

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）
総合研究報告書（平成26～28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。本研究では、AgNPの経皮経口複合曝露による免疫毒性及びアジュバント作用の有無について検討する評価方法を確立し、安全性について評価するため各種実験をおこなうと共に、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した。

平成26年度は、実験1-1)において、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）との混合物の経皮曝露後、抗原であるOVAを腹腔内投与（アジュバントの陽性対照としてAlumを使用）し、実験1-2)において、経皮曝露後、OVAを強制経口内投与（アジュバントの陽性対照としてコレラトキシン（CT）を使用）し、実験1-3)においてはOVAとの混合物あるいはAgNP単独の腹腔内投与（アジュバントの陽性対照としてAlumを使用）を行い、AgNPのアジュバント活性の有無を調べる実験を実施した。

平成27年度は、本実験モデルの陽性対照のさらなる最適化を図るため、実験2-1)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2-2)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2-3)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2-4)においては様々なサイズの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。

平成28年度は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3-1)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3-2)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。実験3-3)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3-4)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3-5)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。

国際動向については、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規制動向や使用状況と食品および飼料中、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を行った。27年度は 欧州食品安全機関（EFSA）が主催す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において議論された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と、製品中のナノマテリアルの最適な測定法に関する情報と、EFSAによるナノ材料のリスク評価の活動を調査した。28年度は、EFSAが行っている評価活動のうち、ナノマテリアルを含む既存食品添加物の再評価として公表された酸化チタンの評価意見に加えて、近年、環境経由の曝露懸念が指摘されているマイクロ/ナノプラスチックに関するEFSAの見解と最新の器具・容器包装へのナノマテリアルノ開発状況についての調査を行った。

その結果、実験 1-1) 及び 1-2) 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 が溶媒対照群 (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- γ 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 Ki67 陽性のリンパ節の濾胞の数においては、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 1-1) について、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ー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。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が認められなかった。実験 1-2) について、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。皮膚病変のスコアリングを行った結果、Vehicle 群と比較して OVA + 100 nm AgNP 群で有意な増加が認められた。また、実験 1-3) については、OVA の有無にかかわらず 10 nm 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。60 nm 及び 100 nm 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 + 60 nm 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 再曝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。

実験 2-1) 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 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ー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 2-2) 及び 2-3) 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- γ 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 2-2) 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ースコアの有

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 2-3) 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。

実験 3-1) 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 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 3-2) 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 3-3) について、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 3-4) について、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 3-5) について、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。欧州や世界的な食品関連分野における潜在的なナノマテリアル需要が存在し、重要性の高い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ている。欧州では、2011 年にナノマテリアルの定義が確定して以降、欧州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、食品関連では、まだ新規のナノマテリアルとしての登録は始まっていない。EFSA では、現在の市場における製品のリストを作成し、最大製品数はナノカプセル、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ることを明らかにしている。その中で、EFSA は既存添加物として酸化チタン（食品添加物 E171：ナノサイズ (<100 nm) 分画を質量で 3.2%未満含む) の意見書を公表し、EU の基準ではナノマテリアルとは定義されないもの、慢性影響試験の結果と曝露推定との MOS（安全マージンは）十分であると結論している。また、器具・容器包装への適用では、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。マイクログラスチックやナノプラスチックの健康懸念については、まだリスク評価ができる段階になく、食品製品中での同定、分析法等の技術開発が必要であることが示された。

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マウスモデルにおいては、陽性対照である CT ではアジュバント作用を示す条件下において、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、OVA を強制経口投与した場合も AgNP によるアジュバント作用は見ら

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。

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。一方、等量の AgNP の腹腔内投与において、直径 60 あるいは 100 nm の AgNP には観察されず、10 nm 群のみに観察された致死的な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ストレスの関与が考えられた。しかし、死因に酸化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恵与など更に詳細な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、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 永暁

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

研究協力者：小野 敦

岡山大学 医歯薬学総合研究科 薬学系毒

性学講座 教授

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 第四室研究員

用や、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、国内では明示的に使用されている事例は確認されていないが、海外では公表論文による調査報告例がある。

一方、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。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。

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

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、これまでの研究では、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

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、雌性 BALB/c 系マウスを用いて、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と共に、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）との混合物の免疫毒性及び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

in vivo 研究

実験 1-1) (Figure 1)

AgNP の経皮感作、腹腔内投与惹起による免疫毒性に関して、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 Alum 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。

動物実験は Adachi ら (Allergy. 2012;67 (1392-1399)) の方法に準じて実施した。

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 (SIGMA A5503) 及び Alum (LSL LG-6000) 又は AgNP を各々 0.1、0.25 及び 0.049 mg/50 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、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 + Alum 群、④ OVA + 10 nm AgNP、⑤ OVA + 60 nm AgNP、⑥ OVA + 100 nm AgNP。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 μ 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。腹腔内投与後 30 分間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 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。

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や表面抗体による細胞種の変化を検討した。

実験 1-2) (Figure 2)

経口投与による惹起は腹腔内投与による惹起よりも弱いと考えられたため、実験 2 の実験デザインから、OVA の曝露量を 0.1 から 0.3 mg に、アジュバントの陽性対照である Alum (0.25 mg) をコレラトキシン (CT, LIST BIOLOGICAL LABORATORIES, INC. #101C, 0.4 μ g) に変更して実施した。また、Day 25 に、OVA の感作抗原の投与経路は腹腔内投与 (1 mg) から強制経口投与 (5 mg) に変更して実験 1-1 と同様に実施した。

実験 1-3) (Figure 3)

被験物質懸濁液は 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。

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。

実験 2-1) (Figure 20)

抗原懸濁液は低用量の OVA (SIGMA A5503、2 μ g) 及びコレラトキシン (CT, LIST BIOLOGICAL LABORATORIES, INC. #101C、0.1、1、10 μ g) を 50 μ 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 μ g、④ OVA + CT 1 μ g、⑤ OVA + CT 10 μ 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「トリー」(鳥居薬品株式会社)を 2 cm 角に切り取つ

たものを用い、パッド部に 50 μ 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 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。

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 2-2) (Figure 21)

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 μ g/50 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、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 2-1 と同様に実施した。

実験 2-3) (Figure 22)

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 2-4) (Figure 23)

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 μ 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 μ 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 標本を作製し、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)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ 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。

実験 3-1) (Figure 43)

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 μ g、1 μ g 及び 0.1 μ g) 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 μ g/50 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。AgNP は濃度が 10 μ g、1 μ g 及び 0.1 μ g) /50 μ L /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 μ g、⑤ OVA + AgNP 10 nm 1 μ g、⑥ OVA + AgNP 10 nm 10 μ 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 μ 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 3-2) (Figure 44)

平成 26 年度の実験 1-1) 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。

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 3-3) (Figure 23)

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 3-4) (Figure 45)

動物実験は実験 3-3) 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 3-5) (Figure 46)

動物実験は実験 3-3) 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

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規制動向や使用状況と食品および飼料中、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を行った。27年度は 欧州食品安全機関 (EFSA) が主催す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) において議論された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と、製品中のナノマテリアルの最適な測定法に関する情報と、EFSAによるナノ材料のリスク評価の活動を調査した。28年度は、EFSAが行っている評価活動のうち、ナノマテリアルを含む既存食品添加物の再評価として公表された酸化チタンの評価意見に加えて、近年、環境経路の曝露懸念が指摘されているマイクロ/ナノプラスチックに関するEFSAの見解と最新の器具・容器包装へのナノマテリアルノ開発状況についての調査を行った。

C. 研究結果

in vivo 研究

実験 1-1)

技術的なトラブルにより OVA + 60 nm AgNP 群及び OVA + 100 nm AgNP 群の各 1 匹が 1 週及び 2 週目に死亡した。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。処置開始 2 週まではサージカルテープやエリザベスカラーの装着によって体重増加抑制が認められたが、3 週目からは回復し、群間の差は見られなかった (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 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、群間の差は認められなかった (Figure 5)。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、OVA + 100 nm AgNP 群及び OVA + 60 nm AgNP 群では各々平均 3.3、3.2 及び 2.7 度と、統計学的に有意な体温の大きな低下が認められた (Figure 6)。また、OVA + 10 nm AgNP 群及び OVA + Alum 群では各 1.7 及び 1.2 度低下していた。体温が有意に低下した OVA 群及び何れの OVA + AgNP 群では惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意に増大していた (Figure 6)。OVA + Alum 群でも増加傾向はあるものの、有意な増加は見られなかった。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 + 100 nm AgNP 群及び OVA + 60 nm AgNP 群では全匹 3.0 以上と統計学的有意な高いスコアであった (Figure 6)。また OVA + Alum 群及び OVA + 10 nm AgNP 群でも平均 2.2 及び 2.8 と Vehicle の 1.0 に比べ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-2、IL-4、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 (Figure 7)。

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が認められず (Table 1)、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 陽性を示す濾胞の数においては、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 8)。

実験 1-2)

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 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 IgG1 及び IgE が Vehicle 群と比較して有意に増加していたが、群間の差は認められなかった (Figure 10)。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 (Figure 11)。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 (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-2、IL-4、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 (Figure 12)。

皮膚病変のスコアリングを行った結果、Vehicle 群と比較して OVA + 100 nm AgNP 群で有意な増加が認められ (Table 2)、貼付部位近傍の左腋窩 Ki67 陽性のリンパ節の濾胞の数においては、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 (Figure 13)。

実験 1-3)

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 14、Table 3)。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 3)。

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 15)。病理組織学的解析を行ったところ、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、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 (Figure 16、Table 4)。

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。病理組織学的には、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巢の数は 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。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。OVA + Alum 群で認められる炎症細胞集簇巢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 17)。

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、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 (Figure 18)。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 18)。

抗原再曝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、IL-4 はすべてのデータが検出限界以下だった (Figure 19)。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 (Figure 19)。

実験 2-1)

10 μ 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 (Figure 24)。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 25)。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 26)。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 26)。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 26)。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-γ において、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 27)。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 (Figure 27)。

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 (Figure 28、Table 5)。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 28)。

実験 2-2)

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 29)。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 30)。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 31)。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 31)。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 31)。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-γ において、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 32)。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 (Figure 33、Table 6)。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 (Figure 33)。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 33)。

実験 2-3)

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 34)。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 35)。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は、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 (Figure 36)。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 36)。

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- γ において、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 37)。

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 38、Table 7)。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 (Figure 38)。

実験 2-4)

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 (Figure 39)。

血清生化学的検索 (Table 8) 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 (Figure 40)。

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 (Figure 41)。病理組織学的解析 (Figure

42、Table 9) 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。

実験 3-1)

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 (Figure 47)。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 (Figure 48)。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 (Figure 49)。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 (Figure 49)。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 (Figure 49)。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 (Figure 50)。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 (Figure 50)。

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 51、Table 10)。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 (Figure 51)。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 処置群で増加傾向が認められた (Figure 51)。

実験 3-2)

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パ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 (Figure 52)。

実験 3-3)

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 (Figure 53)。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 (Figure 54)。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 (Figure 55)。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 3-4)

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 (Figure 56)。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 (Figure 56、57)。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 (Figure 56)。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 (Table 11)。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 (Table 11)。

実験 3-5)

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 (Figure 58)。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 (Figure 58、59)。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 (Table 12)。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 (Table 12)。

調査研究

<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材料による健康、環境影響への懸念が高く、2011 年には、EC としてのナノ材料の定義の設定

(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 年にフランスが、その後、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。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。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。

<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>

2010 以前は、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。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)。

二酸化チタン (E171) は、顔料などの一般的な添加剤である。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。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。

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。

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。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

微量元素であるが、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。

食品包装用ナノマテリアルおよびナノテクノロジーの応用は、食品接触材料や食品非接触材料の両方に該当し、急速に商用化になりつつある (Chaudhry and Castle 2011)。二酸化チタンおよびクレイ粒子のような単純な無機分子がパッケージに使用されているのに対し、食品中のカーボンナノチューブのような複雑な無機ナノ粒子の直接的な使用は、現在はないようである。食品接触材料の機能は、顔料、包装機能の改善、活性包装材料とインテリジェント食品包装、抗菌作用および台所用品の自己洗浄のカテゴリーに分類することができる。

<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>

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。

<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>

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によるナノ材料のリスク評価の活動>

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。2016年現在では、この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。2011年以降、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。

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。

飼料添加物: 飼料添加物としてバルクのTiO₂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。

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。

<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。

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。ANSパネルは吸収、分布、排泄に関する利用可能なデータから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、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。しかし、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 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。

<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。

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。マイクロ/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。

<食品容器に関する最新の技術動向>

器具・容器包装へのナノマテリアルの利用に関しては、より機能性を付加した器具・容器包装剤の研究開発が進んでいる。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、ナノマテリアルが直接食品に接触することを避けるために、三層構造フィルムに中間層に、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。

一方、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。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の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。

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、経皮曝露におけるアジュバント陽性対照の候補物質として、Alum 及び CT を検討した。Alum は腹腔内投与の場合はアジュバント作用を示すが、皮膚曝露ではアジュバント作用は示さないと考えられた。CT は塗布量を最

適化することにより、皮膚曝露による感作成立におけるアジュバントの陽性対照として使用可能であることが明らかとなった。また、本モデルの確立においては、抗原としてのOVAの曝露量も最適化する必要があった。

本モデルを用いた一連の実験により、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、他の金属ナノ材料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。

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。

一方、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。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。

27年度の結果から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。

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。

国際動向の調査において、欧州では、2011年にナノマテリアルの定義が確定してから、各国でナノマテリアルに対する(義務的な)登録制度が普及しつつあり、一般の化学物質に関する登録制度は整いつつあるが、食品

関連に関する情報は、既存物質を除いて、まだ規制当局に情報が届けられていない状況である。このことは欧州における食品関連業界が新規のナノマテリアルを用いた商品化に慎重である状況を示し、さらに抗菌作用を謳ったナノ銀を含む家電製の回収もあったことから社会的な需要に壁があるように思われる。しかし、研究レベルでは文献調査等の結果から、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を示している。

食品及び飼料等に関する文献調査等では、重要な潜在的な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ているが、これらはほとんど添加剤であり、典型的には、最終的な食品および飼料製品中に少量(食品では<0.01~1% (w/w) および飼料では1~4% (w/w))が添加されるというものである。食品および飼料中のナノマテリアルの使用は、法律によって規制されているが、現時点ではEFSA等で行っている既存のナノマテリアルの評価の動向を注視している状況である。

一方、新規食品および新規食品組成、規制(EC) 258/97)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り、特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なる。しかし、1997年以前から使われている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り、安全性や曝露に関する情報は不明なままである。この状況に関しては、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と考えられる。

2016年に公表された酸化チタン(食品添加物E171)の科学的意見について、ナノサイズ(<100nm)分画を質量で3.2%未満含むものの、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。生殖発生毒性のデータが欠落しているためにADIは設定しなかったが、慢性影響試験の結果からは、現状の曝露調査による曝露量とは、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、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ると考えられる

食品包装関連では、二酸化ケイ素、窒化チタンおよびカーボンブラックは、現在の欧州法により食品包装用に認可されている3つのナノマテリアルであるが、その他の多くの可能な材料は、世界の市場で研究開発されている。文献調査による潜在的可能性の製品タイプとしては、プラスチックフィルムとプラスチック容器があり、使用目的としては、顔料に加え、従来の食品包装容器の機械的向上やバリア特性の改善、抗菌性や食品のモニタリング等が挙げられている。重要な潜在的可能性のナノマテリアルとして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（ナノクレイ、金属および金属酸化物ナノ粒子；2~5%含有（w/w））が示された。

さらに、ナノマテリアルの食品添加物への最新の応用研究に関しては、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試験法に関しては、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。

他方、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、食物連鎖や脾値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表かも困難である。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、こちらも生体位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。

E. 結論

改良を加えることによって、皮膚感作及び経口投与あるいは、腹腔内投与によるアジュバント作用を検討可能なモデル系とその陽性対照ができた。その系を用いてAgNPのアジュバント作用について検討したところ、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。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規制動向や使用状況と食品および飼料中、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を行った。27年度は、欧州食品安全機関（EFSA）が主催す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において議論された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と、製品中のナノマテリアルの最適な測定法に関する情報と、EFSAによるナノ材料のリスク評価の活動を調査した。28年度は、EFSAが行っている評価活動のうち、ナノマテリアルを含む既存食品添加物の再評価として公表された酸化チタンの評価意見に加えて、近年、環境経路の曝露懸念が指摘されているマイクロ/ナノプラスチックに関するEFSAの見解と最新の器具・容器包装へのナノマテリアルノ開発状況についての調査を行った。調査の結果、欧州や世界的な食品関連分野における潜在的なナノマテリアル需要が存在し、重要性の高い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ている。欧州では、2011年にナノマテリアルの定義が確定して以降、欧州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、食品関連では、まだ新規のナノマテリアルとしての登録は始まっていない。EFSAでは、現在の市場における製品のリストを作成し、最大製品数はナノカプセル、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ることを明らかにしている。その中で、EFSAは既存添加物として酸化チタン（食品添加物E171：ナノサイズ（<100nm）分画を質量で3.2%未満含む）の意見書を公表し、EUの基準ではナノマテリアルとは定義されないもの、慢性影響試験の結果と曝露推定とのMOS（安全マージンは）十分であると結論している。また、器具・容器包装への適用では、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。マイクロプラスチックやナノプラスチックの健康懸念については、まだリスク評価ができる段階になく、食品製品中での同定、分析法等の技術開発が必要であることが示された。

F. 健康危険情報 (該当なし)

G. 研究発表 (論文発表)

Hashiguchi, S., Yoshida, H., Akashi, T., Komemoto, K., Ueda, T., Ikarashi, Y.,

Miyauchi, A., Konno, K., Yamanaka, S., Hirose, A., Kurokawa, M., Watanabe, W. Titanium dioxide nanoparticles exacerbate pneumonia in respiratory syncytial virus (RSV)-infected mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2015) 39, 879-886.

Ohba T, Xu J, Alexander DB, Yamada A, Kanno J, Hirose A, Tsuda H, Imaizumi Y. MWCNT causes extensive damage to the ciliated epithelium of the trachea of rodents. *J Toxicol Sci.* 39:499-505. (2014)

Xu J, Alexander DB, Futakuchi M, Numano T, Fukamachi K, Suzui M, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition, fibrogenesis, and mesothelial proliferation by multiwalled carbon nanotubes. *Cancer Sci.* 105:763-9. (2014)

Cui H, Wu W, Okuhira K, Miyazawa K, Hattori T, Sai K, Naito M, Suzuki K, Nishimura T, Sakamoto Y, Ogata A, Maeno T, Inomata A, Nakae D, Hirose A, Nishimaki-Mogami T. High-temperature calcined fullerene nanowhiskers as well as long needle-like multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce NLRP3-mediated IL-1beta secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 452 : 593-599. (2014)

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.
- 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)
- 菅野 純, 高橋 祐次, 高木 篤也, 広瀬 明彦, 今井田 克己, 津田 洋幸, ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化と効率化に向けて、第41回日本毒性学会学術年会、2014年7月、神戸、シンポジウム
- 小林憲弘, 田中亮太, 竹原広, 納屋聖人, 久保田領志, 五十嵐良明, 広瀬明彦: マウス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41回日本毒性学会学術年会 (2014. 7. 2 兵庫県神戸市).
- 坂本義光, 小縣昭夫, 北条 幹, 山本行男, 広瀬明彦, 井上義之, 橋爪直樹, 猪又明子, 中江 大, “ラットにおいて多層カーボンナノチューブの経気管噴霧反復投与が及ぼす影響” 第41回日本毒性学会学術年会 (2014年7月4日. 兵庫県神戸市)
- Seiko Hashiguchi, Hiroki Yoshida, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Masahiko Kurokawa, Wataru Watanabe, Effects of titanium dioxide nanoparticles on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. *EUROTOX2014* (2014.9, Edinburgh)
- 菅野 純, 高橋祐次, 高木篤也, 広瀬明彦, Toxicological considerations for particulate matter as foreignbody carcinogen. 第73回日本癌学会学術総会 (2014.9) 横浜、シンポジウム
- 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).
- 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)
- 曹永晚, 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)
- 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 直噴全身曝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).
- 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. リンポポ州, 南アフリカ)
- 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).
- 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).
- 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 mutiwalled carbon nanotubes. Global Cancer: Occurrence, Cause, and Avenues to Prevention. IARC 50th Aniversary Conference (2016.6), Lyon, Poster.
- 曹永晩, 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)
- 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, 海鋒藤文, 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
- 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.
- 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.
- 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, 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.

