

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
ナノマテリアルの経口曝露による免疫毒性に対する影響

(H 2 6 - 食品 - 一般 - 0 0 2)

2 6 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 久美子

平成 2 7 (2 0 1 5) 年 5 月

目 次

I . 総括研究報告

ナノマテリアルの経口曝露による免疫毒性に対する影響	1
小川久美子	

II . 分担研究報告

1 . 経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について	14
曹 永晩、西川 秋佳、小川 久美子、最上 知子、安達 玲子	
(資料) Figure 1～12	
Table 1～2	

2 . 抗原性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について	25
小川 久美子、西川 秋佳、曹 永晩、最上 知子、安達 玲子	
(資料) Figure 1～7	
Table 1～2	

3 . 曝露評価(食品等を含む)に関する国際動向調査	35
広瀬 明彦、小野 敦、小林 克己	
(資料)表 1～2	

III . 研究成果の刊行に関する一覧表	43
----------------------------	----

IV . 研究成果の刊行物・別刷	44
------------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）

総括研究報告書（平成26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ているものの、AgNPのサイズによる毒性の違いに関連する情報は少なく、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曝露されるのみならず、消臭・殺菌剤として化粧品にも含まれており、皮膚からも曝露される。AgNPの経皮経口複合曝露による、免疫毒性の有無について検討する評価方法を確立するため、各サイズのAgNP（直径10 nm、60 nm及び100 nm）の卵白アルブミン（OVA）との混合物の1）経皮曝露後、抗原であるOVAを腹腔内投与（アジュバントの陽性対照としてAlumを使用）、2）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）、3）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。その結果、実験1）及び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-分泌について、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）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-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。

以上の結果から、OVA+AgNPの経皮曝露後、OVAを腹腔内または強制経口投与する本モデルにおいては、AgNPの明らかなアジュバント活性は認められなかった。今後、皮膚感作性試験の陽性対照物質や貼付するOVA抗原の濃度などさらなる検討が必要であると考えられた。また、10 nm AgNPを腹腔内投与した全動物で死亡及び瀕死例が認められた。特定の大さの被験物質でのみ見られた現象であり、類似した大きさのナノ銀の静脈投与によっては毒性の報告がないことから、機序について

詳細に検討する必要があると考えられた。また、60 nm 及び 100nm AgNP については、IgG2a 増加を示すことから、細胞免疫への影響の可能性が示唆された。

さらに、ナノマテリアルの食品関連分野を中心とした曝露状況に関する国際動向を調査すること目的として、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、食品分野への適用実態を検討した。まず、ナノ関連に関する欧州の規制動向については、2011 年にナノマテリアルの定義が確定して以降、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、一般の化学物質の登録システムを中心としたもので、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。一方、新規食品規制においては、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るものの、既存の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る。現時点では新規のナノマテリアルとしての登録は認められていない。しかし、研究開発に関する文献調査等の結果からは、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が示された。食品及び飼料等に関する文献調査等では、重要な潜在的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、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る。これらの物質の評価手法がある程度定まれば、新規のナノマテリアルの適用も増加していくものと考えられた。

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

研究分担者：西川 秋佳
国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験
研究センター センター長
研究分担者：曹 永晩
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長
研究分担者：広瀬 明彦
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測
評価部 部長
研究協力者：小野 敦
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測
評価部 室長
研究協力者：小林 克己
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測
評価部 研究員
研究協力者：最上 知子
国立医薬品食品衛生研究所 生化学部
部長
研究協力者：安達 玲子
国立医薬品食品衛生研究所 生化学部
室長

A. 研究目的

ナノマテリアルには、様々の材質が考案されており、その工業的利用の振興が期待されている。ナノマテリアルの中でも、カーボンブラックや酸化チタン、酸化銀、カーボンナノチューブなどは、製品や環境経由の曝露による、ヒトの健康への影響が懸念されており、複数の検討がなされている。一方、ナノテクノロジーは食品・食品容器分野における積極的な利用も期待

されており、これまでの研究でナノ銀や酸化チタンの食品関連分野における使用実態を調査した結果、ナノ銀については容器・包装用途における抗菌目的の使用が、二酸化チタンについては容器・包装に遮光性や抗菌性を付与する目的の使用が確認できた。

ナノ銀 (AgNP) の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び 90 日間反復投与毒性試験等において、肝臓や腎臓に軽度の変化が示されているものの、十分な評価は行われていない (Bergin IL et. al., *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol.* 2013;3. doi: 10.1504/IJBNN.2013.054515.)。また、免疫毒性についての報告は限られている (Shin S-H et al., *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology.* 2012;4 (222-227))。AgNP のサイズによる毒性の違いについて、細胞を用いた検討では可能性が指摘されているが (Park MVDZ et. al., *Biomaterials.* 2011;32 (9810-9817))、動物を用いた検討での報告はない。

AgNP は、食品・食品容器包装用途として経口曝露されるのみならず、消臭・殺菌剤として化粧品にも含まれており、皮膚からも曝露される。金属はアレルギーの原因となりうるが、一般に、銀やチタンのアレルゲンとしての性質は低いとされている。しかし、経口曝露では免疫寛容が成立する物質でも、ナノマテリアルとして経皮的に繰り返し曝露された後に、経口曝露されることにより、アレルギー反応が惹起される可

能性や、他のアレルゲン曝露に対してアジュバント効果を示す可能性の検討は十分ではない。

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

本研究では、AgNPの経皮経口複合曝露による、免疫毒性の有無について検討する評価方法を確立するため、雌性 BALB/c 系マウスを用いて、各サイズの AgNP（直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm）の卵白アルブミン（OVA）との混合物の 1）経皮曝露後、抗原である OVA を腹腔内投与、2）経皮曝露後、OVA を強制経口投与、3）OVA との混合物あるいは AgNP 単独の腹腔内投与し、AgNP アジュバント活性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)

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、 Vehicle 群、 OVA 群、 OVA + Alum 群、 OVA + 10 nm AgNP、 OVA + 60 nm AgNP、

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 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 と同様に実施した。

実験 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、溶媒対照群 (Vehicle) 群、OVA 群、OVA + Alum 群、OVA + 10 nm AgNP、OVA + 60 nm AgNP、OVA + 100 nm AgNP、10 nm AgNP、60 nm AgNP、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 標本を作製し、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- の濃度を、BD OptEIA ELISA Sets を用いて測定した。

調査研究

ナノ材料に関する規制が比較的進んでいる欧州において、食品分野への適用実態を検討した。まず、ナノ関連に関する欧州の規制動向を概況した。さらに 2014 年からナノ製品の登録制度を開始したデンマークにおけるナノ製品の実態状況を調査した報告を中心に、食品関連製品に関する情報を整理した。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エクセル統計 2012 for Windows ソフトウェアを用いて、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett 法により有意差検定を行った。不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Steel 法により多重検定を行い、

p<0.05 を有意とした。なお、図中には * p<0.05、** p<0.01 で有意差の程度を記した。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者による腹腔内並びに強制経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

C . 研究結果

in vivo 研究

実験 1)

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。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。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。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。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。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が、IL-2、IL-4、IL-5 及び IFN- において、群間に有意な変化は見られなかった。

皮膚病変のスコアリングを行った結果、Vehicle 群と比較していずれの群においても有意な増加が認められず、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。

実験 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。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。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。

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。

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、貼付部位近傍の左腋窩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 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。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。

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。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。

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。

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。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。

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。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。

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年にフランスは、将来のナノ登録を見据えつつ、ナノ物質に関する情報政府への情報提出を義務的とした(この登録制度はナノ物質だけを対象とし、それらを含む消費者製品はカバーしていない)。登録データは毎年、フランス食品安全・環境・労働機関(ANSES)に提出され、ナノ物質の特性や用途に加え、企業秘密に関する情報も含む。これに続いて、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。ベルギーも、ナノ物質及びそれを含む混合物物質を対象としたものであるが、デンマークの登録制度は、ナノ物質だけでなく、むしろ製品に焦点を当てている。2014年6月の開始からの1年間分の登録については、機密情報は公開されないが、その年次報告書は2015年8月末に報告されることとなっている。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。幾つかの評価はすでに終了しており、それらの再評価は、2015年12月31日までに完了する予定となっている。

欧州の食品包装中のナノ材料は、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(Commission (a) 2012)。窒化チタンのナノ粒子および食品接触材料プラスチック包装のためのコーティングされたナノ二酸化ケイ素(100 nm未満)の安全性評価は、それぞれ2012年および2007年にEFSAによって公開されている(EFSA 2007; EFSA 2012)。

< デンマークにおける食品および飼料中のナノ材料の使用状況 >

潜在的にナノスケールサイズの分布を有する食品添加物が食品に使用され、デンマークの市場で販売されていることを示す報告書に対するデンマークの食品業界へのインタビューの結果、多く物質は、業界がナノ材料とは見なしていない。そして、重量ベースの粒度分布を用いたものとしても定義されていない。ところが、これらの物質は、2011/696/EUによる個数基準の粒径配布状況を適用すると、ナノ材料と分類される可能性がある。さらに、いずれのインタビュー回答者は、食品成分および添加物のサイズ分布に関する正確な情報を与えることができなかった。企業は、製品を使用するまたは販売する場合、これら物質のナノサイズの関連特徴の機能を示さなくてはならないが、この資料の提出は、無かった。つまり、どの企業も、ナノ材料を含む食品を市場へ販売のための登録申請をデンマーク獣医食品庁に提出していない。

ナノ材料(2011/696/EU)の定義は、EU委員会が勧告しており、それに従えば、既存の成分および添加剤を含む広範囲の食品でナノ材料を含むものとして特徴付けることができる。しかし、この規制は、「1997年5月15日以前から現在までにある程度にヒトへ消費(摂取)がされていない食品および食品成分」(新規食品および新規食品組成、規制(EC)258/97)にのみ適用するので、既存のナノ材料含む食品は対象とならない。従って、対象となるナノ材料が改訂新規食品規制による新規食品として表示および定義されない限りは、デンマークに新規食品添加用ナノ材料の殆どは存在しないことになる。

そこで、この調査の目的のためのナノ材料の特定の定義は、ナノ材料(2011/696/EU)の定義にしたがっており、既存添加物除外した食品との関連した定義と異なっている。調査結果の概要を表1に示す。

表1. デンマークの食品産業におけるナノマテリアルとして扱われている材料

ナノ材料	製品	効用	含有量
シリコン化合物(例: 二酸化ケイ素)およびケイ酸塩	広範囲使用(例: 食品および野菜の缶詰)	固結防止、清浄、消泡、香りのキャリア(媒体)および増粘剤	該当なし
炭酸カルシウム	広範囲に使用	カラー、安定剤および固結防止	該当なし
自然着色剤/顔料(例: アントシアニン、ビート(飼料用大根)、コチニール(色素)、クロロフィルおよびカロテノイド)	広範囲に使用(ジュース、ビール、ワイン、肉、乳製品および菓子)	色素	不定
二酸化チタン	製菓(例: ガム、ビスケットおよびチョコレート)	表面のコーキングおよび色素	約 0.01 ~ μg/mg

一方、畜産用飼料産業界に対するインタビューでも、製品がこの調査で定められるナノマテリアルを含むと思っておらず、ほとんどの場合、供給材料または添加剤の粒子サイズのデータ・資料を持っていないことが示された。

殆どの飼料は、0.25~1 mmの幅のサイズの粉末またはいくつかの栄養素からフレーク飼料を製造し、ペレットまたは圧ぺん化したものであり、最小サイズは、マイクロスケールである。畜産用飼料は、プレミックスを作製し飼料に混合するが、そのプレミックスは、多くのビタミンおよびミネラルとキャリア(シリカまたはカルシウム)の混合物でナノスケールである可能性もある。職場で安全衛生上の規制を遵守するために(粉塵を避けるため)、粉末は、ナノスケールよりはるかに大きい粒子であるが、おそらくキャリア中の混合物は、ナノスケールの一次粒子の塊または凝集物質である可能性もある。同様に魚用飼料の材料の一般的な最適粒子サイズは0.5~1.75 mmとされ、ナノスケールよりはるかに大きい。特に、魚用飼料用ビタミンおよびミネラルのサイズは、500 μmまたは350 μmより小さい粒子が95%になるように決められているが、それでもナノスケールよりかなり大きい粒子が使用されている。

デンマークにおけるナノマテリアルとして家畜用飼料の材料または添加物のスクリーニング段階で使用可能なナノマテリアル、飼料製品および用途などを表2に示した。インタビューで注目すべきことは、この調査で定義されているナノマテリアル成分を食品に使用することを期待していない。また、粒子サイズのデータは不明である。表に記載されている全ての材料は、5~7年前に導入されたキレート物質を除いて、何十年もデンマークの飼料業界で使用されてきたものである。

表2. デンマークの畜産用飼料産業界で分類されているナノマテリアルの概要

金属材料	製品	用途・機能	食品中含有量
ケイ素化合物およびケイ酸塩	圧ぺんフレーク飼料およびペレットを含む一般家畜用飼料; プレミックス(飼料添加剤の混合物)	キャリア用	約 1% (w/w)
炭酸カルシウムおよびリン酸カルシウム	一般家畜用飼料; 水産用飼料	栄養素およびキャリア	約 1 ~ 4% (w/w)
金属塩および酸化物(酸化鉄および微量元素: 銅、亜鉛、マンガンおよびコバルト)	一般家畜用飼料; 水産用飼料	栄養素	<< 1% (w/w)
微量元素のアミノ酸キレート	一般家畜用飼料	栄養添加物	<< 1% (w/w)
着色剤/顔料(例: カロテンおよびアスタキサンチン)	採卵鶏を含む一般家畜用飼料; 水産用飼料	色素	<< 1% (w/w)

< デンマークにおける食品接触材料中のナノマテリアルの使用状況 >

プラスチック容器、フィルムおよび紙の包装を含む食品包装に対するデンマークの生産者へのインタビューでは、食品接触材料中のナノマテリアルの使用が明らかにされなかった。この調査では、ナノマテリアル(例えばナノクレイ/ナノ粘土)の将来性も対象としているが、商業的に実用化されていない。幾つかの意見の中には、ナノマテリアルがラベリングや包装のために使用される顔料、接着剤、ポリマーおよび紙に含まれている可能性に言及した。しかし、これら顔料、接着剤、ポリマーおよび紙に混入されるナノマテリアルのタイプは、特定することが出来なかった。顔料業界へのインタビューでは、オフセット印刷のために現在利用可能な顔料の多く(最大 100)は、ナノスケールの範囲近くに設定されており、EU 勧告(EC 2011/696/EU) によってナノマテリアルとして定義されるかもしれないとしている。つまり、最近の生産者による REACH の報告では、Lithol Rubine (PR57:1), Permanent Maroon Medium (PR 15) および Toluidine Maroon (PR 13) がナノスケールを含んだ顔料の事例として報告されている。

