別添 3

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３０年度）

食品用途となるナノマテリアルの暴露による毒性評価に関する研究

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。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暴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、皮膚からも暴露される。AgNPの経皮経口複合暴露による、特にアジュバント作用に関する評価方法を確立するため、実験 1)においてコレラトキシン B サブユニット (CTB)を卵白アルブミン (OVA)と混合物にし、経皮暴露 (p.c.)した。その後、抗原であるOVAを腹腔内投与し、アジュバント作用の有無を検討した。実験 2)においては、アレルゲン経皮感作経口惹起系の予備検討として、経皮感作後、経口投与 (i.g.)による追加免疫、その後経口投与によるアレルギー症状惹起の有無を検討した。実験 1)については、いずれのOVA処置群でも、血中のOVA特異的なIgG1及びIgEがVehicle群と比較して有意な増加を示し、IgG1がCTB群でOVA群と比較して有意な増加・増加傾向を示した。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・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。抗原再暴露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン IL-2及びIL-17分泌については、OVA + CTB 1 μg投与群でVehicle群と比較して有意な増加を示した。皮膚病変のスコアはすべてのCTB投与群で、Ki67陽性を示す濾胞の割合はすべてのOVA投与群でVehicle群と比較して有意に増加し、OVA + CTB 1 μg及びOVA + 5 μg投与群でOVA群と比較して有意に増加した。実験 2)については、OVA p.c.⇒i.g.群及びOVA p.c.⇒i.g.long群でIgG1及びIgEが6及び7週で各時点のVehicle群と比較して有意な増加を示し、OVA i.p.⇒i.g.群でIgG1が7週でVehicle群と比較して有意な増加を示した。惹起60分後の下痢スコアについては、OVA i.p.⇒i.g.群及びOVA p.c.⇒i.g.long群でVehicle群と比較して有意な高値を示した。以上の結果から、今回の条件においては、皮膚感作性試験の陽性アジュバント物質として検討したCTBについては弱いながらアジュバント効果を示した。また、アレルゲン経皮感作経口惹起系の予備検討において、OVA p.c.⇒i.g.long群はOVAの経皮投与後、経口投与によるアレルギー症状の惹起を示し、今回の条件での経皮感作経口惹起系は有効であることが明らかとなった。AgNPの経皮経口複合暴露によるアジュバント作用に関する評価方法を確立するための重要な知見を得たと考えられた。

AgNPのサイズによる毒性の違いに関連する情報は少ない。26年度及び27年度の検討において、我々はマウスに直径 10 nm、60 nm及び100 nm の AgNPを単回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ことを報告した。AgNPの毒性を規定する要因として、重量あたりの表面積、サイズの相異による動態の違い、あるいは、粒子の表面修飾の関与等が議論されているが、現在の所、詳細は不明

のままである。そこで、30 年度の本研究では、高分子化合物、ポリビニルピロリドン(Polyvinylpyrrolidone, PVP)で表面修飾した AgNP の単回腹腔内投与による急性毒性について、検討した。その結果、直径 5 nm AgNP PVP 投与群において、体温低下に加え、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ことから AgNP の急性毒性は粒子のサイズに相関することが再確認できた。今後、本研究で得られた結果についてさらに検討を重ね、AgNP の急性毒性メカニズムについて、ナノ粒子のサイズ及び表面修飾に加え、酸化的ストレスの詳細に関する解析を進めることが必要である。

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては、その特性による予想外の健康影響の可能性が指摘されている。酸化チタンや酸化亜鉛は、日焼け止め製品等の化粧品類へ配合されており、かつ着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装にも使用されている。本研究班の目的は、食品・食品容器包装用途に用いられ、経口及び経皮から暴露されるナノマテリアルについて、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積することである。29 年度においては、ナノ酸化チタン、ナノ酸化亜鉛について、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果、及び、抗原経皮感作に与える影響について検討した。30 年度においては、引き続きナノ酸化亜鉛が抗原経皮感作に与える影響について検討するとともに、29 年度腹腔内投与時に急性毒性が見られたことから、ナノ酸化亜鉛の腹腔内投与（i.p.)による急性毒性に関する検討を行った。さらに、抗原経皮感作-経口惹起実験系の確立を目指し、抗原経口投与（p.o.)によるアレルギー反応惹起実験系に関する検討を実施した。抗原経皮感作時の増強効果については、今回用いた酸化亜鉛（粒子径 80 nm）では効果は見られなかった。先行研究における結果と考え合わせ、ナノマテリアルの経皮感作増強効果は粒子径により異なり、粒子径が小さいナノマテリアルの方が経皮感作増強効果が大きいことが示唆された。また、酸化亜鉛に関しては、酸化チタンと異なり急性毒性が見られ、肝臓、腎臓、及び胸腺やリンパ節に影響を与える可能性が示された。経口惹起実験系については、抗原の i.p.感作後に p.o.追加免疫を行うことにより、最終的に p.o.によりアレルギー反応を惹起することが可能であることが示された。今後は経皮感作-経口惹起の動物モデル実験系を確立し、ナノマテリアルの経皮／経口暴露が免疫応答に与える影響について検討を進める。

本研究では、ナノマテリアルの食品関連分野を中心とした曝露状況やリスク評価に関する国際動向を調査することを目的とする。平成 30 年度は、欧州食品安全機関（EFSA）主催の「食品および飼料分野におけるナノテクノロジーのリスクアセスメントに関する科学ネットワーク（FSA 科学ネットワーク会議）」に関する調査を行い、リスクアセスメントに関する改定ガイダンスに対するケーススタディおよびガイダンスの実用性への議論について調査した。また、「食品添加物および食品に添加する栄養源に関する科学パネル（ANS パネル）」より、二酸化ケイ素の再評価、ケイ酸カルシウム・ケイ酸マグネシウム・三ケイ酸マグネシウム及びタルクの再評価、銀ヒドロゾルの安全性および生物学的利用能に係る科学的意見書についての情報取集を行った。その結果、改定ガイドラインについては EU 各国により、特に、物理化学的特性評価に関するガイダンスの修正は有用となる可能性があるものと判断されていた。また、既存物質の再評価では、既存の評価は有効ではないことが確認されたが、ナノを含むものとしての評価としては情報が足りないことが示唆されていた。EFSA のナノ成分を含有する既存物質の評価を議論からは、ナノ材料の物理化学的な特性評価や、毒性学的評価などの科学的知見についての情報は未だ不足していることが示され、今後もさらなる情報収集が必要であると考えられた。

キーワード：ナノ銀、酸化チタン、酸化亜鉛、経皮感作性、急性毒性、経皮感作経口惹起系、コレラトキシンBサブユニット、アジュバント効果、マウスモデル、国際動向、EFSA

研究分担者：曺　永晩
国立医薬品食品衛生研究所　病理部　室長
研究分担者：西川 秋佳
国立医薬品食品衛生研究所　客員研究員
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：為広　紀正
国立医薬品食品衛生研究所　生化学部
主任研究官
研究協力者：大野　彰子
国立医薬品食品衛生研究所　安全性予測
評価部　主任研究官

A. 研究目的

ナノ銀（AgNP)の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与（i.g.)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の経皮暴露（p.c)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暴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、皮膚からも暴露される。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、経口暴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暴露された後に、経口暴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、他のアレルゲン暴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。

平成24年から、ある特定の小麦タンパク質加水分解物（グルパール19S)を含有する洗顔石鹸（茶のしずく石鹸：医薬部外品)の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告され、非常に大きな問題となった。我々は、当所生化学部との共同研究で、即時型アレルギー誘発経皮感作モデル実験系を用いると、小麦タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因が経皮感作性に与える影響について解析ができ、被験物質をマウス皮膚暴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。また、Yamashitaらによって、被験物質をマウス腹腔内投与による感作後、強制経口投与によって惹起させるモデルの開発も試みられ、有用な結果を示している（Yamashita H et. al., Allergy. 2012;67, (201-209), Matsui T et. al., Int Arch Allergy Immunol. 2017;173, (71-83))。本研究では、上記のモデルを応用し、卵白アルブミン（OVA)の経皮感作後、OVAの腹腔内投与惹起による免疫毒性における、AgNPのアジュバ

ント効果を検討することを目的としている。評価にはアジュバントの陽性対照が必要であるため、平成27年度からコレラトキシンを用いて検討している。

コレラ菌（*Vibrio cholerae*)が産生するコレラ菌由来毒素（コレラトキシン、CT)は、分子量約84 kDaのオリゴマータンパク質で，腸管で作用し激しい下痢などにより脱水症状を引き起こす。CTはオリゴマータンパク質で，分子量約27 kDaのAサブユニット（CTA)1分子，分子量約11.6 kDaのBサブユニット（CTB)5分子からなる。CTそのものも、消化管の粘膜においては、アジュバント作用が示されており(Holmgren J et al., Vaccine. 1993;11 (1179-1184))、経口ワクチンのアジュバントとして期待されているが、強い毒性を有している。また、毒性を示さないCTBは経皮免疫のアジュバントとして検討されている（Glenn GM et. al., Nature. 1998;391, 851-852, Olvera-Gomez I et. al., PNAS. 2012;109, 2072-2077)。

平成29年度の検討において、2、1及び0.7 μg/50 μL /マウスのCT及びCTBについては明らかなアジュバント効果を示さなかったため、本研究では、より高濃度のCTBを卵白アルブミン（OVA)と混合物にし、経皮暴露した。その後、抗原であるOVAを腹腔内投与し、CTBの陽性アジュバントとしての有用性を検討した。また、アレルゲン経皮感作経口惹起系の予備検討として、経皮感作後、経口投与による追加免疫、その後経口投与によるアレルギー症状の惹起有無を検討した。

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 (94-99))、動物を用いた検討での報告は少ない。Balb/cマウスに腹腔内投与した高濃度のAgNPによる急性毒性に関して報告があった(Elkhawass E.A.et. al., International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;6 (9810-9817))。

26年度及び27年度の検討において、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、その結果を報告した（CHO YM et. al., Toxicol Pathol. 2018;31 (73-80))。AgNPの毒性を規定する要因として、重量あたりの表面積あるいはサイズの相異による動態の違い等が想定されるが、現在の所、詳細は不明のままである。

