

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）
総括研究報告書（平成28年度）

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、経皮あるいは静脈内投与試験では脾臓への影響が報告されているものの、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の経皮曝露による、免疫毒性の有無について検討するため、実験1)において直径10 nm AgNP（濃度 0.1 µg、1 µg 及び 10 µg）と卵白アルブミン（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、AgNPのアジュバント作用の有無を調べる実験を実施し、実験2)においては各サイズのAgNP（直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm、濃度 49 µg）とOVA（100 µg）との混合物の経皮曝露後、皮膚の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞に及ぼす影響を調べた。また、26年度及び27年度我々はマウスに直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP を腹腔内投与したところ、AgNP 10 nm を投与した全動物において24時間内の死亡又は瀕死例が認められ、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、脾臓のうっ血及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に観察された。28年度の本研究では、実験3)において、昨年度に行った実験の肝臓サンプルを用いて、肝臓内銀濃度及び活性酸素種（ROS）関連 mRNA の発現を検討し、実験4)においては、10 nm AgNPの急性毒性について、直径 10 nm AgNP を 0.002 mg、0.02 mg 及び 0.2 mg 濃度で、硝酸銀（AgNO₃）を 0.32 mg 濃度で腹腔内投与を行い、AgNPの濃度による影響について検討し、実験5)においては、N-acetyl-L-cysteine（NAC、2000 mg/kg bw）を経口投与1時間後、AgNP 10nm（0.2 mg）を腹腔内投与し、AgNPによる急性毒性に対する抗酸化剤の影響について検討した。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やリスク評価に関する国際動向を調査するため、28年度は、27年度に引き続き、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2016に関する調査を行った。また、2016年に公表された二酸化チタン（E 171）の再評価に関する科学的意見と食品中のマイクロプラスチックおよびナノプラスチックに関するステートメント、および第6回食品容器に関する国際シンポジウムにおける、ナノマテリアルの器具・容器包装に関しての最新開発研究状況や溶出試験の問題点等について情報収集を行った。

その結果、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を示したが、投与群間の差は認められなかった。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・低下傾向及び血中ヒスタミン濃度並びにアナフィラキシースコアの有意な増加・増加傾向が認められた。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、IFN-γ及びIL-17A分泌については、AgNP投与による有意な変化は見られなかった。実験2)については、AgNP曝露による皮膚のランゲルハンス細胞内のバーベック顆粒における明らかな形態学的変化は認められなかった。実験3)については、AgNP 10 nm群の肝臓内銀濃度が他の群に比べ有意な高値を示した。実験4)については、AgNO₃群で投与30分後より立毛及び活動低下が、投与1時間後より有意な体温低下が認められ、投与3時間後より死亡又は瀕死状態になった。AgNP 10 nm 0.2 mg群で投与5時間後より立毛及び活動低下が、投与6時間後より有意な体温低下が認められ、解剖時、肝臓は暗赤色調を呈していた。また、AgNP 10 nm 0.2 mg群及びAgNO₃群で相対肝臓重量の増加が見られた。病理組織学的には、AgNP 10 nm 0.2 mg群及びAgNO₃群で、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に認められた。細胞質内封入体及び胸腺髓質の単細胞壊死はAgNP 10 nm 0.2 mg群でのみ認められた。実験5)については、投与6時間後よりAgNP群で活

動低下が認められ、有意な体温の低下が認められた。投与7時間後より NAC + AgNP 群で活動低下が認められた。解剖時、AgNP 群で肝臓は暗赤色調を呈し、AgNP 群及び NAC + AgNP 群で相対肝臓重量の増加が見られた。病理組織学的には、AgNP 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、胸腺皮質の単細胞壊死及び腸間膜リンパ節傍皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に認められ、NAC + AgNP 群では観察されなかった。AgNP 群及び NAC + AgNP 群で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～黒色素の沈着が高頻度に認められた。

国際動向調査により、以下の知見が得られた。EFSA では、ナノマテリアルを含む可能性のある既存添加物の再評価を行っているが、今回科学的意見の公表された酸化チタン（食品添加物 E171）については、EU の基準ではナノマテリアルとは定義されないもの、ナノサイズ (<100nm) 分画を質量で 3.2%未満含む。再評価の結果は、生殖毒性評価の情報が欠落しているため ADI は設定しなかったが、慢性影響試験の結果からは、現状の暴露調査による暴露量とは、十分なマージンがあると結論付けていた。マクロプラスチックやナノプラスチックの特にシーフードに焦点を当てた食物連鎖を通じた健康懸念については、食品中のマイクロプラスチックの同定および定量に関する報告や、海洋生物における実験的証拠により、栄養段階の間で移動する可能性があることを示した報告があるものの、同定・分析する手法が確立されていないため、まだリスク評価ができる段階でなく、今後の技術開発が必要である。

以上の結果から、OVA+AgNP の経皮曝露後、OVA を腹腔内投与する本モデルにおいては、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、AgNP は皮膚のランゲルハンス細胞に対して明らかな影響を及ぼさなかった。今後、AgNP の形状やコーティングなどさらなる検討が必要であると考えられた。一方、AgNP の腹腔内投与において、10nm 群のみに観察された急性毒性については、被験物質による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、そのメカニズムの一つとして酸化的ストレスの関与が考えられた。しかし、死因に酸化的ストレスが直接関わっていることは考えにくいことから、機序については心筋や神経への患与など更に詳細な検討が必要であると考えられた。国際動向については、食品添加物への応用については、食品への接触面への適用を避けるための三層構造のフィルムへのナノマテリアルの開発が進んでいる。しかし、容器からの食品への溶出を試験する手法に関しては、用いる疑似溶媒の選択により溶出量が異なることや、溶出後の粒子サイズの変化などの条件を考慮する必要があると考えられた。

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、急性毒性、ナノマテリアル、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：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：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

A. 研究目的

ナノマテリアルには、様々な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 (Bergin IL et. al., Int J Biomed Nanosci Nanotechnol. 2013;3. doi: 10.1504/IJBNN.2013.054515.)、経皮あるいは静脈内投与試験では脾臓への影響が報告されている (Korani M et. al., Int J Nanomedicine. 2011;6, 855-862, Schäfer B et.al., Arch Toxicol. 2013;87, 2249-2262)) もの、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。更に、AgNPの経皮曝露濃度による免疫毒性に及ぼす影響に関する報告も乏しい。

