口投与の取り込みの検討では、追加的なハザードの情報確認のため、いくつかの *in vitro* アプローチが適用されるであろう。

ENM の影響、例えば、胃腸管のバリアの正常機能、消化管の維持・免疫細胞・免疫反応を評価する炎症反応などの検討が実施される。

バリア正常機能/浸透性を評価する *in vitro* モデルには、例えば、一次ヒト食道上皮細胞、M-細胞（上皮内層全般に存在する変性腸嚢腫）、分化 CaCo-2 細胞（ヒト大腸ガン由来細胞）などのいくつかのタイプの細胞に基いている。*In vitro* モデルには検討される多数のパラメーターがあり、それらには LDH 漏出あるいは MTT (平均通過循環時間) 減少、経上皮電気抵抗、傍細胞流出、炎症メディエーター、活性酸素類の発生などが含まれる。

免疫細胞および免疫反応への全身影響を評価する *in vitro* モデルには、例えば、全血サイトカイン放出モデルが含まれる。細胞毒性、炎症および免疫パラメーターは、このモデルにおいて測定される。全血アッセイでは、免疫刺激（炎症プロセス・化膿性・初回免疫・免疫毒性反応・特異体質性反応など）と免疫反応の低下を含む免疫毒性反応の特性解明が可能である (Langezzal et al., 2002)。全血アッセイは、化膿性汚染（例えば、エンドトキシン）あるいは特異的な免疫細胞活性化 (Hoffmann et al., 2005; Schindler et al., 2006) の評価に信頼性が確立されている。このモデルについては、エンドトキシン作用と細胞免疫活性の区分を検討すべきである。また、全身的に利用できる ENM の *in vitro* モデルでは、補完物の活性化も検討されるであろう。しかし、全血アッセイは、消化器官関連の免疫反応についての代表性は持っていない。また、*in vitro* モデルには、単核細胞貪食システム (MPS) (主として、マクロファージで構成される) による取り

込みを介する血液/組織からの ENM の除去にも適用されるであろう。

もし、*in vitro* 研究において上皮の浸透性の増加が示された場合には、免疫細胞あるいは免疫反応への影響、適切な *in vivo* 研究 (5.4 項参照) あるいは *in vivo* 方法の免除についての科学的正当性を示すべきである。

5.4 *In vivo* 研究

In vivo テストは、有害反応の確認と用量-反応関係の決定のために実施される。また、*in vivo* テストは、ENM の毒性動態プロファイルを決定する ADME 情報を発生させるためにも不可欠で、必要な場合には、*in vitro* 遺伝毒性からの結果のフォローアップに用いられる。組織分布、組織への蓄積/持続および除去は、血漿レベルよりも重要と見なされている。特別の注意は、粒子類取り込みのキャパシテイの大きい典型的な標的臓器 (例えば、肝臓・脾臓・肺など) に対して払うべきである。

5.4.1. *In vivo* 研究における ENM の投与

In vivo 経口毒性研究におけるテスト物質の投与は、動物飼料や飲料水への追加、あるいは強制経口投与により行われる。ENM の場合には、構造/特性は食品/飼料のマトリックスによる影響を受け、模倣物質による類似状態は形成できず、テスト動物への ENM を含む丸ごとの食品/飼料マトリックスの投与を検討すべきである。

ENM の投与は理想的には飼料マトリックス中に均一にブレンドし、あるいは、飲料水や強制飼養媒体中に均等に分散させるべきである。媒体中の ENM の安定性や物理-化学的特性を決定すべきである (第3章参照)。ENM は水中または飼料媒体中で凝集する、あるいは、凝集粉末として既に飼料中で均一ではなく混合されて投与されるため、ENM の量の正確さについては限界があろう。

毒性テスト媒体における ENM の構造/特性と、食品/飼料マトリックス中の ENM の構造/特性との間の整合性 (同一物質であるか否かの) は、毒性テスト着手前にチェックし、可能な限り、すべての毒性学的テスト (すなわち、ADME・遺伝毒性・*in vivo* 研究、その他) に同一媒体を用いるのが望ましい。テスト物質の投与には、液体あるいは飼料マトリックス中での ENM の注意深いコントロールとダイナミックな特性解明が求められる。例えば、液体中の ENM は飲料水容器の壁面に吸着され、動物は飲めないであろう (すなわち、暴露なし)。食品マトリックスあるいは飲料水の何れかの投与媒体の相互作用の可能性については、*in vivo* 投与前に決定する必要がある。

上記の障害のいくつかを克服するため、ENM は十分に明確化された条件下で、拡散され、特性が解明された状態での投与を目的として、チューブによる強制飼養 (gavage) の適用が可能である。この投与方法は、かなり正確な量と十分な拡散特性の ENM を動物に与えることができる。しかし、強制経口投与法は、飼料を介した、長期間の低濃度の ENM の投与方法としての代表性はないように考えられる。この方法では、一定時刻に、胃腸内液と混合あるいは混合しない ENM の塊 (ボラス) が与えられ、単一形状で多量の ENM による吸収物質の局所での高濃度と増量が発生し、ENM が容易に結合する飼料成分との同時摂取の状態を欠いている。