ポリビニルピロリドン(Polyvinyl pyrrolidone, PVP)は工業用には水に溶けにくい物質を溶解・分散させるための溶解補助剤・分散剤として用いられ、ナノマテリアルにも立体安定剤として使用されている。PVPで表面修飾したAgNPがラットの脳細胞に細胞毒性を誘発し、それには粒子のサイズ及び形態に依存した炎症の誘発と考えられた（Trickler WJ et. al., Toxicol Sci. 2010;118 (160-170))。クエン酸又はPVPで表面修飾したAgNPをラットに気管内注入した結果、PVP 修飾AgNPはクエン酸修飾AgNPに比較して、BALF 中の マークロファージ中の銀は急速に減少し、肺組織からも迅速に排泄されていた（Anderson DS et. al., Nanotoxicology. 2015;9(591-602))と報告されている。

本研究では、PVPで表面修飾したAgNPの急性毒性について、AgNP (直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg)を腹腔内投与し、その影響について検討した。

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては、更なる応用が期待されている一方で、その特性による予想外の健康影響の可能性が指摘されている。酸化チタンや酸化亜鉛は多

くの日焼け止め製品に配合されており、ヒト皮膚と接触する頻度が非常に高い。その経皮曝露の影響に関しては、これまでに皮膚透過性試験や皮膚感作性試験等が行われているが、いずれも明らかな作用は認められていない。一方で、最近、タンパク質が皮膚から取り込まれ抗原となる経皮感作経路が食物アレルギー発症の重要な要因として注目されている。そこで、研究分担者である安達らは、平成 26-28 年度の先行研究（厚生労働科学研究費補助金　化学物質リスク研究事業）において、動物モデルを用いた検討により、数種の酸化チタン等のナノマテリアルが抗原経皮感作を増強することを示し、また、培養細胞を用いた in vitro 実験系により、これらのナノマテリアルが、アジュバント物質の活性発現において重要であるマクロファージのインフラマソーム活性化・炎症性サイトカインの産生を誘導することを示してきた。

本研究班の目的は、食品・食品容器包装用途に用いられ、経口及び経皮から暴露されるナノマテリアルについて、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積することであり、本分担研究では、化粧品等への配合とともに、着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタン、及びナノ酸化亜鉛が、経皮的アレルゲン感作時やその後の経口惹起に与える影響について検討する。29 年度においては、ナノ酸化チタン、ナノ酸化亜鉛について、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果、及び、抗原経皮感作に与える影響について検討した。30 年度においては、引き続きナノ酸化亜鉛が抗原経皮感作に与える影響について検討するとともに、29 年度腹腔内投与時に急性毒性が見られたことから、ナノ酸化亜鉛の腹腔内投与による急性毒性に関する検討を行った。さらに、抗原経皮感作-経口惹起実験系の確立を目指し、抗原経口投与によるアレルギー反応惹起実験系に関する検討を実施した。

近年、ナノマテリアルを用いた材料は、日焼け止め製品としての化粧品や、塗料・抗菌雑貨など家庭用品の他、電子材料などの産業分野において、消費者に幅広く利用されており、今後、更なる応用が期待されている。一方、ナノマテリアルの安全性に対する懸念は年々高まってきており、健康影響への可能性が指摘されている。しかし、現状では、ナノマテリアルの安全性や曝露などに関する科学的知見に乏しいことから、有害性に関する研究が積極的に進められている。一方、欧州連合では、ナノ材料の安全性のデータの届出・登録の義務化への整備が進められており、米国においても EPA を主体に規制および監視を検討している。国内においては、カーボンナノチューブ等で形状やサイズによって毒性が異なる可能性が示唆されている。また、ナノテクノロジーの応用により食品・食品容器分野において積極的な利用が期待され、食品添加物や食品サプリメントなどへの使用が増えてきている。H30 年度は、昨年度に続き、EFSA が 2010 年から主催している EFSA 科学ネットワーク会議の議論に関する調査および食品添加物および食品に添加する栄養源に関する科学パネル（ANS パネル）より、ナノ成分を含有する既存物質に係る科学的意見書について調査を実施した。

Ｂ．研究方法

経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について

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)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、コレラトキシン B サブユニット（CTB)のアジュバント陽性対照としての効果を検討するため、OVA をより高濃度の CTB と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。

抗原懸濁液は OVA (Sigma A5503-1g)を 2 μg、

CTB (LBL 103B)を各々1、5 及び 25 μg/50 μL / マウスとなるようリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)に加えて投与する前に調製した。

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とし、各群は以下の通りに構成した、① Vehicle 群、② OVA 群、③ OVA + CTB 1 μg 群、④ OVA + CTB 5 μg、⑤ OVA + CTB 25 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 クールの感作後、血中の OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体並びに総 IgE 及び総 IgG 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、IL-17 及び IL-13 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、腋窩及び鼠経リンパ節重量の測定を行った。病理組織学的検査は、脾臓、暴露皮膚局所、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)

経皮感作用の抗原懸濁液は OVA (Sigma A5503-1g)を 500 μg/50 μL/マウスとなるよう PBS に加えて調製した。腹腔内感作用の抗原懸濁液は 500 μg OVA + 120 μg ALUM (Thermo Imject™ Alum Adjuvant) /0.2 mL/マウスとなるよう PBS に加えて調製した。経口追加感作及び惹起用の腹腔内感作用抗原懸濁液は OVA を 50 又は 500 μg/50 μL/マウスとなるよう PBS に加えて調製した。すべての懸濁液は投与する直前に調製した。

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 PBS p.c.⇒i.g. (Vehicle)群、② OVA 腹腔内投与後強制経口投与 (OVA i.p.⇒ i.g.)群、③ OVA 経皮投与後強制経口投与、追加免疫 4 回 (OVA p.c.⇒i.g.)群、④ OVA 経皮投与後強制経口投与、追加免疫 7 回 (OVA p.c. ⇒i.g. long)群。

①、③及び④群は 8 週齢時に背面片側を剃毛し、実験 1 と同様に 4 週間経皮感作を行った。②群は実験 4 週目から 2 回 (1 回/1 週) OVA の腹腔内投与による感作を行った。実験 6 週目から①、②及び③群は 4 回/1 週、④群は 7 回/2 週の追加免疫を行った。実験 6 、7 及び 8 週目に、血中の OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体並びに総 IgE 及び総 IgG を ELISA 法で測定した。①、②及び③群は実験 8 週に、④群は 9 週目に、感作抗原 100 mg を強制経口投与してアレルギー反応の惹起を行った。追加免疫及び惹起時、OVA の強制経口投与 60 分間後のマウスの直腸内体温変化及び下痢症状の観察を行い、下痢症状については基準に従ってスコアリングした。サイトカインの測定は実験 1 と同様に行った。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エ

クセル統計（BellCurve for Excel）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、Dunnet 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、Dunnet 法により多重検定を行い、p<0.05 を有意とした。なお、図中には ＊p<0.05、＊＊ p<0.01 で有意差の程度を記した。

ナノ銀の腹腔内投与による急性毒性について

実験 3）

AgNP は nanoComposix 社の PVP コーティング銀ナノ粒子（直径 5 nm（AGPB5）、10 nm（AGPO10）、60 nm（AGPB60）及び 100 nm（AGPB100）、濃度 1 mg/ml）を用いることとした。AgNP を 0.2 mg/0.2 ml/マウスとなるよう希釈せずに投与した。

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 5-6 匹（投与 6 時間後解剖群）又は 3 匹（投与 24 時間後解剖群）とし、各群は以下の通りに構成した、① 溶媒対照（Saline、Vehicle）群、② 5 nm AgNP PVP 群、③ 10 nm AgNP PVP 群、④ 60 nm AgNP PVP 群、⑤ 100 nm AgNP PVP 群。単回腹腔内投与（0.2 ml /マウス）し、6 及び 24 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、 6 及び 24 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。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エクセル統計（BellCurve for Excel）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、Dunnet 法により有意差検定を行った。不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Steel 法により多重検定を行った。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 ＊ p<0.05、 ＊＊ p<0.01 で有意差の程度を記した。

酸化チタン等の経皮／経口暴露による免疫毒性の解析

試料及び試薬

被験物質としては、

酸化亜鉛 A（粒子径 25 nm）
酸化亜鉛 B（粒子径 35 nm）
酸化亜鉛 C（粒子径 80 nm）
（全て表面未処理）

を使用した。

抗原タンパク質としては、卵アレルゲンである卵白アルブミン（OVA; Sigma A5503）及びオボムコイド（OM; Sigma T2011）を用いた。その他の試薬は特級グレードのものを用いた。

酸化亜鉛ナノマテリアルの懸濁液調製

酸化亜鉛は、それぞれ 50 mg/mL の濃度で PBS に懸濁し、2.5 分間の超音波処理の後にボルテックスミキサーにより攪拌するというサイクルを 4 回繰り返し、最後に 25G 注射針付きのシリンジを用いて攪拌し均一化した。

抗原の経皮感作に及ぼす酸化亜鉛ナノマテリアルの影響に関する検討（【実験 4】）

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー（株）より購入し、MF 飼料(オリエ

ンタル酵母工業（株））を給餌した。1群の匹数は5匹とした。8週齢時に背面片側を剃毛し(Day 0)、翌日より3日間、OVA溶液（1μg/50μL)、あるいはOVA及び酸化亜鉛（12.5 ng-1.25 mg）の混合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2cm角に切り取ったものを用い、パッド部に50μLの抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3日間貼付後にパッチを外し(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、血清中の抗原特異的IgE、IgG1、及びIgG2a抗体をELISA法により測定した。アナフィラキシー反応の惹起は、Day 25にOVA 1 mg/100μLを腹腔内投与（i.p.）して行った。i.p.後 30 分間、マウスの直腸温を測定した。また、アナフィラキシー症状を観察し、基準に従ってスコアリングを行った。惹起 30 分後に麻酔下で採血し、血清中ヒスタミンの濃度をHistamine EIA Kit(SPI-BIO)にて測定した。