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)

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

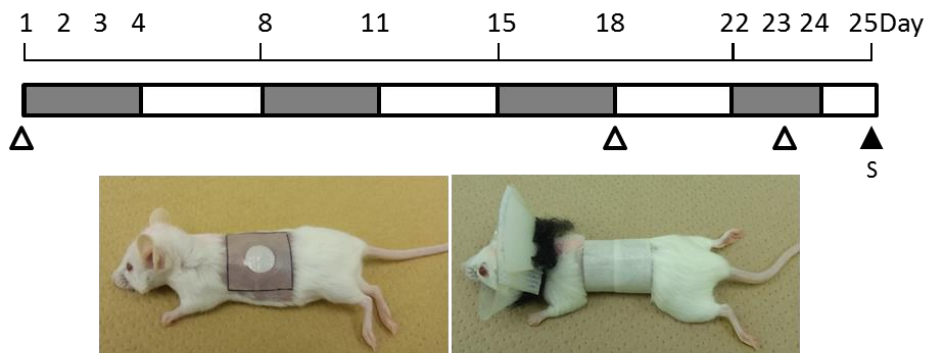
(2017 年 1 月 26 日～27 日) 堺市
Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Ogawa K: Acute toxicity of intraperitoneally administered silver nanoparticles of varying sizes in mice. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2017.3 Baltimore, MD, USA)

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)



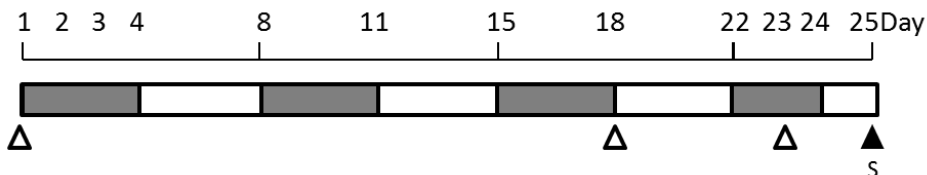
Animal 8-week old female BALB/c mouse (n=5/group)

█ Test chemicals exposure (skin patch on the flank, 50 μ l/mouse),
OVA (Ovalbumin, 0.1 mg) + Alum (0.25 mg) or silver nanoparticles (AgNP, 0.049 mg/mouse)

- ① 2 mM citrate (vehicle)
- ② OVA
- ③ OVA + Alum
- ④ OVA + 10 nm AgNP
- ⑤ OVA + 60 nm AgNP
- ⑥ OVA + 100 nm AgNP

- △ Blood sampling
- ▲ Evocation with OVA (i.p. 1mg)
- S Sacrifice (30 min after evocation)

Figure 1. 実験デザイン (実験 1-1)



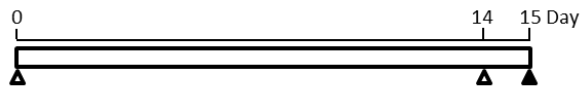
Animal 8-week old female BALB/c mouse (n=5/group)

█ Test chemicals exposure (skin patch on the flank, 50 μ l/mouse),
OVA (Ovalbumin, 0.3 mg) + Cholera toxin (CT, 0.4 μ g) or silver nanoparticles (AgNP, 0.049 mg/mouse)

- ① 2 mM citrate (vehicle)
- ② OVA
- ③ OVA + CT
- ④ OVA + 10 nm AgNP
- ⑤ OVA + 60 nm AgNP
- ⑥ OVA + 100 nm AgNP

- △ Blood sampling
- ▲ Evocation with OVA (i.g. 5 mg)
- S Sacrifice (30 min after evocation)

Figure 2. 実験デザイン (実験 1-2)



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 3. 実験デザイン (実験 1-3)

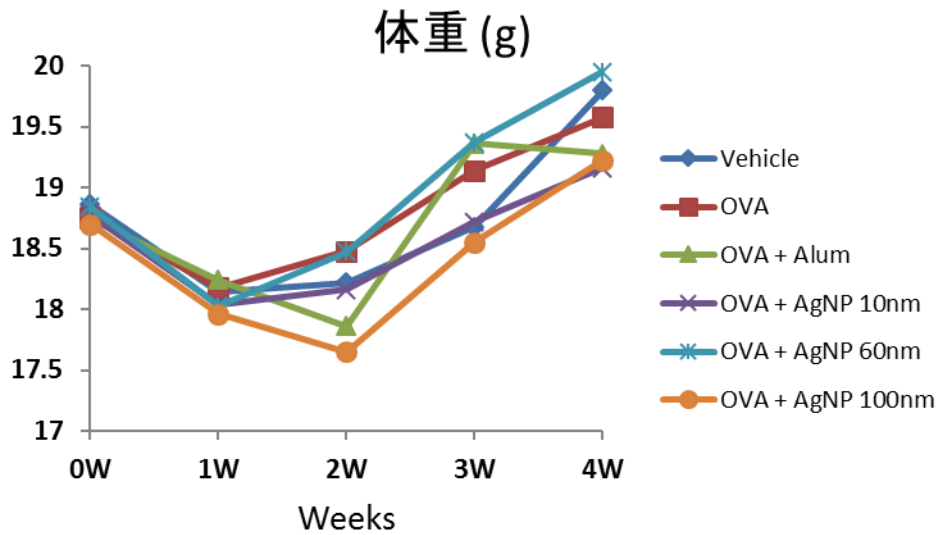


Figure 4. 体重 (実験 1-1)

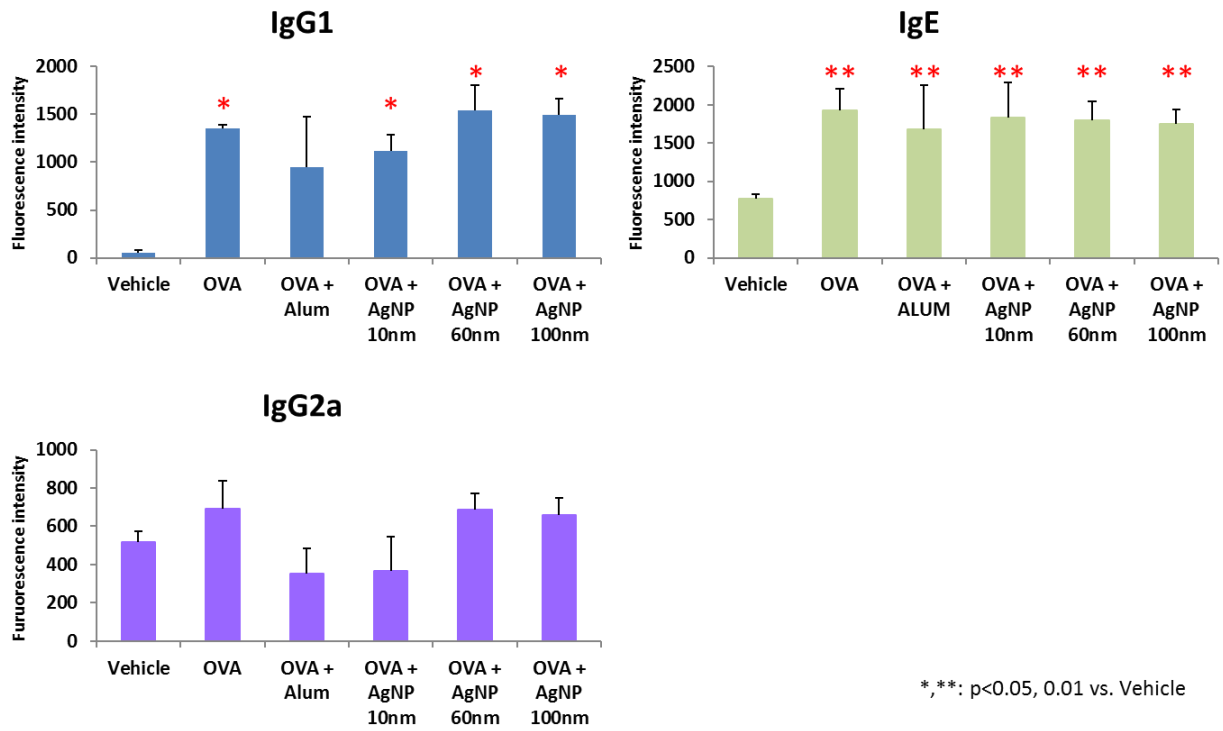


Figure 5. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 1-1)

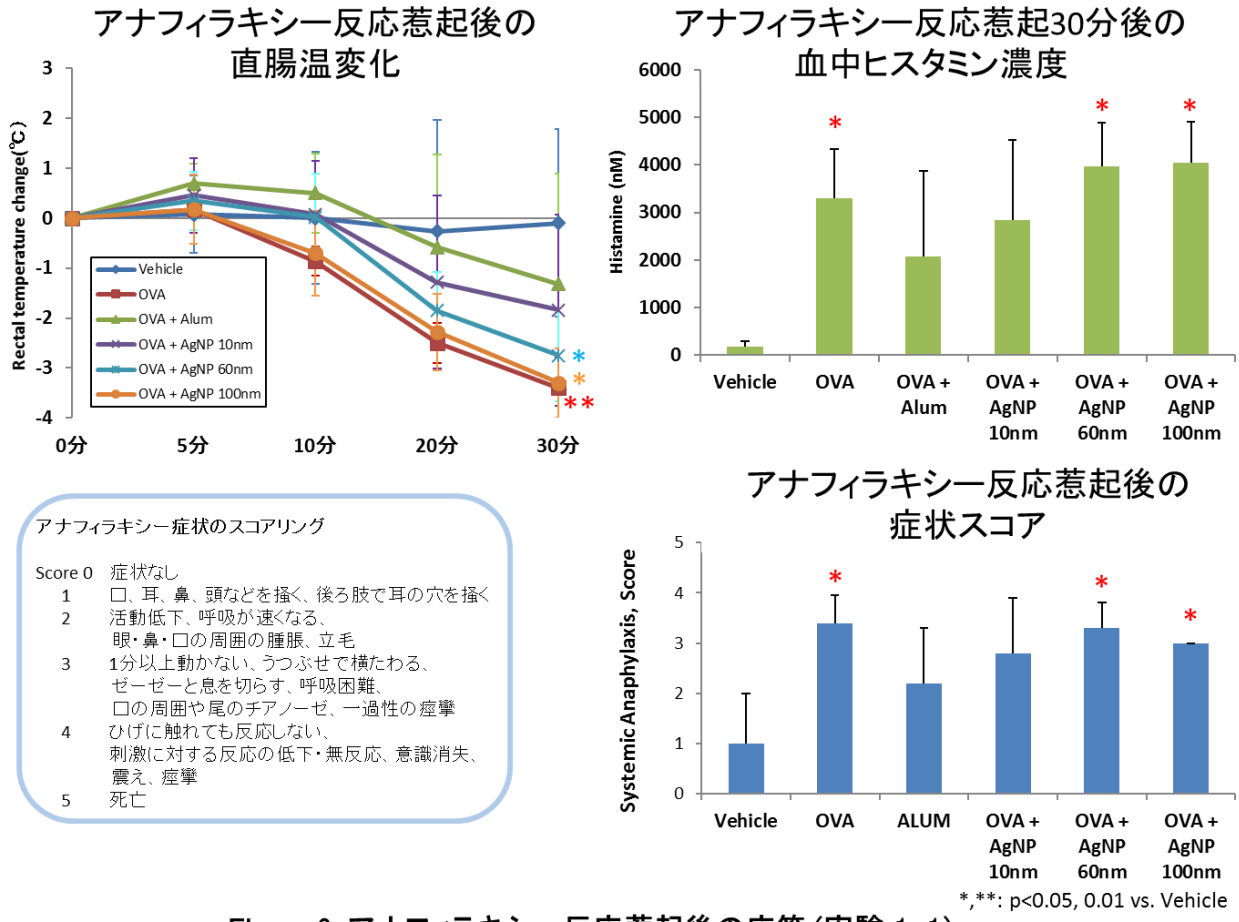


Figure 6. アナフィラキシー反応惹起後の応答 (実験 1-1)

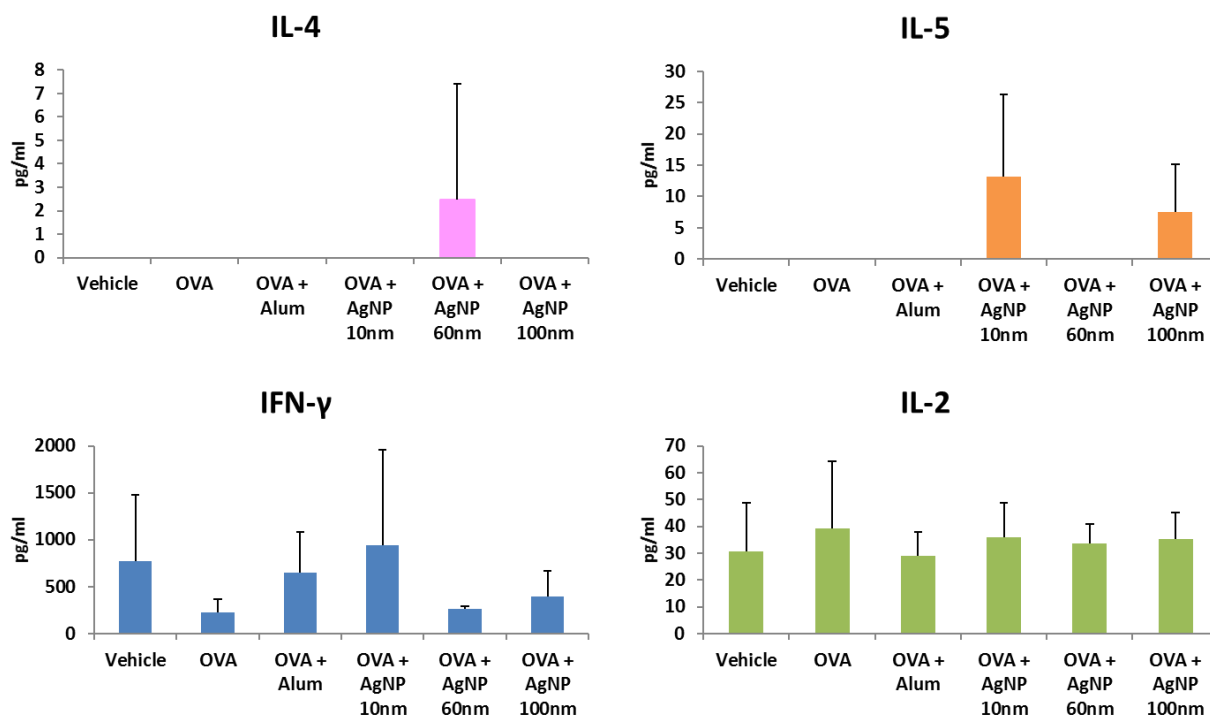


Figure 7. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 1-1)

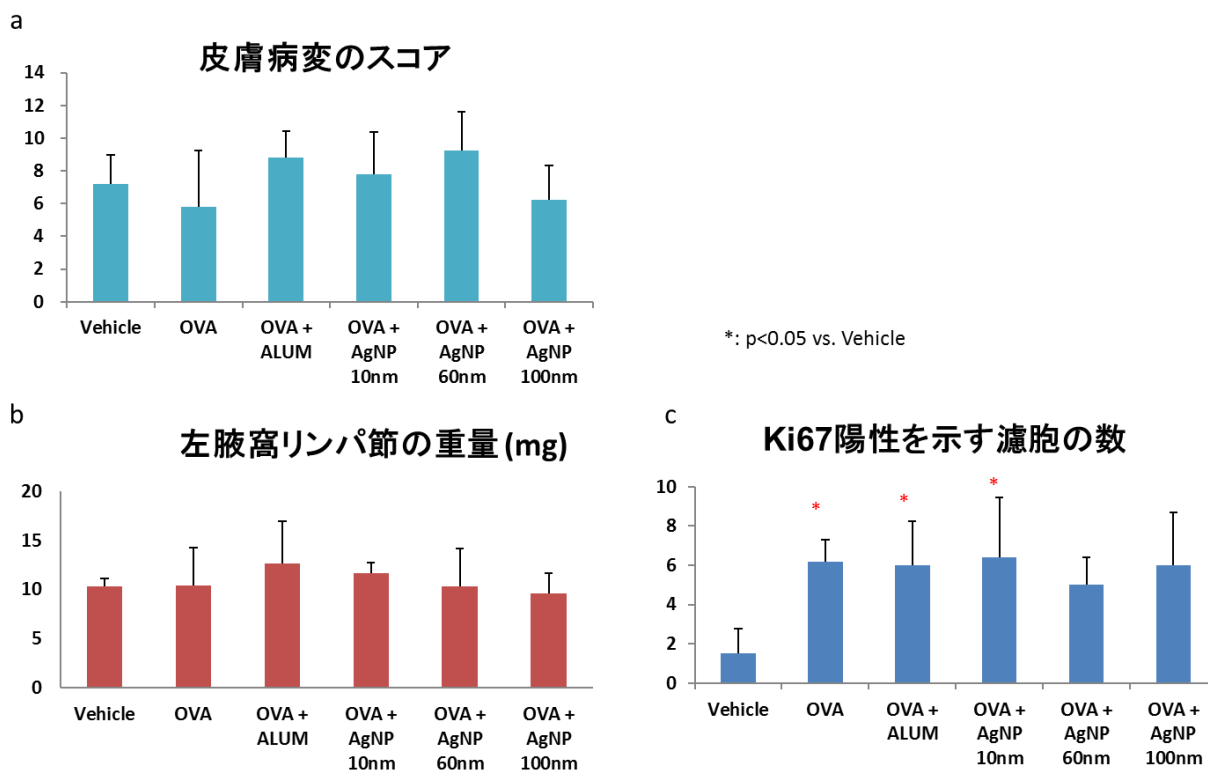


Figure 8. 皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(c) (実験 1-1)

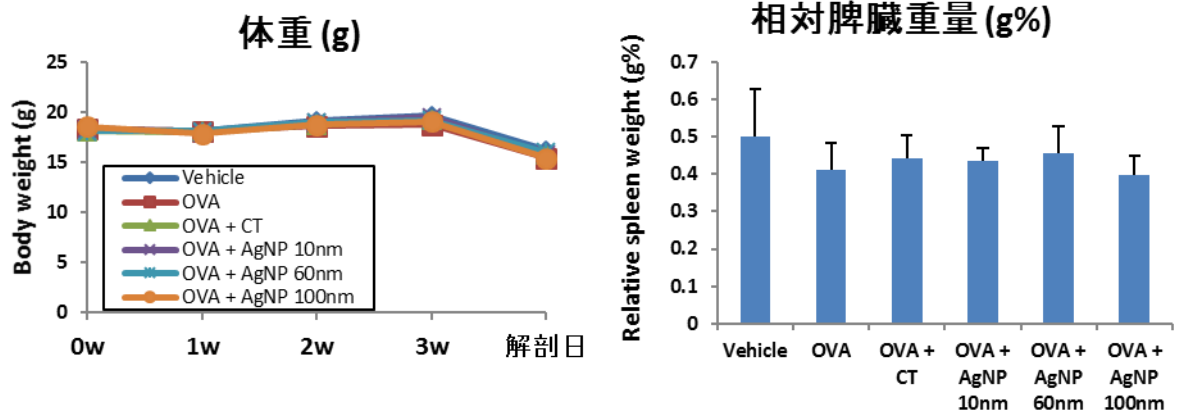


Figure 9. 体重(a)及び相対脾臓重量(b) (実験 1-2)

