

別添 1

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

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

(H29-食品-一般-003)

平成29年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 久美子

平成30(2018)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書	
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 小川久美子	---- 1
II. 分担研究報告書	
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 曹 永晩、西川 秋佳、小川 久美子 (資料) Figure 1~13 Table 1, 2	----- 22
2. ナノ銀の腹腔内投与による急性毒性について 小川 久美子、西川 秋佳、曹 永晩 (資料) Figure 1~9 Table 1~7	----- 35
3. 酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析 安達 玲子、為広 紀正 (資料) Figure 1~6 Table 1, 2	----- 50
4. 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 広瀬 明彦、五十嵐 智女	----- 60
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 67

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29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：

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。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、免疫毒性の有無について、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)においてコレラ菌由来毒素（コレラトキシン、CT）並びにその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。その結果、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を示したが、CT及びCTB投与による影響は認められなかった。一方、Vehicle群と比較してOVA処置群では惹起30分後の体温の有意な低下・低下傾向及び血中ヒスタミン濃度並びにアナフィラキシスコアの有意な増加・増加傾向が認められたが、CT及びCTB投与による影響は認められなかった。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IL-2、IL-4、IL-5及びIFN- γ 分泌については、CT及びCTB投与による有意な変化は見られなかった。実験2)においては、ヒトで皮膚感作性を示す小麦タンパク加水分解物（HWP）について、OVAと同等の低濃度暴露による抗原作用の有無を検討した。その結果、0.5時間処理HWPはヒトで皮膚感作性を持つ物質と同様のSDS-PAGEパターンを示した。HWP 5.4、27及び135 μ g群で、血中のHWP特異的なIgG1及びIgEがVehicle群と比較して有意に増加を示した。一方、Vehicle群と比較してHWP 27及び135 μ g群で惹起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、IL-4、IL-5及びIFN- γ 分泌については、HWP投与による有意な変化は見られなかった。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。前年度、CTを用いた検討では明らかなアジュバント作用を認めており、今後、再現性及び濃度依存性など更なる検討が必要であると考えられた。また、HWPの経皮暴露後、HWPを腹腔内投与する実験において、HWPはOVAと同程度の低濃度でも十分な抗原性を示し、皮膚感作性試験の有望な抗原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。

また、AgNPのサイズによる毒性の違いについて、26年度及び27年度我々はマウスに直径10 nm、60 nm及び100 nmのAgNPを腹腔内投与したところ、AgNP 10 nmを投与した全動物において24時間内の死亡又は瀕死例が認められ、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死、

脾臓のうっ血及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に観察された。28年度の研究では抗酸化作用を示すN-acetyl-L-cysteine (NAC)による肝臓の病理所見の有意な減少が確認できた。29年度の本研究では、実験3)においては、AgNPの急性毒性について、AgNPの表面積を考量した投与量(直径10 nm AgNP 0.2 mg、直径60 nm AgNP 1.2 mg、直径100 nm AgNP 2 mg)で腹腔内投与を行い、その影響について検討したところ、AgNP 10 nm 6時間群において、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。又、病変と肝臓内の銀濃度とは相関がないことから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。実験4)においては、NAC(2000 mg/kg bw)、Vitamin C (Vit C、200 mg/kg bw)、Vitamin E (Vit E、100 mg/kg bw)及びL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO、1.6 g/kg bw)を経口投与1時間後、AgNP 10nm (0.2 mg)を腹腔内投与し、AgNPによる急性毒性に対する抗酸化剤の影響について検討したところ、直接活性酸素類を消去するVit C及びVit EよりはGSHの前駆体であるNACの方がAgNPの急性毒性を有効に抑制できた。抗酸化剤の投与によってAgNPによる毒性が著しく抑制できたことは、少なくとも一部は酸化ストレスによるAgNPの毒性メカニズムを支持すると考えられた。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酸化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。

一方、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、酸化チタン、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。その結果、今回検討対象とした酸化チタン(ルチル型、粒子径35 nm)及び酸化亜鉛(粒子径35 nm)は、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果を示すが、抗原経皮感作は増強しないことが示された。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。今後は経皮感作-経口惹起の動物モデル実験系により、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。

また、国際動向については、29年度は、欧州食品安全機関(EFSA)が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワークおよび、食品接触材料の科学ネットワークに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「食品および飼料連鎖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」の作成を行っており、ナノマテリアルの科学ネットワークではガイダンスのパブコメに向けた議論が行われた。ガイダンスには、2011年のガイダンスより詳細な分析法やin vitro分解性などを用いた評価基準、ナノマテリアルに適用可能な生物学的試験(in vivo/in vitro)法に関して網羅的な情報を収載したものになっていることが示された。また、食品接触材料の科学ネットワークでは、容器等の印刷用インクに含まれるナノサイズの顔料に関する分析法や今後の評価指針等の方向性について関心が高まっていることが示された。

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、小麦タンパク加水分解物、コレラトキシン、アジュバント効果、抗酸化剤、マウスモデル、国際動向、EFSA

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：五十嵐 智女
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測
評価部 第一室研究助手

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、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。ナノ銀 (AgNP) の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び 90 日間反復投与毒性試験等において肝臓や腎臓に軽度の変化が示され (Bergin IL et. al., Int J Biomed Nanosci Nanotechnol. 2013;3. doi: 10.1504/IJBNN.2013.054515.)、経皮あるいは静脈内投与試験では脾臓への影響が報告されている (Korani M et. al., Int J Nanomedicine. 2011;6, 855-862, Schäfer B et. al., Arch Toxicol. 2013;87, 2249-2262)) もの、十分な評価は行われていない。また、免疫毒性についての報告は限られている (Shin S-H et al., Clinical and Experimental Otorhinolaryngology. 2012;4 (222-227))。AgNP のサイズによる毒性の違いについて、細胞を用いた検討では可能性が指摘されているが (Park MVDZ et. al., Biomaterials. 2011;32

(9810-9817))、動物を用いた検討での報告はない。更に、AgNP の経皮暴露濃度による免疫毒性に及ぼす影響に関する報告も乏しい。

一方、AgNP は、食品・食品容器包装用途として経口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ギー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、他のアレルギー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。

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。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)。

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、CT並びに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、ヒトで皮膚感作性を示す小麦タンパク加水分解物(HWP)について、OVAと同等の低濃度暴露による抗原作用の有無を検討した。

また、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ない。最近、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年度我々は抗原性あるいは卵白アルブミン(OVA)の抗原性に対するアジュバント作用を検討するためマウスに直径10 nm、60 nm及び100 nmのAgNPを腹腔内投与したところ抗原の有無にかかわらず、AgNP 10 nmを投与した全動物のみにおいて24時間内の死亡又は瀕死例が認められ、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死、脾臓のうっ血及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に観察された。28年度の研究では抗酸化作用を示すN-acetyl-L-cysteine (NAC)による病理所見の有意な減少が確認できた。

本研究では、AgNPの急性毒性について、AgNPの表面積を考慮し、110 cm²で同等とした投与量(直径10 nm AgNP 0.2 mg、直径60 nm AgNP 1.2 mg、直径100 nm AgNP 2 mg)で腹腔内投与を行い、その影響について検討し、さらに、NAC(2000 mg/kg bw)、Vitamin C (Vit C、200 mg/kg bw)、Vitamin E (Vit E、100 mg/kg bw)及びL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO、1.6 g/kg bw)を経口又は腹腔内投与1時間後、AgNP

10 nm (0.4 mg)を腹腔内投与し、AgNPによる急性毒性に対する抗酸化剤又は又はグルタチオン(GSH)合成抑制剤の影響について検討した。

一方、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。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。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。

また、国際的には、欧州連合ではナノ材料の届出・登録の義務化の動きがあり、米国でもEPAを主体に規制や監視が検討されている。本邦でも、カーボンナノチューブ等では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。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。さらに、ナノテクノロジーは食品・食品容器分野における積極的な利用も期待されており、これまでの研究では、食品関連分野における使用実態を調査した結果、ナノ銀や、二酸化チタンについては容器・包装への使用が確認できたほか、欧州ではEFSAが2010年から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評価に関する科学ネットワーク (Scientific network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed) において、積極的な議論を行っている。本研究ではこうした欧州における動向を中心に、国際的なナノマテリアルの評価状況に関する最新動向の調査を行うことを目的とした。

B. 研究方法

実験 1)

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

卵白アルブミン (OVA) と AgNP の経皮感作後、OVA の腹腔内投与惹起による免疫毒性に関して、コレラトキシン (CT) のような毒性を示さないコレラトキシン B サブユニット (CTB) のアジュバント効果を検討するため、OVA をアジュバントの陽性対照であるコレラトキシン (CT) 又はコレラトキシン B サブユニット (CTB) 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。

抗原懸濁液は OVA (Sigma A5503-1g)、CT (LBL 101B) 及び CTB (LBL 103B) を各々 2、1 及び 0.7 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ /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。1 μg CT 中には約 0.7 μg の CTB が含まれている。

動物は、7週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とし、各群は以下の通りに構成した、① Vehicle 群、② OVA 群、③ OVA + CT

群、④ OVA + CTB。

8 週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間被験物質懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原懸濁液の貼付には、パッチテスター「トリー」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μL の抗原懸濁液を浸潤させ剃毛部に貼付した。パッチの上からマウス用ジャケットを巻いてパッチを保護し、剥脱を防いだ。3 日間の感作後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1クールとし、4クルールの感作後、血中の OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体を ELISA 法で測定した。アレルギー反応の惹起は Day 25 に、感作抗原 1 mg を腹腔内投与して行った。OVA の腹腔内投与 30 分間後のマウスの直腸内体温変化及びアナフィラキシー症状を観察し、症状については基準に従ってスコアリングした。また、惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血漿中ヒスタミンの濃度を、Histamine EIA Kit (SPI-BIO) にて測定した。解剖時に採取した脾臓細胞は再懸濁後、OVA (最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加、37°C 24 時間、又は 72 時間培養し、培地中のサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2、IFN- γ 及び IL-17A の濃度を、ELISA フローサイトメトリー法を用いて測定した。

更に、全身状態観察、体重、脾臓重量、腋窩および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)

グルテン (Sigma G5004) を 100 mg/mL とするよう 1M Tris (pH 11.4) に加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を調製した。経皮感作にはストック懸濁液を PBS で 10 倍希釈し、pH を 8 付近に調整したものを用いた。

グルテン酸加水分解物 (HWP) については、グルテンのストック懸濁液に 1M 塩酸を加えて pH

を約 2 に調整し、100°C のヒートブロック上で、0.5 時間加熱した。その後、1.5M 水酸化ナトリウム水溶液で中和して加水分解反応を停止させ、グルテン終濃度 10 mg/mL となるように PBS にて希釈した。分解 0 時間のサンプルは、1M 塩酸を予め中和した溶液中にグルテンストック懸濁液を加え、加熱は行わずに調製した。HWP は懸濁液の状態なので静置して上清を使用したため、BCA タンパク質アッセイにより上清のタンパク濃度測定を行うとともに SDS-PAGE により加水分解が進行したことを確認した。

動物実験において、Day 25 に行うアレルギー反応の惹起を感作抗原 270 μ g を用いて腹腔内投与して行う以外は、実験 1 と同様に実施した。

各群は以下の通りに構成した、① Vehicle 群、② HWP 0.22 μ g 群、③ HWP 1.1 μ g 群、④ HWP 5.4 μ g 群、⑤ HWP 27 μ g 群、⑥ HWP 135 μ g 群。

実験 3)

AgNP は nanoComposix 社の銀ナノ粒子（直径 10 nm (AGCB10)、60 nm (AGCB60) 及び 100 nm (AGCB100)、濃度 1 mg/ml) を用いることとした。nanoComposix 社からのデータから 10 nm AgNP の表面積は 60 nm AgNP 及び 100 nm AgNP の各々約 6 倍及び 10 倍であることが分かった。AgNP を 0.2~2 mg/2 ml/マウスとなるようクエン酸バッファーに加えて投与する前に調製した。

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料（オリエンタル酵母工業株式会社）を給餌した。1 週間の馴化後、1 群の匹数は 5-6 匹とし、各群は以下の通りに構成した、① 溶媒対照 (Vehicle) 6 時間群、② 10 nm AgNP 群、③ 60 nm AgNP 群、④ 100 nm AgNP 群。腹腔内投与 (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。肝臓及び全血の凍結サンプルを採取し、ICP-MS を用いて銀濃度を測定した。

実験 4)

動物実験は実験 1 と同様に実施した。Citrate (vehicle) や AgNP (10 nm, 0.4 mg/mouse) を腹腔内投与する 1 時間前に saline 又は NAC (2000 mg/kg bw)、Vit C (200 mg/kg bw) 及び Vit E (100 mg/kg bw) を経口投与し、BSO (1.6 g/kg bw) を腹腔内投与した。解剖は vehicle または AgNP を投与した 6 時間及び 24 時間後に実施した。血清を用いて血清生化学検査を行った。

各群は以下の通りに構成した、① Saline + Vehicle 群、② Saline + AgNP 群、③ NAC + AgNP 群、④ Vit C + AgNP 群、⑤ Vit E + AgNP 群、⑥ BSO + AgNP 群。

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。

試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン B (ルチル型、粒子径 35 nm)

酸化亜鉛 B (粒子径 35 nm)

の 2 種のナノマテリアル (表面未処理) を使用した。また、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果の検討においては、前年度までの先行研究

において抗原経皮感作を増強することが示されている、

酸化チタン D (アナターゼ型、
粒子径 15 nm)

酸化亜鉛 A (粒子径 25 nm)

の 2 種 (表面未処理) についても合わせて検討した。

抗原タンパク質としては、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。

酸化チタン及び酸化亜鉛ナノマテリアルの懸濁液調製

酸化チタン及び酸化亜鉛は、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。

【実験 5】抗原の腹腔内投与による感作に対する酸化チタン及び酸化亜鉛の影響に関する検討

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。7 週齢時に、酸化亜鉛 A、B、及び酸化チタン D のそれぞれについて、OVA 20 μ g 及びナノマテリアル (2 mg あるいは 10 mg) を生理食塩水 300 μ L に懸濁し、腹腔内投与 (i.p.) した (Day 0、1 次免疫)。陽性対照アジュバントとしては Alum (水酸化アルミニウムゲル (コスモ・バイオ (株))、2 mg) を用いた。14 日後 (Day 14) に再度投与し (2 次免疫)、翌日 (Day 15) に血液を採取して、血清中の OVA 特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。

抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタン及び酸化亜鉛の影響に関する検討 (【実験 6, 7】)

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 (1-2 μ g/50 μ L)、あるいは OVA 及び酸化チタン/酸化亜鉛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 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/100 μ L を i. p. して行った。i. p. 後 30 分間、マウスの直腸内体温を測定した。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。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し V 群、あるいは OVA 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)

投与実験は熟練者による経皮並びに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。

また、国際動向については、欧州食品安全機関（EFSA）が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワーク（Scientific network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed）（第7回会議、2017年11月開催）に関して調査を行った。また、食品接触材料に関する科学ネットワーク（Scientific Network of the food ingredients and food packaging（FIP）Unit on food contact materials（FCM），the ‘EFSA FCM Network’）（第5回会議2017年7月開催）において、食品接触材料へのナノ粒子の敵に関する議題を調査した。

C. 研究結果

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群と比較して有意に増加を示したが、CT及びCTB投与による影響は認められなかった。また、いずれのOVA投与群でもIgG2aの有意な変化は認めなかった。直腸内体温の変化については、惹起10分、20分及び30分後、Vehicle群と比較して全OVA群で統計学的に有意な体温の低下が認められ、OVA + CTB群では惹起5分後から、体温の低下が示された。30分後にOVA群、OVA + CT群及びOVA + CTB群では各々平均3.2、4.4及び4.3度の体温低下が認められた。体温が有意に低下した全てのOVA処置群においては惹起30分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意に上昇していた。惹起後30分間、アナフィラキシー症状をスコアリングした結果、全てのOVA処置群でも平均2.8~3.2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においては、OVA + CT群でVehicle

群と比べ有意な増加が認められた。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、OVA + CT群でVehicle群と比較して有意な増加が認められた。OVA群及びOVA + CTB群で有意な増加はないものの、増加傾向を示した。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 \times 100（%））については、Vehicle群と比較して全OVA処置群で有意な増加又は増加傾向が認められた。

実験2)

グルテンの酸加水分解物を3回作製し、BCAタンパク質アッセイにより、懸濁液上清の濃度を測定した結果、平均2.7 mg/mlであった。加水分解0.5時間のSDS-PAGEのパターンは100 kDa以下に広くスメアなパターンを示し、グルパール19Sと類似した（厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）「医薬部外品・化粧品に含有される成分の安全性確保に関する研究」分担研究報告書（平成24年度））。グルパール19Sとパターンが類似している0.5時間分解物を取り上げ、マウスに対する経皮感作能を検討した。

暴露期間中の体重について、群間の差は認められなかったが、解剖時の脾臓の相対重量において、HWP 5.4 μ g群で有意な増加が示された。感作4週後のマウスにおいて、HWP 5.4、27及び135 μ g群で、血中のHWP特異的なIgG1及びIgEがVehicle群と比較して有意に増加を示し、HWP 27及び135 μ g群で、IgG2aが有意に増加した。直腸内体温の変化については、惹起20分及び30分後、Vehicle群と比較してHWP 27 μ g以上の群で統計学的に有意な体温の低下が認められた。30分後にHWP 5.4、27及び135 μ g群では各々平均0.4、2.0及び2.8度の体温低

下が認められた。体温が低下した HWP 5.4、27 及び 135 µg 群においては惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意な上昇又は上昇傾向を示した。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 HWP 処置群でも平均 1.4~3.0 と統計学的有意な高いスコア又は高い傾向のスコアであった。抗原再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、何れのサイトカインにおいても、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、HWP 5.4、27 及び 135 µg 群で Vehicle 群と比較して有意な増加が認められた。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量については Vehicle 群と比較して HWP 135 µg 群で有意な増加が認められた。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 (%)) についても、Vehicle 群と比較して HWP 5.4、27 及び 135 µg 群で有意な増加が認められた。

実験 3)

AgNP 10 nm 群の 1 匹で投与 6 時間後より立毛が認められたが、何れの群においても 24 時間後まで有意な体温低下は認められなかった。AgNP 投与 6 時間後の解剖時、AgNP 10 nm 群の肝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 時間後の解剖時になると多く観察された。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。病理組織学的には、投与後 6 時間、AgNP 10 nm 群で、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及び胆嚢の浮腫が有意な高頻度に認められた。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。肝臓中の銀濃度において、AgNP 60 nm 6 時間及び 24 時間解剖群、並びに AgNP 100 nm 24 時間群で各々の vehicle 群及び AgNP 10 nm 群と比べて有

意に高い値を示した。血中の銀濃度において、すべての AgNP 6 時間群及び AgNP 60 nm 24 時間群で有意に高い濃度を示した。

実験 4)

Saline + Vehicle 6 時間群の 1 匹が投与ミスで死亡し、結果から除外した。AgNP 投与 6 時間後まで、いずれの AgNP 群で活動低下及び有意な体温の低下は認められなかったが、AgNP 投与 24 時間後に Vit C + AgNP 群及び Vit E + AgNP 群で有意な体温の低下が認められた。Saline + AgNP 24 時間群及び BSO + AgNP 24 時間群で各々 1 匹の死亡例が認められ、Vit C + AgNP 24 時間群及び BSO + AgNP 24 時間群で各々 1 匹の瀕死例が認められた。AgNP 投与 24 時間後において、NAC + AgNP 24 群を除くすべての AgNP 投与群生存動物で立毛又は頻呼吸が認められた。BSO + AgNP 24 時間群 (統計検討対象匹数が 2 匹なので結果は参考値である) 除き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が、BSO + AgNP 24 時間群相対肝臓重量の有意な増加が認められた。AgNP 投与 6 時間後解剖時、AgNP 群で肝臓は暗赤色調を呈し、Saline + AgNP 群が最も強かった。24 時間後解剖時、NAC + AgNP 群を除くすべての AgNP 群で肝臓及び脾臓は暗赤色調を呈した。血清生化学検査において、6 時間後解剖時、Saline + AgNP 群で、ALB、T-CHO、TG 及び glucose の有意な減少が認められたが、NAC + AgNP 群ではいずれの項目も変化がなかった。Vit C + AgNP 群、Vit E + AgNP 群及び BSO + AgNP 群で glucose の減少及び Vit E + AgNP 群で AST の増加が認められた。また、BSO + AgNP 群で TP、ALB、ALP、T-CHO 及び TG の減少が認められた。24 時間後解剖時、NAC + AgNP 群を除くすべての AgNP 投与群で TP、ALB、T-CHO の何れかの減少又は AST の増加が認められた。病理組織学的には、AgNP 投与 6 時間後、NAC + AgNP 群を除くすべての AgNP 投与群で肝臓のうっ血、類洞内細胞成分増加、肝細胞の空胞化及び脾臓の白脾髄のアポト

ーシスが Saline + Vehicle 群に比べ、有意に増加又は増加傾向を示した。すべての AgNP 投与群で腸間膜及び胸腺リンパ節に暗褐色色素の沈着が有意に増加又は増加傾向を示した。Saline + AgNP 群において、肝臓の単細胞壊死及び Vit C + AgNP 群において、肝臓の巣状壊死並びに胆嚢の浮腫・出血が認められた。AgNP 投与 24 時間後、群間の有意な差は認められなかったが、AgNP 投与群で認められる肝臓、胆嚢、脾臓及び胸腺の病変が NAC + AgNP 群では観察されなかった。

【実験 5】抗原の腹腔内投与による感作に及ぼす酸化チタンの影響に関する検討

酸化亜鉛及び酸化チタン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、まず、動物実験における最も基本的な感作方法として、OVA の腹腔内投与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。) 酸化亜鉛 A, B どちらも、10 mg 投与群 (OVA-ZnOA_H 群、OVA-ZnOB_H 群) では、投与翌日までに 5 匹全匹が死亡した。また、酸化亜鉛 A 2 mg 投与群 (OVA-ZnOA_L 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。2 次免疫翌日 (Day 15) の血清中の抗原特異的 IgE, IgG1 及び IgG2a 抗体産生について、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 Th1 細胞優位な免疫応答の際に産生される抗体である。OVA 腹腔感作時に陽性対照アジュバントとして Alum を使用した群 (OVA-ALUM 群) では、抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体産生については、OVA のみを投与したアジュバント不使用群 (OVA 群) と比較して増大していたことから、Alum の Th2 細胞優位な免疫応答を誘導するアジュバントとしての効果が確認された。OVA 腹腔感作時に酸化

亜鉛 2 mg を共存させた場合 (OVA-ZnOA_L 群、OVA-ZnOB_L 群)、IgE については、酸化亜鉛 A, B ともに OVA 群に対して有意な抗体産生の増大が見られた。IgG1 についても増大が見られ、酸化亜鉛 B の場合は有意に増大していた。また IgG2a についても、酸化亜鉛 A, B ともに OVA 群に対して有意な抗体産生の増大が見られた。一方、酸化チタン D を共存させた場合は、IgE, IgG1 産生とともに高用量群 (OVA-TiO2D_H 群) で OVA 群に対して有意な増大が見られた。IgG2a に関しては有意な増大は見られなかった。これらの結果から、今回実験に用いた 3 種のナノマテリアルは全て、OVA の i.p.感作を増強することが示された。また、酸化チタン D は Alum と同様に Th2 細胞有意な免疫応答を誘導したが、酸化亜鉛 A, B では IgG2a の産生も見られ、また i.p.による毒性も見られたことから、酸化亜鉛と酸化チタンではその生体影響が異なることが示された。

抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタン／酸化亜鉛の影響に関する検討

近年、加水分解コムギタンパク質を含有する洗顔石鹸の使用によるコムギアレルギー発症事例のように、タンパク質が皮膚から取り込まれて抗原となる経皮感作経路がアレルギー発症の重要な要因として注目されている。そこで抗原の経皮的な感作時に酸化チタンあるいは酸化亜鉛ナノマテリアルを共存させた場合の影響について検討した。

工業的に利用されている酸化チタンにはルチル型とアナターゼ型の 2 種の結晶型が存在する。前述の先行研究において、酸化チタンに関しては、酸化チタン A (ルチル型、粒子径 15 nm)、酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm)、及び酸化チタン D について検討したところ、酸化チタン C が最も強く経皮感作を増強し、酸化チタン A 及び D もある程度の増強効果を示した。また酸化亜鉛 A (粒子径 25 nm) についても経皮感作を増強する傾向が見られた。