【実験 5】酸化亜鉛ナノマテリアルの腹腔内投与による急性毒性に関する検討

動物は、6週齢の雌性BALB/cマウスを日本エスエルシー（株）より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業（株））を給餌した。1群の匹数は5匹とした。実験は7週齢時に行った。酸化亜鉛A、B、Cそれぞれ10 mgを生理食塩水300 μLに懸濁し、腹腔内投与（i.p.）した。投与前、投与後 3 時間後及び6時間後に直腸温の測定、及び全身状態の観察を行った。体重測定及び採血の後解剖し、各臓器を摘出した。血液は遠心して血清を採取し、血液生化学検査を行った。検査項目は、TP：総タンパク、ALB：アルブミン、A/G：アルブミン/グロブリン比、BUN：尿素窒素、CRE：クレアチニン、Na、K、Cl、Ca、IP：無機リン、AST：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ALT：アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP：アルカリホスファターゼ、γ-GT：γ-グルタミルトランスフェラーゼ、T-CHO：総コレステロール、TG：中性脂肪、T-BIL：総ビリルビン、GLU：グルコースの18項目である。また、摘出した肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節、胸腺、心臓及び肺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。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、図表中には ＊ 又は ＃ p<0.05、 ＊＊ p<0.01で有意差の程度を記した。

【実験 6】経口惹起実験系に関する検討

動物は、6週齢の雌性BALB/cマウスを日本エスエルシー（株）より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業（株））を給餌した。予備検討として実施したので、1群の匹数は3匹とし、また対照群は設定しなかった。7週齢時に、OVAあるいは OM 1μg と水酸化アルミニウムゲル（Imject Alum（ThrmoFisher #77161））との混合懸濁液を腹腔内投与（i.p.）し（Day 0)、7日後（Day 7）に再度投与して感作を行った。その後、Day 14, 16, 18, 21に抗原30 mgを経口投与（p.o.）し、追加免疫を行った。この時、絶食ありの群では、投与前 4 時間絶食させた。Day 0, 14, 22 には部分採血し、血清中の抗原特異的IgE、 IgG1、及びIgG2a抗体をELISA法により測定した。Day 28 に OVA 100 mg あるいは OM 90 mg を経口投与し、アレルギー反応を惹起した。追加免疫及び惹起時の経口投与後 1時間は、マウスの直腸温測定、及び下痢症状の観察を行い、下痢症状については基準に従ってスコアリングした。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、Vehicle群/OVA群を基準としたDunnettの検定、あるいは Tukey-Kramer の検定を行い、p<0.05を有意とした。図中には、*p<0.05、**p<0.01、#p<0.05、##p<0.01で有意差の程度を示した。

（倫理面への配慮）

投与実験は熟練者による経皮、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。

ナノマテリアルの暴露評価（食品等を含む）に関する国際動向調査

EFSA が主催している「食品および飼料分野におけるナノテクノロジーのリスクアセスメントに関する科学ネットワーク（Science network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed：FSA 科学ネットワーク会議）：第 8 回会議、2018 年 7 月、開催国・首都：イタリア・ローマ）」に関する調査を実施した。また、「食品添加物および食品に添加する栄養源に関する科学パネル（EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food ：ANS パネル）」より、ナノ成分を含有する既存物質：①二酸化ケイ素の再評価、②ケイ酸カルシウム・ケイ酸マグネシウム・三ケイ酸マグネシウム及びタルクの再評価、③銀ヒドロゾルの安全性および生物学的利用能に係る科学的意見書について調査を実施した。

C．研究結果

経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について

実験 1）

暴露期間中の体重及び解剖時の脾臓の相対重量について、群間の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 及び IgE が Vehicle 群と比較して有意な増加を示し、IgG1 が CTB 群で OVA 群と比較して有意な増加・増加傾向を示した。また、いずれの CTB 処置群でも、血中の総 IgE 及び総 IgG が Vehicle 群と比較して有意な増加を示し、OVA + CTB 25 µg 群で OVA 群と比較して有意な増加を示した。また、OVA + CTB 25 µg 群で IgG2a の有意な高値が認められた。直腸内体温の変化については、惹起 5 分、10 分、20 分及び 30 分後、Vehicle 群と比較して全 OVA 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、OVA + CTB 1 µg 群及び OVA + CTB 25 µg 群では惹起 5 分後から、OVA + CTB 5 µg 群では惹起 20 分後から、体温の低下が示された。30 分後に OVA 群、OVA + CTB 1 µg 群、OVA + CTB 5 µg 群及び OVA + CTB 25 µg 群では各々平均 1.6、3.1、2.6 及び 3.6 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 + CTB 1 µg 群及び OVA + CTB 25 µg 群で惹起 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、OVA + CTB 5 µg 群では上昇傾向が見られた。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、全ての OVA 処置群でも平均 2.6～3.0 と統計学的に有意な高いスコア又は高い傾向のスコアであった。抗原再暴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-2 及び IL-17 において、OVA + CTB 1 µg 群で、IL-5 において、OVA + CTB 25 µg 群で、Vehicle 群と比べ有意な増加が認められた。IL-4、IFN-γ 及び IL-13 において、群間に有意な変化は見られなかった。皮膚病変のスコアリングを行った結果、すべての CTB 投与群で Vehicle 群と比較して有意な増加が、OVA 群と比較して増加傾向が認められた。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量については Vehicle 群と比較していずれの群においても有意な増加は認められなかった。一方、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、OVA 群と比較して OVA + CTB 5 µg 群及び OVA + CTB 25 µg 群で有意な増加が認められた。

実験 2)

暴露期間中の体重及び解剖時の脾臓の相対重量について、群間の差は認められなかった。実験 6 週目及び 7 週目のマウスにおいて、OVA p.c.⇒i.g 群及び OVA p.c.⇒i.g long 群で、血中の OVA 特異的な IgG1 及び IgE が各時点の Vehicle 群と比較して有意に増加を示し、実験 7 週目のマウスにおいて、OVA i.p.⇒i.g 群で、IgG1 が有意に増加した。また、実験 6 週目のマウスにおいて、OVA p.c.⇒i.g.群で、Vehicle 群と比較して総 IgE 及び総 IgG の有意に増加を示し、実験 7 週目のマウスにおいて、OVA p.c.⇒i.g.群及び OVA p.c.⇒i.g. long 群で総 IgE、OVA i.p.⇒i.g.群で総 IgG の有意な高値が認められた。直腸内体温の変化については、群間の差は認められなかった。惹起後 60 分間、下痢症状をスコアリングした結果、OVA i.p.⇒i.g. 群及び OVA p.c.⇒i.g. long 群で Vehicle 群と比較して有意な高値を示した。OVA i.p.⇒i.g. 群は追加免疫 3 回目から、OVA p.c.⇒i.g. long 群は追加免疫 5 回目から明らかな下痢スコアの高値が認められた。抗原再暴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-4 及びにおいて、OVA i.p.⇒i.g.群及び OVA p.c.⇒i.g. long で、IL-5 において、OVA i.p.⇒i.g.群で、Vehicle 群と比べ有意な増加が認められた。IFN-γ、IL-2、IL-17 及び IL-13 において、群間に有意な変化は見られなかった。

ナノ銀の腹腔内投与による急性毒性について

実験 3)

5 nm AgNP PVP 群のすべての生存マウスで投与 3 時間後より活動低下及び促迫呼吸が認められた。全 9 匹（投与 6 時間及び 24 時間後解剖予定マウス各々6 匹及び 3 匹）中、投与 30 分及び 4 時間後各々1 匹ずつ死亡し、残りのすべての動物は投与 4 時間後に瀕死状態になった。投与 24 時間後に解剖予定の 3 匹は投与 30 分及び 7 時間後に各々1 匹及び 2 匹死亡した。

5 nm AgNP PVP 群において、投与 3 時間後から有意な体温低下が認められた。100 nm AgNP PVP 群において、AgNP 投与 24 時間後に僅かながら低温低下が認められた。何れの群においても相対肝臓重量の変化は観察されなかった。投与 6 時間後の解剖時、5 nm AgNP PVP 群の肝臓及び脾臓は暗赤色調を呈していた。投与 6 時間後の解剖時にすべての AgNP 投与群の腸間膜で僅かに認められた暗褐色顆粒は、投与 24 時間後の解剖時には、より多く観察された。病理組織学的には、投与後 6 時間、5 nm AgNP PVP 群で、肝臓のうっ血、類洞内細胞数増加、肝細胞の空胞化、胆嚢の浮腫及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に認められ、10 nm AgNP PVP 群の全例で、肝臓類洞内の黒褐色色素沈着が、一部で核分裂像が見られた。腹膜における黒褐色色素沈着はすべての AgNP 投与群で高頻度に観察された。投与後 24 時間、病変における群間の変化は認めなかった。

酸化チタン等の経皮／経口暴露による免疫毒性の解析

【実験 4】抗原の経皮感作に及ぼす酸化亜鉛ナノマテリアルの影響に関する検討

酸化亜鉛 A、B については 29 年度までに検討してきた。30 年度は酸化亜鉛 C についての検討を行った。

IgE 及び IgG1 は Th2 細胞優位な免疫応答（アレルギーを含む）の際に産生される抗体であり、一方、IgG2a は Th 1 細胞優位な免疫応答の際に産生される抗体である。OVA 群では IgE、IgG1 の産生が見られた。酸化亜鉛 C を共存させた群では、OVA 群と比較して抗体産生の有意な増減は見られなかった。なお、IgG2a に関しては、全ての群において産生は見られなかった。

4 週間の経皮感作後に、抗原の i.p.によるアナフィラキシー（能動的全身性アナフィラキシー）反応の惹起を行った。惹起後 30 分間、直腸温の測定、及びアナフィラキシー症状のスコアリングを行った。また、惹起 30 分後の血清

中のヒスタミン濃度を測定した。惹起後 30 分間の直腸内体温の変化において、30 分後、OVA 群では V 群と比較して直腸温が平均 2.7℃低下していた。酸化亜鉛 C を共存させた群では、OVA 群と比較して体温低下の有意な増強は見られなかった。惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度において、OVA 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度が増大する傾向が見られた。酸化亜鉛 C を共存させた群では、OVA 群と比較してヒスタミン濃度の有意な増大は見られなかった。惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果において、OVA 群では V 群と比較してスコアの有意な増大が見られた。酸化亜鉛 C を共存させた群では、OVA 群と比較してスコアの有意な増大は見られなかった。これらの結果から、酸化亜鉛 C は OVA 経皮感作を増強しないことが示された。

