

201522017A

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

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

(H26-食品-一般-002)

27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 久美子

平成28(2016)年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告	
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 小川久美子	----- 1
II. 分担研究報告	
1. 経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について 曹 永晩、西川 秋佳、小川 久美子、最上 知子、安達 玲子 (資料) Figure 1～18 Table 1～3	----- 15
2. ナノ銀の腹腔内投与による急性毒性について 小川 久美子、西川 秋佳、曹 永晩、最上 知子、安達 玲子 (資料) Figure 1～5 Table 1～2	----- 31
3. 曝露評価（食品等を含む）に関する国際動向調査 広瀬 明彦、小野 敦、山田 隆志、高橋 美加、小林 克己 (資料) 表 1～2	----- 41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 48

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

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 部長）

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。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。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を確立するため、実験1)において低濃度の卵白アルブミン（OVA）及びアジュバントの陽性候補物質としてコレラトキシン（CT, 0.1, 1, 10 µg）を用いて評価系を最適化し、その結果をもとに、実験2-1)においては各サイズのAgNP（直径10 nm, 60 nm及び100 nm）とOVA（2 µg）との混合物の経皮曝露後、抗原であるOVAを腹腔内投与し、実験2-2)においては経皮曝露後、OVAを強制経口内投与を行い、AgNPのアジュバント作用の有無を調べる実験を実施した。実験1)については、いずれのOVA処置群でも、感作4週後のマウス血清中のOVA特異的な血中IgG1及びIgEが溶媒対照群（Vehicle）群と比較して有意に増加し、さらにCT処置によって、血清中のOVA特異的な血中IgG1, IgE及びIgG2aがOVA処置群と比較して有意に増加した。一方、Vehicle群と比較してOVA処置群では惹起30分後の体温の有意な低下及び血中ヒスタミン濃度並びにアナフィラキシスコアの有意な高値が認められたが、CT処置による差は認められなかった。実験2-1)及び2-2)共に、いずれのOVA処置群でも、感作4週後のマウス血清中のOVA特異的な血中IgG1及びIgEがVehicle群と比較して有意に増加又は増加傾向を示したが、投与群間の差は認められなかった。抗原再曝露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカインIL-2, IL-4, IL-5及びIFN- $\gamma$ 分泌については、群間に有意な変化は見られなかった。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節のKi67陽性濾胞率においては、Vehicle群と比較して全投与群で増加または増加傾向が認められた。実験2-1)については、Vehicle群と比較してOVA群、OVA+60 nm AgNP群及びOVA+100 nm AgNP群では惹起30分後の体温の有意な低下及び血中ヒスタミン濃度並びにアナフィラキシスコアの有意な高値が認められたが、投与群間に有意な変化は見られなかった。実験2-2)については、直腸内体温の変化において、惹起30分後、Vehicle群と比較してOVA群で低下傾向があったものの、いずれの群においても、有意な低下は見られなかった。惹起30分後の血中ヒスタミン濃度測定及び惹起後30分間のアナフィラキシー症状のスコアリング結果、群間に有意な変化は見られなかった。

また、昨年度我々は抗原性試験を行うためマウスに直径10 nm, 60 nm及び100 nmのAgNPを腹腔内投与したところ抗原の有無にかかわらず、AgNP 10 nmを投与した全動物のみにおいて24時間内の死亡又は瀕死例が認められた。27年度の本研究では、雌性BALB/c系マウスを用いて、様々なサイズのAgNPの急性毒性について、各サイズのAgNP（直径10 nm, 60 nm及び100 nm）を腹腔内投与（0.2 mg/マウス）1, 3及び6時間後に剖検を行い、影響について検討した。投与5時間後より、AgNP 10 nm群で立毛及び活動低下が、投与6時間後にはAgNP 10 nm群及びAgNP 100 nm群で有意な体温の低下が認められた。投与6時間後のAgNP 10 nm群において、解剖時、肝臓及び脾臓のうっ血がみられ、血清生化学的検索では、総タンパク、アルブミン、総コレステロール、トリグリセリド及びグルコースの有意な減少、並びに無機リン、アスパラギン酸トランスアミナーゼ及び総ビリルビンの有意な増加が認められ、アラントランスアミナーゼについても有意差はないものの増加傾向を示した。総活性酸素種（ROS）/活性窒素種（RNS）フリーラジカルの産生量において、AgNP 100 nmの投与1時間及び6時間群の肝臓組織中で有意な上昇が認められ、AgNP 10 nmの投与6時間群の血清中に上昇傾向がみられた。病理組織学的には、AgNP 10 nmの投与6時間群でのみ、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死、脾臓のうっ血、胸腺皮質の単細胞壊死及び肺胞壁の細胞増加が有意な高頻度に認められた。AgNP 60 nmの投与1時間及び3時間群並びに

AgNP 100 nm の投与 1 時間群で肝細胞の細胞分裂像が 5 例中 5 例で認められた。胸腺周囲リンパ節の褐色～黒色素の沈着、腸間膜の肉芽腫及び褐色～黒色素の沈着はいずれの AgNP 投与群でも高頻度に認められた。

以上の結果から、OVA+AgNP の経皮曝露後、OVA を腹腔内または強制経口投与する本モデルにおいて、AgNP の明らかなアジュバント作用は認められなかった。また、所属リンパ節の Ki67 陽性濾胞率は感作の指標として有用と考えられた。今後、AgNP の濃度や貼付する OVA 抗原の濃度などさらなる検討が必要であると考えられた。一方、26 年度の研究において 10 nm AgNP を腹腔内投与した動物のみに見られた致死的な毒性は、被験物質による肝細胞障害又は循環器不全が死因と関連している可能性が示唆された。今回の検討においては、投与後の時間によって特定の大きさの被験物質でのみ見られた所見があり、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、機序については更に詳細な検討が必要であると考えられた。

さらに、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、27 年度は、欧州食品安全機関(EFSA)が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワーク(Scientific network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed)の動向を調査した。EFSA では、将来のナノテクノロジーを用いた食品関連製品への対応に備えて、現在市場に存在しているナノ関連製品のリストの収集することを優先的に行っており、収集したリストにおける製品の最大数はナノカプセル、銀及び二酸化チタンが占め、また、最多の用途は食品添加物と食品接触材料であった。また、銀などの無機材料からナノカプセルやナノ複合材料など有機材料へ用途がシフトしていることが示されていた。一方、食品表示の規制においてナノ材料を特定するための技術的な課題はナノスケールにおいて質量基準の粒度分布から個数基準の粒度分布への変換は非常に困難なので、粒子サイズの測定は要求される個数基準とすべきであるが、製品による柔軟な閾値の運用が提言されている。さらに体積比表面積(VSSA)のナノ材料を特定するときの役割や単分子やミセルなど非固体材料についての議論に今後注目する必要があると考えられた。EFSA における最近の評価状況においては、既存ナノマテリアルの再評価が中心で、まだ新規のナノマテリアルについての評価は行われていない。一方環境経由の汚染物質評価に関する話題として、魚介類などへの汚染が懸念されているプラスチック微粒子とナノ粒子に関する懸念への対応が EFSA に諮問されている。

キーワード：ナノ銀、経皮感作性、アジュバント作用、急性毒性、マウスモデル、国際動向

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 センター長  
研究分担者：曹 永晩  
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長  
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 部長  
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  
部長  
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  
室長  
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 室長  
研究協力者：山田 隆志  
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測  
評価部 室長

研究協力者：高橋 美加  
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測  
評価部 研究員  
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 研究員

#### 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。

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。

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ゲン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。

最近、ある特定の小麦タンパク質加水分解物 (グルパール 19S) を含有する洗顔石鹸 (茶のしずく石鹸：医薬部外品) の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告され、非常に大きな問題となっている。我々は、当所生化学部との共同研究で、即時型アレルギー誘発経皮感作モデル実験系を用いると、小麦タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因が経皮感作性に与える影響について解析ができ、被験物質をマウス皮膚曝露後に腹腔内投与によって惹起させると、所属リンパ節の腫大を伴うアレルギー反応を示す事を病理組織学的に見いだしてきた。

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を確立するため、雌性 BALB/c 系マウスを用いて、各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) の卵白アルブミン (OVA) との混合物の 1) 経皮曝露後、抗原である OVA を腹腔内投与、2) 経皮曝露後、OVA を強制経口投与、3) OVA との混合物あるいは AgNP 単独の腹腔内投与し、AgNP