ボラス強制経口投与による動態は、継続的な投与により誘発され、トータル暴露や ADME 研究における多様な投与の場合よりも大きいピーク濃度に関連し、さらに大きい影響の可能性とは相違し、これらの結果の反復 90 日間経口毒性研究のデザインへの適切なデザインへの利用により、この可能性を修正できる。現状での知識では、全般として、不確実性は ENM のボラス強制経口投与の利用により最小化されるであろう。ADME 研究におけるボラス投与の限界は、投与用量について得られた確実性の見地から容認され、有害影響の可能性の用量-反応関係が示されよう。

上記の経口投与方法の何れにおいても、胃の酸性環境の通過と、in vivo テストの理由の一つである胃腸においてキームス (訳者注)との混合について検討すべきである。また、時間依存性の溶解/分解の可能性ほか、凝集および蛋白質や生物学的分子類による ENM 表面の改良処理などによる物理-化学的変性の検討も不可欠である。

訳者注：キームス (chyme) とは、胃から十二指腸へ通過し、部分的に消化された食物の半流動体の塊りで、「びじゅく」ともいう。

5.4.2 ADME 研究

ナノマテリアルの特性は、非ナノ形状物質と比較して、変性で特異な毒性動態や組織分布を発生させる可能性があるため、吸収・分布・代謝・排泄 (ADME) の研究は、ENM の安全評価には不可欠である。しかし、ENM についての ADME 研究の困難さを過小評価してはならない。前項で討議した ENM のテスト動物への投与に含まれる問題に加えて、血液・組織・排泄物中の ENM の量の測定、体内での形状の確認も極めて困難であろう。ENM の表面変質、例えば、蛋白質やその他の生物学的分子類の粘着性の動態は、ADME に対して著しい影響を与えることができる。

ADME 研究においては、臓器・組織、その他の生物学的サンプル中での、ナノマテリ

アルの検出あるいはその元素組成についての測定システムの利用は不可欠である。その代替として、直接的（放射性同位元素）あるいは間接的（蛍光染料または放射能）な標識システムが用いられるであろう。ICP-MS(高周波誘導結合プラズマ質量分析法)は、化学元素の決定はできるが、ナノマテリアルそのものの存在は検出できない（すなわち、ナノ形状以外の物質も検出できない）、しかし、適当な分離テクニックと組み合わせることにより、この欠点は克服できる。放射性同位元素は、ある種の金属 ENM に用いられるであろう（Geiser & Kreyling, 2010）。蛍光標識あるいは放射性標識化学物質類は、ENM から標識が放出される不利な点がある。その場合には、標識の分布は決定できるが、ENM については確実ではない（Geiser & Kreyling, 2010）。標識の選定および検出テクニックは、ENM の組成、例えば、金属ナノマテリアルあるいは脂質様ナノマテリアルなどに基くべきである。さらに、ENM の特性や活性に対する標識システムのインパクトについても検討すべきである。

多くのタイプの ENM は、それらの複雑な組成により、固有の多分散性（大サイズ分散）を示す。体内への ENM の吸収に考慮して、包括的な質量バランス研究が示唆されている。反復投与は ENM の毒性動態を変化させる可能性があるため、この問題に対応するためには、適切な研究デザインを選定すべきである。ENM は、単核細胞貪食システム（MPS）、特に、肝臓と脾臓において取り込まれるため、ENM の生物学的持続性に依存する毒性動態研究の拡大が必要であろう。この毒性動態研究は、臓器および組織中の ENM の蓄積と、これらの組織からのクリアランスのタイミングと程度についての情報を示すであろう。また、ENM の消化管壁内における滞留も、特に、上皮細胞内と免疫に有用な Peyer' s patches(訳者注 1)内の M 細胞(訳者注 2)との識別における重要な決定因子である。

訳者注 1:Peyer' s patch(17 世紀のスイスの解剖学者 Peyer により発見された板(patch)状の、消化管内のリンパ組織で、我々が食品などにより取り込む多量の細菌の流入と戦うために存在している。

訳者注 2 : M 細胞(M cell)は小襞細胞（microfold cell）ともいわれ、パイエル板（注）を覆う濾胞被蓋上皮の吸収上皮細胞間に散在する細胞。M 細胞においては、細胞やウイルスの取り込みが観察されていることから、M 細胞は消化管の免疫に関与していると考えられる。

注：パイエル板は、空回腸や結腸壁などで腸間膜の反対側に位置する哺乳類固有の免疫器官の一つ。

追加的な研究として、多量のマクロファージとその他の免疫能力のある細胞類を有する MPS 器官内において、ENM の位置確認の検討が実施できる。胃腸管においては Peyer' s

S

patch や腸間膜リンパ節などのような GALT(消化管関連リンパ組織)は、ENM の蓄積と免疫反応への影響の可能性にとって重要である。ENM の生物学的持続性は、長期毒性と関連するであろう。

化学物質についての毒性動態の研究デザインは、OECD テストガイドライン 417 に述べられている。このガイドラインは、ADSM 研究実施についての、多様な測定と最終結果についての一般的な方法論を述べている。

実験パラメーターの選定と、高毒性用量の投与を避けるため、用量範囲についてのパイロット・スタディの採用が推奨されている。パイロット・スタディの用量は、排泄物中、適切な場合には、血液や血漿中の ENM の同定に十分でなければならない。血液サンプルは、ENM の投与後一定の間隔（最初は 24 時間以上）で採取すべきである。さらに、消化管上皮と、リスクが予想される肝臓や脾臓などの二次臓器における ENM の滞留を検討すべきである。