【実験 5】酸化亜鉛ナノマテリアルの腹腔内投与による急性毒性に関する検討

酸化亜鉛ナノマテリアルが免疫応答に及ぼす影響を検討するため、29 年度には、動物実験における最も基本的な感作方法として、OVA の i.p.による感作を実施し、その際にナノマテリアルを共存させることにより、そのアジュバント効果について検討した。(アジュバントとは、抗原と一緒に投与され、その抗原性を増強するために用いられる物質である。) その結果酸化亜鉛による感作増強作用が認められたが、その際、酸化亜鉛 A, B どちらも、10 mg 投与群で投与翌日までに 5 匹全匹が死亡し、また、酸化亜鉛 A 2 mg 投与群では 1 次、2 次免疫のそれぞれ翌日に 1 匹ずつ死亡した。このように、酸化亜鉛の i.p.により急性毒性が見られ、その際粒子径による違いが見られたことから、30 年度においては、酸化亜鉛の急性毒性に関する検討を行った。酸化亜鉛 A, B, C を 10 mg/匹にて i.p.し、3 時間後及び 6 時間後に直腸温測定、採血、解剖による臓器採取を行った。直腸温測定結果において、酸化亜鉛投与群では経時的な体温低下が見られ、酸化亜鉛 A, B, C 投与群でそれぞれ 3 時間後には平均 5.8℃、7.8℃、4.7℃低下、6 時間後には平均 9.5℃、11.0℃、10.0℃低下したが、酸化亜鉛の粒子径による違いは見られなかった。血液生化学検査において Vehicle 群との間に有意差があった項目の測定結果から、尿素窒素、ALT、グルコースは Vehicle 群と比較して増大しており、かつ酸化亜鉛 A, B では C と比較してより増大していた。一方ナトリウムは、Vehicle 群と比較して低下しており、かつ酸化亜鉛 A, B では C と比較してより低下していた。カリウム、無機リン、AST、ALP、総コレステロール、及び中性脂肪は Vehicle 群と比較して増大し、一方塩素は Vehicle 群と比較して低下していた。総タンパク、アルブミン、アルブミン/グロブリン比、クレアチン、Ca、総ビリルビンに関しては、Vehicle 群と酸化亜鉛投与群との間に有意差は見られなかった。なお、γ-GT に関しては全ての検体で検出限界以下であった。

病理組織学的解析の結果おいて、全てのナノ酸化亜鉛投与 3 時間及び 6 時間後、及び酸化亜鉛 A 投与 6 h 群で、それぞれ胸腺皮質及び髄質のアポトーシスが Vehicle 群と比較して有意な増加を示した。又、群間の有意な差は認められなかったが、ナノ酸化亜鉛投与群でのみ胆嚢の浮腫並びに胸腺リンパ節の褐色色素及び無構造物質の沈着が認められた。一方、肝臓、腎臓及び脾臓においては、被験物質による明らかな所見は認められなかった。

【実験 6】経口惹起実験系に関する検討

今後抗原の経皮感作＋経口惹起に対するナノマテリアルの影響について検討を進めていくにあたり、抗原 i.p.により感作したマウスに抗原を経口投与し、アレルギー反応を惹起できるかどうかについて検討した。

各群の実験条件及び実験全体のスケジュールにおいて、抗原としては OVA 及び OM を用い、2 回の i.p.の後に p.o.にて 4 回の追加免疫を行

い、その後、p.o.にてアレルギー反応を惹起した。OVA では i.p.のみでも抗体産生が見られるが、p.o.追加免疫によって特に IgE 産生が増大した。OM では i.p.による抗体産生は OVA と比較して少なく、p.o.追加免疫の効果が明確に見られた。(なお、通常 Vehicle 群では、IgE、IgG1 の蛍光値はそれぞれ 100 及び 50 程度である。)

次に、p.o.追加免疫、及び p.o.惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果において、追加免疫 1、2 回目では体温低下、下痢症状ともほとんど見られなかったが、追加免疫 3、4 回目、及び p.o.惹起時には、OVA 投与群で体温が低下し、また、OVA 投与群、OM 投与群の両方で下痢症状が見られた。(なお、通常の Vehicle 群での体温変動は OM 投与群での変動とほぼ同様である。) これらの結果から、抗原の i.p.感作後に p.o.追加免疫を行うことにより、最終的に p.o.によりアレルギー反応を惹起することが可能であることが示された。

ナノマテリアルの暴露評価（食品等を含む）に関する国際動向調査

1．第 8 回食品および飼料分野におけるナノテクノロジーのリスクアセスメント（EFSA 科学ネットワーク）

食品および飼料分野におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーの実用性についてのリスクアセスメントに関するガイダンス：ケーススタディおよびガイダンスへの実用性

今回の会議では、2018 年 7 月 4 日に公開された「食物と飼料分野におけるナノサイエンスとナノテクノロジーの応用へのリスクアセスメントに関するガイダンス：第一部、ヒトおよび動物の健康」の試験的運用段階について紹介し、今後のガイダンスの実用化に向けた議論が行われた。2018 年 7 月に EFSA は、ナノサイエンスおよびナノテクノロジー事業の運用に向けた安全性についての評価方法に関するガイダンスを発表した。このガイダンスは、必要とする試験の種類や、適用可能な方法に関する実用的な提案を収載している。尚、このガイダンスは、2011 年のガイダンスの公表以降に得られた新たな知見と加え、詳細で且つ具体的な分析法や分解法や、*in vivo/in vitro* による生物学的試験法を用いた体系的な評価指針を示している。

更に、このガイダンスでは、EFSA に付託された新規食品、食品接触材料、食品および飼料添加物、農薬などの分野を網羅しており、全ての関係事業者、特に、リスクアセスメントの評価者やリスク管理者および申請者を対象としたナノテクノロジーに関連する申請書類の作成に関する必要な情報を提供している。将来的に、このガイダンスは、新規食品、食品/飼料添加物、殺生物剤、殺虫剤および食品接触材料の各分野で適応されるナノコンポジットやナノカプセルにおける評価にも考慮される可能性がある。また、データギャップを補完するための read-across 法への適応の可能性として、ナノマテリアルの *in vitro* 試験に関する一般的な問題についても述べられており、*in vitro* 消化試験、トキシコキネティクス、遺伝毒性に関する内容や、作用機序(MOA)やキーイベント(KE)、AOP 解明への必要性についても議論されている。さらにガイダンスでは、リスクキャラクタリゼーションと不確実性の分析へのアプローチを提案し、この分野のさらなる研究のための勧告も提唱している。

また、2019 年には、食品および飼料分野におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーの応用の環境リスク評価に焦点を当てた第 2 のガイダンスの策定を予定している。尚、このガイダンスの試験的な運用は 2019 年末まで続き、2020 年にはリバイズされて公表される予定である。

EU 加盟国における活動

EFSA： EFSA ガイダンスでどのように解釈されているかについて、食品添加物の再評価と新たな評価の例について議論していた。専門家ら

は、粒子状である任意の物質において、ナノ範囲を含む粒径の物理化学的特性評価をどのような方法論で適用すべきかということを論点としていた。EFSA ガイダンスでは、粒径分布は複数の独立した技術（そのうちの１つは電子顕微鏡による測定方法：ＥＭ）で決定することを推奨している。ワーキンググループのメンバーは、粒径分布は粒子材料の物理化学的特性評価の一環として、EM を使用したデータ情報の必要性について議論していた。

以下、幾つかの論点が示されている。

- 溶解度：溶解速度が非常によく特徴付けられている場合には粒子状についての EM のデータは必要としない。また、ガイダンスのセクション 4.3.3 で説明したように、ナノ粒子の「溶解度」と「分散」の間に違いがあることも重要である（例：シリカは水に溶けると云われているが、ＥＭでの測定では粒子が分散して浮遊していることがわかる）。
- その他の技術について：NanoDefine プロジェクトによる評価スキームは、粒子状物質の物理化学的特性評価にアプローチするためのスクリーニング方法の選択肢について提供している。例えば、動的光散乱法（DLS）は、材料が多分散系ではない場合に限り使用できるが、材料が多分散の場合、大きい粒子については検出可能であるが、小さい粒子については検出できず、粒子径の大きさに依存することから、本測定手法は適さないとしている。従って、EM のデータが提供されていない場合、この点について考慮する必要性がある。実際、高溶解性を有するナノマテリアルを除き（上の箇条書きの項目を参照）、EM 情報が必要であるという結論に向けた議論が行われた。
- 腸管細胞への取り込みについて：この問題を取り上げるには科学的知見が必要となるが、250nm 前後のナノ材料では腸管細胞による取り込みが異なるため、精密なサイズの測定が重要となる。また、粒子のサイズと形状は EM でしか見ることができないことから、粒状材料の粒度分布を特徴付けるための標準的なアプローチとして EM の必要性を裏付けるものである。

専門家らは、EFSA に提出された申請書類に評価される物質の物理的特性評価の一環として、また、消費者への安全性の観点からも粒度分布に関する適切なデータの提供への重要性について改めて表明しているものであった。

<u>ベルギー</u>：最近発表された EFSA ガイダンスに沿って実施した二酸化チタン（E171）と銀（E174）中のナノサイズ粒子の割合を特徴付ける分析方法論についての検証の結果と実用化に関する結果が報告された。その研究結果は、ガイダンスの分析手法が食品添加物とこれらの食品添加物を含む市販製品を特徴付けるものであると示唆していた。銀のデータの結果では、２つの異なる粒子を有し、銀（E174）を処理することにより、銀ナノ粒子の形成が誘導された。また、二酸化チタン（E171）のデータ結果では、食品への添加の前後で幾つかのタイプの二酸化チタンのナノサイズ粒子を有することが実証されたことを報告していた。

<u>ポルトガル</u>：ナノ粒子の数と金属の濃度の関係における金属ナノ粒子の外部および内部線量の信頼性に関する調査結果が報告された。ネットワーク会議では、金属濃度とナノ粒子の濃度の両方による内在化と細胞毒性の発現について議論され、この内容について推奨していた。しかし、この研究では、EM による細胞内の濃度の定量化が安全性評価において一貫して要求する実施可能な方法にはならないことを示していた。