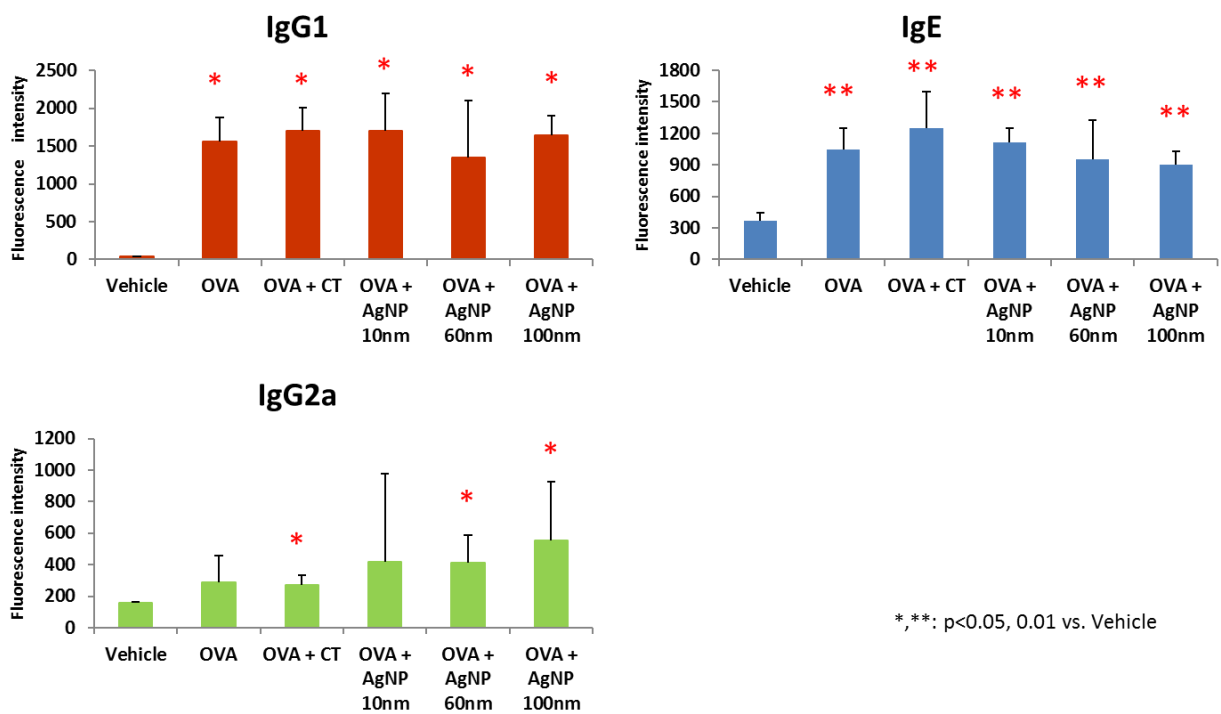


Figure 10. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 1-2)

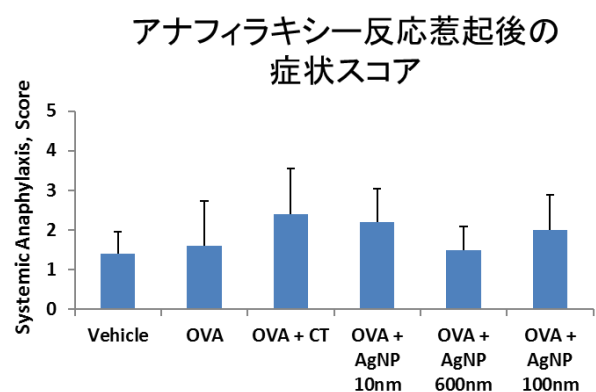
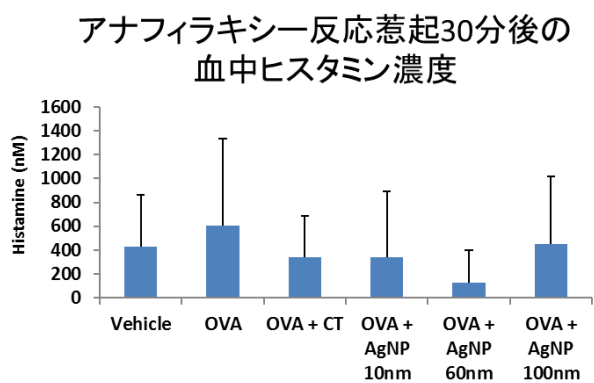
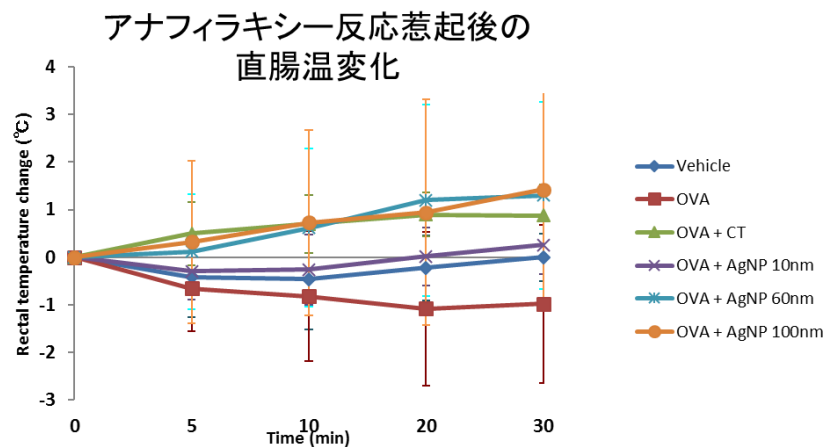


Figure 11. アナフィラキシー反応惹起後の応答 (実験 1-2)

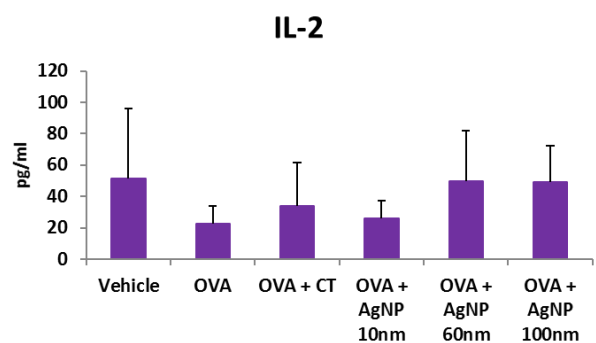
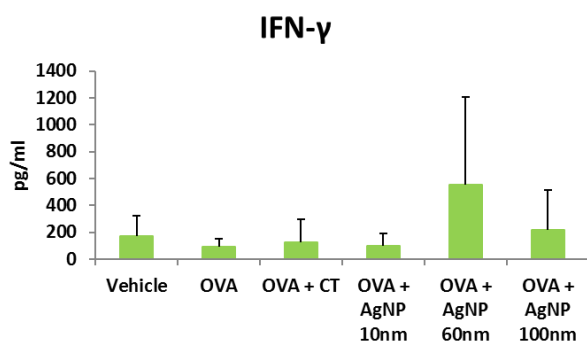
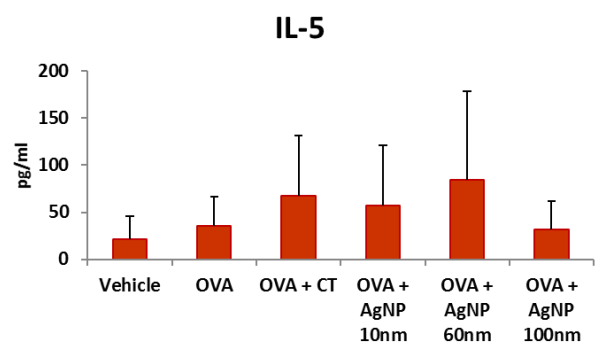
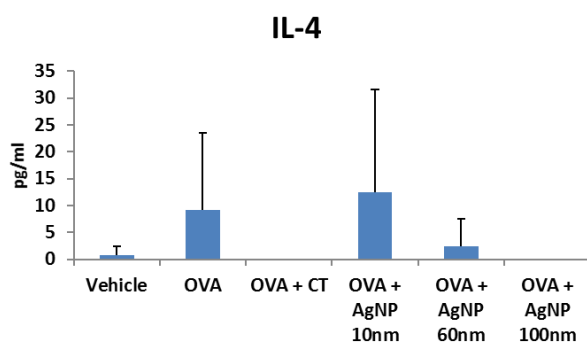


Figure 12. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 1-2)

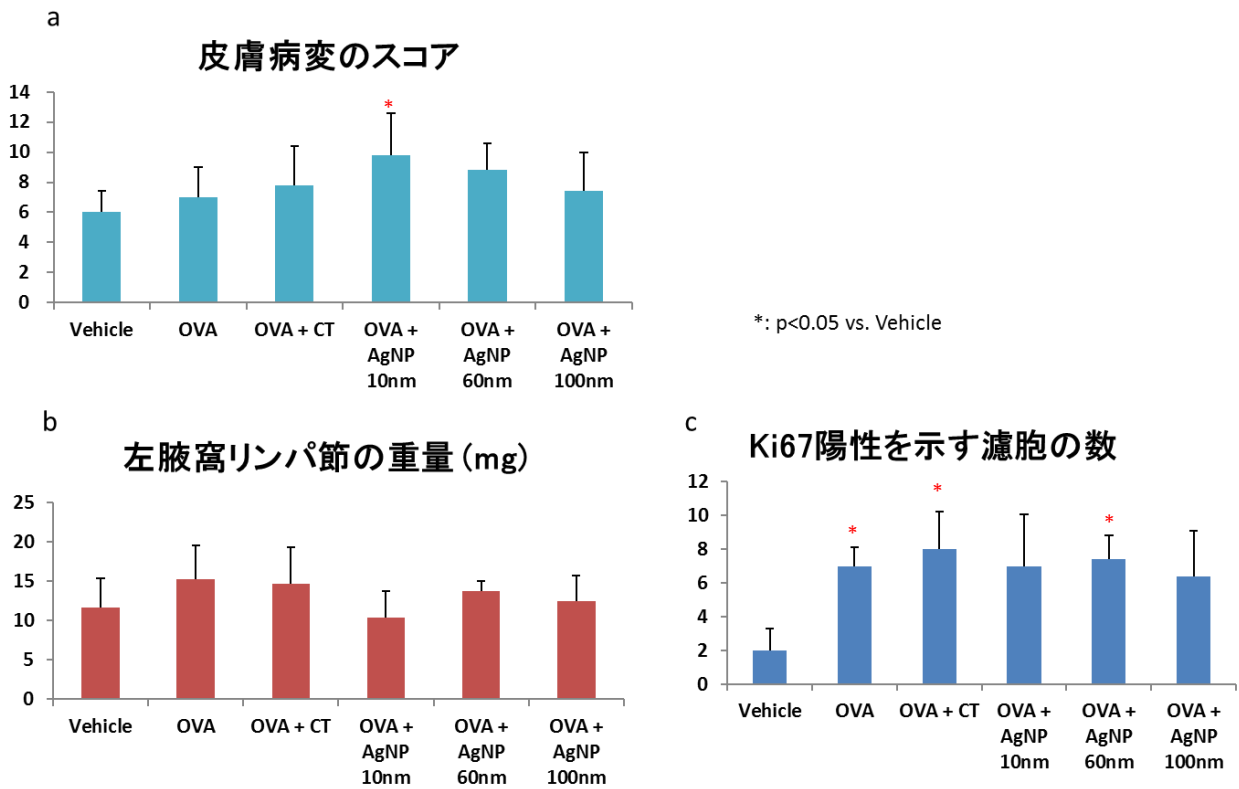


Figure 13. 皮膚病変のスコア(a)、左腋窩リンパ節の重量(b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(c) (実験 1-2)

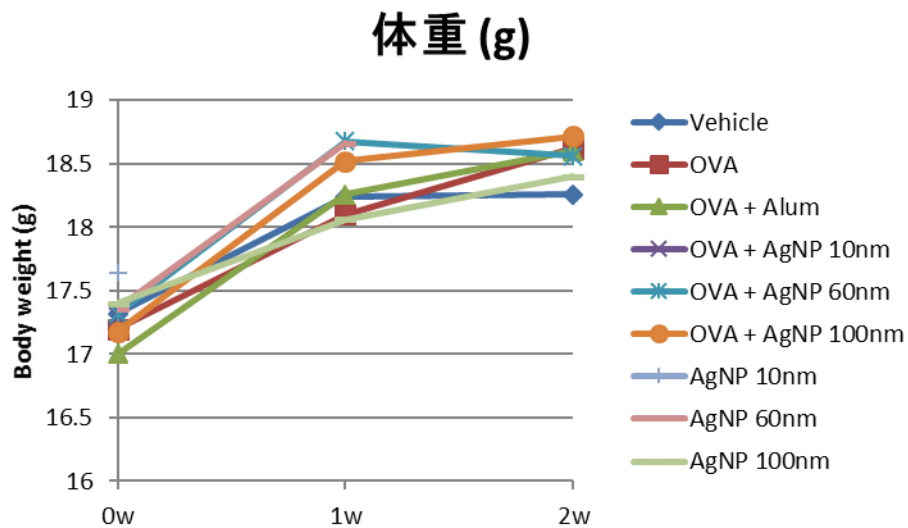


Figure 14. 体重 (実験 1-3)

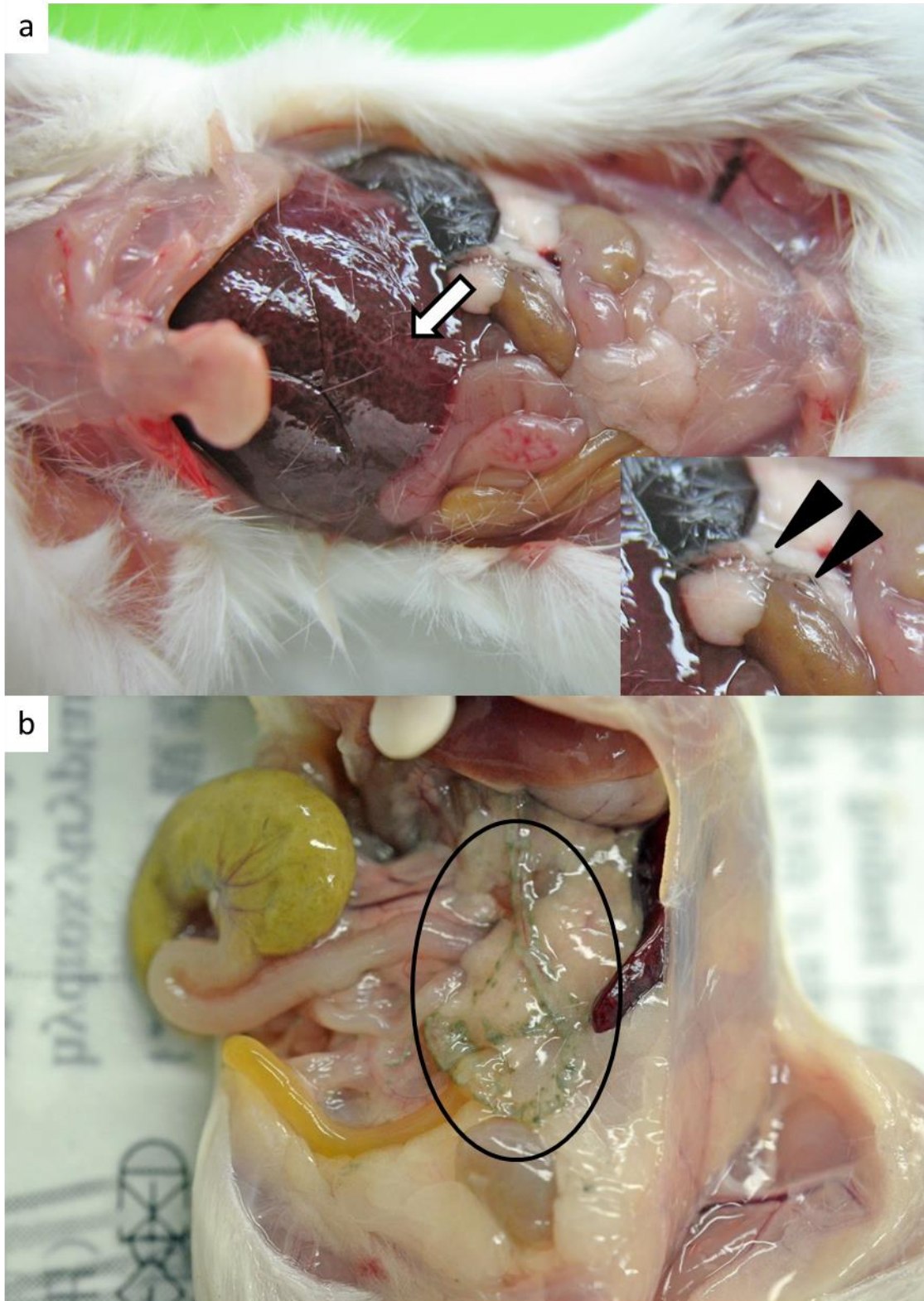


Figure 15. OVA + AgNP 10 nm群(a, 死亡例) 及びOVA + AgNP 100 nm群(b, 計画解剖例)の肉眼写真。死亡例の肝臓の斑な暗赤色変色(矢印)及びいずれの群も腹腔内黒色粒子状物質の散在(矢頭又は円内)が認められる。(実験 1-3)

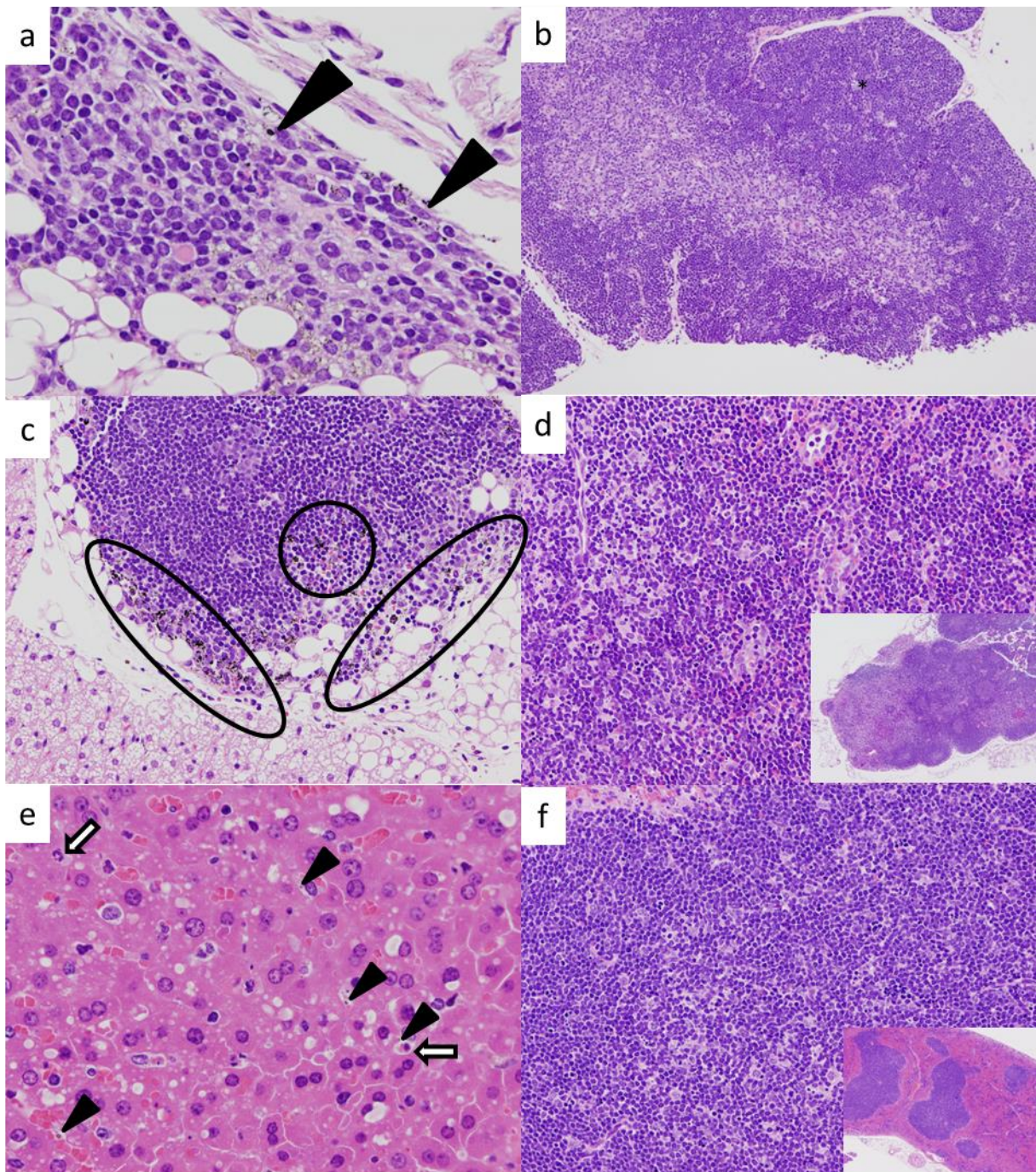


Figure 16. OVA + AgNP 10 nm群 (a, 瀕死死亡例) の病理組織写真。(a) 腸間膜の肉芽腫、褐色並びに黒色色素の沈着(矢頭)、(b)胸腺の細胞死、(c)胸腺周囲リンパ節の褐色並びに黒色色素の沈着(円内)、濾胞細胞死増加、(d)腸間膜リンパ節の出血及び細胞死、(e)肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及びクッパー細胞の暗褐色色素沈着(矢頭)、肝細胞の変性及び細胞死(矢印)、(f)脾臓のうっ血及び白脾髄における細胞死が認められた。(実験 1-3)

