

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性確保推進研究事業）
「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」
分担研究報告書（令和元年度）

分担研究課題名：酸化チタン等の経皮／経口暴露による免疫毒性の解析

研究分担者：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：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

研究要旨

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。平成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。また、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開始した。令和元年度においては、抗原経皮感作-経口惹起実験系を確立し、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討した。経皮感作-経口惹起実験系については、経皮感作後に複数回の経口投与による追加免疫を行い、その後経口投与によりアレルギー症状を惹起する実験系を確立することができた。この実験系を用いて抗原経口投与時のナノ酸化チタンの共存による影響について検討したところ、ナノ酸化チタンが、抗原の経口投与による追加免疫やアレルギー症状惹起を増強する可能性が示された。今後、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、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

A．研究目的

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。その経皮暴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、経皮的アレルギー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。平成 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。平成 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。また、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開始した。令和元年度においては、抗原経皮感作-経口惹起実験系を確立し、アレルギーの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討した。

B . 研究方法

試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン α (アナターゼ型、粒子径 6 nm)
(表面未処理)

を使用した。

抗原タンパク質としては、卵アレルギーである卵白アルブミン (OVA; Sigma A5503) を用いた。その他の試薬は特級グレードのものを用

いた。

酸化チタンナノマテリアルの懸濁液調製

酸化チタンは、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ポ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。

【実験 1】経皮感作-経口惹起実験系に関する検討

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 3 匹とした。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。8 週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (500 μ g/50 μ L) 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 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 クールの経皮感作を行った。その後、Day 35、37、39、42、44、46、49、51、53、56 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回/週、計 10 回) 追加免疫を行った。この時、OVA-S 群では、投与前 3 時間絶食させた。Day 0、35、57 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 63 に OVA 100 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 Table 1 の基準に従ってスコアリングした。

【実験 2】アレルギー経皮感作後の経口投与に

対するナノ酸化チタンの影響に関する検討

経皮感作の操作は【実験 1】と同様に行った。1 群の匹数は 3 匹とした。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。経皮感作時の OVA 用量は $2\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ とした。その後、Day 28、30、32、35、37、39、42 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回/週、計 10 回) 追加免疫を行った。この時、 $\text{TiO}_2\text{C po}$ 群では、OVA 30mg と TiO_2 1.88mg (OVA:ナノ酸化チタン重量比=16:1) を懸濁させて経口投与した。Day 0, 25, 43 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。経口投与後 1 時間の直腸温測定及び下痢症状スコアリングは【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、Vehicle 群を基準とした Dunnett の検定を行い、 $p<0.05$ を有意とした。図中には、* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ で有意差の程度を示した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理審査委員会の承認を得て行った。マウスへの検体の投与、採血等においては、動物の苦痛を最小限に留めるように努め、動物飼育・管理に当たっては研究所の動物施設利用規定に従った。

C. 研究結果

【実験 1】経皮感作-経口惹起実験系に関する検討

平成 30 年度においては、抗原の腹腔内投与による感作に続いて経口投与を行い、追加免疫及びアレルギー反応を惹起する実験系に関する検討を行った。OVA 30mg \times 4 回の追加免疫を行い、その 1 週間後に OVA 100mg を経口投与してアレルギー反応を惹起したところ、ある程度の体温低下や下痢症状は見られたが、顕著

な反応ではなかった。令和元年度においては、経皮感作-経口惹起実験系を確立するため、これまでの経皮感作実験系と同様に OVA による 4 週間の経皮感作の後、OVA 30mg \times 10 回の追加免疫を行い、その 1 週間後に OVA 100mg を経口投与してアレルギー反応惹起を行った。各群の実験条件、及び実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。経口投与前の絶食無しの群 (OVA 群) と絶食有りの群 (OVA+S 群) で比較した。

Fig. 2 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ、その後の経口追加免疫によってさらに増加した。経口投与前の絶食の影響は特に見られなかった。(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、経口追加免疫、及び経口惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果を示す (Fig. 3, 4)。追加免疫 4 回までは体温低下、下痢症状ともほとんど見られなかったが、追加免疫 7 回目以降、及び経口惹起においては、顕著な体温低下及び下痢症状が見られた。(なお、通常の Vehicle 群では体温変動や下痢症状はほとんど見られない。) これらの結果から、抗原経皮感作後に複数回の経口追加免疫を行うことにより、最終的に経口投与による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。

