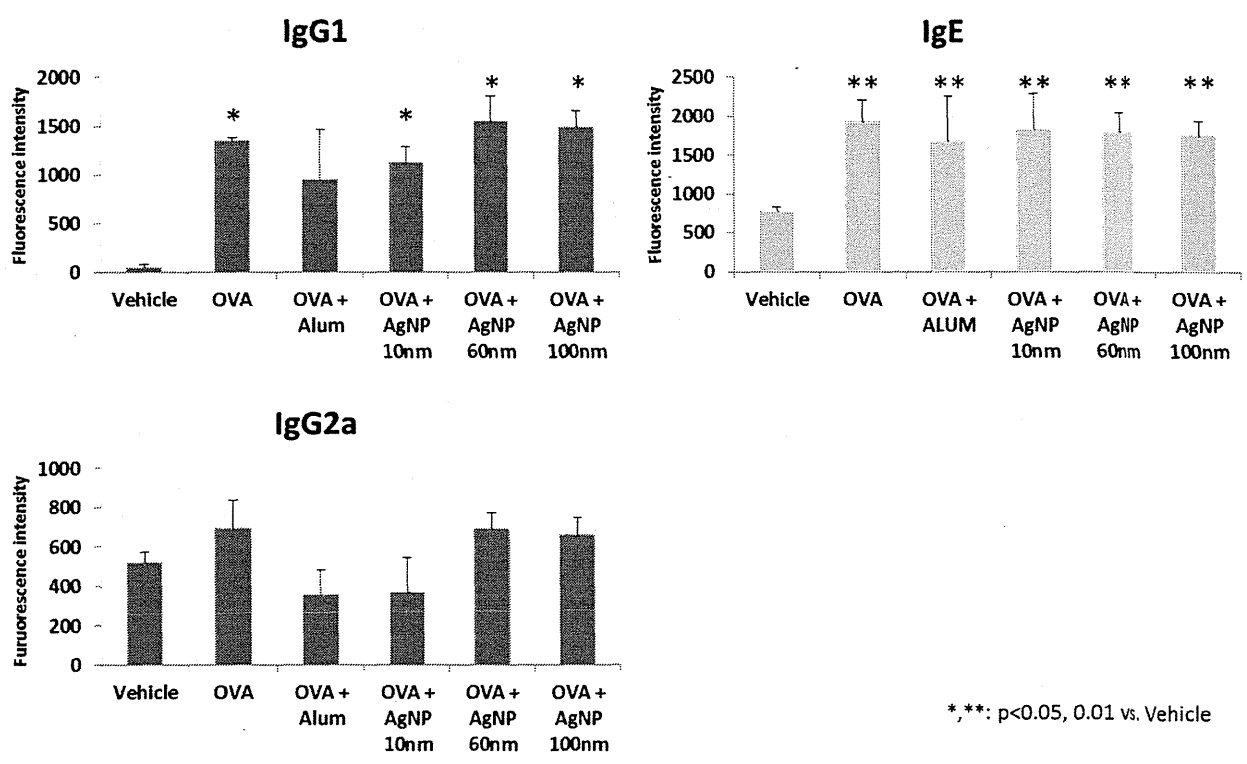
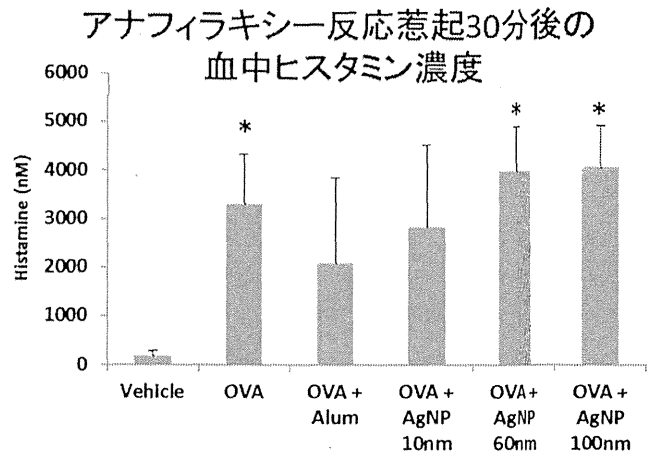
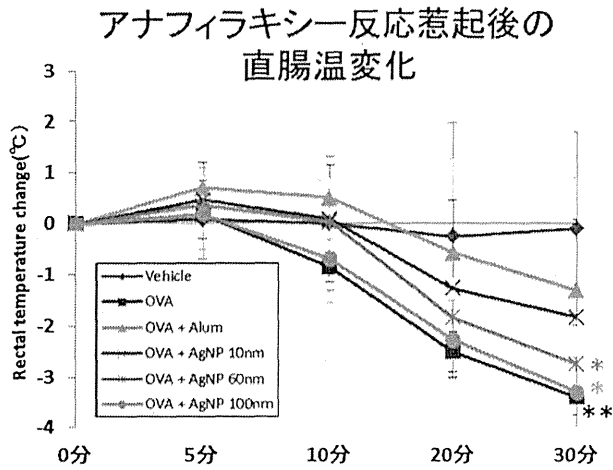


Figure 3. 体重 (実験 1)



*, **: p<0.05, 0.01 vs. Vehicle

Figure 4. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 1)



アナフィラキシー症状のスコアリング

Score 0 症状なし

1 口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ肢で耳の穴を掻く

2 活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛

3 1分以上動かない、うつぶせて横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣

4 ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣

5 死亡

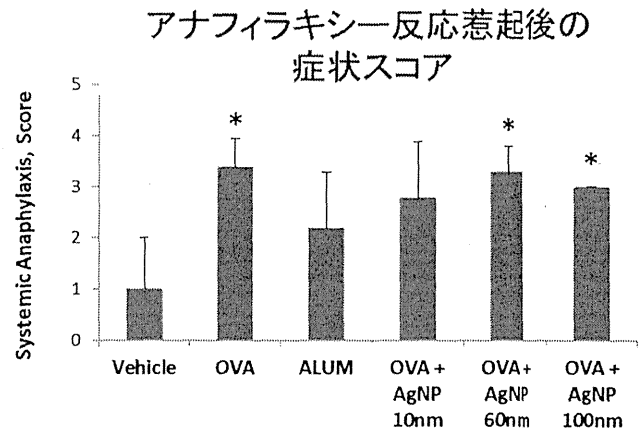


Figure 5. アナフィラキシー反応惹起後の応答(実験1) * , ** : p<0.05, 0.01 vs. Vehicle

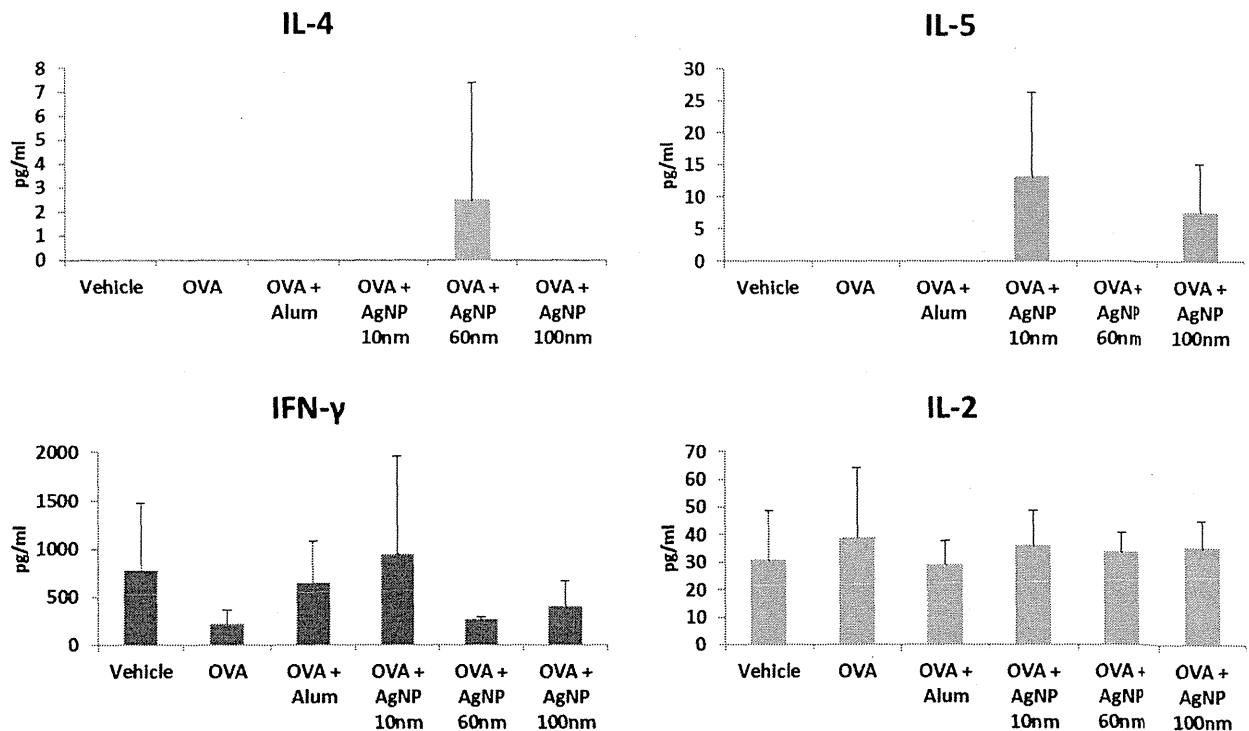


Figure 6. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌(実験1)