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、26年度及び27年度我々は抗原性あるいは卵白アルブミン (OVA) の抗原性に対するアジュバント作用を検討するためマウスに直径 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、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、脾臓のうっ血及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に観察された。本研究では、実験1) において、昨年度に行った実験の肝臓サンプルを用いて、肝臓内銀濃度及び活性酸素種 (ROS) 関連 mRNA の発現を検討し、実験2) においては、10 nm AgNP の急性毒性について、直径 10 nm AgNP を 0.002 mg, 0.02 mg 及び 0.2 mg 濃度で、硝酸銀 (AgNO₃) を 0.32 mg 濃度で腹腔内投与を行い、AgNP の濃度による影響について検討し、実験3) においては、N-acetyl-L-cysteine (NAC, 2000 mg/kg bw) を経口投与1時間後、AgNP 10nm (0.2 mg) を腹腔内投与し、AgNP による急性毒性に対する抗酸化剤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。27年度はEFSAが2010年から主催している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) の動向調査し、国際的なナノマテリアルの評価状況に関する動向を収集した。その中で、EFSA が既存ナノマテリアルの再評価を中心に行っていることと魚介類などへの汚染が懸念されているナノ粒子も含むマイクロプラスチックの検討を行っていることを報告した。28年度は引き続き科学ネットワークの動向を調査すると共に、上記の話題に関して28年度に発表された文書等の最新動向の調査を行うことを目的とした。

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。

卵白アルブミン(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の濃度による影響についても合わせて検討するため、OVAをアジュバントの陽性対照であるコレラトキシン(CT)又は直径10 nm AgNP(濃度10 µg、1 µg及び0.1 µg)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)、濃度1 mg/ml)を用いることとした。抗原懸濁液はOVA及びCTを各々2及び1 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。AgNPは濃度が10 µg、1 µg及び0.1 µg/50 µL/マウスとなるように調整した。

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 + AgNP 10 nm 0.1 µg、⑤ OVA + AgNP 10 nm 1 µg、⑥ OVA + AgNP 10 nm 10 µg。

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。パッチの上からマウス用ジャケットを巻いてパッチを保護し、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 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、IFN-γ及びIL-17Aの濃度を、ELISAフローサイトメトリー法を用いて測定した。

更に、全身状態観察、体重、脾臓重量、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)

平成26年度の動物実験から得られた皮膚標本を用いて皮膚の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞の形態学的変化を電子顕微鏡を用いて検討した。

動物実験は実験1と同様に実施した。

各群は以下の通りに構成した、① Vehicle群、② OVA(100 µg)群、③ OVA + AgNP 10 nm(49 µg)群、④ OVA + AgNP 60 nm群、⑤ OVA + AgNP 100 nm群。

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のイオン化度を調べるために、1 µg Ag/mL濃度で調整したAgNP及びAgNO₃サンプルを超遠心(40,000 g、2時間)し、その上清における銀濃度をICP-MSを用いて測定した。

AgNPを0.2 mg/300 µl/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 6時間群、③ 60 nm AgNP 6時間群、④ 100 nm AgNP 6時間群。腹腔内投与(300 µl/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標本を作製し、病理組織学的検討を行った。肝臓の凍結サンプルを採取し、ICP-MSを用いて銀濃度を測定した。また、採取した肝臓サンプルよりmRNAを抽出し、ROS関連遺伝子(Gstt1、Gpx1、Fmo2)の発現量をリアルタイムRT-PCRにより相対定量した。血清を採取し、心不全のバイオマーカーであるbrain natriuretic peptide (BNP)をキ

ットを用いて測定した。

実験 4)

動物実験は実験 1 と同様に実施した。

各群は以下の通りに構成した、① Vehicle 群、② AgNP 10 nm 0.002 mg 群、③ AgNP 10 nm 0.02 mg、④ AgNP 10 nm 0.2 mg 群。

実験 5)

動物実験は実験 1 と同様に実施した。Citrate (vehicle)や AgNP (10 nm, 0.2 mg/mouse)を腹腔内投与する 1 時間前に NAC (2000 mg/kg bw) を経口投与し、前処置する群を設けた。解剖は vehicle や AgNP を投与した 7 時間後に実施した。

各群は以下の通りに構成した、① Citrate 群、② NAC + Citrate 群、③ AgNP 群、④ NAC + AgNP 群。

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、Dunnett 法あるいは Steel 法により多重検定を行った。病理組織学的所見の発生頻度については、Fischer's exact test による検定を実施し、いずれの検定も $p < 0.05$ 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。

調査研究

27 年度に引き続き 28 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 2016 (Scientific

network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed) に関する調査を行った。また、2016 年の 6 月に公表された食品添加物としての二酸化チタン (E 171) の再評価に関する科学的意見と 2016 年の 5 月に公表された食品中のマイクロプラスチックおよびナノプラスチックに関するステートメント、および 2016 年 11 月に開催された第 6 回食品容器に関する国際シンポジウムにおいて、ナノマテリアルの器具・容器包装に関しての最新開発研究状況や溶出試験の問題点等について情報収集を行った。

C. 研究結果

in vivo 研究

実験 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。実験期間中の体重及び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 週後のマウスにおいて、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、OVA+CT 群の IgG1、IgE 及び IgG2a が OVA 群と比較して有意に増加を示したが、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 群及び全ての 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 + AgNP 10 nm 0.1 μ g 群、OVA + AgNP 10 nm 1 μ g 群及び OVA + AgNP 10 nm 10 μ g 群では各々平均 3.1、3.2、2.5、1.3 及び 2.3 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 群でも平均 2.4~3.0 と統計学的有意な高いスコア又は高い傾向のスコアであった。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結果、IL-5 及び IFN- γ 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 + AgNP 10 nm 0.1 μ g 群及び OVA + AgNP 10 nm 1 μ g 群で、IL-2 においては、OVA + CT 群、OVA + AgNP 10 nm 0.1 μ g 群及び OVA + AgNP 10 nm 1 μ g 群で、IL-17A において

は、Vehicle 群と比べ有意な増加が認められたが、殆どのデータが検量線下限以下であった。OVA + CT 群で Vehicle 群及び OVA 群と比べても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 x 100 (%)) については、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で増加傾向が認められた。

実験 2)

皮膚標本を電子顕微鏡で観察した結果、Vehicle 群と比較していずれの OVA 処置群でもランゲルハンス細胞及びバーベック顆粒の明らかな形態学的な変化は認められなかった。

実験 3)