【実験 2】アレルギー経皮感作後の経口投与に対するナノ酸化チタンの影響に関する検討

上記【実験 1】において経皮感作-経口惹起実験系が確立されたので、この実験系を用いて酸化チタンナノ材料の影響について検討した。用いたのは、これまでに OVA による経皮感作を増強することが示されているナノ酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm) である。【実験 1】と同様、4 週間の OVA 経皮感作の後、OVA 30mg \times 7 回の追加免疫を行い、その 1 週間後に OVA 50mg を経口投与してアレルギー反応惹起を行った。OVA のみを経口投与

する群（OVA 群）に加え、OVA の経口追加免疫時にナノ酸化チタン C を共存させる群（TiO₂C po 群）を設定した。OVA:ナノ酸化チタン重量比は、経皮感作においてナノ酸化チタンによる増強効果が見られた 16:1 とした。各群の実験条件、及び実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。

Fig. 5 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ、その後の経口追加免疫によってさらに増加した。抗体産生に関しては、経口追加免疫時のナノ酸化チタンの共存による影響は見られなかった。

次に、経口追加免疫、及び経口惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果を示す（Fig. 6, 7）。体温低下に関して、OVA 群では、経口追加免疫中はそれほど大きな体温低下は見られなかったが、TiO₂C po 群では、追加免疫 7 回目において大きな体温低下が見られた。経口惹起時には、両群ともに顕著な体温低下が見られたが、OVA 群では 30 分以降は回復傾向が見られたのに対し、TiO₂C po 群では 60 分後まで体温低下が持続していた。下痢症状に関しては、OVA 群と比較して TiO₂C po 群ではより高いスコアとなる傾向が見られた。これらの結果から、OVA 群と TiO₂C po 群とで有意差は見られなかったものの、ナノ酸化チタンが抗原経口投与による追加免疫及びアレルギー症状惹起を促進する可能性があることが示された。

D. 考察

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、経皮的アレルギー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った。平成 29 年度においては、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。平成 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。粒子径の小さなナノ酸化チタン(6nm)やナノ酸化亜鉛(25nm)が経皮感作を増強することから、これらのナノマテリアルの作用は粒子径に依存する(粒子径が小さい場合に増強効果がある)可能性が示唆された。また平成 30 年度には、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開始した。

令和元年度においては、抗原経皮感作-経口惹起実験系の確立を目指して検討を続けた。その結果、OVA 30mg×7 回以上の経口投与による追加免疫と、その後の OVA の経口投与によりアレルギー症状を惹起する実験系を確立することができた。そこで、この実験系を用いて、抗原経口投与時のナノ酸化チタンの共存による影響について検討した。経皮感作において顕著な増強効果を示したナノ酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm) について検討したところ、OVA による追加免疫や経口惹起を増強する傾向が見られたことから、ナノ酸化チタンが抗原経口投与による追加免疫及びアレルギー症状惹起を促進する可能性が示された。

近年、アレルギー発症の要因として、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、経皮感作後の抗原経口投与においても、ナノ酸化チタンが、抗原追加免疫やアレルギー症状惹起を増強する可能性が示された。今後、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、さ

らなる検討を行い、科学的知見を集積することが必要である。

E. 結論

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ため、抗原経皮感作-経口惹起実験系の確立、及びアレルギーの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討した。抗原経皮感作-経口惹起実験系については、OVA 30mg×7回以上の経口投与による追加免疫と、その後のOVAの経口投与によりアレルギー症状を惹起する実験系を確立することができた。この実験系を用いて抗原経口投与時のナノ酸化チタンの共存による影響について検討したところ、ナノ酸化チタンが、抗原の経口投与による追加免疫やアレルギー症状惹起を増強する可能性が示された。今後は、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、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazaki A, Watanabe S, Ogata K, Nagatomi Y, Kokutani R, Minegishi Y, Tamehiro N, Sakai S, Adachi R, Hirao T. Real-time PCR Detection Methods for Food Allergens (Wheat, Buckwheat, and Peanuts) Using Reference Plasmids. J Agric Food Chem. 2019 May 15; 67(19): 5680-5686.