本研究においては、前述の酸化チタン B、及び酸化亜鉛 B について、先行研究と同様の方法にて経皮感作増強効果の有無に関する検討を実施した。

【実験 6】酸化チタン B の共存効果

血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果について、OVA 群では IgE、IgG1 の産生が見られた。酸化チタン B 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大は見られなかった。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、直腸内体温の測定、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。30 分後、OVA 群では V 群と比較して直腸温が平均 3.5℃低下していた。酸化チタン B を共存させた群では、OVA 群と比較して体温低下の増強は見られなかった。B には惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。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。酸化チタン B を共存させた群では、OVA 群と比較してヒスタミン濃度の増大は見られなかった。C には惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果を示す。OVA 群では V 群と比較してスコアの大きな増大が見られた。酸化チタン B を共存させた群では、OVA 群と比較してスコアの増大は見られなかった。これらの結果から、酸化チタン B は OVA 経皮感作を増強しないことが示された。

【実験 7】酸化亜鉛 B の共存効果

血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果について、OVA 群では IgE、IgG1 の産生が見られたが、酸化亜鉛 B を共存させたすべての群で、OVA 群と比較して抗体産生の増大は見られなかった。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。

アナフィラキシー反応惹起後の結果においては、惹起後 30 分間の直腸内体温の変化 (A) について、30 分後、OVA 群では V 群と比較して平均 3.9℃低下していた。酸化亜鉛 B を共存させた群では、OVA 群と比較して体温低下の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 (B) について、OVA 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度が増大していた。酸化亜鉛 B 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 (C) について、OVA 群では V 群と比較してスコアの大きな増大が見られた。酸化亜鉛 B を共存させた群では、OVA 群と比較してスコアの増大は見られなかった。これらの結果から、酸化亜鉛 B は OVA 経皮感作を増強しないことが示された。

なお、i.p.投与と異なり経皮感作の場合は酸化亜鉛による急性毒性は観察されなかった。

1, 第 7 回食品および飼料におけるナノテクノロジー・リスクアセスメント (FSA 科学ネットワーク)

今回の会議では、2018 年の 1 月に予定されている「食品および飼料連鎖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：第 1 部、ヒトおよび動物の健康」のパブコメのドラフトについて議論が行われた。

EFSA は、食品および飼料連鎖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リスクアセスメントの人間および動物の健康（第 1 部）に関するこのガイダンスを作成した。これは、EFSA に付託された新規食品、食品接触材料、食品/飼料添加物および殺虫剤を含む分野をカバーしている。このガイダンスは、以前（2011 年）のガイダンスの発表以降に得られた新しい知見を考慮に入れている。将来的には、新規食品、食品/飼料添加物、殺生物剤、殺虫

剤、殺虫剤、殺虫剤および食品接触材料の各分野で適用されるナノコンポジットやナノカプセルにおける知見も考慮される可能性がある。ガイダンスは、ナノ物質の物理化学的特性、暴露評価、およびハザード特性に関するより多くの洞察と関連性のある新しい科学的研究を取り入れている。具体的には、材料がナノマテリアルであるかどうかを判定すべき重要なパラメータ、ナノマテリアルのキャラクタリゼーションに使用できる手法と技術、複雑なマトリックスの中での測定方法について、ナノマテリアルの物理化学的特徴付けについて詳細に説明している。また、暴露評価とハザードの同定とキャラクタリゼーションに関連しても詳細に記載している。特に、*in vivo/in vitro*の毒物学的研究に関するナノ特異的考察が議論され、毒物学的試験のための段階的フレームが概説されている。初期的段階の結果に応じて、生殖毒性、発生毒性、免疫毒性、アレルギー誘発性、神経毒性、腸内微生物への影響、および内分泌活性を調べる研究が必要となるかもしれないことや、データギャップを補完するためのリードアクロス法の適用の可能性として、ナノ物質の *in vitro* 試験に関連する一般的な問題に加えて、*in vitro* 消化試験、トキシコキネティクス、遺伝毒性についても触れている。統合化試験戦略 (ITS) や MOA の潜在的な使用も議論している。ガイダンスでは、リスクの特徴付けと不確実性分析へのアプローチを提案し、この分野におけるさらなる研究のための勧告も提供している。

食品および飼料連鎖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：第1部、ヒトおよび動物の健康の概要

物理化学的特徴付けについては、EC が推奨する定義に従って材料がナノマテリアルであるかどうかを確認し、特定するために、NanoDefine プロジェクトによって開発された決定フロースキームがこのガイダンスに例示

されている。EC の定義は現在審議中ではあるが、ナノスケールと見なされる (1~100nm となる) 粒子の数が 50%以上となるものをナノマテリアルとしており、この定義の使用を推奨している。

原則としては、暴露評価とリスク評価とともに危険有害性の同定/特徴付けに基づく化学物質の現在のリスクアセスメントのパラダイムは、ナノマテリアルにも適用可能である。しかし、粒状材料のサイズをナノスケールに縮小することは、対応する非ナノ材料と比較して毒物学的影響に変化をもたらす特性の違いや生体動態的挙動をある程度変化させる可能性があるため、本ガイダンスの規定に従ってナノマテリアルの安全性評価を実施しなければならない。

ナノマテリアルのリスク評価の前提条件として、粒子表面 (コーティングを含む) 上の物質だけでなく、コアに相当する部分のナノマテリアルの構成要素と不純物の明確な特徴付けも必要とする。物理化学的パラメータに関する情報は、ナノ材料の潜在的な毒性の重要な指針を提供することもでき、適切な試験戦略を決定するのに役立つ。また、ナノ材料のキャラクタリゼーションは、異なる段階で実施されることが推奨されている。ガイダンスには、パラメータの測定に使用できる現在利用可能な方法とツール、および考慮すべき品質管理の側面の概要も記載されているが、粒子サイズ分布は、複数の独立した技術 (そのうちの1つは電子顕微鏡法) によって決定されるべきであることを推奨している。

溶解によって引き起こされる高い分解性により、ナノ材料が対応する非ナノ材料形態に変化することにも注目すべきである。このガイダンスに記載されているナノ特異的な評価は、食品製造および加工プロセスの生理学的条件下あるいは食品マトリックスおよび胃腸系でイオンまたは分子に急速に分解しない物質が局所または全身レベルで生物学的実体と相互作用

用する機会を評価する。

セクション全体をとおしてガイダンスは、ナノ特異的データのいくつかの測定要件が免除される可能性を示している。例えば、ナノ材料の使用時にはナノマテリアルとして局所的または全身的な暴露をもたらさないケースや、食物接触材料からナノマテリアルの食品への移動がないことが示されるケースがある。また、ナノマテリアルは同じ物質で、材料サイズ、結晶形、形状、表面特性などが異なるいくつかの形で開発できるため、ケースバイケースによる個別評価を避けるためのグループ化/リードアクロス手法による評価の可能性について説明している。

食品/飼料を介したナノ物質の暴露評価の原則は、非ナノ物質の場合と本質的に同様の暴露シナリオの可能性を考慮する必要がある。間接的な暴露（例えば、食物接触材料からの移動や、餌を摂取した動物を経由した食品などへのキャリアオーバーなど）の可能性がある場合は、ナノマテリアルまたはその分解生成物が食品/飼料マトリックス中に粒子として存在したままであるかどうかを決定すべきである。暴露データが得られない場合、または複合マトリックス中のナノ粒子の特性および量を決定することができない場合は、最悪のシナリオとして、食品/飼料製品に添加されたすべてのナノ物質が存在し、摂取され、ナノマテリアルとして吸収されると仮定する。

第6章では、毒物学的有害性の同定と毒性評価のためのナノマテリアルの試験のための段階的アプローチを概説し、適用可能な *in vitro* および *in vivo* 試験が説明されている。提案されたアプローチでは、最初のステップで、ナノマテリアルの胃腸管での分解性を評価するための、胃腸管を代表する条件下での *in vitro* 試験を行う。ナノマテリアルが急速に分解しない場合には、その定量化および特性化されるべきである。胃腸管内の条件下で高い分解速度が示される場合は、関連する非ナノ材料に関する

EFSA ガイダンスに従って評価されるべきである。

急速に分解しないナノマテリアルのみが、ステップ1（一連の *in vitro* 試験や情報収集）の下で試験することが考慮される。特に、ナノマテリアルまたはその成分の発癌性、突然変異誘発性、生殖毒性（CMR）に関する情報は、ステップ1で検討される。模擬リソソーム条件下での分解試験も実施され、ナノ物質の特定の特性を考慮した遺伝毒性を含んだ *in vitro* 毒性試験バッテリーを実施する。

ステップ1の情報でナノ物質が生体内で残留性が無く非遺伝毒性である場合には、ステップ2以降の評価を避けることができるかもしれないが、現状では従来の（ナノ以外の）物質に対する安全性評価が依然として必要である。ステップ2には、経口吸収および組織分布の評価を行うためのサテライト群を行う TG 407 試験の拡張パラメータを含むように修正された 90 日間反復投与試験（OECD TG408）が行われる。これらの試験から得られた陽性の結果は、ステップ3のより詳細な調査を必要とするかもしれない。ステップ3では、長期暴露中のナノマテリアルの蓄積性を調査し、実験動物とヒトとの胎内動態の違いを調べる。これらの研究により、不確実性を減少させることによってリスクアセスメントを改善することができる。ステップ3ではまた、神経毒性、免疫毒性または内分泌系への影響の専門的かつ詳細な試験を含む。食物からの潜在的な長期暴露を考慮すると、腸内微生物に対するナノ物質の潜在的影響は、特にナノ物質が抗菌効果を有する場合に考慮されるべきである。

一般に、ナノマテリアルのリスクキャラクターリゼーションは、従来の化学物質と同じ要素、すなわち、物理化学的性質、暴露および毒物学的影響に関するデータおよび情報を考慮して行われる。検証された方法を用いて適切に実施された研究から得られたデータでナノ特異的な問題を考慮すると、従来の材料に使用されて

いるものよりも大きな不確定係数を使用する必要はない。しかし、データが不十分であるか、不的確なテストであった場合、ナノマテリアルの安全性評価のために追加の不確定係数を適用することが検討されうる。

ガイダンスはまた、代替試験法アプローチ、MOA および AOP に関連して現在開発中の分野についても指摘している。

2, 第5回食品成分および食品包装 (FIP) ユニットの科学的ネットワーク 食品接触材料 (FCM) のユニット、「EFSA FCM ネットワーク」

本会議の議題として、食品接触材料の印刷インキに使用される物質の安全性評価が取りあげられ、インキ中のナノマテリアル測定や評価について関心が持たれた。

印刷インキは通常、溶媒、高分子バインダー、添加剤、および着色成分の4つの主要成分からなり、ほとんどが着色成分として顔料を含む。印刷されたインク膜の高い光沢および高い透明性を達成するためには、顔料粉末中の凝集物および凝集物を分割して細かく分散させると共に、分散させた顔料粒子を安定させなければならない。乾燥した印刷インキフィルムは、通常1~1.5 μ mの厚さであり、したがって、埋め込まれた粒子の全ては、通常、1 μ mよりかなり小さい。実際には、これらの材料が上記の目的のために特別に製造されていないとしても、すべての印刷インキはナノオブジェクトを含む。液体印刷インキサンプルの分析には、小角X線散乱 (SAXS) および動的光散乱 (DLS) は適しておらず、レーザー回折分析及び光子相関分光法 (PCS) が使用されている。レーザー回折分析による分散有機顔料上の粒子分布の測定は、印刷インキ中の顔料が<100nmの範囲に相当なパーセンテージを含むことを証明している。また、走査電子顕微鏡 (SEM) でも<100nmの範囲の粒子を確認できる。レーザー回折分析の結果は、平均粒子サイズとして Cu-フタロシアニンについて 80~90nm であり、二酸化チタンにつ

いて 200~300nm であった。小板状のアルミニウム顔料は、30~40nmの平均厚さを有するため、ナノ材料としても明確に考慮する必要がある。

EuPIA (European Printing Ink Association) は、食品接触材料用の印刷インキに使用される物質の安全性評価がどのように行われるかを紹介した。照会の中で、その方針、主要なコンセプトの文書作成およびプロセスが示された。最初の評価ステップでは原材料の選択のための一般的な基準を示した。続いて、以下の3つの原則を含むリスク評価プロセスが行われる。

- 完全に評価された物質 (例えば Union リスト)
- 公開毒性データに基づく自主的 TDI または SML
- TTC 概念に基づく自主的 TDI または SML

暴露評価においては EU キューブモデルがデフォルトとして使用され、必要に応じて、EFSA 食品消費データや FACET などの他のモデルも使用できる。(これらの暴露評価を行うためのガイダンスが 8 月に公表されている。) 非意図的添加物や公的にリスト化されていない物質については、REACH 登録情報から有害性情報等を入力しているが、EFSA から、これらの情報は当局が評価していない情報が含まれるので注意すべきであるという提言を受けた。一方、EuPIA ではまだ評価に生物学的試験を導入していないが、将来的には取り込むべきであることが示された。インクの移行量が 10ppb を超えると予想される場合には、物質の評価申請書をドイツとおよびスイス当局に申請することを業界に推奨している。ナノフォーム顔料に関する活動については、EuPIA はドイツのペイントとインク協会「German Paint and Ink Association」が、ナノスケールの顔料粒子の食品パッケージの印刷層から食品への移行挙動の分析」ドイツ連邦栄養農業省 (BMEL) と BfR との間で議論が行われていることを紹介した。

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、CT並びに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、ヒトで皮膚感作性を示すHWPについて、OVAと同等の低濃度暴露による抗原作用の有無を検討した。その結果、今回の条件においては、陽性アジュバント物質として検討した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。前年度、CTを用いた検討では明らかなアジュバント作用を認めており、今後、再現性及び濃度依存性など更なる検討が必要であると考えられた。また、HWPはOVAと同程度の低濃度でも十分な抗原性を示し、皮膚感作性試験の有望な抗原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。しかし、今回の検討ではCTBの明らかなアジュバント作用は認められなかった。

更に、これまでの検討で明らかなアジュバント効果を示してきたCTもアジュバント作用を示さなかった。CTBについては1 µg CTと同じモル数に相当する、0.7 µgを投与したが、今までの検討で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い。今後はより高濃度でのCTBの検討が必要であると考えられた。今回の実験でCTの明らかなアジュバント作用が見られなかったことについて、CT群のOVA抗原特異的IgE及びIgG1値がOVA群に比べ増加傾向はあったものの、有意な増加を示さなかったことから、OVAの濃度の最適化が必要と考えられた。

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))。健康問題になっているグルパール19Sのような小麦タンパク加水分解物、HWPを用いて、OVAに代わる抗原物質としての有効性を検討した。小麦タンパク、グルテンの酸加水分解0.5時間のSDS-PAGEのパターンは100 kDa以下に広くスミアなパターンを示したが、酸加水分解0時間のSDS-PAGEのパターンより高分子の産生も認められた。一般的にペプチド結合の加水分解に関して、酸性条件では可逆反応であり、逆反応が進行する可能性があるため、一旦生成したペプチド鎖がまた別のペプチド鎖と結合し、鎖長の長い新たなアミノ酸配列が出現する可能性が考えられる。OVAの場合、2 µgという低濃度で抗原性を示すが、今回検討したHWPも5.4 µgで抗原性を示し、経皮感作性試験の抗原としての有効性が認められた。更に、惹起時の抗原濃度がOVAを用いた実験の約30%に過ぎなかったにも関わらずHWP 27 µg以上の群で明らかなアナフィラキシー反応を示した。皮膚病変におい

ても、HWP 5.4 µg 以上の群で有意に高いスコアを示した。以前検討したグルパール 19S に比べ、HWP は弱いながら皮膚毒性を有する可能性等が考えられる。皮膚毒性を示さず、かつ抗原性を維持する濃度の検索が必要と考えられた。

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た。28 年度は抗酸化剤 NAC を用いた検討から、AgNP による急性毒性のメカニズムの一つとして酸化ストレスの関与が考えられた。本年度は、そのメカニズムを更に明らかにするため、実験 3) においては、AgNP の表面積を考量した投与量で腹腔内投与を行い、その影響について検討し、実験 2) においては、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た。

AgNP の表面積を考量した投与量による検討において、AgNP 10、60 及び 100 nm の表面積は各々 55.1、9.4 及び 5.4 m²/g であることから AgNP 60 及び 100 nm 群の投与量は AgNP 10 nm 群の各々 6 及び 10 倍に設定した。投与 6 時間後、何れの AgNP 投与群でも体温の低下及び明らかな臨床症状は見られなかった。また、AgNP 10 nm 群で肝臓における肉眼病変及び肝臓並びに胆嚢における病理組織学的変化が認められたが、28 年度までの検討で観察された変化より弱い病変であった。28 年度までの検討において、AgNP の投与量は 300 µl/マウスであったが、今回の検討では被験物質の納品時の濃度から全群 2 ml/マウスで行うことになった。27 年の研究から Balb/c マウスに AgNP の急性毒性は少なくとも AgNP 10 nm 0.02 mg 以上が必要と考えられたが、今回の結果から、AgNP の急性毒性は総暴露量のみならず、暴露濃度によっても影響を受ける可能性が考えられた。また、AgNP 10 nm 群では肝臓及び胆嚢の病変が Vehicle 群に比べ有意に高頻度に認められたが、その 6 及び 10 倍の量を投与した AgNP 60 及び 100 nm 群の肝

臓及び胆嚢において、AgNP による病変は認められなかったことから、AgNP の毒性はサイズ依存性であることが示唆された。

肝臓及び血中の銀濃度について、AgNP 投与後の肝臓中の銀濃度は AgNP 10 nm 群より投与量の多かった AgNP 60 及び 100 nm 群で 6 時間及び 24 時間まで高い濃度に達し、維持したが、2 群間の平均値に大きな差がなかったことから、腹腔内投与したナノ銀が肝臓内に蓄積可能な量には限界があることが示唆された。又、肝臓内の銀濃度と病変には相関がないことから 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。今回の検討で用いた ICP-MS は金属イオンのみを検出できることから、肝臓内に存在する AgNP が粒子のままなのか、イオン化したのかは不明である。28 年度の結果から AgNP 溶液の超遠心上清における銀濃度は、AgNP 10 nm 群で 60 及び 100 nm 群に比べ高い値を示し、AgNP のサイズによるイオン化の違いが示唆された。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も議論が続いている (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。一方、AgNP 10 nm 群の肝臓内濃度は経時的な減少がみられ、60 及び 100 nm 群と異なる動態を示した。AgNP の急性毒性は肝臓内蓄積量より初期暴露量及び粒子のサイズに相関することが明らかとなった。毒性が投与濃度によって観察されにくくなる問題についてはさらなる検討が必要と考えられた。

AgNP の急性毒性における様々な抗酸化剤の影響を調べたところ、NAC を除く何れの投与群でも明らかな抑制作用は認められなかった。直接活性酸素類を消去する Vit C 及び Vit E よりも GSH の前駆体である NAC の方が AgNP の急性

毒性を有効に抑制された。NAC は 28 年度の
研究においても同様の結果を示した。NAC のみ
ではあるが、抗酸化剤の投与によって AgNP
による毒性が著しく抑制されたことは、少な
くとも一部は酸化ストレスによる AgNP の毒
性メカニズムの関与を支持する結果と考えら
れた。また、GSH 合成抑制剤である BSO による
毒性亢進作用も観察されなかった。BSO は
GSH 生合成に重要な役割を果たす酵素である
γ-グルタミルシステインシンセターゼを阻害
することにより、GSH 欠損を誘導し、細胞内
プロセスにおける GSH の役割を検討するた
めに用いられる (Drew R et. al., Biochemical
Pharmacology, 1984;33 (2989-2994))。今回
の検討で認められた AgNP の急性毒性は 26
~28 年度までの検討で認められた臨床症状
などに比して弱い傾向はあるものの、病理組
織学的検討において、同様の病変が観察さ
れた。臨床症状及び病理組織病変の強弱は
被験物質のロット差などが考えられた。

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
て検討する予定であり、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。

抗原 i.p. 時に酸化亜鉛 B (35 nm) を共存
させたところ、感作を増強する効果が見ら
れた。また、先行研究において使用した酸
化亜鉛 A (25 nm) 及び酸化チタン D (ア
ナターゼ型、15 nm) についても、i.p. 感
作を増強する効果が見られた。先行研究
では、この他に、酸化チタン A (ルチル
型、15 nm)、酸化チタン B (ルチル型、
35 nm)、酸化チタン C (アナターゼ型、
6 nm) についてもこのような増強効果がある

ことを示している。従って、酸化チタン、
酸化亜鉛等のナノマテリアルは、抗原 i.p.
による感作においてアジュバント効果を示
すことが明らかとなった。但し、酸化亜鉛
の i.p. では急性毒性が認められた。酸化
亜鉛 A, B の高用量群 (10 mg 投与) では、
1 次免疫の翌日までに各群 5 匹全匹が死
亡し、酸化亜鉛低用量群 (2 mg 投与) では
感作期間中に 5 匹中 2 匹が死亡した。酸
化チタンではこのような急性毒性は見られ
なかった。酸化亜鉛 A の方が酸化亜鉛 B
と比較してより強い毒性が見られたこと
から、粒子径が小さい方が強い毒性を示
す可能性が考えられた。また、酸化チタン
を共存させた場合は、Alum と同様に OVA
特異的 IgE 及び IgG1 の産生が増強され、
IgG2a 産生は見られなかったのに対し、
酸化亜鉛を共存させた場合は IgG2a 産
生の増強効果も見られた。これらの結果
から、酸化亜鉛と酸化チタンでは生体影
響が異なることが示された。これは化学
的特性の違いを反映しているものと考え
られる。

一方、酸化チタン B、酸化亜鉛 B 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、経皮感作を増強する効
果は見られなかった。先行研究では、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こと、
また、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。こ
れらの結果、及び本研究における酸化チ
タン B の結果より、酸化チタンの経皮感
作増強効果は粒子径により異なり、粒
子径が小さい酸化チタンの方が経皮感
作増強効果が大きいことが示された。ま
た、酸化亜鉛の場合も、先行研究にお
いて、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こと
から、酸化チタンの場合と同様に、こ
の増強効果は粒子径に依存している可
能性が示唆された。

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。本研究の結果は、この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たものである。これまでの検討結果を考えると、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も示されており、やはり注意すべきであろう。

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。

「食品および飼料連鎖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」が 2011 年のガイダンスの公表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が示されたものになっているが、まず、依然ナノマテリアルの定義について、EC の定義との整合性とケースバイケースで決定される科学的な判断についてどちらに従うべきなのかについて曖昧になっている。また、EC のナノマテリアルの定義に明確に含まれていない物質を評価する際ための指針にいくつかの状況が概説されているが、一般論としては一般食品法とこのガイダンスの原則が適用されことになる。例えば、ナノスケールに関連する特定の特性に起因する潜在的なリスクは、それらの特性および関連する危険性に焦点を当てて評価されなければならないが、

100nm 未満のサイズ of 材料を構成する粒子の割合とは無関係である可能性がある。また、このようなサイズの構成割合に関して閾値を確立する科学的根拠はなく、分析技術における不確実性や検出の限界の問題がある。さらに、ナノスケールの特性を保持する 100nm 超の粒子に関しては、この意味におけるナノマテリアルの最大サイズを確立することはできないと考えられる。これらのことから、単純にサイズの問題で評価指針の切り分けを行うことには慎重であるべきであろう。また、ガイダンスには、網羅的な評価手法が記されているが、申請者が申請に必要なある最小限の情報が、ガイダンスに記載されている広範なリストから明確化しにくいようである。申請者が全ての特性を評価するのは非現実的であり、網羅的なパラメータが全てのナノマテリアルに必要というわけでは無いが、妥当性の説明は申請者に任されている。

評価スキームの中でその後評価のステップを分けることとなる重要なステップとしては胃腸管内での分解性を評価する *in vitro* 分解性試験があるが、ガイダンスでは、その急速に分解されるかどうかを判定するための閾値が提案されている。しかし、一般の化学物質とは異なり、ナノマテリアルについての標準化された手法は未だ確立されていない状況であり、将来的には修正・改良される可能性があると考えられる。また、ガイダンスにはナノマテリアルの評価において妥当性のある様々な *in vitro* 試験について例示されているが、さらなる試験が必要かどうかについての指針は示されていないとい課題もある。

一方、ガイダンスで今回提案された 90 日の反復投与毒性試験は、サテライト試験の追加によりこれまでより多くの動物を使用することが指摘されている。より長期の試験を行うことを回避するための方策ではあるが、将来的にはより効率的な評価法に置き換えていくことが検討されると考えられる。

食品接触材料 (FCM) ネットワーク会議では、従来その懸念が指摘されてきた、印刷用インク顔料に含まれるナノサイズの顔料についても議論が及んできたことを示している。しかし、食品接触材料の評価では、一般化学物質としての顔料の評価手法の確立自体もこれからの課題であり、未だナノマテリアルとしての評価を議論するには、科学的知見も含めてさらなる知見の収集が必要であると考えられた。

E. 結論

今回、経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果を調べる本モデルの改善を目的に、新しい抗原物質及び陽性アジュバント物質について検討した。我々が実施した、HWP の経皮暴露後、HWP を腹腔内投与する実験において、HWP は OVA と同程度の低濃度でも十分な抗原性を示し、皮膚感作性試験の有望な抗原であることが明らかとなった。また、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 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。今後、再現性及び濃度依存性など更なる検討が必要であると考えられた。

本研究では、AgNP の急性毒性について、AgNP の表面積を同等とした投与量の影響及び様々な抗酸化剤の影響について検討した。その結果、AgNP 10 nm 6 時間群において、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。又、病変と肝臓内の銀濃度とは相関がないことから AgNP の急性毒性は粒子のサイズに依存することが再確認できた。直接活性酸素類を消去する Vit C 及び Vit E よりも GSH の前駆体である NAC の方が AgNP の急性毒性を有効に抑制した。抗酸化剤の投与によって AgNP による毒性が著しく抑制できたことは、少なくとも一部は酸化ストレスによる AgNP の毒性メカニズムを支持すると考えられた。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酸化ストレスに関する解析を進めることにより、食品の安全性確保に資する知見を集積することが重要である。

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チタン及び酸化亜鉛について、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。今回用いた酸化チタン (ルチル型、35 nm) 及び酸化亜鉛 (35 nm) では、抗原 i. p. 時のアジュバント効果は見られたが、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。今後は経皮感作-経口惹起の動物モデル実験系により、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暴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ている。29 年度は、欧州食品安全機関 (EFSA) が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワークおよび、食品接触材料の科学ネットワークに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「食品および飼料連鎖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」の作成を行っており、ナノマテリアルの科学ネットワークではガイダンスのパブコメに向けた議論が行われた。ガイダンスには、より詳細な分析法や *in vitro* 分解性などを用いた評価基準、ナノマテリアルに適用可能な生物学的試験 (*in vivo/in vitro*) 法に関して網羅的な情報を収載したものになっていることが示された。

また、食品接触材料の科学ネットワークでは、容器等の印刷用インクに含まれるナノサイズの顔料に関する分析法や今後の評価の方向性について関心が高まっていることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K: Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol.* 2018, 31:73-80.
- 2) Shoji M, Adachi R, Akiyama H. Japanese food allergen labeling regulation: an update. *J AOAC Int* 2018, 101: 8-13.
- 3) Abdelgied M., El-Gazzar A., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou K. A., 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.*, 2018 May 17. doi: 10.1111/cas.13643. in press.