台所家電や家電製品を生産する二つの大きな国際的な企業からの回答では、環境システムおよびヒトに対する健康へのナノマテリアルの毒性についての懸念が増大しているという結果に基づき、欧州市場からのナノ銀を含む製品を回収したというものであった。これらの現象は、ヒトへの影響に関する論文を裏付け、これによって台所家電へのナノマテリアルの使用が減少していることを示唆している。回答者は、自社製品のいずれも、業界の定義に従ってナノ物質を含んでいないと主張している。しか

し、例えば EC2011/696/ EU に従って定義すると、カーボンブラックおよび二酸化チタンのような顔料は、プラスチック部品および台所用品のコーティングおよびラッカーに使用されている可能性が高い。

< 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 >

最近まで、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や評価が報告されている。

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。これらは、食品および飼料により小さな粒子が、大きなコロイドに強く凝集 (ELC 2009) する可能性があるナノマテリアルについて考慮すべきかどうかを議論されている。アモルファス二酸化ケイ素は、分離剤、補助剤、増粘・濃化剤および酸化防止剤として、調味料やカフェクリーマーなどの粉末状の食品で使用されてきた。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)。ナノサイズのシリカの含有量は、この研究から不明である。しかし、使用したシリカは、50%以上がナノ粒子の幅に入ることから、ナノマテリアルと定義できることから、これをナノマテリアルとして定義している。これらの知見から、Dekker と共同研究者は、124 mg が (ナノシリカ高濃度含有食品を摂取した場合の一日当たりの摂取量) ナノシリカの一日平均摂取量と推定した。さらに、コロイド状シリカは、ワインおよびフルーツジュースの清澄剤として使用され、焼成シリカは、コーヒーや紅茶の消泡剤として使用される (委員会 (b) の 2012)。欧州食品安全機関 (EFSA) は、二酸化ケイ素の再評価を 2016 年までに遅くとも完了しなければならないと述べている。

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。いくつかの製品中の二酸化チタンの濃度は、0.0005% および 0.04% の間で変動している。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。シリカは、50%以上がナノ粒子の幅に入ることから、ナノマテリアルと定義できる。二酸化チタンが添加されている食品は、乳製品、キャンディー、ガム、焼き菓子、調味料および飲料 (Weir, Westerhoff *et al.* 2012) などである。Weir らは、食品グレードの二酸化チタンの一日平均摂取量を推定した。その結果、米国の 10 歳以下の子供は、1 ~ 2 mg/kg 体重でその他のグループでは、おおよそ 0.2 ~ 0.7 mg/kg 体重と報告している。

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製品を含む幅の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。食品グレードの炭酸カルシウムの典型的な平均粒径は、5 μm で 100 nm 未満が 1% 未満のものは、ナノマテリアルとは定義できないことを業界で云われている。飼料中の炭酸カルシウムは、飼料原料および技術的添加剤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ため、本報告書では、食用に記載されていない。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。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。天然色素添加剤は、合成着色添加剤の代替となる。天然色素添加剤、風味剤および油の使用は、しばし

ば、水に分散可能にするためキャリアシステムを用いて分散させる。それは、ナノ化処置またはナノカプセル化によって均一に分散 (ELC 2009; Chaudhry, Watkins *et al.* 2010) させる。炭水化物 (例えばデンプン)、ゼラチン、
-シクロデキストリンおよびアルギン酸カルシウムは、ナノキャリアの典型的な例であり、数多くの企業が製造し、製品を販売 (Möller, Eberle *et al.* 2009) している。乳化された非水溶性化合物は、もしかするとナノ範囲にある。しかしながら、キャリア (搬送) システムの場合は、サイズが大きくてもよい (Möller, Eberle *et al.* 2009)。

食品包装用ナノ材料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 (Nanotechnology 2008)。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。

顔料: 食品接触材料のカーボンブラックおよび二酸化チタンを含む有機および無機顔料は、一般的に食品包装材料のプラスチック、板紙、缶の接着および密閉剤の発色剤として使用されている (Environment Canada 2011)。

包装器材の改善: 複合ナノ材料は、プラスチック母体にナノ物質を低レベル (2~5%) 含有し、従来の食品包装材料に勝る幾つかの利点を示す。例えば、その利点は、機械的特性の改善、気体と液体の浸透性の減少および軽量化と難燃性の向上などである。複合ナノ材料は、主に瓶やフィルムの特性を改善し、場合によっては、他の材料のコーティングに用いられる。

特に、種々の有機クレイは、グローバルナノ対応の食品および飲料市場の約 70% に興味を持たれている (Möller, Eberle *et al.* 2009)。多くの複合材料は、成功裏にアジアおよび米国で商品化されている。例えばポリエチレン製 (PET) ボトルの飲料 (ジュース、ビールおよびソフトドリンク) の炭酸ガスの低減と酸素の侵入を最小限にする (Nanotechnology 2008;

Duncan 2011)。クレイの低コスト化のために肉、チーズおよび穀物などの製品用の様々な食品包装用途用ナノクレイポリマー複合材料が開発された。これらナノクレイポリマー複合材料は、フルーツジュースおよび乳製品用の包装の押出コーティング用すなわち、炭酸飲料のボトル製造の共押し出し法に使用される (Hatzigrigoriou and Papaspyrides 2011)。

異なるナノ材料は、食品包装の改善のために、すなわちバリア性または機能的特性を向上のために、純粋なポリマーまたは複合ナノ材料に添加することができる。例えば、材料の剛性および強度の改善のために窒化チタンがある (Chaudhry and Castle 2011)。二酸化チタンナノ粒子は、材料の透明性を維持しながら UV 光をブロックするためにフィルムに添加することができる (Chaudhry and Castle 2011) また、アクリルナノ粒子は、ポリ乳酸フィルムを強化するために添加できると述べている (Robinson and Morrison 2010)。また、この2つのナノ材料は、上述した品質改善の目的で市販されている。二酸化ケイ素は、ナノ粒子の真空蒸着法でフィルム上に蒸着させ、炭酸飲料やスナック、菓子およびコーヒーの貯蔵期間を延長させるために使用される (Silvestre, Duraccio *et al.* 2011)。

活性包装材料とインテリジェント食品包装

: 活性物質および材料は、貯蔵期間の延長の維持または包装食品の状態を劣化させない目的で添加される。その作用は、包装食品または食品を取り巻く環境からの物質の吸収または放出させるためである。具体的には、欧州市場における活性包装の現状を以下に述べる。活性包装システムによる製品は、食べることが出来ないことを消費者に対して明確に識別出来るように表示・啓蒙しなくてはならない。そして新しい活性または高機能物質は、EFSA によって承認されなければならない。酸化亜鉛、銀、リン酸カルシウムまたは銀ゼオライトのナノ粒子を含むポリマー複合材料に抗菌剤を加えた商品は、販売されている (Robinson and Morrison 2009)。

金および二酸化チタンのナノ粒子から製造されたナノセンサーは、食品包装ラインで食品の状態の監視システムに利用できる。ヨーロッパの幾つかの開発初期段階のナノセンサーは、製品が受け入れられる可能性が高いか否かを検索するため市販されている (Robinson and Morrison 2010)。

抗菌作用および自浄作用を持つ台所用品：

幾つかの企業は、冷蔵庫、冷凍庫およびコーヒーマシンを製造している。これらの製品は、ナノサイズの銀および二酸化チタンを含み微生物の増殖を防止し、製品の衛生的な環境を維持するために、内面および表面にナノ材料が添加されている。同様に、ナノサイズの銀でコーティングされた抗菌台所用品（例えば刃物類、平鍋、まな板、食品容器 およびサラダボウル）は、実用化されている (Miller, Lowrey et al. 2008)。これらの製品は、デンマークの市場で確認されていない。しかし、これら製品は、容易にオンラインで購入することができる。

過去 10 年、多くのメーカーは、ナノサイズ銀を使用し、抗菌作用を持つ冷蔵庫、冷凍庫および洗濯機を販売してきたが、これらの製品の大半は、もはや市場から撤退した。2005 年に一つの大きな台所家電のメーカーは、抗菌製品の製品ラインを立ち上げたが、NGO の国民の反発と圧力によって一時的に市場から撤退した (El-Badawy, Feldhake et al. 2010)。

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、各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) の卵白アルブミン (OVA) との混合物の 1) 経皮曝露後、抗原である OVA を腹腔内投与、2) 経皮曝露後、OVA を強制経口内投与を行い、AgNP アジュバント活性の有無を調べる実験を実施した結果、本モデルにおいて、AgNP の投与による明らかなアジュバント活性は認められなかった。

OVA の経皮曝露後、OVA を腹腔内投与した動物において、Vehicle 群と比べ、明らかな OVA 特異的抗体産生増加、直腸内体温の低下、血中ヒスタミン濃度増加、アナフィラキシースコアリングの高値及び Ki67 陽性左腋窩リンパ節濾胞数の増加が認められ、本モデルは皮膚感作後、腹腔内惹起による影響を調べるモデルとして適していることが明らかとなった。しかし、OVA の経皮曝露後、OVA を強制経口投与した動物において、直腸内体温の軽度の低下がみられたが、血中ヒスタミン濃度及びアナフィラキシー症状のスコアリングの明らかな変化は認められなかった。以前報告された OVA の経皮曝露後、強制経口投与による惹起による直腸内体温の低下は本試験の結果とほぼ同じ程度であった (Muto T et al., Int. Immunol. 2014; 26

(539-549))。OVA の経皮曝露による OVA 特異的抗体の産生は十分であったことから、明らかな惹起を誘導するには、OVA の強制経口投与条件に更なる検討が必要であると考えられた。

皮膚感作性試験のアジュバント陽性対照を想定して用いた、Alum 及び CT ともに明らかなアジュバント効果を示さなかった。未だ皮膚感作試験における、優れたアジュバント陽性対照物質は知られていない。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る。また、CT は消化管の粘膜においては、アジュバント作用が示されており、経口ワクチンのアジュバントとして期待されているが (Holmgren J et al., Vaccine. 1993;11 (1179-1184))、皮膚感作性試験のアジュバント陽性対照物質として適用するためには更なる検討が必要である。

本モデルにおいては、貼付する OVA 抗原の濃度が高く被験物質のアジュバント活性が見えにくくなっている可能性があった。両試験の何れの OVA 処置群においても、血中の OVA 特異的な IgG1 及び IgE の産生量は極めて多いと考えられ、この状態では感作を促進する作用については感度が低くなる可能性がある。被験物質のアジュバント作用をより高感度に検出するため、OVA 抗原の濃度について検討を行う必要がある。

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皮膚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。このモデルを使った本研究の成果は、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。

また、腹腔内投与の試験においては、OVA の有無にかかわらず 10 nm AgNP を腹腔内投与した動物で前例が死亡又は瀕死に陥った。腸間膜の肉芽腫、腸間膜及び胸腺周囲リンパ節における褐色並びに黒色素の沈着は、AgNP のサイズに関わらず死亡例 (不十分なサンプリングによ

り肉芽腫は確認できなかった) 瀕死例及び計画解剖例で共通に認められたが、胸腺の細胞死、胸腺周囲リンパ節の濾胞細胞死増加、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は 10 nm AgNP 投与群の死亡例及び瀕死例でのみ認められ、60 nm 及び 100 nm AgNP 投与群では認められなかったことから、AgNP のサイズが死をもたらした要因の一つと考えられる。しかし、同等の大きさのナノ銀の静脈投与では毒性を誘発したとの報告がない (Lee Y et. al., *Nanotoxicity*. 2013;7 (1120-1130))。10 nm AgNP 投与群で腸間膜リンパ節、胸腺及び胸腺周囲リンパ節に著しい病変が認められたことから、AgNP はリンパ管循環を介して大きな影響を及ぼした可能性が考えられた。リンパ系を除いては肝臓の病変が最も重篤であったことから、AgNP による肝細胞障害が死亡原因と関連している可能性が考えられるが、詳細はまだ不明であり、機序について詳しく検討する必要がある。

AgNP の毒性は AgNP の大きさのみならず (Park MVDZ et. al., *Biomaterials*. 2011;32 (9810-9817)) 化学成分、電荷、コーティング、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ある。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 57.4、9.4、6.5 m²/g 及び 2.4E+14、9.1E+11、1.7E+11 particle/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。

臓器重量において、OVA + 60 nm AgNP 群で脾臓の絶対及び相対重量が Vehicle 群に比べ有意に増加した。病理組織学的に群間のあきらかな変化が見られないことから、偶発的な変化と考えられたが、更なる詳細な検討が必要と考えられた。

マウス血清中の OVA 特異的抗体について、血中 IgG1、IgE 及び IgG2a の値を検討した。IgG1 及び IgE は Th2 細胞が、IgG2a は Th1 細胞が産生することが知られている。また、Alum は Th2 細胞による液性免疫を促すアジュバントの

陽性対照物質としてよく用いられている。検討の結果、OVA 群に比べ、OVA + Alum 群では OVA 特異的 IgG1 及び IgE 抗体価について有意に上昇し、Alum のアジュバント効果が確認できたが、OVA + AgNP 群で有意な上昇は認められず、AgNP による明らかなアジュバント作用は示されなかった。OVA 特異的 IgG2a 抗体価については OVA 群に比べて OVA + AgNP 群で有意な上昇は認められ、下記の通り AgNP による IL-2 及び IFN- の明らかな変化はみられていないものの、AgNP が Th1 細胞による細胞性免疫に対して影響を及ぼした可能性がのこり、今後の検討が必要と考えられた。

抗原である OVA の再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2 及び IFN- の分泌を調べた。IL-4 及び IL-5 は Th2 細胞が、IL-2 及び IFN- は Th1 細胞が産生することが知られている。IL-4 全サンプルが検出限界以下であり、IL-5 においては群間に有意な変化は見られなかったことから、Th2 細胞に対する明らかな影響は証明されなかった。Alum のアジュバント効果は主に Th2 細胞に及ぼしていることが知られており、IgG1 の有意な増加も見られているため、測定の指摘条件の検討が求められる。

また、IL-2 については OVA 投与群で有意に増加しており、OVA による Th1 細胞への影響が示唆された。IFN- については、有意差はないものの OVA 群と比べ、OVA + Alum 群又は OVA + AgNP 群で増加傾向がみられ、Alum 及び AgNP の Th1 細胞に対する影響については今後の検討が必要と考えられた。

調査研究の結果、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、2012 年最初に導入したフランスをはじめとして、デンマーク、ベルギーでも登録制度が開始されていた。しかし、この登録制度は、化学物質の登録システムである REACH の対象物質に限定されており、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。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、既存物質を対象に EFSA が評価を行っている。食品包装中のナノマテリアルに関しても既存物質のいくつかは EFSA により評価されている。