2. 学会発表

- 1) 安達玲子、為広紀正、木村美恵、曹永晩、水田保子、小川久美子、近藤一成
酸化亜鉛ナノマテリアルの抗原経皮感作への効果及び急性毒性における粒子径の影響
第46回日本毒性学会学術年会 2019年6月

- 2) Adachi R, Tamehiro N, Kondo K, Miyazaki A, Watanabe S, Hirao T. Interlaboratory validation of real-time PCR methods for the detection of wheat, buckwheat, and peanuts in processed foods.

133rd AOAC Annual Meeting & Exposition
2019年9月

- 3) Watanabe S, Miyazaki A, Hashimoto M, Unno H, Yonekawa Y, Adachi R, Hirao T. Novel DNA reference material by bioprinting IX: Application for quality control of the qualitative real-time PCR method for food allergens.

133rd AOAC Annual Meeting & Exposition
2019年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

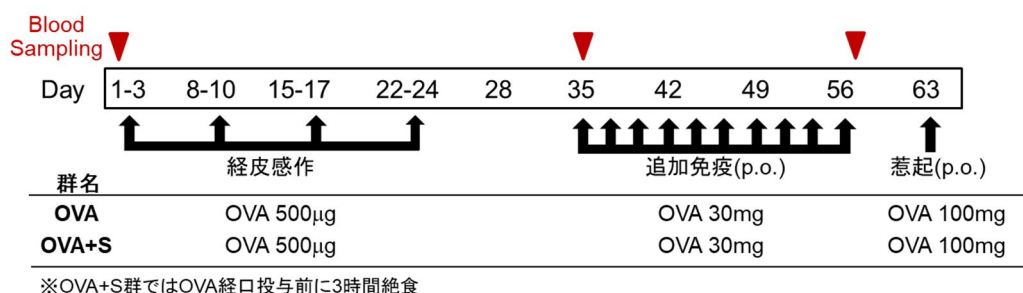
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

実験1 経皮感作-経口惹起実験系に関する検討(1群3匹 x 2群)



実験2 アレルゲン経皮感作後の経口投与に対するナノ酸化チタンの影響に関する検討(1群3匹 x 3群)