2. 学会発表

- 1) 曹永晩, 水田保子, 赤木純一, 豊田武士, 小川久美子: 経皮暴露感作性試験におけるコレラトキシン及びコレラトキシンBサブユニットのアジュバント作用. 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2018. 1. 26)
- 2) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K: Adjuvant effects of transcutaneously exposed cholera toxin and its B sub-unit. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2018. 3. 12)
- 3) 曹永晩, 赤木純一, 水田保子, 豊田武士, 小川久美子: サイズによって異なるナノ銀の急性毒性. 第44回日本毒性学会学術年会

(2017. 7. 12)

- 4) 為広紀正, 安達玲子, 木村美恵, 酒井信夫, 崔 紅艶, 最上 (西巻) 知子, 近藤一成. ナノ酸化チタンの結晶構造の違いが抗原の経皮感作性に与える影響
第44回日本毒性学会学術年会 (2017年7月)
- 5) 酒井信夫, 田原麻衣子, 曾我慶介, 安達玲子, 近藤一成, 五十嵐良明. ヒト急性単球性白血病細胞株 (THP-1) より分化誘導した樹状細胞様細胞の抗原提示におけるナノ酸化チタン共存の影響について
第24回日本免疫毒性学会学術年会 (2017年9月)
- 6) Adachi R, Tamehiro N, Sakai S, Kimura Y, Cui HY, Nishimaki-Mogami T, Kondo K. Enhancement of transdermal protein sensitization by titanium dioxide nanomaterials.
57th SOT Annual Meeting & ToxExpo (2018年3月)
- 7) Akihiko Hirose. International trends and necessity of chronic studies on risk assessment of nanomaterials. 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄
- 8) 坂本義光, 広瀬明彦, 中江 大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の経気管投与ラットに見られた肺胞過形成病変の免疫組織学的性状, 第76回日本癌学会学術総会, 横浜 (2017年9月28日~30日)
- 9) 北條幹, 坂本義光, 山本行男, 村上詩歩, 長谷川悠子, 前野愛, 五十嵐海, 湯澤勝廣, 生嶋清美, 多田幸恵, 清水本武, 長澤明道, 久保喜一, 安藤弘, 海鉦藤文, 田中和良, 矢野範男, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大: ラットにおける多層カーボンナノチューブおよびクリソタイル誘発中皮腫の病理学的性状の比較, 第34回日本毒性病理学会学術集会, 那覇 (2018年1月25日~26日)
- 10) 坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ

の経気管反復投与によりラット肺に誘発された増殖性病変の免疫組織学的解析, 第34回日本毒性病理学会学術集会, 那覇 (2018年1月25日~26日)

- 11) Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, David Alexander, William Alexander, Takamasa Numano, Satoru Takahashi, Hirotugu Takase, Akihiro Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate (K₂₀·8TiO₂) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury - A comparative study to titanium dioxide nano particles. 第44回日本毒性学会学術年会, 7月10-12日、横浜
- 12) Ahmed M. El-Gazzar¹, Mohamed Abdelgied, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotugu Takase, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi, Ashraf Mohamed Nazem, Osama Saeid Elokke and Hiroyuki Tsuda. Comparative Pulmonary toxicity of DWCNT and MWCNT-7 in Rats 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄
- 13) Mohamed Abdelgied, Ahmed M. El-Gazzar, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotugu Takase, Khaled Abbas Abdou, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi and Hiroyuki Tsuda. Potassium octatitanate fiber (K₂₀·8TiO₂) fiber is a potent inducer of lung

and pleural injury in male Fischer 344 rats: A comparative study of titanium dioxide nano particles 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄

- 14) Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2018) (2018.3.14 San Antonio, TX, USA)
- 15) Norihiro Kobayashi, Ryota Tanaka, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Developmental toxicity assessment of four different preparations of multi-wall carbon nanotubes in mice after repeated intratracheal instillation. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2018) (2018.3.14 San Antonio, TX, USA).

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

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）

分担研究報告書（平成29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 永暁（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、免疫毒性の有無について、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)においてコレラ菌由来毒素（コレラトキシン、CT）並びにその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、ヒトで皮膚感作性を示す小麦タンパク加水分解物（HWP）について、OVAと同等の低濃度暴露による抗原作用の有無を検討した。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群と比較して有意に増加を示したが、CT及びCTB投与による影響は認められなかった。一方、Vehicle群と比較してOVA処置群では惹起30分後の体温の有意な低下・低下傾向及び血中ヒスタミン濃度並びにアナフィラキシースコアの有意な増加・増加傾向が認められたが、CT及びCTB投与による影響は認められなかった。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IL-2、IL-4、IL-5及びIFN- γ 分泌については、CT及びCTB投与による有意な変化は見られなかった。実験2)については、0.5時間処理HWPはヒトで皮膚感作性を持つ物質と同様のSDS-PAGEパターンを示した。HWP 5.4、27及び135 μ g群で、血中のHWP特異的なIgG1及びIgEがVehicle群と比較して有意に増加を示した。一方、Vehicle群と比較してHWP 27及び135 μ g群で惹起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、IL-4、IL-5及びIFN- γ 分泌については、HWP投与による有意な変化は見られなかった。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。前年度、CTを用いた検討では明らかなアジュバント作用を認めており、今後、再現性及び濃度依存性など更なる検討が必要であると考えられた。また、HWPの経皮暴露後、HWPを腹腔内投与する実験において、HWPはOVAと同程度の低濃度でも十分な抗原性を示し、皮膚感作性試験の有望な抗原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。

キーワード：ナノ銀、経皮感作性、小麦タンパク加水分解物、コレラトキシン、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 (Bergin IL et. al., *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol.* 2013;3. doi: 10.1504/IJBNN.2013.054515.)、経皮あるいは静脈内投与試験では脾臓への影響が報告されている (Korani M et. al., *Int J Nanomedicine.* 2011;6, 855-862, Schäfer B et.al., *Arch Toxicol.* 2013;87, 2249-2262)) もの、十分な評価は行われていない。また、免疫毒性についての報告は限られている (Shin S-H et al., *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology.* 2012;4 (222-227))。AgNP のサイズによる毒性の違いについて、細胞を用いた検討では可能性が指摘されているが (Park MVDZ et. al., *Biomaterials.* 2011;32 (9810-9817))、動物を用いた検討での報告はない。更に、AgNP の経皮暴露濃度による免疫毒性に及ぼす影響に関する報告も乏しい。

一方、AgNP は、食品・食品容器包装用途として経口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ギー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、他のアレルギー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。

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。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)。

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、CT 並びに 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、ヒトで皮膚感作性を示す小麦タンパク加水分解物 (HWP) について、OVA と同等の低濃度暴露による抗原作用の有無を検討した。

B. 研究方法

実験 1)

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

卵白アルブミン (OVA) と AgNP の経皮感作後、OVA の腹腔内投与惹起による免疫毒性に関して、コレラトキシン (CT) のような毒性を示さないコレラトキシン B サブユニット (CTB) のアジュバント効果を検討するため、OVA をアジュバントの陽性対照であるコレラトキシン (CT) 又はコレラトキシン B サブユニット (CTB) 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。

抗原懸濁液は OVA (Sigma A5503-1g)、CT (LBL 101B) 及び CTB (LBL 103B) を各々 2、1 及び 0.7 µg/50 µL /マウスとなるよう 2 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.4-7.6) に加えて投与する前に調製した。1 µg CT 中には約 0.7 µg の CTB が含まれている。

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とし、各群は以下の通りに構成した、① Vehicle 群、② OVA 群、③ OVA + CT 群、④ OVA + CTB (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。パッチの上からマウス用ジャケットを巻いてパッチを保護し、剥脱を防いだ。3 日間の感作後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1クールとし、4 クールの感作後、血中の OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体を ELISA 法で測定した。アレルギー反応の惹起は Day 25 に、感作抗原 1 mg を腹腔内投与して行った。OVA の腹腔内投与 30 分間後のマウスの直腸内体温変化及びアナフィラキシー症状を観察し、症状については基準 (Figure 5) に従ってスコアリングした。また、惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血漿中ヒスタミンの濃度を、Histamine EIA Kit (SPI-BIO) にて測定した。解剖時に採

取した脾臓細胞は再懸濁後、OVA (最終濃度 10 µg/ml) を添加、37°C 24 時間、又は 72 時間培養し、培地中のサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2、IFN-γ 及び IL-17A の濃度を、ELISA フローサイトメトリー法を用いて測定した。

更に、全身状態観察、体重、脾臓重量、腋窩および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)

グルテン (Sigma G5004) を 100 mg/mL となるよう 1M Tris (pH 11.4) に加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を調製した。経皮感作にはストック懸濁液を PBS で 10 倍希釈し、pH を 8 付近に調整したものをを用いた。

グルテン加水分解物 (HWP) については、グルテンのストック懸濁液に 1M 塩酸を加えて pH を約 2 に調整し、100°C のヒートブロック上で、0.5 時間加熱した。その後、1.5M 水酸化ナトリウム水溶液で中和して加水分解反応を停止させ、グルテン終濃度 10 mg/mL となるように PBS にて希釈した。分解 0 時間のサンプルは、1M 塩酸を予め中和した溶液中にグルテンストック懸濁液を加え、加熱は行わずに調製した。HWP は懸濁液の状態なので静置して上清を使用したため、BCA タンパク質アッセイにより上清のタンパク濃度測定を行うとともに SDS-PAGE により加水分解が進行したことを確認した。

動物実験において、Day 25 に行うアレルギー反応の惹起を感作抗原 270 µg を用いて腹腔内投与して行う以外は、実験 1 と同様に実施した。

各群は以下の通りに構成した、① Vehicle 群、② HWP 0.22 µg 群、③ HWP 1.1 µg 群、④ HWP 5.4 µg 群、⑤ HWP 27 µg 群、⑥ HWP 135 µg 群 (Figure 2)。

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。

(倫理面への配慮)

投与実験は熟練者による経皮並びに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

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 (Figure 3)。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 群と比較して有意に増加を示したが、CT 及び CTB 投与による影響は認められなかった (Figure 4)。また、いずれの OVA 投与群でも IgG2a の有意な変化は認めなかった。直腸内体温の変化については、惹起 10 分、20 分及び 30 分後、Vehicle 群と比較して全 OVA 群で統計学的に有意な体温の低下が認められ、OVA + CTB 群では惹起 5 分後から、体温の低下が示された (Figure 5)。30 分後に OVA 群、OVA + CT 群及び OVA + CTB 群では各々平均 3.2、4.4 及び 4.3 度の体温低下が認められた。体温が有意に低下した全ての OVA 処置群においては惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が

統計学的に有意に上昇していた (Figure 5)。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 2.8~3.2 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 (Figure 5)。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 においては、OVA + CT 群で Vehicle 群と比べ有意な増加が認められた (Figure 6)。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、OVA + CT 群で Vehicle 群と比較して有意な増加が認められた (Figure 7、Table 1)。OVA 群及び OVA + CTB 群で有意な増加はないものの、増加傾向を示した (Figure 7、Table 1)。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 $\times 100$ (%)) については、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で有意な増加又は増加傾向が認められた (Figure 7)。

実験 2)

グルテンの酸加水分解物を 3 回作製し、BCA タンパク質アッセイにより、懸濁液上清の濃度を測定した結果、平均 2.7 mg/ml であった。加水分解 0.5 時間の SDS-PAGE のパターンは 100 kDa 以下に広くスメアなパターンを示し (Figure 8)、グルパール 19S と類似した (厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「医薬部外品・化粧品に含有される成分の安全性確保に関する研究」分担研究報告書 (平成 24 年度))。グルパール 19S とパターンが類似している 0.5 時間分解物を取り上げ、マウスに対する経皮感作能を検討した。

暴露期間中の体重について、群間の差は認められなかったが、解剖時の脾臓の相対重量にお

いて、HWP 5.4 µg 群で有意な増加が示された (Figure 9)。感作 4 週後のマウスにおいて、HWP 5.4、27 及び 135 µg 群で、血中の HWP 特異的な IgG1 及び IgE が Vehicle 群と比較して有意に増加を示し、HWP 27 及び 135 µg 群で、IgG2a が有意に増加した (Figure 10)。直腸内体温の変化については、惹起 20 分及び 30 分後、Vehicle 群と比較して HWP 27 µg 以上の群で統計学的に有意な体温の低下が認められた (Figure 11)。30 分後に HWP 5.4、27 及び 135 µg 群では各々平均 0.4、2.0 及び 2.8 度の体温低下が認められた (Figure 11)。体温が低下した HWP 5.4、27 及び 135 µg 群においては惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意な上昇又は上昇傾向を示した (Figure 11)。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 HWP 処置群でも平均 1.4 ~ 3.0 と統計学的有意な高いスコア又は高い傾向のスコアであった (Figure 11)。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、何れのサイトカインにおいても、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 12)。皮膚病変のスコアリングを行った結果、HWP 5.4、27 及び 135 µg 群で Vehicle 群と比較して有意な増加が認められた (Figure 13、Table 2)。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 HWP 135 µg 群で有意な増加が認められた (Figure 13)。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 × 100 (%)) についても、Vehicle 群と比較して HWP 5.4、27 及び 135 µg 群で有意な増加が認められた (Figure 13)。

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、CT 並びに 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、ヒトで皮膚感作性を示す HWP について、OVA と同等の低濃度暴露による抗原作用の有無を検討した。その結果、今回の条件においては、陽性アジュバント物質として検討した 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。前年度、CT を用いた検討では明らかなアジュバント作用を認めており、今後、再現性及び濃度依存性など更なる検討が必要であると考えられた。また、HWP は OVA と同程度の低濃度でも十分な抗原性を示し、皮膚感作性試験の有望な抗原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。しかし、今回の検討では CTB の明らかなアジュバント作用は認められなかった。更に、これまでの検討で明らかなアジュバント効果を示してきた CT もアジュバント作用を示さなかった。CTB については 1 µg CT と同じモル数に相当する、0.7 µg を投与したが、これまでの検討で 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い。今後はより高濃度での CTB の検討が必要であると考えられた。今回の実験で CT の明らかなアジュバント作用が見られなかったことについて、CT 群の OVA 抗原特異的 IgE 及び IgG1 値が OVA 群に比べ増加傾向はあったものの、有意な増加を示さなかったことから、OVA の濃度の最適化が必要と考えられた。

近年、大きな話題になったある特定の小麦タンパク加水分解物（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)）。健康問題になっているグルパール 19S のような小麦タンパク加水分解物、HWP を用いて、OVA に代わる抗原物質としての有効性を検討した。小麦タンパク、グルテンの酸加水分解 0.5 時間の SDS-PAGE のパターンは 100 kDa 以下に広くスミアなパターンを示したが、酸加水分解 0 時間の SDS-PAGE のパターンより高分子の産生も認められた。一般的にペプチド結合の加水分解に関して、酸性条件では可逆反応であり、逆反応が進行する可能性があるため、一旦生成したペプチド鎖がまた別のペプチド鎖と結合し、鎖長の長い新たなアミノ酸配列が出現する可能性が考えられる。OVA の場合、2 µg という低濃度で抗原性を示すが、今回検討した HWP も 5.4 µg で抗原性を示し、経皮感作性試験の抗原としての有効性が認められた。更に、惹起時の抗原濃度が OVA を用いた実験の約 30%に過ぎなかったにも関わらず HWP 27 µg 以上の群で明らかなアナフィラキシー反応を示した。皮膚病変においても、HWP 5.4 µg 以上の群で有意に高いスコアを示した。以前検討したグルパール 19S に比べ、HWP は弱いながら皮膚毒性を有する可能性等が考えられる。皮膚毒性を示さず、かつ抗原性を維持する濃度の検索が必要と考えられた。

E. 結論

今回、経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果を調べる本モデルの改善を目的に、新しい抗原物質及び陽性アジュバント物質について検討した。我々が実施した、HWP の経皮暴露後、HWP を腹腔内投与する実験において、HWP は OVA と同程度の低濃度でも十分な抗原性を示し、皮膚感作性試験の有望な抗原であることが明らかとなった。また、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 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。今後、再現性及び濃度依存性など更なる検討が必要であると考えられた。

F. 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）

曹永暁, 水田保子, 赤木純一, 豊田武士, 小川久美子: 経皮暴露感作性試験におけるコレラトキシン及びコレラトキシンBサブユニットのアジュバント作用. 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2018. 1. 26)

Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K: Adjuvant effects of transcutaneously exposed cholera toxin and its B sub-unit. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2018. 3. 12)

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

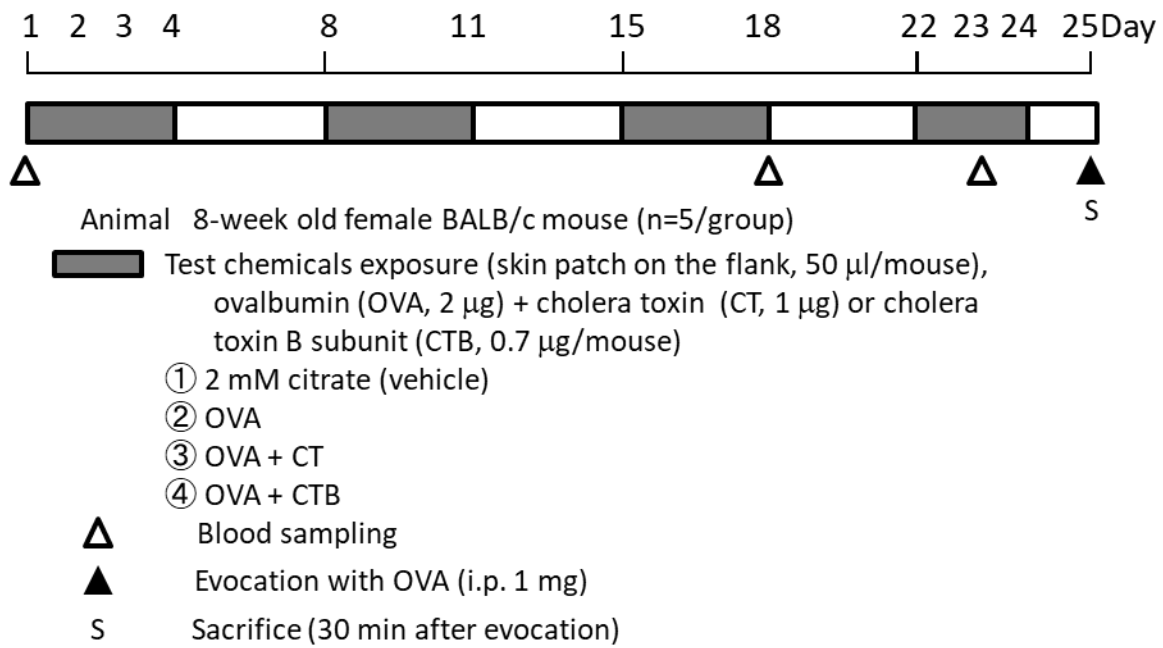


Figure 1. 実験デザイン (実験 1)

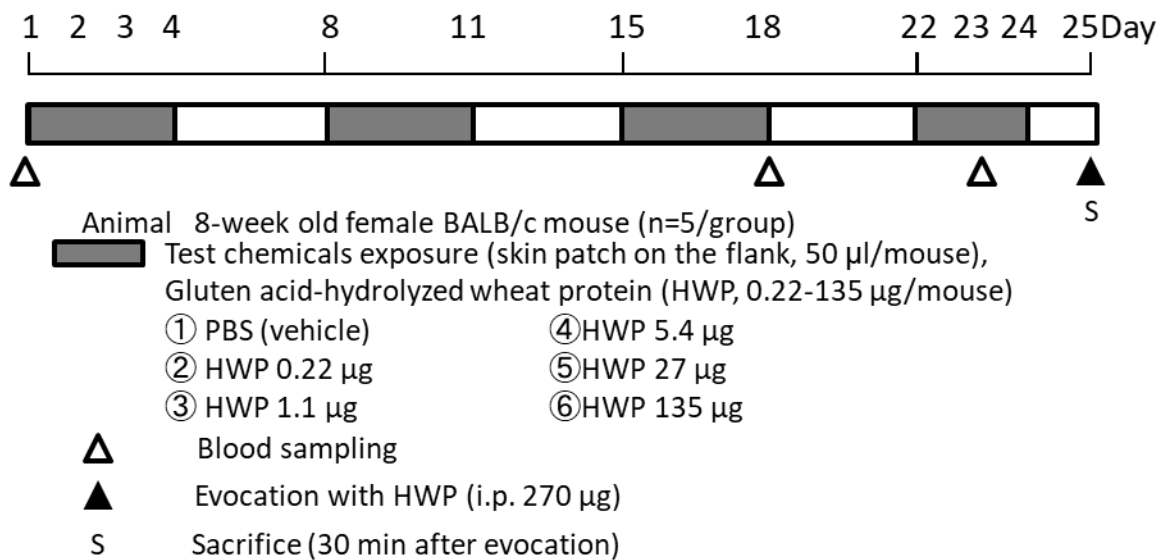


Figure 2. 実験デザイン (実験 2)

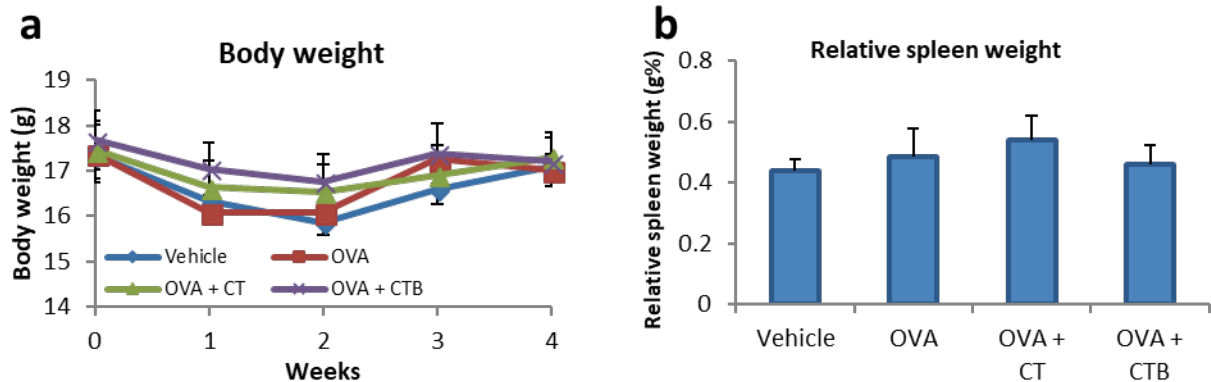


Figure 3. 体重 (a)及び相対脾臓重量 (b) (実験 1)