アジュバント作用の有無を調べる実験を実施した。

また、昨年度我々は抗原性試験を行うためマウスに直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP を 0.2 mg/300  $\mu$ l/マウスの用量で腹腔内投与したところ卵白アルブミン (OVA) 抗原の有無にかかわらず、AgNP 10 nm を投与した全動物で 24 時間内の死亡又は瀕死例が認められた。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 の急性毒性について、各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) を腹腔内投与 (0.2 mg/マウス) 1、3 及び 6 時間後に剖検を行い、AgNP の影響について検討した。

さらに、国際動向の調査も継続的に実施することとした。EFSA は EFSA と EU 加盟国との間における情報共有とリスク評価法の調和を目的として、2010 年に食品および資料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワーク (Scientific network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed) を設立した。この科学ネットワークに委託されるべき項目は最初の 3 年間に討議され、2013 年から科学ネットワークは以下に示す目的にフォーカスすることとなった。

- リスク評価経験と手法の調和促進 (リスク評価事例や課題を共有することで重複作業を避けつつ、新たなリスク評価活動や優先順位付け、共通の研究テーマ等を討議する)
- EFSA と EU 加盟国間の情報とデータの共有 (リスク評価に必要なデータの得やすさや質について討議する為に、ナノテクノロジーの利用実態に関するデータの共有やリスク評価における特定の分野や課題を同定する)

2013 年に行われた科学ネットワークの会議では、食品関連市場に流通している製品中のナノマテリアルのインベントリ、製品中のナノマテリアルの分析及びモニタリング、最適な測定法、in vitro 及び in vivo 試験法のバリデーシヨンの必要性がについて、継続的にフォローアップしていくことがフォローアップすべき重要な課題として位置づけられている。そこで 27 年度は、この EFSA 科学ネットワーク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とした。

## B. 研究方法

### in vivo 研究

#### 実験 1)

動物実験は Adachi ら (Allergy. 2012;67

(1392-1399) の方法に準じて実施した。

抗原懸濁液は低用量の OVA (SIGMA A5503, 2  $\mu\text{g}$ ) 及びコレラトキシン (CT, LIST BIOLOGICAL LABORATORIES, INC. #101C, 0.1, 1, 10  $\mu\text{g}$ ) を 50  $\mu\text{L}$  /マウスとなるようリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に加えて投与する前に調製した。

動物は、7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 Vehicle 群、② OVA 群、③ OVA + CT 0.1  $\mu\text{g}$ 、④ OVA + CT 1  $\mu\text{g}$ 、⑤ OVA + CT 10  $\mu\text{g}$ 。8週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より3日間被験物質懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原懸濁液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50  $\mu\text{L}$  の抗原懸濁液を浸潤させ剃毛部に貼付した。パッチの上からサージカルテープを巻いてパッチを保護し、さらにマウスの首にエリザベスカラーを装着してパッチの剥脱を防いだ。3日間の感作後にパッチを外し (Day 4)、その後4日間休ませるという操作を1クールとし、4クルールの感作後、血中の OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体を ELISA 法で測定した。アレルギー反応の惹起は Day 25 に、感作抗原 1 mg を腹腔内投与して行った。OVA の腹腔内投与 30 分間後のマウスの直腸内体温変化及びアナフィラキシー症状を観察し、症状については基準に従ってスコアリングした。また、惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血漿中ヒスタミンの濃度を、Histamine EIA Kit (SPI-BIO) にて測定した。解剖時に採取した脾臓細胞は再懸濁後、OVA (最終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 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- $\gamma$  の濃度を、BD OptEIA ELISA Sets を用いて測定した。

更に、全身状態観察、体重、腋窩および腸間膜リンパ節重量の測定を行った。病理組織学的検査は、脾臓、曝露皮膚局所、各所のリンパ節について実施し、リンパ組織については、リンパ球の増殖状態を検討した。

#### 実験 2-1)

OVA と AgNP の経皮感作後、OVA の腹腔内投与惹起による免疫毒性に関して、AgNP のアジュバント効果及び AgNP のサイズによる影響についても合わせて検討するため、OVA を CT 又は各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm)

を混合して処置する群を設定し、感作及び惹起に関する比較を行った。

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 及び CT 又は AgNP を各々 2、1 及び 49  $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$  /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、7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 Vehicle 群、② OVA 群、③ OVA + CT 群、④ OVA + 10 nm AgNP、⑤ OVA + 60 nm AgNP、⑥ OVA + 100 nm AgNP。動物実験及び解析は実験 1 と同様に実施した。

#### 実験 2-2)

OVA の感作抗原による惹起の経路を腹腔内投与 (1 mg) から強制経口投与 (100 mg) に変更して実験 2-1 と同様に実施した。

#### 実験 3)

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。AgNP を 0.2 mg/300  $\mu\text{L}$  /マウスとなるよう クエン酸バッファー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週間の馴化後、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 (Vehicle) 6 時間群、② 10 nm AgNP 1 時間群、③ 10 nm AgNP 3 時間群、④ 10 nm AgNP 6 時間群、⑤ 60 nm AgNP 1 時間群、⑥ 60 nm AgNP 3 時間群、⑦ 60 nm AgNP 6 時間群、⑧ 100 nm AgNP 1 時間群、⑨ 100 nm AgNP 3 時間群及び ⑩ 100 nm AgNP 6 時間群。腹腔内投与 (300  $\mu\text{L}$  /マウス) し、1、3 及び 6 時間後、2 時間の絶食後、深麻酔下で腹大動脈から採血後、放血及び放血し、解剖した。

全身状態観察を行い、解剖前の体重及び投与 1、3 及び 6 時間後の体温を測定した。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 標本作製し、病理組織学的検討を行った。

全血を採取し、総タンパク (TP)、アルブミン (ALB)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスアミナーゼ ( $\gamma$ GTP)、総コレステロール (TC)、トリグリセリド (TG)、総ビリルビン (BIL)、グルコース (Glucose) の各項目を測定した。

血清及び肝臓ライセートのトータル活性酸素種 (ROS)/活性窒素種 (RNS) フリーラジカルの測定は、1 時間及び 3 時間群は 3 例、6 時間群は 5 例のサンプルから、OxiSelect™ In Vitro ROS/RNS Assay Kit (Green Fluorescence) (CELL BIOLABS, INC. San Diego, CA) を用いて測定した。

#### 調査研究

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、食品分野でのナノマテリアルの曝露状況やリスク評価に関する動向を調査することを目的として、今年度は、欧州食品安全機関 (EFSA) が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワーク (Scientific network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed) を調査した。特に、ナノマテリアルのインベントリ作成状況や曝露状況や規制等に必要測定手法、および EFSA における最近のナノマテリアルの評価状況に関する動向を収集した。

#### 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並びに強制経口投与が主体であり、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

##### *in vivo* 研究

##### 実験 1)

10  $\mu$ g CT を浸潤させたパッチの皮膚貼付終了後、一部の動物の皮膚に発赤が認められたが、他の群における皮膚肉眼病変の明らかな変化はみられなかった。解剖時の脾臓相対重量は群間の明らかな差は認められなかった。感作 4 週後のマウス血清中の OVA 特異的抗体について、いずれの OVA 処置群でも、血中の OVA 特異的な IgG1、IgE 及び IgG2a が Vehicle 群と比較して有意に増加を示し、いずれの CT 投与群においても OVA 単独群と比較して有意な増加がみられた。直腸内体温の変化において、惹起 20 分及び 30 分後、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で統計学的に有意な体温の低下が認められた。30 分後に OVA 群、OVA+CT 0.1  $\mu$ g、OVA+CT 1  $\mu$ g 及び OVA+CT 10  $\mu$ g 群で各々平均 3.3、4.0、3.4 及び 2.9 度の体温低下が認められた。体温が有意に低下した OVA 群及び全ての OVA+CT 群において惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意に増大していた。また、惹起後 30 分間、アナフィラキシー症状をスコアリングした結果、OVA 群及び何れの OVA+CT 群では平均 2.8~3.4 と統計学的有意な高いスコアであった。抗原再曝露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌については、IL-2、IL-5 及び IFN- $\gamma$  において、群間に有意な変化は見られなかった。IL-4 においては、OVA 群及び何れの OVA+CT 群でも Vehicle 群と比べ有意な増加が認められたが、全てのデータが検量線下限以下だったため有意な結果と見なされなかった。