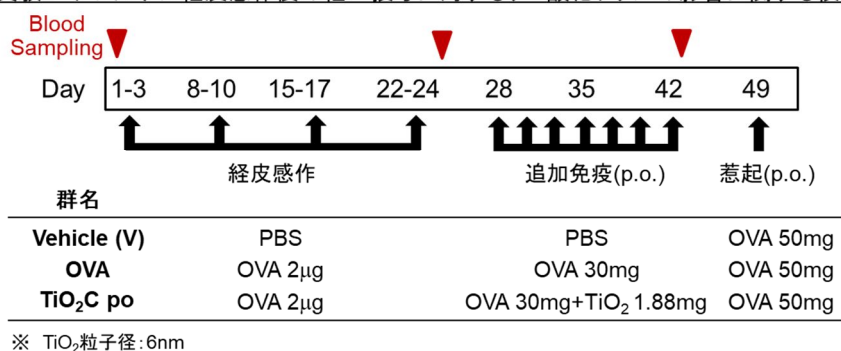


Figure 1 各実験群の設定および投与スケジュール

Table 1 下痢症状スコアリングの基準

Score 0	solid state
1	funicular form
2	slurry
3	watery state

※Allergy 67, 201-9 (2012). スコア2以上を下痢とする。

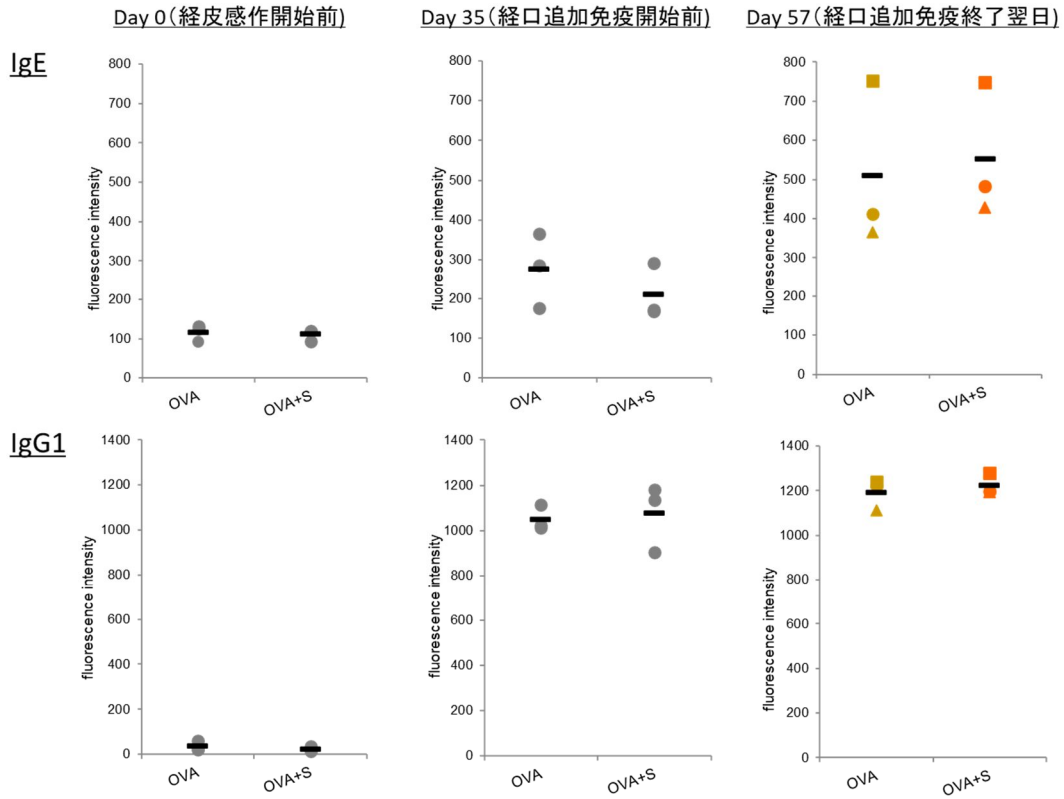


Figure 2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生(【実験1】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