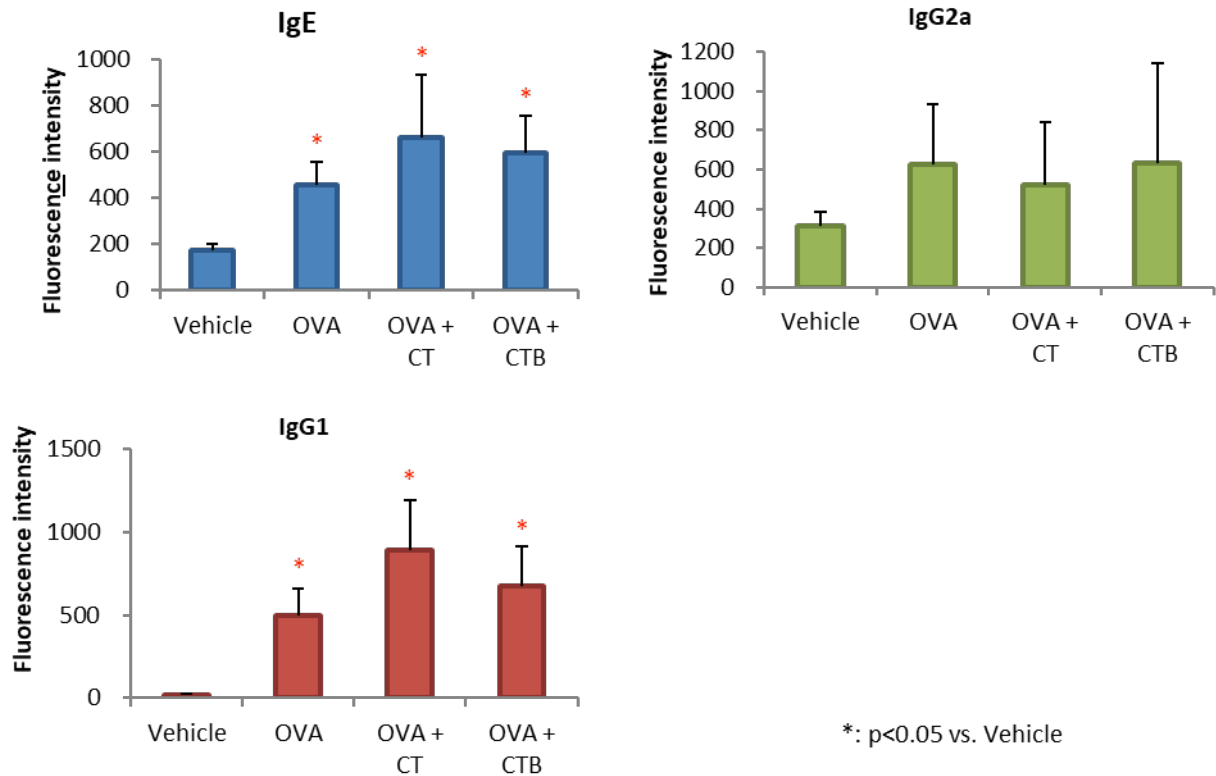
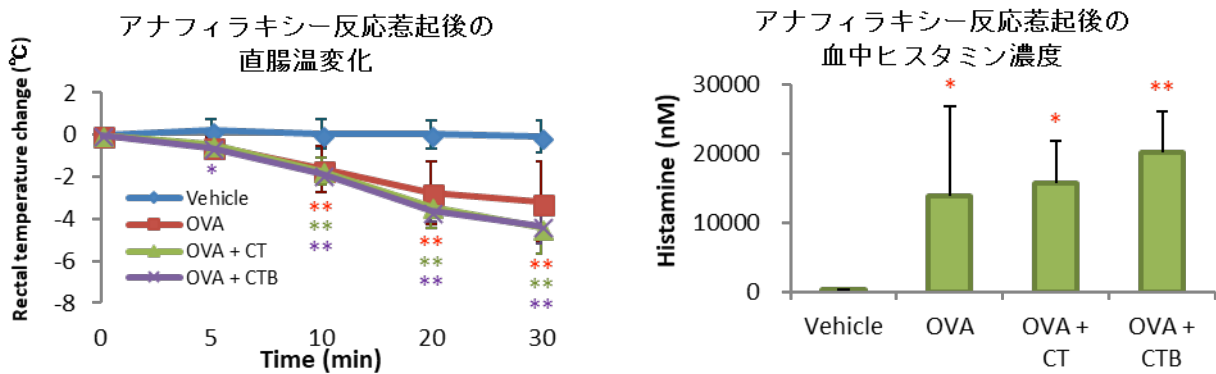


Figure 4. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 1)



アナフィラキシー症状のスコアリング

- Score 0 症状なし
- 1 □、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

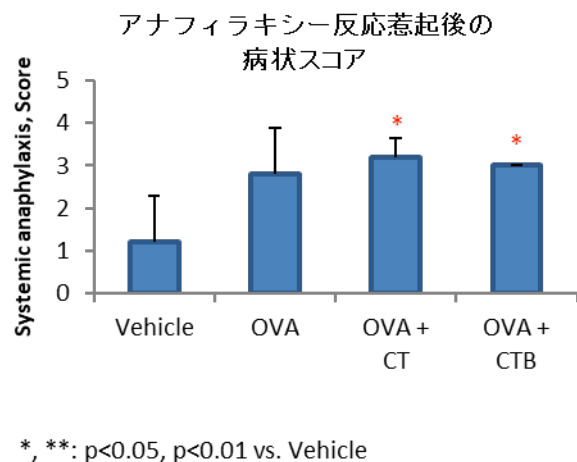


Figure 5. アナフィラキシー反応惹起の反応 (実験 1)

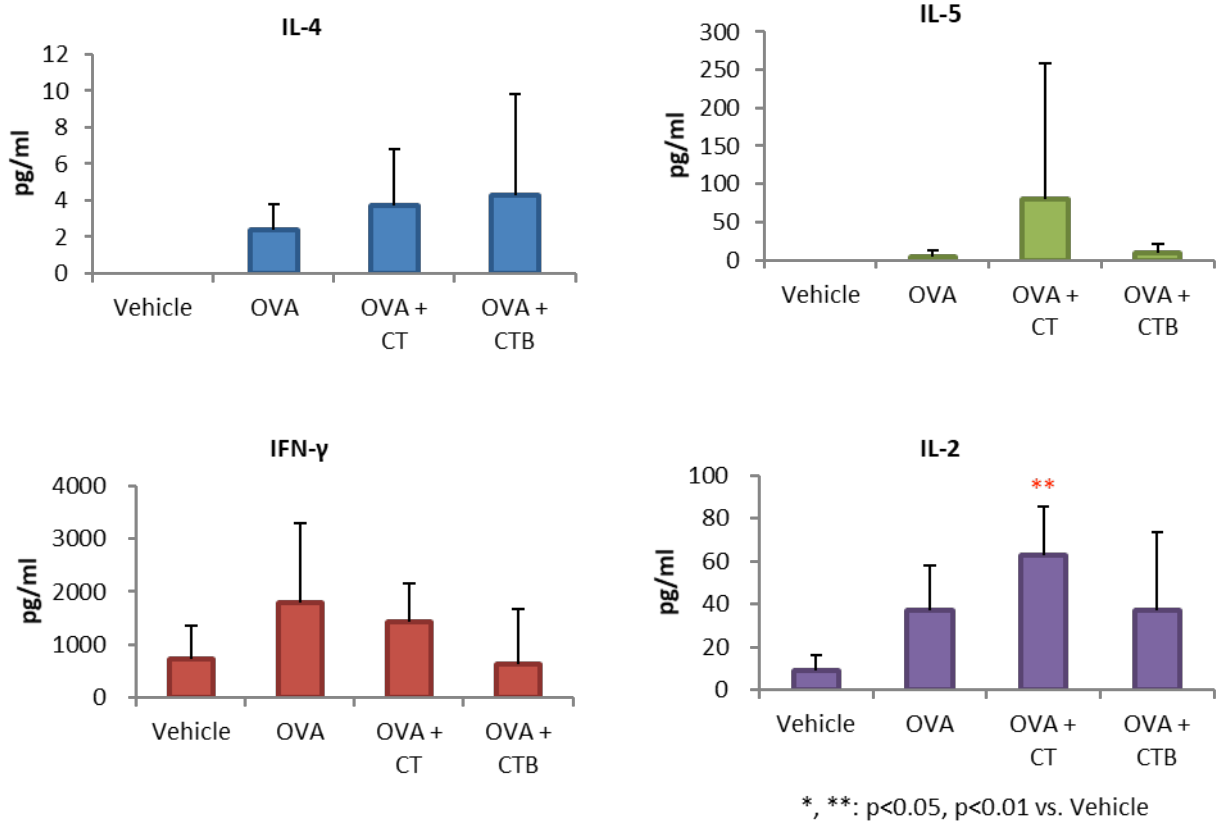


Figure 6. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 1)

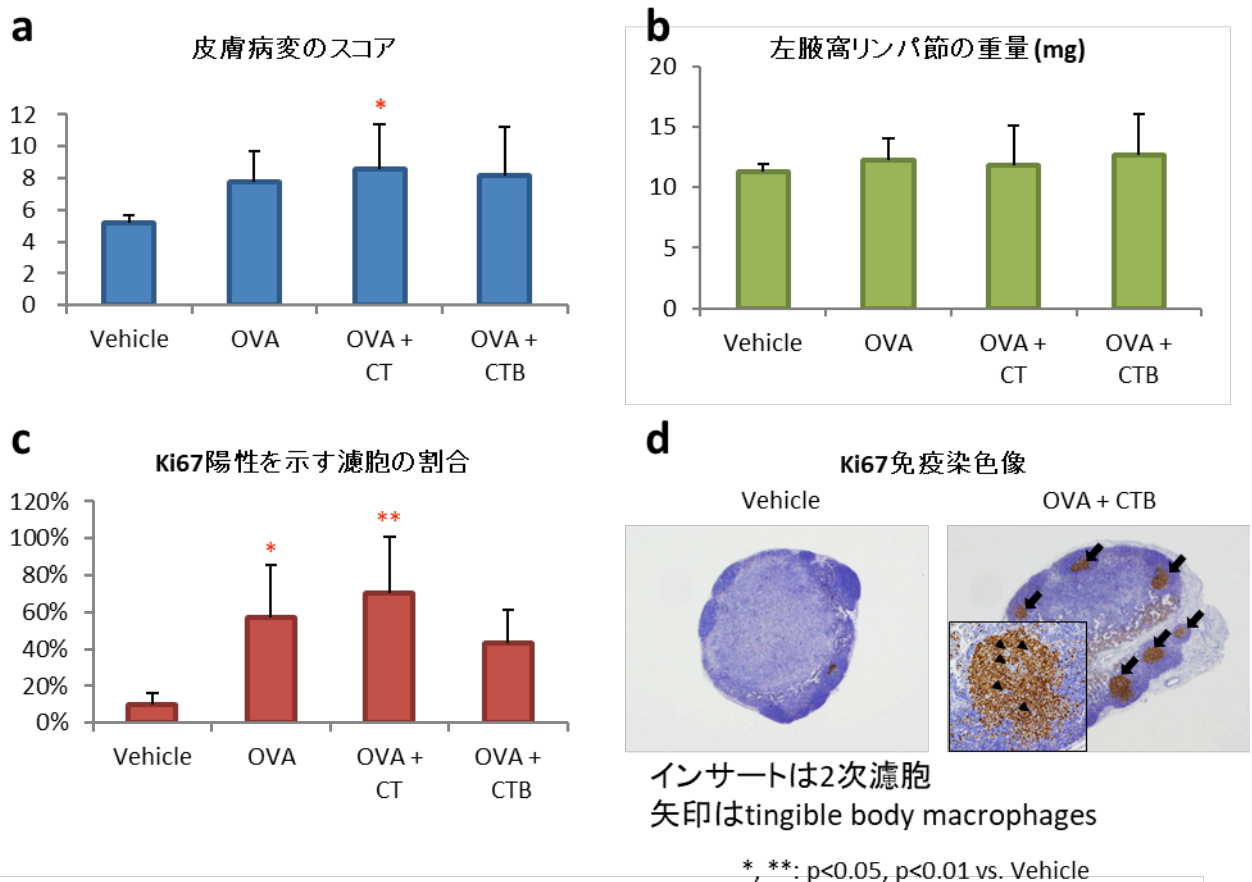


Figure 7. 皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)、細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の割合 (c) 及びKi67免疫染色像 (d) (実験 1)

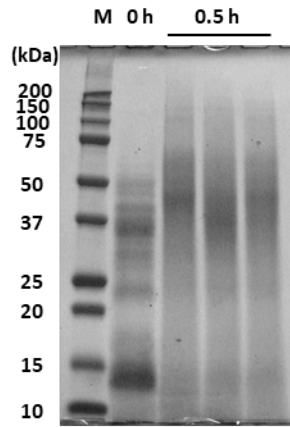


Figure 8. グルテン酸加水分解物の電気泳動像 (実験 2)

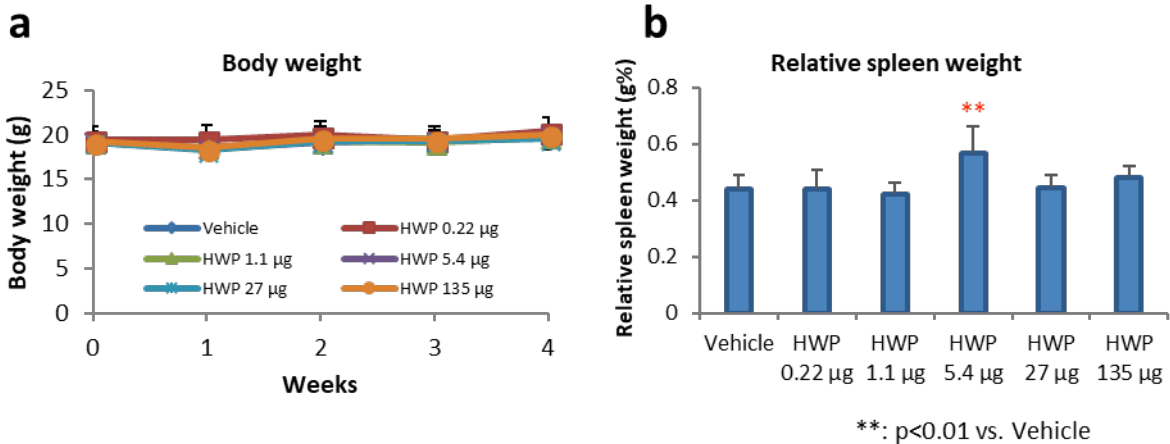


Figure 9. 体重 (a)及び相対脾臓重量 (b) (実験 2)

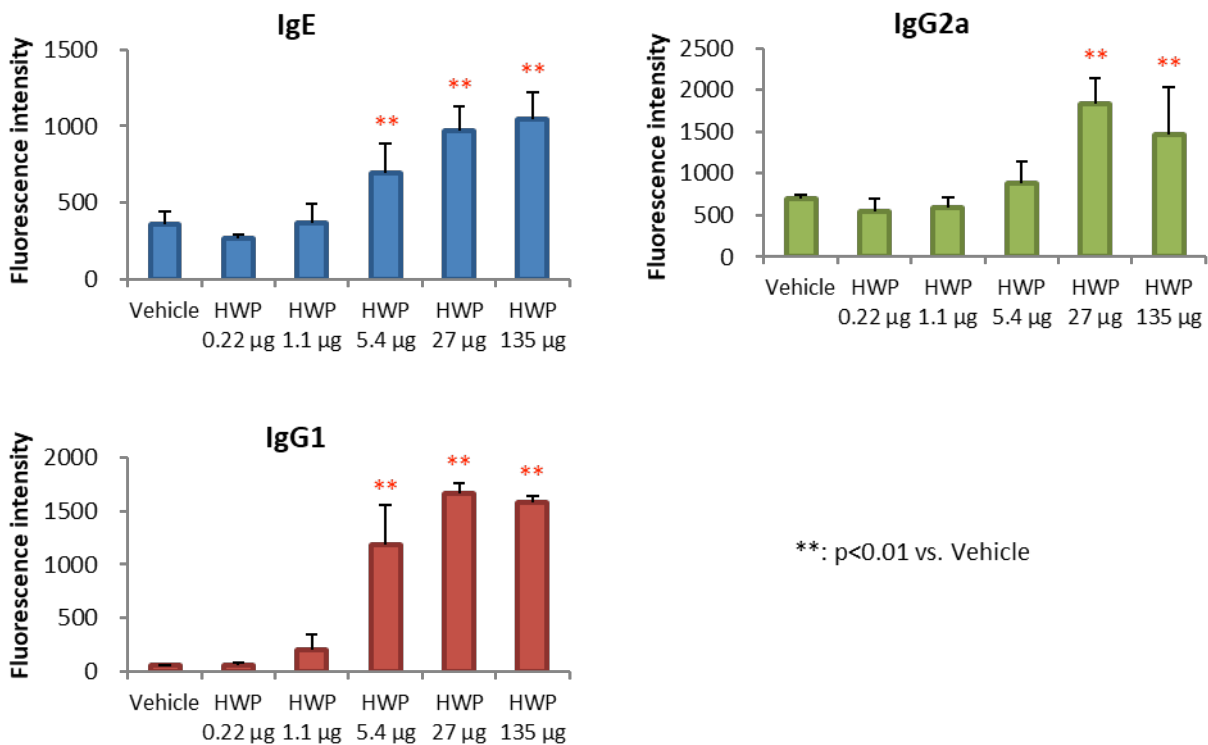
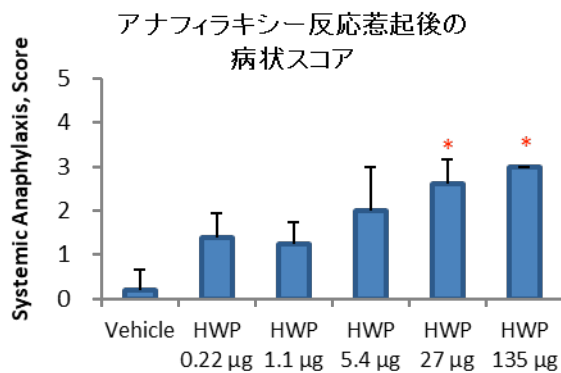
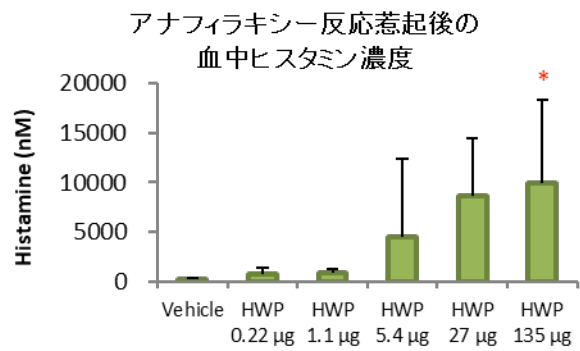
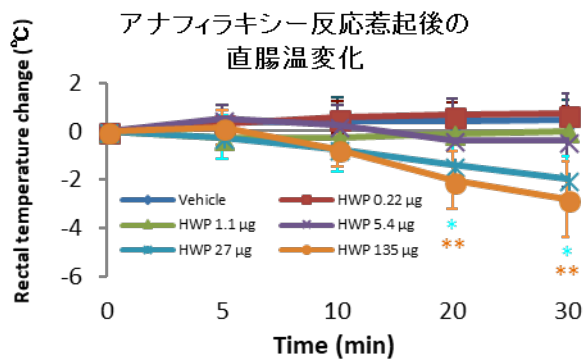


Figure 10. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 2)



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

Figure 11. アナフィラキシー反応惹起の反応 (実験 2)

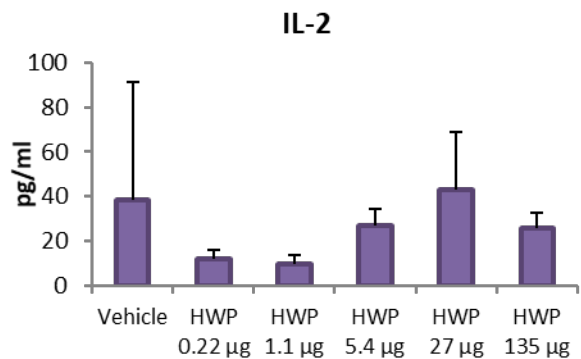
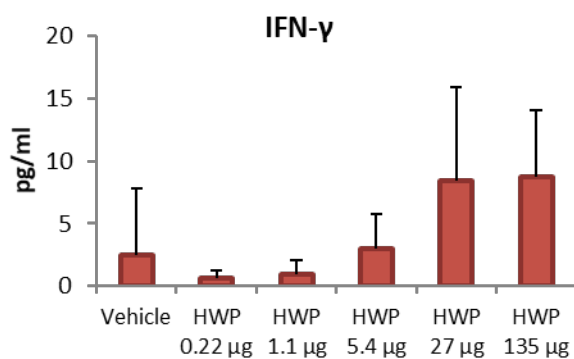
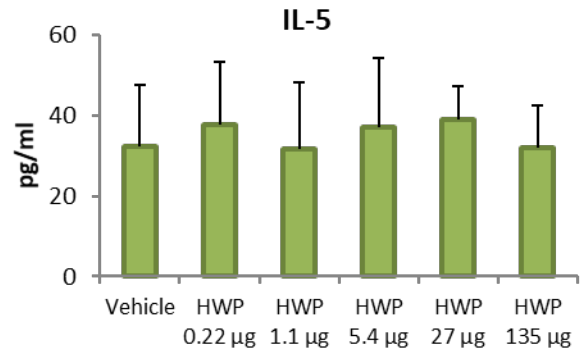
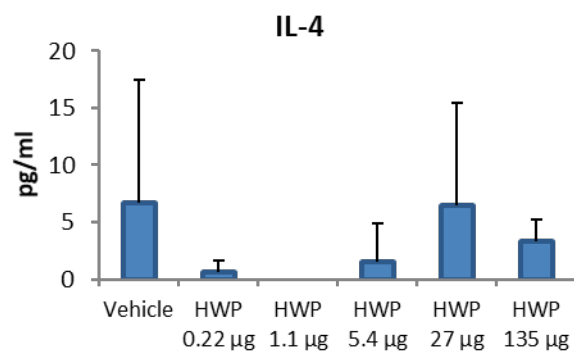


Figure 12. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 2)

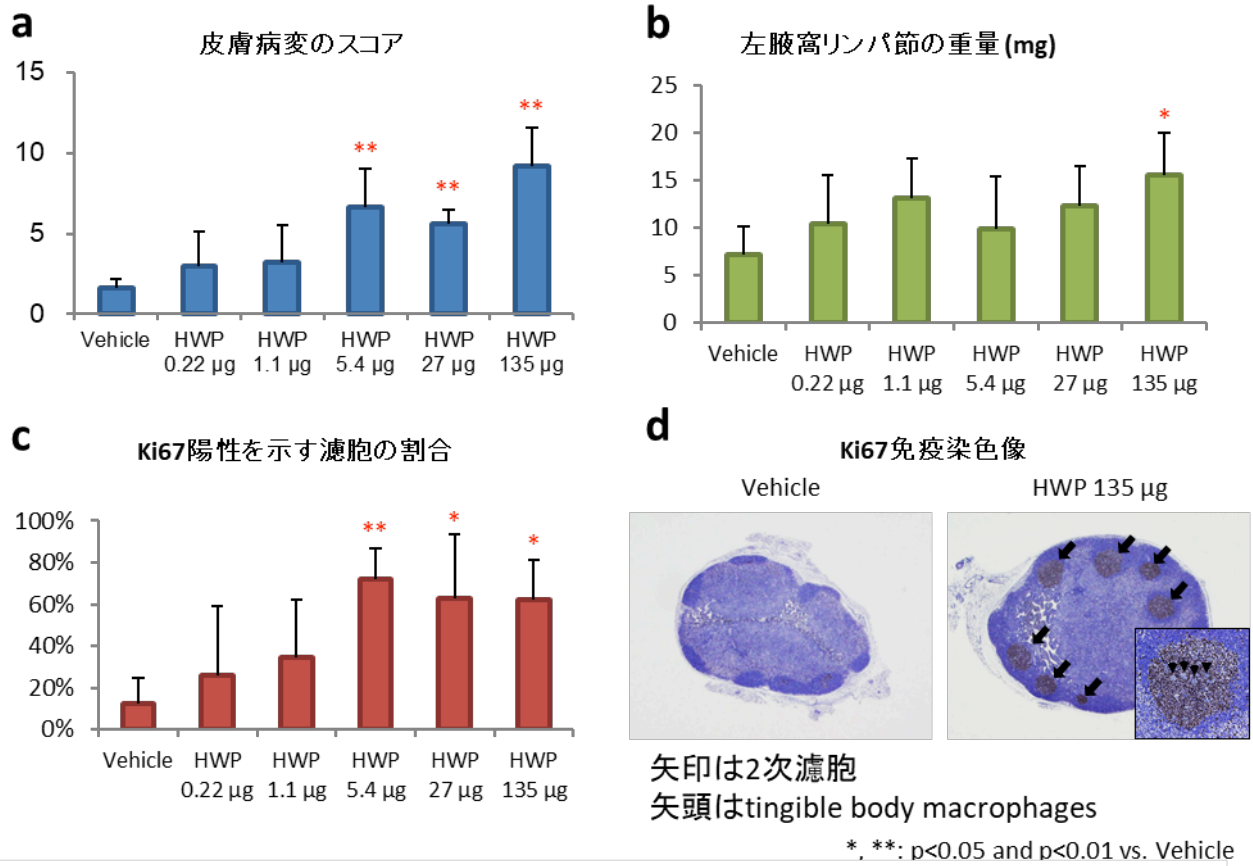


Figure 13.皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)、細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の割合 (c)及びKi67免疫染色像 (d) (実験 2)