以上のように、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。また、欧州では食品分野におけるナノテクノロジーの大型の開発研究プロジェクト (NanoPack, Good Food project (FP6), Natural Antimicrobials for Innovative Safe Packaging (FP7) 等) も実施されており、将来的なニーズは決して低くはないと思われる。

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とも考えられ、評価の方向性が定まれば、新規製品の申請へと急速に動き出すかも知れない。

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。有機・無機の顔料は、今のところ適用除外品である。文献調査による潜在的な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、重要な潜在的な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。それらの使用目的としては、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おり、現在は、ナノマテリアルの食品包装への適用は登録が必要ではあるが、使用が許可された場合には、その使用はゆっくりと増加していくと予想される。

E . 結論

我々が実施した、OVA+AgNP の経皮曝露後、OVA を腹腔内または強制経口投与する本モデルにおいては、AgNP の明らかなアジュバント活性は認められなかった。今後、皮膚感作性試験の陽性対照物質や貼付する OVA 抗原の濃度などさらなる検討が必要であると考えられた。また、OVA 及び様々なサイズのナノ銀を用いた抗原性試験の結果、腹腔内投与した 60 nm 及び 100 nm AgNP は BALB/c マウスに対して Th2 細胞を介した液性免疫の亢進は示さないが、Th1 細胞を介した細胞性免疫を亢進させる可能性が示唆された。一方、OVA の投与にかかわらず 10 nm AgNP 群において、全例死亡又は瀕死が認められたことから、AgNP のサイズによる毒性の現れ方に違いがある可能性が示され、機序について詳細な検討が必要であると考えられた。

また、ナノマテリアルの食品関連分野を中心とした曝露状況に関する国際動向を調査すること目的として、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、食品分野への適用実態を検討した。まず、ナノ関連に関する欧州の規制動向については、2011 年にナノマテリアルの定義が確定して以降、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、一般の化学物質の登録システムを中心としたもので、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。一方、新規食品規制においては、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るものの、既存の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る。現時点では新規のナノマテリアルとしての登録は認められていない。しかし、研究開発に関する文献調査等の結果からは、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が示された。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、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る。これらの物質の評価手法がある程度定まれば、新規のナノマテリアルの適用も増加していくものと考えられた。

F. 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)

(学会発表)

Norihiro Kobayashi, Reiji Kubota, Ryota Tanaka, Hiroshi Takehara, Masato Naya, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: 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 San Diego, CA, USA).

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
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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

**厚生労働科学研究費補助金(食の安全確保推進研究事業)
分担研究報告書(平成26年度)**

経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について

研究分担者： 曹 永晩 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部)
研究分担者： 西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)
研究代表者： 小川 久美子 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部)
研究協力者： 最上 知子 (国立医薬品食品衛生研究所 生化学部)
研究協力者： 安達 玲子 (国立医薬品食品衛生研究所 生化学部)

研究要旨：

ナノ銀 (AgNP) の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び 90 日間反復投与毒性試験等において、肝臓や腎臓に軽度の変化が示されているものの、十分な評価は行われていない。AgNP のサイズによる毒性の違いに関連する情報はさらに少ない。また、免疫毒性についての報告は限られている。一方、AgNP は、食品・食品容器包装用途として経口曝露されるのみならず、消臭・殺菌剤として化粧品にも含まれており、皮膚からも曝露される。AgNP の経皮経口複合曝露による、免疫毒性の有無について検討する評価方法を確立するため、各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) の卵白アルブミン (OVA) との混合物の 1) 経皮曝露後、抗原である OVA を腹腔内投与、2) 経皮曝露後、OVA を強制経口内投与を行い、AgNP アジュバント活性の有無を調べる実験を実施した。また、各々 Alum 及びコレラトキシン (CT) をアジュバントの陽性候補物質として用いた。実験 1) 及び 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、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) 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 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。以上の結果から、OVA+AgNP の経皮曝露後、OVA を腹腔内または強制経口投与する本モデルにおいて、AgNP の明らかなアジュバント活性は認められなかった。今後、皮膚感作性試験の陽性対照物質や貼付する OVA 抗原の濃度などさらなる検討が必要であると考えられた。

キーワード：ナノ銀、経皮感作性、アジュバント効果、マウスモデル

A. 研究目的

ナノ銀 (AgNP) の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び 90 日間反復投与毒性試験等において、肝臓や腎臓に軽度の変化が示されているものの、十分な評価は行われていない (Bergin IL et. al., Int J Biomed Nanosci Nanotechnol. 2013;3. doi:

10.1504/IJBNN.2013.054515.)。また、免疫毒性についての報告は限られている (Shin S-Het al., Clinical and Experimental Otorhinolaryngology. 2012;4 (222-227))。AgNP のサイズによる毒性の違いについて、細胞を用いた検討では可能性が指摘されているが (Park MVDZ et. al., Biomaterials. 2011;32

(9810-9817))、動物を用いた検討での報告はない。

一方、AgNP は、食品・食品容器包装用途として経口曝露されるのみならず、消臭・殺菌剤として化粧品にも含まれており、皮膚からも曝露される。金属はアレルギーの原因となりうるが、一般に、銀やチタンのアレルギーとしての性質は低いとされている。しかし、経口曝露では免疫寛容が成立する物質でも、ナノマテリアルとして経皮的に繰り返し曝露された後に、経口曝露されることにより、アレルギー反応が惹起される可能性や、他のアレルギー曝露に対してアジュバント効果を示す可能性の検討は十分ではない。

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

本研究では、AgNP の経皮経口複合曝露による、免疫毒性の有無について検討する評価方法を確立するため、各サイズの AgNP（直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm）の卵白アルブミン（OVA）との混合物の 1）経皮曝露後、抗原である OVA を腹腔内投与、2）経皮曝露後、OVA を強制経口投与し、AgNP アジュバント活性の有無を調べる実験を実施した。

B . 研究方法

実験 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 µL /マウスとなるよう 2 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.4-7.6) に加えて投与する前に調製した。

動物は、7週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料を給餌した。1群の匹数は5匹とし、各群は以下の通りに構成した、Vehicle 群、OVA 群、OVA + Alum 群、OVA + 10 nm AgNP、OVA + 60 nm AgNP、OVA + 100 nm AgNP (Figure 1)。8週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より3日間被験物質懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原懸濁液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 µL の抗原懸濁液を浸潤させ剃毛部に貼付した。パッチの上からサージカルテープを巻いてパッチを保護し、さらにマウスの首にエリザベスカラーを装着してパッチの剥脱を防いだ。3日間の感作後にパッチを外し (Day 4)、その後4日間休ませるという操作を1クールとし、4クールの感作後、血中の OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体を ELISA 法で測定した。アレルギー反応の惹起は Day 25 に、感作抗原 1 mg を腹腔内投与して行った。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-B10) にて測定した。解剖時に採取した脾臓細胞は再懸濁後、OVA (最終濃度 10 µg/ml) を添加、37°C 24 時間、又は 72 時間培養し、培地中のサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2 及び IFN- 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 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 µg) に変更して実施した (Figure 2)。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 と同様に実施した。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エクセル統計 2012 for Windows ソフトウェアを用いて、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett 法により有意差検定を行った。不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Steel 法により多重検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。なお、図中には * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ で有意差の程度を記した。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者による腹腔内並びに強制経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

C . 研究結果

実験 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 3)。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 4)。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 5)。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 5)。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 5)。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 6)。

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、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 7, Table 1)。

実験 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 8)。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 9)。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 (Figure 10)。

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 11)。

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、貼付部位近傍の左腋窩リ

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 12, Table 2)。

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、各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) の卵白アルブミン (OVA) との混合物の 1) 経皮曝露後、抗原である OVA を腹腔内投与、2) 経皮曝露後、OVA を強制経口内投与を行い、AgNP アジュバント活性の有無を調べる実験を実施した結果、本モデルにおいて、AgNP の投与による明らかなアジュバント活性は認められなかった。

OVA の経皮曝露後、OVA を腹腔内投与した動物において、Vehicle 群と比べ、明らかな OVA 特異的抗体産生増加、直腸内体温の低下、血中ヒスタミン濃度増加、アナフィラキシースコアリングの高値及び Ki67 陽性左腋窩リンパ節濾胞数の増加が認められ、本モデルは皮膚感作後、腹腔内惹起による影響を調べるモデルとして適していることが明らかとなった。しかし、OVA の経皮曝露後、OVA を強制経口投与した動物において、直腸内体温の軽度の低下がみられたが、血中ヒスタミン濃度及びアナフィラキシー症状のスコアリングの明らかな変化は認められなかった。以前報告された OVA の経皮曝露後、強制経口投与による惹起による直腸内体温の低下は本試験の結果とほぼ同じ程度であった (Muto T et al., *Int. Immunol.* 2014; 26 (539-549))。OVA の経皮曝露による OVA 特異的抗体の産生は十分であったことから、明らかな惹起を誘導するには、OVA の強制経口投与条件に更なる検討が必要であると考えられた。

皮膚感作性試験のアジュバント陽性対照を想定して用いた、Alum 及び CT とともに明らかなアジュバント効果を示さなかった。未だ皮膚感作試験における、優れたアジュバント陽性対照物質は知られていない。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る。また、CT は消化管の粘膜においては、アジュバント作用が示されており、経口ワクチンのアジュバントとして期待されているが (Holmgren J et al., *Vaccine.* 1993; 11 (1179-1184)) 皮膚感作性試験のアジュバント陽性対照物質として適用するためには更なる検討が必要である。

本モデルにおいては、貼付する OVA 抗原の濃

度が高く被験物質のアジュバント活性が見えにくくなっている可能性があった。両試験の何れの OVA 処置群においても、血中の OVA 特異的な IgG1 及び IgE の産生量は極めて多いと考えられ、この状態では感作を促進する作用については感度が低くなる可能性がある。被験物質のアジュバント作用をより高感度に検出するため、OVA 抗原の濃度について検討を行う必要がある。

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皮膚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。このモデルを使った本研究の成果は、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。

E. 結論

我々が実施した、OVA+AgNP の経皮曝露後、OVA を腹腔内または強制経口投与する本モデルにおいて、AgNP の明らかなアジュバント活性は認められなかった。今後、皮膚感作性試験の陽性対照物質や貼付する OVA 抗原の濃度などさらなる検討が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

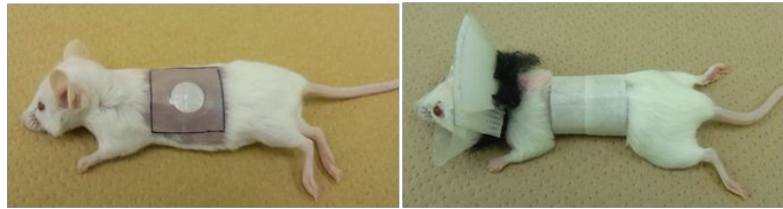
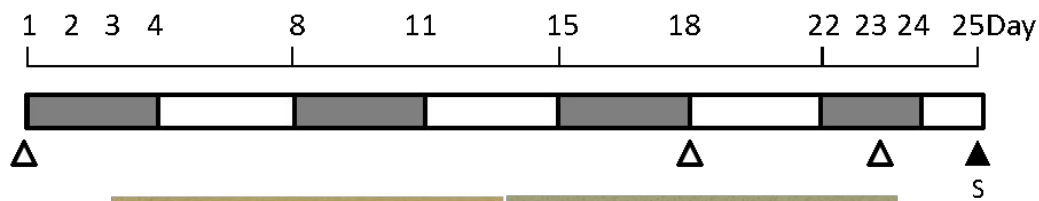
なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)
なし

H. 知的所有権の取得状況

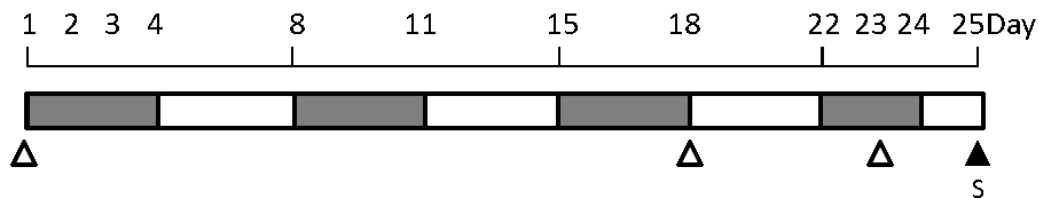
1. 特許所得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



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)



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 2)

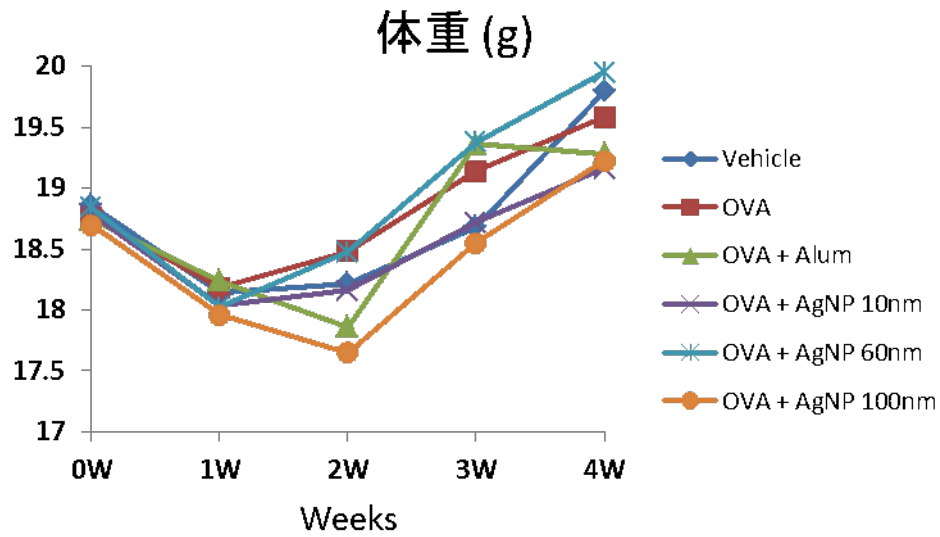


Figure 3. 体重 (実験 1)