超遠心上清の銀濃度は AgNP 10 nm 及び AgNO3 で有意な高値を示したが、AgNP 60 nm 及び AgNP 100 nm では vehicle に比べ高い傾向は示したものの統計学的有意な変化は見られなかった。肝臓内銀濃度において、AgNP 10 nm 群では vehicle のみならず、AgNP 60 nm 及び AgNP 100 nm に比べても有意な高値を示した。肝臓における ROS 関連遺伝子の発現について、AgNP 10 nm 群の Fmo2 が有意な低値を示した。また血清を用いて心不全のバイオマーカーである BNP の測定を試みたが、使用したキットの測定限界以下だった (データなし)。

実験 4)

AgNO3 群で投与 30 分後より立毛及び活動低下が、投与 1 時間後より有意な体温低下が認められ、投与 3 時間後より死亡又は瀕死状態になった。AgNP 10 nm 0.2 mg 群では投与 5 時間後より立毛及び活動低下が、投与 6 時間後より有意な体温低下が認められ、解剖時、肝臓は暗赤色調を呈していた。AgNP 10 nm 0.2 mg 群及び AgNO3 群で相対肝臓重量の増加が見られた。病理組織学的には、AgNP 10 nm 0.2 mg 群及び AgNO3 群で、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に認められた。細胞質内封入体及び胸腺髓質の単細胞壊死は AgNP 10 nm 0.2 mg 群でのみ認められた。

実験 5)

投与 6 時間後より AgNP 群で活動低下が認められ、有意な体温の低下が認められた。投与 7 時間後より NAC + AgNP 群で僅かな活動低下が認められた。解剖時、AgNP 群で肝臓は暗赤色調を呈し、AgNP 群及び NAC + AgNP 群で相対肝臓重量の増加が見られた。病理組織学的には、AgNP 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、胸腺皮質の単細胞壊死及び腸間膜リンパ節傍皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に認められ、NAC + AgNP 群ではいずれの病変も観察されなかった。AgNP 群及び NAC + AgNP 群で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～黒色素の沈着が高頻度に認められた。

調査研究

1, 2016 年の食品および飼料におけるナノテクノロジー・リスクアセスメント (EFSA 科学ネットワーク)

EU のリスクアセスメント機関における活動

まず、欧州委員会は、2009 年 1 月 20 日以前に欧州連合 (EU) で承認された食品添加物の再評価を EFSA に要請した。規則 (EU) No 257/2010 はこの再評価の規則を定めており、利害関係者は、EFSA によって開始されたデータ・パブリックコールに従って情報を提出できる。EFSA の ANS パネル (食品添加物及び食品に添加される栄養源に関する科学パネル) は、粉状または粒状の食品添加物の製造プロセスが様々なサイズ/material をもたらすことに留意した。全体として、これらの食品添加物はナノマテリアルとして設計されていないが、バルク材料には意図せず存在するか形成されたナノスケールの材料が含まれる可能性がある。しかし、再評価された食品添加物は、2011 年 10 月 18 日のナノマテリアルの定義 (2011/696/EU) に関する欧州委員会の勧告によると、ナノ物質とはみなされなかった。これは、利害関係者から EFSA に提出された、あるいは公的な文献から集められた粒子サイズ分布に関するデータと食品添加物の特性に関するデータに基づいて結論付けられた。ANS パネルは、食品添加物の仕様を規定している委員会規則 (EU) No 231/2012 には食品添加物の粒子サイズの制限の設定がないと指摘し、粒子サイズおよび粒度分布を再評価された食品添加物の EU 規格に含むよう提案した

農業/食品/飼料製品におけるナノマテリアル

ルのヒトおよび動物リスク評価に関する EFSA ガイダンス

EFSA の科学委員会は、食品および飼料におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する 2011 年ガイダンスを更新するための新しいワーキンググループを設立している。取り組むべき主な課題とこの作業の進展は、毎年ナノネットワーク会議で発表されることになっており、ガイダンス案に関する協議が 2018 年に計画されている。

ECHA (欧州化学品庁) によるガイダンス開発

2012 年に、ECHA は、「ナノマテリアルのための勧告」に関するガイダンスの附属書の形で、情報要件および化学物質安全性評価 (IR&CSA) に関するガイダンスを更新したが、現在、ナノマテリアルに関するガイダンスのための新しいプロジェクトを展開しており、それらのトピックスは以下の通り：(1) 登録の問題とナノフォーム登録に関するガイダンスの新しい附属書、(2) ヒト健康に関する情報要件—現ガイダンスの Chapter R7. a および R7. c の附属書の更新、(3) 環境に関する情報要件—現ガイダンス文書の附属書 Chapter R7. a の Chapter R7. b および R7. c への更新、(4) ナノフォーム間のリード・アクロス—QSAR および化学物質のグループ分けに関する IR&CSA のガイダンスに関する Chapter R6 の新しい附属書。

EU 加盟国における活動

フィンランド：食材中に部分的にナノサイズとして存在する食品添加物の評価結果のリスクコミュニケーションについて、食品/飼料および食品接触材料におけるナノ構造に関しては、天然に存在するナノ構造と人工的ナノマテリアルとを区別することが不可欠である。ナノネットワークは、人工的ナノマテリアルのリスクコミュニケーションには、ケースバイケースのアプローチが必要であるが、一般的に、食品/飼料分野の新技术については、新技术の導入は立法とレギュラトリーサイエンスの進展を通じて慎重なアプローチに従うとした。すべての利害関係者（生産者、規制当局、学者、消費者団体、メディア、政治家など）からなる全国的なワークショップが、いくつかの加盟国で組織されており、現在の最先端および将来の方向性についての協議の効果的なプラットフォームであるかもしれない。

イタリア—ナノマテリアルに関する新規食品規制の実施結果とその安全性評価法について、人工的ナノマテリアルからなる食品は、新

しい欧州規則 (EC) No2015/2283 に基づく新規食品である。ビタミン類、ミネラル類、あるいは人工的ナノマテリアルを含有するかそれらからなる他の物質も新規食品と見なされる：最初にこの規則に従って、次に関連する特定の法律に従い、再評価される。従って、人工的ナノマテリアルには新規食品としての認可が必要となる。EFSA は最新の試験方法がそれらの安全性評価に用いられることを確認する必要があるとしており、試験方法をナノマテリアルに実施する場合、そのナノマテリアルの科学的妥当性については実施者が説明し、実施できる場合にはそのマテリアルの特徴に対応するための技術的適応や調整について実施者が説明すべきであるとしている。