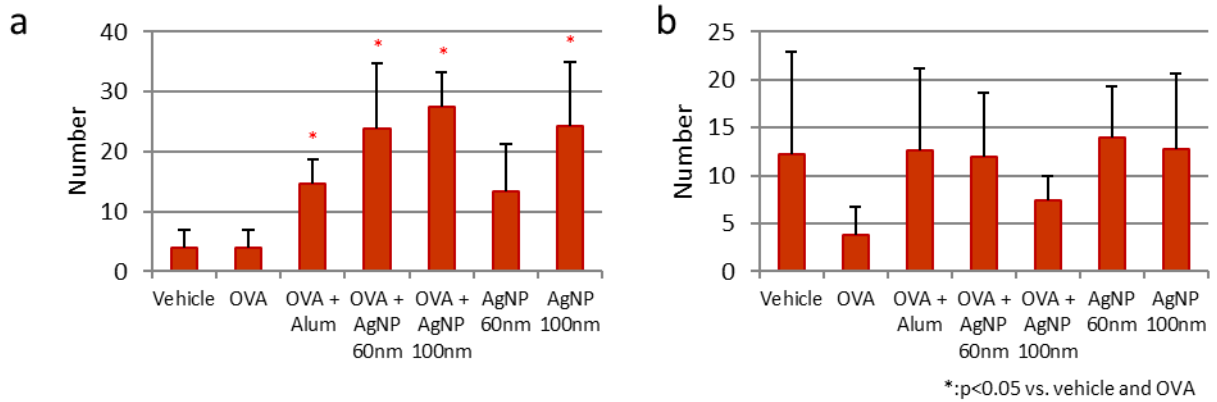


Figure 17. 腸間膜で認められた炎症細胞集簇の数(a)及び腸間膜リンパ節における細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(b) (実験 3)

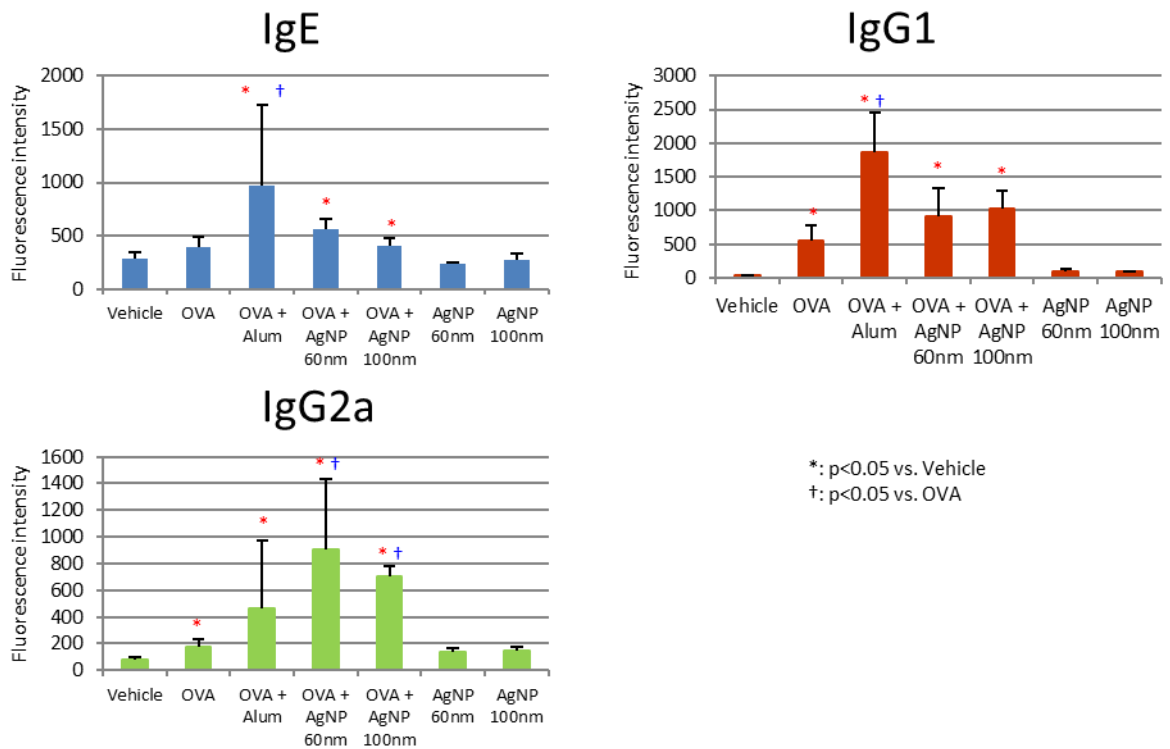
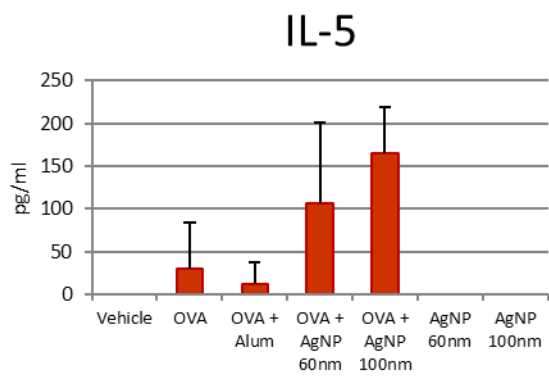


Figure 18. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 1-3)



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

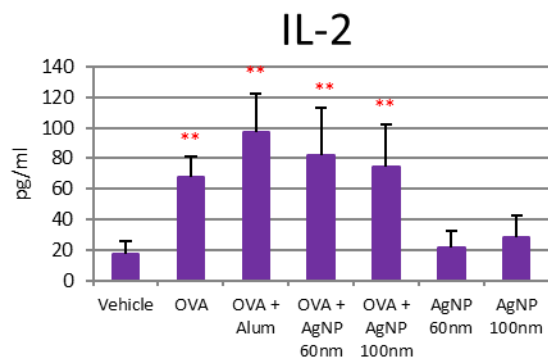
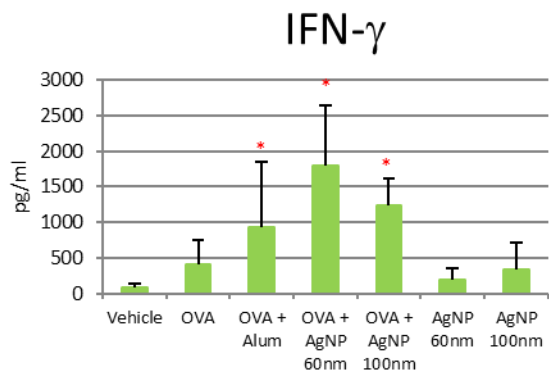
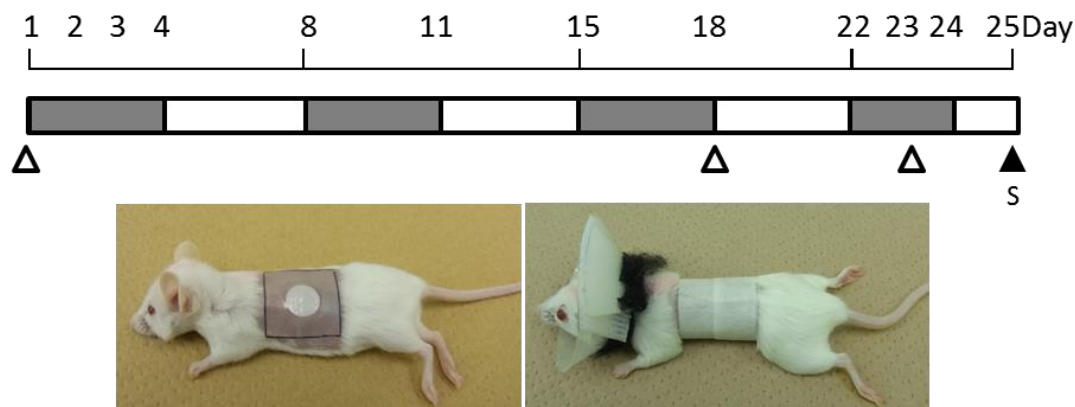


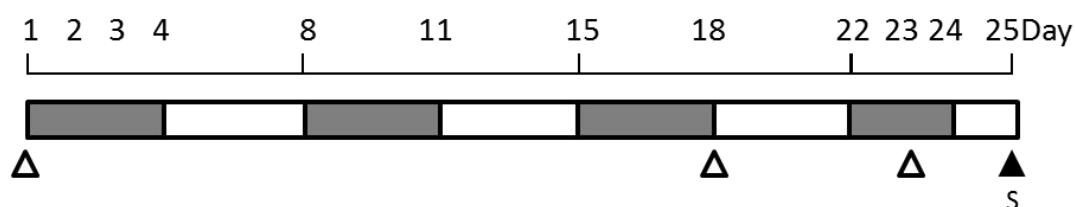
Figure 19. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 1-3)



Animal 8-week old female BALB/c mouse (n=5/group)

- █ Test chemicals exposure (skin patch on the flank, 50 μ l/mouse),
OVA (Ovalbumin, 2 μ g) + cholera toxin (CT, 0.1, 1, 10 μ g)
 - ① PBS (vehicle)
 - ② OVA
 - ③ OVA + CT 0.1 μ g
 - ④ OVA + CT 1 μ g
 - ⑤ OVA + CT 10 μ g
- △ Blood sampling
- ▲ Evocation with OVA (i.p. 1 mg)
- S Sacrifice (30 min after evocation)

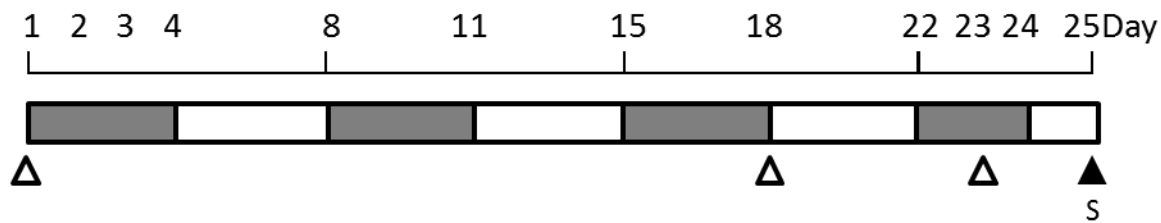
Figure 20. 実験デザイン (実験 2-1)



Animal 8-week old female BALB/c mouse (n=5/group)

- █ Test chemicals exposure (skin patch on the flank, 50 μ l/mouse),
ovalbumin (OVA, 2 μ g) + cholera toxin (CT, 1 μ g) or silver
nanoparticles (AgNP, 49 μ g/mouse)
 - ① 2 mM citrate (vehicle)
 - ② OVA
 - ③ OVA + CT
 - ④ OVA + 10 nm AgNP
 - ⑤ OVA + 60 nm AgNP
 - ⑥ OVA + 100 nm AgNP
- △ Blood sampling
- ▲ Evocation with OVA (i.p. 1 mg)
- S Sacrifice (30 min after evocation)

Figure 21. 実験デザイン (実験 2-2)



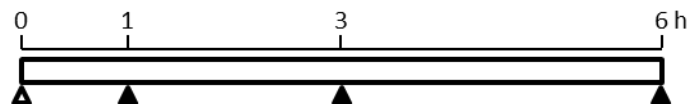
Animal 8-week old female BALB/c mouse (n=5/group)

█ Test chemicals exposure (skin patch on the flank, 50 μ l/mouse), ovalbumin (OVA, 2 μ g) + cholera toxin (CT, 1 μ g) or silver nanoparticles (AgNP, 49 μ g/mouse)

- ① 2 mM citrate (vehicle)
- ② OVA
- ③ OVA + CT
- ④ OVA + 10 nm AgNP
- ⑤ OVA + 60 nm AgNP
- ⑥ OVA + 100 nm AgNP

- △ Blood sampling
- ▲ Evocation with OVA (i.g. 100 mg)
- S Sacrifice (30 min after evocation)

Figure 22. 実験デザイン (実験 2-3)



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

- △ Test chemicals exposure (i.p., 300 μ l/mouse)
 - ① PBS (vehicle, 6 hr only)
 - ② 10 nm AgNP (0.2 mg)
 - ③ 60 nm AgNP (0.2 mg)
 - ④ 100 nm AgNP (0.2 mg)
- ▲ Sacrifice

Figure 23. 実験デザイン (実験 2-4)

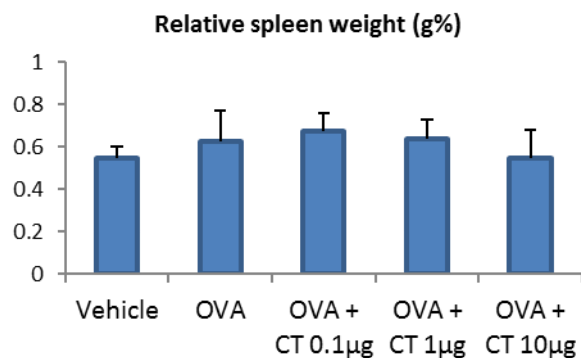


Figure 24. 相对脾臓重量 (実験 2-1)

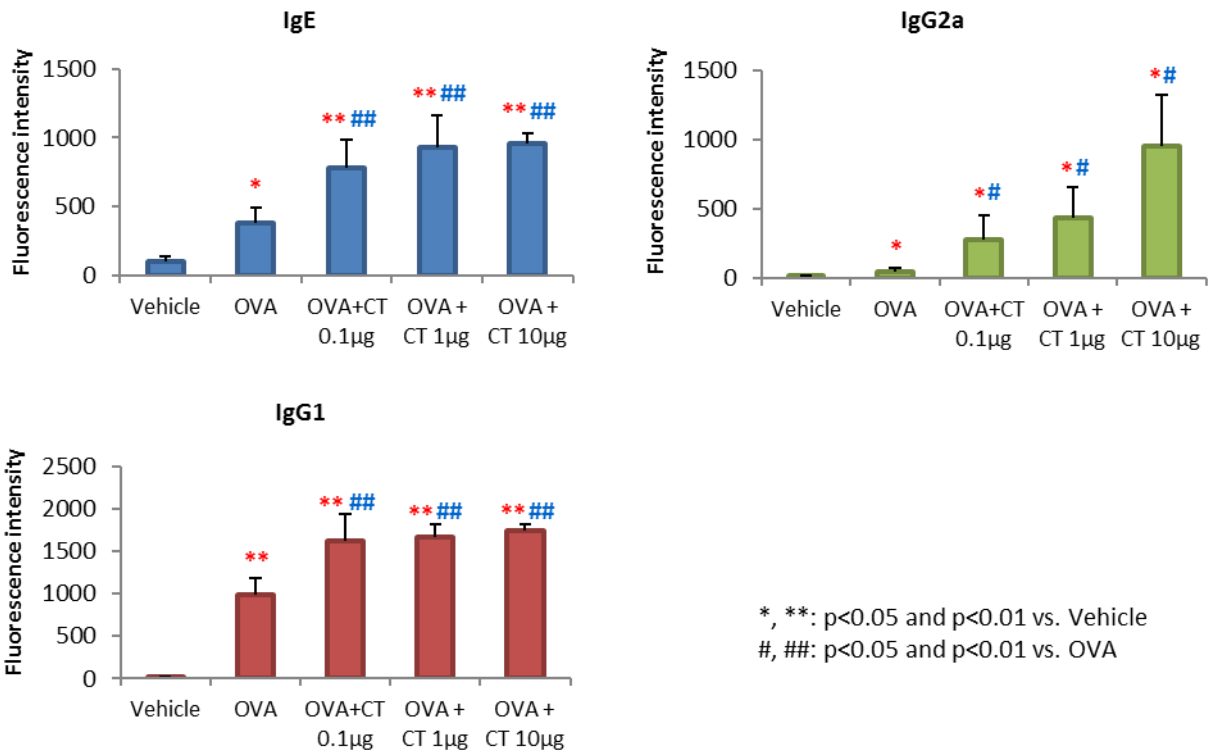


Figure 25. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 2-1)