皮膚病変のスコアリングを行った結果、Vehicle 群と比較していずれの群においても有意な増加は認められなかった。一方、貼付部位傍の左腋窩リンパ節の重量及び細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の割合 (Ki67 陽性 2 次濾胞の数/濾胞の数  $\times 100$  (%)) については、Vehicle 群と比較して全ての OVA 処置群で増加または増加傾向が認められた。

### 実験 2-1)

AgNP を浸潤させたパッチの皮膚貼付終了後、一部の動物の皮膚に灰色の着色が認められたが、1 日以上は持続しなかった。解剖時の脾臓相対重量は群間に明らかな差は認められなかった。感作 4 週後のマウス血清中の OVA 特異的抗体について、いずれの OVA 処置群でも、血中の OVA 特異的 IgG1、IgE 及び IgG2a が Vehicle 群と比較して有意に増加又は増加傾向を示し、OVA+CT 群の IgG1 及び IgG2a が OVA 群と比較して有意に増加又は増加傾向を示したが、AgNP 投与による影響は認められなかった。直腸内体温の変化については、惹起 10 分、20 分及び 30 分後、Vehicle 群と比較して全 OVA 群、OVA+CT 群及び何れの OVA+AgNP 群で統計学的に有意な体温の低下又は低下傾向が認められた。30 分後に OVA 群、OVA+CT 群、OVA+10 nm AgNP 群、OVA+60 nm AgNP 群及び OVA+100 nm AgNP 群では各々平均 4.9、5.1、2.4、2.9 及び 3.8 度の体温低下が認められた。体温が有意に低下した OVA 群、OVA+CT 群及び全ての OVA+AgNP 群においては惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意に上昇していた。惹起後 30 分間、アナフィラキシー症状をスコアリングした結果、OVA 群、OVA+CT 及び何れの OVA+AgNP 群では平均 2.8 ~ 3.4 と統計学的有意な高いスコアであった。抗原再曝露による経皮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、IL-5 及び IFN- $\gamma$  において、群間に有意な変化は見られなかった。IL-2 においては、OVA+CT 群で Vehicle 群と比べ有意な増加が認められた。皮膚病変のスコアリングを行った結果、OVA+CT 群で Vehicle 群と比較して有意な増加が認められた。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量については Vehicle 群と比較していずれの群においても有意な増加が認められなかった。一方、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の割合 (Ki67 陽性 2 次濾胞の数/濾胞の数  $\times$  100 (%)) については、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で増加または増加傾向が認められた。

### 実験 2-2)

技術的なトラブルにより OVA+CT 群の 1 匹が 4 週目に死亡した。実験中の体重及び解剖時の絶対及び相対脾臓重量に群間の差は見られなかった。感作 4 週後のマウス血清中の OVA 特異的抗体について、いずれの OVA 処置群でも、血中の OVA 特異的 IgG1 及び IgE が Vehicle 群と比較して有意に増加又は増加傾向を示し、さら

に IgG1 については、OVA 群と比較して OVA+CT 群で有意に高値を示した。IgG2a については、OVA 群と比較して OVA 群及び OVA+10 nm AgNP 群で有意に増加した。OVA+10 nm AgNP 群及び OVA+60 nm AgNP 群で IgE 及び IgG2a の有意な低下が認められた。直腸内体温の変化について、惹起 30 分後、Vehicle 群と比較して OVA 群で低下傾向があったものの、いずれの群においても、有意な低下は見られなかった。惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度測定及び惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリング結果については、群間に有意な変化は見られなかった。

抗原再曝露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を調べたが、IL-2、IL-4、IL-5 及び IFN- $\gamma$  において、群間に有意な変化は見られなかった。

皮膚病変のスコアリングを行った結果、Vehicle 群と比較していずれの OVA 処置群でも増加傾向が認められた。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量については Vehicle 群及び OVA 群と比較して OVA+CT 群で有意に高値を示し、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の割合 (Ki67 陽性 2 次濾胞の数/濾胞の数  $\times$  100 (%)) については、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で有意な増加が認められた。

### 実験 3)

60 nm AgNP 3 時間群の 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。

投与 5 時間後より、AgNP 10 nm 群で立毛及び活動低下がみられた。投与 6 時間後には AgNP 10 nm 群及び AgNP 100 nm 群で有意な体温の低下が認められ、各々平均 2.2 及び 0.8 度低下した。

血清生化学的検索では、投与 6 時間後の AgNP 10 nm 群において、Vehicle 群に比べ、TP、ALB、TC、TG 及び Glucose の有意な減少、並びに IP、AST 及び BIL の有意な増加が認められ、ALT においても有意差はないものの増加傾向を示した。全ての 1 時間群で BUN 及び Na の低下が見られ、AgNP 10 nm 及び AgNP 60 nm の 3 時間群でも BUN の有意な低下が認められた。全ての 3 時間群で IP の有意な増加を認め、AgNP 10 nm 及び AgNP 100 nm の 3 時間群及び AgNP 60 nm の 6 時間群で TG の有意な減少、AgNP 10 nm 3 時間群及び AgNP 60 nm 1 時間群で Glucose の増加が認められた。AgNP 60 nm の 6 時間群では Glucose の有意な減少が認められた。

トータル活性酸素種 (ROS) / 活性窒素種 (RNS) フリーラジカルの産生量において、AgNP



100 nm の投与 1 時間及び 6 時間群の肝臓組織中で有意な上昇が認められ、血清中の産生量については、AgNP 10 nm の投与 6 時間群の血清中に上昇傾向がみられた。

解剖時の肉眼的観察では、投与 6 時間後の AgNP 10 nm 群において、肝臓及び脾臓が暗赤色に変色しており、うっ血が示唆された。病理組織学的解析を行ったところ、AgNP 10 nm の投与 6 時間群で肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死、脾臓のうっ血、胸腺皮質の単細胞壊死及び肺胞壁の細胞増加が Vehicle 群及び他の投与群に比べ有意な高頻度で認められた。また、肝臓のクッパー細胞の暗褐色色素沈着も高頻度に認められた。AgNP 60 nm 1 時間及び 3 時間群並びに AgNP 100 nm 1 時間群で肝細胞の細胞分裂像が 5 例中 5 例で認められた。胆嚢の浮腫が AgNP 60 nm 6 時間群を除くいずれの AgNP 投与群でも認められ、特に AgNP 60 nm 1 時間及び 3 時間群並びに AgNP 10 nm 6 時間群で有意な高頻度を示した。胸腺周囲リンパ節の褐色～黒色色素の沈着、腸間膜の肉芽腫及び褐色並びに黒色色素の沈着はいずれの AgNP 投与群でも高頻度に認められた。

## 調査研究

### 1. 食品関連市場に流通している製品中のナノマテリアルのインベントリ

まず、EFSA は RIKILT (Institute of Food Safety in the Netherlands) および JRC (Joint Research Center) に「農業、飼料、食品分野におけるナノテクノロジーの応用のインベントリ」調査プロジェクトを依頼し、2014 年の会議ではその結果の検討が行われた。このインベントリの目的は、EFSA のために今後のナノテクノロジーの用途を予測することである。しかし、市販が確認されているものと市販が想定されているものとを区別する困難な作業であることが報告されている。この作業は、今すでに食品に存在するものと開発中のものとを消費者が区別することが非常に重要であることを再認識させることとなった。

### 「農業、飼料、食品分野におけるナノテクノロジーの応用のインベントリ」の概要

この調査では、農業/飼料/食品分野におけるナノテクノロジーの現在あるいは将来の応用のインベントリを作成し、また、EU および非 EU 各国におけるナノ材料に関する法的規制の概要を示している。情報源は文献検索 (約 900

文献 (農業、食品加工、食品接触材料、作用機序、(環境) 毒性学、および法令など) とナノ材料関連企業のウェブサイト、各分野における 1,000 人以上の専門家へのアンケートであった。〈インベントリの作成〉

インベントリとして 633 レコードから成り、ナノ材料の物理化学的特性、製品名および関連サプライヤー、(環境) 毒性試験、標的種、曝露とリスク評価の状況に関する情報を含んでいる。また、定義済みクエリとして「現在・将来の応用」、「毒性データ」、「リスク評価の状況」の 3 タイプのインベントリ・リストが作成された。資料の約 75% は査読論文であり、その他として、非査読論文、特許、企業ウェブサイトやアンケート結果からの情報がほぼ同程度含まれる。また、約 50% はヨーロッパ、30% はアジア、20% はアメリカからの資料である。インベントリには 55 種類のナノ材料が抽出でき、そのうち半数は 1 回の報告しかない。報告の最多はナノカプセル化物 (ミセル、ナノカプセル、ナノキャリアおよびナノエマルジョンの総称) の 149 回、続いて銀の 122 回、酸化チタンの 65 回である。使用トン数に関してはシリカと酸化チタンの情報しかないが、シリカと酸化チタンは多くの食品に古くから使用されているので、これらの使用量はナノカプセル化物や銀よりかなり高いことが予想できる。