<u>スロベニア</u>：改定版の EFSA ガイダンス文書に沿ったナノ粒子を含む二酸化チタンの食品接触材の安全性評価に関するケーススタディが報告された。ケーススタディは、酸性食物として３％酢酸の刺激により準セラミック焦げ付き防止の平鍋コーティングによるものと、機械的摩耗による食物への二酸化チタンのナノ

粒子の放出があり得ることを示唆していた。そこで、移行試験および機械的試験から入手可能な情報に基づき、放出された二酸化チタン粒子の消費者への曝露評価を実施した。その結果、ナノ粒子の合成法の瞬間気相生成法（Flash Creation. Method:FCM）によって、ナノ粒子の放出に関連するリスクアセスメントのさらなる検討の必要性と、そこには多くの関連する不確実性（物理化学的特性評価、ハザード特性評価および曝露評価）への考慮に対する必要性が提唱されていた。

フィンランド：フィンランドのテクニカルリサーチセンター：Technical Research Center（VTT）でナノファイバーの生産について報告があった。ナノテクノロジーを応用した食品は、主にセルロース（添加剤 E460）ミクロフィブリルやナノフィブリルなどが挙げられ、様々な特性を有している。安全性評価に関するデータの作成には、様々なマトリックスからのナノセルロースまたは類似のナノ材料に対して分析が実施された。特に、*in vitro* 消化試験段階でのナノセルロース製品の安全性評価では、ナノセルロースはヒトの胃腸系では消化されないが、反芻動物の反すう胃（ルーメン）や実験用ラットの盲腸では微生物発酵を起こすことから、*in vitro* の消化試験における消化率の相違について考慮することが指摘されていた。従って、食品および飼料だけでなく食品包装材料にも使用されるナノセルロースや新規食品としてのミクロセルロースにおいては、その他の規制製品と同様に、EFSA ガイダンスに沿った事前評価の必要性が提唱されていた。

ドイツ/フランス：ナノ粒子の腸管毒性および肝臓毒性を決定する要因を研究するためのドイツ及びフランスの二国間協力プロジェクト（SolNanoTox プロジェクト）の内容について報告が行われた。食品および包装に使用されている異なる溶解度の特性を有する類似のナノ粒子の細胞への取り込みは、ナノ粒子の形状に依存し、その効果はイオン種により強くなる傾向があり、特に、肝細胞は腸管細胞よりも影響が大きいことが示された。また、毒性作用に関しては、酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害および金属イオンの恒常性の乱れに由来するものと考えられた。ネットワーク会議では、作用機序（MoA）およびキーイベント（KE）への解明には、一般的な毒性のさらなる研究を必要とし、更に、オミックスへのアプローチは、有害性発現経路（AOP）の解明に役立つものであることが提唱された。現在、ナノ粒子に関する細胞内での変化については、利用可能なオミックスデータ、特にメタボロミクスを活用することで、定量的リスク評価はできないものの、より多くの情報が提供されることが示唆された。

オランダ：合成非晶質シリカ（SAS、SiO 2、E551）と二酸化チタン（TiO2、E171）の 2 つの場合に適用した EFSA ガイダンスの段階的枠組みによるレトロスペクティブ評価について報告があった。このレトロスペクティブ評価では、利用可能な、又は利用できない情報について識別できたので、今回のガイダンスは適切に構成されており、ガイダンスに準拠することへの重要性を示していた。また、物理化学的な特徴付けは、ナノ材料を評価するための初期段階で非常に重要であると述べていた。

EFSA ガイダンスでは、規制製品に関する他の EFSA ガイダンス文書の場合と同様に、毒性試験についても段階的なアプローチを推奨しているが、全ての段階への義務化はされていない。初期段階の試験結果について、目的とする用途への化合物の安全性について結論づけられるような十分なデータが提供されるのであれば、更なる試験の必要性はないとしている。これは動物実験の削減やとコスト削減にも繋がるだけでなく、またナノ材料のリスクアセスメントに関して妥協するものでもないと述べていた。

以上、今回の会議で EU 各国により議論された内容では、改定ガイドラインについて、特に、物理化学的特性評価に関するガイダンスの修

正は有用となる可能性があるものと結論づけていた。

2．食品添加物としての二酸化ケイ素(E 551)の再評価

EFSA は、ANS パネルが行った食品添加物として使用される際の二酸化ケイ素(E 551)の安全性を再評価するための科学的意見について公表した。食品添加物の二酸化ケイ素（E 551）として使用される合成非晶質シリカ粒子（synthetic amorphous silica；SAS）の形態は、製造過程に応じてヒュームドシリカ（乾式シリカ）および水和シリカ（沈殿シリカ、シリカゲルおよび含水シリカ）などが挙げられる。これら異なる形態を有する SAS の中でも、コロイダルシリカは食品添加物として認可されていない。1991 年に食品科学委員会(SCF)は二酸化ケイ素（E551）とケイ酸塩類に対するグループの一日摂取許容量(ADI)を「設定不要」と定めている。しかし、生物学的試験や毒性学的試験で使用された SAS 物質は、物理学的な特性が異なっており、それらの特性について必ずしも十分に記載されていなかった。これまで二酸化ケイ素（E551）は体内に吸収されにくいものと考えられていたが、一部の組織からケイ素含有物質(二酸化ケイ素と推定された場合もある）が検出された。ナノ二酸化ケイ素を用いた試験を含む亜慢性毒性試験、生殖毒性試験、発生毒性試験においては、試験数は少ないが有害影響を示さなかった。また、二酸化ケイ素（E 551）は、遺伝毒性に関する懸念はないと報告されている。食品添加物の二酸化ケイ素（E 551）中にはナノ粒子が存在している可能性があるものの、ナノ二酸化ケイ素を用いた長期試験の情報がないことから、ANS パネルはナノ粒子の全粒子径範囲を含んでいない被験物質で得られた慢性毒性試験の結果を、現行の二酸化ケイ素（E 551）の成分規格に適合する試料に外挿して推定することはできないものとした。また、推定される最大の曝露用量は、試験で確定された無毒性量(NOAELs)より少なくとも一桁低いものであった。

ANS パネルは以下ように推奨している。

- 欧州委員会は、食品添加物が主要な曝露源にならないように、二酸化ケイ素（E551）の EU 規格の有害元素（ヒ素、鉛、水銀およびカドミウム）に関して現行の上限値を引き下げるよう検討する。
- 欧州委員会は、二酸化ケイ素（E 551）に対して現在の EU の仕様を改訂し、適切な統計的記述子（例えば、範囲、中央値、四分位数）を使用し粒子径分布を特徴付けることや、食品添加物として使用される二酸化ケイ素（E 551）中に存在するナノ粒子(少なくとも一次元以上の外寸が 100 nm 未満）の数量および重量の割合について追加をする。さらに、適用される測定方法については、EFSA ガイダンス文書（EFSA 科学委員会、2011a、b）に準拠するとした。

従って、ANS パネルは、現在の EU の成分規格では食品添加物として二酸化ケイ素（E551）を正確に特徴づけるには不十分であると結論づけた。今後、粒子径分布の明確な特性評価の必要性が求められるとしている。また、利用可能なデータベースに基づくと、報告されている使用方法と使用量では、二酸化ケイ素（E551）の毒性を示す兆候は認められなかったとしている。今回、利用可能なデータベースが限られていたこともあり、ANS パネルは、現行の ADI を「設定不要」という状況については承認せず、二酸化ケイ素（E551）の EU の規格を一部変更するよう勧告するよう結論付けている。

3．食品添加物としてのケイ酸カルシウム(E 552)、ケイ酸マグネシウム(E 553a(i))、三ケイ酸マグネシウム(E 553a(ii))及びタルク(E 553b)の再評価

EFSA は、ケイ酸塩類「ケイ酸カルシウム(E 552)、ケイ酸マグネシウム(E 553a(i))、三ケイ酸マグネシウム(E 553a(ii))」及びタルク(E

553b)の再評価に係る食品添加物及び食品に添加する栄養源に関する科学委員会(ANS パネル)の科学的意見書(2018 年 6 月 28 日採択)を公表した。1991 年に食品科学委員会(SCF)は二酸化ケイ素（E551）とケイ酸塩類に対するグループの一日摂取許容量(ADI)を「設定不要」と定めているが、ANS パネルは、食品添加物として使用される二酸化ケイ素（E551）の安全性を再評価する科学的意見書を提出していたこともあり、同パネルは、ケイ酸塩類及びタルク(E553b)についても再評価を実施するとした。ケイ酸塩類及びタルク（E553b）の体内動態に関する試験結果から、これらの物質は体内吸収が非常に低く、わずかに吸収されたケイ酸は尿中へ排泄されていると示された。また、ヒトを含めた一般動物においても、肝臓や腎臓への大きな蓄積は起きていないと評価している。毒性評価に関しては、これまでケイ酸カルシウム(E 552)、ケイ酸マグネシウム(E 553a(i))、及びタルク（E553b）の遺伝毒性、発生毒性は無く、また、三ケイ酸マグネシウム（E553a(ii)）は、何十年にも亘り、最大 4g/人/日の高用量で使用されているにも関らず、欧州連合(EU)加盟国共有の医薬品副作用情報データベースには腎臓への影響に関する症例について報告されていない。

しかし、ANS パネルは、ラットの実験で、ケイ酸カルシウム（E552）由来のケイ素の蓄積が報告されていることや、ケイ酸塩類及びタルク（E553b）の亜慢性及び慢性毒性、発がん性、及び生殖毒性に関する信頼できるデータがないことを考慮すると、食品添加物として使用されるケイ酸塩類（E552、E553a(i)、E553a(ii)）及びタルク（E553b）の安全性について評価することはできないと結論付けている。また、リスクを特徴付ける最も代表的なものとして考えられる食品サプリメントの全てのケイ酸塩類(E552-553)に関する曝露量については、制酸剤として使用される三ケイ酸マグネシウム E553a(ii)の一日最大用量(4g/人/日)を下回るものであった。ANS パネルは、現在の毒性データベースにおける不確実性を減らすことができるような幾つかの方法について指摘している。これらの方法は、食品添加物の申請のため EFSA のガイダンスの Tier 1 手法に推奨されている毒性学的試験では、適切に特徴付けられている材料を用いて実施されていると述べている。