望ましい用量の送達を確認するため、経口強制法による投与が検討される。しかし、この方法には、消化管内容物との相互作用が限定されるという不利な点がある（5.4.1 項参照）。

主要 ADME 研究における情報は、他の毒性研究の用量設定を援助するため、最少で 2 種類の用量レベルを用いるべきである（OECD テストガイドライン 417）。ENM の反復投与は、蓄積についての情報を示すであろう。

5.4.3. *In vivo* 反復投与 90 日間経口毒性研究

ENM の摂取については、最低の要件は、「げっ歯類における反復投与 90 日間経口毒性研究」（OECD テストガイドライン 408）で、これは、その後、いくつかの追加的パラメーターの評価が追加されて「げっ歯類における反復投与 28 日間経口毒性研究」（OECD テストガイドライン 407）に改訂されている。追加的なパラメーターは、内分泌系の発現影響（例えば、甲状腺ホルモンの測定、内分泌系関連の影響の指標についての、肉眼的解剖検査および組織病理学的検索を重視している（オプションとして、発情周期の評価）。反復投与研究においては、心臓血管系および炎症のパラメーターのほか、単核細胞貪食システム（MPS）が特に注目され、全身への移動の後、ENM の大部分は MPS 組織内で終わる（end up）ように見える。反復投与 90 日間経口毒性研究は、ベンチマーク用量信頼限界下限（BMDL）あるいは無有害影響量（NOAEL）の確認に用い得る。

ラボラトリー動物から得られた毒性データは、標的動物の飼料への投与の予測に、直接適用できないことに留意すべきで、例えば、標的動物についての、例えばトレランス（耐性）テストなどの追加が必要であろう。

5.4.4. その他の *in vivo* 毒性レス

非ナノ形状物質（すなわち、同一化学物質のバルク状、分子状あるいはイオン状の）についての適切な毒性および ADME データが利用できる場合には、げっ歯類における反復投与 90 日間経口毒性研究は、ENM についての遺伝毒性と ADME 研究と共に、ENM の長期毒性テストが必要であるか否かの決定に、比較ベースを示すことができる。もし、臓器および組織内の ENM(または、分解/代謝産物)の毒性影響あるいは蓄積の証拠がある場合には、累進性の毒性影響あるいは遅延性毒性を検出し、BMDL および NOAEL を確認するために、慢性毒性テストの実施は適切であろう。

反復投与 90 日間経口毒性研究は、生殖毒性の情報の供与のみに限定され、発生毒性についての情報は得られない。それは、生殖器官についての情報や、発情周期の評価を示すが、子宮内暴露からの全生殖サイクル、性的成熟から受胎、妊娠、出生前後の発育などは評価されない。従って、ENM について、生殖および発生毒性についてのテストが必要であるか否かの決定には、非ナノ形状の相対物質と、比較可能な ADME 情報について入手し得る毒性データの検討が必要である。ENM の発生毒性についての研究が必要か否かの決定についても、その物質がナノ形状の場合には、ナノに特異的な特性により胎盤を通過するか否か、挙動は非ナノ形状物質と異なるのかの検討も必要である。ADME 研究には、通常の場合、妊娠動物は含まれないため、そのような情報は容易には得られないであろう。化学物質の生殖および発生についての研究デザインは、OECD テストガイドライン 414, 415, 416 に記載されている。慢性毒性および発ガン性研究は、OECD テストガイドライン 453 に収載されている。

5.4.5. *In vivo* 遺伝毒性テスト

少なくとも1種類の *in vitro* テストが遺伝毒性を示した場合、または、*in vitro* での ENM のテストが不可能な際には、陽性の *in vitro* 知見により適切に実証でき、*in vivo* 状況に関連を示さない限り、通常は、*in vivo* テストによるフォローアップが求められる (Eastmond et al., 2009)。必要なフォローアップの開始前に、その物質の *in vitro* のテスト結果と、化学的活性（接触部位の影響における）、生物学的利用能、代謝、毒性動態、標的臓器の特異性、その他の関連データをレビューすべきである。

In vivo 遺伝毒性テストは、*in vitro* および適当な標的臓器で陽性と確認された遺伝毒性発現影響との関連が不可欠である。陰性の結果の評価には、テストそのもの、あるいは他の毒性動態、または反復投与毒性研究の何れかからの証拠、テスト物質に暴露された標的組織あるいはその代謝産物が不可欠である。

適切な *in vivo* 遺伝毒性テストの選択には、すべての利用可能の情報に基づくエキスパートの判断が必要で、ケースバイケースで適用される。下記の *in vivo* テストの何れかは適当であろう。

- *In vivo* 小核テスト (OECD テストガイドライン 474)
- *In vivo* コメット・アッセイ (現在は、OECD テストガイドラインではないが、国際的に合意されたプロトコールは入手可能、例えば、<http://cometassay.com> 参照。)
- 遺伝子誘導げっ歯類遺伝子突然変異アッセイ (ドラフト OECD テストガイドライン)

双方の *in vitro* テストが陰性ではあるが、活性酸素類発生の徴候がある場合や、*in vitro* の ENM テストが不可能のケースでは、ADME に含まれ、作用機序についての情報を示す可能性のある *in vivo* コメット・アッセイあるいは反復投与 90 日間経口毒性研究が推奨される (Karlsson, 2010)。