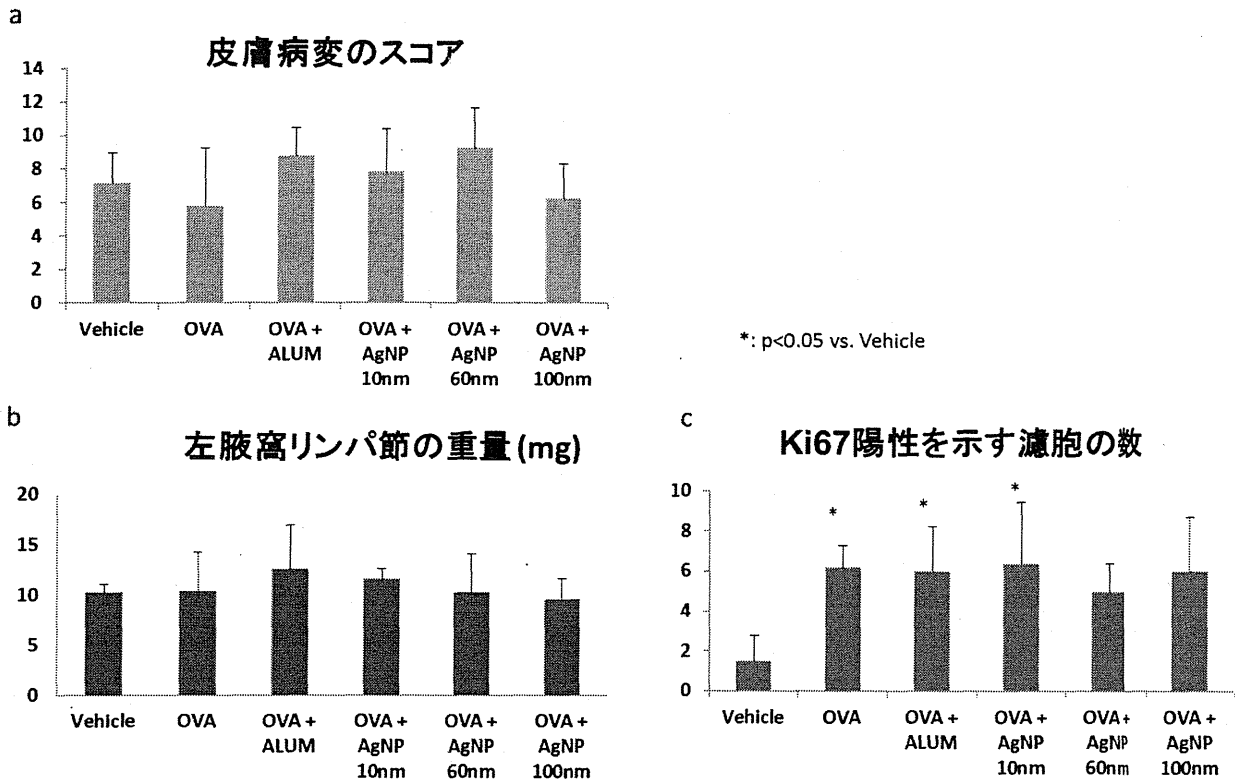


Figure 7. 皮膚病変のスコア(a)、左腋窩リンパ節の重量(b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(c) (実験 1)

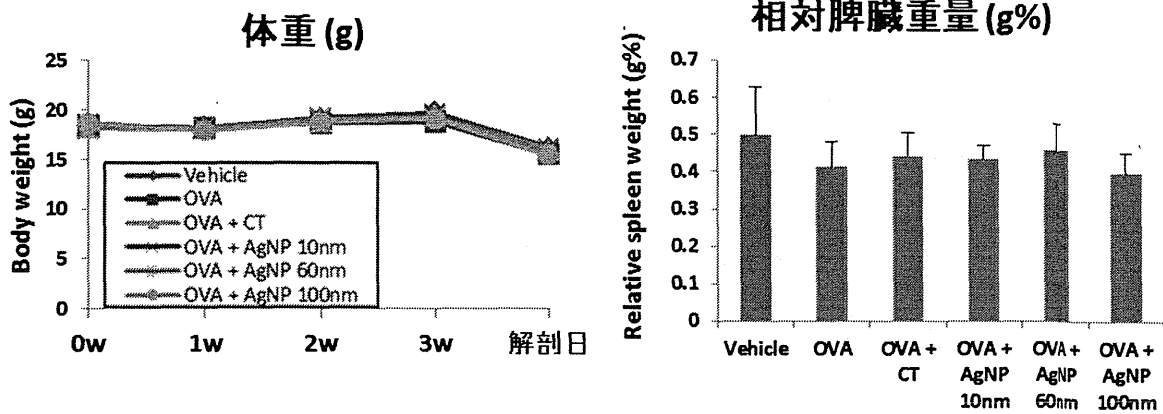


Figure 8. 体重(a)及び相対脾臓重量(b) (実験 2)

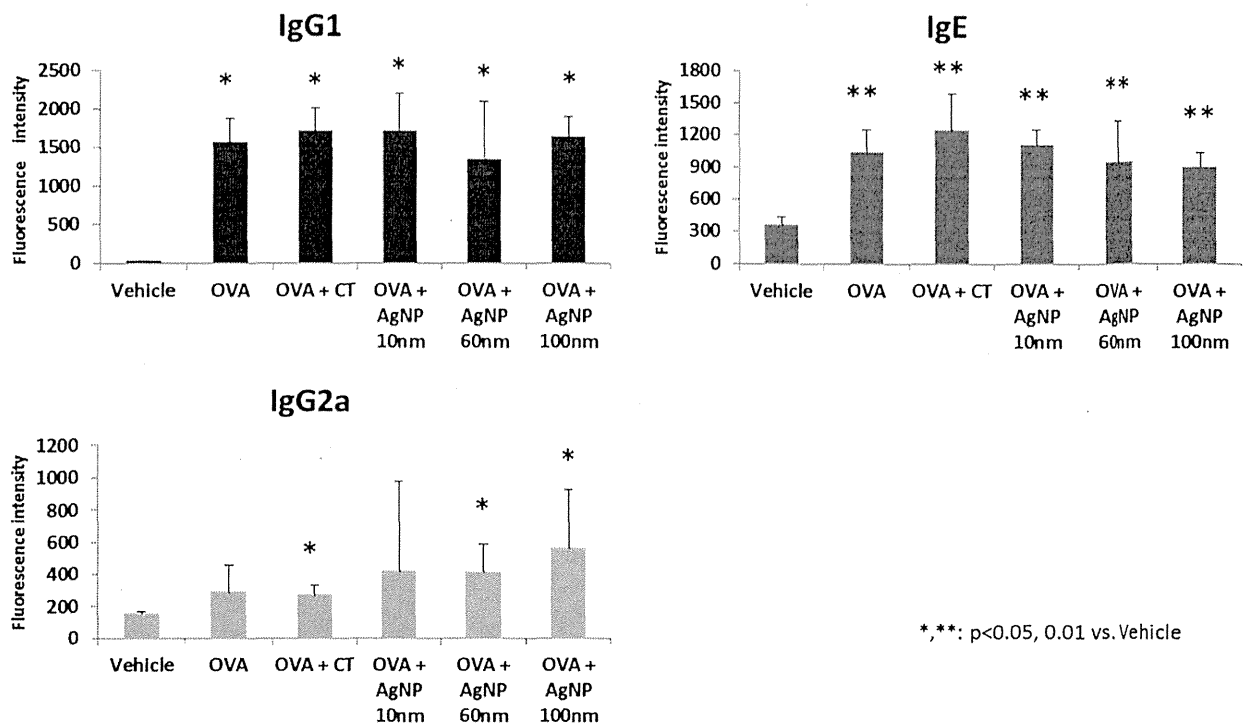


Figure 9. 血清中のOVA特異的抗体産生(実験 2)

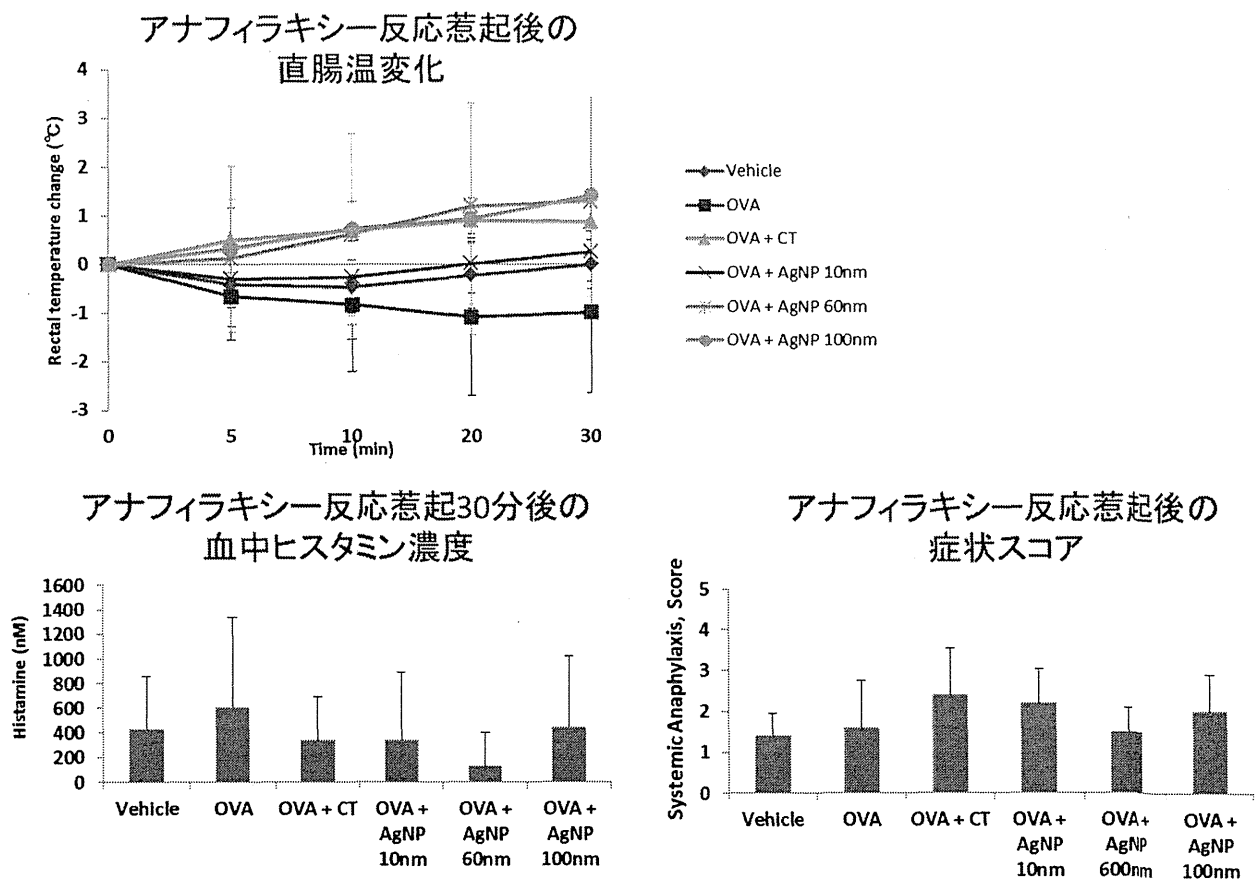


Figure 10. アナフィラキシー反応惹起後の応答(実験 2)