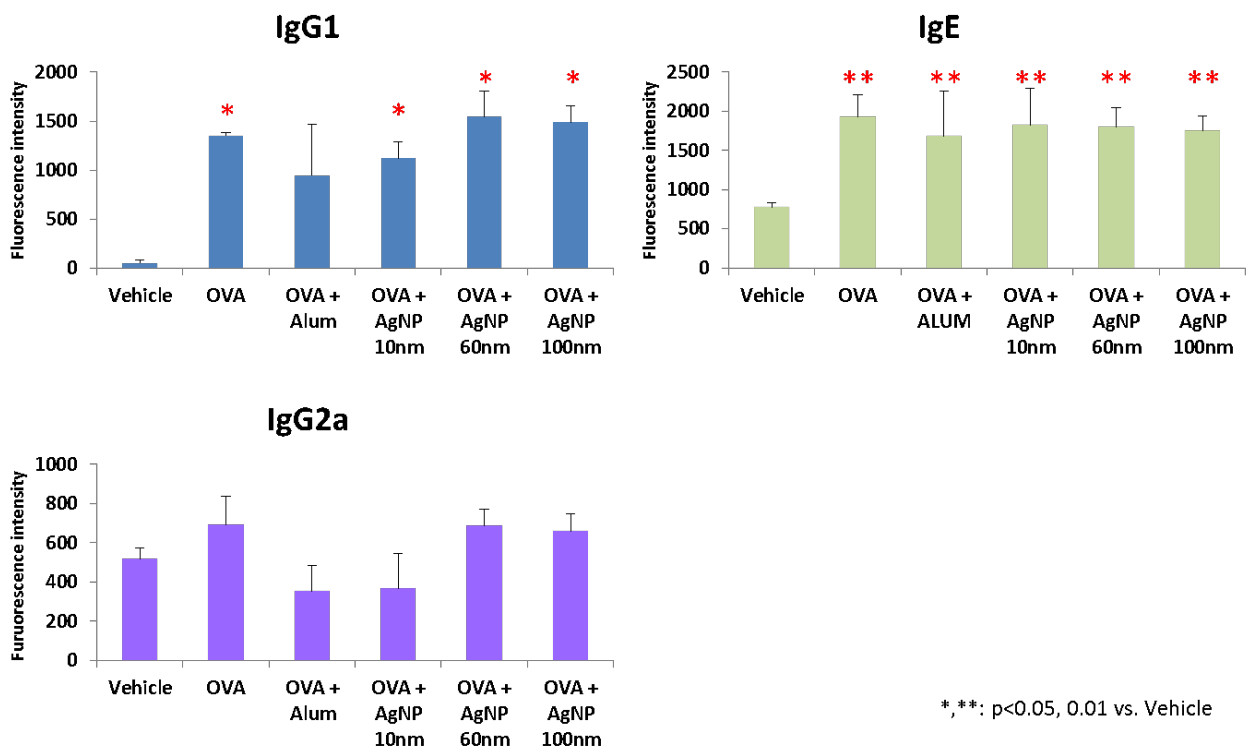
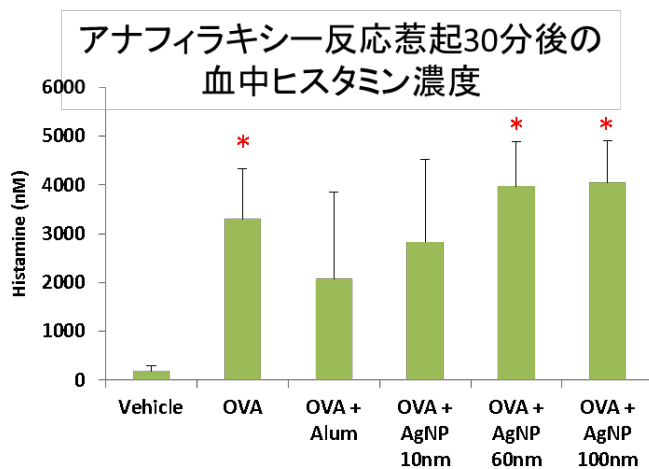
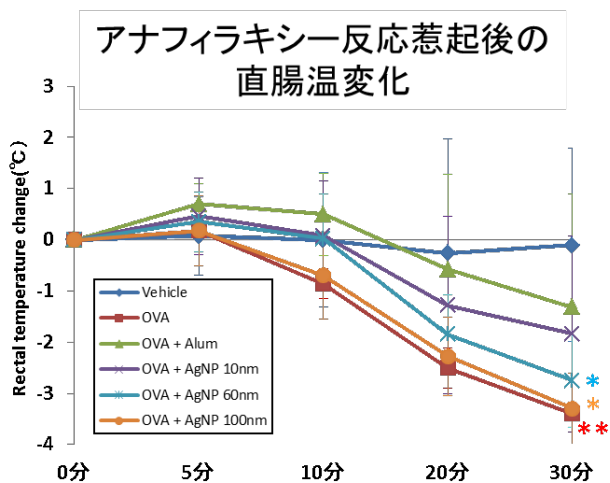


Figure 4. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 1)



アナフィラキシー症状のスコアリング

Score 0 症状なし

1 口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ肢で耳の穴を掻く

2 活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛

3 1分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣

4 ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣

5 死亡

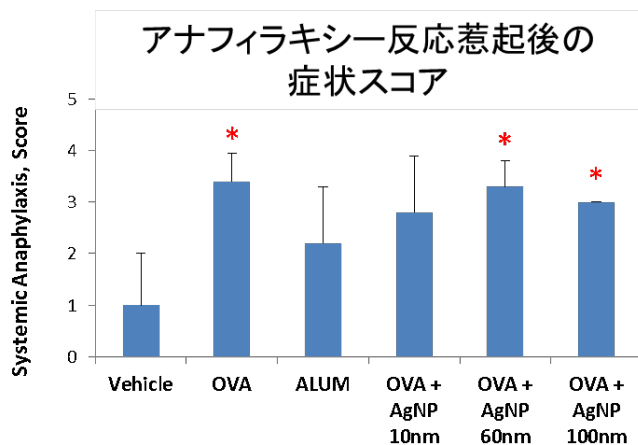


Figure 5. アナフィラキシー反応惹起後の応答(実験 1) * , ** : p<0.05, 0.01 vs. Vehicle

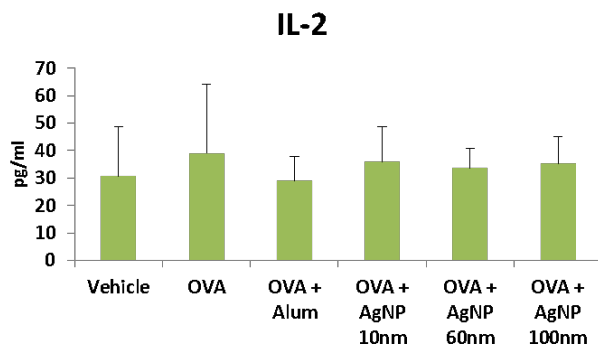
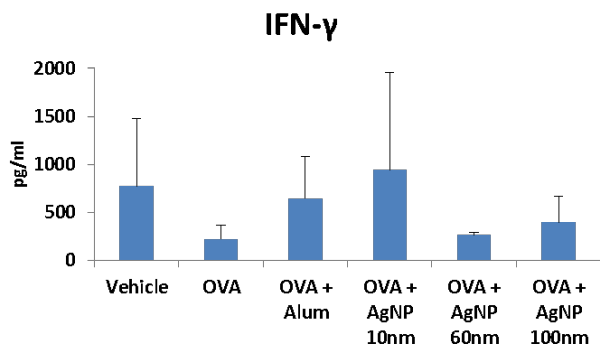
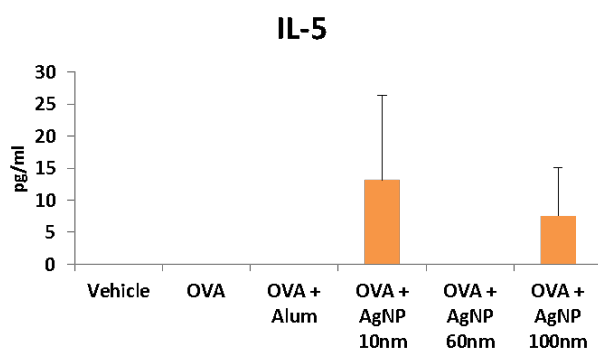
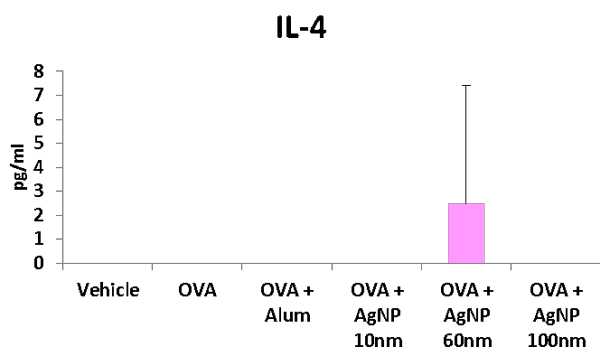


Figure 6. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌(実験1)

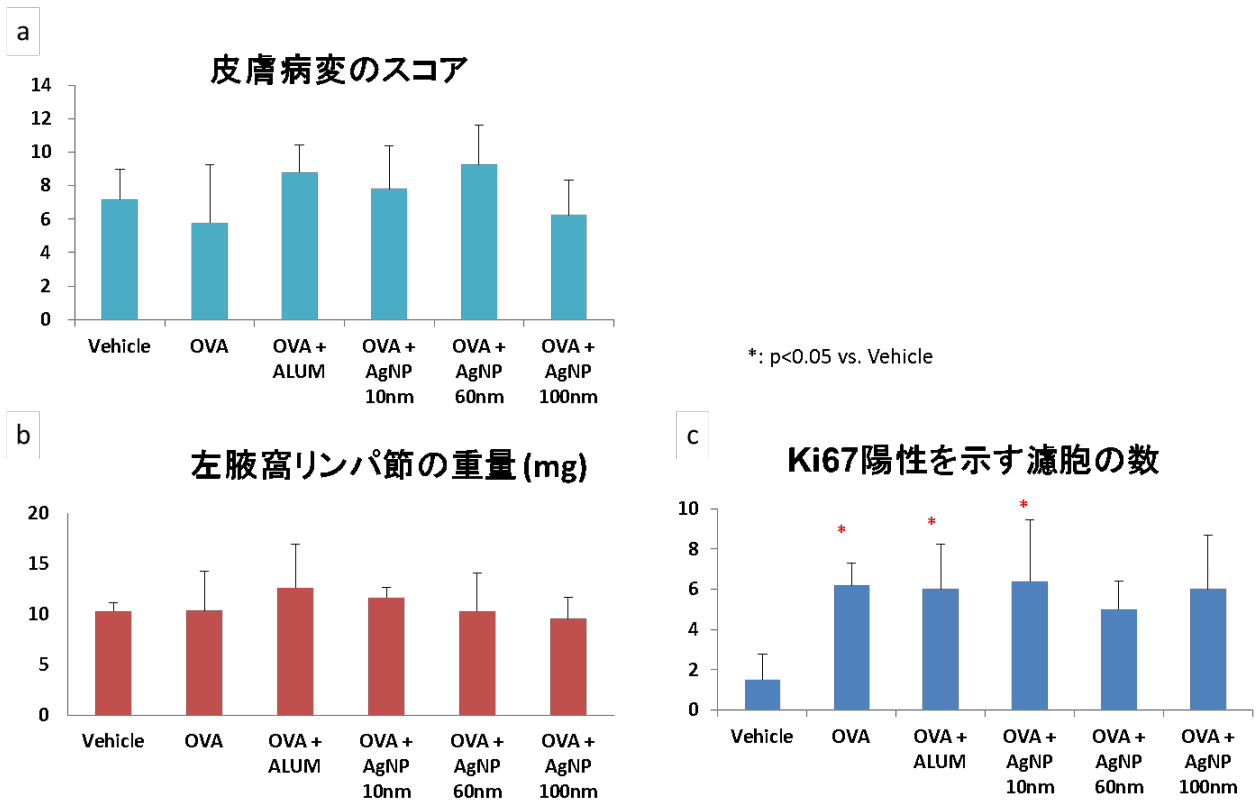


Figure 7. 皮膚病変のスコア(a)、左腋窩リンパ節の重量(b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(c)(実験1)

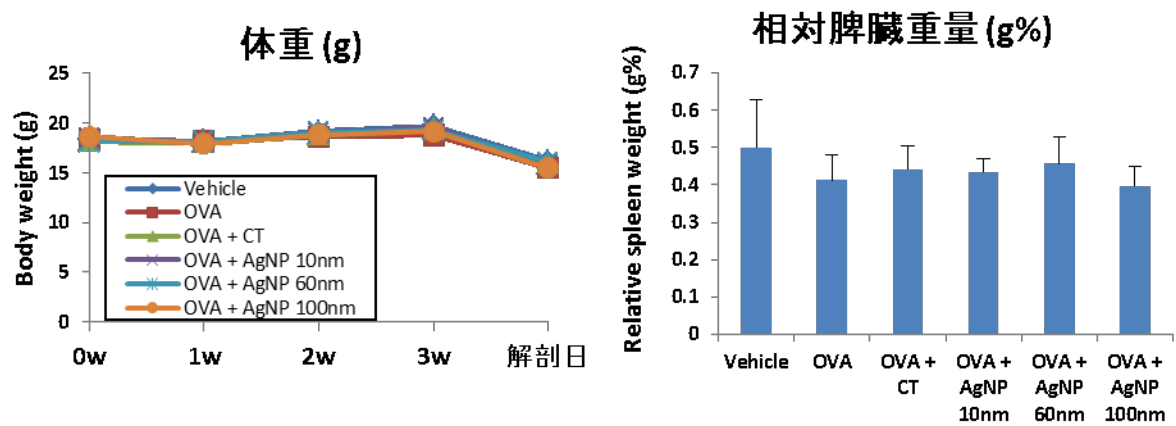


Figure 8. 体重(a)及び相対脾臓重量(b)(実験2)

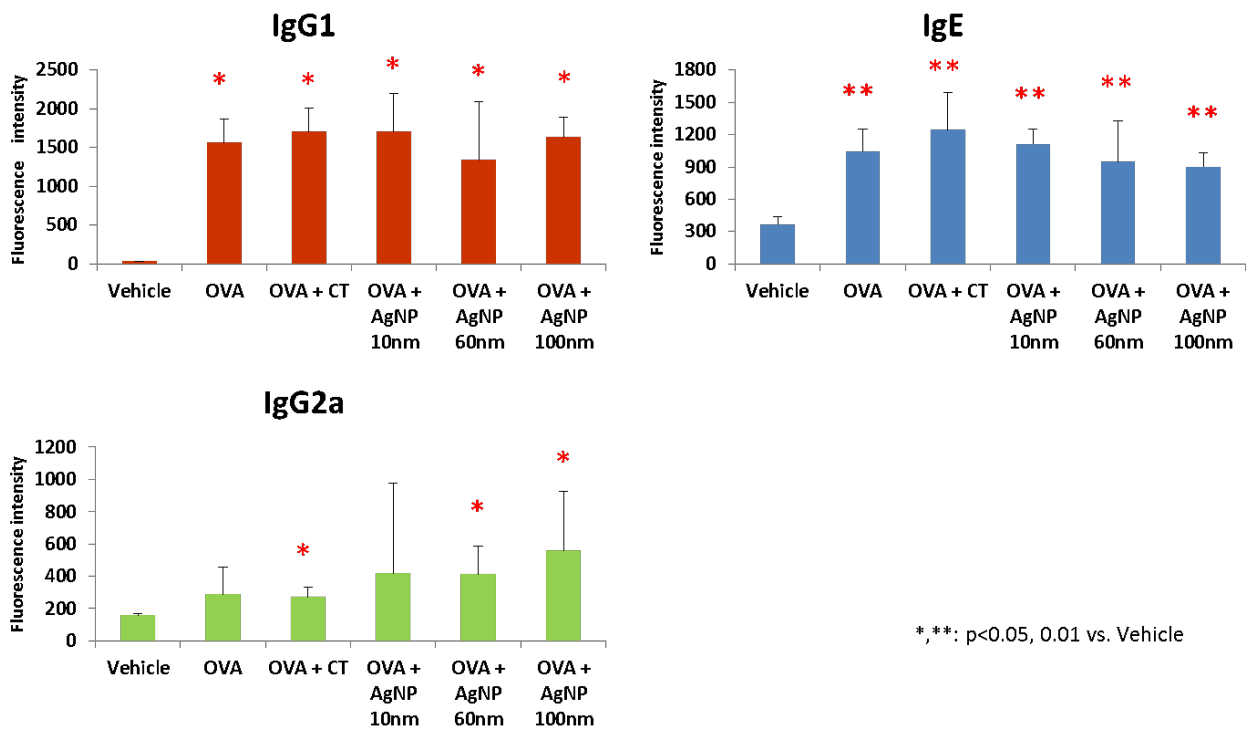


Figure 9. 血清中のOVA特異的抗体産生(実験 2)