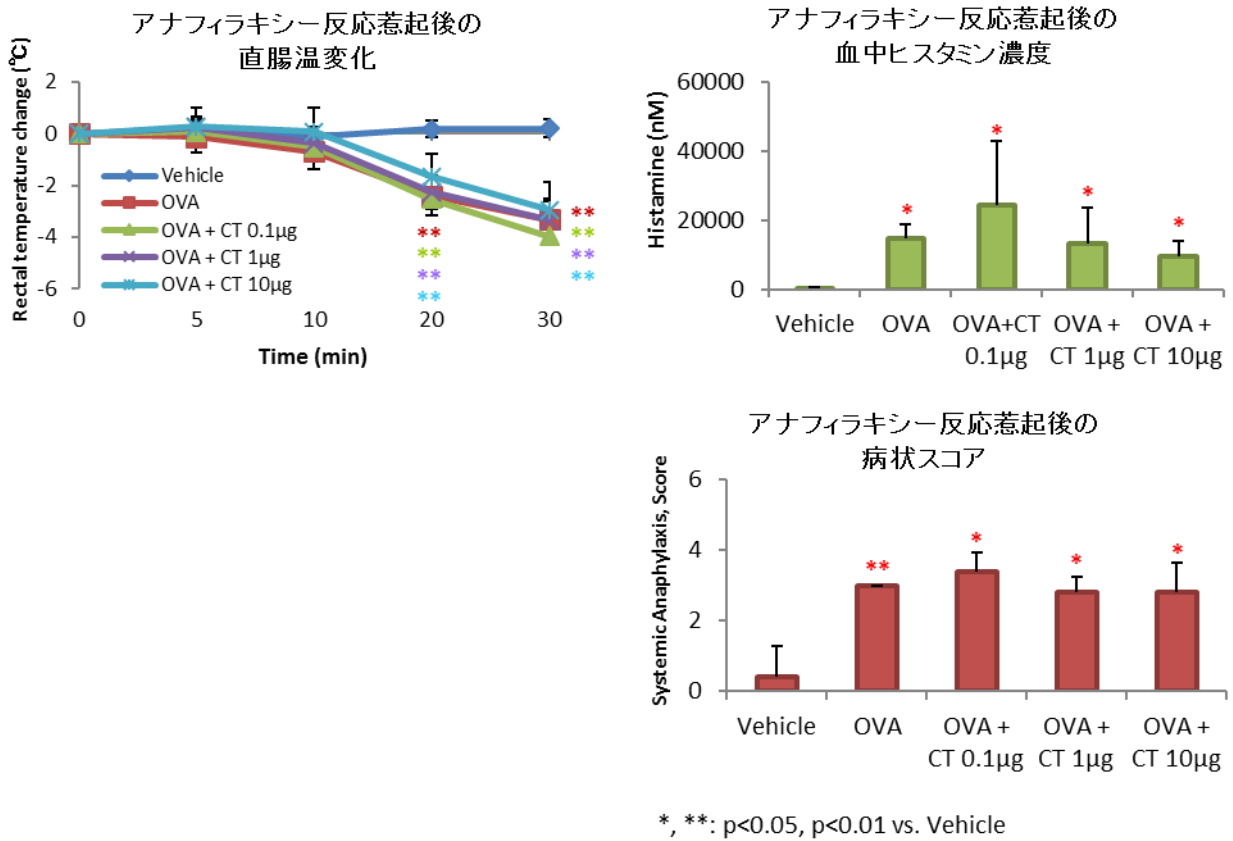
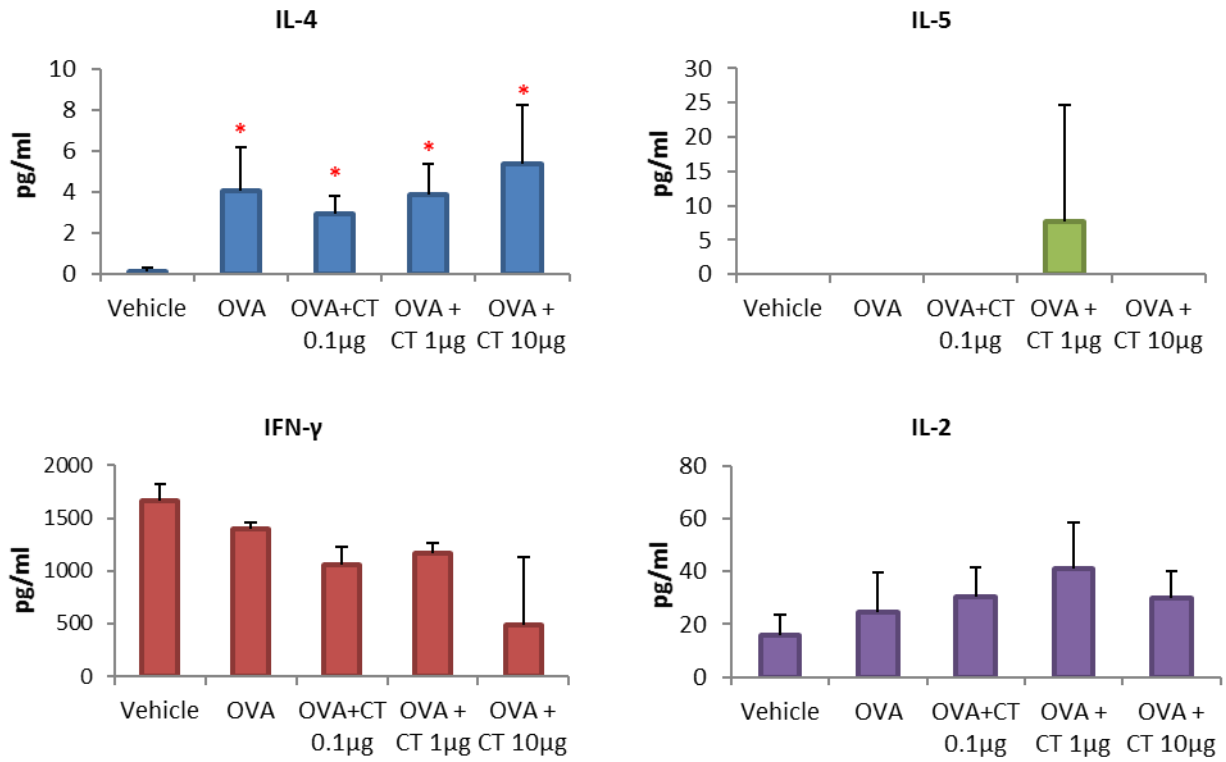
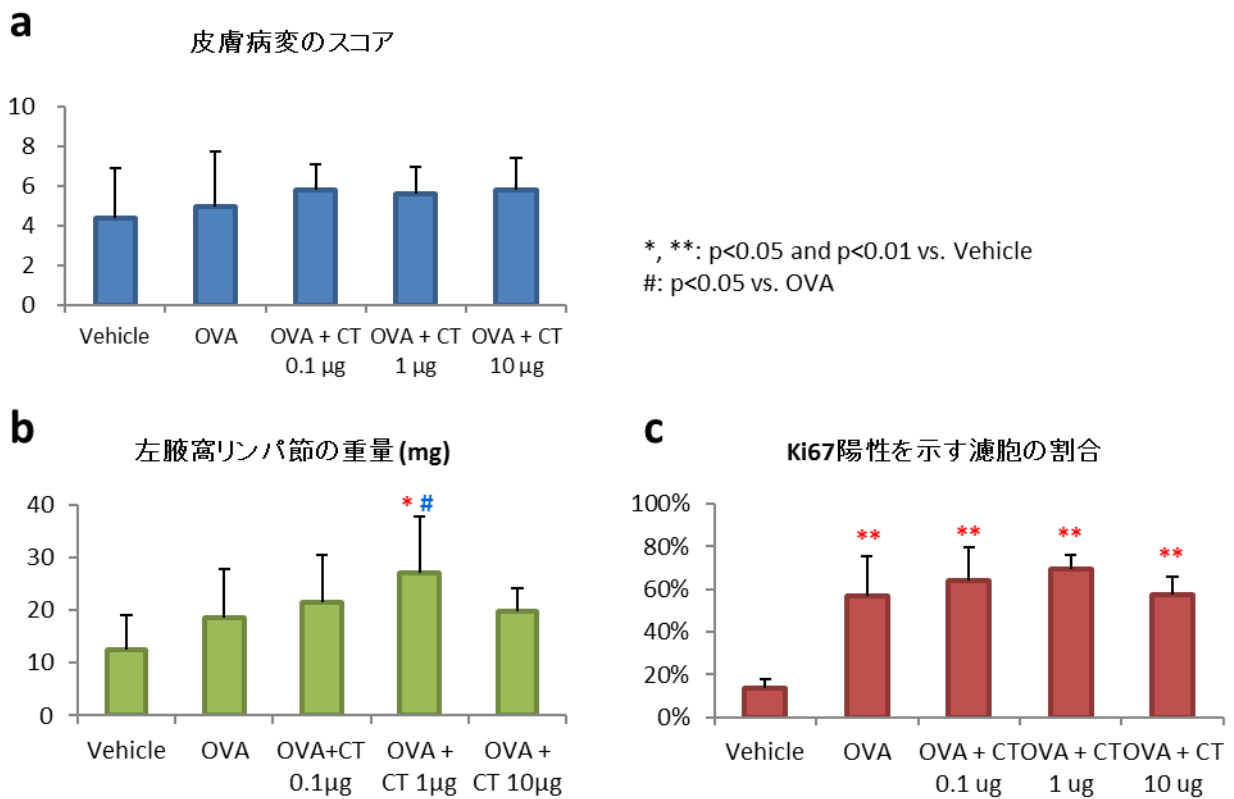


Figure 26. アナフィラキシー反応惹起の反応 (実験 2-1)



*, **: p<0.05 vs. Vehicle

Figure 27. 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 2-1)



*, **: p<0.05 and p<0.01 vs. Vehicle
#: p<0.05 vs. OVA

Figure 28. 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陽性を示す濾胞の割合 (c) (実験 2-1)

Relative spleen weight (g%)

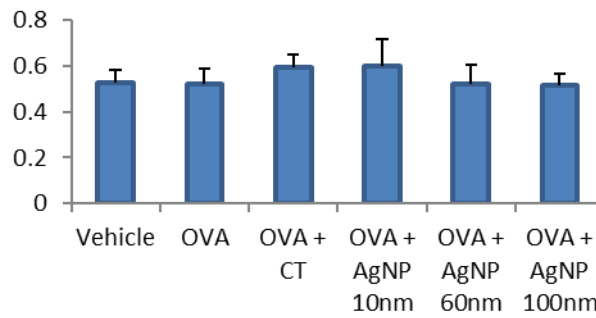


Figure 29. 相对脾臟重量 (実験 2-2)

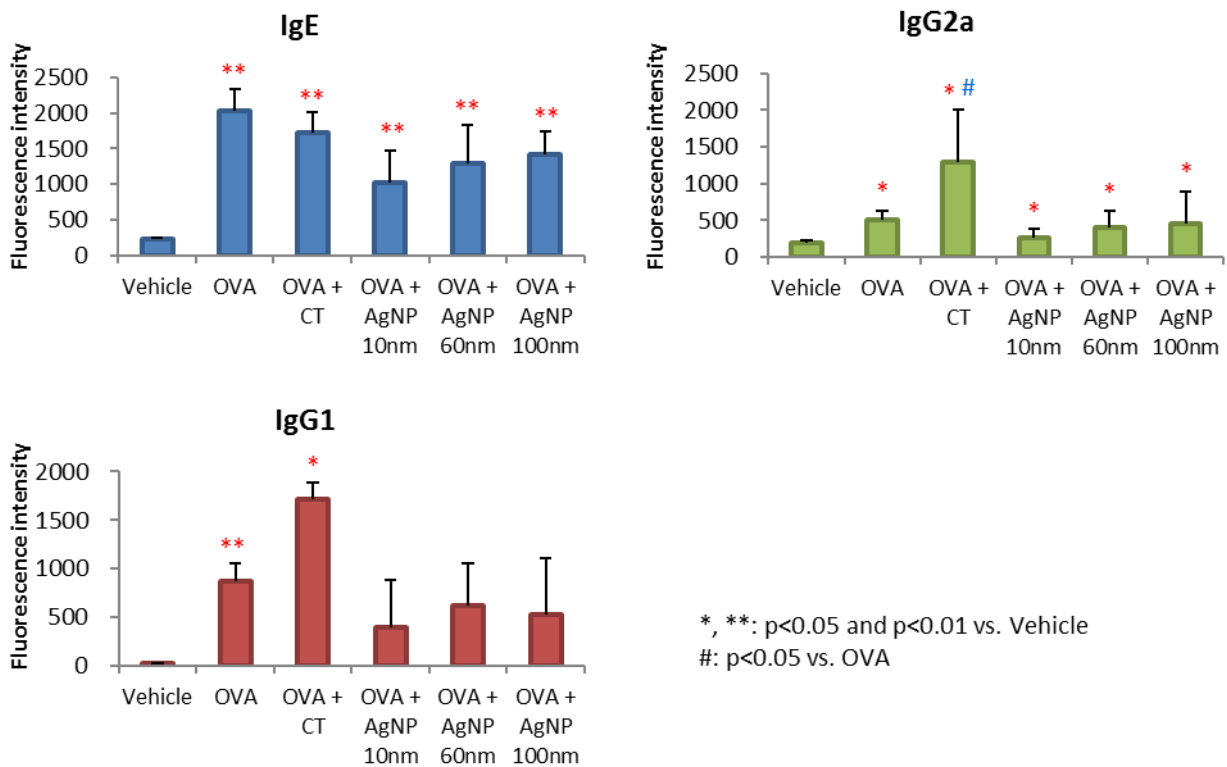
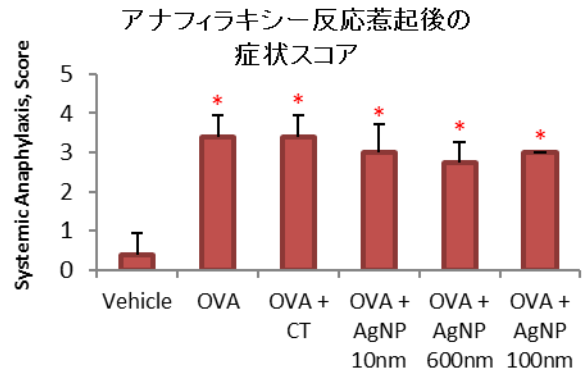
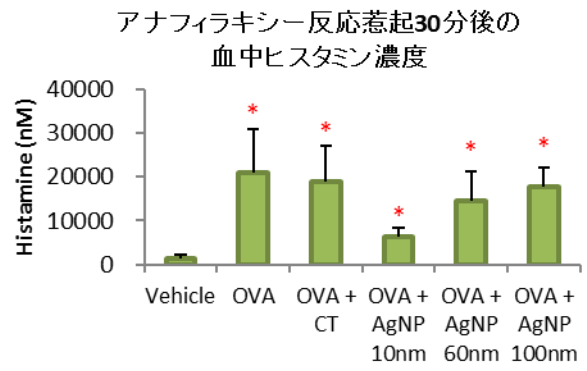
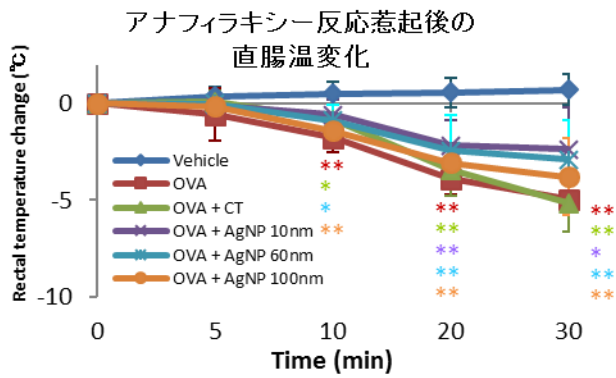


Figure 30. 血清中のOVA特異的抗体の産生 (実験 2-2)



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

Figure 31. アナフィラキシー反応惹起の反応 (実験 2-2)

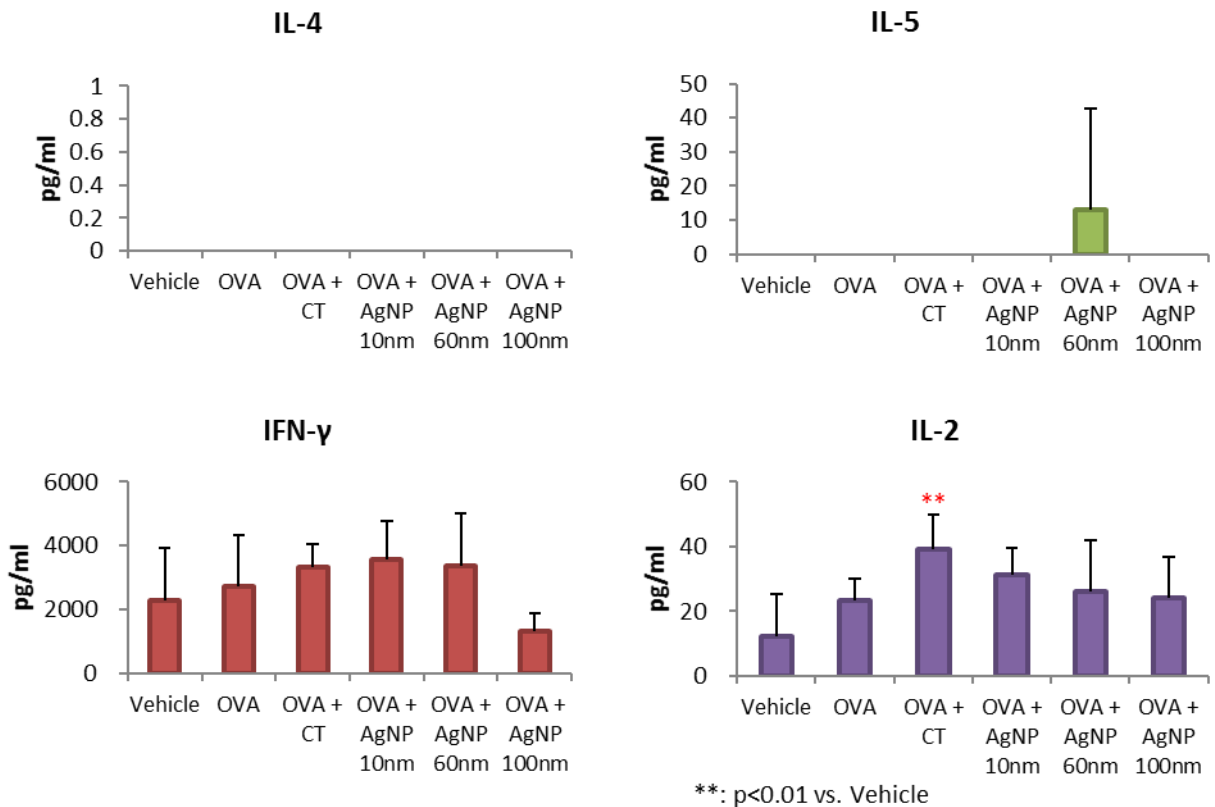


Figure 32. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 2-2)

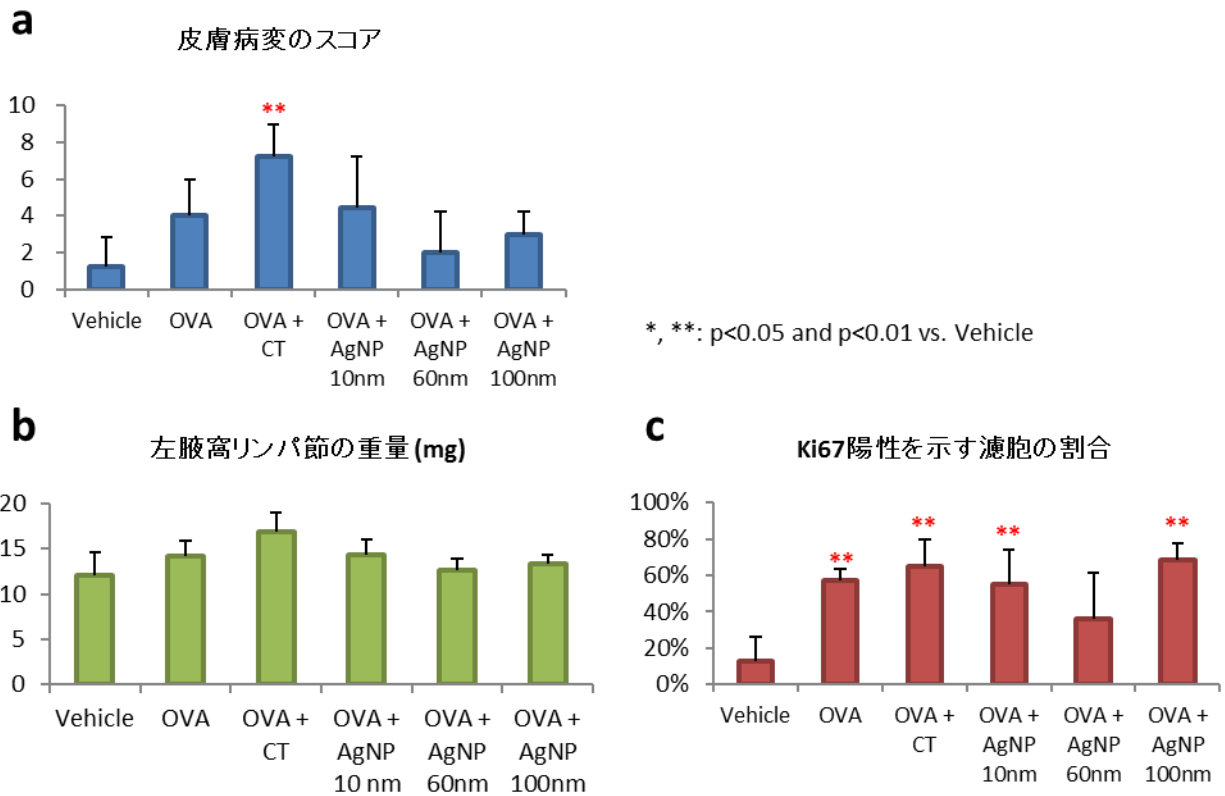


Figure 33. 皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の割合 (c) (実験 2-2)

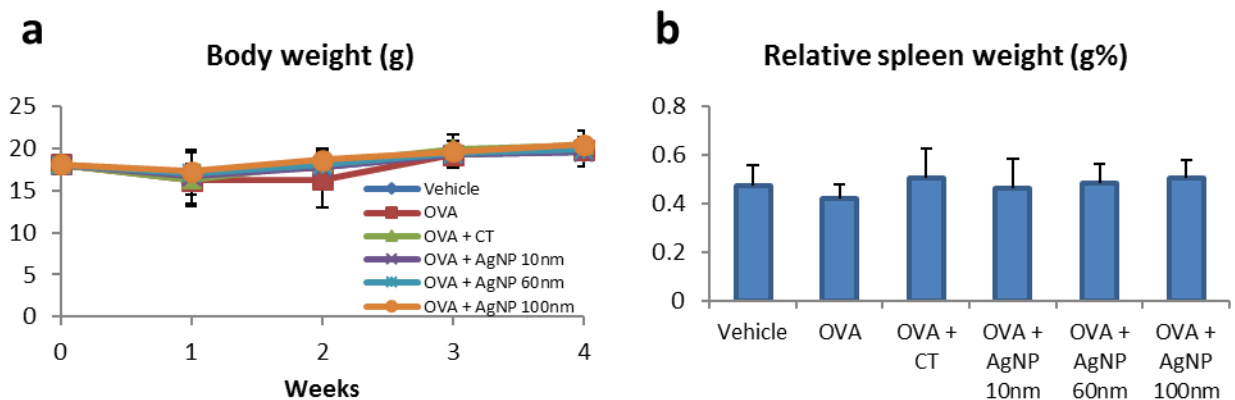


Figure 34. 体重 (a)及び相対脾臓重量 (b) (実験 2-3)