Table 1. 病理組織学的所見 (実験1)

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

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 集簇巢無し
++: 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 1-3箇所	11-20箇所	炎症細胞が真皮に浸潤 限局性集簇巢有り
+++: severe	7箇所以上	4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 (実験2)

Treatment	No. of animal	Skin			
		Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration
		+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++
Vehicle	5	4/0/0	0/1/0	1/0/0	1/0/0
HWP 0.22 µg	5	4/0/0	1/2/0	1/1/0	3/0/0
HWP 1.1 µg	4	3/1/0	2/1/0	1/1/0	4/0/0
HWP 5.4 µg	5	2/1/1	0/1/2	1/2/1	0/5/0
HWP 27 µg	5	3/2/0	4/1/0	3/2/0	2/3/0
HWP 135 µg	5	1/0/4	0/1/3	2/0/3	0/4/1

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29年度）

ナノ銀の腹腔内投与による急性毒性について

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）

研究要旨：

ナノ銀（AgNP）の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び90日間反復投与毒性試験等において肝臓や腎臓に軽度の変化が示され、経皮あるいは静脈内投与試験では脾臓への影響が報告されているものの、十分な評価は行われていない。AgNPのサイズによる毒性の違いに関連する情報はさらに少ない。26年度及び27年度我々はマウスに直径10 nm、60 nm及び100 nmのAgNPを腹腔内投与したところ、AgNP 10 nmを投与した全動物において24時間内の死亡又は瀕死例が認められ、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死、脾臓のうっ血及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に観察された。28年度の研究では抗酸化作用を示すN-acetyl-L-cysteine（NAC）による肝臓の病理所見の有意な減少が確認できた。29年度の本研究では、実験1)においては、AgNPの急性毒性について、AgNPの表面積を考量した投与量（直径10 nm AgNP 0.2 mg、直径60 nm AgNP 1.2 mg、直径100 nm AgNP 2 mg）で腹腔内投与を行い、その影響について検討し、実験2)においては、NAC（2000 mg/kg bw）、Vitamin C（Vit C、200 mg/kg bw）、Vitamin E（Vit E、100 mg/kg bw）及びL-buthionine-(S,R)-sulfoximine（BSO、1.6 g/kg bw）を経口投与1時間後、AgNP 10nm（0.2 mg）を腹腔内投与し、AgNPによる急性毒性に対する抗酸化剤の影響について検討した。その結果、AgNP 10 nm 6時間群において、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。又、病変と肝臓内の銀濃度とは相関がないことから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。直接活性酸素類を消去するVit C及びVit EよりはGSHの前駆体であるNACの方がAgNPの急性毒性を有効に抑制できた。抗酸化剤の投与によってAgNPによる毒性が著しく抑制できたことは、少なくとも一部は酸化ストレスによるAgNPの毒性メカニズムを支持すると考えられた。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酸化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。

キーワード：ナノ銀、急性毒性、マウス、抗酸化剤

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)）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ない。最近、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 年度我々は抗原性あるいは卵白アルブミン (OVA) の抗原性に対するアジュバント作用を検討するためマウスに直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP を腹腔内投与したところ抗原の有無にかかわらず、AgNP 10 nm を投与した全動物のみにおいて 24 時間内の死亡又は瀕死例が認められ、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死、脾臓のうっ血及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に観察された。28 年度の研究では抗酸化作用を示す N-acetyl-L-cysteine (NAC) による病理所見の有意な減少が確認できた。

本研究では、実験 1) においては、AgNP の急性毒性について、AgNP の表面積を考慮し、110 cm^2 で同等とした投与量 (直径 10 nm AgNP 0.2 mg、直径 60 nm AgNP 1.2 mg、直径 100 nm AgNP 2 mg) で腹腔内投与を行い、その影響について検討し、実験 2) においては、NAC (2000 mg/kg bw)、Vitamin C (Vit C、200 mg/kg bw)、Vitamin E (Vit E、100 mg/kg bw) 及び L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO、1.6 g/kg bw) を経口又は腹腔内投与 1 時間後、AgNP 10 nm (0.4 mg) を腹腔内投与し、AgNP による急性毒性に対する抗酸化剤又は又はグルタチオン (GSH) 合成抑制剤の影響について検討した。

B. 研究方法

実験 1)

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。

nanoComposix 社からのデータ (Table 1) から 10 nm AgNP の表面積は 60 nm AgNP 及び 100 nm AgNP の各々約 6 倍及び 10 倍であることが分かった。AgNP を 0.2~2 mg/2 ml/マウスとなるようクエン酸バッファーに加えて投与する前に調製した。

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社) を給餌した。1 週間の馴化後、1 群の匹数は 5-6 匹とし、各群は以下の通りに構成した、① 溶媒対照 (Vehicle) 6 時間群、② 10 nm AgNP 群、③ 60 nm AgNP 群、④ 100 nm AgNP 群。腹腔内投与 (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 (Figure 1)。

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。肝臓及び全血の凍結サンプルを採取し、ICP-MS を用いて銀濃度を測定した。

実験 2)

動物実験は実験 1 と同様に実施した。Citrate (vehicle) や AgNP (10 nm, 0.4 mg/mouse) を腹腔内投与する 1 時間前に saline 又は NAC (2000 mg/kg bw)、Vit C (200 mg/kg bw) 及び Vit E (100 mg/kg bw) を経口投与し、BSO (1.6 g/kg bw) を腹腔内投与した。解剖は vehicle または AgNP を投与した 6 時間及び 24 時間後に実施した。血清を用いて血清生化学検査を行った。

各群は以下の通りに構成した、① Saline + Vehicle 群、② Saline + AgNP 群、③ NAC + AgNP 群、④ Vit C + AgNP 群、⑤ Vit E + AgNP 群、⑥ BSO + AgNP 群 (Figure 2)。

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、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った。病理組織学的所見の発生頻度については、Fischer's exact test による検定を実施し、いずれの検定も $p < 0.05$ を有意とした。なお、図中には * 又は # $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 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

実験 1)

AgNP 10 nm 群の 1 匹で投与 6 時間後より立毛が認められたが、何れの群においても 24 時間後まで有意な体温低下は認められなかった (Figure 3)。AgNP 投与 6 時間後の解剖時、AgNP 10 nm 群の肝臓は暗赤色調を呈していた (Figure 4)。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 時間後の解剖時になると多く観察された (Figure 4)。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 (Figure 5)。病理組織学的には、投与後 6 時間、AgNP 10 nm 群で、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及び胆嚢の浮腫が有意な高頻度に認められ

た (Figure 6、Table 2)。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 (Table 2)。投与後 24 時間、病変における群間の変化は認めなかった (Table 3)。肝臓中の銀濃度において、AgNP 60 nm 6 時間及び 24 時間解剖群、並びに AgNP 100 nm 24 時間群で各々の vehicle 群及び AgNP 10 nm 群と比べて有意に高い値を示した (Figure 7)。血中の銀濃度において、すべての AgNP 6 時間群及び AgNP 60 nm 24 時間群で有意に高い濃度を示した (Figure 7)。

実験 2)

Saline + Vehicle 6 時間群の 1 匹が投与ミスで死亡し、結果から除外した。AgNP 投与 6 時間後まで、いずれの AgNP 群で活動低下及び有意な体温の低下は認められなかったが、AgNP 投与 24 時間後に Vit C + AgNP 群及び Vit E + AgNP 群で有意な体温の低下が認められた (Figure 8)。Saline + AgNP 24 時間群及び BSO + AgNP 24 時間群で各々 1 匹の死亡例が認められ、Vit C + AgNP 24 時間群及び BSO + AgNP 24 時間群で各々 1 匹の瀕死例が認められた。AgNP 投与 24 時間後において、NAC + AgNP 24 群を除くすべての AgNP 投与群生存動物で立毛又は頻呼吸が認められた。BSO + AgNP 24 時間群 (統計検討対象匹数が 2 匹なので結果は参考値である) 除き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が、BSO + AgNP 24 時間群相対肝臓重量の有意な増加が認められた (Figure 9)。AgNP 投与 6 時間後解剖時、AgNP 群で肝臓は暗赤色調を呈し、Saline + AgNP 群が最も強かった (Figure 10)。24 時間後解剖時、NAC + AgNP 群を除くすべての AgNP 群で肝臓及び脾臓は暗赤色調を呈した (Figure 10)。血清生化学検査において、6 時間後解剖時、Saline + AgNP 群で、ALB、T-CHO、TG 及び glucose の有意な減少が認められたが、NAC + AgNP 群ではいずれの項目も変化がなかった (Table 4)。Vit C + AgNP 群、Vit E + AgNP 群及び BSO + AgNP 群

で glucose の減少及び Vit E + AgNP 群で AST の増加が認められた (Table 4)。また、BSO + AgNP 群で TP、ALB、ALP、T-CHO 及び TG の減少が認められた (Table 4)。24 時間後解剖時、NAC + AgNP 群を除くすべての AgNP 投与群で TP、ALB、T-CHO の何れかの減少又は AST の増加が認められた (Table 5)。病理組織学的には、AgNP 投与 6 時間後、NAC + AgNP 群を除くすべての AgNP 投与群で肝臓のうっ血、類洞内細胞成分増加、肝細胞の空胞化及び脾臓の白脾髄のアポトーシスが Saline + Vehicle 群に比べ、有意に増加又は増加傾向を示した (Figure 11、Table 6)。すべての AgNP 投与群で腸間膜及び胸腺リンパ節に暗褐色色素の沈着が有意に増加又は増加傾向を示した (Table 6)。Saline + AgNP 群において、肝臓の単細胞壊死及び Vit C + AgNP 群において、肝臓の巣状壊死並びに胆嚢の浮腫・出血が認められた (Figure 11、Table 6)。AgNP 投与 24 時間後、群間の有意な差は認められなかったが、AgNP 投与群で認められる肝臓、胆嚢、脾臓及び胸腺の病変が NAC + AgNP 群では観察されなかった (Table 7)。

D. 考察

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た。28 年度は抗酸化剤 NAC を用いた検討から、AgNP による急性毒性のメカニズムの一つとして酸化ストレスの関与が考えられた。本年度は、そのメカニズムを更に明らかにするため、実験 1) においては、AgNP の表面積を考量した投与量で腹腔内投与を行い、その影響について検討し、実験 2) においては、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た。

AgNP の表面積を考量した投与量による検討において、AgNP 10、60 及び 100 nm の表面積は各々 55.1、9.4 及び 5.4 m²/g であることから

AgNP 60 及び 100 nm 群の投与量は AgNP 10 nm 群の各々 6 及び 10 倍に設定した。投与 6 時間後、何れの AgNP 投与群でも体温の低下及び明らかな臨床症状は見られなかった。また、AgNP 10 nm 群で肝臓における肉眼病変及び肝臓並びに胆嚢における病理組織学的変化が認められたが、28 年度までの検討で観察された変化より弱い病変であった。28 年度までの検討において、AgNP の投与量は 300 µl/マウスであったが、今回の検討では被験物質の納品時の濃度から全群 2 ml/マウスで行うことになった。27 年の研究から Balb/c マウスに AgNP の急性毒性は少なくとも AgNP 10 nm 0.02 mg 以上が必要と考えられたが、今回の結果から、AgNP の急性毒性は総暴露量のみならず、暴露濃度によっても影響を受ける可能性が考えられた。また、AgNP 10 nm 群では肝臓及び胆嚢の病変が Vehicle 群に比べ有意に高頻度に認められたが、その 6 及び 10 倍の量を投与した AgNP 60 及び 100 nm 群の肝臓及び胆嚢において、AgNP による病変は認められなかったことから、AgNP の毒性はサイズ依存性であることが示唆された。

肝臓及び血中の銀濃度について、AgNP 投与後の肝臓中の銀濃度は AgNP 10 nm 群より投与量の多かった AgNP 60 及び 100 nm 群で 6 時間及び 24 時間まで高い濃度に達し、維持したが、2 群間の平均値に大きな差がなかったことから、腹腔内投与したナノ銀が肝臓内に蓄積可能な量には限界があることが示唆された。又、肝臓内の銀濃度と病変には相関がないことから 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。今回の検討で用いた ICP-MS は金属イオンのみを検出できることから、肝臓内に存在する AgNP が粒子のままなのか、イオン化したのかは不明である。28 年度の結果から AgNP 溶液の超遠心上清における銀濃度は、AgNP 10 nm 群で 60 及び 100 nm 群に比べ高い値を示し、AgNP のサイズによるイオン化の違いが示唆された。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も議論

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。一方、AgNP 10 nm 群の肝臓内濃度は経時的な減少がみられ、60 及び 100 nm 群と異なる動態を示した。AgNP の急性毒性は肝臓内蓄積量より初期暴露量及び粒子のサイズに相関することが明らかとなった。毒性が投与濃度によって観察されにくくなる問題についてはさらなる検討が必要と考えられた。

AgNP の急性毒性における様々な抗酸化剤の影響を調べたところ、NAC を除く何れの投与群でも明らかな抑制作用は認められなかった。直接活性酸素類を消去する Vit C 及び Vit E よりも GSH の前駆体である NAC の方が AgNP の急性毒性を有効に抑制された。NAC は 28 年度の研究においても同様の結果を示した。NAC のみではあるが、抗酸化剤の投与によって AgNP による毒性が著しく抑制されたことは、少なくとも一部は酸化的ストレスによる AgNP の毒性メカニズムの関与を支持する結果と考えられた。また、GSH 合成抑制剤である BSO による毒性亢進作用も観察されなかった。BSO は GSH 生合成に重要な役割を果たす酵素である γ -グルタミルシステインシンターゼを阻害することにより、GSH 欠損を誘導し、細胞内プロセスにおける GSH の役割を検討するために用いられる (Drew R et. al., *Biochemical Pharmacology*. 1984;33 (2989-2994))。今回の検討で認められた AgNP の急性毒性は 26~28 年度までの検討で認められた臨床症状などに比して弱い傾向はあるものの、病理組織学的検討において、同様の病変が観察された。臨床症状及び病理組織病変の強弱は被験物質のロット差などが考えられた。

E. 結論

本研究では、AgNP の急性毒性について、AgNP の表面積を同等とした投与量の影響及び様々な抗酸化剤の影響について検討した。その結果、AgNP 10 nm 6 時間群において、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。又、病変と肝臓内の銀濃度とは相関がないことから AgNP の急性毒性は粒子のサイズに依存することが再確認できた。直接活性酸素類を消去する Vit C 及び Vit E よりも GSH の前駆体である NAC の方が AgNP の急性毒性を有効に抑制した。抗酸化剤の投与によって AgNP による毒性が著しく抑制できたことは、少なくとも一部は酸化的ストレスによる AgNP の毒性メカニズムを支持すると考えられた。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酸化的ストレスに関する解析を進めることにより、食品の安全性確保に資する知見を集積することが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

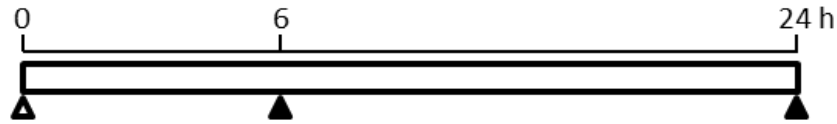
Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K: Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol*. 2018;31:73-80.

2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)

曹永晩, 赤木純一, 水田保子, 豊田武士, 小川久美子: サイズによって異なるナノ銀の急性毒性. 第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017. 7. 12)

G. 知的所有権の取得状況

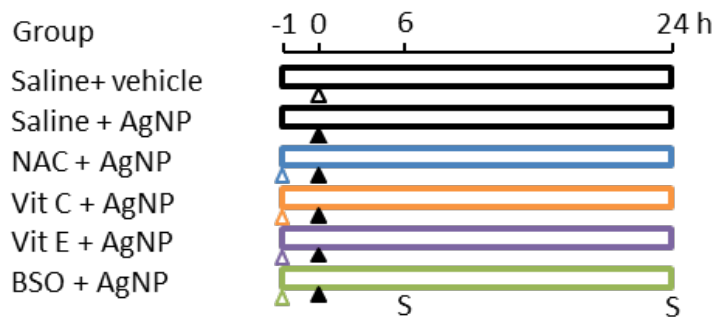
1. 特許所得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし



- ▲ Test chemicals exposure (i.p., 2 ml/mouse)
 - ① Citrate (vehicle)
 - ② 10 nm AgNP (0.2 mg)
 - ③ 60 nm AgNP (1.2 mg)
 - ④ 100 nm AgNP (2 mg)

- ▲ Sacrifice

Figure 1. 実験デザイン (実験 1)



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

- △ Vehicle (2 mM citrate, i.p., 300 μ l/mouse)
- ▲ Silver nanoparticles (10 nm AgNP, i.p., 0.4 mg/mouse)
- △ N-acetyl-l-cysteine (NAC, i.g., 2000 mg/kg bw)
- △ Vitamin C (Vit C, i.g., 200 mg/kg bw)
- △ Vitamin E (Vit E, i.g., 100 mg/kg bw)
- △ L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO, i.p., 1.6 g/kg bw)
- S Sacrifice

Figure 2. 実験デザイン (実験 2)

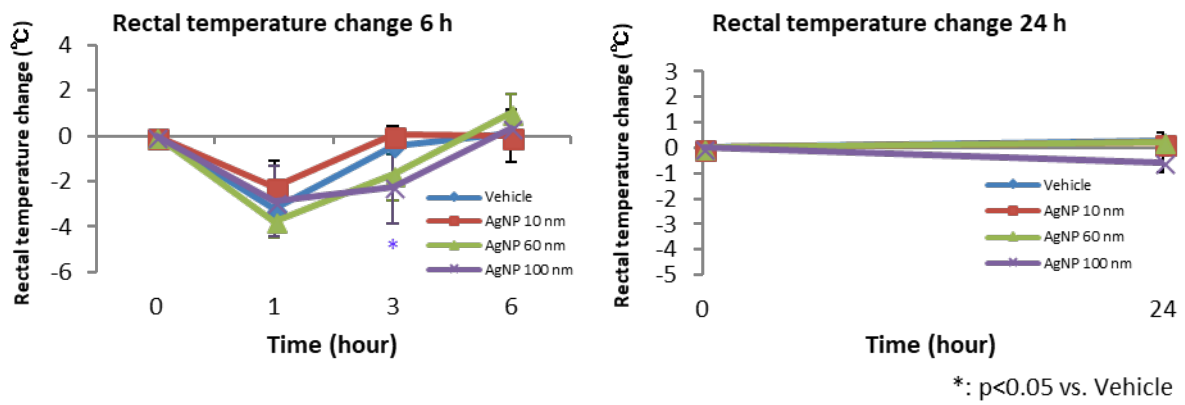


Figure 3. 相对肝重量及び体温変化 (実験 1)

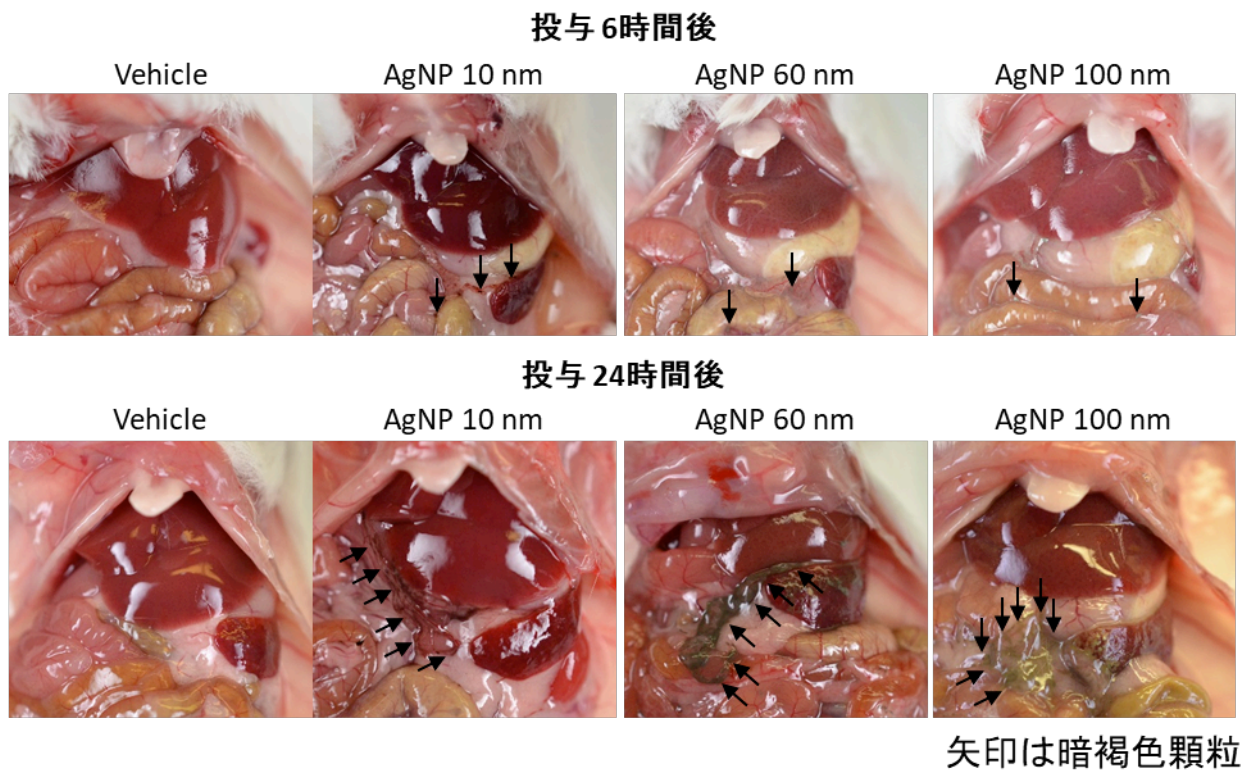


Figure 4. 剖検時の肉眼変化 (実験 1)

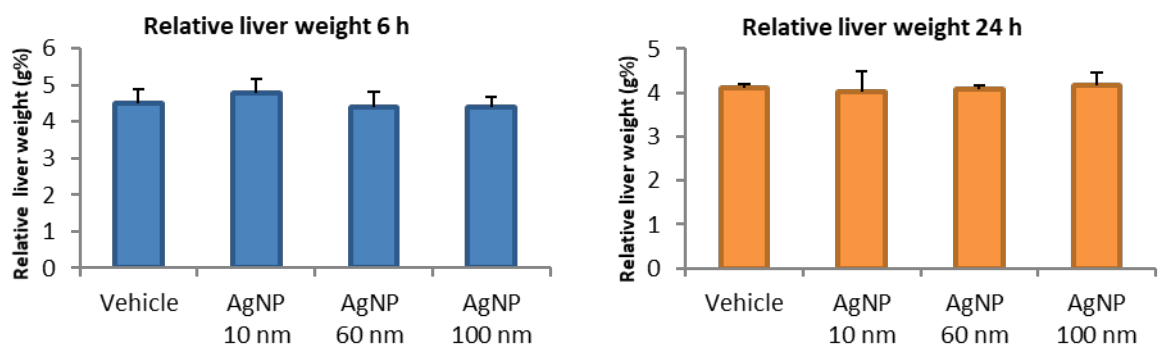


Figure 5. 相对肝重量 (実験 1)