オランダ—ナノフォームのハザード評価に関する新アプローチ (リード・アクロス) および最近の出版物について、ECHA/RIVM/JRC の作業文書には同じ物質だが異なるナノフォームの物質間についてリード・アクロスの段階的アプローチが記載されており、ECHA においてガイダンス作成に使用されている。その際、各ナノフォームの物理化学的特性に関するデータが重要な出発点である。さらに、リード・アクロスによるナノフォーム間の仮説は、動力学とハザードに関するテーマによって実証されるべきである。また、食品や食品サプリメント、練り歯磨きからの二酸化チタン (TiO₂) 及びそのナノフラクシオンのオランダ人における経口摂取量が Rompelberg ら (2016) によって推定された。これは、食品中の Ti と TiO₂ のナノ粒子の測定濃度と、食品の消費データに基づいている。RIVM による最近の別の研究 (Heringa ら、2016) では、ナノ TiO₂ の経口摂取に関するリスク評価が行われ、利用可能な情報に基づく動態学的考察を含む。その動態から、経口吸収量が非常に低い点だけではなく、組織に長期間蓄積することも考慮することが重要と考えられた。オランダの研究では、動物試験における推定臓器レベルとヒトにおける推定臓器レベルとの間にマージンがあるにもかかわらず、種差や個人差、試験期間などの要因を考慮に入れるためにはより大きなマージンが望まれると考えた結果、健康リスクを排除することはできないと結論付けている。これらの結論は食品添加物としての E 171 の使用の EFSA ANS パネルによる再評価中に正当に検討されている。

2、食品添加物としての二酸化チタン (E 171)

の再評価

欧州委員会から欧州食品安全機関（EFSA）への要請に従って、ANS パネル（食品に添加される食品添加物と栄養源に関する科学委員会）は、食品添加物として使用される場合の二酸化チタン（TiO₂、E 171）の安全性を再評価する科学的意見を提供するように求められた。

TiO₂ は、欧州連合（EU）において食品添加物として認可された食品着色料である。これは、1975 年および 1977 年に食品科学委員会（SCF）によって、1969 年には FAO/WHO 合同食品添加物委員会（JECFA）によって評価されている。JECFA は 1969 年に一日摂取許容量（ADI）を「適正製造基準を除き、制限されない」とした。SCF は、1975 年に TiO₂ の ADI を確立しなかったが、1977 年には「ADI が確立されていないが食品に使用できる着色料」のカテゴリーに TiO₂ を含めた。

自然界では TiO₂ は様々な結晶形で存在する。アナターゼおよびルチルは、2 つの最も重要な自然形態である。食品添加物 TiO₂（E 171）は、白色～わずかに着色した粉末であり、水および有機溶媒に不溶である（Commission Regulation（EU）No 231/2012）。ANS パネルは、利害関係者から提供されたデータや文献によると食品添加物としての TiO₂（E171）はナノマテリアルの定義に関する EU 勧告に従ってナノマテリアルとはみなされないとした。

吸収、分布、排泄に関する利用可能なデータから、ANS パネルは以下の結論を出した。

- ・ 経口投与された TiO₂ の吸収は極めて低い。
- ・ TiO₂ のバイオアベイラビリティ（粒子またはチタンとして測定）は低い。
- ・ チタンとして測定されたバイオアベイラビリティは、粒子サイズとは無関係と思われる。
- ・ TiO₂ の経口投与の大部分は、糞便中に無変化で排泄される。
- ・ 経口摂取された TiO₂ のうち、少量（最大 0.1 %）が腸管関連リンパ組織（GALT）によって吸収され、続いて様々な臓器に分布される。これらの臓器からの排泄速度は可変であった。

ANS パネルはさらに、動物およびヒトには相当量の、非常に変化しやすいバックグラウンドレベルのチタンが存在し、このことが報告されたチタンの取り込みの低レベルでの分析において課題を示し、報告された所見の解釈を複雑にする可能性がある」と結論した。

ANS パネルは、経口摂取された TiO₂ 粒子（マイクロ及びナノサイズ）が *in vivo* 遺伝毒性を

示す可能性は低い、と結論付けた。

生殖系への毒性影響は非食品グレードまたは特徴付けの不十分なナノマテリアル（すなわち、E171 ではない）を用いて実施された試験のうちいくつかで確認されているとした。食品添加物（E 171）については、生殖エンドポイントに関する利用可能だが限られたデータベースにおいて毒性影響は見られなかった。パネルは、食品添加物の提出のためのガイダンス（EFSA ANS Panel, 2012）にある拡張 90 日間試験の欠如や、食品添加物（E 171）を用いた多世代または拡張一世代生殖毒性試験がないことから、最終的な結論に達することができなかった。したがって、ANS パネルは ADI を確立しなかった。ANS パネルは、マウスおよびラットでの TiO₂ の発がん性試験から、ラットのオスの 2,250 mg TiO₂/kg bw/day を最も低い無毒性量（NOAEL）に選択した。ANS パネルは、以下の点を考慮して、ADI が確立されるべきではなく、安全マージン（MoS）アプローチが適切であると考えた。

- ・ 食品添加物 E171 は、主にマクロサイズの TiO₂ 粒子からなるが、ナノサイズ（<100nm）分画を質量で 3.2% 未満含む。
- ・ 経口投与されたマイクロサイズとナノサイズの TiO₂ 粒子において、吸収、分布、排泄に差異は観察されない。
- ・ 最高用量までいかなる毒性も認められなかった長期間試験の結果に基づき、吸収された粒子の最終的な蓄積に起因する悪影響はないと思われる。
- ・ 利用可能な生殖毒性試験の制限に起因する毒物データベースの不確実性。

食品添加物として使用される TiO₂（E 171）の食事曝露を評価するため、曝露量が次に基いて計算された：EFSA に提供されたデータセットに基づき、パネルは異なる仮定に基づいて 2 つの詳細な曝露推定値を算出した。同じブランドを買い続ける消費者のシナリオとブランドに拘らない消費者のシナリオである。

一方、最高曝露量評価シナリオでは、推定曝露量の平均値は乳児/高齢者の 0.4 mg/kg bw/day から子供の 10.4 mg/kg bw/day の範囲であった。推定曝露量の 95 パーセンタイル値は高齢者の 1.2 mg/kg bw/day から子供の 32.4 mg/kg bw/day の範囲であった。