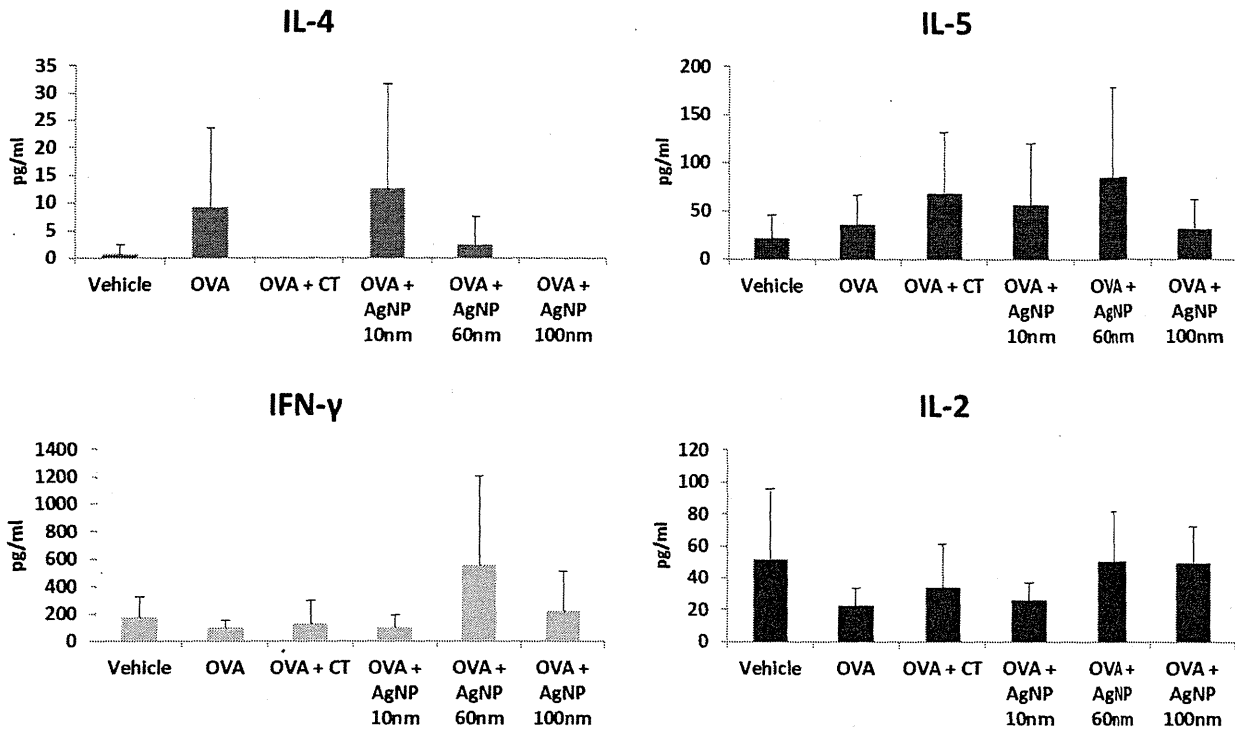


Figure 11. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 2)

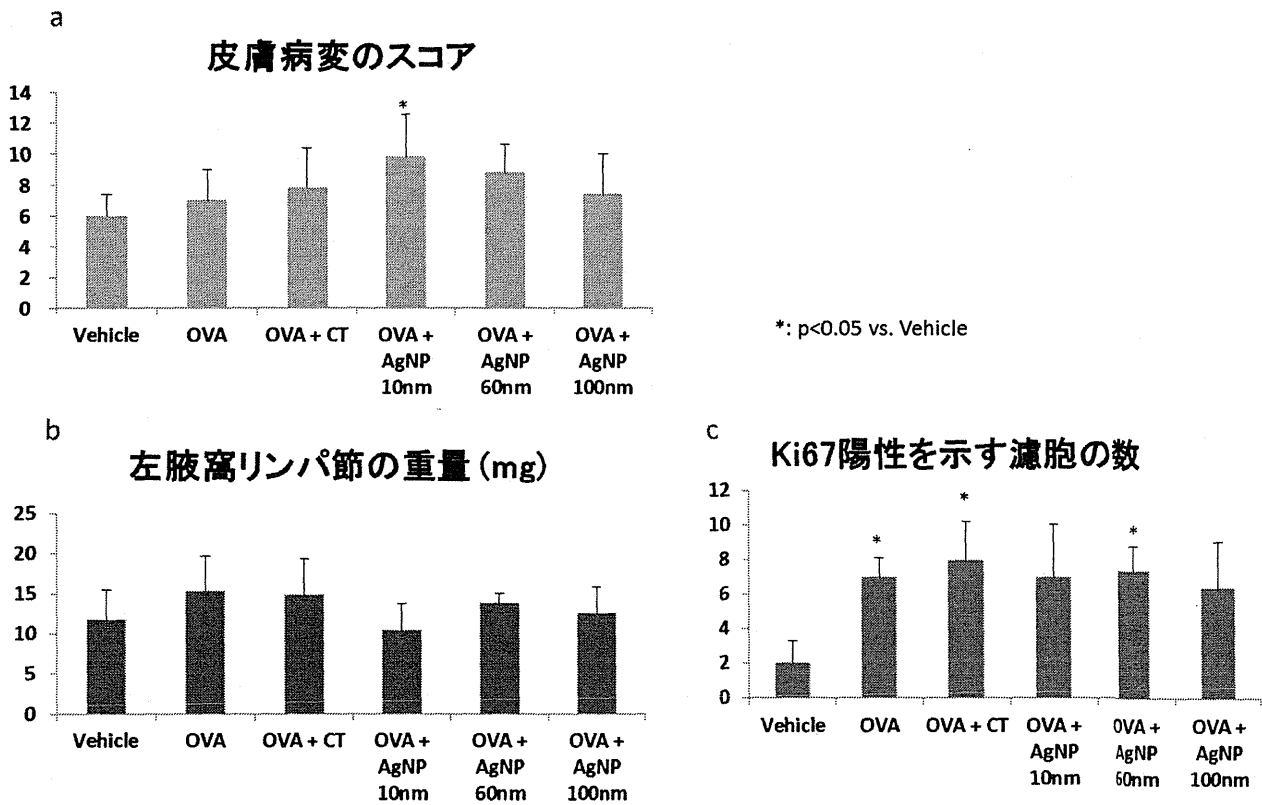


Figure 12. 皮膚病変のスコア(a)、左腋窩リンパ節の重量(b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(c) (実験 2)

Table 1. 病理組織学的所見 (試験 1)

Treatment	No. of animal	Skin			
		Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration
		+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++
Vehicle	5	1/4/0	2/1/2	0/4/0	3/0/2
OVA	5	1/3/0	0/4/0	3/1/0	1/1/2
OVA + ALUM	5	1/4/0	0/3/2	0/3/2	1/2/2
OVA + AgNP 10 nm	5	2/2/1	1/2/2	1/2/2	3/1/1
OVA + AgNP 60 nm	4	0/2/2	0/1/3	2/1/1	1/1/2
OVA + AgNP 100 nm	4	4/0/0	1/2/1	2/2/0	2/1/1

Scoring +=1, ++=2, +++=3

Grading standard

Grade	Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration
+: mild	4層以上の有棘細胞層 1-3箇所	びまん性角化亢進	隣接した3個以上の細胞による病変 1-10箇所	炎症細胞が真皮に浸潤 集簇無し
++: moderate	4-6箇所	びまん性角化亢進 有棘細胞2層以上の高さ、皮脂腺 1個分以上の高さを示す限局性角 化亢進 1-2箇所	11-20箇所	炎症細胞が真皮に浸潤 限局性集簇有り
+++: severe	7箇所以上	3箇所以上	21箇所以上	炎症細胞が皮下組織ま で浸潤 びまん性浸潤

Table 2. 病理組織学的所見 (試験 2)

Treatment	No. of animal	Skin			
		Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration
		+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++
Vehicle	5	4/1/0	0/4/1	3/2/0	4/1/0
OVA	5	2/2/1	1/2/2	4/1/0	2/3/0
OVA + ALUM	5	4/1/0	1/2/2	3/0/2	2/2/1
OVA + AgNP 10 nm	5	0/3/2	0/2/3	2/2/1	0/4/1
OVA + AgNP 60 nm	5	2/1/2	0/2/3	2/3/0	0/5/0
OVA + AgNP 100 nm	5	4/1/0	1/1/3	4/1/0	1/4/0

Scoring +=1, ++=2, +++=3

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書（平成26年度）

抗原性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について

研究代表者： 小川 久美子（国立医薬品食品衛生研究所 病理部）
研究分担者： 西川 秋佳（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）
研究分担者： 曹 永暁（国立医薬品食品衛生研究所 病理部）
研究協力者： 最上 知子（国立医薬品食品衛生研究所 生化学部）
研究協力者： 安達 玲子（国立医薬品食品衛生研究所 生化学部）

研究要旨：

ナノ銀（AgNP）の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び90日間反復投与毒性試験等において、肝臓や腎臓に軽度の変化が示されているものの、十分な評価は行われていない。AgNPのサイズによる毒性の違いに関連する情報はさらに少ない。また、免疫毒性についての報告は限られている。本研究では、雌性BALB/c系マウスを用いて、様々なサイズのAgNPのアジュバント効果について、卵白アルブミン（OVA）及び既知のアジュバントであるAlum又は各サイズのAgNP（直径10nm、60nm及び100nm）を腹腔内に混合投与して検討した。OVAの有無にかかわらず10nm AgNPを腹腔内投与した動物で10匹中9匹の死亡例及び1匹の瀕死例が認められた。それらの動物では、腸間膜の肉芽腫及び褐色並びに黒色素の沈着、胸腺の細胞死、胸腺周囲リンパ節の褐色並びに黒色素の沈着及び濾胞細胞死増加、腸間膜リンパ節の出血及び細胞死、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、変性及び細胞死及びクッパー細胞の暗褐色色素沈着、脾臓のうっ血、白脾髄における細胞死が認められた。被験物質による肝細胞障害が死亡原因と関連している可能性が考えられるが、詳細は不明である。60nm及び100nm AgNP投与群でも腸間膜の肉芽腫の増加、腸間膜及び胸腺周囲リンパ節における褐色並びに黒色素の沈着が認められ、OVA+60nm AgNP群では脾臓の絶対及び相対重量が溶媒対照群（Vehicle）群に比べ有意に増加した。マウス血清中のOVA特異的抗体について、血中IgG1及びIgEはOVA群と比較してOVA+Alum群で有意に増加していたが、AgNP投与による有意な変化は認めず、IgG2aはOVA群と比較してOVA+AgNP群で有意な増加がみられた。OVA再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を調べたが、IL-4及びIL-5については、群間に有意な変化は見られなかったが、IL-2及びIFN- γ については、Vehicle群に比べOVA投与各群で有意な増加又は増加傾向が認められた。今回の検討においては、10nm AgNPを腹腔内投与した全動物で死亡及び瀕死例が認められた。特定の大きさの被験物質でのみ見られた現象であり、類似した大きさのナノ銀の静脈投与によっては毒性の報告がないことから、機序について詳細に検討する必要があると考えられた。また、60nm及び100nm AgNPについては、IgG2a増加を示すことから、細胞免疫への影響の可能性が示唆された。