6. 暴露アセスメント

基本的には、ENM の暴露アセスメント (食品はおよび飼料経由の) 原則は、非ナノ形状物質の暴露アセスメントと同一である (Kores et al., 2002; EFSA, 2006, 2009d)。食品/飼料サンプリングおよび複合物サンプル内での変動、サンプル間の濃度の変動は、マイクロ/マクロスケールあるいは溶解化学物質の暴露アセスメントの場合と異ならない。入手可能な消費データに基づいて、種々の集団グループにおける ENM 食品/飼料の平均と高度の取り込みが推定されている。信頼性の高い数値範囲の決定においては、確率方法はポイント予測よりも有用であろう。可能ならば、高度暴露が予想される集団の特定部分を確認し、リスクアセスメントで検討すべきである。食品サプリメントの消費 (量と頻度) についての情報は限定的である。輸入および生産量についてのデータは、暴露アセスメントについて追加的な情報をもたらす。暴露アセスメントにおいて行われたすべての予測は報告すべきである。

暴露アセスメントの中心部分は、消費された食品あるいは飼料中に存在する ENM の量の測定と特性解明である。大多数のケースにおいて、ENM 測定の出発点は、現在、食品/飼料に添加され、あるいは接触する物質についての情報に依存している。添加された ENM の当初の特性は評価が可能で、暴露アセスメントにおける予測として用いられるが、現在では、暴露アセスメントの不確実性が増加しており、食品あるいは飼料マトリックス中の ENM について、現場での経常的測定は不可能である（第3章参照）。

食品/飼料の ENM の構造は、食品/飼料の製造工程あるいは保存の期間中に、食品/飼料マトリックス中に存在する蛋白質類・脂質類・その他の物質との相互作用により変化するであろう。従って、ENM の分析は食品チェーンの初期の段階で行うべきで、加工や保存の影響および ENM の安定性などについては、暴露アセスメントにおいて検討すべきである。また、マトリックスの消化あるいは分解の他の原因への影響について、ENM の特性の検討が必要である。

飼料への ENM の添加については、関連する動物の組織や製品の測定により測定し、ヒトの暴露への移行を検討すべきである（EFSA, 2008）。

暴露データがなく、食品/飼料マトリックス中のナノ形状物質が測定できない場合においては、ENM の構造/特性は決定されないため、毒性研究で用いられる ENM の構造/特性との関連付けは困難であるが、ナノ形状物質の存在・摂取・吸収について、すべての添加 ENM について推定すべきである。このケースでは、毒性テストは、食品/飼料マトリックス中への投与により実施できる。

7. リスクの特性解明

リスクの特性解明のステップは、ハザード確認とハザードの特性解明からのすべての情報と、暴露アセスメントと他の ENM または非ナノ形状物質（すなわち、バルク・分子・イオンなどの形状）からの情報が結合するポイントである。最終的なリスクの特性解明は、アセスメントを通じた反復プロセスが不可欠であるが、リスクマネージャーに対する、十分な定性（qualitative）、可能ならば定量（quantitative）の情報を具備したガイダンスに帰着すべきである。リスクの特性解明からのアウトプットは、信頼性の高いアセスメントと、アセスメントに関する不確実性の下におけるパラメーターを併有し、その意図的使用における ENM の安全の包括的なアセスメントである。それは、リスクアセスメントにおいて、どのような予測がなされたのかと、その特性と不確実性のマグニチュードについて、明確に説明すべきである。

リスクアセスメントに必要な情報の派生についてのいくつかのアプローチは、この ENM のガイダンスに述べられている。情報が評価されるすべての段階において、リスクアセスメントに着手できるか否かについての決定を下すために、証拠の重要性評価プロセス (weight-of-evidence process) を適用すべきである。重要性評価のアプローチにおいては、すべての入手可能な情報源とデータのタイプに配慮される。夫々の評価ステップにおいて、決定は特別な段階において入手できる情報の量と質とに依存し、テストの信頼性確認はデータの派生に用いられた。評価された ENM の確認 (同定) / 特性解明は、派生したデータは ENM により得られ、食品/飼料に利用されることを実証するため不可欠である。もし、入手した情報全体が、特定の段階に相当であれば、その際にはリスクアセスメントは実施でき、それ以上のテストは要求されないであろう。しかし、これが可能ではないと見なされた場合には、不十分な推定とされ、それ以上のテストに着手しなければならない。

8. 不確実性の分析

科学委員会は、2009年、データソースの確認、データの採用/不採用についてのクライテリア、データの秘密性、予測と不確実性において適用される一般原則を扱った科学見解を採択した (EFSA, 2009d)。この見解は、ENM においても対応すべきリスクアセスメントにおける不確実性を如何に扱うかについて、多くの一般的勧告を行った。また、科学委員会は、ENM にも適用可能な、リスクアセスメントにおける不確実性を如何に扱うかについての実際のアプローチを含む、食物暴露アセスメントにおける不確実性に関連するガイダンスを採択した (EFSA, 2006)。リスクと関連の不確実性について表現する専門用語は、正確で理解し易く、できるだけ透明にすべきである。種々のリスクアセスメント段階に固有のすべての不確実性は適切に解明し定量すべきである。生物学的パラメーターにおける自然的变化 (集団内における感受性の変化) を反映する種々のタイプの不確実性と、生物種間の反応における変化とは区別すべきである。実験データにおける不確実性の予測には、適切な統計学的分析を用いるべきである。一方、予測における不確実性の定量 (例えば、動物からヒト、ラボラトリー研究から複雑な系への外挿など) は、より困難であろうが、解明のため討議すべきである。