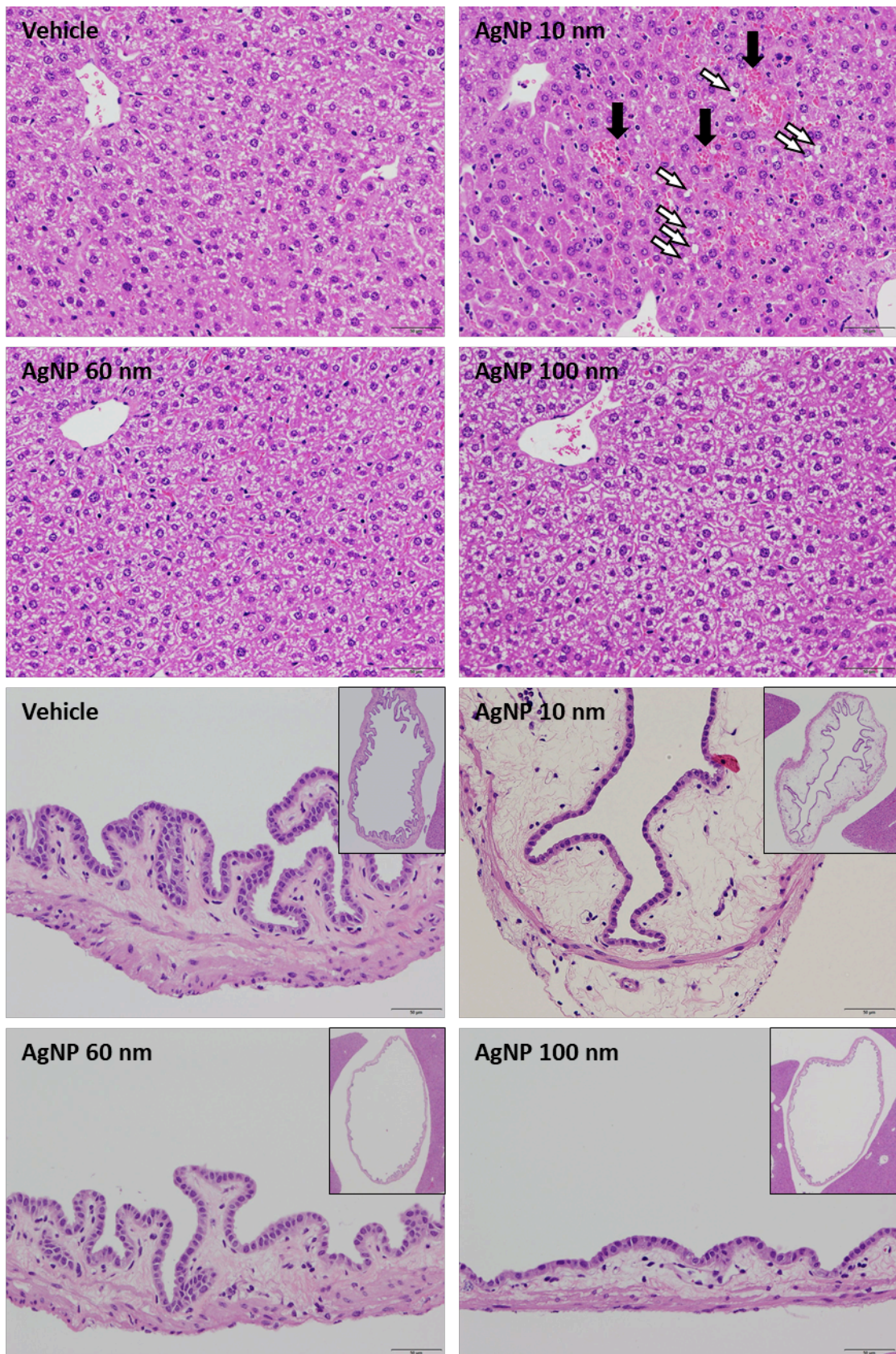


Figure 6. 肝臓及び胆嚢の病理組織写真(実験 1)。
 AgNP 10 nm 群の肝臓のうっ血(黒矢印)、肝細胞の空胞化(白矢印)及び胆嚢粘膜下並びに漿膜の浮腫が認められた。

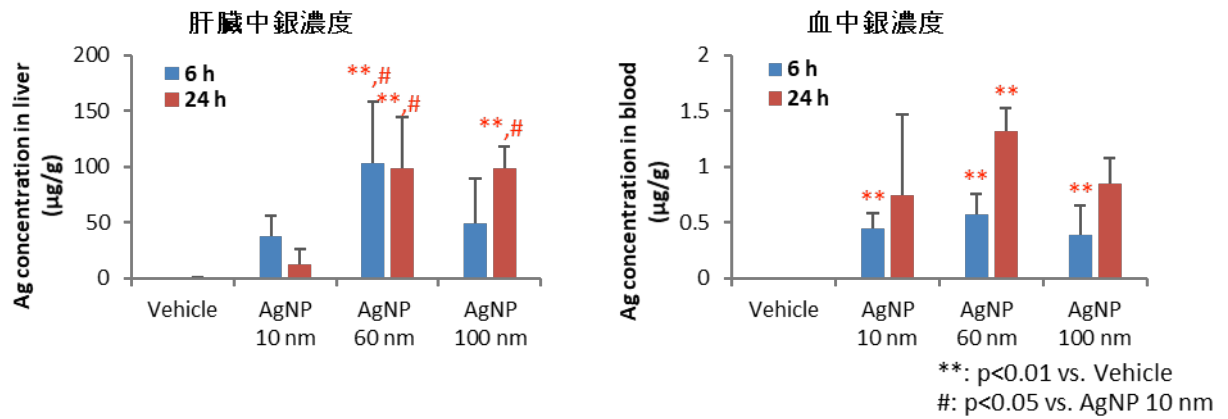


Figure 7. 肝臓中及び血中銀濃度 (実験 1)

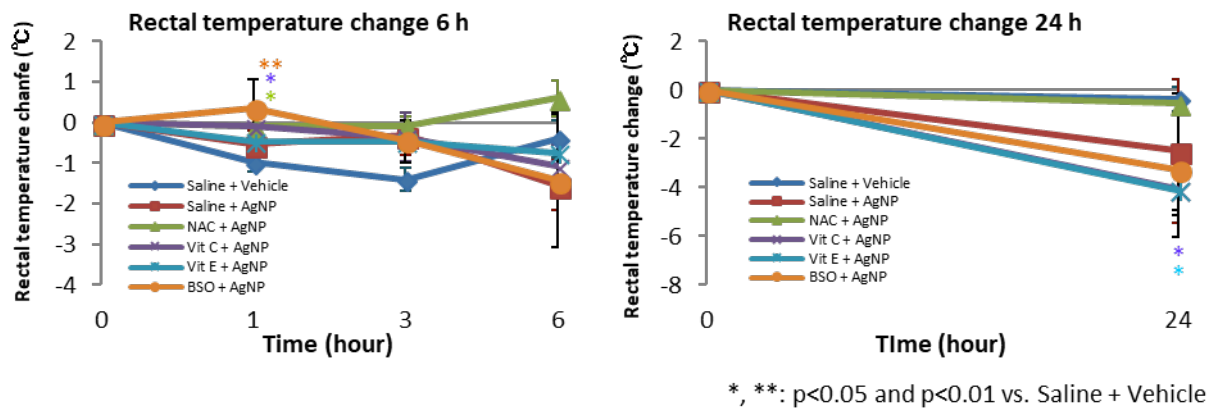


Figure 8. 相対肝重量及び体温変化 (実験 2)

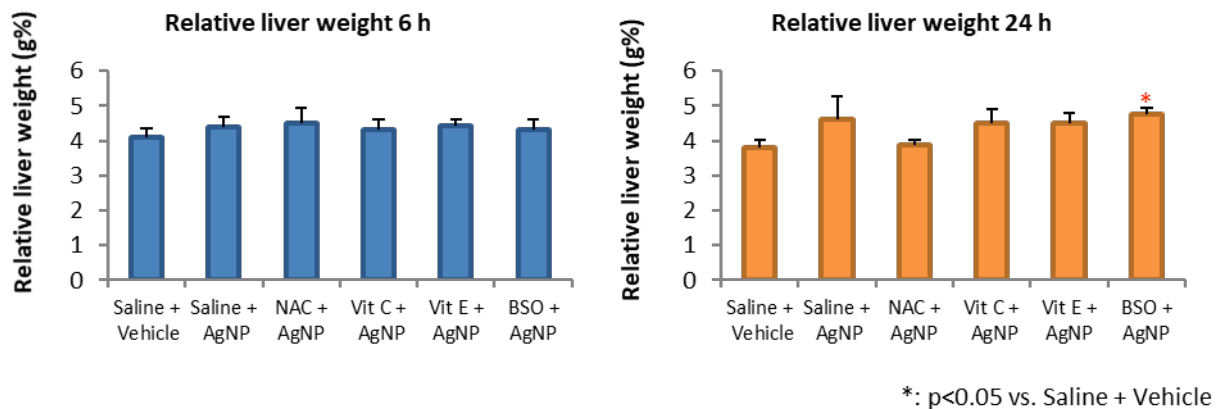


Figure 9. 相対肝重量 (実験 2)

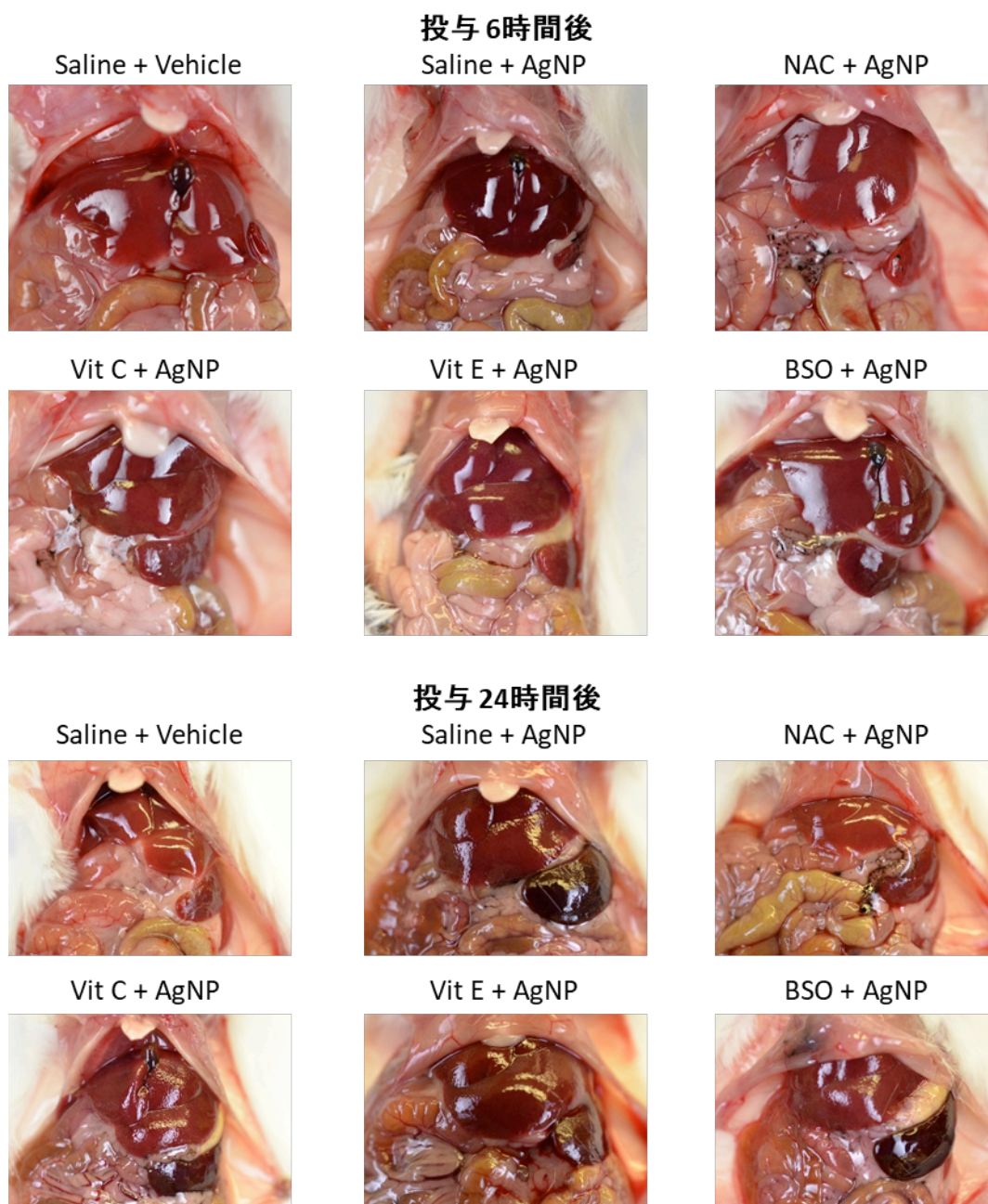


Figure 10. 剖検時の肉眼変化 (実験 2)

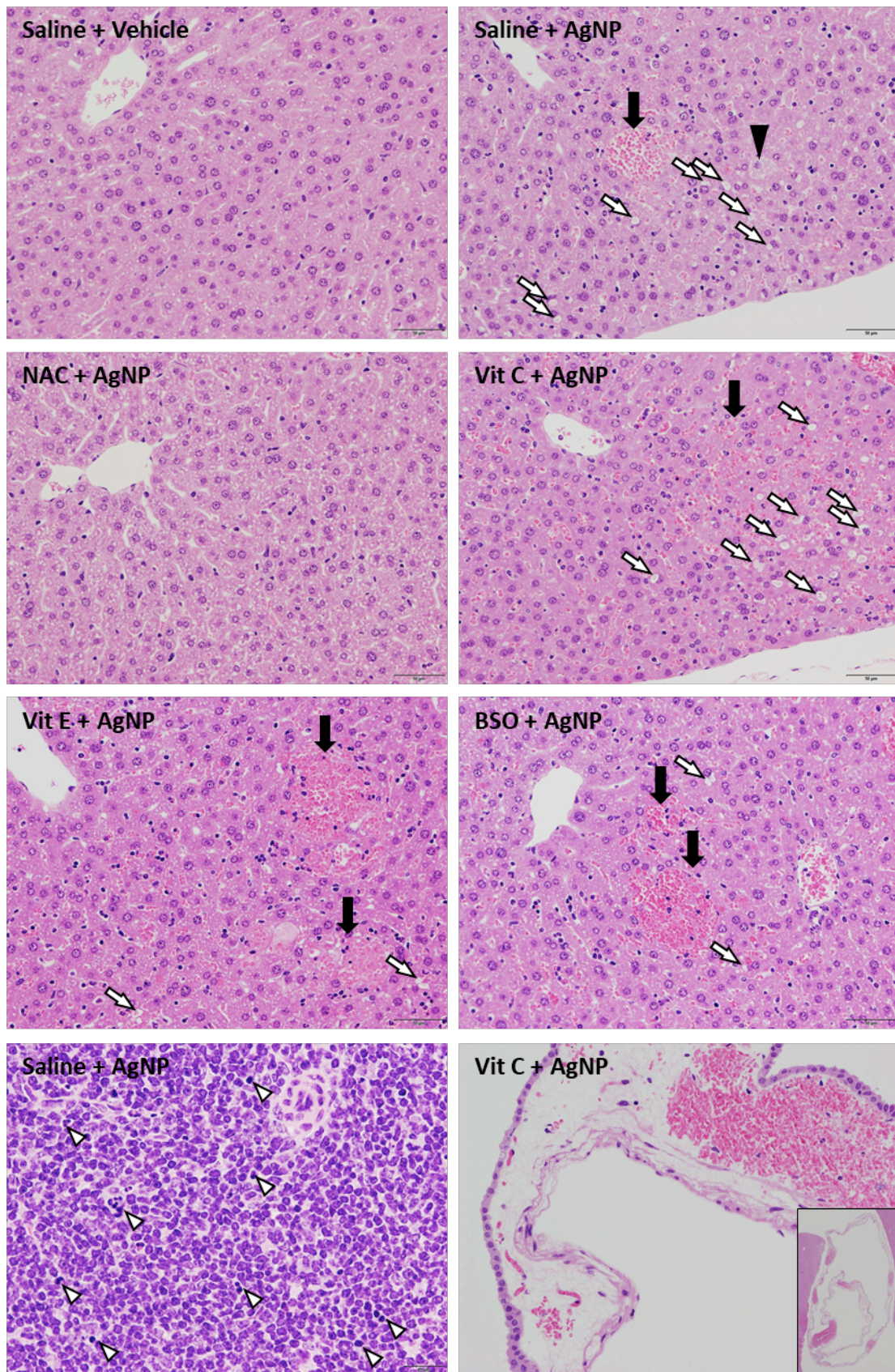


Figure 11. 肝臓、胆嚢、脾臓及び胆嚢の病理組織写真 (実験2)。
 Saline + AgNP、Vit C + AgNP、Vit E + AgNP及びBSO + AgNP群の肝臓
 のうっ血 (黒矢印)、肝細胞の空胞化 (白矢印)、Saline + AgNP群の肝臓
 の単細胞壊死 (黒矢頭)、脾臓のアポトーシス (白矢頭)及びVit C +
 AgNP群の胆嚢粘膜下・漿膜の浮腫並びに出血が認められた。

Table 1. Characteristics of tested AgNP reported by the manufacturer in the datasheet (実験 1)

	10 nm AgNP	60 nm AgNP	100 nm AgNP
Lot No.	DMW0198	DMW0164	DMW0120
Diameter (nm)	9.6 ± 2	59.8 ± 6.2	104.3 ± 12.6
Coefficient of Variation (%)	20.4	10.3	12.1
Particle Concentration (mL ⁻¹)	2.2 x 10 ¹⁴	9.1 x 10 ¹¹	1.7 x 10 ¹¹
Surface Area (m ² /g)	55.1	9.4	5.3
Mass Concentration (mg/mL)	1.07	1.07	1.05
Endotoxin Concentration (EU/mL)	< 5	< 2.5	< 2.5
Zeta Potential (mV)	-39.4	-46.5	-49.3
pH of Solution	7.7	7.5	7.3
Hydrodynamic Diameter (nm)	13.3	65.8	107
Silver Purity (%)	99.99	99.99	99.99

Table 2. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP up to 6 hours (実験 1)

Organ and lesions	Treatment	6 h				
		Vehicle	10 nm AgNP	60 nm AgNP	100 nm AgNP	
	No. of animals	5	5	6	5	
Liver	Congestion, intermediate zone	0	4*	0	0	
	Increased cellular component in sinusoid	0	3	0	0	
	Vacuolation, hepatocyte	0	4*	0	0	
	Oval cell hyperplasia	0	1	0	0	
	Multinucleated cell	0	1	0	0	
Gallbladder	Edema, subserosa	0	4*	0	0	
Spleen	Congestion	0	1	0	1	
	Apoptosis, white pulp	0	0	2	2	
Thymus	Apoptosis, cortex	1	0	4	3	
	+	1	0	3	0	
	++	0	0	1	3	
Thoracic lymph node	Apoptosis, medulla	0	0	1	1	
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte +	0a	4	5	3b	
Thoracic lymph node	+	0a	0	5	3b	
	++	0a	4	0	0b	
	Apoptosis	0a	0	0	2b	
	Cell infiltration, neutrophil	0a	1	1	0b	
Mesenterium	Inflammatory cell foci	5	5	6	5	
	+	5	4	2	5	
	++	0	1	4	0	
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	4*	6**	5**	
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, cortex	1	3	3	2	
Kidney	Regenerative tubules	5	5	5	4	
Heart	Thrombus, right ventricle	1	0	0	0	
	Thrombus, left ventricle	0	0	1	1	
	Thrombus, left atrium	0	0	1	0	
	Thrombus, intra mural	0	0	1	0	
	Mineralization, epicardium	4	4	5	6	
	Single cell necrosis	0	0	0	2	
	Vacuolation	0	0	1	0	
	Megalocyte, cardiomyocyte	0	0	0	2	
	Lung	Hemorrhage	1	0	0	0
		Dark brown pigment deposition, alveolar macrophage +	0	0	2	0
Pancreas	Hemorrhage	0	2	0	1	

*, **, significantly different from the vehicle group at p<0.05 and 0.01, respectively. a; n=2, b; n=5.

Table 3. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP up to 24 hours (実験1)

Organ and lesions	Treatment	24 hr			
		Vehicle	10 nm AgNP	60 nm AgNP	100 nm AgNP
	No. of animals	3	3	3	3
Liver	Microgranuloma	0	1	1	0
Spleen	Apoptosis, white pulp	0	1	0	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte +/-	0	1	3	3
	+	0	1	0	0
	++	0	0	2	2
	+++	0	0	1	1
Mesenterium	Inflammatory cell foci	3	3	3	3
	+	0	2	2	0
	++	3	1	1	3
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	2	3	3
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, cortex	1	1	0	0
Kidney	Regenerative tubules	3	3	2	3
Heart	Mineralization, epicardium	3	2	2	3
Lung	Dark brown pigment deposition, alveolar macrophage	0	1	0	1
	+	0	1	0	0
	++	0	0	0	1

Table 4. Serum biochemistry for Balb/C mouse treated with AgNP and antioxidants (実験2)

		6 h					
		Saline + Vehicle	Saline + AgNP	NAC + AgNP	Vit C + AgNP	Vit E + AgNP	BSO + AgNP
No. of animals		4	5	5	5	5	4
TP	g/dL	4.5 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.6 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.3 ± 0.2	4.0 ± 0.5 *
ALB	g/dL	3.1 ± 0.1	2.8 ± 0.2 **	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.2 **
A/G		2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.3 ± 0.7
BUN	mg/dL	19.4 ± 3.7	20.7 ± 2.9	23.4 ± 3.4	23.6 ± 2.2	22.4 ± 2.8	24.0 ± 7.7
Cre	mg/dL	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.02
Na	mEq/L	152 ± 2	153 ± 3	152 ± 1	151 ± 1	150 ± 2	150 ± 3
K	mEq/L	4.7 ± 0.4	4.7 ± 0.5	3.9 ± 0.4	5.0 ± 0.7	4.9 ± 0.5	5.7 ± 1.4
Cl	mEq/L	110 ± 6	109 ± 8	114 ± 1	110 ± 5	106 ± 8	108 ± 5
Ca	mg/dL	7.5 ± 0.3	7.2 ± 0.7	7.5 ± 0.4	6.7 ± 0.7	7.7 ± 0.6	6.9 ± 0.7
IP	mg/dL	10.1 ± 2.3	10.0 ± 0.9	9.1 ± 0.9	11.8 ± 1.9	10.1 ± 1.5	12.2 ± 3.1
AST	IU/L	113 ± 59	214 ± 85	110 ± 41	210 ± 43	253 ± 68 **	134 ± 11
ALT	IU/L	37 ± 12	16 ± 27	50 ± 42	5 ± 2	27 ± 28	19 ± 6
ALP	IU/L	506 ± 21	476 ± 40	443 ± 21	454 ± 54	506 ± 19	411 ± 35 **
γGTP	IU/L	<3	<3	<3	<3	<3	<3
T-CHO	mg/dL	68 ± 4	59 ± 2 **	64 ± 3	61 ± 5	68 ± 4	57 ± 3 **
TG	mg/dL	30 ± 8	14 ± 3 *	23 ± 9	21 ± 9	20 ± 7	13 ± 5 **
BIL	mg/dL	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.05	0.11 ± 0.08
Glucose	mg/dL	182 ± 18	98 ± 9 **	189 ± 31	117 ± 18 **	124 ± 22 **	123 ± 32 **

Each value represents the mean ± S.D.

*, **; significantly different from the vehicle group at p < 0.05 and 0.01, respectively.

Table 5. Serum biochemistry for Balb/C mouse treated with AgNP and antioxidants (実験2)

		24 h					
		Saline + Vehicle	Saline + AgNP	NAC + AgNP	Vit C + AgNP	Vit E + AgNP	BSO + AgNP
No. of animals		3	2	3	3	3	2
TP	g/dL	5.0 ± 0.1	4.4 ± 0.6	4.7 ± 0.1	4.1 ± 0.2 **	4.3 ± 0.1 *	4.2 ± 0.0 *
ALB	g/dL	3.3 ± 0.1	2.9 ± 0.4	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.1 *	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.1 *
A/G		2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.8 ± 0.3
BUN	mg/dL	24.3 ± 2.7	21.6 ± 8.5	22.5 ± 1.5	29.3 ± 4.2	31.5 ± 3.1	24.8 ± 3.1
Cre	mg/dL	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.15 ± 0.02
Na	mEq/L	156 ± 2	154 ± 2	155 ± 0	156 ± 1	159 ± 5	157 ± 1
K	mEq/L	4.2 ± 0.3	3.8 ± 0.8	4.5 ± 0.2	3.9 ± 0.4	3.6 ± 0.4	3.6 ± 0.3
Cl	mEq/L	112 ± 7	109 ± 9	117 ± 1	105 ± 8	101 ± 4	110 ± 11
Ca	mg/dL	8.4 ± 0.3	8.0 ± 0.6	8.7 ± 0.2	7.8 ± 0.6	8.0 ± 0.0	8.1 ± 0.7
IP	mg/dL	10.2 ± 1.0	8.4 ± 2.2	9.9 ± 0.6	8.2 ± 0.7	8.5 ± 0.9	8.2 ± 1.7
AST	IU/L	79 ± 4	304 ± 359	69 ± 10	514 ± 166 *	395 ± 46	384 ± 102
ALT	IU/L	34 ± 6	27 ± 16	20 ± 6	91 ± 105	22 ± 12	91 ± 47
ALP	IU/L	429 ± 88	400 ± 1	383 ± 29	389 ± 16	441 ± 9	360 ± 6
γGTP	IU/L	<3	<3	<3	<3	<3	<3
T-CHO	mg/dL	84 ± 6	71 ± 2 *	78 ± 2	75 ± 3	97 ± 4 *	77 ± 6
TG	mg/dL	36 ± 12	31 ± 5	29 ± 10	24 ± 12	29 ± 2	21 ± 18
BIL	mg/dL	0.07 ± 0.03	0.13 ± 0.07	0.07 ± 0.01	0.18 ± 0.05	0.18 ± 0.09	0.16 ± 0.01
Glucose	mg/dL	174 ± 20	125 ± 77	147 ± 18	97 ± 22	87 ± 28	82 ± 14

Each value represents the mean ± S.D.