キーワード：ナノ銀、抗原性、アジュバント効果、マウスモデル

A. 研究目的

ナノ銀（AgNP）の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び90日間反復投与毒性試験等において、肝臓や腎臓に軽度の変化が示されているものの、十分な評価は行われていない（Bergin IL et. al., Int J Biomed Nanosci Nanotechnol. 2013;3. doi: 10.1504/IJBNN.2013.054515.）。また、免疫毒性についての報告は限られている（Shin S-H et al., Clinical and Experimental Otorhinolaryngology. 2012;4 (222-227)）。

AgNPのサイズによる毒性の違いについて、細胞を用いた検討では可能性が指摘されているが（Park MVDZ et. al., Biomaterials. 2011;32 (9810-9817)）、動物を用いた検討での報告はない。

一方、AgNPは、食品・食品容器包装用途として経口曝露されるのみならず、消臭・殺菌剤として化粧品にも含まれており、皮膚からも曝露される。金属はアレルギーの原因となりうるが、一般に、銀やチタンのアレルギーとしての性質は低いとされている。しかし、経口曝露では免

疫寛容が成立する物質でも、ナノマテリアルとして経皮的に繰り返し曝露された後に、経口曝露されることにより、アレルギー反応が惹起される可能性や、他のアレルゲン曝露に対してアジュバント効果を示す可能性の検討は十分ではない。

本研究では、AgNP の経皮経口複合曝露による、免疫毒性の有無について検討する評価方法の確立に先立ち、様々なサイズの AgNP の抗原性におけるアジュバント効果について、卵白アルブミン (OVA) 及び既知のアジュバントである Alum 又は各サイズの AgNP (AgNP、直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) を混合して腹腔内投与した雌性 BALB/c 系マウスを用いて、検討を行った。

B. 研究方法

AgNP は nanoComposix 社の銀ナノ粒子 (直径 10 nm (AGCB10)、60 nm (AGCB60) 及び 100 nm (AGCB100)、濃度 1 mg/ml) を用いることとした。抗原懸濁液は OVA (SIGMA A5503) 及び Alum (LSL LG-6000) 又は AgNP を各々 0.02、2 及び 0.2 mg/300 μ l/マウスとなるよう 2 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.4-7.6) に加えて投与する前に調製した。

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社) を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とし、各群は以下の通りに構成した、① 溶媒対照群 (Vehicle) 群、② OVA 群、③ OVA + Alum 群、④ OVA + 10 nm AgNP、⑤ OVA + 60 nm AgNP、⑥ OVA + 100 nm AgNP、⑦ 10 nm AgNP、⑧ 60 nm AgNP、⑨ 100 nm AgNP。7 週齢 (Day 0) 及び 10 週齢時 (Day 14) に 2 回抗原懸濁液を腹腔内投与 (300 μ l/マウス) し、Day 15 に解剖した (Figure 1)。

全身状態観察、体重、肝臓、腎臓及び脾臓重量の測定を行った。肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節、胃、小腸、大腸、胸腺、心臓、肺及び膵臓についてはホルマリン固定後、パラフィン包埋切片、HE 標本を作製し、病理組織学的検討を行った。リンパ組織については、リンパ球の増殖状態や表面抗体による細胞種の変化を検討した。

全血を採取し、OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体を ELISA 法で測定した。解剖時に採取した脾臓細胞は再懸濁後、OVA 抗原 (最

終濃度 10 μ g/ml) を添加、37°C 24 時間、又は 72 時間培養し、培地中のサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2 及び IFN- γ の濃度を、BD OptEIA ELISA Sets を用いて測定した。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エクセル統計 2012 for Windows ソフトウェアを用いて、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett 法により有意差検定を行った。不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Steel 法により多重検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。なお、図中には * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ で有意差の程度を記した。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者による腹腔内投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

OVA + 60 nm AgNP 群の 1 匹のデータは投与ミスによりすべての結果より削除した。

OVA の有無にかかわらず 10 nm AgNP を腹腔内投与した動物で Day 0 の投与 1 日後に 10 匹中 9 匹の死亡例が認められた。また、瀕死例の 1 匹は Day 14 の投与 9 時間後までに活動低下、痙攣及び異常呼吸が認められ、切迫屠殺を行った。60 又は 100 nm AgNP を投与したいずれの動物でも同様の症状は認められなかった。

実験期間を通して体重における群間の有意な変化は認められなかった (Figure 2)。臓器重量において、OVA + 60 nm AgNP 群では脾臓の絶対及び相対重量が Vehicle 群に比べ有意に増加し、OVA 群に比べ脾臓の絶対重量の増加が認められた (Table 1)。

死亡及び瀕死例の肉眼病変としては、肝臓の斑な暗赤色変色及び腹腔内黒色粒子状物質が散在性に認められた (Figure 3a)。病理組織学的解析を行ったところ (Table 2)、腸間膜の肉芽腫 (瀕死例のみ確認、死亡例からは広範な腸間膜のサンプリングができず確認できなかった) 及び褐色並びに黒色素の沈着

(Figure 4a)、胸腺の細胞死 (Figure 4b)、胸腺周囲リンパ節の褐色並びに黒色素の沈着及び濾胞細胞死増加 (Figure 4c)、腸間膜リンパ節の出血及び細胞死 (Figure 4d)、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、変性及び細胞死 (Figure 4e) 及びクッパー細胞の暗褐色色素沈着、脾臓のうっ血、白脾髄における細胞死 (Figure 4f) が認められた。

Day 15 の解剖時において、OVA の有無にかかわらず 60 nm 及び 100 nm AgNP 投与群でも肉眼的に腹腔内黒色粒子状物質が散在性に認められた (Figure 3b)。病理組織学的には (Table 2)、腸間膜の肉芽腫、腸間膜及び胸腺周囲リンパ節における褐色並びに黒色素の沈着が認められた。腸間膜で認められた炎症細胞集簇の数に Vehicle 及び OVA 群と比較して OVA + Alum 又は OVA + AgNP 群で有意に増加していた (Figure 5a)。また、60 nm 及び 100 nm AgNP 投与群でも有意な増加又は増加傾向が認められた (Figure 5a)。OVA + Alum 群で認められる炎症細胞集簇には結晶物が認められた。しかし、何れの 60 nm 及び 100 nm AgNP 投与群においても 10 nm の死亡例、瀕死例に見られた肝臓、脾臓及び胸腺の AgNP による変化は認められなかった。腸間膜リンパ節における細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の数は OVA、Alum 及び AgNP の投与による群間の明らかな変化は認められなかった (Figure 5b)。

Figure 6 に Day 15 のマウス血清中の OVA 特異的抗体についての検討結果を示す。IgE、IgG1 及び IgG2a は Vehicle 群と比較して IgE の OVA 群を除くすべての OVA 群及び OVA + AgNP 群で有意に増加していた。また、IgE 及び IgG1 は OVA 群と比較して OVA + Alum 群では有意に増加していたが、OVA + AgNP 群では有意な変化は認められなかった。一方、IgG2a は OVA 群と比較して OVA + Alum 群で増加傾向が、OVA + AgNP 群では有意な増加が認められた。

Figure 7 に抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌についての検討結果を示す。IL-4 はすべてのデータが検出限界以下だった。IL-5 においては、群間に有意な変化は見られなかった。IL-2 及び IFN- γ において、Vehicle 群に比べ、いずれの OVA 処置群でも有意な増加又は増加傾向が認められたが、OVA 群と比較して OVA + Alum 群及び OVA + AgNP 群では有意な変化は認められなかった。

D. 考察

雌性 BALB/c 系マウスを用いて、OVA 及び Alum 又は様々なサイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) を腹腔内に混合投与し、ナノ銀のアジュバント効果について OVA 特異的抗体価及び脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を主体に検討を行った。

OVA の有無にかかわらず 10 nm AgNP を腹腔内投与した動物で前例が死亡又は瀕死に陥った。腸間膜の肉芽腫、腸間膜及び胸腺周囲リンパ節における褐色並びに黒色素の沈着は、AgNP のサイズに関わらず死亡例 (不十分なサンプリングにより肉芽腫は確認できなかった)、瀕死例及び計画解剖例で共通に認められたが、胸腺の細胞死、胸腺周囲リンパ節の濾胞細胞死増加、腸間膜リンパ節の出血及び細胞死、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、変性及び細胞死、及びクッパー細胞の暗褐色色素沈着、脾臓のうっ血、白脾髄における細胞死は 10 nm AgNP 投与群の死亡例及び瀕死例でのみ認められ、60 nm 及び 100 nm AgNP 投与群では認められなかったことから、AgNP のサイズが死をもたらした要因の一つと考えられる。しかし、同等の大きさのナノ銀の静脈投与では毒性を誘発したとの報告がない (Lee Y et. al., *Nanotoxicity*, 2013;7 (1120-1130))。10 nm AgNP 投与群で腸間膜リンパ節、胸腺及び胸腺周囲リンパ節に著しい病変が認められたことから、AgNP はリンパ管循環を介して大きな影響を及ぼした可能性が考えられた。リンパ系を除いては肝臓の病変が最も重篤であったことから、AgNP による肝細胞障害が死亡原因と関連している可能性が考えられるが、詳細はまだ不明であり、機序について詳しく検討する必要がある。

AgNP の毒性は AgNP の大きさのみならず (Park MVDZ et. al., *Biomaterials*, 2011;32

(9810-9817))、化学成分、電荷、コーティング、凝集性及び動物実験での投与経路によって影響を受ける可能性がある。最近の報告では質量の単位より表面積や粒子の数といった単位を使ったほうが AgNP の毒性を比較する際により正確であると報告されている (Huk et al., Particle and Fibre Toxicology.