ANS パネルは EU の成分規格書の改正のため、以下について推奨されている。

- 欧州委員会は、より良い定義に沿った分析、すなわち粒子径分布の特徴付けや、適切な統計学的記述子(例えば、範囲、中央値、四分位数)を用いる)、並びにナノ粒子(一次元以上の外寸が 100nm 未満)の数量及び重量での割合に対する情報の追加を実施するため、ケイ酸塩類（E 552、E 553a(i)、E 553a(ii))、及びタルク（E 553b）の EU の成分規格書を改正する。
- ナノ粒子サイズ分布の特徴に関して、適用される分析方法論は、食料と飼料分野におけるナノサイエンスとナノテクノロジー（EFSA 科学委員会、2018 年）への応用のリスクアセスメントに関する EFSA ガイダンスで推奨されているものに準拠する。
- 食品添加物に対して EFSA のガイダンス（EFSA ANS Panel、2012）で説明されている Tier 1 手法に推奨されている毒性学的試験は、現行の毒性データベースの不確実性を減らすために適切に特徴付けた材料を用いて実施する。
- 提出されているほとんどのデータはタルク（E553b）のデータであるため、ケイ酸塩類(E 552, E 553a(i)), E 553a(ii))の実際の用法及び使用量に関する多くのデータを提出する必要がある。
- 欧州委員会は食品添加物が食品の毒性に対する主要な曝露源とならないように、ケイ酸塩類（E552、E553a(i)、E553a(ii))、及びタルク（E553b）に関する EU の成分規格書の毒性元素(ヒ素、鉛、水銀)に対して現行の上限

値を引き下げるよう検討する。

- 欧州委員会はE553bのEU成分規格書にアルミニウム、ニッケル、フッ素及び結晶シリカ(アルファ水晶)の上限値の収載を検討する。

以上、ANSパネルは、ケイ酸塩類（E552、E553a(i)、E553a(ii)）及びタルク（E551）のグループADIにメカニズム的根拠は無く、1991年にSCFが設定したグループADIは時代に即さないものであると位置づけられと共に、ADIを設定することが出来なかったと結論づけている。

4．食品サプリメントに栄養目的で添加される銀源としての銀ヒドロゾルの安全性と生物学的利用能

EFSAは、ANSパネルが行ったフードサプリメントに栄養目的で添加される銀源としての銀ヒドロゾルの安全性と生物学的利用能に関する科学的意見書を公表した。銀ヒドロゾルは、ＵＳＰ２３等級の水中の正電荷を帯びた銀イオンと銀金属粒子との混合物からなる懸濁液であり、総銀濃度は１０～２７．５μｇ／ｍＬの範囲である。透過型電子顕微鏡（ＴＥＭ）および原子間力顕微鏡（ＡＦＭ）によって行われた粒子サイズ分析に関する情報は、この材料がナノ範囲にあることを示したが、ナノ材料の評価のための特性評価は提供されておらず、どのナノ特性が評価にデータを必要とするかを確かめることは不可能であった。申請データからは、経口投与量は胃からの消失試験の結果として示されており、銀の全身吸収に関する情報は提供されていなかった。仮に、銀ヒドロゾルに由来する銀が体内吸収されるのであれば、銀ヒドロゾルの一般毒性試験が必要とされるが、申請データとしては急性毒性試験の情報と銀化合物(例えば銀塩類)で実施された毒物データのみであった。ANSパネルは、提出されたデータは、食品サプリメントに栄養目的とする銀の供給源とした銀ヒドロゾルの食品添加物に加えることへの安全性だけでなく、生物学的利用能の評価に対しても不十分なものであるとして結論づけている。

Ｄ．考察

本研究では、AgNPの経皮経口複合暴露による、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、様々な濃度のCTBをOVAと混合物にし、経皮暴露後、抗原であるOVAを腹腔内投与し、CTBの陽性アジュバントとしての有用性を検討した。実験2)においては、アレルゲン経皮感作経口惹起系の確立のため、経皮感作後、経口投与による追加免疫、その後経口投与によるアレルギー症状の惹起有無を検討した。その結果、今回の条件においては、経皮感作性試験におけるCTBの陽性アジュバントとしての有効性が明らかとなった。また、実験 2)において、OVAの経皮投与後、経口投与によるアレルギー症状の惹起を示し、今回の条件での経皮感作経口惹起系は有効であることが明らかとなった。

26年度に行った皮膚感作性試験のアジュバント陽性対照の検討において、Alumは明らかなアジュバント効果を示さなかった。Alumは分子量が大きいことで表皮を通過し、アジュバント作用を果たすことが困難と推測された。しかし、CTは消化管の粘膜においては、アジュバント作用が示されており、経口ワクチンのアジュバントとして期待された(Holmgren J et al., Vaccine. 1993;11 (1179-1184))。27年度にCTの経皮感作性試験におけるアジュバント陽性対照物質として検討した結果、検討したすべての濃度 (0.1-10 µg)でOVA特異的抗体の有意な増加が認められ、CT は有効な陽性対照アジュバントであることが明らかとなった。しかし、CTは毒物であり、購入・保管・使用・廃棄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 CTAと無毒な 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 (Stratmann T, Vaccine (Basel). 2015; 3 (579-596))、CTBを用いた検

討を行った。29 年度の検討では、1 μg CT と同じモル数に相当する、0.7 μg を投与したが、明らかなアジュバント作用は認められず、それまでの検討で CT がアジュバント効果を示したのは 0.3 μg の CTA による影響が否定できなかった。今年度は、より高濃度での検討で CTB の陽性アジュバントとして有効性を検討した。CTB 処置によって IgE 値に変化はなかったが、濃度依存性はないものの IgG1 値及び僅かに濃度依存性を示す IgG2a 値の増加が認められ、総 IgE 及び総 IgG の値が CTB の濃度依存的に増加したことから、CTB 処置は、Th2 細胞のみならず、Th1 細胞による免疫にも関与している可能性が考えられた。更に、摘出した脾細胞を ova で再刺激したところ､サイトカイン IL-2 及び IL-17 の分泌量が多いことから､CTB 処置によって Th1 細胞に加え､Th17 細胞の関与も検討する必要があると考えられた。細胞毒性を示さないとされている CTB の処置による皮膚病変スコアの高値及び Ki67 陽性を示す濾胞の高い割合も Th2 細胞以外の免疫毒性経路の活性が推測された。CTB の経皮処置によって Th1 細胞からサイトカイン INF-γ の産生並びに処置した表皮や真皮における樹状細胞の集簇が報告されている (Anjuère F dt al., J Immunol. 2003;170 (1586-1592))。

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、当所生化学部で確立された本モデルを使用し、グルパール 19S による経皮感作性が証明された（Adachi R et al., Allergy. 2012; 67 (1392-1399))。今年度はこのモデルに改良を加え、OVA を抗原とした経皮感作経口惹起試験モデルの開発を試みた。Muto ら (Int Immunol. 2014;26(539-549)) の報告を参考に経皮感作後、強制経口投与による惹起を試みたが、体温低下などアナフィラキシー反応は認められなかった。Yamashita ら及び Matsui ら (Allergy. 2012;67, (201-209), Int Arch Allergy Immunol. 2017;173, (71-83)) が強制経口投与による惹起の前に、経口投与による追加免疫を実施することで効率よく経口惹起が可能であることを報告した。Adachi らのモデルから経皮感作の方法を、Yamashita らのモデルから追加免疫及び経口惹起の方法を採用し、経皮感作経口惹起を行った結果、Yamashita らの 4 回/1 週の追加免疫を 7 回/2 週に回数を増やしたモデルで有意なアナフィラキシー反応（下痢)が認められた。明らかな体温の低下は認められなかったが、OVA i.p.⇒i.g. 群及び OVA p.c.⇒i.g. long 群で惹起 30 分後に弱いながら体温低下が認められた。60 分間の観察時間中のストレスによる正確な体温の変化が測定できなかった可能性が考えられ、改良を試みている。経皮感作後 1 週及び 2 週後の実験 6 週目及び 7 週目に経皮感作を行った群で各時点の Vehicle 群に比べ IgE 及び IgG1 の高値が認められ、経皮感作終了後に OVA 抗原特異的 IgE 及び IgG1 が高濃度に維持できていることが分かった。追加免疫時の下痢スコアは OVA i.p.⇒i.g. 群で何れの群より早い段階から高値を示し、経皮感作を行った群では 5 回目の投与から高値を示した。これらの結果から、血清中の抗体の量だけでなく抗原のばく露経路及び追加免疫の有無や回数が経口投与によるアナフィラキシー反応の誘導に関与すると考えられた。

26 年度の研究で、OVA の有無にかかわらず AgNP 10 nm 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、AgNP の急性毒性は粒子のサイズによって異なることをあきらかにした。28-29 年度は抗酸化剤 *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) を含む様々な抗酸化剤又は GSH 合成抑制剤の影響について検討し､AgNP による急性毒性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。本年度は、高分子化合物、PVP で表面修飾した AgNP の急性毒性について、AgNP (直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg)で腹腔内投与を行い、その影響について検討した。

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議論が続いている (Reidy B et. al., Materials. 2013;6 (2295-2350))。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。ナノマテリアルの高い分散性及び安定性のため、クエン酸、PVP、シリカ、1-ドデカンチオール及びアミノ化による表面修飾が行われている (https://nanocomposix.com)。我々は今までクエン酸修飾 AgNP を用いて研究を行ってきたが、表面修飾の異なる AgNP を用いて様々な検討が行われている。PVP で修飾した AgNP がラットの脳細胞に細胞毒性を誘発し、それには粒子のサイズ及び形態に依存した炎症の誘発と考えられ、*in vitro* の結果ではあるが、AgNP の毒性におけるサイズによる違いについて一致した結果が報告された (Trickler WJ et. al., Toxicol Sci. 2010;118 (160-170))。また、クエン酸又は PVP に表面修飾した AgNP をラットに気管内注入を行った結果、PVP 修飾 AgNP はクエン酸修飾 AgNP に比較して、BALF 中の マークロファージ中の銀は急速に減少し、肺組織からも迅速に排泄されていたことから、AgNP の表面修飾によって体内分布及び排泄の違いを誘発する可能性が示唆されている (Anderson DS et. al., Nanotoxicology. 2015;9(591-602))。