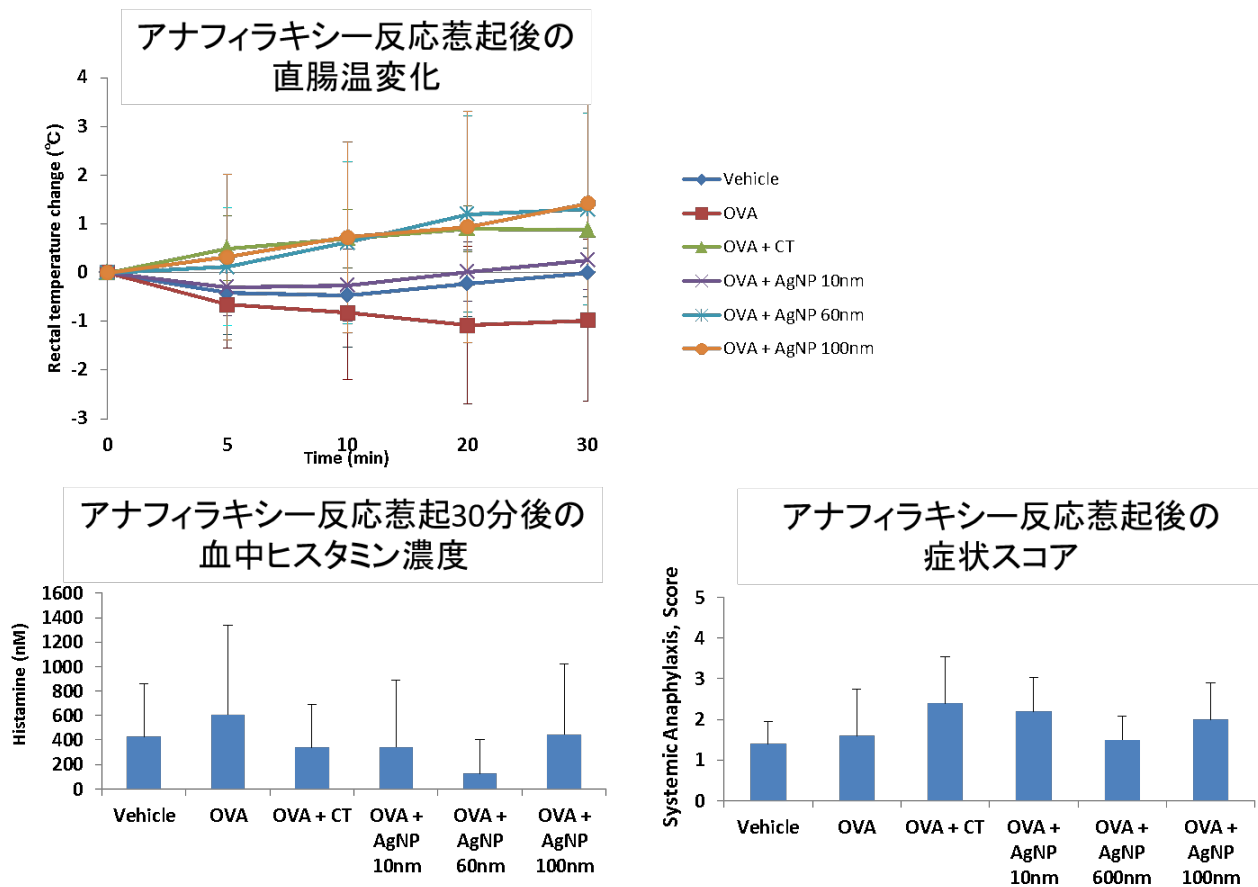


Figure 10. アナフィラキシー反応惹起後の応答(実験 2)

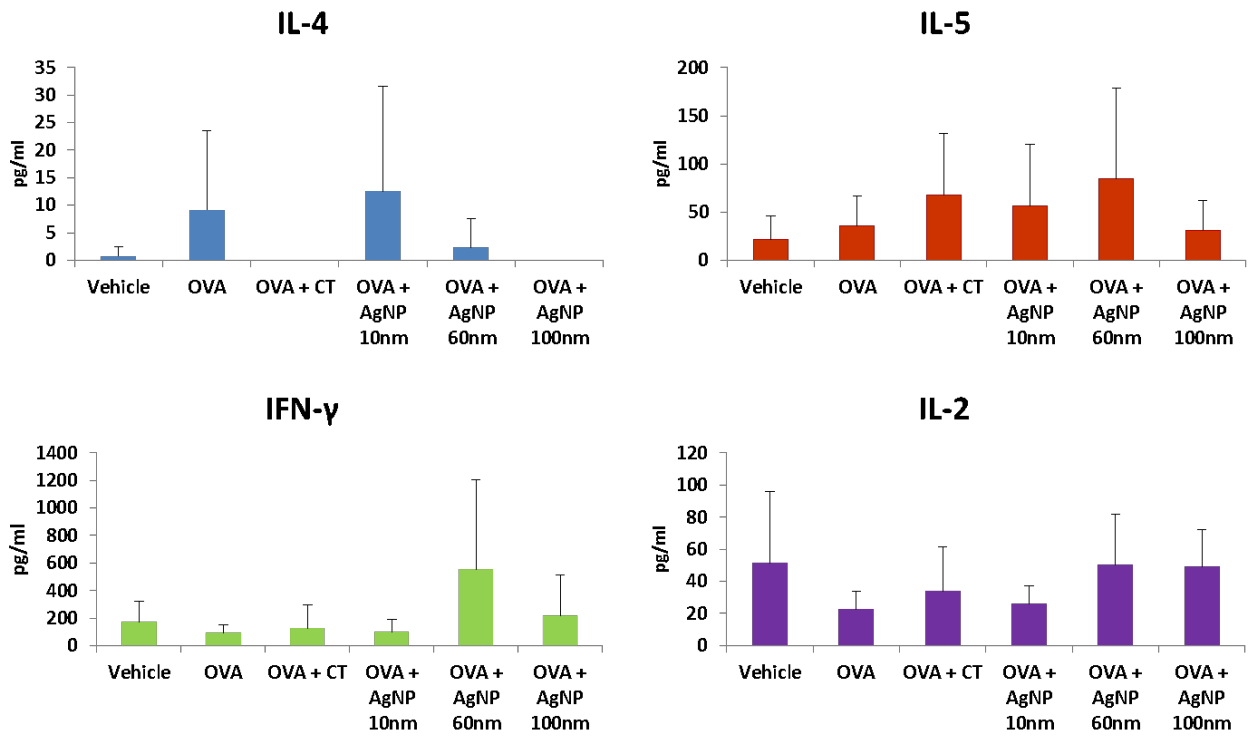


Figure 11. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 2)

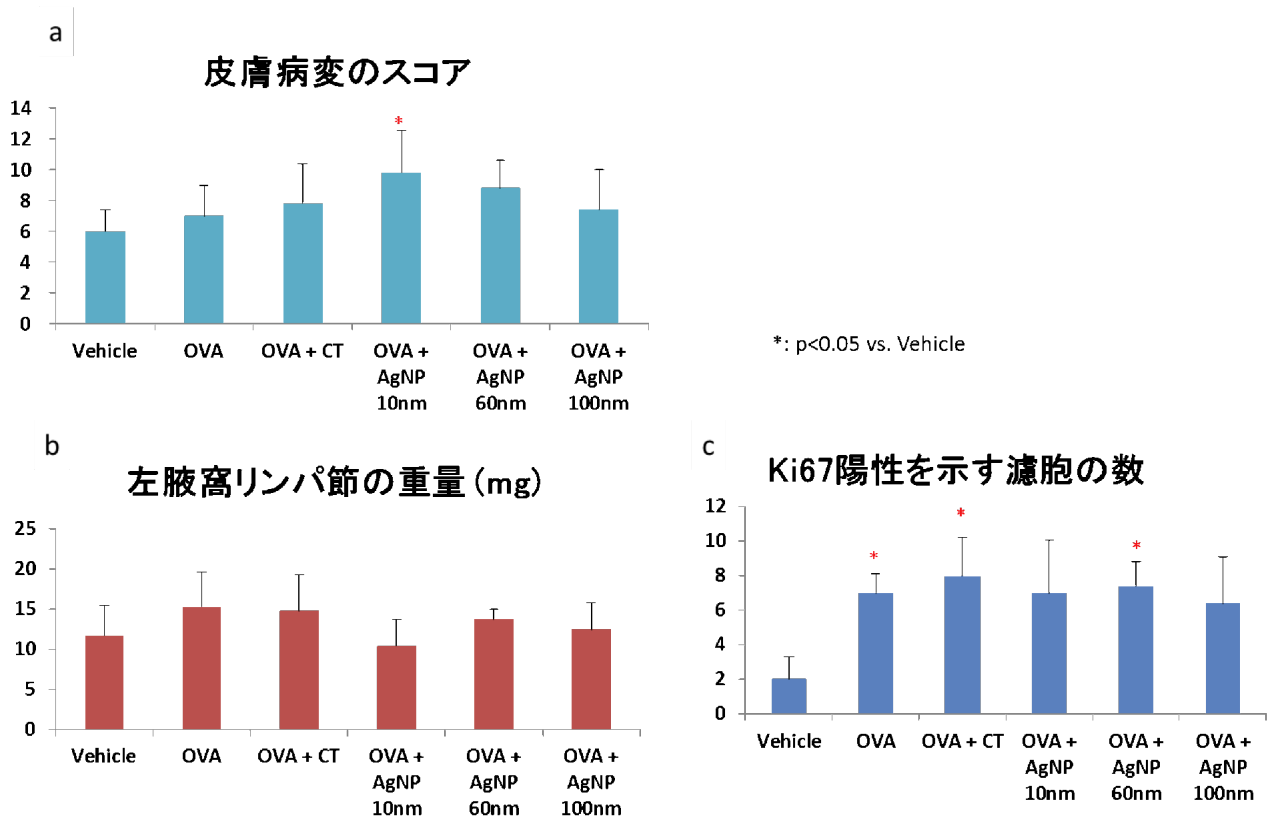


Figure 12. 皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(c) (実験 2)

Table 1. 病理組織学的所見 (試験 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 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

**厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書（平成26年度）**

抗原性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について

研究代表者： 小川 久美子 （国立医薬品食品衛生研究所 病理部）
研究分担者： 西川 秋佳 （国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）
研究分担者： 曹 永晩 （国立医薬品食品衛生研究所 病理部）
研究協力者： 最上 知子 （国立医薬品食品衛生研究所 生化学部）
研究協力者： 安達 玲子 （国立医薬品食品衛生研究所 生化学部）

研究要旨：

ナノ銀（AgNP）の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び90日間反復投与毒性試験等において、肝臓や腎臓に軽度の変化が示されているものの、十分な評価は行われていない。AgNPのサイズによる毒性の違いに関連する情報はさらに少ない。また、免疫毒性についての報告は限られている。本研究では、雌性BALB/c系マウスを用いて、様々なサイズのAgNPのアジュバント効果について、卵白アルブミン（OVA）及び既知のアジュバントであるAlum又は各サイズのAgNP（直径10nm、60nm及び100nm）を腹腔内に混合投与して検討した。OVAの有無にかかわらず10nm 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。60nm及び100nm 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+60nm 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再暴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。今回の検討においては、10nm AgNPを腹腔内投与した全動物で死亡及び瀕死例が認められた。特定の大きさの被験物質でのみ見られた現象であり、類似した大きさのナノ銀の静脈投与によっては毒性の報告がないことから、機序について詳細に検討する必要があると考えられた。また、60nm及び100nm AgNPについては、IgG2a増加を示すことから、細胞免疫への影響の可能性が示唆された。

キーワード：ナノ銀、抗原性、アジュバント効果、マウスモデル

A. 研究目的

ナノ銀（AgNP）の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び90日間反復投与毒性試験等において、肝臓や腎臓に軽度の変化が示されているものの、十分な評価は行われていない（Bergin IL et. al., Int J Biomed Nanosci Nanotechnol. 2013;3. doi: 10.1504/IJBNN.2013.054515.）。また、免疫毒性についての報告は限られている（Shin S-H et al., Clinical and Experimental

Otorhinolaryngology. 2012;4 (222-227)）。AgNPのサイズによる毒性の違いについて、細胞を用いた検討では可能性が指摘されているが（Park MVDZ et. al., Biomaterials. 2011;32 (9810-9817)）。動物を用いた検討での報告はない。

一方、AgNPは、食品・食品容器包装用途として経口曝露されるのみならず、消臭・殺菌剤として化粧品にも含まれており、皮膚からも曝露される。金属はアレルギーの原因となりうるが、

一般に、銀やチタンのアレルゲンとしての性質は低いとされている。しかし、経口曝露では免疫寛容が成立する物質でも、ナノマテリアルとして経皮的に繰り返し曝露された後に、経口曝露されることにより、アレルギー反応が惹起される可能性や、他のアレルゲン曝露に対してアジュバント効果を示す可能性の検討は十分ではない。

本研究では、AgNPの経皮経口複合曝露による、免疫毒性の有無について検討する評価方法の確立に先立ち、様々なサイズのAgNPの抗原性におけるアジュバント効果について、卵白アルブミン(OVA)及び既知のアジュバントであるAlum又は各サイズのAgNP(AgNP、直径10 nm、60 nm及び100 nm)を混合して腹腔内投与した雌性BALB/c系マウスを用いて、検討を行った。