2014;11, <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/11/1/65>)。本試験で用いられた 10、60 及び 100 nm AgNP の表面積及び粒子の数は各々 57.4、9.4、6.5 m²/g 及び 2.4E+14、9.1E+11、1.7E+11 particle/mL であり、いずれについても 10 nm AgNP が他のサイズの AgNP より著しく大きな値を示している。

臓器重量において、OVA + 60 nm AgNP 群で脾臓の絶対及び相対重量が Vehicle 群に比べ有意に増加した。病理組織学的に群間のあきらかな変化が見られないことから、偶発的な変化と考えられたが、更なる詳細な検討が必要と考えられた。

マウス血清中の OVA 特異的抗体について、血中 IgG1、IgE 及び IgG2a の値を検討した。IgG1 及び IgE は Th2 細胞が、IgG2a は Th1 細胞が産生することが知られている。また、Alum は Th2 細胞による液性免疫を促すアジュバントの陽性対照物質としてよく用いられている。検討の結果、OVA 群に比べ、OVA + Alum 群では OVA 特異的 IgG1 及び IgE 抗体価について有意に上昇し、Alum のアジュバント効果が確認できたが、OVA + AgNP 群で有意な上昇は認められず、AgNP による明らかなアジュバント作用は示されなかった。OVA 特異的 IgG2a 抗体価については OVA 群に比べて OVA + AgNP 群で有意な上昇は認められ、下記の通り AgNP による IL-2 及び IFN- γ の明らかな変化はみられてないものの、AgNP が Th1 細胞による細胞性免疫に対して影響を及ぼした可能性がのこり、今後の検討が必要と考えられた。

抗原である OVA の再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2 及び IFN- γ の分泌を調べた。IL-4 及び IL-5 は Th2 細胞が、IL-2 及び IFN- γ は Th1 細胞が産生することが知られている。IL-4 全サンプルが検出限界以下であり、IL-5 においては群間に有意な変化は見られなかったことから、Th2 細胞に対する明らかな影響は証明されなかった。

Alum のアジュバント効果は主に Th2 細胞に及ぼしていることが知られており、IgG1 の有意な増加も見られているため、測定の手続き条件の検討が求められる。

また、IL-2 については OVA 投与群で有意に増加しており、OVA による Th1 細胞への影響が示唆された。IFN- γ については、有意差はないものの OVA 群と比べ、OVA + Alum 群又は OVA + AgNP 群で増加傾向がみられ、Alum 及び AgNP の Th1 細胞に対する影響については今後の検討が必要と考えられた。

E. 結論

我々が実施した、OVA 及び様々なサイズのナノ銀を用いた抗原性試験の結果、腹腔内投与した 60 nm 及び 100 nm AgNP は BALB/c マウスに対して Th2 細胞を介した液性免疫の亢進は示さないが、Th1 細胞を介した細胞性免疫を亢進させる可能性が示唆された。一方、OVA の投与にかかわらず 10 nm AgNP 群において、全例死亡又は瀕死が認められたことから、AgNP のサイズによる毒性の現れ方に違いがある可能性が示され、機序について詳細な検討が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

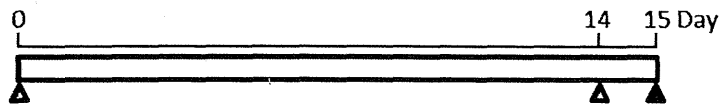
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



Animal 7-week old female BALB/c mouse (n=5/group)

▲ Antigen exposure (i.p., 300 μ l/mouse)

- ① 2 mM citrate (vehicle)
- ② OVA (20 μ g)
- ③ OVA + Alum (2 mg)
- ④ OVA + 10 nm AgNP (0.2 mg)
- ⑤ OVA + 60 nm AgNP (0.2 mg)
- ⑥ OVA + 100 nm AgNP (0.2 mg)
- ⑦ 10 nm AgNP (0.2 mg)
- ⑧ 60 nm AgNP (0.2 mg)
- ⑨ 100 nm AgNP (0.2 mg)

▲ Sacrifice

Figure 1. 実験デザイン

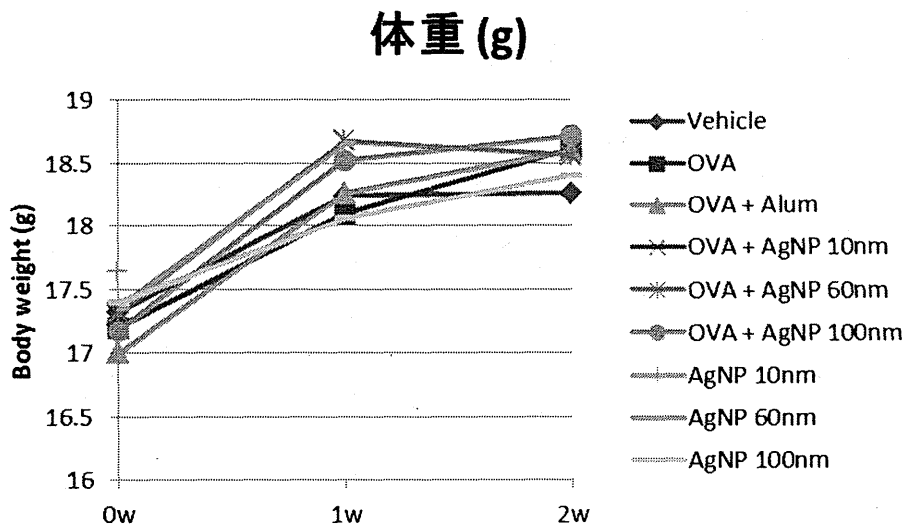


Figure 2. 体重

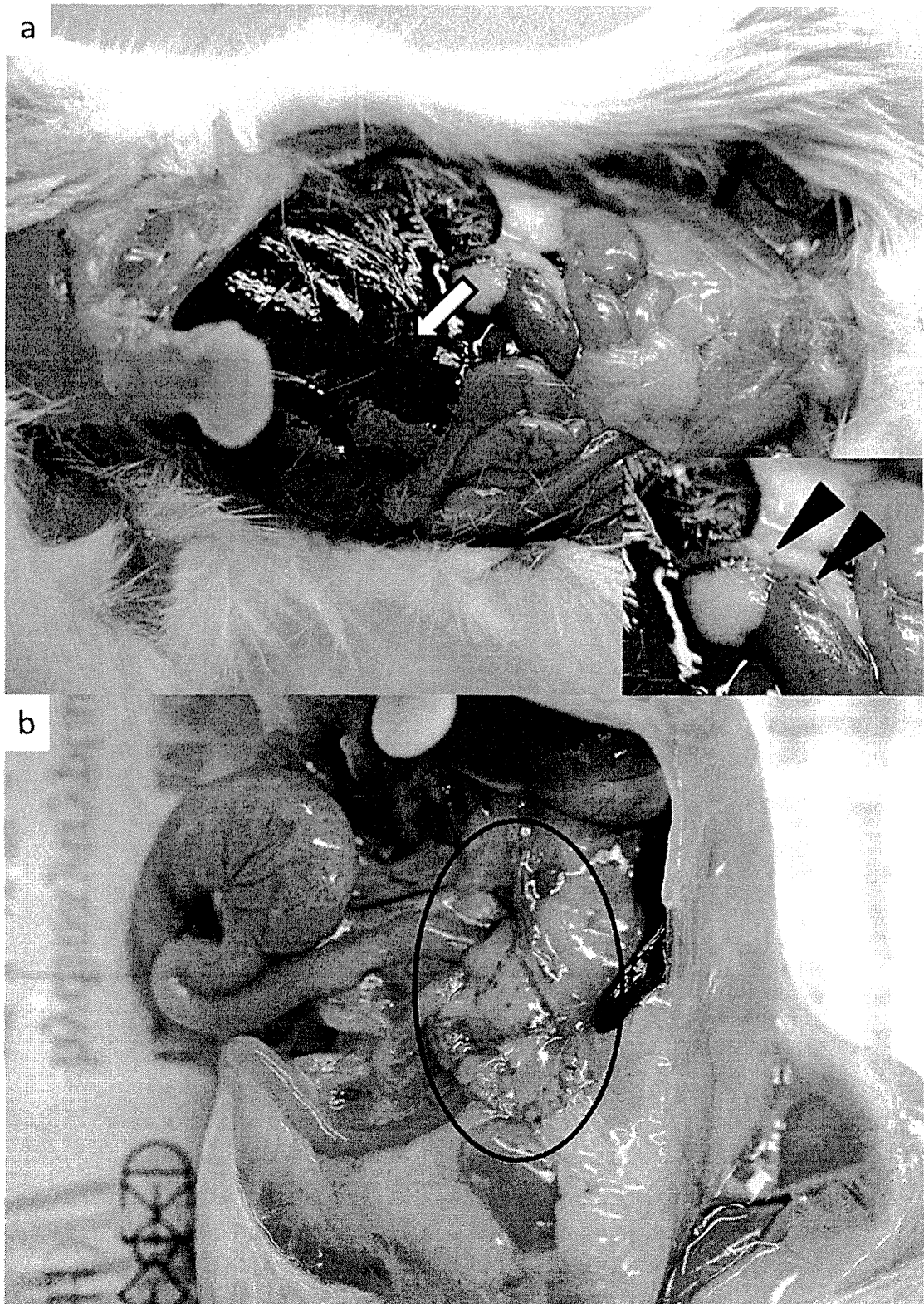


Figure 3. OVA + AgNP 10 nm群(a, 死亡例) 及びOVA + AgNP 100 nm群 (b, 計画解剖例)の肉眼写真。死亡例の肝臓の斑な暗赤色変色(矢印) 及びいずれの群も腹腔内黒色粒子状物質の散在(矢頭又は円内)が認められる。