ナノ材料の毒性スクリーニングの重要な要素は、試験材料の詳細かつ包括的な物理化学的特性についての検討である。物理化学的特性は、生物学的/毒物学的反応とナノ粒子表面特性とを相互に関連付け、他の研究者による物質固有のハザードと毒性所見を比較する際に十分な基準点を与えるには必須である。基準点となるには、厳密な特性評価が行われた場合にのみ可能である。顕著な物理的特性として、サイズ、サイズの範囲やその分布があり、その他、形状、表面積、ゼータ電位および凝集状態がある。「Nano Inventory」を使うことで、レコード内のナノ材料が物理化学的にどの程度特徴付けられているかを推定することが可能である。サイズの範囲と平均粒径は最も頻繁に報告されており、633 レコード中、それぞれ 451 レコードと 298 レコードであったが、実際の測定サイズは少数の論文でしか示されず、殆どがサプライヤーの示した値である。その他の重要な物理化学的特徴については、サイズの分布は 49 レコード、形状は 84 レコード、ゼータ電位は 82 レコード、凝集状態は 66 レコードであった。

#### <定義済みクエリ「現在・将来の応用」>

「現在・将来の応用」のクエリの結果によると、インベントリ内のレコードの大多数をナノカプセル、銀および酸化チタンが占め、また、最多の応用例は食品添加物と食品接触材料である。現在、276のナノ材料の市販が確認できるが、市販品か今後市販されるかの厳密な区別を恒常的に行うには無理がある。無機ナノ材料は非常に多様で金属、金属酸化物、粘土、フルカーボン素材を含む。一方、有機ナノ材料の大半はナノカプセル化物とナノ複合物（ナノ複合材、ナノ積層材、ナノポリマーの総称）である。少数（20%未満）のナノ材料が80%以上の応用例に関与している。また、現在と将来の比較で、銀などの無機材料からナノカプセルやナノ複合物など有機材料へ用途がシフトしていることがわかった。さらに、新規食品、飼料添加物、殺生物剤および農薬への応用が現在、主に開発段階にあることがわかる。食品から飼料への用途の転用を認める情報は得られなかったが、いくつかの食品は飼料に使える可能性があった。

#### <定義済みクエリ「毒性データ」>

「毒性データ」のクエリは、リストに含まれるナノ材料の毒性試験の種類に関する情報を示す。ナノ材料とその毒性に関するデータが691あるが、リストはある特定の物質の毒性データの網羅的なソースとしては構築されていない。主として、シリカ、酸化チタンおよび銀の細胞毒性、遺伝毒性および反復投与毒性といったエンドポイントのデータがある。物理化学的特性の体系的報告が無いと毒性データの有用性や比較可能性が減少するが、これが改善されればリスク評価で試験結果が使い易くなると考えられた。

数種のナノ材料（銀、酸化チタン、酸化亜鉛、シリカおよびカーボンナノチューブ）の毒性についての結果として、銀ナノ材料の影響には銀イオンの放出が関連し、銀イオンの吸収に続く銀ナノ粒子の生体内形成が示唆された。酸化チタンの毒性試験から経口投与での吸収が示されたが、その吸収率は不明であり、また、その遺伝毒性は陰性と陽性の矛盾する結果が出ていた。経口投与された酸化亜鉛は（主にイオンとして）わずかな量しか吸収されず、また、吸収された亜鉛は7日後には臓器から除去された。食品に多用されるシリカの主要な形態は合成非晶質シリカであり、最新のレビューでは食品を介して曝露した消費者への安全性が示唆さ

れた。カーボンナノチューブは、in vivo 試験で体内への吸収は認められないが、in vitro 試験では細胞内への取り込みが示唆された。これら全てのケースに不確実なことや矛盾する結果があり、ナノ材料の取り込みと毒性に関して結論を出すためには、さらなる研究が推奨された。

#### <定義済みクエリ「リスク評価の状況」>

「リスク評価の状況」のクエリには文献調査で見つかった極少数の情報からの検索結果しか得られなかった。曝露やハザード評価を含む完全なリスク評価は数種類のナノ材料（シリカおよび酸化チタン）にしかなく、ほとんどの研究はナノ粒子の有害性評価（毒性情報）か放出量（曝露量）のどちらか一方にしか焦点を当てていない。完全なリスク評価が行われているのは、食品中の合成非晶質シリカと包装材料中の酸化チタンであった。リスク評価は、ハザード情報とヒト曝露データの両方に不確定要素があるため、非常に慎重に行われる。銀と酸化亜鉛に関するリスク評価データもあるが、不完全であり、他のナノ材料のリスク評価に関する現況と同様である。リスク評価を実施する主な理由は「自己評価」であり、規制上の要件として、あるいは規制当局へのナノ材料に関する申請資料の一環としてのリスク評価は得られなかった。

#### <作用機序について>

ナノ材料の作用機序に関して、次に示すデータが得られた。金属と金属酸化物ベースのナノ粒子は一般的な微生物に対して有効な抗菌剤を構成することが明白である。したがって、例えば、銀、酸化チタン、酸化亜鉛などのナノ粒子は消費者製品、健康関連製品および工業製品における抗菌剤および添加剤としてかなり注目されている。また、薬剤や栄養成分の摂取を増加させる目的で安定剤として使用される有機ナノ粒子も同様に注目されている。作用機序は「毒性データ」クエリのフィールドの一つであり、計235のエントリが含まれるがそのレコードの大部分はナノ銀関連であった。

#### <農業/飼料/食品分野におけるナノテクノロジーに関する法的規制について>

ナノ材料の法令や規制に関して、文献調査やアンケートに基づいてEUおよび非EU各国について検討された。現在、EU各国では次に示す数種のナノ材料の法的定義が採用されている：「消費者への食品情報」に関するNo.1169/2011、「プラスチック食品接触材料」に関するNo.10/2011、「化粧品」に関する

No.1223/2009、「殺生物性製品」に関する No.528/2013。また、欧州委員会は 2011 年にナノ材料の定義に関する勧告 (2011/696/EU) を発表した。新規食品の法案 (COM/2013/0435) もナノ材料や食品におけるナノテクノロジーの応用を規制する法的根拠となっている。非 EU 各国における現行法の点検により、ナノ材料に特化した法令や法的拘束力ある定義は限定的であり、非 EU 各国では主に業界のガイダンスに基づく広いアプローチを採用していた。例えば、日本では食品衛生法が食品の安全性を規制し、厚生労働省が所轄官庁である。ナノ材料に固有の法令は今のところ日本にはないが、様々な研究活動がナノテクノロジーの分野で進められている。食品安全委員会からは「食品分野におけるナノテクノロジーの利用についての安全性評価情報に関する基礎調査報告書」(FSCJ 2010) が 2010 年 3 月に公表されており、日本の食品分野におけるナノテクノロジーの利用の現状についての意見が示されていた。

## 2. 製品中のナノマテリアルの分析及びモニタリング、最適な測定法

ナノの定義とその技術的側面の問題として、政策科学レポート:JRC Part 3「ナノ材料(NM)という用語の定義のための EC 勧告の見直しに向けて」(JRC、2015) では、ナノの定義 (EC Recommendation 2011/696/EU) を明確化することと、その実施を促進するためのオプションを報告する際に必要な科学技術的な評価が検討されていた。ここで推奨される定義には、食品表示の規制目的を含む多くの応用分野のための一般的な情報源という目的もある。JRC の評価では、定義の範囲は以前と同様に、天然物や製造されたナノ材料、付随的ナノ材料も対象とする勧告をサポートする。ナノスケールの定義として、ナノ粒子の唯一の定義プロパティであるサイズ (1~100 nm) を変更する根拠はほとんどなかった。

このレポートは、定義において次の論点を明確にし、さらなる実施ガイダンスを提供する必要があると言及した：粒子、粒子サイズおよび外形寸法、最小の外形寸法、構成粒子。材料中の外形寸法 1~100 nm を有する粒子の分画の数量に言及した閾値 (現在は 50%) と、製品におけるこのような材料の含有量の閾値の間には、考え方に違いがある。定義の中で (現在の「粒子を含有する」ではなく)「主に粒子から