ANS パネルは、特定の食品カテゴリーへのブランド信仰を特定していないことから、一般的集団をカバーするブランドにこだわらない消

費者のシナリオがリスク特性評価のためのより適切かつ現実的なシナリオであると考えた。そこで、入手可能な毒性学的データにおいて特定された NOAEL 2,250 mg TiO₂/kg bw/day とこの案で考慮された TiO₂ (E 171) の報告された使用/分析レベルから得られた曝露データを用いて計算された MoS の最小値は 100 を超えていた。

非遺伝毒性及び非発がん性化合物について、NOAEL や BMDL との間に 100 以上の MoS があり、予測された曝露量は個人差や種差による外挿での不確実性要因を十分に説明できると考えられたため、ANS パネルは、現在入手可能なデータベースと TiO₂ の吸収に関する考察、使用可能な毒性学的データとこの案で考慮された TiO₂ (E 171) の報告された使用/分析レベルから得られた曝露データを用いて計算された MoS には懸念がないとした。

ANS パネルは、E 171 の生殖毒性に関する確実で信頼性の高いデータが得られた時点で、完全なデータセットによりパネルが健康影響に基づく指標値 (ADI) を確立することが可能になる、と結論した。

3. 食品中のマイクロプラスチックおよびナノプラスチック (ステートメント)

ドイツ連邦リスク評価機関 (BfR) の要請により、食物連鎖における汚染物質に関する EFSA パネル (CONTAM パネル) は、特にシーフードに焦点を当てた食品中のマイクロプラスチックおよびナノプラスチックに関するステートメントを提出するよう求められた。

シーフードを含む食品中のマイクロプラスチックの同定および定量化のための方法が文献に報告されている。しかし、それらの研究の中には、空気や装置からの汚染を避けるための品質保証の記載がなく、また、粒子がどのように「プラスチック」であると同定されるかについて明確でないものもある。マイクロプラスチックの記載法は以下の手順の 1 つ以上を含む：

(i) 生体物質の抽出および分解、(ii) 検出および定量化 (計数) (iii) プラスチックの特性解析。記載された生体物質分解法には、ある種のプラスチックがある程度分解される欠点を持つものがある。計数は肉眼または顕微鏡を用いて試料を検査することによって行われる。文献ではマイクロプラスチックは、マイクロファイバー、フィルム小球体、及びフラグメントビーズ、フィルムなどのいくつかの方法で分類ま

たは命名されている。

海洋生物における実験的証拠は、マイクロプラスチックが栄養段階の間で移動する可能性があることを示している。魚粉が家禽生産や養豚に使用されるため、マイクロプラスチックは非海産食品に行きつく可能性がある。食品中のマイクロプラスチックの存在に関しては、限られたデータしか入手できない。利用可能なデータは、魚、エビ、二枚貝などのシーフードから、また、蜂蜜、ビール、食卓塩などの他の食品からも得られる。シーフードにおけるマイクロプラスチックの含有量を求めた研究では、マイクロプラスチック含有量は異なる単位 (例えば、海洋生物あたりの粒子数、g 湿重量あたりの粒子数) で与えられているため、結果の比較は必ずしも可能ではない。海洋生物のマイクロプラスチック濃度は胃、消化管または消化管全体で決定される。魚では 1 匹あたりの平均粒子数は 1~7 である。エビでは平均 0.75 粒子/g である。二枚貝では粒子数の平均値は 0.2~4 (中央値)/g である。蜂蜜について報告されたマイクロプラスチックの平均含有量は 0.166 繊維/g 及び 0.009 断片/g である。ビールでは 1 mL あたり 0.025 繊維、0.033 断片及び 0.017 顆粒である。食卓塩についてマイクロプラスチックの含有量は 0.007~0.68 粒子/g である。

マイクロプラスチックは平均 4% の添加剤を含有することができ、また、プラスチックは汚染物質を吸着することが可能である。添加剤および汚染物は共に有機質や無機質で存在し、一般的に受け入れられる分析法を用いて決定することが可能である。汚染物質 (例えば難分解性有機汚染物質 (POPs)) の栄養移行が報告されており、生物濃縮がみられた。また、消化管におけるマイクロプラスチックの運命に関する情報が不足している。毒物動態に関する利用可能なデータには吸収と分布のみが含まれ、代謝と排泄に関する情報はない。150 μm 未満のマイクロプラスチックのみが腸上皮を通過して移行し、全身曝露を引き起こす可能性がある。さらに、微生物叢を含む消化管におけるマイクロプラスチックの局所影響に関する知識が欠如している。このようなマイクロプラスチックの影響に関する毒性データが、ヒトのリスクアセスメントには基本的に不足している。

マイクロプラスチックについて、その存在や同一性を評価し、食品中の量を定量化するため、分析法をさらに開発し、標準化することが推奨される。品質保証の実施と実証が必要である。

特に、より小さい粒子について、消化管における局所影響に関する研究を含む、動態および毒性に関する研究が必要である。ヒト消化管におけるマイクロプラスチックの分解およびナノプラスチック形成の可能性に関する研究が必要である。

ナノプラスチック

国際的に認められたナノマテリアルの定義に基づいて、ナノプラスチックはナノスケール（0.001~0.1 μm ）の任意の外形寸法を有する材料、あるいはナノスケールの内部構造または表面構造を有する材料として定義することができる。

一般に、この文章でカバーされる分野すべてのナノプラスチックに関する情報は、ほとんどまたは全く存在しない。

ナノプラスチックは、例えば工業プロセスにおいて、マイクロプラスチック破片の破砕中に作られたり、使用される工業用材料から生じたりする。

食品中のナノプラスチックの同定と定量化のための分析法は存在しないため、食品中の発生データは完全に不足している。一般にナノマテリアルに適用する分析法が応用できることが期待される。

シーフード加工中のナノプラスチックの運命に関する利用可能な文献はない。ナノプラスチックは、この問題に関する利用可能な文献はないが、食品そのもの以外の供給源（例えば、加工助剤、水、空気、または機械、設備、繊維製品からの放出物）に由来する可能性が高い。したがって、加工中にナノプラスチックの量が増加する可能性がある。プラスチックの量に関する他の加工（例えば、調理やベーキング）の影響は不明である。