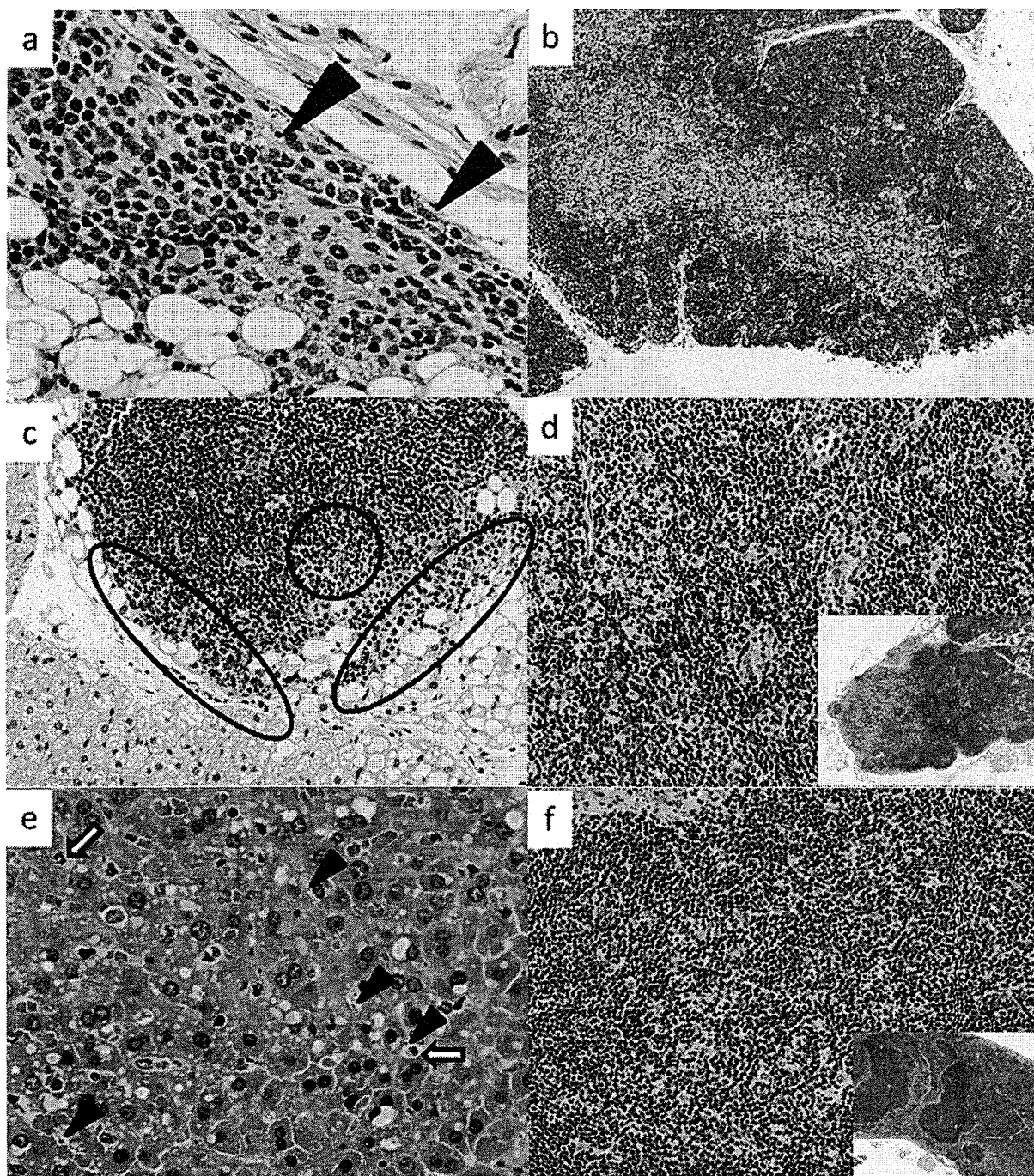


Figure 4. OVA + AgNP 10 nm群 (a, 瀕死死亡例) の病理組織写真。(a) 腸間膜の肉芽腫、褐色並びに黒色色素の沈着(矢頭)、(b)胸腺の細胞死、(c)胸腺周囲リンパ節の褐色並びに黒色色素の沈着(円内)、濾胞細胞死増加、(d)腸間膜リンパ節の出血及び細胞死、(e)肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及びクッパー細胞の暗褐色色素沈着(矢頭)、肝細胞の変性及び細胞死(矢印)、(f)脾臓のうっ血及び白脾髄における細胞死が認められた。

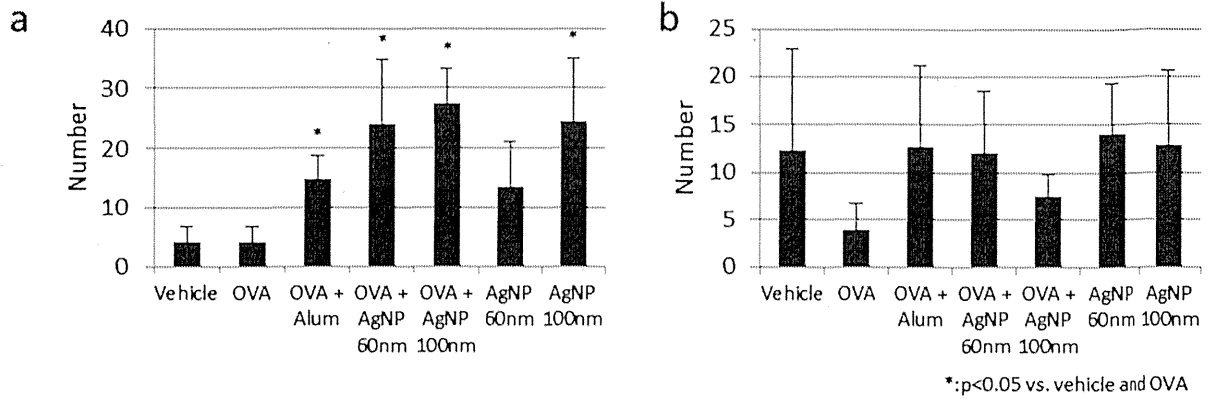


Figure 5. 腸間膜で認められた炎症細胞集簇の数(a)及び腸間膜リンパ節における細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(b)

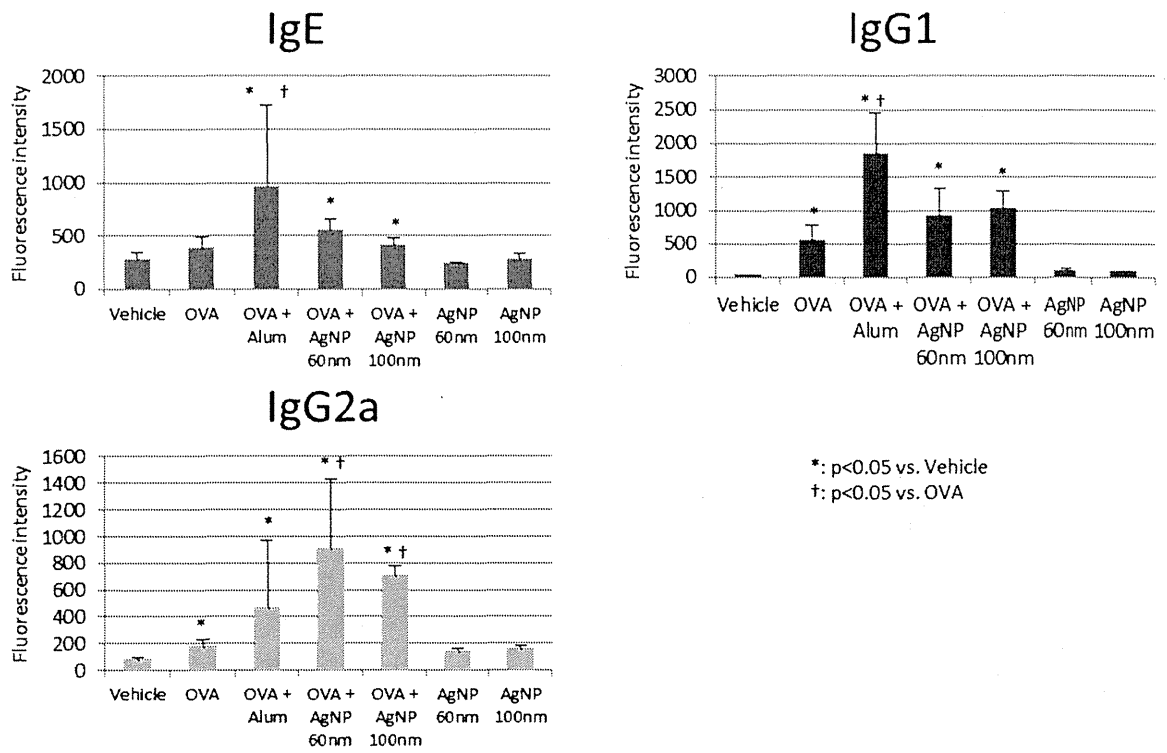


Figure 6. 血清中のOVA特異的抗体産生

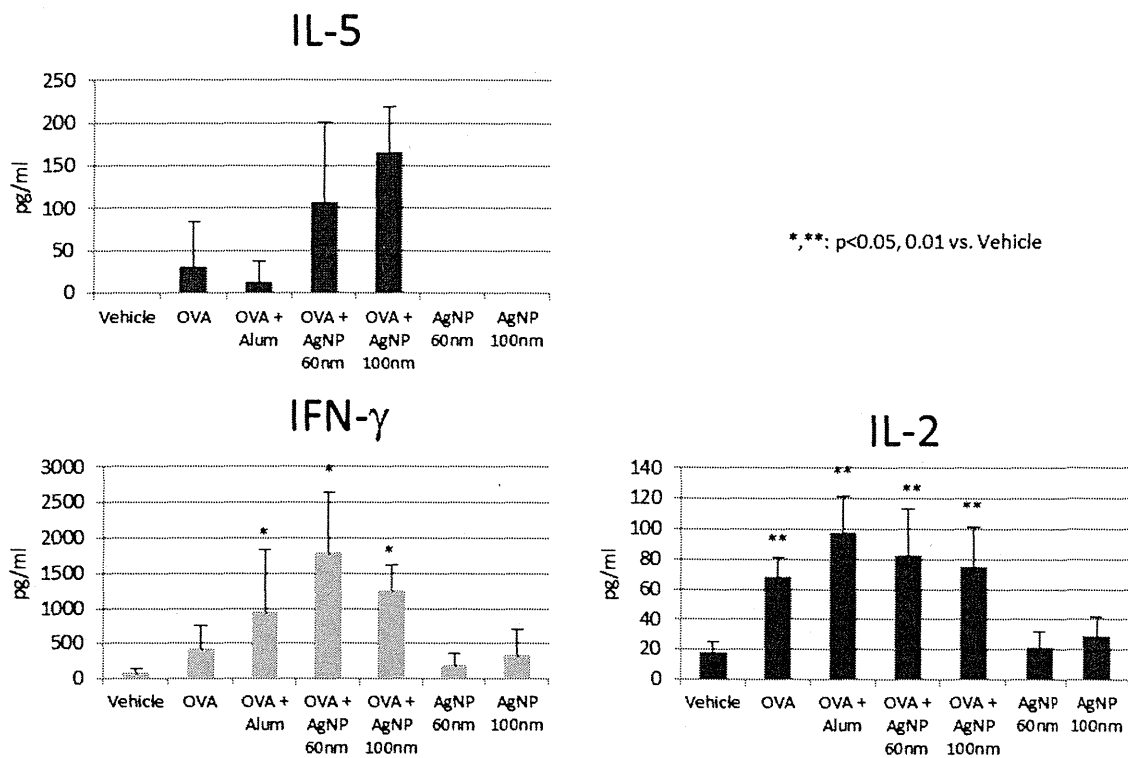


Figure 7. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌

Table 1. 体重および臓器重量

Group	Vehicle	OVA	OVA + Alum	OVA + AgNP 60nm	OVA + AgNP 100nm	AgNP 60nm	AgNP 100nm
No. of animals	5	5	5	4	5	5	5
Body weight (g)	18.1 ± 1.2	17.9 ± 1.3	18.1 ± 1.4	18.5 ± 1.6	18.3 ± 0.7	18.4 ± 1.2	18.2 ± 1.0
Absolute							
Liver (g)	0.89 ± 0.13	0.83 ± 0.08	0.89 ± 0.15	0.88 ± 0.05	0.85 ± 0.07	0.90 ± 0.14	0.86 ± 0.04
Kidneys (g)	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02
Spleen (g)	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.00* †	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Relative							
Liver (g%)	4.95 ± 0.64	4.63 ± 0.34	4.89 ± 0.45	4.78 ± 0.42	4.68 ± 0.47	4.85 ± 0.50	4.73 ± 0.17
Kidneys (g%)	1.18 ± 0.10	1.22 ± 0.06	1.16 ± 0.05	1.15 ± 0.12	1.18 ± 0.01	1.19 ± 0.07	1.20 ± 0.06
Spleen (g%)	0.55 ± 0.09	0.58 ± 0.03	0.59 ± 0.02	0.65 ± 0.05*	0.58 ± 0.06	0.53 ± 0.06	0.55 ± 0.06