なる」というフレーズを使用すれば、ナノ粒子を含有する製品がナノ物質とされる誤解を防ぐことができる。ナノ粒子 (1~100 nm) 分画の柔軟な閾値 (1~50%) が、規制当局が特定の懸念に対処することを可能にする。また、体積比表面積 (VSSA) の役割を明らかにする価値があり、ある材料がナノ材料ではないことを証明する方法として参考になるかもしれない。材料の意図しない混入を避ける方法の戦略や、確実に含まれる材料のリストも注目に値する。例えば、単分子やミセルなど非固体材料について含めるか除くかの議論は現在進行中である。定義を満たすための追加のガイダンスとして、特に、方法のリストを伴う適正な測定/サンプリングの実行が有用であることがこのレポートで結論付けられていた。EFSA の科学ネットワークは、詳細な実行ガイダンスをもたらすこの提案を強く支持した。

### <NanoDefine プロジェクトの進捗状況の報告>

欧州各国からの 28 の NanoDefine プロジェクト・コンソーシアムのメンバーが、ナノ材料の EC 推奨定義を満たすために統合された分析的アプローチを開発している NanoDefine プロジェクトの計画および進捗状況がナノネットワークで議論された。

このプロジェクトはナノマテリアルの定義の勧告に伴う分析的課題に対処している：(1) 数やサイズの分布を得ることがより良く、強度・体積・質量から、数に変換する場合には誤差が生じやすい。(2) 30 nm 以下の測定はいくつかの技術でのみ可能である、また 1~100 nm の測定と同時に 100 nm 以上についても対処する必要がある。(3) 凝集体の集合体や凝集体は分散させ、また、凝集体中に粒子を見つける必要がある。

定義を満たすための考えとして、階層型アプローチや、方法の選択及びナノ材料の分類のための NanoDefiner ツールの使用がある。既存の方法やアルゴリズムは理論的及び実験的評価を受けることになる。体積比表面積 (VSSA) については、NanoReg プロジェクトとの協力が不可欠である。新しい機器やソフトウェアがデータの質を向上させるために開発される。基準材料、方法の検証、および標準化 (CEN/ISO との連携) が予想され、さらに、個々の粒子の外形寸法、粒子サイズ分布、凝集、VSSA の役割、コロイド、混合物の分析に基づいて、定義を改訂する提案が出される可能性がある。2017

年10月までに、NanoDefine プロジェクトでは関係業界や規制当局が考慮すべき事柄のための試験スキーム及びツールを提供する予定である。

#### <EFSAによるナノ材料のリスク評価の活動>

科学ナノネットワークでは農業/食品/飼料に使用されるナノ材料の評価に関する EFSA の活動が議論された。2011年に EFSA の科学委員会は「食品および飼料連鎖におけるナノサイエンスとナノテクノロジーの応用のリスク評価に関するガイダンス」を公表した (EFSA SC, 2011)。そこに記載されたアプローチは、主に経口曝露への懸念であり、申請者とリスク評価者のパネルによって実行されるべきものである。2011年以来、科学委員会は加盟国の登録制度や計測手法、リスクアセスメント法などの開発や試験結果を監視している。EFSA では、食品接触材料や食品添加物、新規な食品、飼料添加物として使用される物質の応用が評価されている。これらの用途のそれぞれが異なる法的枠組みの下で評価されていることに留意する必要がある。将来的な用途への準備のため、EFSA は市販されているナノ材料/ナノアプリケーションのインベントリ (RIKILT & JRC, 2014) の作成により、それらの市場での立場をある程度予測する必要がある。

食品接触材料：EFSA は食品接触材料に使用される工業ナノ材料を明らかにカバーする用途を受理し、評価している。食品への移行の証拠がないので、リスク評価はゼロ曝露シナリオに基づく。多くの用途について、現在評価中である。ナノ形状の香料としての用途では受理されていない。

食品添加物：過去及び進行中の用途は全てバルク材料についてである。ANS パネルでは、食品添加物の大部分を再評価するプログラムを実施しており、それらのいくつか (例えば、銀 (E174)、酸化チタン (E171)) は、ナノ分画を含む可能性がある。しかし、すでに認可された食品添加物の再評価では、申請者情報やドシエもなく、データをパブリックドメインから収集するか、関係者に適切なデータを提供または生成してもらう必要がある。バルク材料に関する EFSA によるデータ要求は、ナノサイズの粒子の含有量についての質問を含む可能性がある。酸化チタンは、別の法的枠組みに基づいて飼料添加物として並行して評価されている。法令 (EU) No 231/2012 では、食品添加物にお

いてナノ分画の限界を規定していない。食品添加物は意図せず存在し形成された小型のナノ分画を含むことがある。また、ナノ形状は食品添加物の機能を妨げる可能性もある。例えば、ナノ TiO<sub>2</sub> に増白作用はない。特別に注意が必要な課題は、生物学的研究の評価に十分な特性評価 (例えば、ナノ形状物質の割合や使用法) と市販の食品添加物中に潜在的に存在するナノ分画の量である。

飼料添加物：飼料添加物としてバルクの TiO<sub>2</sub> は、食品添加物としての再評価と並行して再評価中である。サイズ分布のデータは申請者から提出される標準的なリスク評価書類の一部となっている。

新規食品：EFSA は今のところ新規食品が明らかにナノ形状から成る用途を受理していない。新しい新規食品法は「工業ナノ材料」を明らかに含む。

農薬：EFSA は活性成分だけを評価する。活性成分のナノ固有のリスク評価はまだ行われていない。しかしながら、いくつかの製剤に関しては加盟国の定義によってはナノ製剤と判定される。農薬ネットワークと EFSA PPR パネルは、リスク評価における調和を確保するために、理想的には EFSA 科学委員会による規制ガイダンス (環境リスク評価を含む) の開発を支持する。

汚染物質：EFSA は先ごろ、魚介類を中心として食品中に汚染している可能性のあるプラスチック微粒子及びナノ粒子の存在に関する科学的意見を BfR から要求されており、この作業は継続中である。

#### D. 考察

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を確立するため、実験 1) において、低濃度の OVA 及びアジュバントの陽性候補物質としてコレラトキシン (CT, 0.1, 1, 10 µg) を検討し、実験 2-1) においては、各サイズの AgNP (直径 10 nm, 60 nm 及び 100 nm) と卵白アルブミン (OVA, 2 µg) との混合物の経皮感作後、抗原である OVA を腹腔内投与し、実験 2-2) では、経皮感作後、OVA を強制経口内投与を行い、AgNP のアジュバント作用の有無を調べる実験を実施した。その結果、本モデルにおいて、CT は経皮感作性試験のアジュバント陽性物質として有効であることが明らかになったが、AgNP による明らかなアジュバント作用は認めなかった。

26年度の検討においては、皮膚感作性試験のアジュバント陽性対照をとって用いた、Alum及びCTともに明らかなアジュバント効果を示さなかった。Alumは分子量が大きいことで表皮を通過し、アジュバント作用を果たすことが困難と推測された。しかし、CTは消化管の粘膜においては、アジュバント作用が示されており、経口ワクチンのアジュバントとして期待されているが(Holmgren J et al., Vaccine. 1993;11(1179-1184))、経皮感作性試験のアジュバント陽性対照物質として応用するためには更なる検討が必要であると考えられた。26年度の検討では、貼付するOVA抗原の濃度が高かったため、血中のOVA特異的なIgG1及びIgEの産生量が極めて多くなったと考えられ、この状態では感作の促進作用検出には感度が低くなる可能性があった。今年度はOVAの濃度を100 µgから2 µgに変更したところ、Vehicle群及びOVA群と比べ、明らかなOVA特異的抗体IgE、IgG1及びIgG2aの産生増加が認められ、本モデルにおいて、CTは経皮感作試験の陽性アジュバントとして適していることが明らかとなった。そこで、今年度は明らかな皮膚毒性は認めないが、OVA特異的抗体の有意な増加が認められたCT 1 µgを陽性対照アジュバントとして使用した。