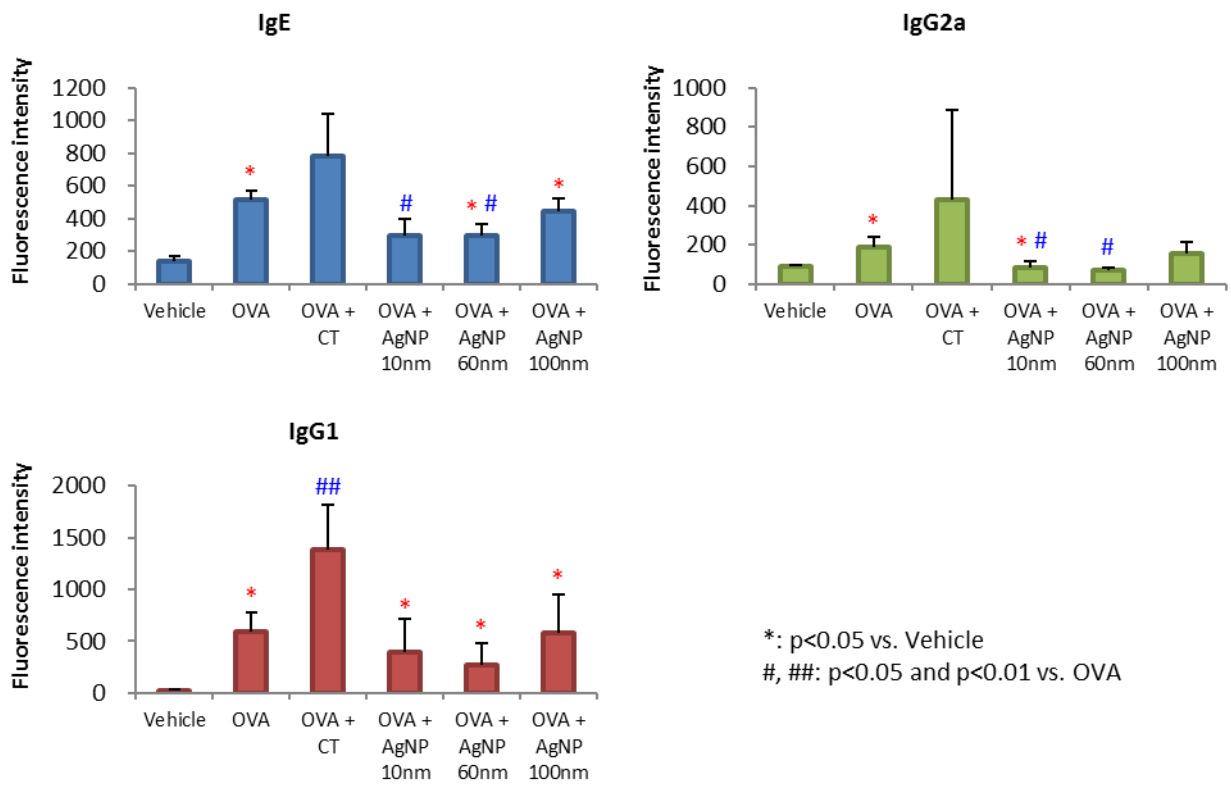


Figure 35. 血清中のOVA特異的抗体の産生 (実験 2-3)

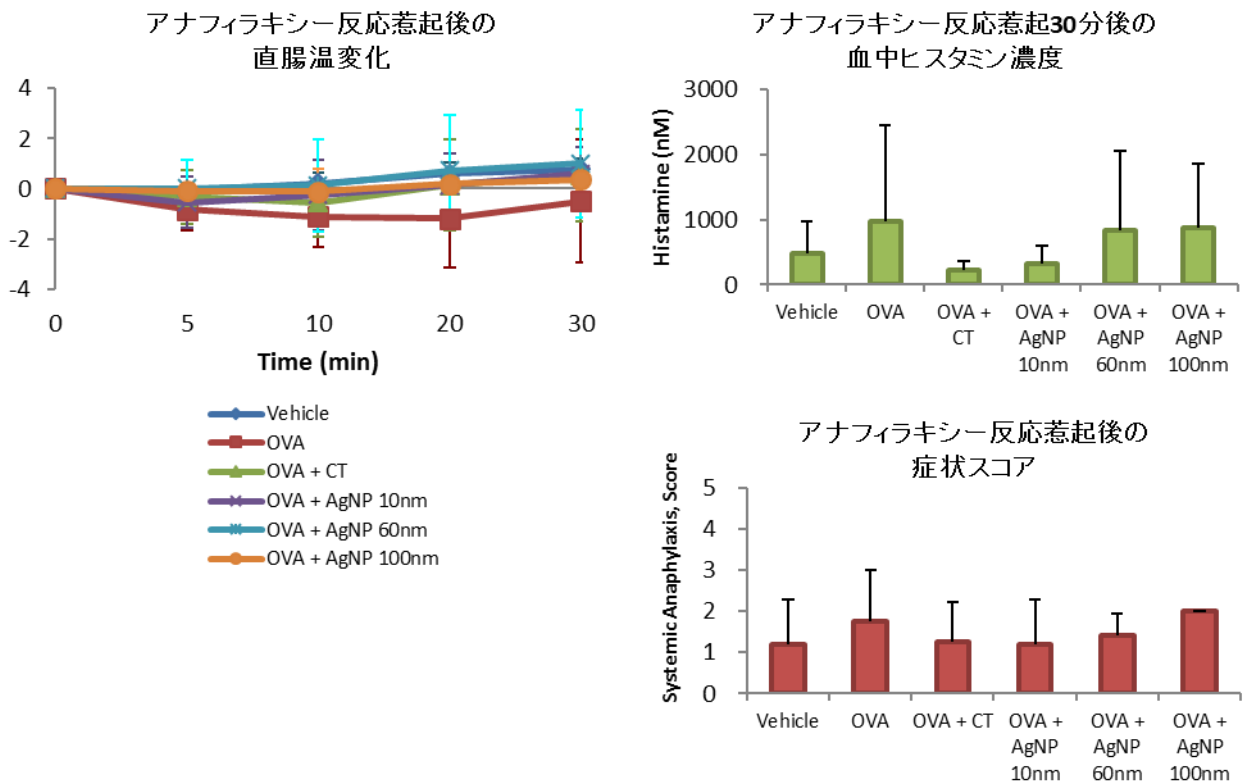


Figure 36. アナフィラキシー反応惹起の反応 (実験 2-3)

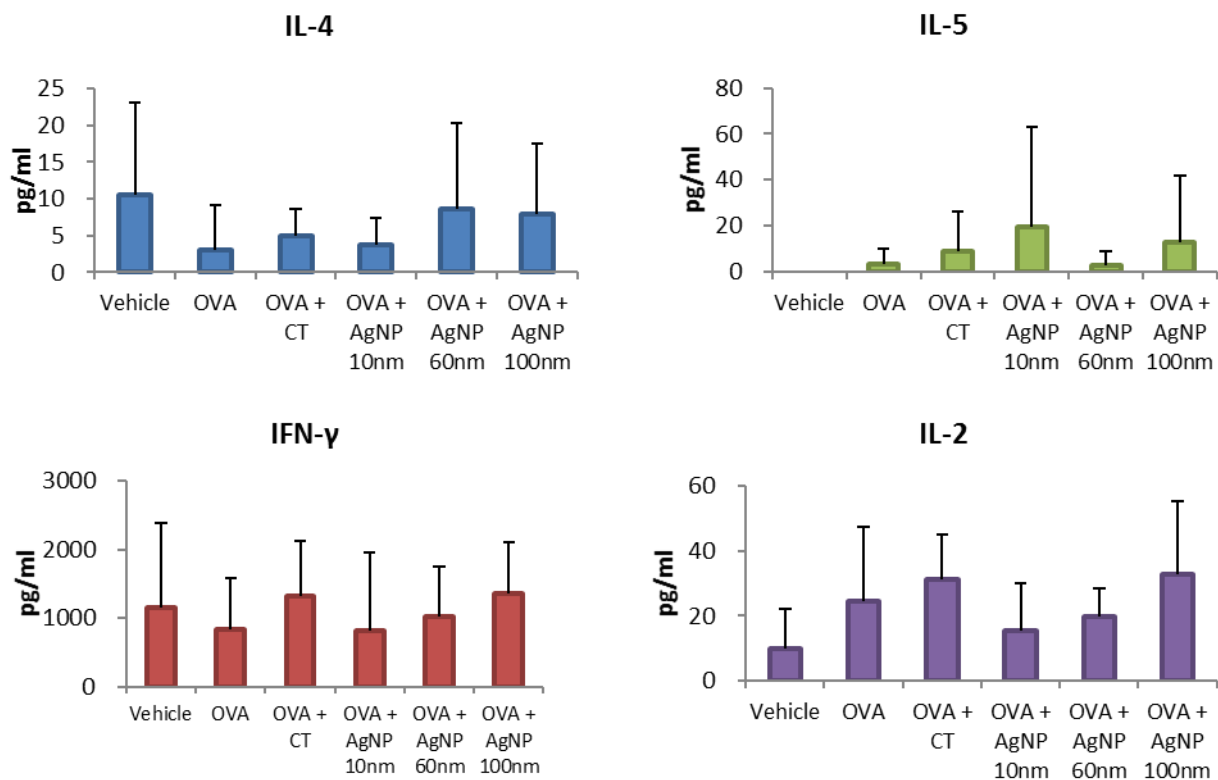


Figure 37. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 2-3)

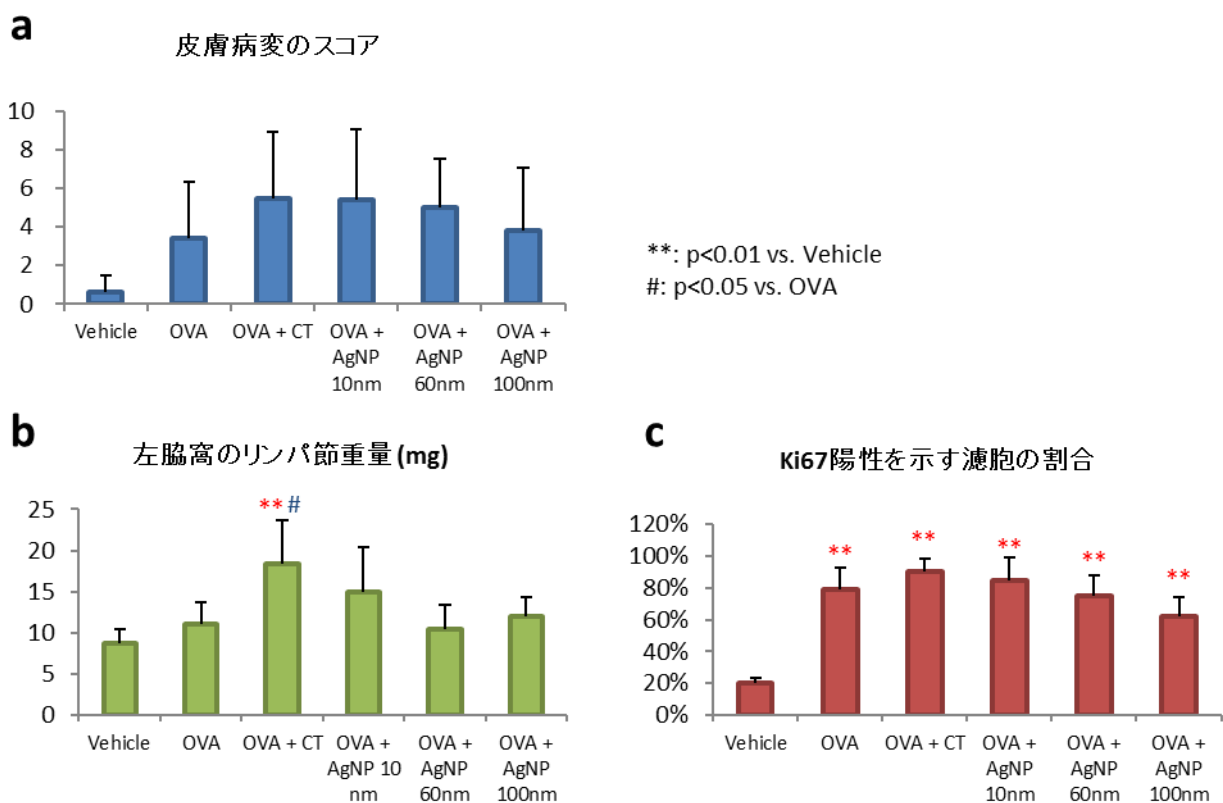


Figure 38. 皮膚病変のスコア (a)、左脇窩リンパ節の重量 (b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の割合 (c) (実験 2-3)

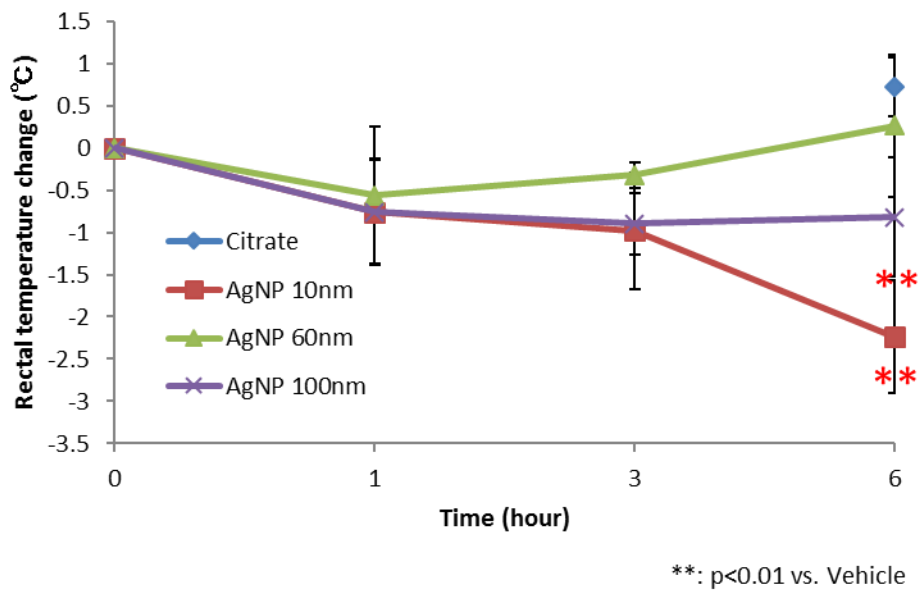
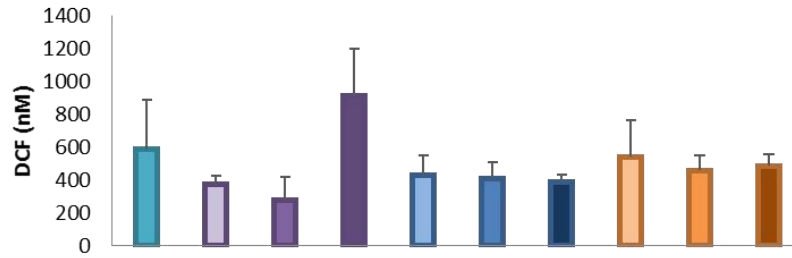


Figure 39. 投与後の直腸温の変化 (実験 2-4)

Serum ROS



Hepatic ROS

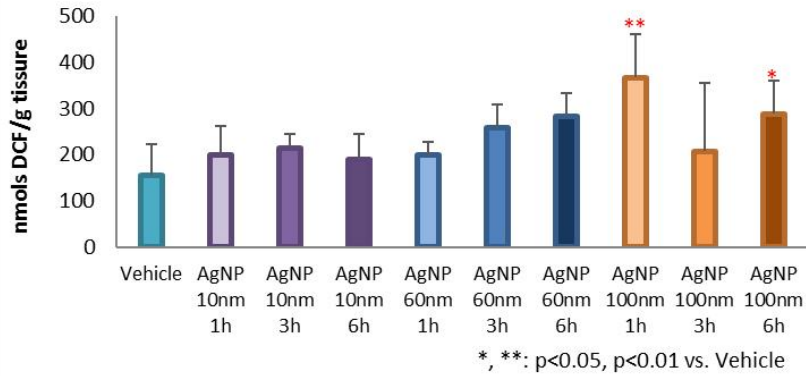
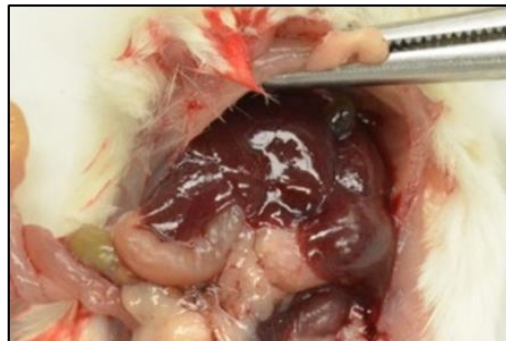


Figure 40. 血清及び肝臓中のROS産生量 (実験 2-4)

No. 1, Citrate, 6 hr



No. 18, AgNP 10 nm, 6 hr



No. 35, AgNP 60 nm, 6 hr



No. 50, AgNP 100 nm, 6 hr



Figure 41. 剖検時の肉眼変化 (実験 2-4)

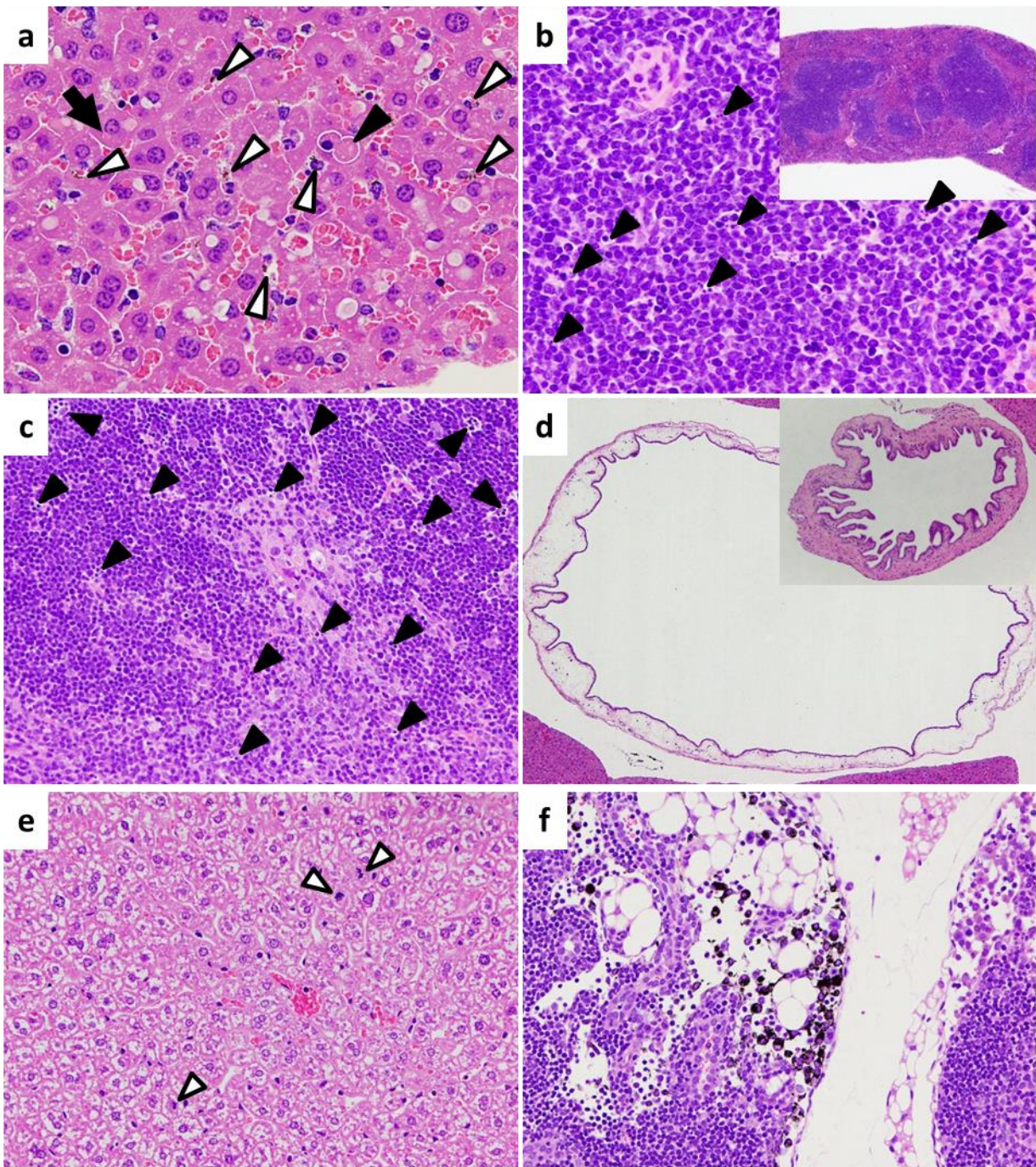
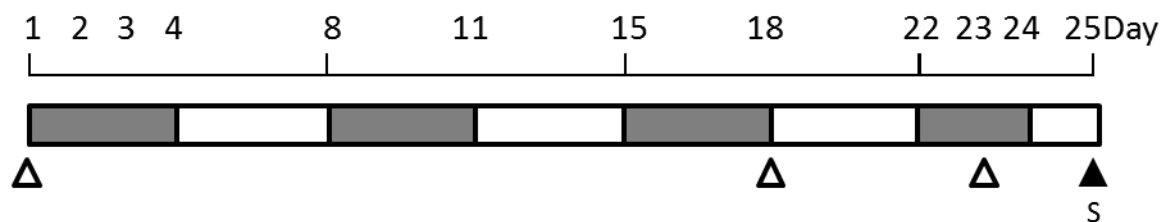