Each value represents the mean ± S.D.

*: Significantly different from vehicle group at p<0.05.

†: Significantly different from OVA group at p<0.05.

Table 2. 病理組織学的解析

Organ and lesions	Treatment	Vehicle	OVA	OVA + Alum	OVA + AgNP 10 nm	OVA + AgNP 60 nm	OVA + AgNP 100 nm	AgNP 10 nm	AgNP 60 nm	AgNP 100 nm
	No. of animals	5	5	5	5 ^a	4	5	5 ^b	5	5
Liver										
Vacuolation, hepatocyte		0	0	0	5	0	0	4	0	0
Granular degeneration, hepatocyte		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Congestion, intermediate zone		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Dark brown pigment deposition, Kupffer cell		0	0	0	5	0	0	4	0	0
Spleen										
Cell infiltration, red pulp, neutrophil		0	0	0	2	0	0	1	0	0
Congestion, red pulp		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Apoptosis, white pulp		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Dark brown pigment deposition, white pulp		0	0	0	1	0	0	0	0	0
macrophage proliferation		0	0	0	0	0	0	1	0	0
Mesenterium										
Granuloma		0	5	5	1	4	5	0 ^e	5	5
Crystal		0	5	0	0	0	0	0	0	0
Dark brown pigment deposition		0	0	0	5	4	5	5	5	5
Mesenteric lymph nodes										
Apoptosis, cortex		0	0	0	4	0	0	3	0	0
Apoptosis, paracortex		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Apoptosis, medulla		0	0	0	2	0	0	2	0	0
Hemorrhage		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Thymus										
Apoptosis, cortex		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Apoptosis, medulla		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Thymus lymph nodes										
Dark brown pigment deposition		0 ^e	0	0 ^c	3 ^e	2 ^f	2 ^d	1 ^c	4 ^f	2 ^d
Apoptosis		0 ^e	0	0 ^c	3 ^e	1 ^f	2 ^d	1 ^c	3 ^f	1 ^d

a, 1 moribund and 4 dead cases, b; 5 dead cases, c; No. of sample is 1, d; No. of sample is 2, e; No. of sample is 3, f; No. of sample is 4, e; No. of sample is 0.

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアルの経口曝露による免疫毒性に対する影響

分担研究課題名：曝露評価（食品等を含む）に関する国際動向調査

研究分担者：広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部

研究協力者：小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部

研究協力者：小林 克己 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部

研究要旨

本研究では、ナノマテリアルの食品関連分野を中心とした曝露状況に関する国際動向を調査すること目的として、26年度は、ナノマテリアルに関する規制が比較的進んでいる欧州における、食品分野への適用実態を検討した。まず、ナノ関連に関する欧州の規制動向については、2011年にナノマテリアルの定義が確定して以降、各国でナノマテリアルに対する登録制度が普及しつつあるが、一般の化学物質の登録システムを中心としたもので、食品及び飼料、食品接触材、医療器具、化粧品、農薬、及び廃棄物などは適用除外となっている。一方、新規食品規制においては、ナノマテリアルに限らず、新規の物質を含む食品は規制の対象となるものの、既存のナノマテリアルを含む可能性のある物質を含む食品は対象外である。現時点では新規のナノマテリアルとしての登録は認められていない。しかし、研究開発に関する文献調査等の結果からは、ヨーロッパと世界の食品および飼料メーカーにおける潜在的なナノマテリアル需要が存在することが示された。食品及び飼料等に関する文献調査等では、重要な潜在的需要の可能性のあるナノマテリアルとして、二酸化ケイ素/シリカ、二酸化チタン、顔料およびナノキャリアシステムが挙げられ、食品包装関係では、カーボンブラック、二酸化ケイ素、窒化チタン、複合ナノマテリアルなどがあげられる。これらの物質の評価手法がある程度定まれば、新規のナノマテリアルの適用も増加していくものと考えられた。

A. 研究目的

ナノマテリアルには、様々の材質が考案されており、その工業的利用の振興が期待されている。ナノマテリアルの中でも、カーボンブラックや酸化チタン、酸化銀、カーボンナノチューブなどは、製品や環境経由の曝露による、ヒトの健康への影響が懸念されており、複数の検討がなされている。一方、ナノテクノロジーは食品・食品容器分野における積極的な利用も期待されており、これまでの研究でナノ銀や酸化チタンの食品関連分野における使用実態を調査した結果、ナノ銀については容器・包装用途における抗菌目的の使用が、二酸化チタンについては容器・包装に遮光性や抗菌性を付与する目的の使用が確認できた。食品添加物用としての二酸化チタンナノ粒子の使用は明示的に確認され

ていないが、海外では報告例がある。そこで、本研究では、海外におけるナノマテリアルの食品関連分野での適用動向について調査すること目的とする。

B. 研究方法

本年度は、ナノマテリアルに関する規制が比較的進んでいる欧州において、食品分野への適用実態を検討した。まず、ナノ関連に関する欧州の規制動向を概況した。さらに2014年からナノ製品の登録制度を開始したデンマークにおけるナノ製品の実態状況を調査した報告を中心に、食品関連製品に関する情報を整理した。

C. 研究結果

＜最近の欧州の規制動向＞

欧州では欧州委員会によって他地域に比べて早期からナノマテリアルによる健康、環境影響への懸念が高く、2011年には、ECとしてのナノマテリアルの定義の設定(2011/696/EU)に加えて、EFSAなど様々な評価行政関連の機関から評価ガイダンスが公表されている。こうした状況の中、2012年にフランスは、将来のナノ登録を見据えつつ、ナノ物質に関する情報政府への情報提出を義務的とした(この登録制度はナノ物質だけを対象とし、それらを含む消費者製品はカバーしていない)。登録データは毎年、フランス食品安全・環境・労働機関(ANSES)に提出され、ナノ物質の特性や用途に加え、企業秘密に関する情報も含む。これに続いて、ベルギーとデンマークも義務的なナノ物質報告制度の開始を表明した。ベルギーも、ナノ物質及びそれを含む混合物物質を対象としたものであるが、デンマークの登録制度は、ナノ物質だけでなく、むしろ製品に焦点を当てている。2014年6月の開始からの1年間分の登録については、機密情報は公開されないが、その年次報告書は2015年8月末に報告されることとなっている。しかし、これらの登録には、食品及び飼料、食品接触材、医療器具、化粧品、農薬、及び廃棄物などは適用除外となっている。

欧州における食品や飼料分野におけるナノテクノロジーの潜在的な使用は、ECの規則(178/2002 and 133/2008)または特定の承認プロセス(EC 1333/2008, Nanotechnology 2008)および規制(258/97EC)によって、新規食品に対して規制されている。規則(1333/2008 EC)は、特に既に食品添加物のナノ形態で開発されていた場合、それは新たな添加剤と考えられ、事前に販売承認を必要とする。全ての既存の食品添加物は、現在、欧州食品安全機関(EFSA)で、特に粒子サイズ分布が問題となり再評価されている。幾つかの評価はすでに終了しており、それらの再評価は、2015年12月31日までに完了する予定となっている。

欧州の食品包装中のナノマテリアルは、規則(EC, 1935/2004)によって食品と接触する材料および製品に合理的に接触しなくてはならないと定められている。現在、ナノサイズの範囲の一次粒子(合成非晶質二酸化ケイ素3、窒化チタン4およびカーボンブラック5)のみの3つの材料は、欧州市場で食品と接触するプラスチック材料と容器に対して使用することを認可されて

いる(Commission (a) 2012)。窒化チタンのナノ粒子および食品接触材料プラスチック包装のためのコーティングされたナノ二酸化ケイ素(100 nm未満)の安全性評価は、それぞれ2012年および2007年にEFSAによって公開されている(EFSA 2007; EFSA 2012)。

＜デンマークにおける食品および飼料中のナノマテリアルの使用状況＞

潜在的にナノスケールサイズの分布を有する食品添加物が食品に使用され、デンマークの市場で販売されていることを示す報告書に対するデンマークの食品業界へのインタビューの結果、多く物質は、業界がナノマテリアルとは見なしていない。そして、重量ベースの粒度分布を用いたものとしても定義されていない。ところが、これらの物質は、2011/696/EUによる個数基準の粒径配布状況を適用すると、ナノマテリアルと分類される可能性がある。さらに、いずれのインタビュー回答者は、食品成分および添加物のサイズ分布に関する正確な情報を与えることができなかった。企業は、製品を使用するまたは販売する場合、これら物質のナノサイズの関連特徴の機能を示さなくてはならないが、この資料の提出は、無かった。つまり、どの企業も、ナノマテリアルを含む食品を市場へ販売のための登録申請をデンマーク獣医食品庁に提出していない。

ナノマテリアル(2011/696/EU)の定義は、EU委員会が勧告しており、それに従えば、既存の成分および添加剤を含む広範囲の食品でナノマテリアルを含むものとして特徴付けることができる。しかし、この規制は、「1997年5月15日以前から現在までにある程度にヒトへ消費(摂取)がされていない食品および食品成分」(新規食品および新規食品組成、規制(EC)258/97)にのみ適用するので、既存のナノマテリアル含む食品は対象とならない。従って、対象となるナノマテリアルが改訂新規食品規制による新規食品として表示および定義されない限りは、デンマークに新規食品添加用ナノマテリアルの殆どは存在しないことになる。