上記のように経皮曝露OVAの濃度及び陽性対照アジュバントの改良に加え、2-2)の実験で経口投与するOVAの量を5 mgから100 mgに変更したモデルを用いて、各サイズのAgNPアジュバント作用の有無を調べる実験を実施したところ、昨年度と同様に、AgNPによるアジュバント作用は認めなかった。OVAの経皮感作後、OVAを腹腔内投与した動物においては、Vehicle群と比べ、明らかなOVA特異的抗体産生増加、直腸内体温の低下、血中ヒスタミン濃度増加、アナフィラキシースコアリングの高値及びKi67陽性左腋窩リンパ節濾胞率の増加が認められ、本モデルは皮膚感作後、腹腔内惹起による影響を調べるモデルとして適していることが明らかとなった。しかし、OVAの経皮曝露後、OVAを強制経口投与した動物においては、OVAの量を増やしたにもかかわらず、直腸内体温の軽度の低下はみられたが、血中ヒスタミン濃度及びアナフィラキシー症状のスコアリングの明らかな変化は認められなかった。以前報告されたOVAの経皮曝露後、強制経口投与による惹起による直腸内体温の低下は本試験の結果とほぼ同じ程度であった(Muto T et al., Int. Immunol. 2014; 26 (539-549))。OVAの経皮曝露による

OVA特異的抗体の産生は十分であったことから、明らかな惹起を誘導するには、OVAの強制経口投与条件に更なる検討が必要であると考えられた。

当所生化学部で確立された本モデルは、即時型アレルギー誘発経皮感作モデル実験系で被験物質をマウス経皮曝露後に腹腔内投与によって惹起させることができる。近年、大きな話題になったある特定の小麦タンパク質加水分解物(グルパール19S)を含有する洗顔石鹸(茶のしずく石鹸：医薬部外品)の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告された問題で、本モデルを使用し、グルパール19Sによる経皮感作性が証明された。このモデルを用いた本研究の成果は、ナノ銀の免疫毒性に対する情報のみならず、今後の食品成分関連新規物質の免疫毒性評価法の改良に資するデータが得られ、他の食品関連物質や化学物質の評価に有用な情報になるものとする。

また、昨年度の研究で、OVAの有無にかかわらず10 nm AgNPを腹腔内投与した動物で全例が死亡又は瀕死に陥った。その死因を明らかにするため、雌性BALB/c系マウスを用いて、様々なサイズのAgNP(直径10 nm、60 nm及び100 nm)を腹腔内に投与し、ナノ銀による急性毒性について血清生化学的解析及び病理組織学的解析を主体に検討を行った。

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～黒色素の沈着は、AgNPのサイズに関わらず全てのAgNP投与群で共通に認められたが、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死、脾臓のうっ血、胸腺皮質の単細胞壊死及び肺胞壁の細胞増加、並びにクッパー細胞の暗褐色色素沈着、脾臓のうっ血はAgNP 10 nmの投与6時間群でのみ認められ、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))。AgNP 10 nm 6時間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、ASTの著しい高値及びALTの増加傾向があったことから、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。

ヒト気管支上皮細胞にサイズの異なる AgNP (直径 10、40 及び 75 nm) を添加して培養すると 10 nm 添加群でのみ細胞毒性がみられたが、ROS の産生及び DNA 損傷の明らかな増加は認められなかった (Gluga AR et. al., Particle and Fibre Toxicology. 2014;11 (DOI:10.1186/1743-8977-11-11)。今回の結果からも肝細胞への毒性は明らかになったものの、その程度と ROS の産生量は一致しなかった。有意差は認めなかったが、血清中の ROS の産生量が AgNP 10 nm 6 時間群で増加傾向がみられたことから、死因は肝臓に限らず、全身に及ぼす影響によるものの可能性も考えられ、肝臓及び脾臓にうっ血がみられ、肺胞壁の細胞増加及び胆嚢の浮腫などがみられることから、循環器系の異常による死亡の可能性も否定はできない。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)), 表面化学成分、電荷、コーティングの有無、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示唆されている。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.particleandfibretoxology.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 55.1、9.4、5.3 m<sup>2</sup>/g 及び 2.2E+14、9.1E+11、1.7E+11 particles/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。

一方、ナノ材料の市場での農業/飼料/食品分野における応用と目的の現況において、収集したリストにおける製品の最大数はナノカプセル、銀及び二酸化チタンが占めたが、毒性データはシリカ、酸化チタンおよび銀に限定されている。既に市場に出回っている製品と研究開発途上の製品との比較により、近い将来、農業/飼料/食品分野でのナノテクノロジーの応用は、例えば、食品加工における乳剤およびミセル、ビタミンや栄養成分の送達のためのナノカプセル化、農業における殺虫剤や肥料のカプセル化など、有機ナノ構造体の増加が予測されている。テクノロジーの開発は日々進歩してお

り、ナノ材料の新規および潜在的な応用についての報告が、そのナノ材料の完全且つ不変の物理化学的特性評価や、その摂取のための安全性試験の情報を伴うとは限らない。しかしながら、このような情報は既存や新規のナノ材料の安全な応用を計画的に開発するには不可欠である。

食品表示の規制のため、ある材料をナノ材料とみなす技術的側面に関して、JRC のレポートや NanoDefine プロジェクトにおける研究では、より小さなナノメートル範囲 (約 30 nm 以下) の外形寸法の粒子や複合素材に組み込まれたナノ粒子の測定やサンプリングに課題はあるものの、ナノスケールにおいて質量基準の粒度分布から個数基準の粒度分布への変換は非常に困難なので、粒子サイズや個数を計ることが必要であることが示されている。しかし、製品によって含有量の閾値 (現在 50%) の考え方に違いがあるので、変更の可能性も示唆されているが、体積比表面積 (VSSA) のナノ材料を特定するときの役割や単分子やミセルなど非固体材料についての議論にも今後注目する必要があると考えられた。

EFSA における最近の評価状況においては、既存のバルク物質として知られているマテリアルのナノサイズ粒子についての再評価を中心としてリスク評価が行われているが、まだ新規のナノマテリアルについての評価、申請は行われていないようで、評価において重要な点は毒性影響との関係性を評価するための物性測定や実験手法である。さらに、汚染物質評価に関する新しい話題として、魚介類などへの生物濃縮汚染が懸念されているプラスチック微粒子 (マイクロプラスチック) 及びナノ粒子に関するリスクへの対応が EFSA に諮問されているようである。

## E. 結論

我々が実施した、OVA+AgNP の経皮曝露後、OVA を腹腔内または強制経口投与する本モデルにおいて、抗原濃度及び陽性アジュバントの改良を行ったのにもかかわらず、AgNP の皮膚感作については、明らかなアジュバント作用は認めなかった。また、所属リンパ節の Ki67 陽性濾胞率は感作の指標として有用と考えられた。今後、貼付する AgNP の濃度などさらなる検討が必要であると考えられた。

また、AgNP 10 nm 単回腹腔内投与後 6 時間群において、体温などの臨床症状、血清生化学



的検査及び肝臓の肉眼及び病理組織学的検査で著しい変化が認められた。AgNPのサイズによる毒性の現れ方に違いがあることが明らかとなり、被験物質による肝細胞障害又は循環器不全が死亡原因と関連している可能性が示唆された。しかし、その詳細な機序を解明するにはさらなる検討が必要であると考えられた。

また、国際動向としては、欧州食品安全機関(EFSA)が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワークでは、将来のナノテクノロジーを用いた食品関連製品への対応に備えて、現在市場に存在しているナノ関連製品のリストの収集することを優先的に行っており、収集したリストにおける製品の最大数はナノカプセル、銀及び二酸化チタンが占め、また、最多の用途は食品添加物と食品接触材料であった。また、銀などの無機材料からナノカプセルやナノ複合材料など有機材料へ用途がシフトしていることが示されていた。一方、食品表示の規制においてナノ材料を特定するための技術的な課題はナノスケールにおいて質量基準の粒度分布から個数基準の粒度分布への変換は非常に困難なので、粒子サイズの測定は要求される個数基準とすべきであるが、製品による柔軟な閾値の運用が提言されており、さらに体積比表面積(VSSA)のナノ材料を特定するときの役割や単分子やミセルなど非固体材料についての議論に今後注目する必要があると考えられた。EFSAにおける最近の評価状況においては、既存ナノマテリアルの再評価が中心で、まだ新規のナノマテリアルについての評価は行われていない。

#### F. 健康危険情報 (該当なし)

#### G. 研究発表 (論文発表)

Xu J, Alexander DB, Iigo M, Hamano H, Takahashi S, Yokoyama T, Kato M, Usami I, Tokuyama T, Tsutsumi M, Tamura M, Oguri T, Niimi A, Hayashi Y, Yokoyama Y, Tonegawa K, Fukamachi K, Futakuchi M, Sakai Y, Suzui M, Kamijima M, Hisanaga N, Omori T, Nakae D, Hirose A, Kanno J, Tsuda H. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Sci.* 106:825-32 2015.