Figure 42. AgNP 10 nm 6時間群(a-d)、AgNP 60 nm 1時間群(e)及び 3時間群(f)の病理組織写真。(a)肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、クッパー細胞の暗褐色色素沈着(白矢頭)、肝細胞単細胞壊死(黒矢頭)及び細胞質内封入体(矢印)、(b)脾臓のうっ血及び白脾髄における細胞死、(c)胸腺の細胞死、(d)胆嚢粘膜下の浮腫(枠内はVehicle群)、(e)肝細胞の細胞分裂像(白矢頭)、(f)胸腺周囲リンパ節の褐色～黒色色素の沈着が認められた。



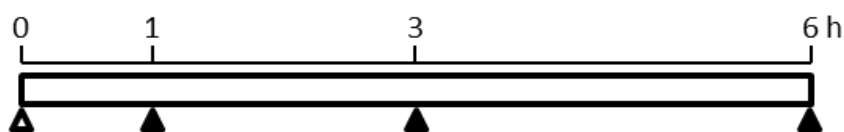
Animal 8-week old female BALB/c mouse (n=5/group)

█ Test chemicals exposure (skin patch on the flank, 50 μ l/mouse), ovalbumin (OVA, 2 μ g) + cholera toxin (CT, 1 μ g) or silver nanoparticles (10 nm AgNP, 0.1, 1, 10 μ g/mouse)

- ① 2 mM citrate (vehicle)
- ② OVA
- ③ OVA + CT
- ④ OVA + AgNP 10 nm 0.1 μ g
- ⑤ OVA + AgNP 10 nm 1 μ g
- ⑥ OVA + AgNP 10 nm 10 μ g

- △ Blood sampling
- ▲ Evocation with OVA (i.p. 1 mg)
- S Sacrifice (30 min after evocation)

Figure 43. 実験デザイン (実験 3-1)

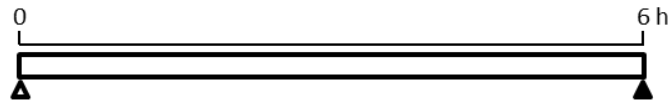


Animal 7-week old female BALB/c mouse (n=5/group)

- ▲ Test chemicals exposure (i.p., 300 μ l/mouse)
 - ① Citrate (vehicle, 6 hr only)
 - ② 10 nm AgNP (0.2 mg)
 - ③ 60 nm AgNP (0.2 mg)
 - ④ 100 nm AgNP (0.2 mg)

- ▲ Sacrifice

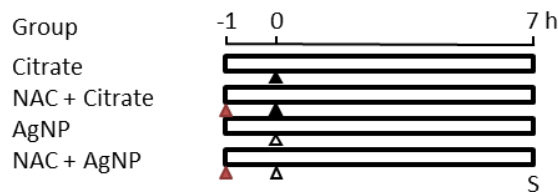
Figure 44. 実験デザイン (実験 3-2)



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

- ▲ Test chemicals exposure (i.p., 300 μ l/mouse)
 - ① Citrate (vehicle)
 - ② AgNP 10 nm 0.002 mg
 - ③ AgNP 10 nm 0.02 mg
 - ④ AgNP 10 nm 0.2 mg
- ▲ Sacrifice

Figure 45. 試験デザイン (実験 3-4)



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

- ▲ Vehicle (2 mM citrate, i.p., 300 μ l/mouse)
- △ Silver nanoparticles (10 nm AgNP, i.p., 0.2 mg/mouse)
- ▲ N-acetyl-L-cysteine (NAC, i.g., 2000 mg/kg bw)
- S Sacrifice

Figure 46. 試験デザイン (実験 3-5)

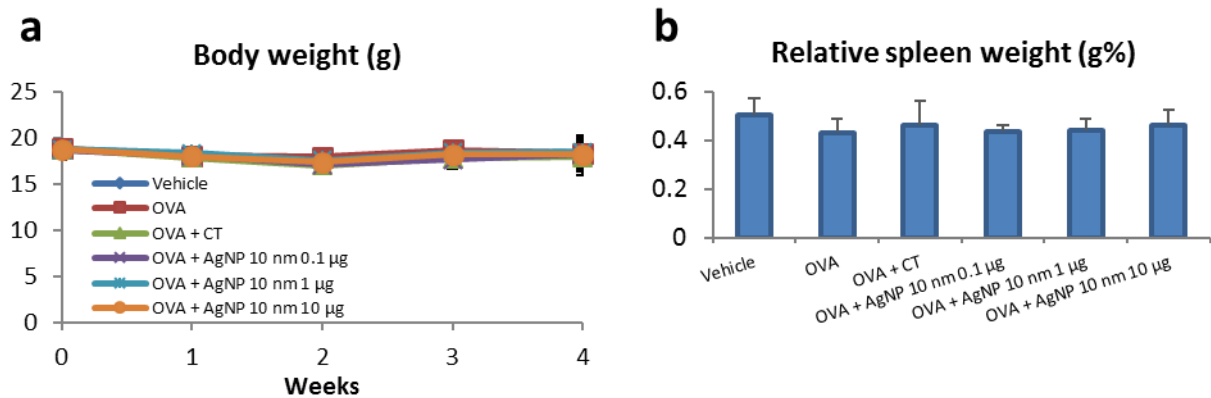


Figure 47. 体重 (a)及び相対脾臓重量 (b) (実験 3-1)

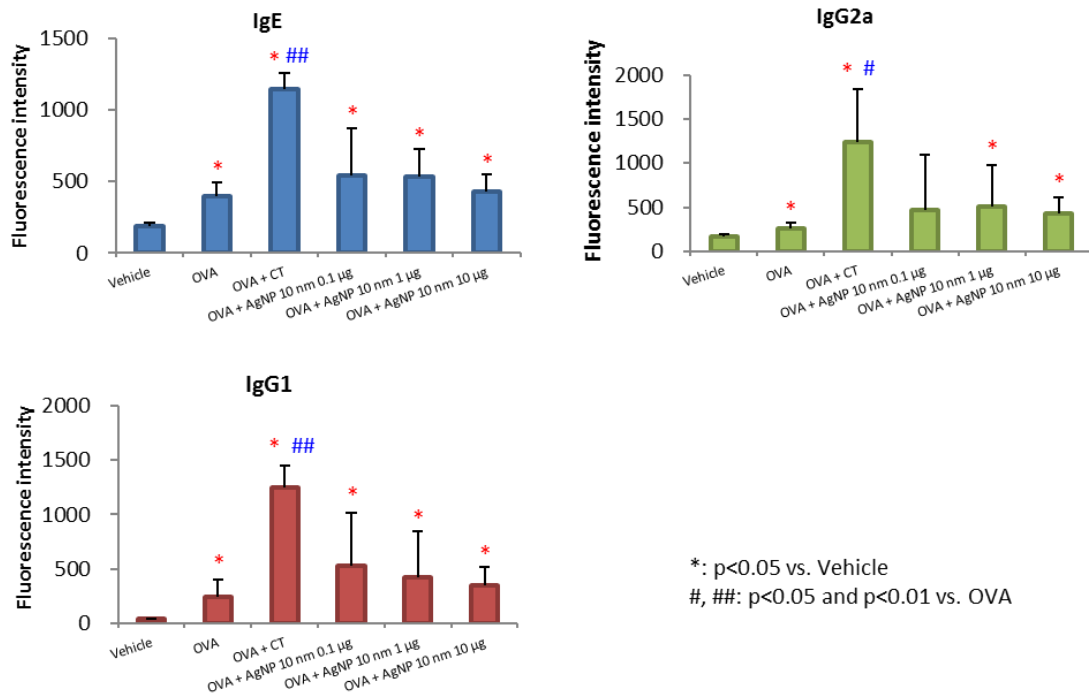


Figure 48. 血清中のOVA特異的抗体産生(実験 3-1)

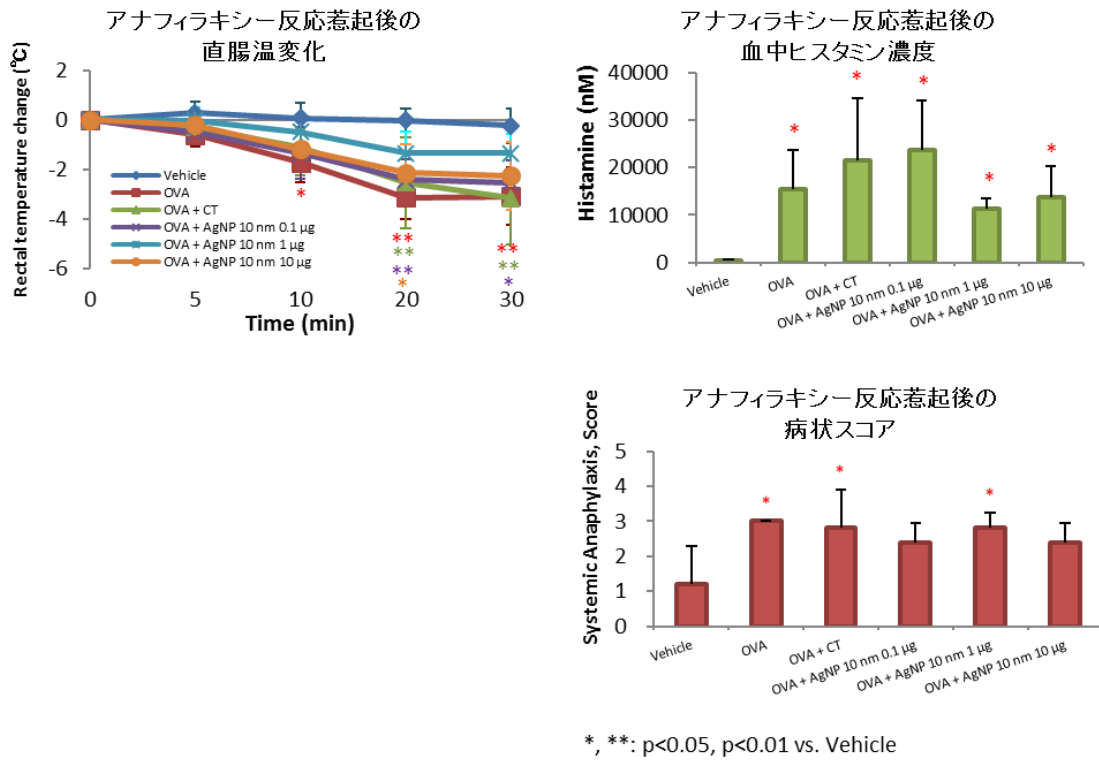


Figure 49. アナフィラキシー反応惹起の反応(実験 3-1)

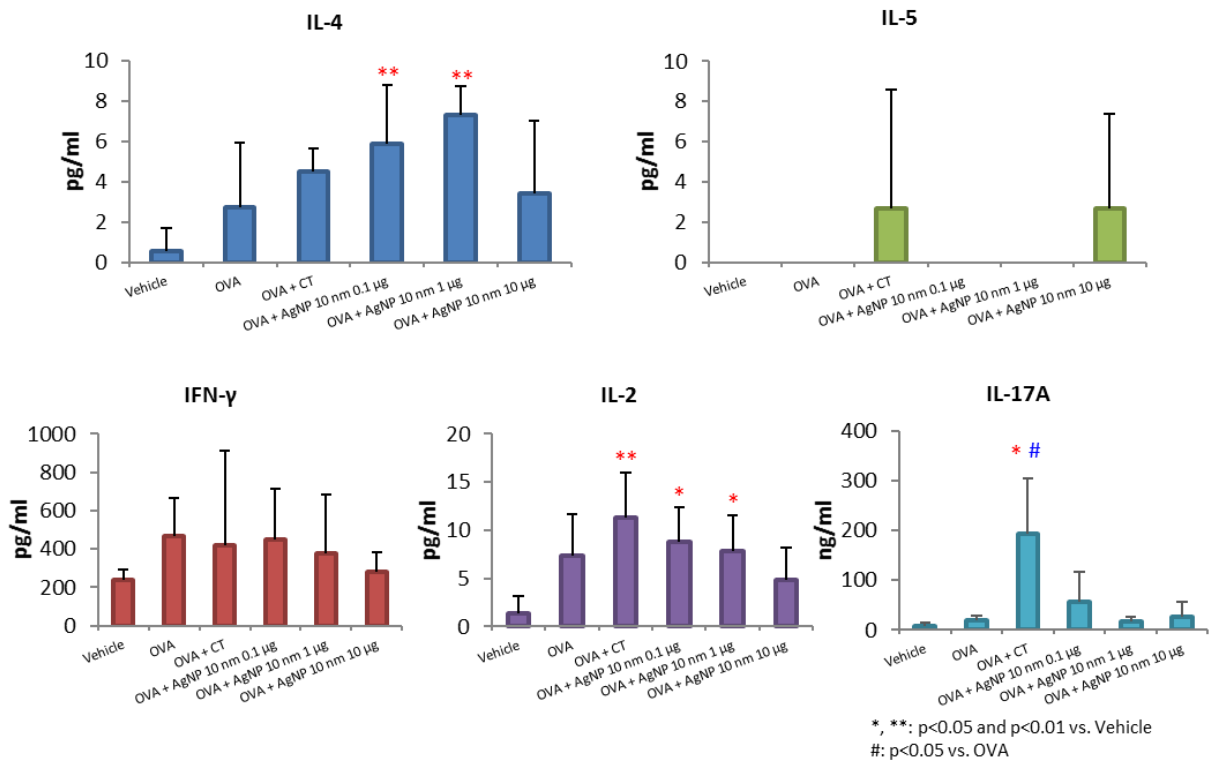


Figure 50. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 3-1)

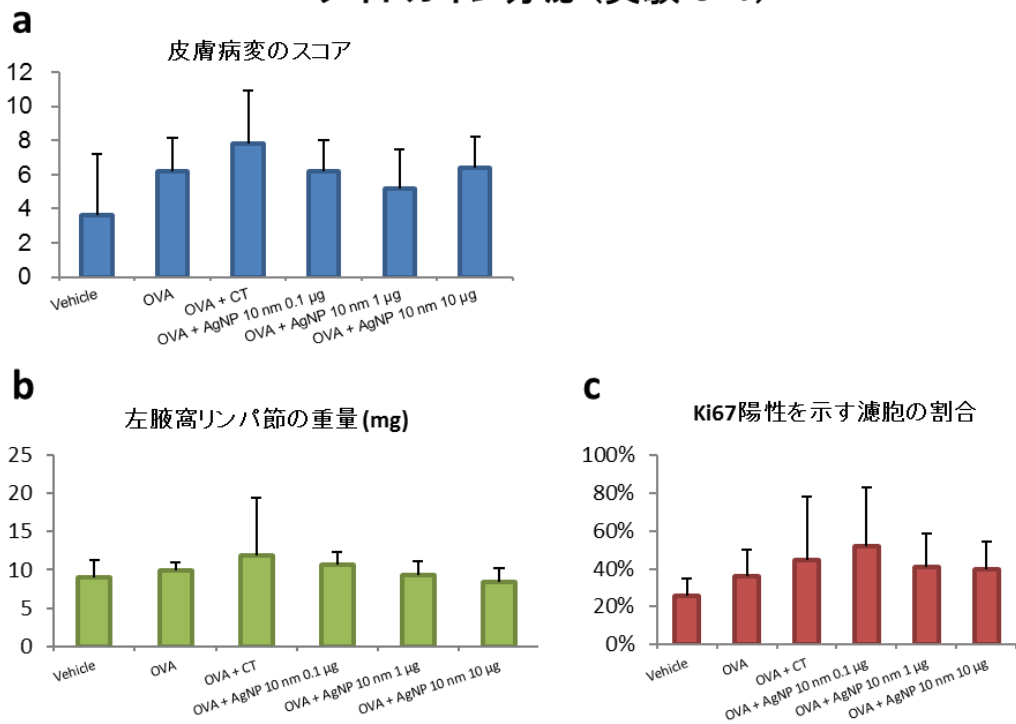


Figure 51. 皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の割合 (c) (実験 3-1)

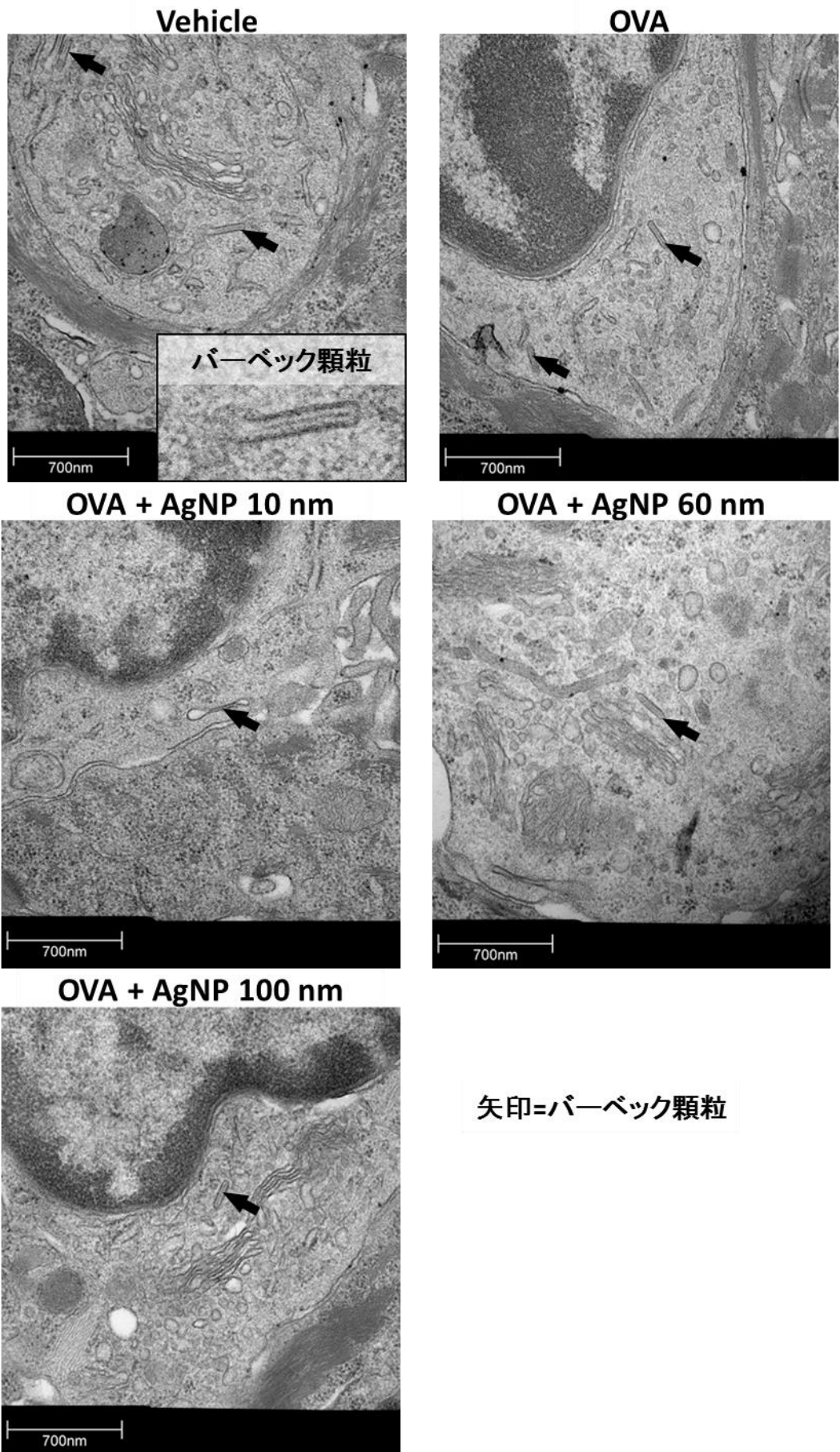


Figure 52. ランゲルハンス細胞バーベック顆粒の電子顕微鏡観察 (実験 3-2)