B. 研究方法

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0.02、2及び0.2 mg/300 µl/マウスとなるよう2 mM クエン酸緩衝液(pH 7.4-7.6)に加えて投与する前に調製した。

動物は、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、溶媒対照群(Vehicle)群、OVA群、OVA + Alum群、OVA + 10 nm AgNP、OVA + 60 nm AgNP、OVA + 100 nm AgNP、10 nm AgNP、60 nm AgNP、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 µl/マウス)し、Day 15に解剖した(Figure 1)。

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 µg/ml)を添加、37°C 24時間、又は72時間培養し、培地中のサイトカインIL-4、IL-5、IL-2及びIFN- γ の濃度を、BD OptEIA ELISA Setsを用いて測定した。

統計解析

データはMicrosoft Excelにより集計し、エクセル統計2012 for Windowsソフトウェアを用いて、各群の分散比をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett法により有意差検定を行った。不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により検定を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Steel法により多重検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。なお、図中には* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ で有意差の程度を記した。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者による腹腔内投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

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 2)。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 1)。

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 3a)。病理組織学的解析を行ったところ (Table 2)、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 (Figure 4a)、胸腺の細胞死 (Figure 4b)、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 (Figure 4c)、腸間膜リンパ節の出血及び細胞死 (Figure 4d)、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、変性及び細胞死 (Figure 4e) 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 (Figure 4f) が認められた。

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 (Figure 3b)。病理組織学的には (Table 2)、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の数には 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 (Figure 5a)。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 (Figure 5a)。OVA + Alum 群で認められる炎症細胞集簇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 5b)。

Figure 6 に 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を示す。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。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 7 に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についての検討結果を示す。IL-4 はすべてのデータが検出限界以下だった。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。

D . 考察

雌性 BALB/c 系マウスを用いて、OVA 及び Alum 又は様々なサイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) を腹腔内に混合投与し、ナノ銀のアジュバント効果について OVA 特異的抗体価及び脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を主体に検討を行った。

OVA の有無にかかわらず 10 nm AgNP を腹腔内投与した動物で前例が死亡又は瀕死に陥った。腸間膜の肉芽腫、腸間膜及び胸腺周囲リンパ節における褐色並びに黒色素の沈着は、AgNP のサイズに関わらず死亡例 (不十分なサンプリングにより肉芽腫は確認できなかった) 瀕死例及び計画解剖例で共通に認められたが、胸腺の細胞死、胸腺周囲リンパ節の濾胞細胞死増加、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は 10 nm AgNP 投与群の死亡例及び瀕死例でのみ認められ、60 nm 及び 100 nm AgNP 投与群では認められなかったことから、AgNP のサイズが死をもたらした要因の一つと考えられる。しかし、同等の大きさのナノ銀の静脈投与では毒性を誘発したとの報告がない (Lee Y et. al., Nanotoxicity. 2013;7 (1120-1130))。10 nm AgNP 投与群で腸間膜リンパ節、胸腺及び胸腺周囲リンパ節に著しい病変が認められたことから、AgNP はリンパ管循環を介して大きな影響を及ぼした可能性が考えられた。リンパ系を除いては肝臓の病変が最も重篤であったことから、AgNP による肝細胞障害が死亡原因と関連している可能性が考えられるが、詳細はまだ不明であり、機序について詳しく検討する必要がある。

AgNP の毒性は AgNP の大きさのみならず

(Park MVDZ et. al., Biomaterials. 2011;32 (9810-9817))、化学成分、電荷、コーティング、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ある。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 57.4、9.4、6.5 m²/g 及び 2.4E+14、9.1E+11、1.7E+11 particle/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。

臓器重量において、OVA + 60 nm AgNP 群で脾臓の絶対及び相対重量が Vehicle 群に比べ有意に増加した。病理組織学的に群間のあきらかな変化が見られないことから、偶発的な変化と考えられたが、更なる詳細な検討が必要と考えられた。

マウス血清中の OVA 特異的抗体について、血中 IgG1、IgE 及び IgG2a の値を検討した。IgG1 及び IgE は Th2 細胞が、IgG2a は Th1 細胞が産生することが知られている。また、Alum は Th2 細胞による液性免疫を促すアジュバントの陽性対照物質としてよく用いられている。検討の結果、OVA 群に比べ、OVA + Alum 群では OVA 特異的 IgG1 及び IgE 抗体価について有意に上昇し、Alum のアジュバント効果が確認できたが、OVA + AgNP 群で有意な上昇は認められず、AgNP による明らかなアジュバント作用は示されなかった。OVA 特異的 IgG2a 抗体価については OVA 群に比べて OVA + AgNP 群で有意な上昇は認められ、下記の通り AgNP による IL-2 及び IFN- γ の明らかな変化はみられてないものの、AgNP が Th1 細胞による細胞性免疫に対して影響を及ぼした可能性がのこり、今後の検討が必要と考えられた。

抗原である OVA の再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2 及び IFN- γ の分泌を調べた。IL-4 及び IL-5 は Th2 細胞が、IL-2 及び IFN- γ は Th1 細胞が産生することが知られている。IL-4 全サンプルが検出限界以下であり、IL-5 においては群間に有意な変化は見られなかったことから、Th2 細胞

に対する明らかな影響は証明されなかった。Alum のアジュバント効果は主に Th2 細胞に及ぼしていることが知られており、IgG1 の有意な増加も見られているため、測定の指摘条件の検討が求められる。

また、IL-2 については OVA 投与群で有意に増加しており、OVA による Th1 細胞への影響が示唆された。IFN- γ については、有意差はないものの OVA 群と比べ、OVA + Alum 群又は OVA + AgNP 群で増加傾向がみられ、Alum 及び AgNP の Th1 細胞に対する影響については今後の検討が必要と考えられた。

E. 結論

我々が実施した、OVA 及び様々なサイズのナノ銀を用いた抗原性試験の結果、腹腔内投与した 60 nm 及び 100 nm AgNP は BALB/c マウスに対して Th2 細胞を介した液性免疫の亢進は示さないが、Th1 細胞を介した細胞性免疫を亢進させる可能性が示唆された。一方、OVA の投与にかかわらず 10 nm AgNP 群において、全例死亡又は瀕死が認められたことから、AgNP のサイズによる毒性の現れ方に違いがある可能性が示され、機序について詳細な検討が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

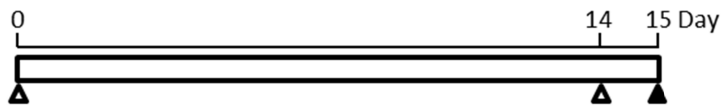
2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)
なし

H. 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



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 1. 実験デザイン

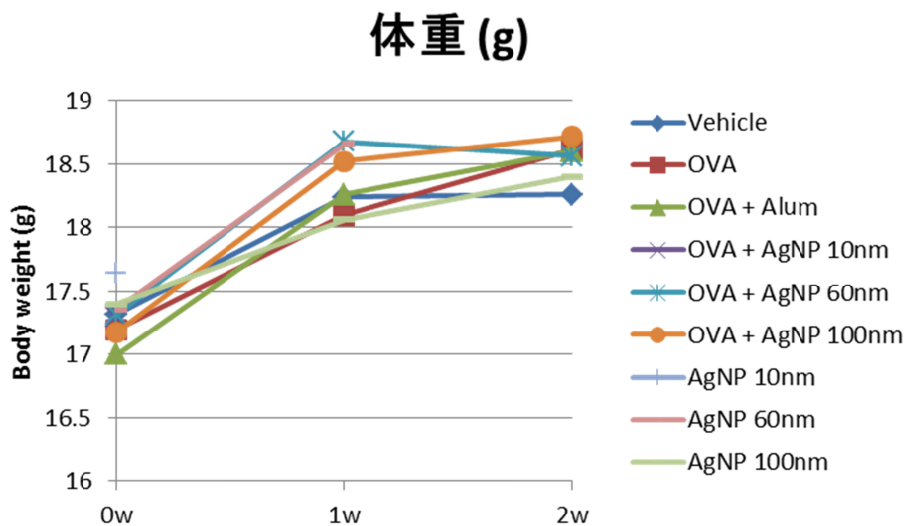


Figure 2. 体重

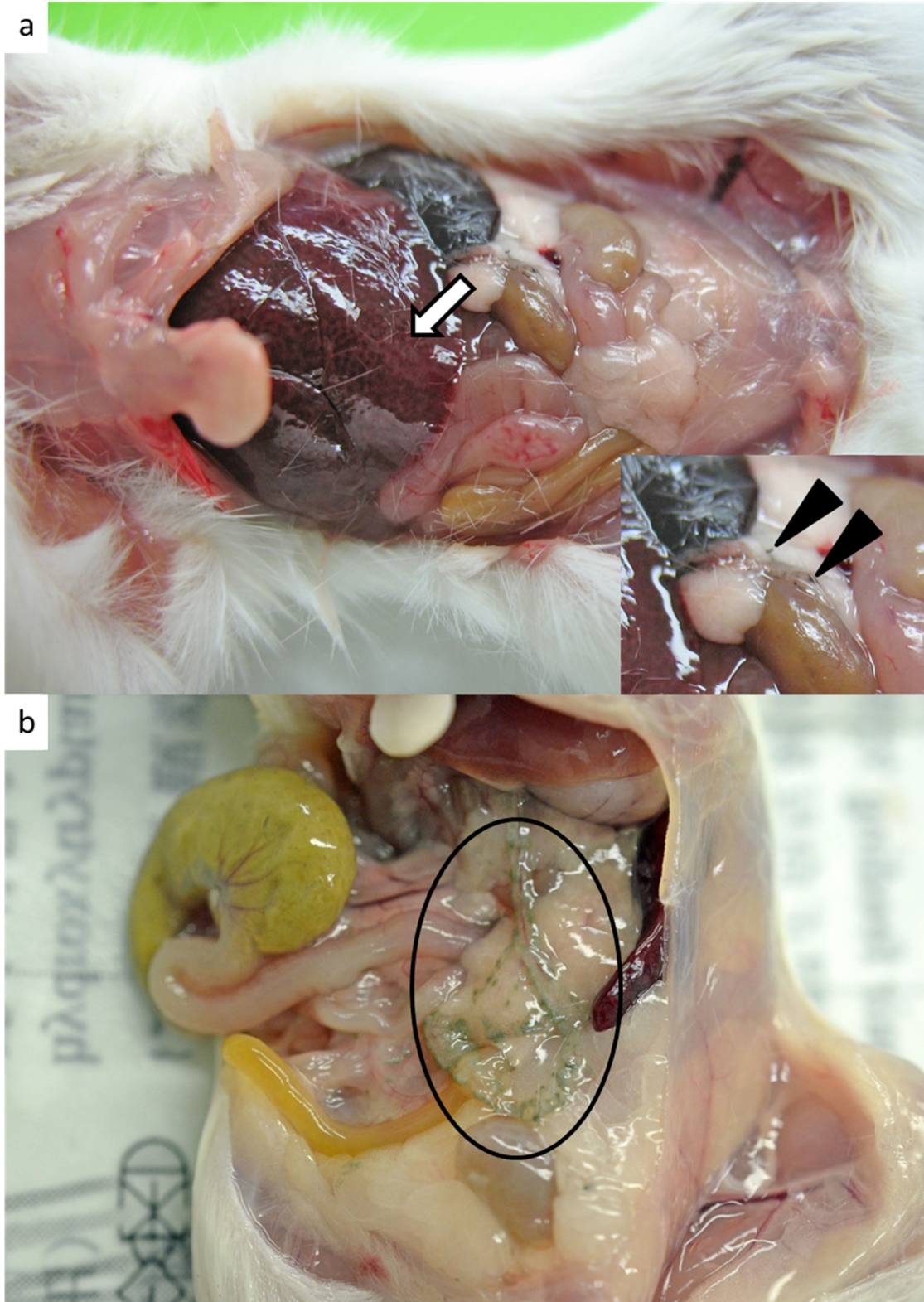


Figure 3. OVA + AgNP 10 nm群(a, 死亡例) 及びOVA + AgNP 100 nm群 (b, 計画解剖例)の肉眼写真。死亡例の肝臓の斑な暗赤色変色(矢印) 及びいずれの群も腹腔内黒色粒子状物質の散在(矢頭又は円内)が認められる。

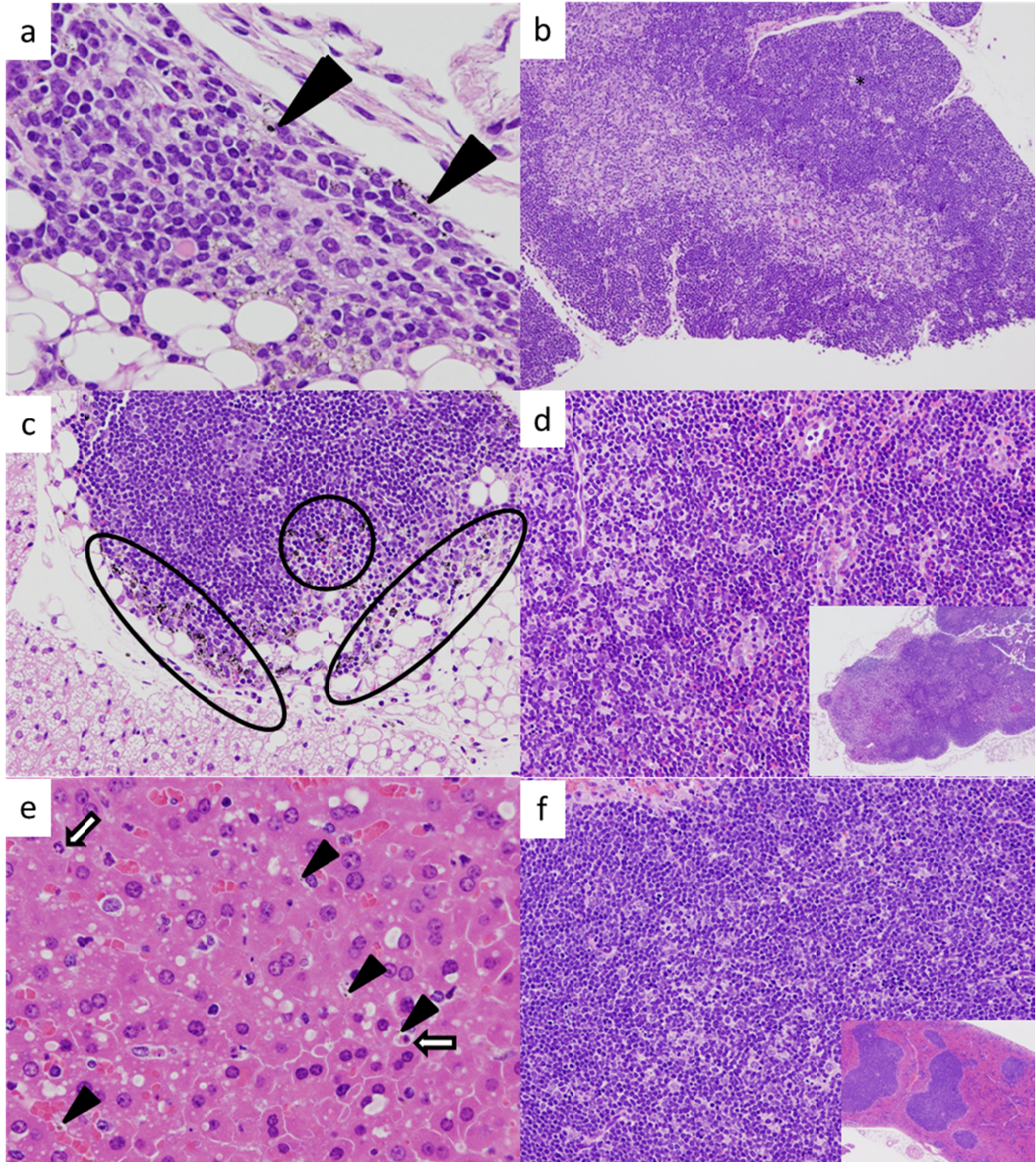


Figure 4. OVA + AgNP 10 nm群 (a, 瀕死死亡例) の病理組織写真。(a) 腸間膜の肉芽腫、褐色並びに黒色色素の沈着(矢頭)、(b)胸腺の細胞死、(c)胸腺周囲リンパ節の褐色並びに黒色色素の沈着(円内)、濾胞細胞死増加、(d)腸間膜リンパ節の出血及び細胞死、(e)肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及びクッパー細胞の暗褐色色素沈着(矢頭)、肝細胞の変性及び細胞死(矢印)、(f)脾臓のうっ血及び白脾髄における細胞死が認められた。