消化管におけるナノプラスチックの運命に関する情報が不足している。毒物動態に関する利用可能なデータには吸収と分布のみが含まれ、代謝と排泄に関する情報はない。摂取されたマイクロプラスチックが消化管で分解してナノプラスチックになるか不明である。人工ナノマテリアルには毒性影響を示すものがあるが、ナノプラスチックの毒性データはヒトのリスクアセスメントには基本的に不足しており、また、あるナノマテリアルから他のナノマテリアルにデータを外挿することはできない。ナノプラスチックは細胞に入ることができるが、ヒト健康への影響は不明である。

ナノプラスチックについて、その存在や同一性（形状を含む）を評価し、食品中の量を定量化するため、分析法を開発し、標準化することが推奨される。品質保証の実施と実証が必要である。食事曝露を評価するため、食品中の発生データを生成する必要がある。動態および毒性に関する研究が必要である。

4. 第6回食品容器に関する国際シンポジウム

4年毎に開催される本シンポジウムでは、食品用途の器具・容器包装におけるナノマテリアルの開発状況と器具・容器包装からの溶出試験等に関しての様々な研究が報告されていた。

器具・容器包装からの溶出試験については、理論的にはポリマーのマトリックスに対してナノマテリアルはかなり大きいので、ポリマー内での移動速度や溶出速度は著しく低いと考えられている。しかし、特にナノ銀に関しての最近の溶出試験の報告を検討してみると、様々な結果が報告されており一様な解釈が難しいと考えられる。一般的に酢酸などの疑似溶媒を使用した方が、アルコールや有機溶媒を使用した場合よりも溶出量が多い傾向があるが、その場合には、ナノ銀からの銀イオンとしての溶出が促進することによるものと思われる。その場合には、測定法に依存して ICM-MS などにより銀原子の量を測定するか、シングルパーティクル ICP-MS などのように粒子としての銀原子の量を測定し、溶出時の形態を判別することが可能である。しかし、溶媒測定時の酸化状態如何では、イオン化した銀イオンが、それ自身あるいは他の粒子成分などと反応して、溶出溶媒中に粒子として産生することも報告されている。このことは、上記の方法だけでは、ナノ銀粒子の溶出形態を推定することは困難であり、測定された粒子の元素分析などさらなる解析が必要であることを示している。一方、ポリマー内でも化学的安定性の高いカーボンブラックや酸化チタンについては、器具・容器包装からの溶出は、粒子とイオンの形状を問わず、ほとんど報告されていない。

一方、器具・容器包装へのナノマテリアルの利用に関しては、まだ本格的な市場化には至っていないが、より機能性を付加した器具・容器包装の開発が進んでいる。ポリ乳酸はバイオベースの器具・容器包装のプラスチックとして最も関心が高い基材であるが、低い耐性や低いガスバリアー性の問題を抱えており、機能改善のためのナノマテリアルの利用の研究が進めら

れている。しかし、欧州では食品に直接接触する基剤におけるナノマテリアルの利用が制限されているところでもある。そこで、三層構造のポリ乳酸フィルムの中層に、ナノマテリアルを使用しその機能を生かしながら、安全性の懸念も回避できる製品の開発が進んでいる。また、同じ3層構造の特徴を生かして、ポリエチレンを基材としたフィルムに抗酸化・ラジカルスカベンジャー機能などを付加するためナノセレンを利用する研究開発も進んでいることが報告されていた。

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)においては、直径10 nm AgNP(濃度10 µg、1 µg及び0.1 µg)と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、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2)においては各サイズのAgNP(直径10 nm、60 nm及び100 nm、濃度49 µg)とOVA(100 µg)との混合物の経皮曝露後、皮膚の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞に及ぼす影響を調べた。その結果、本モデルにおいて、AgNPによる明らかなアジュバント作用及びランゲルハンス細胞への影響は認めなかった。

26年度及び27年度の検討においては、異なるサイズのAgNPのアジュバント効果を調べたが、いずれのサイズのAgNPにおいても、明らかなアジュバント効果を示さなかった。28年度は濃度によるAgNPのアジュバント効果の有無について調べた。当所の研究により、他の金属ナノマテリアルは低濃度の方でより強いアジュバント効果を示す結果が得られている(所内他部の未公開データ)。アジュバントは必ずしも高濃度である必要はなく、抗原性を最大限発揮できる抗原との比があると推測される。しかし、我々が検討したナノ銀の濃度の範囲内では明らかなアジュバント作用は認められなかった。今後さらに広範な濃度での検討は必要であると考えられた。

ランゲルハンス細胞は骨髄由来の樹状細胞で、皮膚などの重層扁平上皮細胞に特有の抗原提示細胞である。トノフィラメントを欠き、デスモソームなどの細胞接着構造を持たず、遊走性である。電子顕微鏡で観察すると細胞質に線維成分は少なく、特異的な”テニスラケット状”の切断面を持つバーベック顆粒を持つ。バー

ベック顆粒はゴルジ装置由来とも細胞膜由来ともいわれており、細胞内の抗原輸送を担っている(あたらしい皮膚科学、清水 宏、中山書店)。ランゲルハンス細胞に有毒な物質はバーベック顆粒に形態学的異常を及ぼす報告もある(Kanerva L, Am J Dermatopathol. 1990 12 (51-62))。ナノマテリアルによる影響についての報告は見当たらない。

26年度及び27年度の研究において、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、経口投与するOVAの濃度を5 mgから100 mgに変更したモデルを用いて、サイズの異なるAgNPの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、AgNPによるアジュバント作用は認めなかった。今年度はナノ銀のサイズではなく濃度に着目してアジュバント作用の有無を調べたが、以前と同様に、明らかな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及びアナフィラキシスコアリングの高値が認められ、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、本モデルの陽性対照物質であるCTは毒物であり、使用に制限が多いことから、無毒な陽性対照が望ましい。CTは有毒なサブユニットA(CTA)と無毒なサブユニットB(CTB)で構成されており、CTBは有望なアジュバントとして期待されていることから、今後、CTBを用いた検討が必要であると考えられた(Stratmann T, Vaccine (Basel). 2015; 3 (579-596))。

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考えられる。

26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。27 年度の研究では経時的観察を行い、急性毒性の再現性、血清生化学的解析及び病理組織学的解析を主体に検討した。本年度は、その死因を明らかにするため、実験 3) では肝臓内銀濃度及び活性酸素種 (ROS) 関連 mRNA の発現を検討し、実験 4) では AgNP の濃度による影響について検討し、実験 5) では抗酸化剤の影響について検討した。