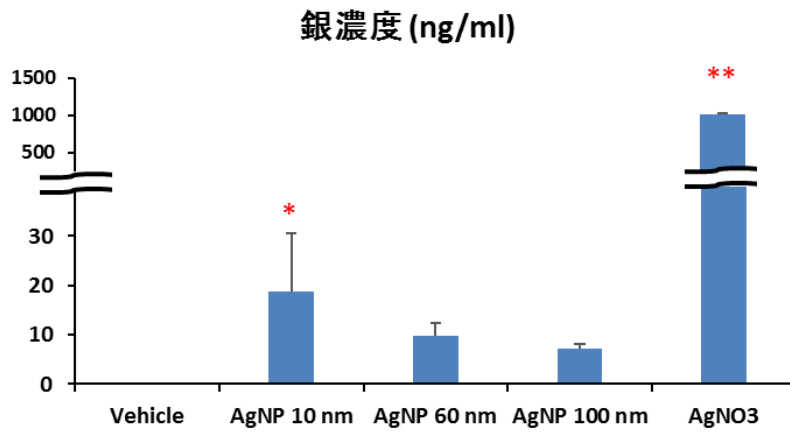


Figure 53. 超遠心上清の銀濃度 (実験 3-3)

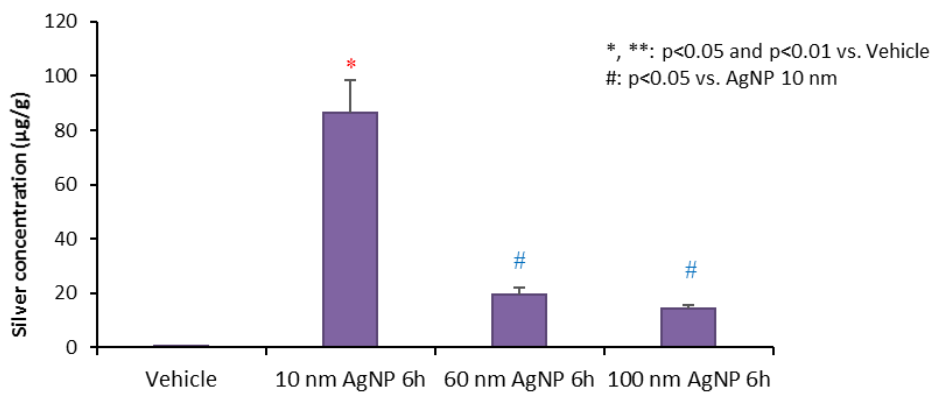


Figure 54. 肝臓内銀濃度 (実験 3-3)

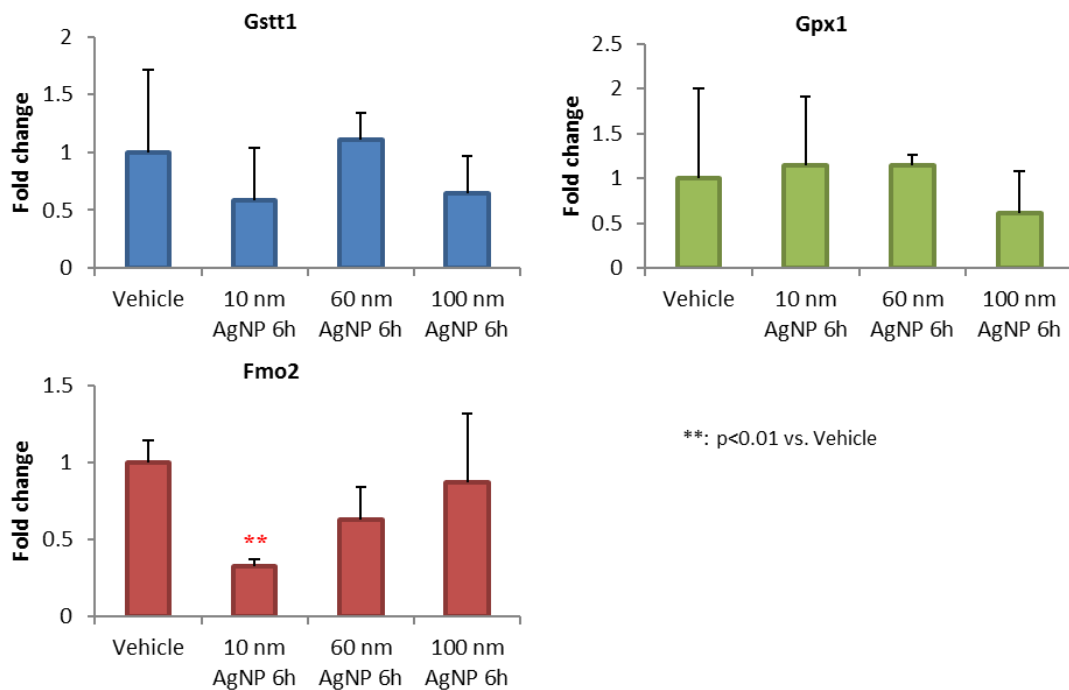
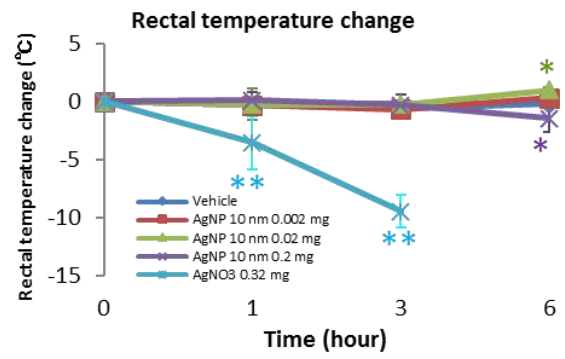
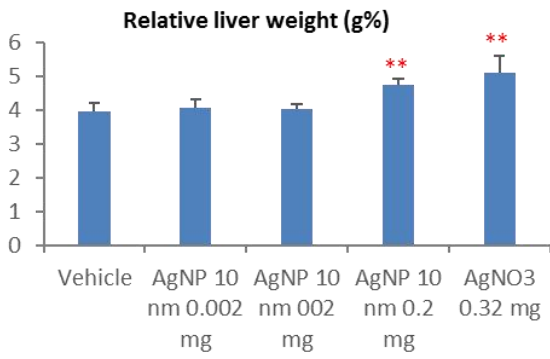


Figure 55. 肝臓におけるROS関連遺伝子の発現 (実験 3-3)



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

Figure 56. 相对肝重量及び体温変化 (実験 3-4)

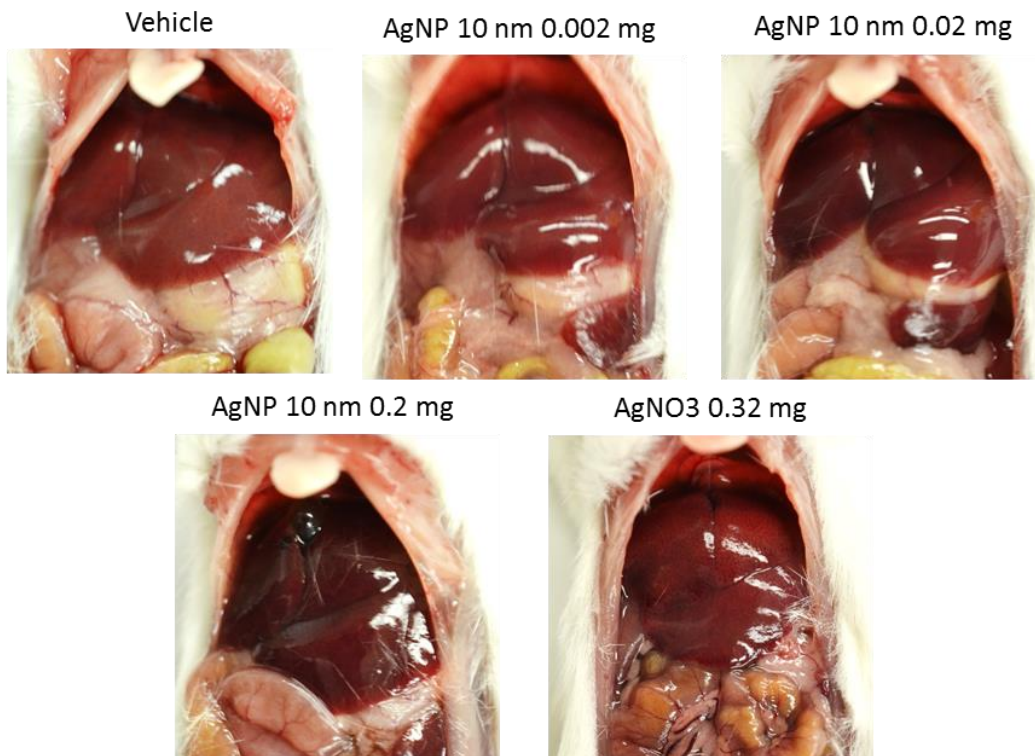


Figure 57. 剖検時の肉眼変化 (実験 3-4)

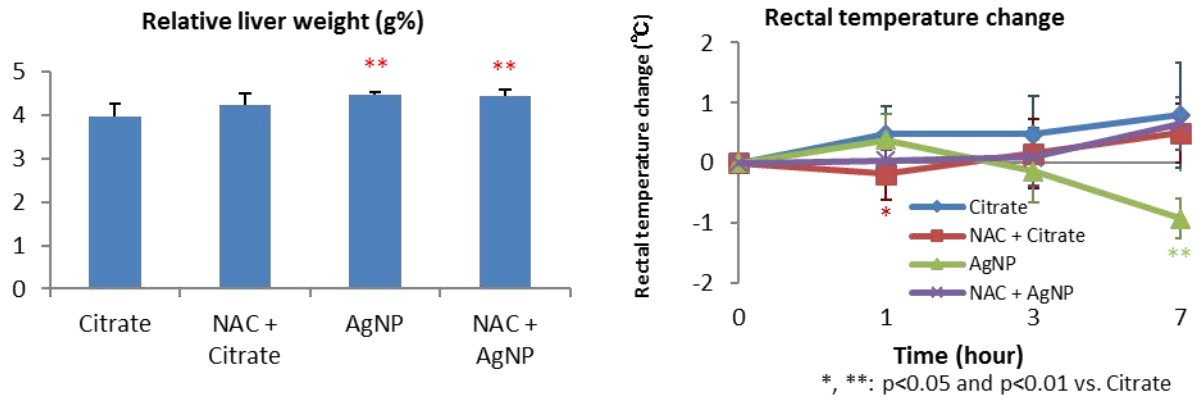


Figure 58. 相对肝重量及び体温変化 (実験 3-5)

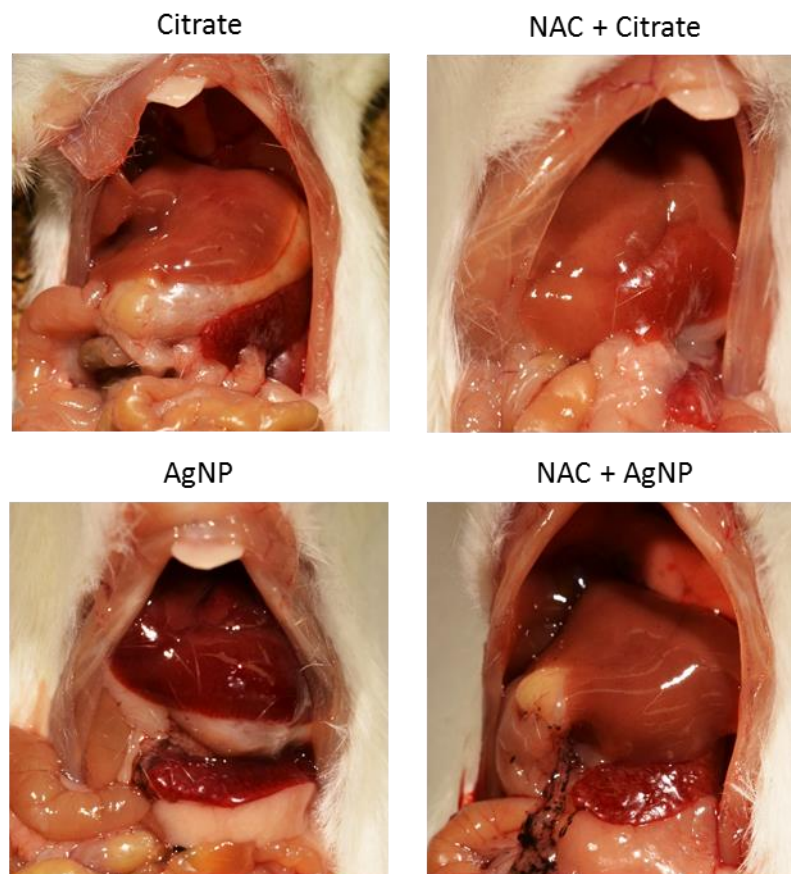


Figure 59. 剖検時の肉眼変化 (実験 3-5)

Table 1. 病理組織学的所見 (試験 1-1)

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 1-2)

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

Table 3. 体重および臓器重量 (実験 1-3)

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 4. 病理組織学的解析 (実験 1-3)

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	
Organ and lesions	No of animals	5	5	5	5 ^a	4	5	5 ^b	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 ^c	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, g, No. of sample is 0.

Table 5. 病理組織学的所見 (試験 2-1)

Treatment	No. of animal	Skin			
		Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration
		+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +
Vehicle	5	2/2/0	2/2/0	2/1/0	2/1/0
OVA	5	1/2/0	0/3/1	3/0/0	3/1/1
OVA + CT 0.1 µg	5	2/3/0	3/1/1	4/0/0	2/2/1
OVA + CT 1 µg	5	4/1/0	4/1/0	2/3/0	3/2/0
OVA + CT 1 µg	5	4/1/0	3/1/1	2/3/0	3/1/1

Table 6. 病理組織学的所見 (試験 2-2)

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

Table 7. 病理組織学的所見 (試験 2-3)

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

Table 9. 病理組織学的所見 (試験 2-4)

Organ and lesions	Treatment	Vehicle		AgNP 10 nm		AgNP 60 nm		AgNP 100 nm			
	Time after treatment	6 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h	1 h	3 h	6 h
	No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5
Liver	Congestion, intermediate zone	0	0	0	5**	0	0	0	0	0	0
	Decreased glycogen, hepatocyte	0	0	0	3	0	0	4*	0	1	4*
	Increased glycogen, hepatocyte	0	2	0	0	5**	0	0	4*	0	0
	Vacuolation, hepatocyte	0	0	0	5**	0	0	0	0	0	0
	Cytoplasmic inclusions, hepatocyte	0	0	0	5**	0	1	0	0	0	0
	Single cell necrosis, hepatocyte	0	0	0	5**	1	0	0	0	0	0
	Focal necrosis, hepatocyte	0	0	0	3	0	0	1	2	1	0
	Mitosis, hepatocyte	0	1	0	0	5**	5**	2	5**	2	1
	Megalocyte, hepatocyte	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
	Dark brown pigment deposition, Kupffer cell	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
	Infiltration, neutrophil	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Gall bladder	Hyperplasia, mesothelium	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Edema, submucous	0	3	2	5**	5**	4*	0	3	2	2
	Edema, subserosa	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
	Dilatation	0	4*	1	5**	2	2	2	4*	2	0
	Vacuolation, epithelium	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	Cell infiltration, submucous, lymphocytic	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Spleen	Congestion	0	0	0	4*	0	0	0	0	0	0
	Apoptosis, white pulp	0	0	0	2	1	0	1	3	3	1
	Extramedullary hematopoiesis, erythrocytic	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Thymus	Apoptosis, cortex	0	0	3	5**	2	4*	1	0	3	0
	Apoptosis, medulla	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	3	5**	5**	4*	3	4*	3	3	3
	Congestion	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
Intestine	Hemorrhage, large intestine, submucous	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Congestion, large intestine, lamina propria	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Vacuolation, small intestine, mucosal epithelium	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Small intestine injection track	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Cecum injection track	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mesenterium	Apoptosis, cortex	0	3	4*	5**	5**	5**	5**	5**	4	5**
	Apoptosis, paracortex	0	3	5**	5**	5**	5**	5**	5**	4	5**
	Erythrophagocytosis	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
	Hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, cortex	0	1	2	3	2	4*	2	0	4*	2
	Apoptosis, paracortex	0	2	3	3	1	2	2	2	1	3
Kidney	Regenerative tubules	4	5	5	5	5	5	3	5	5	5
	Mineralization, medulla	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Heart	Cell infiltration, interstitial, lymphocytic	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	Thrombus, right ventricle	0	2	0	0	0	1	2	0	1	2
	Thrombus, left ventricle	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Thrombus, right atrium	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Mineralization, epicardium	4	5	2	4	3	2	3	3	1	2
	Mineralization, myocardium	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Mineralization, endocardium	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Cell infiltration, interstitial, lymphocytic	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
	Cell infiltration, interstitial, neutrophil	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	Megalocyte, cardiomyocyte	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	High cellularity, alveolar wall	0	0	1	4*	1	0	0	0	0	0
Lung	Hemorrhage	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Dark brown pigment deposition, alveolar macrophage	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
	Lymphatic hyperplasia	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

*,**; significantly different from vehicle group at $p < 0.05, 0.01$, respectively

Table 10. 病理組織学の所見(実験 3-1)

Treatment	No. of animal	Skin				
		Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration	
		+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	
Vehicle	5	3/0/1	0/0/2	1/1/0	1/1/0	3/0/1
OVA	5	1/3/1	2/1/1	4/1/0	2/3/0	1/3/1
OVA + CT 0.1 µg	5	0/3/2	2/0/3	1/2/1	2/3/0	0/3/2
OVA + CT 1 µg	5	1/2/2	1/3/1	4/0/0	4/1/0	1/2/2
OVA + CT 1 µg	5	2/1/1	1/3/0	4/0/0	2/3/0	2/1/1

Table 11. 病理組織学の所見(実験 3-4)

Organ and lesions	Treatment	Citrate (Vehicle)	AgNP 10 nm, 0.002 mg	AgNP 10 nm, 0.02 mg	AgNP 10 nm, 0.2 mg	AgNO3 0.32 mg	
							No. of animals
Liver	Congestion, intermediate zone		0	0	0	4*	5**
	Vacuolation, hepatocyte		0	0	1	4*	5**
	Cytoplasmic inclusions, hepatocyte		0	0	0	4*	0
	Single cell necrosis, hepatocyte		0	0	1	3	0
	Focal necrosis, hepatocyte		0	0	0	2	0
	Dark brown pigment deposition, Kupffer cell		0	0	0	3	0
Gall bladder	Edema, submucous		0	0	0	1	1
	Dilatation		1	0	0	1	0
Spleen	Congestion		0	1	0	0	3
	Apoptosis, white pulp		0	0	0	3	0
Thymus	Apoptosis, cortex		0	2	1	5**	4*
	Apoptosis, medulla		0	0	0	4*	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte		0	0	1	4*	0
Mesenterium	Granuloma		4	1	2	4	2
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, cortex		0	0	1	3	0
	Apoptosis, paracortex		0	0	0	3	0
Kidney	Regenerative tubules		5	4	5	5	5
	Mineralization, medulla		0	0	0	1	0
Heart	Thrombus, right ventricle		0	1	1	1	0
	Thrombus, left ventricle		0	1	0	0	0
	Thrombus, right atrium		0	0	1	0	0
	Thrombus, left atrium		0	1	0	0	0
	Mineralization, epicardium		2	3	1	1	2
	Mineralization, myocardium		0	0	2	1	0

*,**; significantly different from the Vehicle group at $p < 0.05, 0.01$, respectively.

Table 12. 病理組織学的所見 (実験 3-5)

Organ and lesions	Treatment	Citrate	NAC + Citrate	AgNP	NAC + AgNP
	No. of animals	5	5	5	5
Liver	Congestion, intermediate zone	0	0	5**	0##
	Vacuolation, hepatocyte	0	0	5**	0##
	Cytoplasmic inclusions, hepatocyte	0	0	5**	0##
	Single cell necrosis, hepatocyte	0	1	4*	0#
	Dark brown pigment deposition, Kupffer cell	0	0	4*	0#
Gall bladder	Edema, submucous	0	0	1	0
	Dilatation	1	3	3	3
Spleen	Congestion	0	0	1	0
	Apoptosis, white pulp	0	0	3	0
Thymus	Apoptosis, cortex	0	0	5**	0##
	Apoptosis, medulla	0	0	1	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	0	4*	4*
Mesenterium	Granuloma	0	1	5**	5**
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	0	5**	4*
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, cortex	0	0	0	0
	Apoptosis, paracortex	0	0	5**	1#
	Regenerative tubules	5	5	5	5
Kidney	Simple hyperplasia, tubule	0	1	0	0
Heart	Mineralization, epicardium	2	3	4	0#

*,**; significantly different from the Citrate group at $p < 0.05, 0.01$.

##,###; significantly different from the AgNP group at $p < 0.05, 0.01$.