AgNP は酸性状態でイオン化が早まることが知られており、PVP はそのもの自体が弱い酸性を示すことから、40 nm 以下の PVP 修飾 AgNP はイオン化が早いとの報告がある (https://nanocomposix.com/pages/stability-and-shelf-life-of-small-pvp-silver-nanoparticles)。これまで、クエン酸修飾 AgNP は投与 6 時間後まで死亡例は認められていないが、今回の検討において PVP 修飾 AgPN は投与 4 時間後から死亡例が認められ、強い毒性を示した。しかし、同じ 10 nm の AgNP において、クエン酸修飾 AgNP 投与群でのみ急性毒性が認められ、PVP 修飾 AgNP 投与によって毒性は認められなかった。考えられる理由としては、PVP 修飾によって細胞内分布に制限が生じた可能性が推測できる。実際、10 nm AgNP PVP 投与群で肝臓の類洞内黒褐色色素の沈着が認められたものの、病変は殆ど認められなかった。10 nm AgNP PVP 投与群の一部で認められた、核分裂像はクエン酸修飾 60 nm AgNP 投与群においても認められた病変であり、細胞の明らかな病変を示さないが、防御反応との関連が疑われる。何れの実験でも、検討したサイズの中で最小の AgNP で強い毒性が認められ、サイズが小さい程、強い毒性を示す、我々の今までの報告と一致した結果が得られた。修飾の異なる両物質の毒性メカニズムは大きく異なることは無いと思われるが、PVP 修飾 AgNP の狭い安全域及び毒性強度の違いに関する詳細な研究が必要と考えられた。

本研究班の目的は、食品・食品容器包装用途に用いられ、経口及び経皮から暴露されるナノマテリアルについて、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積することである。本分担研究では、ナノ酸化チタンやナノ酸化亜鉛が、経皮的アレルゲン感作時やその後の経口惹起に与える影響について検討を行う。29 年度においては、抗原 i.p.時のアジュバント効果、及び、抗原経皮感作に与える影響について検討した。30 年度においては、引き続きナノ酸化亜鉛が抗原経皮感作に与える影響について検討するとともに、29 年度の検討を受けてナノ酸化亜鉛の腹腔内投与による急性毒性に関する検討を行った。さらに、抗原経口投与によるアレルギー反応惹起実験系に関する検討を実施した。

酸化亜鉛 C について、抗原経皮感作に対する影響に関して検討した結果、経皮感作の増強効果は見られなかった。これまでの検討では、酸化チタン C（アナターゼ型、6 nm）、酸化チタン A（ルチル型、15 nm）、及び酸化チタン D（アナターゼ型、15 nm）の共存により経皮感作が増強されるが、酸化チタン B（ルチル型、35 nm）や酸化チタン E（アナターゼ型、30 nm）では増強されないこと、酸化チタン C が最も強い増強効果を示すことが明らかとなっている。また、酸化亜鉛の場合も、酸化亜鉛 A（25 nm）では経皮感作を増強する傾向が見られているが、酸化亜鉛 B（35 nm）ではこのような効果は見られない。本年度の検討において酸化亜鉛 C（80 nm）でも経皮感作増強効果が見られなかったことから、酸化亜鉛の場合も、酸化チタンと同様に、この増強効果が粒子径に依存している可能性が示唆された。

29 年度の検討において、酸化亜鉛の i.p.時に急性毒性が見られ、かつ、この毒性が粒子径に依存している(粒子径が小さい方が毒性が強い)傾向があったことから、30 年度は、酸化亜鉛の i.p.による急性毒性に関して検討した。マウス 1 匹当たり酸化亜鉛 10 mg を i.p.したところ、6 時間後には 10 度前後の体温低下が見られた。3 時間後の時点では酸化亜鉛 A, B と比較して酸化亜鉛 C では体温低下の度合いが小さい傾向が見られたが、全体としては粒子径による明確な差は無かった。血液生化学検査の結果からは、腎機能の指標である尿素窒素や肝機能の指標である AST, ALT, ALP が酸化亜鉛投与により増大すること、かつ、尿素窒素及び ALT では、酸化亜鉛 A, B の方が酸化亜鉛 C と比較してより大きく増大していることが示された。従って、酸化亜鉛は肝臓や腎臓の機能に影響を与えていることが示唆された。また、病理組織学的解析において、酸化亜鉛投与群で認められた胸腺皮質及び髄質のアポトーシスは、被験物質による他のリンパ組織の萎縮などの明らかな免疫抑制作用が認められなかったことから、具体的なメカニズムは不明であるが、被験物質による物理的又は化学的刺激に起因した変化と考えられる。また、胸腺リンパ節では褐色色素及び無構造物質の沈着が認められたことから、腹腔内投与した被験物質はリンパ循環したと考えられた。

経皮感作-経口惹起実験系の確立を目指して行った経口惹起に関する予備検討においては、抗原の i.p.感作後に 4 回の経口追加免疫を実施することにより、最終的に抗原経口投与によりアレルギー反応を惹起することが可能であることが示された。今後、感作経路を経皮とし、かつ、より明確なアレルギー反応を惹起できるよう、実験系の最適化を進める。

近年のアレルギーに関する研究、また、最近のわが国における加水分解コムギタンパク質を含有する洗顔石鹸の事例等から示されるように、タンパク質が皮膚を透過して体内に取り込まれ抗原となる経皮感作経路が、現在、アレルギー発症の重要な要因として注目されている。本研究のこれまでの検討結果は、抗原タンパク質の経皮感作によるアレルギー発症において、酸化チタンや酸化亜鉛のようなナノマテリアルが共存することにより感作が増強される可能性を示しており、粒子径 30nm 未満程度のナノマテリアルを皮膚に適用する際には注意が必要であると考えられる。また、抗原の i.p.感作時の検討及び急性毒性の検討から、酸化亜鉛の場合は、酸化チタンとは異なり、おそらく亜鉛に由来すると考えられる生体影響の可能性が示されており、やはり注意するべきであろう。

経口惹起に関する予備検討の結果を受け、今後は、経皮感作-経口惹起の動物モデル実験系を確立し、ナノマテリアルの経皮／経口暴露が免疫応答に与える影響について検討を進める予定である。

2010 年、EFSA 科学委員会は、「食品および飼料の安全性に関するナノサイエンスおよびナノ

テクノロジーから生じる潜在的リスク」に関する科学的意見について議論し、この意見の中でEFSA 科学委員会は、EFSA は将来、申請の可能性があるものについてケースバイケースで評価する立場にあり、リスクアセスメントに関する十分なデータが提出された場合にのみ結論づけることとしている。その後、EFSA 科学委員会は、欧州委員会からの依頼により、2011 年 4 月に「食料および飼料分野におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーのリスクアセスメントに関するガイダンス」を公表し、さらに今回、2011 年以降に得られた新しい知見をもとに、より詳細で具体的な分析法や分解性など評価法、生物学的試験(*in vivo/in vitro*)法を用いた体系的な評価指針を作成した。しかし、ナノマテリアルの定義については、EC の定義との整合性とリスクアセスメントの重要な要素となるデータの検証に関する方法論が不足しており、未だに科学的に明確な判断が出来ていないことから、今後も検討の必要性があるとしている。第 8 回食料および飼料分野におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーのリスクアセスメントに関するガイダンスの会議において、ナノ材料についての物理化学的特性、曝露評価、およびハザードの同定に関する多くの洞察と関連性のある新たな科学的意見について議論されていた。特に、ナノスケールに関する粒径分布や形状などの測定で電子顕微鏡を用いた測定法（EM 法）の重要性について議論されている。今回議論された EM 法を含め、100nm 未満のサイズのナノ材料の粒子の構成の割合や形状について、単一の測定法では、分析技術の不確実性や検出限界などの問題点があり、正確に測定することは難しく、複数の分析法を組み合わせることで、より精度をあげることが出来るものと考えられる。また、腸管細胞への取り込みに関する知見で､250nm 前後のナノ材料で異なるとしているが､100nm 以上の粒子に関するナノ材料のサイズの最大値についての指針やリスクについて示されていないことから、今後、明確にすべき課題と考えられた。

食品添加物の二酸化ケイ素（E 551）として使用される合成非晶質シリカ粒子 (SAS) の形態は、製造過程に応じて乾式シリカや水和シリカなどが挙げられ、一次粒子から構成された凝集したナノサイズである。SAS（沈降シリカ）の一次粒子のサイズは、5～15 nm の範囲内であるが、これらの凝集体は、さらに凝集することでより大きな構造を形成する場合もあり、凝集体の大きさは通常１００ｎｍより大きいとされる。しかし、一次粒子である SAS の凝集体は１００ｎｍ未満のサイズを含む可能性もあることから、ナノ材料の粒径の測定に対する様々な分析方法(動的光散乱（DLS)、レーザー回折（LD)、透過型電子顕微鏡（TEM)、走査型電子顕微鏡（SEM）)への適応の可能性について述べているものの、明確な分析手法の選択については示されていなかった。また、毒性に関する情報の報告例は少ないが、ナノ二酸化ケイ素を用いた試験を含むような、亜慢性、生殖および発生毒性試験では、有害影響を示すような兆候は見られず、二酸化ケイ素（E 551）に関しては、遺伝毒性の懸念はないとしている。従って、今回、食品添加物としての二酸化ケイ素（E 551）の再評価では、二酸化ケイ素（E 551）中にナノ粒子が含まれている可能性があるものの、毒性データの情報不足から更なる毒性評価の必要性と、粒子径分布の解析では EU の成分規格に対して正確に特徴づけることが出来ていないとして、様々な分析手法の適応について検討する必要があると考えられた。

食品添加物としてのケイ酸塩類（ケイ酸カルシウム：E552、ケイ酸マグネシウム：E553a（i)、三ケイ酸マグネシウム：E553a(ii)）およびタルク(E553b)に関する再評価では、体内動態に関する試験結果から、これらの材料はほとんど体内に吸収されず、ヒトを含め一般動物では、肝臓、腎臓への大きな蓄積は起きないと評価している。毒性評価の結果から、ケイ酸塩類やタルクは毒性の低い物質であると考えられた。しかし、ケイ酸カルシウム（E552）でケイ素の蓄積がラットで報告されていることや、ケイ酸塩類およびタルクに関す