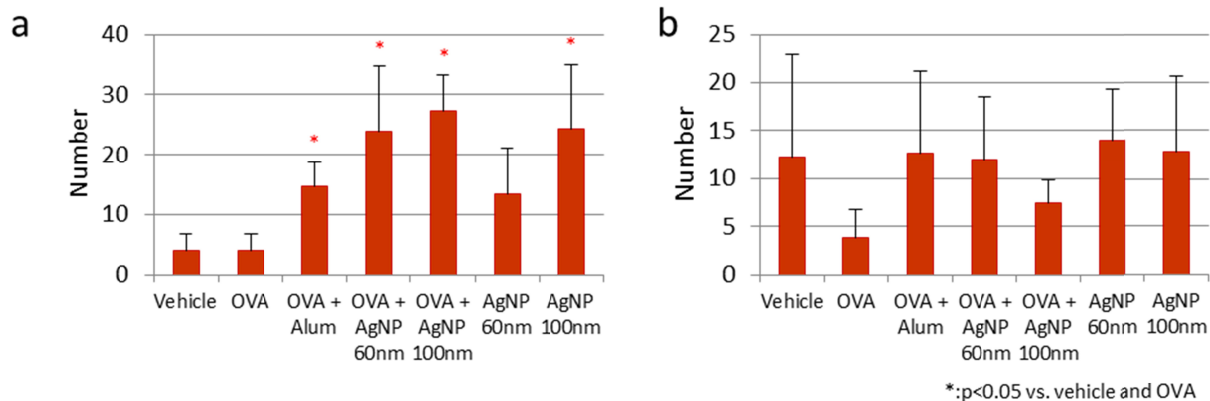


Figure 5. 腸間膜で認められた炎症細胞集簇の数(a)及び腸間膜リンパ節における細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(b)

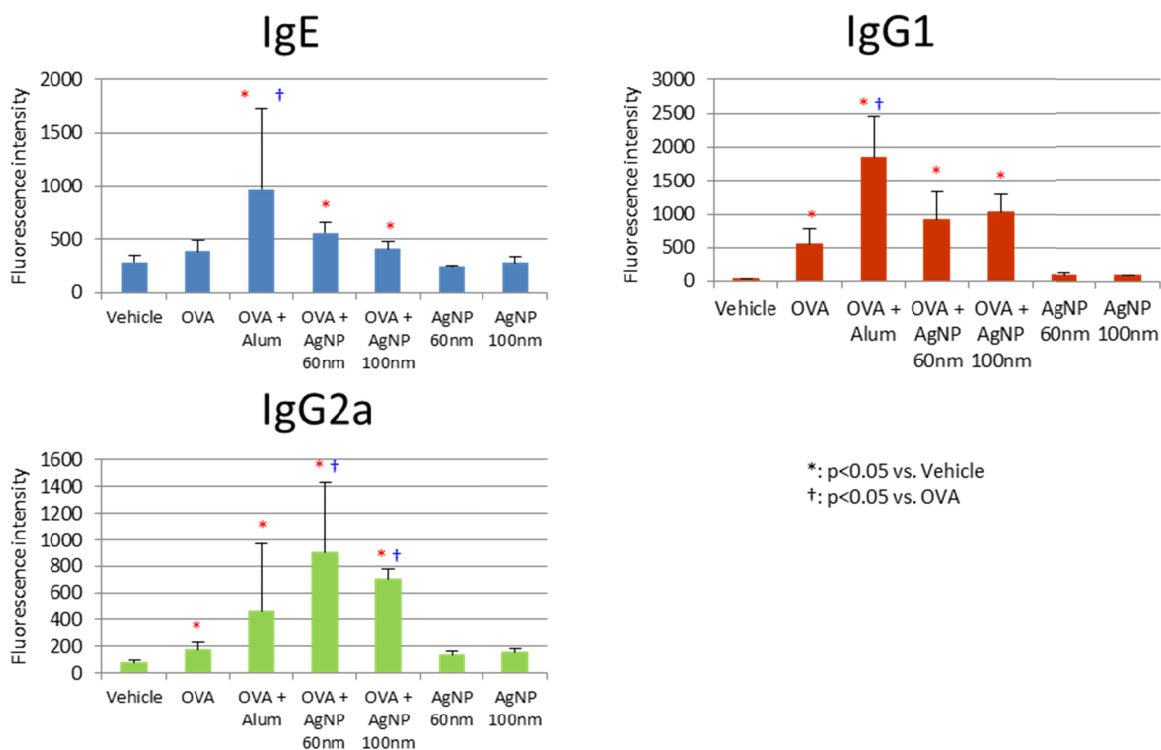


Figure 6. 血清中のOVA特異的抗体産生

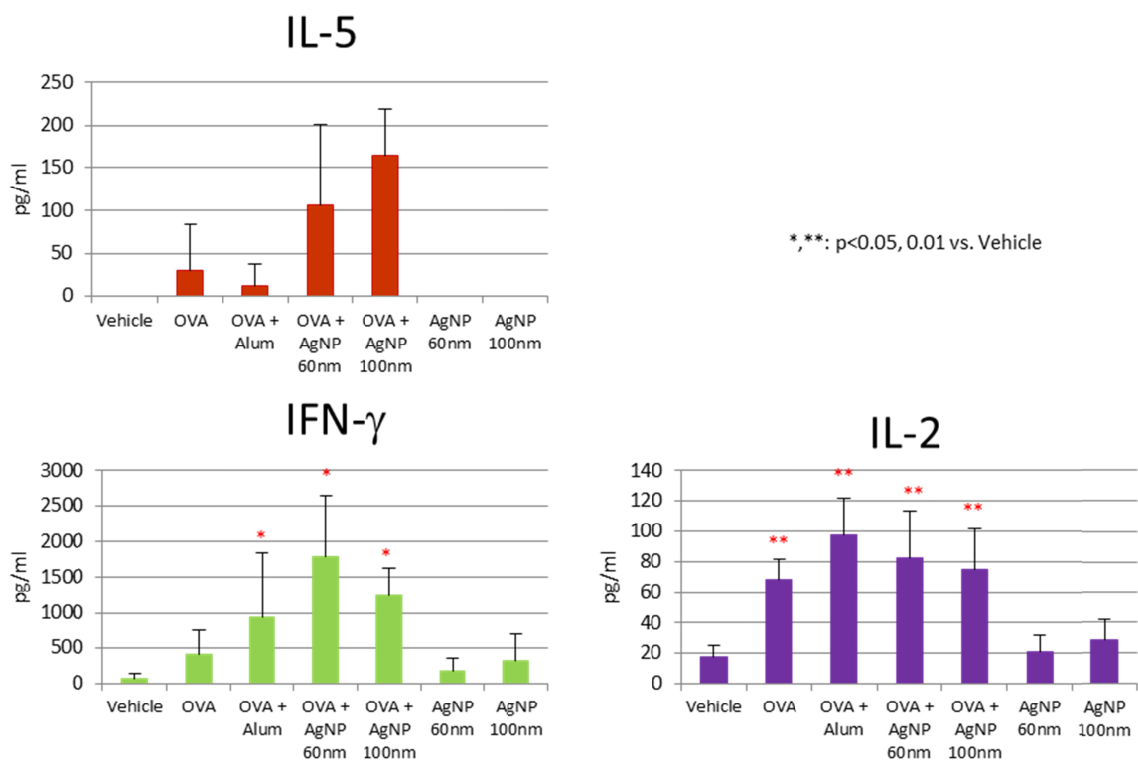


Figure 7. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌

Table 1. 体重および臓器重量

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 2. 病理組織学的解析

Organ and lesions	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
	No. of animals	5	5	5	5 ^a	4	5	5 ^b	5	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 ^g	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 ⁱ	2 ^d
Apoptosis		0 ^e	0	0 ^c	3 ^e	1 ^f	2 ^d	1 ^c	3 ⁱ	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.

研究課題名：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

分担研究課題名：曝露評価（食品等を含む）に関する国際動向調査

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
研究協力者：小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部
研究協力者：小林 克己 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部

研究要旨

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に関する国際動向を調査すること目的として、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、食品分野への適用実態を検討した。まず、ナノ関連に関する欧州の規制動向については、2011 年にナノマテリアルの定義が確定して以降、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、一般の化学物質の登録システムを中心としたもので、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。一方、新規食品規制においては、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るものの、既存の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る。現時点では新規のナノマテリアルとしての登録は認められていない。しかし、研究開発に関する文献調査等の結果からは、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が示された。食品及び飼料等に関する文献調査等では、重要な潜在的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、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る。これらの物質の評価手法がある程度定まれば、新規のナノマテリアルの適用も増加していくものと考えられた。

A．研究目的

ナノマテリアルには、様々な材質が考案されており、その工業的利用の振興が期待されている。ナノマテリアルの中でも、カーボンブラックや酸化チタン、酸化銀、カーボンナノチューブなどは、製品や環境経由の曝露による、ヒトの健康への影響が懸念されており、複数の検討がなされている。一方、ナノテクノロジーは食品・食品容器分野における積極的な利用も期待されており、これまでの研究でナノ銀や酸化チタンの食品関連分野における使用実態を調査した結果、ナノ銀については容器・包装用途における抗菌目的の使用が、二酸化チタンについては容器・包装に遮光性や抗菌性を付与する目的の使用が確認できた。食品添加物用としての二酸化チタンナノ粒子の使用は明示的に確認されていないが、海外では報告例がある。そこで、本研究では、海外におけるナノマテリアルの食

品関連分野での適用動向について調査すること目的とする。

B．研究方法

本年度は、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いて、食品分野への適用実態を検討した。まず、ナノ関連に関する欧州の規制動向を概況した。さらに 2014 年からナノ製品の登録制度を開始したデンマークにおけるナノ製品の実態状況を調査した報告を中心に、食品関連製品に関する情報を整理した。

C．研究結果

< 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マテリアルによる健康、環境影響への懸念が高く、2011 年には、EC としてのナノマテリアルの定義の設定（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年にフランスは、将来のナノ登録を見据えつつ、ナノ物質に関する情報政府への情報提出を義務的とした（この登録制度はナノ物質だけを対象とし、それらを含む消費者製品はカバーしていない）。登録データは毎年、フランス食品安全・環境・労働機関（ANSES）に提出され、ナノ物質の特性や用途に加え、企業秘密に関する情報も含む。これに続いて、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。ベルギーも、ナノ物質及びそれを含む混合物物質を対象としたものであるが、デンマークの登録制度は、ナノ物質だけでなく、むしろ製品に焦点を当てている。2014年6月の開始からの1年間分の登録については、機密情報は公開されないが、その年次報告書は2015年8月末に報告されることとなっている。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。幾つかの評価はすでに終了しており、それらの再評価は、2015年12月31日までに完了する予定となっている。

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（Commission (a) 2012）。窒化チタンのナノ粒子および食品接触材料プラスチック包装の

ためのコーティングされたナノ二酸化ケイ素（100 nm 未満）の安全性評価は、それぞれ2012年および2007年にEFSAによって公開されている（EFSA 2007; EFSA 2012）。

<デンマークにおける食品および飼料中のナノマテリアルの使用状況>

潜在的にナノスケールサイズの分布を有する食品添加物が食品に使用され、デンマークの市場で販売されていることを示す報告書に対するデンマークの食品業界へのインタビューの結果、多く物質は、業界がナノマテリアルとは見なししていない。そして、重量ベースの粒度分布を用いたものとしても定義されていない。ところが、これらの物質は、2011/696/EUによる個数基準の粒径配布状況を適用すると、ナノマテリアルと分類される可能性がある。さらに、いずれのインタビュー回答者は、食品成分および添加物のサイズ分布に関する正確な情報を与えることができなかった。企業は、製品を使用するまたは販売する場合、これら物質のナノサイズの関連特徴の機能を示さなくてはならないが、この資料の提出は、無かった。つまり、どの企業も、ナノマテリアルを含む食品を市場へ販売のための登録申請をデンマーク獣医食品庁に提出していない。

ナノマテリアル（2011/696/ EU）の定義は、EU委員会が勧告しており、それに従えば、既存の成分および添加剤を含む広範囲の食品でナノマテリアルを含むものとして特徴付けることができる。しかし、この規制は、「1997年5月15日以前から現在までにある程度にヒトへ消費（摂取）がされていない食品および食品成分」（新規食品および新規食品組成、規制（EC）258/97）にのみ適用するので、既存のナノマテリアル含む食品は対象とならない。従って、対象となるナノマテリアルが改訂新規食品規制による新規食品として表示および定義されない限りは、デンマークに新規食品添加用ナノマテリアルの殆どは存在しないことになる。

そこで、この調査の目的のためのナノマテリアルの特定の定義は、ナノマテリアル（2011/696/ EU）の定義にしたがっており、既存添加物除外した食品との関連した定義と異なっている。調査結果の概要を表1に示す。