AgNP の濃度による検討において、AgNP 10 nm 0.2 mg 群及び AgNO₃ 群の肝臓及び胸腺でのみ、病変が有意な高頻度に認められ、体温の低下も見られたが、AgNP 10 nm 0.002 mg 及び AgNP 10 nm 0.02 mg 群では見られなかった。Balb/c マウスに AgNP の急性毒性は少なくとも AgNP 10 nm 0.02 mg 以上が必要と考えられた。Balb/c マウスに腹腔内投与した AgNP 20nm による急性毒性に関する報告があったが (Elkhawass E. A. et. al., *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;6 (9810-9817))、急性毒性を誘発する量 (214 mg/kg bw) は我々が 27 年度の研究で用いた投与量 (9.9-12.3 mg/kg bw) に比べはるかに多かった。AgNP の急性毒性に関してはサイズの僅かな差によっても毒性の表現型が大きい差を示す可能性が考えられる。

AgNO₃ は腐食性があり、マウスの LD₅₀ (腹腔内投与) は 17~24 mg/kg である。本研究で使われた AgNO₃ の投与量は約 16 mg/kg であったことから、強い急性毒性が現れたと考えられる。明らかな死因は不明だが、褐色~黒色素の沈着を除くと肝臓及び胸腺などの病変は AgNP と類似していた。

昨年の結果から AgNP のサイズの相違が死亡の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はされていない (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 はリンパ管を介して拡散した可能性が考えられた。また、肝臓にうっ血が認められたことから、右心主体の循環障害が死亡原因と関連している可能性が考えられ、死因に関しては心筋細胞や神経細胞に直接作用した毒性メカニズムについても検討する必要がある。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 (Gliga AR et. al., *Particle and Fibre Toxicology*. 2014;11

(DOI:10.1186/1743-8977-11-11)) と報告されている。今回、肝臓の ROS 関連遺伝子 mRNA の発現において明らかな発現上昇はみられなかった。27 年度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る。肝臓及び脾臓にうっ血がみられ、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。

実験 1) の結果から、超遠心上清の銀濃度及び肝臓内銀濃度において、他のサイズの AgNP に比べ AgNP 10 nm で明らかに高い値を示した。AgNP による毒性の主体が銀イオンなのか、ナノ粒子なのか不明であるが、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.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 55.1、9.4、5.3 m²/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。表面積とイオン化度の関連が示唆されている。

AgNP 10 nm 群において酸化ストレスに関連した遺伝子の発現上昇は認められなかった。AgNP による毒性メカニズムは酸化ストレスによるとの報告もみられるが、その詳細は不明である (McShan D et. al., *Journal Food Drug Analysis*. 2014;22 (116-127))。AgNP の毒性がナノ粒子によるものなのか銀イオンによるものなのかについても議論が続いている (Reidy B et. al., *Materials*. 2013;6 (2295-2350))。しかし、抗酸化剤の投与によって AgNP による

毒性が著しく抑制できたことは、少なくとも一部は酸化ストレスによる AgNP の毒性メカニズムを支持すると考えられた。メカニズムの解明のために、本研究においても ROS 関連たんぱく発現の検討及び作用メカニズムの違う抗酸化剤による検討が必要と考えられる

また、国際動向調査において、粉状または粒状の食品添加物は製造プロセス上様々なサイズのものができることから意図せずになノスケールの材料が含まれる可能性があるということから、既存添加物の再評価を行ってきているが、今回科学的意見の公表された酸化チタン（食品添加物 E171）について、EU のナノマテリアルの定義上は、ナノマテリアルとは認められなかったもののナノサイズ（ $<100\text{nm}$ ）分画を質量で 3.2%未満含み、詳細なリスク評価が行われた。生殖発生毒性に関するデータ欠落のため ADI は設定しなかったが、慢性影響試験の結果からは、現状の暴露調査による暴露推定量とは、十分なマージンがあると結論付けている。しかし、フランス国立農学研究所（INRA）の研究者らは、添加物である二酸化チタン（E171）の経口曝露の影響を研究し、E171 が動物の腸関門を通過し、身体の他の部分に到達することを初めて報告しており、ナノサイズの E171 粒子の吸収に関連する免疫系障害が観察された。また、慢性経口曝露は曝露された動物の 40%において結腸に発がんの非悪性段階である前がん病変を誘発することと、プロモーション作用も有していることが報告されており、生殖発生毒性影響に関する試験だけでなく、免疫影響や発癌作用に対する特に慢性曝露による影響も、特にナノサイズの酸化チタンに対して行っていく必要があると考えられる。

マイクロプラスチックやナノプラスチックの特にシーフードに焦点を当てた食物連鎖を通じた健康懸念については、食品中のマイクロプラスチックの同定および定量に関する報告や、海洋生物における実験的証拠により、栄養段階の間で移動する可能性があることを示した報告があるものの、マイクロプラスチックについての存在、プラスチックとしての同定法や同一性の評価手法、定量化のために分析法がまだ確立されておらず、定量的なリスク評価が困難であることが示されている。また、定量化手法が確立されていないので、食物連鎖や移動への影響評価の際に、消化管をどの程度通過して影響を示すかについての評価も困難である。ナノプラスチックについては、まだ、ナノプラスチック

の運命に関する利用可能な文献はないが、体内への吸収性についてはマイクロプラスチックよりは容易であろうという推測は成り立つが、こちらも生体中で定量的に測定する技術が確立していないので、マイクロプラスチック同様に、今後の分析法の開発の必要性が指摘されている。ナノマテリアルの食品添加物への応用については、食品への接触面への適用を避けるための三層構造のフィルムへのナノマテリアルの開発が進んでいる。しかし、容器からの食品への溶出を試験する手法に関しては、用いる疑似溶媒の選択により、溶出量が異なることや、溶出後の粒子サイズの変化などの条件を吟味する必要があり、溶出物の安全性評価のためには試験法の改良が必要であることが指摘されていると考えられた。

E. 結論

我々が実施した、OVA + AgNP の経皮曝露後、OVA を腹腔内投与する本モデルにおいて、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、AgNP は皮膚のランゲルハンス細胞に対して明らかな影響を及ぼさなかった。今後、AgNP の形状やコーティングなどさらなる検討が必要であると考えられた。

AgNP の腹腔内投与による急性毒性について、AgNP 10 nm 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 はサイズにより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傷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、国際動向調査において 28 年度は、27 年度に引き続き、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 2016 に関する調査を行った。また、2016 年に公表された二酸化チタン（E 171）の再評価に関する科学的意見と食品中のマイクロプラスチックおよびナノプラスチックに関するステートメント、および第 6 回食品容器に関する国際シンポジウムにおける、ナノマテリアルの器具・容器包装に関しての最新開発研究状況や溶出試験の問題点等について情報収集を行った。EFSA では、ナノマテリアルを含む可