(学会発表)

曹永晩、水田保子、豊田武士、赤木純一、平田直、安達玲子、木村美恵、最上(西巻)知子、小川久美子: ナノ銀の経皮曝露によるアジュバント作用のマウスモデル実験系を用いた検討. 第42回日本毒性学会学術年会(2015年6月)

曹永晩、水田保子、豊田武士、赤木純一、平田直、曾根瑞季、安達玲子、木村美恵、最上(西巻)知子、小川久美子: 経皮曝露したナノ銀のアジュバント効果解析. 第32回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2016年1月)

Young-Man Cho, Yasuko Mizuta, Takeshi Toyoda, Jun-ichi Akagi, Tadashi Hirata, Reiko Adachi, Yoshie Kimura, Niahimaki-Mogami Tomoko, Kumiko Ogawa: Evaluation of the adjuvant effects of transcutaneously exposed silver nanoparticles with different size in mouse model. 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2016) (2016.3 New Orleans, LA, USA).

Hirose A, Taquahashi Y, Takagi A, Ogawa Y, Kanno J. Characterization of mesothelioma induction by i.p injection of the MWCNT dispersed with the Taquann method. International Congress on Safety of Engineered Nanoparticles and Nanotechnologies (SENN2015). (2015.4, ヘルシンキ, フィンランド)

Hirose A, Sakamoto Y, Ogata A, Yuzawa K, Kubo, Ando H, Nagasawa A, Nishimura T, Inomata A, and Nakae D. Chronic toxicity by repeated intratracheal administration of MWCNT in rat. The 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. (2015.10. リンボポ州, 南アフリカ)

Kobayashi N, Kubota R, Tanaka R, Takehara H, Naya M, Ikarashi Y, Hirose A: Evaluation of teratogenicity of multi-wall carbon nanotubes in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2015) (2015.3.26 San Diego, CA, USA).

津田 洋幸, 徐 結苟, 酒々井 真澄, 二口 充, 深町 勝巳, 広瀬 明彦, 菅野 純(2015)多種のカ

ーボンナノチューブの短・中期安全性評価手法の提案. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).

菅野 純, 高橋 祐次, 高木 篤也, 小川 幸男, 広瀬 明彦, 石丸 真澄, 今井田 克己 (2015) Taquann 直噴全身暴露吸入によるナノマテリアル有害性評価. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).

藤谷 知子, 猪又 明子, 小縣 昭夫, 安藤 弘, 久保 喜一, 中江 大, 広瀬 明彦, 西村 哲治, 池田 玲子 (2015) マウスにおける多層カーボンナノチューブの胎仔毒性の製品間差. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).

小林 憲弘, 田中 翔, 竹原 広, 納屋 聖人, 久保 田 領志, 五十嵐 良明, 広瀬 明彦 (2015) マウス単回・反復気管内投与による多層カーボンナノチューブの催奇形性の評価. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).

坂本 義光, 小縣 昭夫, 北條 幹, 湯沢 勝廣, 安

藤 弘, 久保 喜一, 長澤 明道, 高橋 博, 広瀬 明彦, 井上 義之, 橋爪 直樹, 猪又 明子, 中江 大 (2015) 多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl N-tert-butyl nitron (PBN) の影響. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).

坂本 義光, 広瀬 明彦, 中江 大 (2015) 多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl N-tert-butyl nitron (PBN) の影響. 第74回日本癌学会学術総会 (2015.10 名古屋).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
(該当なし)
2. 実用新案登録  
(該当なし)
3. その他  
(該当なし)



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(平成27年度)

経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について

研究分担者： 曹 永晩 (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。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。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を確立するため、実験1)において低濃度の卵白アルブミン (OVA) 及びアジュバントの陽性候補物質としてコレラトキシン (CT, 0.1, 1, 10 µg) を用いて評価系を最適化し、その結果をもとに、実験2-1)においては各サイズのAgNP (直径10 nm, 60 nm 及び100 nm) とOVA (2 µg) との混合物の経皮曝露後、抗原であるOVAを腹腔内投与し、実験2-2)においては経皮曝露後、OVAを強制経口内投与を行い、AgNPのアジュバント作用の有無を調べる実験を実施した。実験1)については、いずれのOVA処置群でも、感作4週後のマウス血清中のOVA特異的な血中IgG1及びIgEが溶媒対照群 (Vehicle) 群と比較して有意に増加し、さらにCT処置によって、血清中のOVA特異的な血中IgG1、IgE及びIgG2aがOVA処置群と比較して有意に増加した。一方、Vehicle群と比較してOVA処置群では惹起30分後の体温の有意な低下及び血中ヒスタミン濃度並びにアナフィラキシスコアの有意な高値が認められたが、CT処置による差は認められなかった。実験2-1) 及び2-2) 共に、いずれのOVA処置群でも、感作4週後のマウス血清中のOVA特異的な血中IgG1及びIgEがVehicle群と比較して有意に増加又は増加傾向を示したが、投与群間の差は認められなかった。抗原再曝露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカインIL-2、IL-4、IL-5及びIFN- $\gamma$ 分泌については、群間に有意な変化は見られなかった。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節のKi67陽性濾胞率においては、Vehicle群と比較して全投与群で増加または増加傾向が認められた。実験2-1) については、Vehicle群と比較してOVA群、OVA+60 nm AgNP群及びOVA+100 nm AgNP群では惹起30分後の体温の有意な低下及び血中ヒスタミン濃度並びにアナフィラキシスコアの有意な高値が認められたが、投与群間に有意な変化は見られなかった。実験2-2) については、直腸内体温の変化において、惹起30分後、Vehicle群と比較してOVA群で低下傾向があったものの、いずれの群においても、有意な低下は見られなかった。惹起30分後の血中ヒスタミン濃度測定及び惹起後30分間のアナフィラキシー症状のスコアリング結果、群間に有意な変化は見られなかった。以上の結果から、OVA+AgNPの経皮曝露後、OVAを腹腔内または強制経口投与する本モデルにおいて、AgNPの明らかなアジュバント作用は認められなかった。また、所属リンパ節のKi67陽性濾胞率は感作の指標として有用と考えられた。今後、AgNPの濃度や貼付するOVA抗原の濃度などさらなる検討が必要であると考えられた。

キーワード：ナノ銀、経皮感作性、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ゲン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。

最近、ある特定の小麦タンパク質加水分解物 (グルパール 19S) を含有する洗顔石鹸 (茶のしずく石鹸: 医薬部外品) の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告され、非常に大きな問題となった。我々は、当所生化学部との共同研究で、即時型アレルギー誘発経皮感作モデル実験系を用いると、小麦タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因が経皮感作性に与える影響について解析ができ、被験物質をマウス皮膚曝露後に腹腔内投与によって惹起させると、所属リンパ節の腫大を伴うアレルギー反応を示す事を病理組織学的に見いだしてきた。

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を確立するため、各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) の卵白アルブミン (OVA) との混合物の 1) 経皮曝露後、抗原である OVA を腹腔内投与、2) 経皮曝露後、OVA を強制経口投与し、AgNP アジュバント作用の有無を調べる実験を実施した。

## B. 研究方法

### 実験 1)

動物実験は Adachi ら (*Allergy.* 2012;67

(1392-1399)) の方法に準じて実施した。

抗原懸濁液は低用量の OVA (SIGMA A5503, 2 µg) 及びコレラトキシン (CT, LIST BIOLOGICAL LABORATORIES, INC. #101C, 0.1, 1, 10 µg) を 50 µL /マウスとなるようリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に加えて投与する前に調製した。

動物は、7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 Vehicle 群、② OVA 群、③ OVA + CT 0.1 µg、④ OVA + CT 1 µg、⑤ OVA + CT 10 µg (Figure 1)。8週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より3日間被験物質懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原懸濁液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 µL の抗原懸濁液を浸潤させ剃毛部に貼付した。パッチの上からサージカルテープを巻いてパッチを保護し、さらにマウスの首にエリザベスカラーを装着してパッチの剥脱を防いだ。3日間の感作後にパッチを外し (Day 4)、その後4日間休ませるという操作を1クールとし、4クールの感作後、血中の OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体を ELISA 法で測定した。アレルギー反応の惹起は Day 25 に、感作抗原 1 mg を腹腔内投与して行った。OVA の腹腔内投与 30 分間後のマウスの直腸内体温変化及びアナフィラキシー症状を観察し、症状については基準 (Figure 6) に従ってスコアリングした。また、惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血漿中ヒスタミンの濃度を、Histamine EIA Kit (SPI-BIO) にて測定した。解剖時に採取した脾臓細胞は再懸濁後、OVA (最終濃度 10 µg/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- $\gamma$  の濃度を、BD OptEIA ELISA Sets を用いて測定した。