8.1 ENM の物理-化学的特性解明における不確実性

食品/飼料中および生物学的マトリックス中における ENM の特性解明や検出および測定は困難であろう。現時点においては、すべての種々な ENM の構造/特性の物理-化学的特性解明について、利用可能な標準的方法は存在しない点への留意は重要である。

しかし、適当な方法の慎重な選定と利用、適切に処理された結果は、ENMの同定と特性解明の目的に対して十分なデータをもたらすであろう。

利用する特性解明方法の再現性と正確性は、標的 ENM、サンプル調製手法、適切な標準に対する分析機器の補正などに依存するであろう。種々の測定テクニックにより得られた結果は、測定に適用された物理的原理の違い（例えば、サイズ測定における差異）により異なるであろう（Domingo et al., 2009）。また、差異は ENM の凝集/凝結、サンプルの取扱い/調製手法、種々の手法についての希釈あるいは拡散などのその他のファクターからも発生するであろう。従って、特定の方法からの結果の再現性を可能にするため、また、種々の分析方法の結果の重要な比較を可能にするため、テスト間のサンプル調製法に一貫性を持たせることが極めて重要である。種々の方法から得られた異なる結果は、ある物質をナノマテリアルと見なすか否かのアセスメントと決定に影響を及ぼす。

現在、バックグラウンドの ENM を、食品/飼料中のナノあるいは非ナノ形状の同一材料/物質と区別することは困難である。適切な方法（例えば、安定的なアイソトープ分析、元素指紋鑑定法など）は、バックグラウンドレベルの地質、生体、人工起源と同一あるいは類似物質から、意図的に添加した ENM を区別するために適用できる。

食品/飼料中の ENM の特性解明は、分析方法の利用が、現在、限定されているため不十分であろう。ENM の食品/飼料マトリックスとの相互作用は、食品模擬物質（水・オイル・エタノール・酢酸、標的食品の特性成分を代表する模擬物質、例えば、炭水化物リッチの食品における澱粉）を用いて測定されるであろう。しかし、模擬物質の利用は、実際の食品中における ENM の特性を十分に反映していないため、それにより得られた結果からの外挿は、不確実性を生じさせる。方法の開発と利用により、ENM の特性解明は、食品模擬物質から実際の食品/飼料マトリックスにシフトが可能になり、改善できる。

8.2. ENM のハザード特性解明における不確実性

ENM の毒性動態および毒性学に関連し、ENM テストの最適な方法を含む限定的な情報は入手できる。現存の毒性テスト方法（例えば、OECD テストガイドライン）には、方法の改善（例えば、サンプルの調製や特性解明）が必要であろう。特異的な不確実性は、現在、標準テストプロトコルやテスト動物に適用されている ENM テストの経験不に由来している。また、ENM により生じる追加的な毒性影響は、現行の標準プロトコルでは容易には検出できない。経常的には対応していない追加的な発現影響（例えば、心臓血管系や免疫機能への発現影響など）は、従来の発現影響に加えて検討する必要がある。

ある。現時点では、ENM のハザードアセスメントに用いられる信頼性の高い *in vitro* 法は存在しない。

ENM の表面の分子レベルにおいて、生物学的液体および細胞膜や細胞区分との間で、どのように、そしてどの程度の生化学反応が起るか、例えば、ENM 表面積のどの、そしていくつの原子/分子クラスターが、どのような種類の生化学的あるいは、電子交換その他のような触媒的反応を発生させるかについては、未だ十分には理解されていない。それらの知識の獲得により、特定の ENM の反応性についてより良く理解され、潜在的な影響の予測が可能となるであろう。

食品成分中のアレルギーテストの方法は、現時点では入手できない。ENM について、現存アレルギー蛋白質類との比較は適切であるとは見えない。しかし、ENM と密着/結合する食品マトリックスの蛋白質類の同定は、アレルギー誘発促進についての ENM のポテンシャルについてある程度の考察をもたらすであろう。また、ポスト・マーケティング・モニタリングは、有用な情報を示すであろう。

将来における ENM の研究から出現する情報は、テストプロトコールにおけるその他の修正を指摘するであろう。

8.3. 暴露アセスメントにおける不確実性

テストシステムに存在する ENM のテスト物質の形状の特性解明が不可能で、食品/飼料中に存在する物質との比較ができない場合には、不確実性は増加し、その状況に依存するため、そのリスクの特性解明は、リスクは過小あるいは過大に評価する。しかし、これらの不確実性は、関連の食品/飼料マトリックス中の ENM の *in vivo* テストにより低減できる。

8.4. リスクの特性解明における不確実性

食品/飼料中の、通常の非ナノ形状物質においては、リスクアセスメントは定量的であることが望ましいが、現在では、ある状況下では、定性的 ENM リスクアセスメントのみが可能である。