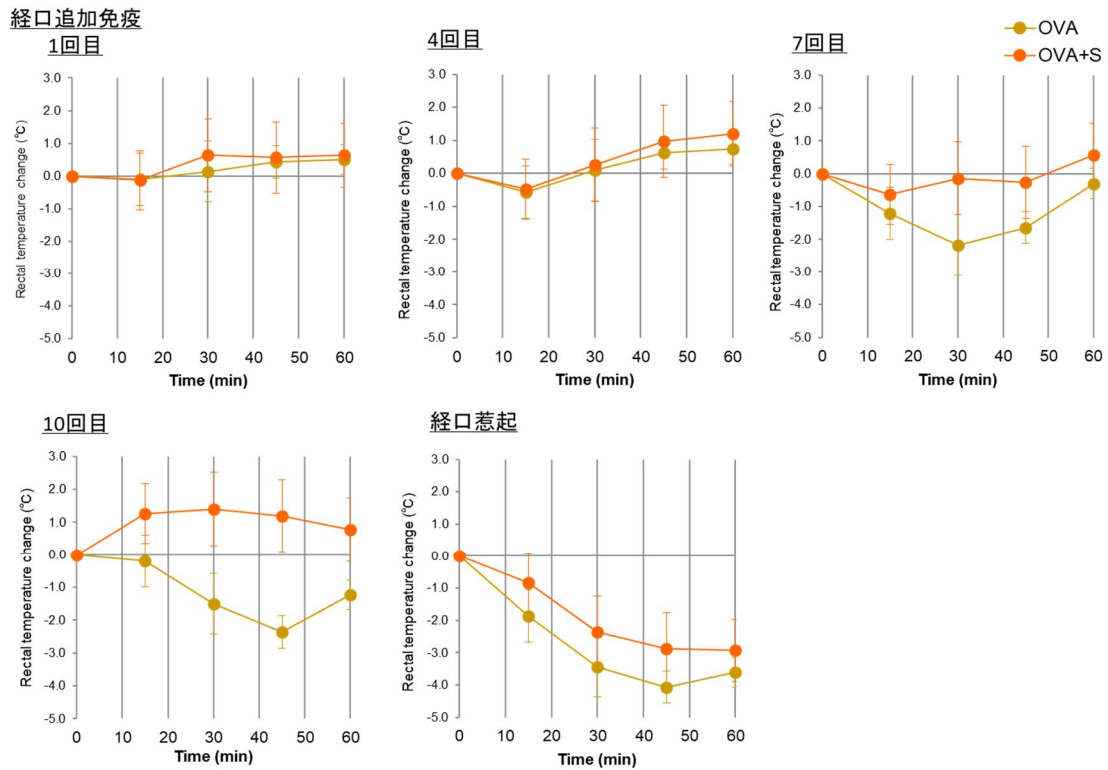


Figure 3 抗原経口投与後の体温低下(【実験1】)

経口追加免疫

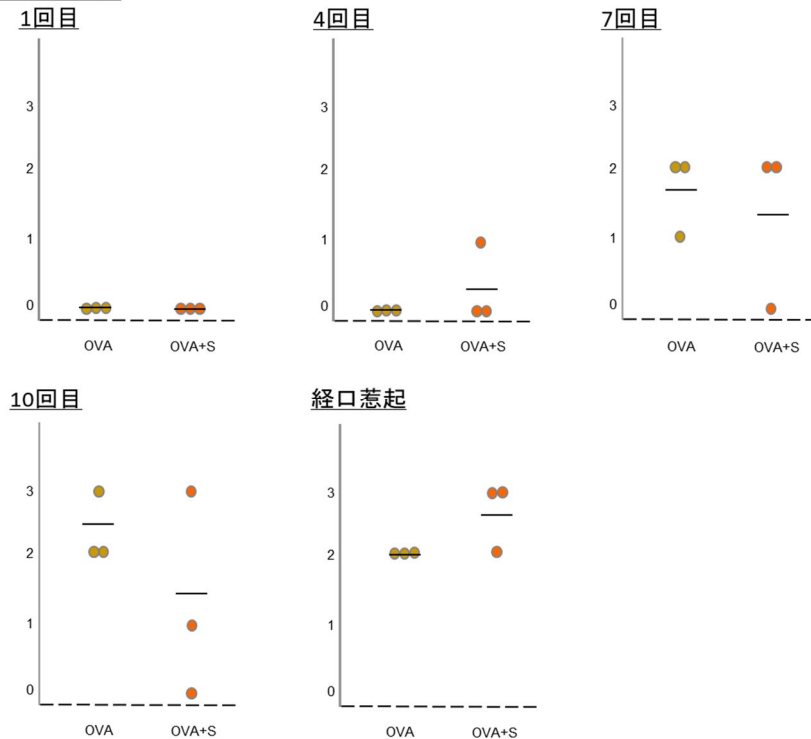


Figure 4 抗原経口投与後60分間の下病症状スコアリング(【実験1】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

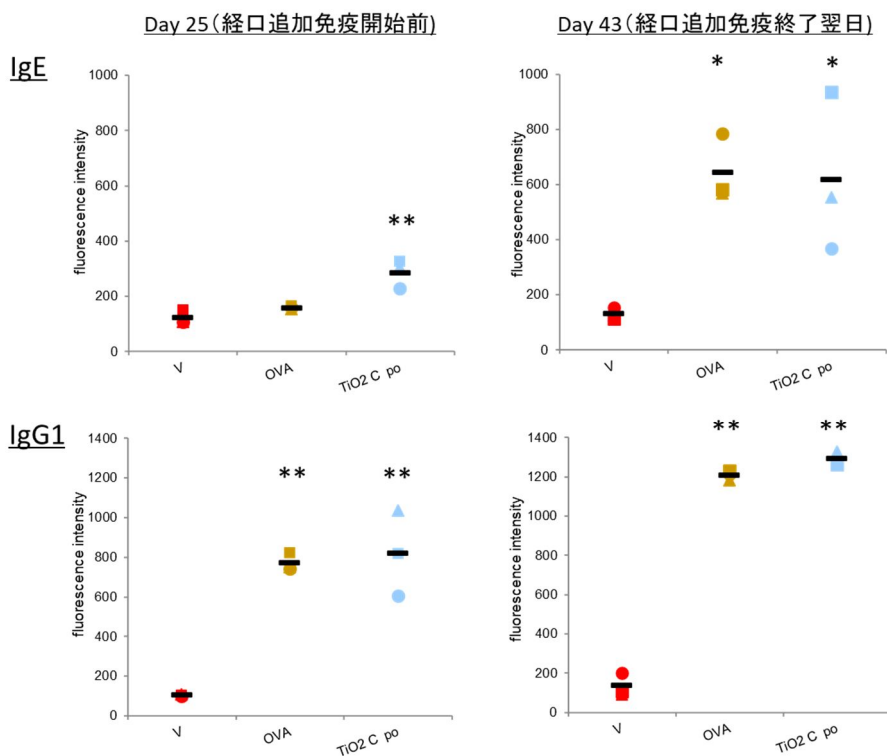
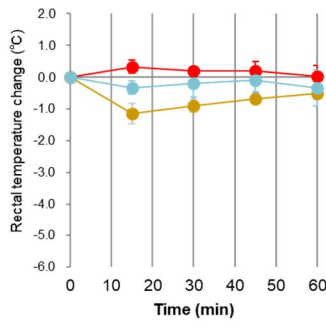