能性のある既存添加物の再評価を行ってきているが、今回科学的意見の公表された酸化チタン（食品添加物 E171）については、EU の基準ではナノマテリアルとは定義されないもの、ナノサイズ（<100nm）分画を質量で 3.2%未満含む。再評価の結果は、生殖毒性評価の情報が欠落しているため ADI は設定しなかったが、慢性影響試験の結果からは、現状の暴露調査による暴露量とは、十分なマージンがあると結論付けていた。マクロプラスチックやナノプラスチックの特にシーフードに焦点を当てた食物連鎖を通じた健康懸念については、食品中のマイクロプラスチックの同定および定量に関する報告や、海洋生物における実験的証拠により、栄養段階の間で移動する可能性があることを示した報告があるものの、同定、分析する手法が確立されておらず、まだリスク評価ができる段階でないため、今後の技術開発が必要である。食品添加物への応用については、食品への接触面への適用を避けるための三層構造のフィルムへのナノマテリアルの開発が進んでいる。しかし、容器からの食品への溶出を試験する手法に関しては、用いる疑似溶媒の選択により溶出量が異なることや、溶出後の粒子サイズの変化などの条件を考慮する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報 (該当なし)

G. 研究発表 (論文発表)

Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Alexander WT, Jiegou X, Tsuda H., Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci.* 107, 924-935. 2016.

Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Hirose A, Sato K., Phagocytosis-dependent and independent mechanisms underlie the microglial cell damage caused by carbon nanotube agglomerates. *J Toxicol Sci.* 41,

501-509. 2016.

(学会発表)

曹永晚, 水田保子, 豊田武士, 赤木純一, 曾根瑞季, 安達玲子, 木村美恵, 最上(西巻)知子, 小川久美子: マウス経皮曝露モデルにおけるコレラトキシンのアジュバント作用の検討. 第43回日本毒性学会学術年会(2016年6月)

曹永晚, 赤木純一, 水田保子, 豊田武士, 小川久美子: BALB/cマウスにおけるナノ銀の腹腔内投与による急性毒性はサイズによって異なる. 第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2017年1月)

Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Ogawa K: Acute toxicity of intraperitoneally administered silver nanoparticles of varying sizes in mice. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2017.3 Baltimore, MD, USA)

Akihiko Hirose, Yoshimitsu Sakamoto, Tomoko Nishimaki-Mogami, Yuhji Taquahashi, Takashi Yamada, Tetsuji Nishimura, Akiko Inomata, Dai Nakae, Hiroyuki Tsuda and Jun. Analysis of size-dependent carcinogenic potential of multiwalled carbon nanotubes. *Global Cancer: Occurrence, Cause, and Avenues to Prevention. IARC 50th Anniversary Conference (2016.6), Lyon, Poster.*

Hirose A, Cui H, Ema M, Kanno J, Tsuda H, Nishimaki-Mogami T, Comparison with the NLRP3 inflammasome activations in THP-1 cells by various nanomaterial. 第14回国際毒性学会(ICT2016), (2016.10), Merida, Mexico, Poster.

北條幹, 坂本義光, 山本行男, 長谷川悠子, 多田幸恵, 久保喜一, 長澤明道, 海鉾藤文, 高橋博, 湯澤勝廣, 安藤弘, 田中和良, 矢野範男, 藤谷知子, 小縣昭夫, 猪又明子, 広瀬明彦, 中江大: MWCNTによるラット中皮腫誘発過程の経時的解析. 第43回日本毒性学会学術年会(2016年6月29日~7月1日)名古屋市

坂本義光, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を経気管反復投与したラットに見られた肺胞過形成病変に関する病理組織学的

解析. 第 75 回日本癌学会学術総会(2016 年 10 月 6 日～8 日)横浜市

Tsuda H, Xu J, Alexander DB, Alexander WT, Mohamed Abd El-gied, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Takahashi S, Ohnishi M, Hirose A, Kanno J, Development of a series of assay model of toxicity and carcinogenicity of carbon nanotubes. 2016 Korean Association for Laboratory Animal Science, 慶州, Korea, Aug. 24-26, 2016

Yamada T, Tanaka Y, Hasegawa R, Sakuratani Y, Yamada J, Kamata E, Ono A, Yamazoe Y, Mekenyan O, Hayashi M, Hirose A., Development of a case study on the read-across assessment of hepatotoxicity of allyl esters for OECD IATA case study project in 2015. The 52nd Congress of the European Societies of Toxicology, Seville, Spain, Sep 04-07, 2016.

Tsuda H, Alexander DB, Alexander WT, AbdElgied M, ELGazzar A, Xu J, Numano T, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Hirose A, Kanno J, Development of a Mechanism Based Short-term Assay Protocol to Test Carcinogenicity of Multiple Wall Carbon Nanotubes (MWNCTs) in the Rat. XIV International Congress of Toxicology, Merida, Mexico, Oct. 2-6, 2016

Kobayashi N, Tanaka S, Ikarashi Y, Hirose A., Developmental toxicity assessment of various sizes of multiwall carbon nanotubes in mice after repeated intratracheal instillation to initiate grouping and read

across. Society of Risk Analysis 2016 Annual Meeting. San Diego, U.S.A., Dec 11-15, 2016.

北條幹, 坂本義光, 山本行男, 長谷川悠子, 多田幸恵, 湯澤勝廣, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大: 多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発過程の経時的観察. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会(2017 年 1 月 26 日～27 日)堺市
坂本 義光, 北條 幹, 広瀬 明彦, 猪又 明子, 中江 大:ラットにおける多層カーボンナノチューブ (CNT) の発がん性と phenyl N -tert-butyl nitron (PBN) 併用が及ぼす影響. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会(2017 年 1 月 26 日～27 日)堺市

寺田央子、加藤雄大、橋口誠子、権藤喜貴、広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 チタン酸カリウム曝露の RSV 肺炎への影響 日本薬学会第 137 年会、27PB-am155、 2017 年 3 月、仙台国際センター

渡辺 渡、権藤喜貴、橋口誠子、加藤雄大、広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦 多層型カーボンナノチューブ曝露による RSV 感染初期応答への影響 日本薬学会第 137 年会、27PB-am154、 2017 年 3 月、仙台国際センター

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)