リスクアセスメントに不可欠なデータの欠落は明確に示し、現存データの質を報告すべきである。不可欠データが欠落する場合には、リスクアセッサはリスクアセスメント

についての結論を下すことはできないであろう。最終リスクアセスメントの決定に際しては、入手情報をどのように評価したかについて、アセスメントから明確にすべきである。

従来のリスクアセスメント同様に、ハザードの特性解明から導き出された NOAELs (無有害影響量) あるいは BMDLs (ベンチマーク用量信頼限界下限) は、不確実係数の適用により、取り込まれるヒトの食品と動物の飼料の安全の推定に用いることができる。これらの不確実性係数は、生物種相互の間と同一生物種の内部において、毒性動態と毒性ダイナミックスの差異を生じさせる。データを検討した結果、修正を要する徴候が示されない場合には、従来のデフォルト不確実性係数は、生物種間で 10、生物種内で 10 を適用すべきである。

結論

ENM に対するリスクアセスメント・パラダイム (暴露アセスメントに続くハザードの確認と特性解明とリスクの特性解明) の適用は適切である。従って、種々のステップについて関連するデータと情報は、リスクアセスメントを実施するため、リスクアセッサは利用すべきである。

適切な ENM の特性解明は、その同一性と、食品/飼料中とテスト条件下の物理-化学的特性の実証に不可欠である。物理-化学的特性は、種々の環境中で変化し、ENM の特性解明は、製造 (初期の新鮮な状態) 段階・食品/飼料製品で使用する段階・食品/飼料マトリックス中での存在段階・毒性テストにおいて用いられる段階・生物学的液体や組織中での存在段階など、五つの段階において決定すべきである。

ENM のリスクは、その化学的成分、物理-化学的特性、組織との相互作用、可能性のある暴露レベルにより決定される。その物理-化学的特性の解明には、ENM の同定を必要とし、ENM のガイダンスが適切であるか否かにより決定される。ENM ガイダンスが適切であれば、テストからの結果は、暴露アセスメントと組み合わせられた、ハザードアセスメントの情報を与え、リスクの特性解明のベースを形成するであろう。吸収・分布・代謝・排泄 (ADME) パラメーターは、ENM の化学成分のほか、その物理-化学的特性 (例えば、サイズ・形状・溶解性・表面電荷・表面反応性など) の双方により影響を受けるであろう。

ナノマテリアルの詳細なリスクアセスメントを開始する前に、計画されている用途から、暴露シナリオの概要を予測すべきである。これらの暴露シナリオは、リスクアセスマン

トにおいて必要なハザードの特性解明の範囲の決定に寄与し、暴露アセスメントのパラメーターを示すであろう。

種々の毒性テストアプローチには六つのケースの概要が示されている。

1) ENM の利用において、ENM あるいはその分解/溶解産物が示されないという証拠が確認された場合には、何らかの追加的なテストは必要ない。2)食品/飼料マトリックス中で、ENM が摂取前に非ナノ形状物質に、完全に変質していると判断された場合には、非ナノ形状物質の特異な意図的利用についての EFSA ガイダンスを適用すべきである。3) ENM が消化管中で完全に溶解/分解し、ENM の吸収がないと実証される場合には、そのハザード確認とハザードの特性解明は、非ナノ形状物質のデータへの依存が可能である(入手可能の際は)。4) 同一物質の非ナノ形状物質についての情報が入手でき、ENM の一部あるいは全部が食品/飼料マトリックス中に残留している場合には、非ナノ形状物質の ADME と毒性についての情報と、ENM の ADME と反復投与 90 日間経口毒性研究と遺伝毒性情報の比較に基づくテストアプローチが勧告される。5)非ナノ形状物質についての情報が入手できず、ENM の一部あるいは全部が、食品/飼料と消化管液体中に残留している場合には、ナノ特性についての現在の見解に考慮した修正により、関連の EFSA ガイダンスに準拠すべきである。

6) ハザードを確認し、ハザードの特性解明のため、用量-反応データの取得のため、ENM についての *in vitro* および *in vivo* 研究を実施すべきである。非ナノ形状物質に用いられる一部のテスト方法および標準テストプロトコールは、ENM のテストとしては、必ずしも適切あるいは最適ではないであろう。科学界は、現在、これらの問題に対応するため努力中である。

ENM の暴露アセスメントの出発点である量の測定には、現在は、食品/飼料に添加したあるいは接触する物質の情報に依存せざるを得ない。暴露アセスメントにおいては、添加された ENM の当初の特性は予測として用いることができるが、食品/飼料マトリックス中に存在する ENM の量の測定が望ましい。現在、現場における、ENM の恒常的な測定は不可能であることが、暴露アセスメントにおける不確実性を増加させている。暴露データがなく、食品/飼料マトリックス中でのナノ形状物質の測定が不可能の場合には、毒性研究に用いられた ENM の構造/特性は決定されず、関連付けは困難であるが、すべての添加された ENM、ナノ形状物質として摂取され吸収された ENM を想定すべきである。

現在の不確実性は、すべての可能な利用・側面・特性を網羅する、適切な信頼性の高い

テスト方法の欠落による ENM の同定・特性解明・検出に関連している。同様に、現時点では、ENM に対する標準的な生物学的および毒性学的テスト方法の適用性に、多くの不確実性が存在している。これらの理由から、この ENM ガイダンスは、経験と取得した知識に基き、最新化を必要とするであろう。この分野は急速に進展しつつありことが認識されるため、本ガイダンス文書は適切に改訂されるであろう。