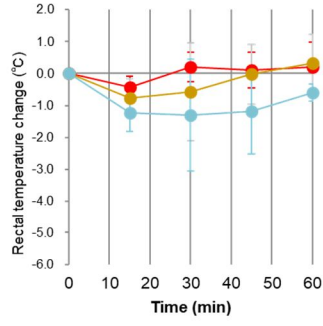
Figure 5 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生(【実験2】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group.

経口追加免疫

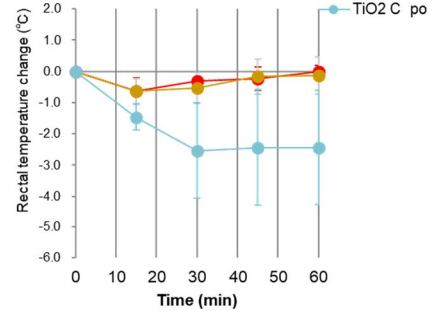
1回目



4回目



7回目



経口惹起

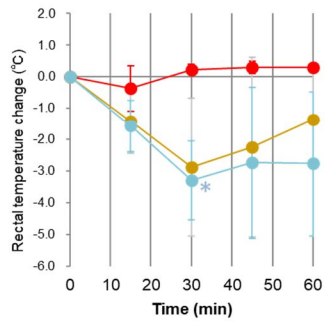
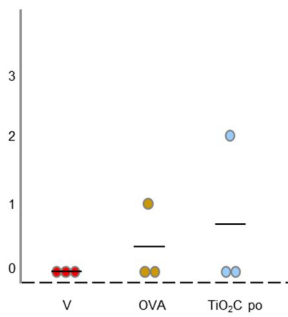


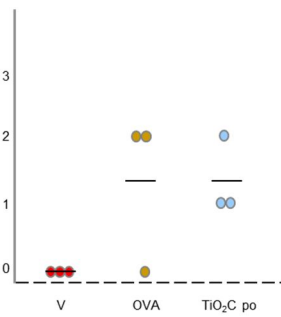
Figure 6 抗原経口投与後の体温低下(【実験2】)
*p<0.05 vs V group.

経口追加免疫

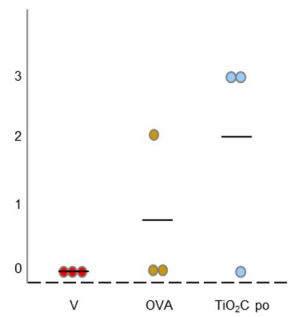
1回目



4回目



7回目



経口惹起

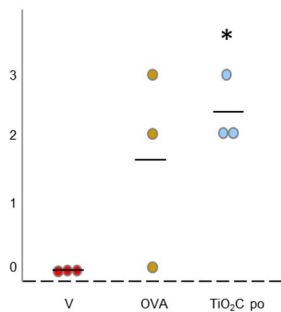


Figure 7 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング(【実験2】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。*p<0.05 vs V group.