そこで、この調査の目的のためのナノマテリアルの特定の定義は、ナノマテリアル(2011/696/EU)の定義にしたがっており、既存添加物除外した食品との関連した定義と異なっている。調査結果の概要を表1に示す。

表 1. デンマークの食品産業におけるナノマテリアルとして扱われている材料

ナノ材料	製品	効用	含有量
シリコン化合物 (例: 二酸化ケイ素) およびケイ酸塩	広範囲使用 (例: 食品および野菜の缶詰)	固結防止、清浄、消泡、香りのキャリア (媒体) および増粘剤	該当なし
炭酸カルシウム	広範囲に使用	カラー、安定剤および固結防止	該当なし
天然着色剤/顔料 (例: アントシアニン、ビート (飼料用大根)、コチニール (色素)、クロロフィルおよびカロチノイド)	広範囲に使用 (ジュース、ビール、ワイン、肉、乳製品および菓子)	色素	不定
二酸化チタン	製菓 (例: ガム、ビスケットおよびチョコレート)	表面のコーキングおよび色素	約 0.01 - μg/mg

一方、畜産用飼料産業界に対するインタビューでも、製品がこの調査で定められるナノマテリアルを含むと思っておらず、ほとんどの場合、供給材料または添加剤の粒子サイズのデータ・資料を持っていないことが示された。

殆どの飼料は、0.25~1 mm の幅のサイズの粉末またはいくつかの栄養素からフレーク飼料を製造し、ペレットまたは圧ぺん化したものであり、最小サイズは、マイクロスケールである。畜産用飼料は、プレミックスを作製し飼料に混合するが、そのプレミックスは、多くのビタミンおよびミネラルとキャリア (シリカまたはカルシウム) の混合物でナノスケールである可能性もある。職場で安全衛生上の規制を遵守するために (粉塵を避けるため)、粉末は、ナノスケールよりはるかに大きい粒子であるが、おそらくキャリア中の混合物は、ナノスケールの一次粒子の塊または凝集物質である可能性もある。同様に魚用飼料の材料の一般的な最適粒子サイズは 0.5~1.75 mm とされ、ナノスケールよりはるかに大きい。特に、魚用飼料用ビタミンおよびミネラルのサイズは、500 μm または 350 μm より小さい粒子が 95% になるように決められているが、それでもナノスケールよりもかなり大きい粒子が使用されている。

デンマークにおけるナノマテリアルとして家畜用飼料の材料または添加物のスクリーニング段階で使用可能なナノマテリアル、飼料製品および用途などを表 2 に示した。インタビューで注目すべきことは、この調査で定義されているナノマテリアル成分を食品に使用することを期待していない。また、粒子サイズのデータは不明である。表に記載されている全ての材料は、5~7年前に導入されたキレート物質を除いて、何十年もデンマークの飼料業界で使用されてきたものである。

表 2. デンマークの畜産用飼料産業界で分類されているナノマテリアルの概要

金属材料	製品	用途・機能	食品中含量
ケイ素化合物およびケイ酸塩	圧ぺんフレーク飼料およびペレットを含む一般家畜用飼料; プレミックス (飼料添加剤の混合物)	キャリア用	約 1% (w/w)
炭酸カルシウムおよびリン酸カルシウム	一般家畜用飼料; 水産用飼料	栄養素およびキャリア	約 1 ~ 4% (w/w)
金属塩および酸化物 (酸化鉄および微量元素: 銅、亜鉛、マンガンおよびコバルト)	一般家畜用飼料; 水産用飼料	栄養素	<< 1% (w/w)
微量元素のアミノ酸キレート	一般家畜用飼料	栄養添加物	<< 1% (w/w)
着色剤/顔料 (例: カロテンおよびアスタキサンチン)	採卵鶏を含む一般家畜用飼料; 水産用飼料	色素	<< 1% (w/w)

<デンマークにおける食品接触材料中のナノマテリアルの使用状況>

プラスチック容器、フィルムおよび紙の包装を含む食品包装に対するデンマークの生産業者へのインタビューでは、食品接触材料中のナノマテリアルの使用が明らかにされなかった。この調査では、ナノマテリアル (例えばナノクレイ/ナノ粘土) の将来性も対象としているが、商業的に実用化されていない。幾つかの意見の中には、ナノマテリアルがラベリングや包装のために使用される顔料、接着剤、ポリマーおよび紙に含まれている可能性に言及した。しかし、これら顔料、接着剤、ポリマーおよび紙に混入されるナノマテリアルのタイプは、特定することが出来なかった。顔料業界へのインタビューでは、オフセット印刷のために現在利用可能な顔料の多く (最大 100) は、ナノスケールの範囲近くに設定されており、EU 勧告 (EC 2011/696/EU) によってナノマテリアルとして定義されるかもしれないとしている。つまり、最近の生産者による REACH の報告では、Lithol Rubine (PR57:1), Permanent Maroon Medium (PR 15) および Toluidine Maroon (PR 13) がナノスケールを含んだ顔料の事例として報告されている。

台所家電や家電製品を生産する二つの大きな国際的な企業からの回答では、環境システムおよびヒトに対する健康へのナノマテリアルの毒性についての懸念が増大しているという結果に基づき、欧州市場からのナノ銀を含む製品を回収したというものであった。これらの現象は、ヒトへの影響に関する論文を裏付け、これによって台所家電へのナノマテリアルの使用が減少していることを示唆している。回答者は、自社製品のいずれも、業界の定義に従ってナノ物質を含んでいないと主張している。しかし、例えば EC2011/696/ EU に従って定義すると、カーボ

ンブラックおよび二酸化チタンのような顔料は、プラスチック部品および台所用品のコーティングおよびラッカーに使用されている可能性が高い。

＜食品および飼料中、および食品接触材中のナノマテリアルに関する文献調査＞

最近まで、食品および飼料産業用ナノマテリアルとナノテクノロジーに関する文献は、非常に限られていたが、2010年以降、既存および新規物質に対して幾つかの調査や評価が報告されている。

二酸化ケイ素/シリカ (E551) およびケイ酸塩は、多くのバリエーションを持って食品添加物および飼料（委員会 (b) 2012）に使用されている。これらは、食品および飼料により小さな粒子が、大きなコロイドに強く凝集（ELC 2009）する可能性があるナノマテリアルについて考慮すべきかどうかを議論されている。アモルファス二酸化ケイ素は、分離剤、補助剤、増粘・濃化剤および酸化防止剤として、調味料やカフェクリーマーなどの粉末状の食品で使用されてきた。粉末状の食品中のシリカ濃度は、0.05～0.6%で、ナノマテリアルとして5～19 (W)%含有である（Dekkers, Krystek *et al.*, 2011）。ナノサイズのシリカの含有量は、この研究から不明である。しかし、使用したシリカは、50%以上がナノ粒子の幅に入ることから、ナノマテリアルと定義できることから、これをナノマテリアルとして定義している。これらの知見から、Dekkerと共同研究者は、124 mg が（ナノシリカ高濃度含有食品を摂取した場合の一日当たりの摂取量）ナノシリカの一日平均摂取量と推定した。さらに、コロイド状シリカは、ワインおよびフルーツジュースの清澄剤として使用され、焼成シリカは、コーヒーや紅茶の消泡剤として使用される（委員会 (b) の 2012）。欧州食品安全機関（EFSA）は、二酸化ケイ素の再評価を2016年までに遅くとも完了しなければならないと述べている。

二酸化チタン (E171) は、顔料などの一般的な安全機関（EFSA 2012）は、市場で植物性カーボン製品中のナノ粒子の存在をナノマテリアルから除外されると述べた。

ビタミン類（非水溶性）、酸化防止剤、調味料および脂肪また色素効果として天然色添加物（例えばカロチノイド）は、食品、補助食品および飼料（例えば酪農、菓子類、肉製品、飲料および魚用飼料）に添加されている。非水溶性

な添加剤である。それは、より小さな粒子がより大きなコロイド（2009 ELC）に強く凝集することがあるので、食品添加の場合、ナノマテリアルと考えられるべきであるかどうか、議論されている。いくつかの製品中の二酸化チタンの濃度は、0.0005%および0.04%の間で変動している。更に、食品グレードの二酸化チタンの平均サイズは110 nmであることと、粒子の36%は、100 nm未満であることが確認された。シリカは、50%以上がナノ粒子の幅に入ることから、ナノマテリアルと定義できる。二酸化チタンが添加されている食品は、乳製品、キャンディー、ガム、焼き菓子、調味料および飲料（Weir, Westerhoff *et al.* 2012）などである。Weirらは、食品グレードの二酸化チタンの一日平均摂取量を推定した。その結果、米国の10歳以下の子供は、1～2 mg/kg 体重でその他のグループでは、おおよそ0.2～0.7 mg/kg 体重と報告している。

炭酸カルシウム (E170) は、飲料、乳製品、菓子類、穀物およびファインベーカーリー製品を含む幅の広い硬化剤および栄養素、抗ケーキング剤、酸性度調節剤、色素および代用塩として使用されている。食品グレードの炭酸カルシウムの典型的な平均粒径は、5 μm で100 nm未満が1%未満のものは、ナノマテリアルとは定義できないことを業界で云われている。飼料中の炭酸カルシウムは、飼料原料および技術的添加剤として使用されている。

鉄、カルシウム、銀およびこれら酸化物は、健康補助食品として販売されているが、食品添加物として認可されていないため、本報告書では、食用に記載されていない。飼料添加物の金属酸化物および金属塩は、栄養添加剤としての微量元素である。飼料添加物は、マイクロメートルサイズの範囲が一般的であることから、これらは、ナノマテリアルと呼ばれていない。

カーボンブラック (E153)（植物起源）は、種々の食品の着色剤として使用され、特に砂糖菓子および甘いお菓子類に用いられている（Miranda-Bermudez, Belai *et al.* 2011）。2012年に、欧州食品

の化合物は、非常に小さくてもよく、これら、ナノサイズの範囲に入ることが殆どない。食品着色添加剤の専門家は、ナノサイズの範囲に向かって着色添加物の粒子サイズを微細化させ、産業の発展に寄与したと述べている。天然色素添加剤は、合成着色添加剤の代替となる。天然色素添加剤、風味剤および油の使用は、しばしば、水に分散可能にするためキャリアシステム