附属資料 A 現在使用されている特性解明方法

下表の特性解明の方法は、光散乱・顕微鏡・分光計・クロマトグラフィー、電気泳動・遠心分離・表面特性評価と、それらの種々の変法と組合せと、その他のサイズ分離方法に基いている。ENM の適切な特性解明は、種々の特性を測定するため、一般的には、複数の方法を必要とし、採用したプロトコールの詳細な記述により、十分な根拠を示すべきである (3.2 項参照)。

表：特性解明方法の例

パラメーター	現在、利用できる方法 ^a
化学組成/同定	元素分析：OES, AAS, XPS, EDX, NMR、特殊な ICP-MS, TXFX その他における質量分析法 (MS) 分子組成：セットのイオン化テクニック (例えば、MALDI,ESI) を用い、分離方法 (例えば、HPLC, GC, CE)、NMR、FT-IR と組み合わせた質量分析 (ToF, QqQ) 殻 (管体) /核 (コア) 組成 (封入・ミセルの)：上記の適当な方法、粒子の崩壊後、適当な方法 (例えば、HPLC, SEC, CE, HDC その他) による成分の分離
物理的形状と形態	顕微鏡法 (TEM, SEM, STXM, AFM)、X線回析
粒子 (一次/二次) サイズ	顕微鏡法 ^b (TEM, SEM, STEM, AFM, STXM) 分離方法：フロー分離、クロマトグラフィー法、例えば、FFF, HDC, SEC, RP/NP-HPLC; DMA/IMS (超)遠心分離法 分光法—例えば、XRD(結晶サイズ、微結晶サイズ) 光 (レーザー) 散乱法 (例えば、DLS, MALS, SLS, PCCS, NTA)
結晶性フェーズ	XRD
粒子濃度	主として、光散乱法 ^c (拡散の場合)。粒子濃度 (純品乾燥粉末において) もその物質の粒子サイズ質量濃度や比重から算出。
質量濃度と比重	化学組成のパラメーターで挙げたセットの方法、例えば分光法 (ICP-MS)
比表面積 ^d	BET 法

表面化学	上記の中での適当な化学特性解明法
表面電荷	電気泳動。例えば、CE、LDE (レーザードプラー電気泳動)°。
酸化還元ポテンシャル	電圧法
溶解/溶解度 [†]	水溶性の標準テスト (例えば、OECD テストガイドライン 105) および logKow (OECD テストガイドライン 107, 117) の採用可。溶解レート常数。
粘性	OECD テストガイドライン 114 のような方法。
流動密度	DIN ISO 697, EN/ISO 60
粉っぽさ(Dustiness)	EN 15051: 2006, DIN 33897-2
化学活性/ 触媒作用	化学的, 生化学的/触媒作用の動態測定
光触媒作用	化学的, 生化学的/触媒作用の動態測定

- a) 現在、利用し得る方法の多くは、ENM についての信頼性の確認はなく、複雑なマトリックスについての確実性は無い。従って、特定のパラメーターの測定について、選択方法の推奨はできない。しかし、十分に認識された主流の分析方法の採用は、ENM の同定と特性解明についての適切なデータをもたらすであろう。この目的のために、一部のケースにおいては、十分に信頼し得るデータを取得するには、1 ッ種類以上の方法の利用が必要であろう (第3章参照)。
- b) 電子顕微鏡法 ((SEM (走査型)、TEM (透過型)) は、ナノ粒子類の可視化のほか、それらのサイズ・凝集状態・構造・形状その他の測定にも有用である。TEM は、電子通過のために極めて薄い検体を必要とし、さらに、真空状態を必要とするため、液体サンプルは扱えない。この点を克服するため、氷結サンプルを扱える低温のTEM が使用されている。また、液体サンプル中のナノ粒子類の特性解明を可能にするため、特殊なデザインのカプセル中の液体サンプルが扱える湿式 (Wet-) SEM(Tiede et al., 2008)も報告されている。また、AFM(原子間力顕微鏡)のような、試料をスキャンする顕微鏡のツールも液体サンプルの検査に用いられる。顕微鏡法の多量の使用は、画像のマニュアル処理に時間がかかるため、現在では限定されている。
- c) 光散乱法は、粒子類のサイズ・分布のほか、凝集や凝結の測定に、一般的の利用さ

- れている。しかし、光散乱法の正確性は、サンプル調製方法と単一分散に依存しており、ENMの最終産物以外の生 (raw) マテリアルの場合には限定されるであろう。
- d) 比表面積測定は、Kreyling ら (2010) により報告された方法の比体積表面積 (Volume Specific Surface Area : VSSA) 算定に用い得る。
 - e) ENMのゼータ電位 (訳者注) は、電気泳動の移動度から算出される。この方法は、異なる溶液と pH/イオン状態におけるテストの差異を回避するため、水中での測定が望ましい。