*, **; significantly different from the vehicle group at p < 0.05 and 0.01, respectively.

Table 6. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP up to 6 hours (実験 2)

Organ and lesions	Treatment	6 hr					
		Vehicle	AgNP	NAC + AgNP	Vit C + AgNP	Vit E + AgNP	BSO + AgNP
No. of animals		4	5	5	5	5	5
Liver	Congestion, intermediate zone	0	5**	0	5**	5**	3
	+	0	3	0	5**	4*	2
	++	0	2	0	0	1	1
	Increased cellular component in sinusoid	0	5**	0	4*	4*	1
	Vacuolation, hepatocyte	0	5**	0	3	1	3
	+	0	2	0	2	1	2
	++	0	3	0	1	0	1
	Cytoplasmic inclusions, hepatocyte	0	2	0	1	0	1
	+	0	1	0	1	0	1
	++	0	1	0	0	0	0
	Single cell necrosis, hepatocyte	0	1	0	0	0	0
	Focal necrosis, hepatocyte	0	0	0	1	0	0
	Dark brown pigment deposition, Kupffer cell	0	0	0	1	2	0
	+	0	0	0	1	0	0
++	0	0	0	0	2	0	
Gallbladder	Edema, subserosa	0	4*	3	3	1	4
	+	0	2	3	2	1	2
	++	0	2	0	1	0	1
	Hemorrhage	0	0	0	1	0	0
Spleen	Congestion +	0	1	0	0	1	0
	+	0	1	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	1	0
	Apoptosis, white pulp	0	2	0	4*	3	4*
	+	0	2	0	4*	1	3
	++	0	0	0	0	1	1
+++	0	0	0	0	1	0	
Thymus	Apoptosis, cortex	0	0	0	2	3	2
	+	0	0	0	2	3	1
	++	0	0	0	0	0	1
	Hemorrhage	0	0	1	0	0	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0 ^a	3 ^b	4	4 ^{b*}	4 ^{b*}	5*
	Apoptosis	0 ^a	0 ^b	1	1 ^b	0 ^b	0
Mesenterium	Inflammatory cell foci +/-	4	5	5	5	5	5
	+	2	3	2	5	4	4
	++	2	2	3	0	1	1
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte +	0	5**	5**	5**	5**	5**
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, paracortex	0	0	0	1	0	0
Kidney	Regenerative tubules	4	3	4	4	5	5
Heart	Mineralization, epicardium	3	3	5	5	4	3
Lung	Hemorrhage +	0	1	3	1	1	0
	Dark brown pigment deposition, alveolar macrophage	0	0	0	0	2	0
Pancreas	Hemorrhage	0	0	1	0	1	0

*,**; significantly different from the vehicle group at p<0.05 and 0.01, respectively. a; n=3, b; n=4.

Table 7. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP up to 24 hours (実験 2)

Organ and lesions	Treatment	24 hr					
		Vehicle	AgNP	NAC + AgNP	Vit C + AgNP	Vit E + AgNP	BSO + AgNP
No. of animals		3	2	3	3	3	2
Liver	Congestion, intermediate zone	0	1	0	3	3	2
	+	0	0	0	1	0	1
	++	0	1	0	2	3	1
	Increased cellular component in sinusoid	0	1	0	3	3	1
	Vacuolation, hepatocyte	0	1	0	3	3	1
	+	0	0	0	2	2	1
	++	0	1	0	1	1	0
	Cytoplasmic inclusions, hepatocyte	0	1	0	3	3	1
	+	0	0	0	1	3	1
	++	0	1	0	2	0	0
	Single cell necrosis, hepatocyte	0	1	0	3	2	0
	+	0	1	0	2	2	0
	++	0	0	0	1	0	2
	Focal necrosis, hepatocyte	0	1	0	2	0	0
Dark brown pigment deposition, Kupffer cell	0	1	0	0	2	0	
Gallbladder	Edema, subserosa	0	0	0	2	1	2
	Hemorrhage	0	1	0	2	0	0
Spleen	Congestion	0	1	0	3	2	2
	Apoptosis, white pulp +	0	1	0	2	1	2
	+	0	1	0	0	1	2
Thymus	++	0	0	0	2	0	0
	Apoptosis, cortex	0	1	0	2	3	2
	Apoptosis, medulla	0	0	0	2	3	1
Thoracic lymph node	Hemorrhage	0	1	0	0	1	0
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte+	0	2	3	2	3	2
	Apoptosis	0	1	0	1	1	2
Mesenterium	Hemorrhage	0	0	0	0	1	0
	Inflammatory cell foci	3	2	3	3	3	2
	+	2	2	3	3	1	1
	++	1	0	0	0	2	1
Mesenteric lymph nodes	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	2	3	3	3	2
	Apoptosis, paracortex	0	0	0	1	0	0
Kidney	Regenerative tubules	3	2	3	2	3	2
Heart	Mineralization, epicardium	3	2	3	2	2	1
Lung	High cellularity, alveolar wall	0	1	0	0	0	0
	Hemorrhage	1	2	1	0	2	0
Pancreas	Hemorrhage	0	0	0	1	1	1

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、酸化チタン、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。その結果、今回検討対象とした酸化チタン（ルチル型、粒子径 35 nm）及び酸化亜鉛（粒子径 35 nm）は、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果を示すが、抗原経皮感作は増強しないことが示された。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。今後は経皮感作-経口惹起の動物モデル実験系により、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。

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。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。

B. 研究方法

試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン B (ルチル型、粒子径 35 nm)

酸化亜鉛 B (粒子径 35 nm)

の 2 種のナノマテリアル (表面未処理) を使用した。また、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果の検討においては、前年度までの先行研究において抗原経皮感作を増強することが示されている、

酸化チタン D (アナターゼ型、
粒子径 15 nm)

酸化亜鉛 A (粒子径 25 nm)

の 2 種 (表面未処理) についても合わせて検討した。

抗原タンパク質としては、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。

酸化チタン及び酸化亜鉛ナノマテリアルの懸濁液調製

酸化チタン及び酸化亜鉛は、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。

【実験 1】抗原の腹腔内投与による感作に対する酸化チタン及び酸化亜鉛の影響に関する検討

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。各群の共存物質等の実験条件を Table 1 に示す。7 週齢時に、酸化亜鉛 A、B、及び酸化チタン D のそれぞれについて、OVA 20 μ g 及びナノマテリアル (2 mg あるいは 10 mg) を生理食塩水 300 μ L に懸濁し、腹腔内投与 (i.p.) した (Day 0、1 次免疫)。陽性対照アジュバントとしては Alum (水酸化アルミニウムゲル (コスモ・バイオ (株))、2 mg) を用いた。14 日後 (Day 14) に再度投与し (2 次免疫)、翌日 (Day 15) に血液を採取して、血清中の OVA 特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。

抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタン及び酸化亜鉛の影響に関する検討 (【実験 2, 3】)

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。実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。また、各群の共存物質等の実験条件を Table 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 溶液 (1-2 μ g/50 μ L)、あるいは OVA 及び酸化チタン/酸化亜鉛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 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/100 μ L を i.p. して行った。i.p. 後 30 分間、マウスの直腸内体温を測定した。また、アナフィラキシー症状を観察し、Table 2 の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。

統計解析

データはMicrosoft Excelにより集計しV群、あるいはOVA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】抗原の腹腔内投与による感作に及ぼす酸化チタンの影響に関する検討

酸化亜鉛及び酸化チタン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、まず、動物実験における最も基本的な感作方法として、OVAの腹腔内投与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。)酸化亜鉛A、Bどちらも、10 mg投与群(OVA-ZnOA_H群、OVA-ZnOB_H群)では、投与翌日までに5匹全匹が死亡した。また、酸化亜鉛A 2 mg投与群(OVA-ZnOA_L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。2次免疫翌日(Day 15)の血清中の抗原特異的IgE、IgG1及びIgG2a抗体産生をFig. 2に示す。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Th1細胞優位な免疫応答の際に産生される抗体である。OVA腹腔感作時に陽性対照アジュバントとしてAlum

を使用した群(OVA-ALUM群)では、抗原特異的IgE及びIgG1抗体産生については、OVAのみを投与したアジュバント不使用群(OVA群)と比較して増大していたことから、AlumのTh2細胞優位な免疫応答を誘導するアジュバントとしての効果が確認された。OVA腹腔感作時に酸化亜鉛2 mgを共存させた場合(OVA-ZnOA_L群、OVA-ZnOB_L群)、IgEについては、酸化亜鉛A、BともにOVA群に対して有意な抗体産生の増大が見られた。IgG1についても増大が見られ、酸化亜鉛Bの場合は有意に増大していた。またIgG2aについても、酸化亜鉛A、BともにOVA群に対して有意な抗体産生の増大が見られた。一方、酸化チタンDを共存させた場合は、IgE、IgG1産生ともに高用量群(OVA-TiO2D_H群)でOVA群に対して有意な増大が見られた。IgG2aに関しては有意な増大は見られなかった。これらの結果から、今回実験に用いた3種のナノマテリアルは全て、OVAのi.p.感作を増強することが示された。また、酸化チタンDはAlumと同様にTh2細胞有意な免疫応答を誘導したが、酸化亜鉛A、BではIgG2aの産生も見られ、またi.p.による毒性も見られたことから、酸化亜鉛と酸化チタンではその生体影響が異なることが示された。

抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタン/酸化亜鉛の影響に関する検討

近年、加水分解コムギタンパク質を含有する洗顔石鹸の使用によるコムギアレルギー発症事例のように、タンパク質が皮膚から取り込まれて抗原となる経皮感作経路がアレルギー発症の重要な要因として注目されている。そこで抗原の経皮的な感作時に酸化チタンあるいは酸化亜鉛ナノマテリアルを共存させた場合の影響について検討した。

工業的に利用されている酸化チタンにはルチル型とアナターゼ型の2種の結晶型が存在する。前述の先行研究において、酸化チタンに関しては、酸化チタンA(ルチル型、粒子径15 nm)、

酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm)、及び酸化チタン D について検討したところ、酸化チタン C が最も強く経皮感作を増強し、酸化チタン A 及び D もある程度の増強効果を示した。また酸化亜鉛 A (粒子径 25 nm) についても経皮感作を増強する傾向が見られた。

本研究においては、前述の酸化チタン B、及び酸化亜鉛 B について、先行研究と同様の方法にて経皮感作増強効果の有無に関する検討を実施した。

【実験 2】酸化チタン B の共存効果

Fig. 3 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。OVA 群では IgE、IgG1 の産生が見られた。酸化チタン B 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大は見られなかった。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、直腸内体温の測定、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。結果を Fig. 4 に示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、OVA 群では V 群と比較して直腸温が平均 3.5°C 低下していた。酸化チタン B を共存させた群では、OVA 群と比較して体温低下の増強は見られなかった。B には惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。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。酸化チタン B を共存させた群では、OVA 群と比較してヒスタミン濃度の増大は見られなかった。C には惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果を示す。OVA 群では V 群と比較してスコアの大きな増大が見られた。酸化チタン B を共存させた群では、OVA 群と比較してスコアの増大は見られなかった。これらの結果から、酸化チタン B は OVA 経皮感作を増強しないこ

とが示された。

【実験 3】酸化亜鉛 B の共存効果

Fig. 5 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。OVA 群では IgE、IgG1 の産生が見られたが、酸化亜鉛 B を共存させたすべての群で、OVA 群と比較して抗体産生の増大は見られなかった。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。

続いて Fig.5 にはアナフィラキシー反応惹起後の結果を示す。惹起後 30 分間の直腸内体温の変化 (A) について、30 分後、OVA 群では V 群と比較して平均 3.9°C 低下していた。酸化亜鉛 B を共存させた群では、OVA 群と比較して体温低下の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 (B) について、OVA 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度が増大していた。酸化亜鉛 B 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 (C) について、OVA 群では V 群と比較してスコアの大きな増大が見られた。酸化亜鉛 B を共存させた群では、OVA 群と比較してスコアの増大は見られなかった。これらの結果から、酸化亜鉛 B は OVA 経皮感作を増強しないことが示された。

なお、i.p.投与と異なり経皮感作の場合は酸化亜鉛による急性毒性は観察されなかった。

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材料について、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する予定であり、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。

抗原 i.p.時に酸化亜鉛 B (35 nm) を共存させたところ、感作を増強する効果が見られた。また、先行研究において使用した酸化亜鉛 A (25 nm) 及び酸化チタン D (アナターゼ型、15 nm) についても、i.p 感作を増強する効果が見られた。先行研究では、この他に、酸化チタン A (ルチル型、15 nm)、酸化チタン B (ルチル型、35 nm)、酸化チタン C (アナターゼ型、6 nm) についてもこのような増強効果があることを示している。従って、酸化チタン、酸化亜鉛等のナノマテリアルは、抗原 i.p.による感作においてアジュバント効果を示すことが明らかとなった。但し、酸化亜鉛の i.p.では急性毒性が認められた。酸化亜鉛 A, B の高用量群 (10 mg 投与) では、1 次免疫の翌日までに各群 5 匹全匹が死亡し、酸化亜鉛低用量群 (2 mg 投与) では感作期間中に 5 匹中 2 匹が死亡した。酸化チタンではこのような急性毒性は見られなかった。酸化亜鉛 A の方が酸化亜鉛 B と比較してより強い毒性が見られたことから、粒子径が小さい方が強い毒性を示す可能性が考えられた。また、酸化チタンを共存させた場合は、Alum と同様に OVA 特異的 IgE 及び IgG1 の産生が増強され、IgG2a 産生は見られなかったのに対し、酸化亜鉛を共存させた場合は IgG2a 産生の増強効果も見られた。これらの結果から、酸化亜鉛と酸化チタンでは生体影響が異なることが示された。これは化学的特性の違いを反映しているものと考えられる。

一方、酸化チタン B、酸化亜鉛 B 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、経皮感作を増強する効果は見られなかった。先行研究では、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こと、また、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。これらの結果、及び本研究における酸化チタン B の結果より、酸化チタンの経皮感作増強効果は粒子径により異な

り、粒子径が小さい酸化チタンの方が経皮感作増強効果が大きいことが示された。また、酸化亜鉛の場合も、先行研究において、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ことから、酸化チタンの場合と同様に、この増強効果は粒子径に依存している可能性が示唆された。

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。本研究の結果は、この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たものである。これまでの検討結果を考えると、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も示されており、やはり注意すべきであろう。

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。

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である酸化チタン及び酸化亜鉛について、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。今回用いた酸化チタン (ルチル型、35 nm) 及び酸化亜鉛 (35 nm) では、抗原 i.p.時のアジュバント効果は見られたが、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。今後は経皮感作-経口惹起の動物モデル実験系により、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。

3. その他
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Shoji M, Adachi R, Akiyama H. Japanese food allergen labeling regulation: an update. J AOAC Int 2018, 101, 8-13.

2. 学会発表

1) 為広紀正、安達玲子、木村美恵、酒井信夫、崔 紅艶、最上（西巻）知子、近藤一成. ナノ酸化チタンの結晶構造の違いが抗原の経皮感作性に与える影響

第44回日本毒性学会学術年会(2017年7月)

2) 酒井信夫、田原麻衣子、曾我慶介、安達玲子、近藤一成、五十嵐良明. ヒト急性単球性白血病細胞株 (THP-1) より分化誘導した樹状細胞様細胞の抗原提示におけるナノ酸化チタン共存の影響について

第24回日本免疫毒性学会学術年会 (2017年9月)

3) Adachi R, Tamehiro N, Sakai S, Kimura Y, Cui HY, Nishimaki-Mogami T, Kondo K. Enhancement of transdermal protein sensitization by titanium dioxide nanomaterials. 57th SOT Annual Meeting & ToxExpo (2018年3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

Table 1 各実験群の感作検体及び共存物質

実験1 抗原の腹腔内投与による感作に及ぼす酸化チタン及び酸化亜鉛の影響(1群5匹 x 9群)

群名	感作検体	共存物質
V	PBS	—
OVA	OVA (20 µg)	—
OVA-ALUM	OVA (20 µg)	Alum (2 mg)
OVA-ZnOA_L	OVA (20 µg)	酸化亜鉛A (2 mg)
OVA-ZnOA_H	OVA (20 µg)	酸化亜鉛A (10 mg)
OVA-ZnOB_L	OVA (20 µg)	酸化亜鉛B (2 mg)
OVA-ZnOB_H	OVA (20 µg)	酸化亜鉛B (10 mg)
OVA-TiO2D_L	OVA (20 µg)	酸化チタンD (2 mg)
OVA-TiO2D_H	OVA (20 µg)	酸化チタンD (10 mg)

※酸化亜鉛A(粒子径: 25 nm)、酸化亜鉛B(粒子径: 35 nm)、酸化チタンD(アナターズ型、粒子径: 15 nm)

実験2 抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタンの影響(1群5匹 x 8群)

群名	感作検体	共存物質
V	PBS	—
OVA1	OVA 1 µg	—
OVA1 TiO2 1.25mg	OVA 1 µg	酸化チタン 1.25 mg
OVA1 TiO2 125µg	OVA 1 µg	酸化チタン 125 µg
OVA1 TiO2 12.5µg	OVA 1 µg	酸化チタン 12.5 µg
OVA1 TiO2 1.25µg	OVA 1 µg	酸化チタン 1.25 µg
OVA1 TiO2 125ng	OVA 1 µg	酸化チタン 125 ng
OVA1 TiO2 12.5ng	OVA 1 µg	酸化チタン 12.5 ng

※酸化チタンB(ルチル型、粒子径: 35 nm)

実験3 抗原の経皮感作に及ぼす酸化亜鉛の影響(1群5匹 x 8群)

群名	感作検体	共存物質
V	PBS	—
OVA2	OVA 2 µg	—
OVA2 ZnO 1.25mg	OVA 2 µg	酸化亜鉛 1.25 mg
OVA2 ZnO 125µg	OVA 2 µg	酸化亜鉛 125 µg
OVA2 ZnO 12.5µg	OVA 2 µg	酸化亜鉛 12.5 µg
OVA2 ZnO 1.25µg	OVA 2 µg	酸化亜鉛 1.25 µg
OVA2 ZnO 125ng	OVA 2 µg	酸化亜鉛 125 ng
OVA2 ZnO 12.5ng	OVA 2 µg	酸化亜鉛 12.5 ng

※酸化亜鉛B(粒子径: 35 nm)

Table 2 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、後ろ足で耳の穴を掻く
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

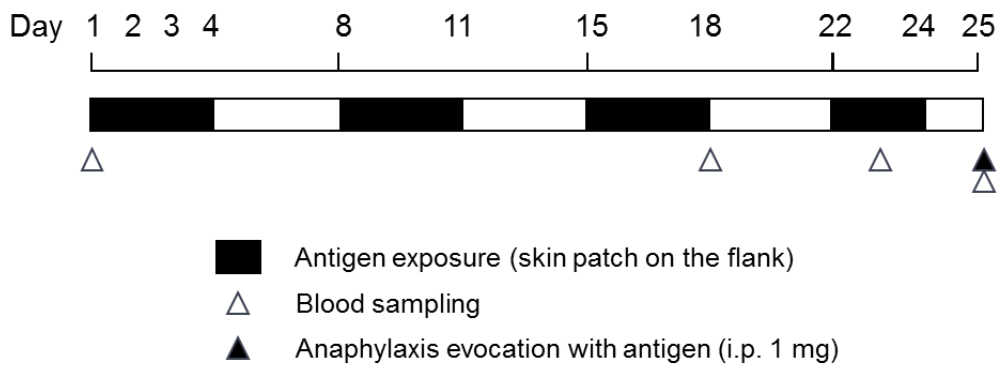


Figure 1 経皮感作試験スケジュール

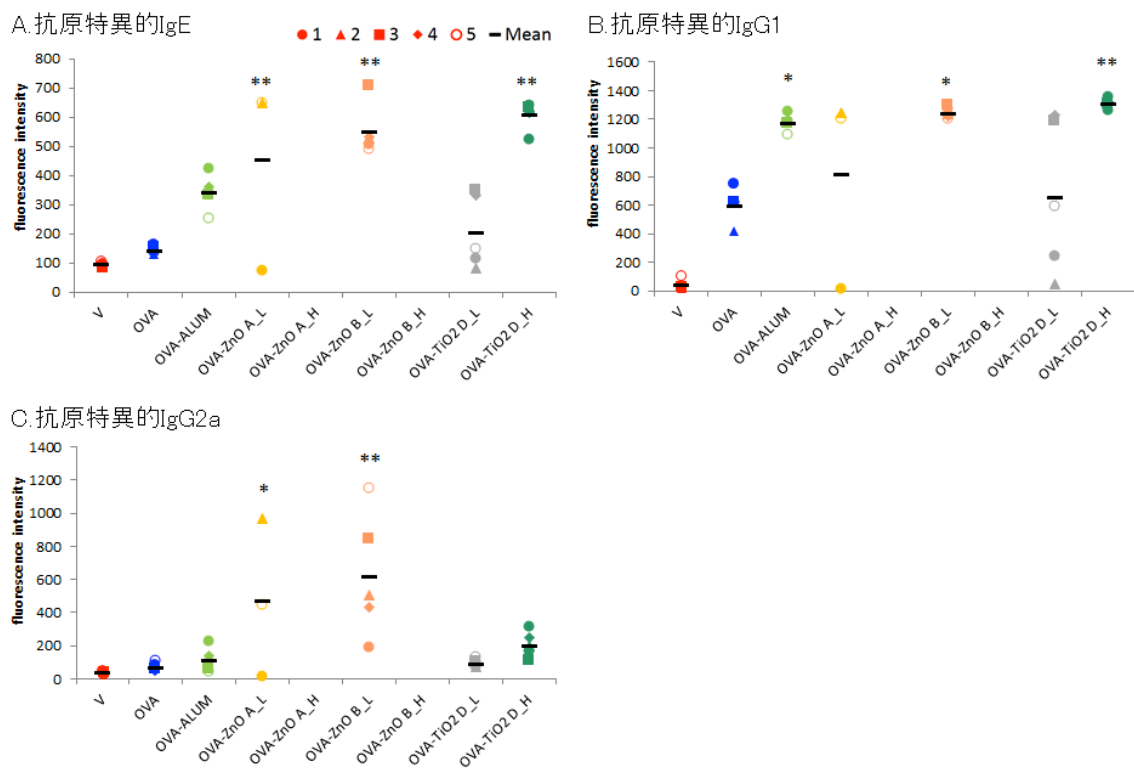


Figure 2 抗原の腹腔内投与による感作における抗原特異的抗体産生(【実験1】)
各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. OVA group.