更に、全身状態観察、体重、腋窩および腸間膜リンパ節重量の測定を行った。病理組織学的検査は、脾臓、曝露皮膚局所、各所のリンパ節について実施し、リンパ組織については、リンパ球の増殖状態を検討した。

### 実験 2-1)

OVA と AgNP の経皮感作後、OVA の腹腔内投与惹起による免疫毒性に関して、AgNP のアジュバント効果及び AgNP のサイズによる影響についても合わせて検討するため、OVA を CT 又は各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm)

を混合して処置する群を設定し、感作及び惹起に関する比較を行った。

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 及び CT 又は AgNP を各々 2、1 及び 49 µg/50 µL /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、7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 Vehicle 群、② OVA 群、③ OVA + CT 群、④ OVA + 10 nm AgNP、⑤ OVA + 60 nm AgNP、⑥ OVA + 100 nm AgNP (Figure 2)。動物実験及び解析は実験 1 と同様に実施した。

#### 実験 2-2)

OVA の感作抗原による惹起の経路を腹腔内投与 (1 mg) から強制経口投与 (100 mg) に変更して実験 2-1 と同様に実施した (Figure 3)。

#### 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 \*又は#  $p < 0.05$ 、\*\*又は##  $p < 0.01$  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並びに強制経口投与が主体であり、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

#### 実験 1)

10 µg CT を浸潤させたパッチの皮膚貼付終了

後、一部の動物の皮膚に発赤が認められたが、他の群における皮膚肉眼病変の明らかな変化はみられなかった。解剖時の脾臓相対重量は群間の明らかな差は認められなかった (Figure 4)。感作 4 週後のマウス血清中の OVA 特異的抗体について、いずれの OVA 処置群でも、血中の OVA 特異的な IgG1、IgE 及び IgG2a が Vehicle 群と比較して有意に増加を示し、いずれの CT 投与群においても OVA 単独群と比較して有意な増加がみられた (Figure 5)。直腸内体温の変化において、惹起 20 分及び 30 分後、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で統計学的に有意な体温の低下が認められた (Figure 6)。30 分後に OVA 群、OVA+CT 0.1 µg、OVA+CT 1 µg 及び OVA+CT 10 µg 群で各々平均 3.3、4.0、3.4 及び 2.9 度の体温低下が認められた。体温が有意に低下した OVA 群及び全ての OVA+CT 群において惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意に増大していた (Figure 6)。また、惹起後 30 分間、アナフィラキシー症状をスコアリングした結果、OVA 群及び何れの OVA+CT 群では平均 2.8 ~ 3.4 と統計学的有意な高いスコアであった (Figure 6)。抗原再曝露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌については、IL-2、IL-5 及び IFN- $\gamma$  において、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 7)。IL-4 においては、OVA 群及び何れの OVA+CT 群でも Vehicle 群と比べ有意な増加が認められたが、全てのデータが検量線下限以下だったため有意な結果と見なされなかった。

皮膚病変のスコアリングを行った結果、Vehicle 群と比較していずれの群においても有意な増加は認められなかった。一方、貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量及び細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の割合 (Ki67 陽性 2 次濾胞の数/濾胞の数 x 100 (%)) については、Vehicle 群と比較して全ての OVA 処置群で増加または増加傾向が認められた (Figure 8、Table 1)。

#### 実験 2-1)

AgNP を浸潤させたパッチの皮膚貼付終了後、一部の動物の皮膚に灰色の着色が認められたが、1 日以上は持続しなかった。解剖時の脾臓相対重量は群間に明らかな差は認められなかった (Figure 9)。感作 4 週後のマウス血清中の OVA 特異的抗体について、いずれの OVA 処置群でも、血中の OVA 特異的な IgG1、IgE 及び IgG2a が Vehicle 群と比較して有意に増加又は増加傾向

を示し、OVA+CT 群の IgG1 及び IgG2a が OVA 群と比較して有意に増加又は増加傾向を示したが、AgNP 投与による影響は認められなかった (Figure 10)。直腸内体温の変化については、惹起 10 分、20 分及び 30 分後、Vehicle 群と比較して全 OVA 群、OVA+CT 群及び何れの OVA+AgNP 群で統計学的に有意な体温の低下又は低下傾向が認められた (Figure 11)。30 分後に OVA 群、OVA+CT 群、OVA+10 nm AgNP 群、OVA+60 nm AgNP 群及び OVA+100 nm AgNP 群では各々平均 4.9、5.1、2.4、2.9 及び 3.8 度の体温低下が認められた。体温が有意に低下した OVA 群、OVA+CT 群及び全ての OVA+AgNP 群においては惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意に上昇していた (Figure 11)。惹起後 30 分間、アナフィラキシー症状をスコアリングした結果、OVA 群、OVA+CT 及び何れの OVA+AgNP 群では平均 2.8~3.4 と統計学的有意な高いスコアであった (Figure 11)。抗原再曝露による経皮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、IL-5 及び IFN- $\gamma$  において、群間に有意な変化は見られなかった。IL-2 においては、OVA+CT 群で Vehicle 群と比べ有意な増加が認められた (Figure 12)。

皮膚病変のスコアリングを行った結果、OVA+CT 群で Vehicle 群と比較して有意な増加が認められた (Figure 13, Table 2)。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量については Vehicle 群と比較していずれの群においても有意な増加が認められなかった。一方、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の割合 (Ki67 陽性 2 次濾胞の数/濾胞の数 x 100 (%)) については、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で増加または増加傾向が認められた (Figure 13)。

#### 実験 2-2)

技術的なトラブルにより OVA+CT 群の 1 匹が 4 週目に死亡した。実験中の体重及び解剖時の絶対及び相対脾臓重量に群間の差は見られなかった (Figure 14)。感作 4 週後のマウス血清中の OVA 特異的抗体について、いずれの OVA 処置群でも、血中の OVA 特異的 IgG1 及び IgE が Vehicle 群と比較して有意に増加又は増加傾向を示し、さらに IgG1 については、OVA 群と比較して OVA+CT 群で有意に高値を示した (Figure 15)。IgG2a については、OVA 群と比較して OVA 群及び OVA+10 nm AgNP 群で有意に増加した (Figure 15)。OVA+10 nm AgNP 群及び OVA+60 nm AgNP 群で IgE 及び IgG2a の有意

な低下が認められた (Figure 15)。直腸内体温の変化について、惹起 30 分後、Vehicle 群と比較して OVA 群で低下傾向があったものの、いずれの群においても、有意な低下は見られなかった。惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度測定及び惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリング結果については、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 16)。

抗原再曝露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を調べたが、IL-2、IL-4、IL-5 及び IFN- $\gamma$  において、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 17)。

皮膚病変のスコアリングを行った結果、Vehicle 群と比較していずれの OVA 処置群でも増加傾向が認められた (Figure 18, Table 3)。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量については Vehicle 群及び OVA 群と比較して OVA+CT 群で有意に高値を示し、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の割合 (Ki67 陽性 2 次濾胞の数/濾胞の数 x 100 (%)) については、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で有意な増加が認められた (Figure 18)。

#### D. 考察

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を確立するため、実験 1) において、低濃度の OVA 及びアジュバントの陽性候補物質としてコレラトキシン (CT, 0.1、1、10  $\mu$ g) を検討し、実験 2-1) においては、各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) と卵白アルブミン (OVA, 2  $\mu$ g) との混合物の経皮感作後、抗原である OVA を腹腔内投与し、実験 2-2) では、経皮感作後、OVA を強制経口内投与を行い、AgNP のアジュバント作用の有無を調べる実験を実施した。その結果、本モデルにおいて、CT は経皮感作性試験のアジュバント陽性物質として有効であることが明らかになったが、AgNP による明らかなアジュバント作用は認めなかった。26 年度の検討においては、皮膚感作性試験のアジュバント陽性対照として用いた、Alum 及び CT とともに明らかなアジュバント効果を示さなかった。Alum は分子量が大きいことで表皮を通過し、アジュバント作用を果たすことが困難と推測された。しかし、CT は消化管の粘膜においては、アジュバント作用が示されており、経口ワクチンのアジュバントとして期待されているが (Holmgren J et al., Vaccine. 1993;11 (1179-1184)), 経皮感作性試験のアジュバント