訳者注：ゼータ電位

- f) 溶解/溶解度：不溶性 ENM が液体形状に導入された「分散」 (dispersion) では、液体と ENM が共存している。真の (true) 溶液では、物質は溶解している (OECD ENV/CHEM/NANO82009) 7/Rev3参照)
- g) ENMが触媒特性を有している場合には、たとえ、少量の触媒活性のENMであって、より大きな生物学的反応を永続させる酸化還元あるいはその他の反応に触媒作用を及ぼすであろう。このように、通常の生化学反応と比較すると、基質を使い果たし、ENMの反応は触媒作用の継続が中心的存在となるであろう。

特性説明方法の表に用いられた略語

AAS - 原子吸光分光法

AEM - 分析電子顕微鏡 (分光計などの分析ツールと組成分析の電子顕微鏡の組合せ)

AFM - 原子間力顕微鏡

BET - Brunauer Emmett Teller 法 (窒素吸収に基づく)

CE - キャピラリー (毛細管) 電気泳動

CFM - 化学力顕微鏡 (最近開発された、物質の化学特性が確認可能の試料スキャン顕微鏡、Tiede et al., 2008)

DLS - 動的光散乱法

DMA ー 示差移動度分析

EDX ー エネルギー分散型X線分光法

FFF ー 電界流動分別

FT-IR ー フーリエ変換赤外線分光法

GC-MS ー ガスクロマトグラフー質量分析計

HDC ー 流体力学クロマトグラフ

HPLC ー 高速液体クロマトグラフ

ICP-MS ー 高周波誘導結合プラズマ質量分析計

IMS ー イオン移動度分光法

LDE ー レーザー・ドプラー電気泳動

MALDI-ToF-MS ー マトリックス介在レーザー脱離/イオン化ー経過時間質量分析計

MALS ー マイクロ波吸収線スペクトル

NMR ー 核磁気共鳴分光法

NTA ー ナノ秒過度吸収

OES ー 発光分光法

PCCS ー 光交差相関分光法

QqQ ー 三・四極質量分光法

SAXS ー 狭角度X線散乱法

SEC - サイズ排他クロマトグラフィー

SedFFF - 沈降フィールドフロー分別

SEM - 走査型電子顕微鏡

SLS - 静的光散乱顕微鏡

SMPS - 走査移動度粒子分粒

SPMS - 一粒子質量分光法

STEM - 走査透過型電子顕微鏡

STM - 走査型トンネル顕微鏡

STXM - 走査透過型X線顕微鏡

TEM - 透過型電子顕微鏡

XPS - X線光電子分光法

XRD - X線回折

用語解説および略語

専門用語

説明

ADME	吸収・分布・代謝・排出（排泄）
凝集 Agglomerate	ファンデルワールス力・一部の静電力・表面張力などの弱い力により、互いに団結する粒子のグループ。
凝結 Aggregate	共有結合あるいは金属化学結合に関連する強い力により、互いに団結する粒子のグループ。
分散 Dispersion	粒子が異なる組成で、継続的なフェーズで分散する状態。
フラーレン	フラーレンは、全部が炭素で構成された分子で、空洞の球体・楕円・管を形成する。球状のフラーレンはバッキーボールとも呼ばれ、60個の炭素原子から構成される。
ENM ガイダンス	「食品および飼料連鎖におけるナノ科学および ナノテクノロジー利用のリスクアセスメントについての EFSA(欧州食品安全行政庁)ガイダンス」の略称。
高アスペクト比 HARN	ある形状のアスペクト比は、長い寸法と短い寸法との比である。
ナノマテリアル ナノ(HARN)	の長さは、その幅よりもかなり長い。HARN の例には、カーボンチューブ(CNT)や金属ナノワイアが含まれる。
ロータス効果 Lotus effect	「セルフクリーニング」効果を示す、高度に疎水性表面の特性。(P.14 訳者注参照)
加工ナノマテリアル (ISO)	特異な特性および特殊な組成を持つように、商業目的で意図的に製造されたナノマテリアル。
ナノマテリアル (ISO)	ナノスケールの外部次元・内部構造・表面構造を有する物質。
ナノ特性 Nanoproperties	その例には（これのみではないが）、より大きな非ナノ形状物質には認められないナノスケールのサイズ、広い表面積、高い表面活性、量子効果、生物学的膜を移動する可能性が含まれる。

ナノスケール Nanoscale	一般的には、1–100 nmのサイズを示すと見なされている（例えば（Lövenstam, 2010; SCENIHR 2010）。ナノスケールのメートル表記では、1–999 nmの範囲である。1 nm以下のサイズ範囲はピコメートル、999 nm以上はマイクロメートルとして測定される。
ナノサイエンス (ISO)	ナノスケールの物質の研究・発見・理解（サイズおよび構造依存の特性および現象で、個々の原子・分子・バルク物質とは区別される）。
ナノテクノロジー (ISO)	サイズおよび構造依存の特性と現象を利用するために、ナノスケールの物質を操作しコントロールする科学知識の利用で、個々の原子・分子・バルク物質とは区別される。
非ナノ形状物質 Non-nanoform	本ガイダンスにおいては、イオン状・分子状（すなわち、一般的には、ナノ形状物質より小さい）・バルク形状（すなわち、凝結ナノマテリアルを含むよりも、サイズが大きい）のいずれかを示す。
流動密度 Pour density	ペレット化におけるコンパクション（締固め）の程度に関数。
溶解性 Solubility	溶液中および溶剤中の溶質の均質溶液に溶解する物質の特性。
溶液 Solution	溶質が固体として存在せず、完全に溶解している溶液。