る毒性試験の信頼出来るデータ情報がないことを考慮すると、食品添加物として使用されるには安全性について正確に評価出来ないと指摘している。また、純度試験で示されるように毒性元素（ヒ素、鉛、水銀）が含まれており、タルク（E553ｂ）に関しては、アルミニウム、ニッケル、フッ素、結晶シリカも含まれていることから、EU の成分規格書の毒性元素の現行の上限値を引き下げることを推奨することで、主要な曝露源とならないように回避するための方策としているが、今回のケイ酸塩類とタルクの再評価では、ADI の設定は出来なかった。今後、これらの材料に含まれるナノ粒子のサイズ分布や粒子径を特徴付けるデータの必要性や、毒性試験情報を追加していくことが必要であると指摘されている。

銀ヒドロゾルは、透過型電子顕微鏡（Transmission Electron Microscope; TEM）および原子間力顕微鏡（Atomic Force Microscope; AFM）によって測定した粒子サイズの分析（粒子サイズおよびサイズ分布）に関する情報によって、その材料のサイズはナノの範囲内であると示唆している。しかし、ナノ材料のリスクアセスメントに対するEFSAガイダンスによっては、ナノ材料の十分な特性評価について提供していないことから、ナノ特有の特性評価に対する必要なデータして確かめることが出来ないとしている。研究報告によると、銀ヒドロゾルからの銀の体内吸収効率は経口投与量の５３％程度であると示されているが、吸収を測定した訳でもなく、吸収したとした場合の十分な毒物学的な評価も報告されなかった。今後、さらなる特性解析のデータと毒性試験評価について検討する必要があると考えられた。

EFSA の「食品添加物および食品に添加する栄養源に関する科学パネル（ANS パネル）」より、食品添加物として使用されるナノ成分を含有する既存物質の評価を議論からは、未だナノ材料の物理化学的な特性評価（主に粒子径サイズの分析測定の手法）や、毒性学的評価などの科学的知見についての情報は不足していることが示され、今後もさらなる情報収集が必要であると考えられた。

Ｅ．結論

今回、経皮経口複合暴露による AgNP のアジュバント効果を調べる本モデルの改善を目的に、新しい陽性アジュバント物質及び経皮感作経口惹起モデルについて検討した。皮膚感作性試験の陽性アジュバント物質として検討した CTB については弱いながらアジュバント効果を示した。また、我々が実施した、OVA の経皮暴露後、強制経口投与する実験において、下痢の誘発が観察され、経皮感作経口惹起試験の有望なモデルであることが明らかとなった。今後、AgNP を用いてアジュバント作用の有無の検討を行う。

本研究では、高分子化合物、PVP に修飾した AgNP の急性毒性について、AgNP（直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg)で腹腔内投与を行い、その影響について検討した。

その結果、その結果、5 nm AgNP PVP 投与群において、体温低下に加え、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から AgNP の急性毒性は粒子のサイズに相関することが再確認できた。今後、本研究で得られた結果についてさらに検討を重ね、AgNP の急性毒性メカニズムについて、ナノ粒子のサイズ及び表面修飾に加え、酸化的ストレスの関与に関する解析を進めることが必要である。

食品・食品容器包装用途、及び化粧品等の両方に用いられ、経口及び経皮にて暴露される可能性があるナノマテリアルである酸化亜鉛について、抗原経皮感作に与える影響、及び i.p. 投与時の急性毒性について検討した。今回用いた酸化亜鉛（80 nm）では抗原経皮感作時の増強効果は見られなかった。先行研究における結果と考え合わせ、ナノマテリアル

の経皮感作増強効果は粒子径により異なり、粒子径が小さいナノマテリアルの方が経皮感作増強効果が大きいことが示唆された。また、酸化亜鉛に関しては、酸化チタンと異なり急性毒性が見られ、肝臓、腎臓、及び胸腺やリンパ節に影響を与える可能性が示された。今後は経皮感作-経口惹起の動物モデル実験系を確立し、ナノマテリアルの経皮／経口暴露が免疫応答に与える影響について検討を進める。

本研究では、ナノマテリアルの食品関連分野を中心とした曝露状況やリスク評価に関する国際動向を調査すること目的とし、平成 30 年度は、29 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関する調査を行った。EFSA では、2011 年のガイダンスの改訂版として「食品および飼料分野におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーのリスクアセスメントに関するガイダンス」を作成しており、2018 年のナノマテリアルの科学ネットワーク会議では、ガイダンスの実用化に向けたパブコメのドラフトへの議論や、リスクアセスメントに関する改定ガイダンスに対するケーススタディおよびガイダンスの実用性について議論されていた。改定ガイドラインについては、データの検証に関する方法論の不足など、若干の懸念点はあるものの、EU 各国により、特に、ナノ粒子を特徴付ける物理化学的特性評価に関するガイダンスの修正は有用となる可能性があるものと判断された。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きており、二酸化ケイ素、ケイ酸塩類とタルクでは、ADI を設定することが出来なかった。また、銀ヒドロゾルに関しては、食品添加物に加えることに対する安全性と生物学的利用能を評価するにはデータが不十分のために ADI を設定しなかった。今回、調査を実施した既存物質の再評価では、既存の評価は有効ではないことが確認されたが、ナノを含むものとしての評価としては情報が足りないことが示唆されている。EFSA のナノ成分を含有する既存物質の評価を議論からは、ナノ材料の物理化学的な特性評価や、毒性学的評価などの科学的知見についての情報は未だ不足していることが示され、今後もさらなる情報収集が必要であると考えられた。

F. 研究発表

１. 論文発表

1) Koizumi D, Shirota K, Oda H, Adachi R, Sakai, S, Akiyama H, Nishimaki-Mogami T, Teshima R. Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Nonpoisonous Extraction System for the Determination of Crustacean Protein in Processed Foods. J AOAC Int 101, 798-804, 2018

2) Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Tsuda H, Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci.* 109(7):2164-2177. 2018

3) El-Gazzar AM, Abdelgied M, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigo M, Naiki A, Takahashi S, Takase H, Hirose A, Kannno J, Elokle OS, Nazem AM, Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats. *Arch Toxicol.* 93:49-59. 2018.

4) Liao D, Wang Q, He J, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Futakuchi M, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Xu J, Tsuda H. Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Chem Res Toxicol.* 31(10):1025-1031. 2018.

5) Sakamoto Y, Hojo M, Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A, Inomata A, Suzuki T, Nakae D.

Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* 43(10):587-600. 2018.

２．学会発表

1) 曺永晩，赤木純一，水田保子，豊田武士，小川久美子：コレラトキシン及びコレラトキシンBサブユニットの経皮曝露感作性試験におけるアジュバントとしての可能性. 第45回日本毒性学会学術年会（2018.7.19）
2) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Tamehiro N, Kimura Y, Adachi R, Ogawa K：Dose-dependent sensitization effects of transcutaneously exposed acid-hydrolyzed wheat protein. 54th Congress of the European Societies of Toxicology（2018.9.4）
3) Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Ogawa K：Effects of antioxidants on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. The Korean Society of Toxicologic Pathology 2018（2018.10.25）
4) 曺永晩，水田保子，赤木純一，豊田武士，井手鉄哉，小川久美子：腹腔内投与銀ナノ粒子によるBALB/cマウスの急性毒性における抗酸化剤の影響. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2019.1.31）
5) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K：Effects of N-acetyl-L-cysteine on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology（2019.3.12）
6) Miyazaki A, Watanabe S, Hirao T, Kokutani R, Minegishi Y, Ogata K, Nagatomi Y, Tamehiro N, Sakai S, Adachi R. Specific Detection of Food Allergens (Wheat, Buckwheat, and Peanut) by Real-Time PCR Methods Using the Reference Plasmids. 132nd AOAC Annual Meeting & Exposition (2018年８月)
7) Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Abdelhamed M., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Takahashi S., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers are possibly carcinogenic in male Fisher 344 rats. *54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018)* (September 2018 Brussels, Belgium)
8) Hirose A., Hojo M., Kobayashi N., Impact of sample preparation of MWCNT for developmental toxicity by intratracheal instillation. *The 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC2018)* (April 2018 Belgrade, Serbia)
9) Hojo M, Kobayashi N, Hasegawa Y, Sakamoto Y, Murakami S, Yamamoto Y, Tada Y, Maeno A, Kubo Y, Ando H, Shimizu M, Taquahashi Y, Suzuki T, Nakae D, Hirose A: Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. *54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018)* (September 2018 Brussels, Belgium)
10) Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A, Yoshida H, Kurokawa M. Effects of double-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. *54th Congress of the European Societies of Toxicology,* (September 2018 Brussels, Belgium)
11) Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Hirabayashi Y, Hirose A, Kanno J. Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System. *58th Annual Meeting of the*

Society of Toxicology, (March 11-14, 2019, Baltimore)
12) 坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大：多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を単回経気管噴霧投与した後終生飼育したラットの肺および中皮組織における増殖性病変の発生. 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)
13) 坂本義光, 多田幸恵, 北條幹, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 中江大：ラットにおいてDHPNで誘発されたメソテリン陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性状. 第35回日本毒性病理学会学術集会 (2019年1月東京)
14) 津田洋幸,徐結荀, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬,広瀬明彦,管野純. ナノマテリアルの気管支内投与による毒性と発がん性の簡易検出システムの開発　第４５回日本毒性学会学術年会　大阪2018年７月
15) 津田洋幸,徐結荀, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬,広瀬明彦,管野純. ナノマテリアル特にカーボンナノチューブによる肺・胸膜中皮障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 試験法の開発 第４５回日本毒性学会学術年会 (2018年7月大阪)
16) 北條幹, 小林憲弘, 長谷川悠子, 安藤弘, 久保喜一, 海鉾藤文, 田中和良, 五十嵐海, 村上詩歩, 多田幸恵, 生嶋清美, 湯澤勝廣, 坂本義光, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 高橋祐次, 広瀬明彦, 中江大：多層カーボンナノチューブのマウス気管内投与による発生毒性と肺の炎症との関連性. 第45回日本毒性学会学術年会 (2018年7月大阪)

G.　知的所有権の取得状況

１. 特許所得

なし

２. 実用新案登録

なし

３. その他

なし