表1. デンマークの食品産業におけるナノマテリアルとして扱われている材料

ナノ材料	製品	効用	含有量
シリコン化合物(例: 二酸化ケイ素)およびケイ酸塩	広範囲使用(例: 食品および野菜の缶詰)	固結防止、清浄、消泡、香りのキャリア(媒体)および増粘剤	該当なし
炭酸カルシウム	広範囲に使用	カラー、安定剤および固結防止	該当なし
自然着色剤/顔料(例: アントシアニン、ビート(飼料用大根)、コチニール(色素)、クロロフィルおよびカロテノイド)	広範囲に使用(ジュース、ビール、ワイン、肉、乳製品および菓子)	色素	不定
二酸化チタン	製菓(例: ガム、ビスケットおよびチョコレート)	表面のコッキングおよび色素	約 0.01 μg/mg

一方、畜産用飼料産業界に対するインタビューでも、製品がこの調査で定められるナノマテリアルを含むと思っておらず、ほとんどの場合、供給材料または添加剤の粒子サイズのデータ・資料を持っていないことが示された。

殆どの飼料は、0.25 ~ 1 mm の幅のサイズの粉末またはいくつかの栄養素からフレーク飼料を製造し、ペレットまたは圧ぺん化したものであり、最小サイズは、マイクロスケールである。畜産用飼料は、プレミックスを作製し飼料に混合するが、そのプレミックスは、多くのビタミンおよびミネラルとキャリア(シリカまたはカルシウム)の混合物でナノスケールである可能性もある。職場で安全衛生上の規制を遵守するために(粉塵を避けるため)、粉末は、ナノスケールよりはるかに大きい粒子であるが、おそらくキャリア中の混合物は、ナノスケールの一次粒子の塊または凝集物質である可能性もある。同様に魚用飼料の材料の一般的な最適粒子サイズは0.5 ~ 1.75 mm とされ、ナノスケールよりはるかに大きい。特に、魚用飼料用ビタミンおよびミネラルのサイズは、500 μm または 350 μm より小さい粒子が95%になるように決められているが、それでもナノスケールよりもかなり大きい粒子が使用されている。

デンマークにおけるナノマテリアルとして家畜用飼料の材料または添加物のスクリーニング段階で使用可能なナノマテリアル、飼料製品および用途などを表2に示した。インタビューで注目すべきことは、この調査で定義されているナノマテリアル成分を食品に使用することを期待していない。また、粒子サイズのデータは不明である。表に記載されている全ての材料は、5 ~ 7年前に導入されたキレート物質を除いて、何十年もデンマークの飼料業界で使用されてきたものである。

表2. デンマークの畜産用飼料産業界で分類されているナノマテリアルの概要

金属材料	製品	用途・機能	食品中含有意量
ケイ素化合物およびケイ酸塩	圧ぺんフレーク飼料およびペレットを含む一般家畜飼料; プレミックス(飼料添加剤の混合物)	キャリア用	約 1% (w/w)
炭酸カルシウムおよびリン酸カルシウム	一般家畜飼料; 水産用飼料	栄養素およびキャリア	約 1 - 4% (w/w)
金属塩および酸化物(酸化鉄および微量元素: 銅、亜鉛、マンガンおよびコバルト)	一般家畜飼料; 水産用飼料	栄養素	<< 1% (w/w)
微量元素のアミノ酸キレート	一般家畜飼料	栄養添加物	<< 1% (w/w)
着色剤/顔料(例: カロテンおよびアスタキサンチン)	採卵鶏を含む一般家畜飼料; 水産用飼料	色素	<< 1% (w/w)

< デンマークにおける食品接触材料中のナノマテリアルの使用状況 >

プラスチック容器、フィルムおよび紙の包装を含む食品包装に対するデンマークの生産業者へのインタビューでは、食品接触材料中のナノマテリアルの使用が明らかにされなかった。この調査では、ナノマテリアル(例えばナノクレイ/ナノ粘土)の将来性も対象としているが、商業的に実用化されていない。幾つかの意見の中には、ナノマテリアルがラベリングや包装のために使用される顔料、接着剤、ポリマーおよび紙に含まれている可能性に言及した。しかし、これら顔料、接着剤、ポリマーおよび紙に混入されるナノマテリアルのタイプは、特定することが出来なかった。顔料業界へのインタビューでは、オフセット印刷のために現在利用可能な顔料の多く(最大100)は、ナノスケールの範囲近くに設定されており、EU 勧告(EC 2011/696/EU) によってナノマテリアルとして定義されるかもしれないとしている。つまり、最近の生産者による REACH の報告では、Lithol Rubine (PR57:1), Permanent Maroon Medium (PR 15) および Toluidine Maroon (PR 13) がナノスケールを含んだ顔料の事例として報告されている。

台所家電や家電製品を生産する二つの大きな国際的な企業からの回答では、環境システムおよびヒトに対する健康へのナノマテリアルの毒性についての懸念が増大しているという結果に基づき、欧州市場からのナノ銀を含む製品を回収したというものであった。これらの現象は、ヒトへの影響に関する論文を裏付け、これによって台所家電へのナノマテリアルの使用が減少していることを示唆している。回答者は、自社製品のいずれも、業界の定義に従ってナノ物質を含んでいないと主張している。しかし、例えば EC2011/696/ EU に従って定義すると、カーボ

ンブラックおよび二酸化チタンのような顔料は、プラスチック部品および台所用品のコーティングおよびラッカーに使用されている可能性が高い。

< 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 >

最近まで、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や評価が報告されている。

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。これらは、食品および飼料により小さな粒子が、大きなコロイドに強く凝集(ELC 2009)する可能性があるナノマテリアルについて考慮すべきかどうかを議論されている。アモルファス二酸化ケイ素は、分離剤、補助剤、増粘・濃化剤および酸化防止剤として、調味料やカフェクリーマーなどの粉末状の食品で使用されてきた。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)。ナノサイズのシリカの含有量は、この研究から不明である。しかし、使用したシリカは、50%以上がナノ粒子の幅に入ることから、ナノマテリアルと定義できることから、これをナノマテリアルとして定義している。これらの知見から、Dekkerと共同研究者は、124 mg が(ナノシリカ高濃度含有食品を摂取した場合の一日当たりの摂取量)ナノシリカの一日平均摂取量と推定した。さらに、コロイド状シリカは、ワインおよびフルーツジュースの清澄剤として使用され、焼成シリカは、コーヒーや紅茶の消泡剤として使用される(委員会 (b) の 2012)。欧州食品安全機関(EFSA)は、二酸化ケイ素の再評価を2016年までに遅くとも完了しなければならないと述べている。

二酸化チタン (E171) は、顔料などの一般的な安全機関(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

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。いくつかの製品中の二酸化チタンの濃度は、0.0005%および0.04%の間で変動している。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。シリカは、50%以上がナノ粒子の幅に入ることから、ナノマテリアルと定義できる。二酸化チタンが添加されている食品は、乳製品、キャンディー、ガム、焼き菓子、調味料および飲料(Weir, Westerhoff *et al.* 2012)などである。Weirらは、食品グレードの二酸化チタンの一日平均摂取量を推定した。その結果、米国の10歳以下の子供は、1~2 mg/kg 体重でその他のグループでは、おおよそ0.2~0.7 mg/kg 体重と報告している。

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の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。食品グレードの炭酸カルシウムの典型的な平均粒径は、5 μmで100 nm未満が1%未満のものは、ナノマテリアルとは定義できないことを業界で云われている。飼料中の炭酸カルシウムは、飼料原料および技術的添加剤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ため、本報告書では、食用に記載されていない。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。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

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。天然色素添加剤は、合成着色添加剤の代替となる。天然

色素添加剤、風味剤および油の使用は、しばしば、水に分散可能にするためキャリアシステムを用いて分散させる。それは、ナノ化処置またはナノカプセル化によって均一に分散 (ELC 2009; Chaudhry, Watkins *et al.* 2010) させる。炭水化物 (例えばデンプン)、ゼラチン、
-シクロデキストリンおよびアルギン酸カルシウムは、ナノキャリアの典型的な例であり、数多くの企業が製造し、製品を販売 (Möller, Eberle *et al.* 2009) している。乳化された非水溶性化合物は、もしかするとナノ範囲にある。しかしながら、キャリア (搬送) システムの場合は、サイズが大きくてもよい (Möller, Eberle *et al.* 2009)。

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 (Nanotechnology 2008)。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。

顔料:食品接触材料のカーボンブラックおよび二酸化チタンを含む有機および無機顔料は、一般的に食品包装材料のプラスチック、板紙、缶の接着および密閉剤の発色剤として使用されている (Environment Canada 2011)。

包装器材の改善: 複合ナノマテリアルは、プラスチック母体にナノ物質を低レベル (2~5%) 含有し、従来の食品包装材料に勝る幾つかの利点を示す。例えば、その利点は、機械的特性の改善、気体と液体の浸透性の減少および軽量化と難燃性の向上などである。複合ナノマテリアルは、主に瓶やフィルムの特性を改善し、

場合によっては、他の材料のコーティングに用いられる。

特に、種々の有機クレイは、グローバルナノ対応の食品および飲料市場の約 70% に興味を持たれている (Möller, Eberle *et al.* 2009)。多くの複合材料は、成功裏にアジアおよび米国で商品化されている。例えばポリエチレン製 (PET) ボトルの飲料 (ジュース、ビールおよびソフトドリンク) の炭酸ガスの低減と酸素の侵入を最小限にする (Nanotechnology 2008; Duncan 2011)。クレイの低コスト化のために肉、チーズおよび穀物などの製品用の様々な食品包装用途用ナノクレイポリマー複合材料が開発された。これらナノクレイポリマー複合材料は、フルーツジュースおよび乳製品用の包装の押出コーティング用すなわち、炭酸飲料のボトル製造の共押し出し法に使用される (Hatzigrigoriou and Papaspyrides 2011)。

異なるナノマテリアルは、食品包装の改善のために、すなわちバリア性または機能的特性を向上のために、純粋なポリマーまたは複合ナノマテリアルに添加することができる。例えば、材料の剛性および強度の改善のために窒化チタンがある (Chaudhry and Castle 2011)。二酸化チタンナノ粒子は、材料の透明性を維持しながら UV 光をブロックするためにフィルムに添加することができる (Chaudhry and Castle 2011) また、アクリルナノ粒子は、ポリ乳酸フィルムを強化するために添加できると述べている (Robinson and Morrison 2010)。また、この2つのナノマテリアルは、上述した品質改善の目的で市販されている。二酸化ケイ素は、ナノ粒子の真空蒸着法でフィルム上に蒸着させ、炭酸飲料やスナック、菓子およびコーヒーの貯蔵期間を延長させるために使用される (Silvestre, Duraccio *et al.* 2011)。

活性包装材料とインテリジェント食品包装: 活性物質および材料は、貯蔵期間の延長の維持または包装食品の状態を劣化させない目的で添加される。その作用は、包装食品または

食品を取り巻く環境からの物質の吸収または放出させるためである。具体的には、欧州市場における活性包装の現状を以下に述べる。活性包装システムによる製品は、食べることが出来ないことを消費者に対して明確に識別出来るように表示・啓蒙しなくてはならない。そして新しい活性または高機能物質は、EFSAによって承認されなければならない。酸化亜鉛、銀、リン酸カルシウムまたは銀ゼオライトのナノ粒子を含むポリマー複合材料に抗菌剤を加えた商品は、販売されている (Robinson and Morrison 2009)。

金および二酸化チタンのナノ粒子から製造されたナノセンサーは、食品包装ラインで食品の状態の監視システムに利用できる。ヨーロッパの幾つかの開発初期段階のナノセンサーは、製品が受け入れられる可能性が高いか否かを検索するため市販されている (Robinson and Morrison 2010)。

抗菌作用および自浄作用を持つ台所用品：幾つかの企業は、冷蔵庫、冷凍庫およびコーヒーマシンを製造している。これらの製品は、ナノサイズの銀および二酸化チタンを含み微生物の増殖を防止し、製品の衛生的な環境を維持するために、内面および表面にナノ材料が添加されている。同様に、ナノサイズの銀でコーティングされた抗菌台所用品 (例えば刃物類、平鍋、まな板、食品容器 およびサラダボウル) は、実用化されている (Miller, Lowrey et al. 2008)。これらの製品は、デンマークの市場で確認されていない。しかし、これら製品は、容易にオンラインで購入することができる。

過去 10 年、多くのメーカーは、ナノサイズ銀を使用し、抗菌作用を持つ冷蔵庫、冷凍庫および洗濯機を販売してきたが、これらの製品の大半は、もはや市場から撤退した。2005 年に一つの大きな台所家電のメーカーは、抗菌製品の製品ラインを立ち上げたが、NGO の国民の反発と圧力によって一時的に市場から撤退した (El-Badawy, Feldhake et al. 2010)。

D. 考察

欧州では、2011 年にナノ材料の定義が確定してから、各国でナノ材料に対する (義務的な) 登録制度が普及しつつあり、2012 年最初に導入したフランスをはじめとして、デンマーク、ベルギーでも登録制度が開始された。しかし、この登録制度は、化学物質の登録システムである REACH の対象物質に限定されており、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。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、ナノ材料に限らず、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材料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、既存物質を対象に EFSA が評価を行っている。食品包装中のナノ材料に関しても既存物質のいくつかは EFSA により評価されている。

以上のように、一般の化学物質に関しての登録制度は整いつつあるが、食品関連に関しての情報は、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材料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材料需要が存在することを示している。また、欧州では食品分野におけるナノテクノロジーの大型の開発研究プロジェクト (NanoPack, Good Food project (FP6), Natural

Antimicrobials for Innovative Safe Packaging (FP7)等)も実施されており、将来的なニーズは決して低くはないと思われる。

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剤中に少量(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とも考えられ、評価の方向性が定まれば、新規製品の申請へと急速に動き出すかも知れない。

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。有機・無機の顔料は、今のところ適用除外品である。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、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。それらの使用目的としては、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おり、現在は、ナノマテリアルの食品包装への適用は登録が必要ではあるが、使用が許可された場合には、その使用はゆっくりと増加していくと予想される。

E. 結論

ナノマテリアルの食品関連分野を中心とした曝露状況に関する国際動向を調査すること

目的として、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、食品分野への適用実態を検討した。まず、ナノ関連に関する欧州の規制動向については、2011年にナノマテリアルの定義が確定して以降、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、一般の化学物質の登録システムを中心としたもので、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。一方、新規食品規制においては、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るものの、既存の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る。現時点では新規のナノマテリアルとしての登録は認められていない。しかし、研究開発に関する文献調査等の結果からは、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が示された。食品及び飼料等に関する文献調査等では、重要な潜在的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、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る。これらの物質の評価手法がある程度定まれば、新規のナノマテリアルの適用も増加していくものと考えられた。

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)

(学会発表)

Norihiro Kobayashi, Reiji Kubota, Ryota Tanaka, Hiroshi Takehara, Masato Naya, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: 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 San Diego, CA, USA).

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

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)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	39	879-886	2015
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	763-769	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