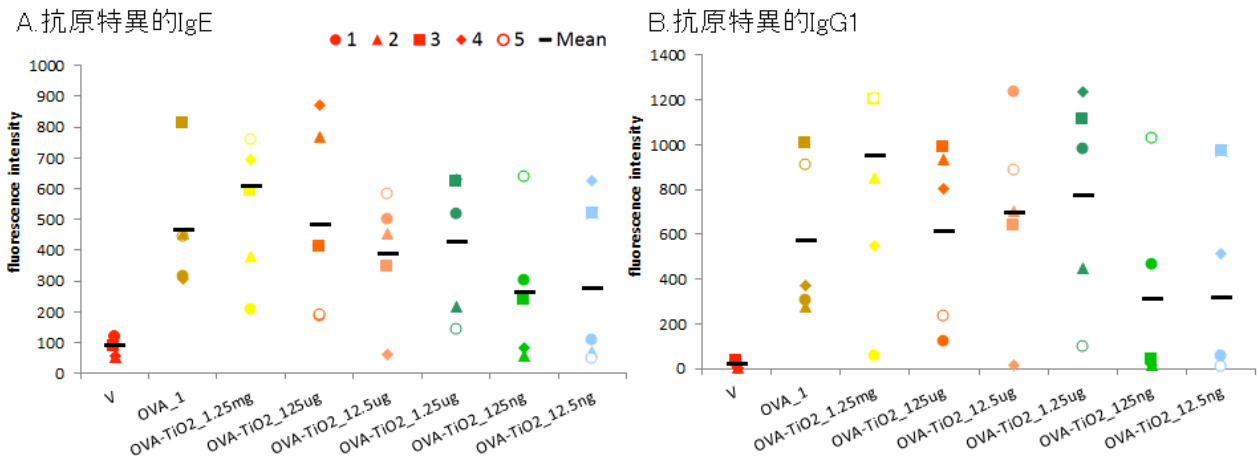
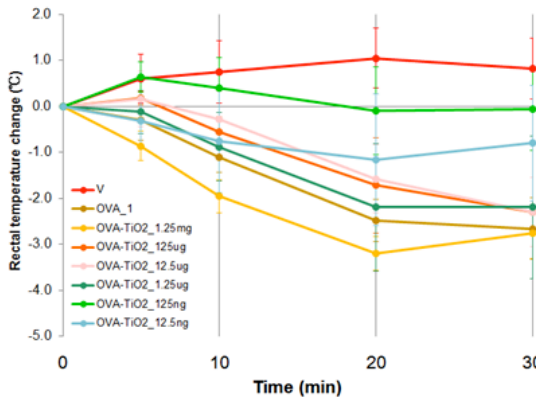
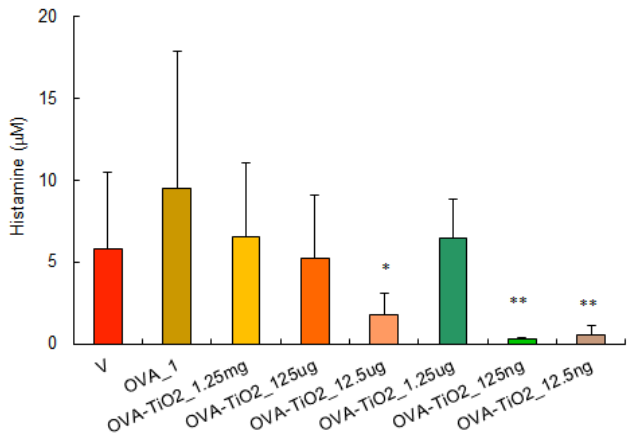


Figure 3 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験2】酸化チタンB)
 各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
 OVA群と酸化チタン共存群との間で有意差は見られなかった。

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

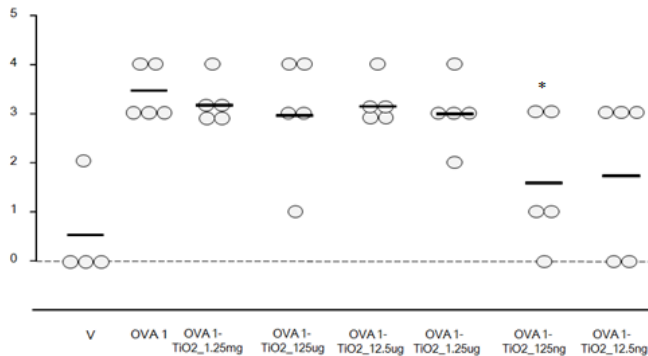
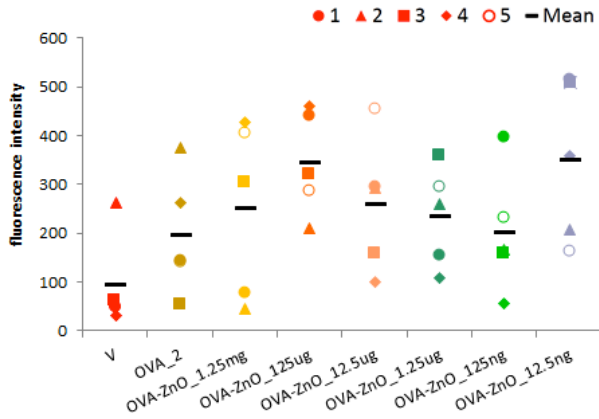


Figure 4 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験2】酸化チタンB)
 A, B: 各群のデータをMean ± S.D.で示す。C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
 *p<0.05, **p<0.01 by Dunnett's test vs. OVA group.

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

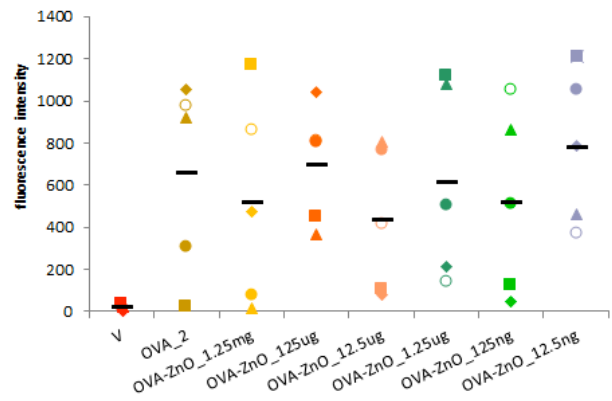
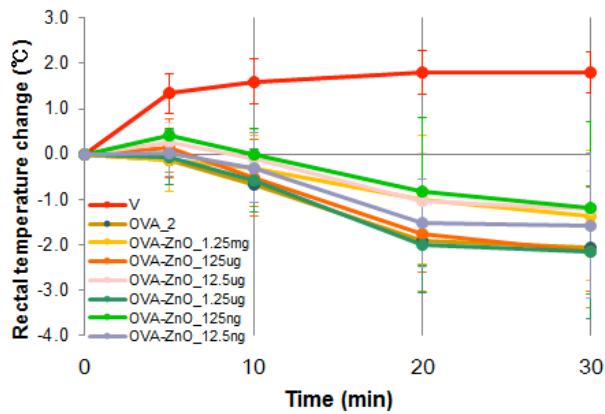


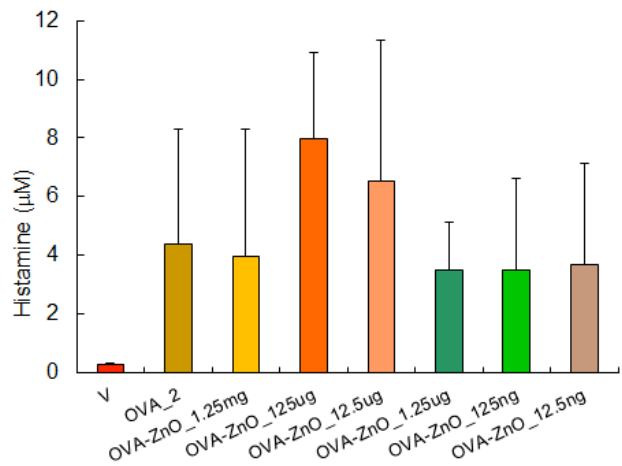
Figure 5 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験3】酸化亜鉛B)

各群の処理抗原についてはTable 1に示す。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。OVA群と酸化チタン共存群との間で有意差は見られなかった。

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

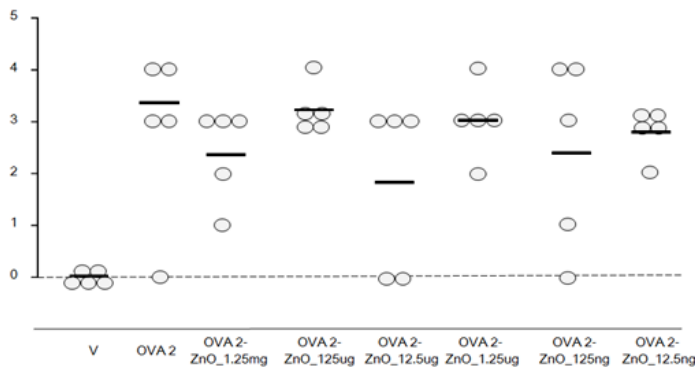


Figure 6 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験3】酸化亜鉛B)

A, B: 各群のデータをMean±S.D.で示す。C: 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。OVA群と酸化チタン共存群との間で有意差は見られなかった。

研究課題名: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

分担研究課題名: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

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:五十嵐 智女 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 第一室研究助手

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暴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ている。29年度は、欧州食品安全機関(EFSA)が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワークおよび、食品接触材料の科学ネットワークに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「食品および飼料連鎖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」の作成を行っており、ナノマテリアルの科学ネットワークではガイダンスのパブコメに向けた議論が行われた。ガイダンスには、2011年のガイダンスより詳細な分析法や *in vitro* 分解性などを用いた評価基準、ナノマテリアルに適用可能な生物学的試験(*in vivo/in vitro*)法に関して網羅的な情報を収載したものになっていることが示された。また、食品接触材料の科学ネットワークでは、容器等の印刷用インクに含まれるナノサイズの顔料に関しての分析法や今後の評価指針等の方向性について関心が高まっていることが示された。

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。国際的には、欧州連合ではナノ材料の届出・登録の義務化の動きがあり、米国でも EPA を主体に規制や監視が検討されている。本邦でも、カーボンナノチューブ等では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。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。さらに、ナノテクノロジーは食品・食品容器分野における積極的な利用も期待されており、これまでの研究では、食品関連分野における使用実態を調査した結果、ナノ銀や、二酸化チタンについては容器・包装への使用が確認できたほか、欧州では EFSA が 2010 年から

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評価に関する科学ネットワーク (Scientific network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed)において、積極的な議論を行っている。本研究ではこうした欧州における動向を中心にし、国際的なナノマテリアルの評価状況に関する最新動向の調査を行うことを目的とした。

B. 研究方法

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(Scientific network of risk assessment of nanotechnology in Food and Feed)(第7回会議、2017年11月開催)に関して調

査を行った。また、食品接触材料に関する科学ネットワーク(Scientific Network of the food ingredients and food packaging (FIP) Unit on food contact materials (FCM), the 'EFSA FCM Network') (第5回会議2017年7月開催)において、食品接触材料へのナノ粒子の敵に関する議題を調査した。

C. 研究結果

1, 第7回食品および飼料におけるナノテクノロジー・リスクアセスメント(FSA 科学ネットワーク)

今回の会議では、2018年の1月に予定されている「食品および飼料連鎖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:第1部、ヒトおよび動物の健康」のバブコメのドラフトについて議論が行われた。

EFSAは、食品および飼料連鎖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リスクアセスメントの人間および動物の健康(第1部)に関するこのガイダンスを作成した。これは、EFSAに付託された新規食品、食品接触材料、食品/飼料添加物および殺虫剤を含む分野をカバーしている。このガイダンスは、以前(2011年)のガイダンスの発表以降に得られた新しい知見を考慮に入れている。将来的には、新規食品、食品/飼料添加物、殺生物剤、殺虫剤、殺虫剤、殺虫剤および食品接触材料の各分野で適用されるナノコンポジットやナノカプセルにおける知見も考慮される可能性がある。ガイダンスは、ナノ物質の物理化学的特性、暴露評価、およびハザード特性に関するより多くの洞察と関連性のある新しい科学研究を取り入れている。具体的には、材料がナノマテリアルであるかどうかを判定すべき重要なパラメータ、ナノマテリアルのキャラクタリゼーションに使用できる手法と技術、複雑なマトリックスの中での測定方法について、ナノマテリアルの物理化学的特徴付けについて詳細に説明している。また、暴露評価とハザードの同定とキャラクタリゼーションに関連しても詳細に記載している。特に、*in vivo* *in vitro*の毒物学的研究に関するナノ特異的考察が議論され、毒物学的試験

のための段階的フレームが概説されている。初期的段階の結果に応じて、生殖毒性、発生毒性、免疫毒性、アレルギー誘発性、神経毒性、腸内微生物への影響、および内分泌活性を調べる研究が必要となるかもしれないことや、データギャップを補完するためのリードアクロス法の適用の可能性として、ナノ物質の*in vitro*試験に関連する一般的な問題に加えて、*in vitro*消化試験、トキシコキネティクス、遺伝毒性についても触れている。統合化試験戦略(ITS)やMOAの潜在的な使用も議論している。ガイダンスでは、リスクの特徴付けと不確実性分析へのアプローチを提案し、この分野におけるさらなる研究のための勧告も提供している。

食品および飼料連鎖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:第1部、ヒトおよび動物の健康の概要

物理化学的特徴付けについては、ECが推奨する定義に従って材料がナノマテリアルであるかどうかを確認し、特定するために、NanoDefineプロジェクトによって開発された決定フロースキームがこのガイダンスに例示されている。ECの定義は現在審議中ではあるが、ナノスケールと見なされる(1~100nmとなる)粒子の数が50%以上となるものをナノマテリアルとしており、この定義の使用を推奨している。

原則としては、暴露評価とリスク評価とともに危険有害性の同定/特徴付けに基づく化学物質の現在のリスクアセスメントのパラダイムは、ナノマテリアルにも適用可能である。しかし、粒状材料のサイズをナノスケールに縮小することは、対応する非ナノ材料と比較して毒物学的影響に変化をもたらす特性の違いや生体動態的挙動をある程度変化させる可能性があるため、本ガイダンスの規定に従ってナノマテリアルの安全性評価を実施しなければならない。

ナノマテリアルのリスク評価の前提条件として、粒子表面(コーティングを含む)上の物質だけでなく、コアに相当する部分のナノマテリアルの構成要素と不純物の明確な特徴付けも必要とする。物理化学的パラメータに関する情報は、ナノ材料の潜在的な毒性の重要な指針を提供することもでき、適切な試験戦略を

決定するのに役立つ。また、ナノ材料のキャラクタリゼーションは、異なる段階で実施されることが推奨されている。ガイダンスには、パラメータの測定に使用できる現在利用可能な方法とツール、および考慮すべき品質管理の側面の概要も記載されているが、粒子サイズ分布は、複数の独立した技術(そのうちの1つは電子顕微鏡法)によって決定されるべきであることを推奨している。

溶解によって引き起こされる高い分解性により、ナノ材料が対応する非ナノ材料形態に変化することにも注目すべきである。このガイダンスに記載されているナノ特異的な評価は、食品製造および加工プロセスの生理学的条件あるいは食品マトリックスおよび胃腸系でイオンまたは分子に急速に分解しない物質が局所または全身レベルで生物学的実体と相互作用する機会を評価する。

セクション全体をととしてガイダンスは、ナノ特異的データのいくつかの測定要件が免除される可能性を示している。例えば、ナノ材料の使用時にはナノマテリアルとして局所的または全身的な暴露をもたらさないケースや、食物接触材料からナノマテリアルの食品への移動がないことが示されるケースがある。また、ナノマテリアルは同じ物質で、材料サイズ、結晶形、形状、表面特性などが異なるいくつかの形で開発できるため、ケースバイケースによる個別評価を避けるためのグループ化/リードアクロス手法による評価の可能性について説明している。

食品/飼料を介したナノ物質の暴露評価の原則は、非ナノ物質の場合と同様に同様の暴露シナリオの可能性を考慮する必要がある。間接的な暴露(例えば、食物接触材料からの移動や、餌を摂取した動物を経由した食品などへのキャリアオーバーなど)の可能性がある場合は、ナノマテリアルまたはその分解生成物が食品/飼料マトリックス中に粒子として存在したままであるかどうかを決定すべきである。暴露データが得られない場合、または複合マトリックス中のナノ粒子の特性および量を決定することができない場合は、最悪のシナリオとして、食品/飼料製品に添加されたすべてのナノ物質が存在し、摂取され、ナノマテ

リアルとして吸収されると仮定する。

第6章では、毒物学的有害性の同定と毒性評価のためのナノマテリアルの試験のための段階的アプローチを概説し、適用可能な *in vitro* および *in vivo* 試験が説明されている。提案されたアプローチでは、最初のステップで、ナノマテリアルの胃腸管での分解性を評価するための、胃腸管を代表する条件下での *in vitro* 試験を行う。ナノマテリアルが急速に分解しない場合には、その定量化および特性化されるべきである。胃腸管内の条件下で高い分解速度が示される場合は、関連する非ナノ材料に関する EFSA ガイダンスに従って評価されるべきである。

急速に分解しないナノマテリアルのみが、ステップ1(一連の *in vitro* 試験や情報収集)の下で試験することが考慮される。特に、ナノマテリアルまたはその成分の発癌性、突然変異誘発性、生殖毒性(CMR)に関する情報は、ステップ1で検討される。模擬リソソーム条件下での分解試験も実施され、ナノ物質の特定の特性を考慮した遺伝毒性を含んだ *in vitro* 毒性試験バッテリーを実施する。

ステップ1の情報でナノ物質が生体内で残留性が無く非遺伝毒性である場合には、ステップ2以降の評価を避けることができるかもしれないが、現状では従来の(ナノ以外の)物質に対する安全性評価が依然として必要である。ステップ2には、経口吸収および組織分布の評価を行うためのサテライト群を行う TG 407 試験の拡張パラメータを含むように修正された 90 日間反復投与試験(OECD TG408)が行われる。これらの試験から得られた陽性の結果は、ステップ3のより詳細な調査を必要とするかもしれない。ステップ3では、長期暴露中のナノマテリアルの蓄積性を調査し、実験動物とヒトとの胎内動態の違いを調べる。これらの研究により、不確実性を減少させることによってリスクアセスメントを改善することができる。ステップ3ではまた、神経毒性、免疫毒性または内分泌系への影響の専門的かつ詳細な試験を含む。食物からの潜在的な長期暴露を考慮すると、腸内微生物に対するナノ物質の潜在的影響は、特にナノ物質が抗菌効果を有する場合に考慮されるべきである。

一般に、ナノマテリアルのリスクキャラクタリゼーションは、従来の化学物質と同じ要素、すなわち、物理化学的性質、暴露および毒物学的影響に関するデータおよび情報を考慮して行われる。検証された方法を用いて適切に実施された研究から得られたデータでナノ特異的な問題を考慮すると、従来の材料に使用されているものよりも大きな不確定係数を使用する必要はない。しかし、データが不十分であるか、不的確なテストであった場合、ナノマテリアルの安全性評価のために追加の不確定係数を適用することが検討される。

ガイダンスはまた、代替試験法アプローチ、MOA および AOP に関連して現在開発中の分野についても指摘している。

2, 第 5 回食品成分および食品包装 (FIP) ユニットの科学的ネットワーク食品接触材料 (FCM) のユニット、「EFSA FCM ネットワーク」

本会議の議題として、食品接触材料の印刷インキに使用される物質の安全性評価が取りあげられ、インキ中のナノマテリアル測定や評価について関心が持たれた。

印刷インキは通常、溶媒、高分子バインダー、添加剤、および着色成分の 4 つの主要成分からなり、ほとんどが着色成分として顔料を含む。印刷されたインク膜の高い光沢および高い透明性を達成するためには、顔料粉末中の凝集物および凝集物を分割して細かく分散させると共に、分散させた顔料粒子を安定させなければならない。乾燥した印刷インキフィルムは、通常 1~1.5 μm の厚さであり、したがって、埋め込まれた粒子の全ては、通常、1 μm よりかなり小さい。実際には、これらの材料が上記の目的のために特別に製造されていないとしても、すべての印刷インキはナノオブジェクトを含む。液体印刷インキサンプルの分析には、小角 X 線散乱 (SAXS) および動的光散乱 (DLS) は適しておらず、レーザー回折分析及び光子相関分光法 (PCS) が使用されている。レーザー回折分析による分散有機顔料上の粒子分布の測定は、印刷インキ中の顔料が <100nm の範囲に相当なパー

センテージを含むことを証明している。また、走査電子顕微鏡 (SEM) でも <100nm の範囲の粒子を確認できる。レーザー回折分析の結果は、平均粒子サイズとして Cu-フタロシアニンについて 80~90nm であり、二酸化チタンについて 200~300nm であった。小板状のアルミニウム顔料は、30~40nm の平均厚さを有するため、ナノ材料としても明確に考慮する必要がある。

EuPIA (European Printing Ink Association) は、食品接触材料用の印刷インキに使用される物質の安全性評価がどのように行われるかを紹介した。照会の中で、その方針、主要なコンセプトの文書作成およびプロセスが示された。最初の評価ステップでは原材料の選択のための一般的な基準を示した。続いて、以下の 3 つの原則を含むリスク評価プロセスが行われる。

- 完全に評価された物質 (例えば Union リスト)
 - 公開毒性データに基づく自主的 TDI または SML
 - TTC 概念に基づく自主的 TDI または SML
- 暴露評価においては EU キューブモデルがデフォルトとして使用され、必要に応じて、EFSA 食品消費データや FACET などの他のモデルも使用できる。(これらの暴露評価を行うためのガイダンスが 8 月に公表されている。) 非意図的添加物や公的にリスト化されていない物質については、REACH 登録情報から有害性情報等を入手しているが、EFSA から、これらの情報は当局が評価していない情報が含まれるので注意すべきであるという提言を受けた。一方、EuPIA ではまだ評価に生物学的試験を導入していないが、将来的には取り込むべきであることが示された。インクの移行量が 10ppb を超えると予想される場合には、物質の評価申請書をドイツおよびスイス当局に申請することを業界に推奨している。ナノフォーム顔料に関する活動については、EuPIA はドイツのペイントとインク協会「German Paint and Ink Association」が、ナノスケールの顔料粒子の食品パッケージの印刷層から食品への移行挙動の分析」ドイツ連邦栄養農業省 (BMEL) と BfR との間で議論が行われていることを紹介した。

D. 考察

「食品および飼料連鎖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」が 2011 年のガイダンスの公表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が示されたものになっているが、まず、依然ナノマテリアルの定義について、EC の定義との整合性とケースバイケースで決定される科学的な判断についてどちらに従うべきなのかについて曖昧になっている。また、EC のナノマテリアルの定義に明確に含まれていない物質を評価する際の指針にいくつかの状況が概説されているが、一般論としては一般食品法とこのガイダンスの原則が適用されことになる。例えば、ナノスケールに関連する特定の特性に起因する潜在的なリスクは、それらの特性および関連する危険性に焦点を当てて評価されなければならないが、100nm 未満のサイズの材料を構成する粒子の割合とは無関係である可能性がある。また、このようなサイズの構成割合に関して閾値を確立する科学的根拠はなく、分析技術における不確実性や検出の限界の問題がある。さらに、ナノスケールの特性を保持する 100nm 超の粒子に関しては、この意味におけるナノマテリアルの最大サイズを確立することはできないと考えられる。これらのことから、単純にサイズの問題で評価指針の切り分けを行うことには慎重にあるべきであろう。また、ガイダンスには、網羅的な評価手法が記されているが、申請者が申請に必要な最小限の情報が、ガイダンスに記載されている広範なリストから明確化しにくいようである。申請者が全ての特性を評価するのは非現実的であり、網羅的なパラメータが全てのナノマテリアルに必要というわけでは無いが、妥当性の説明は申請者に任されている。

評価スキームの中でその後評価のステップを分けることとなる重要なステップとしては胃腸管内での分解性を評価する *in vitro* 分解性試験があるが、ガイダンスでは、その急速に分解されるかどうかを判定するための閾値が提案されている。しかし、一般の化学

物質とは異なり、ナノマテリアルについての標準化された手法は未だ確立されていない状況であり、将来的には修正・改良される可能性があると考えられる。また、ガイダンスにはナノマテリアルの評価において妥当性のある様々な *in vitro* 試験について例示されているが、さらなる試験が必要かどうかについての指針は示されていないとい課題もある。

一方、ガイダンスで今回提案された 90 日の反復投与毒性試験は、サテライト試験の追加によりこれまでより多くの動物を使用することが、実験動物削減の方向性と逆行していることが指摘されている。より長期の試験を行うことを回避するための方策ではあるが、将来的にはより効率的な評価法に置き換えていくことが検討されると考えられる。

食品接触材料 (FCM) ネットワーク会議では、従来その懸念が指摘されてきた、印刷用インク顔料に含まれるナノサイズの顔料についても議論が及んできたことを示している。しかし、食品接触材料の評価では、一般化学物質としての顔料の評価手法の確立自体もこれからの課題であり、未だナノマテリアルとしての評価を議論するには、科学的知見も含めてさらなる知見の収集が必要であると考えられた。

E. 結論

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暴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ている。29年度は、欧州食品安全機関 (EFSA) が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワークおよび、食品接触材料の科学ネットワークに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「食品および飼料連鎖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」の作成を行っており、ナノマテリアルの科学ネットワークではガイダンスのパブコメに向けた議論が行われた。ガイダンスには、より詳細な分析法や *in vitro* 分解性などを用いた評価基準、ナノマテリアルに適用可能な生物学的試験 (*in vivo/in vitro*) 法に関して網羅的な情報を収載したも

のになっていることが示された。また、食品接触材料の科学ネットワークでは、容器等の印刷用インクに含まれるナノサイズの顔料に関する分析法や今後の評価の方向性について関心が高まっていることが示された。

F. 研究発表

(論文発表)

Abdelgied M., El-Gazzar A., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou K. A., 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.*, 2018 May 17. doi: 10.1111/cas.13643. in press.

(学会発表)

Akihiko Hirose. International trends and necessity of chronic studies on risk assessment of nanomaterials. 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄

坂本義光, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の経気管投与ラットに見られた肺胞過形成病変の免疫組織学的性状, 第76回日本癌学会学術総会, 横浜(2017年9月28日~30日)

北條幹, 坂本義光, 山本行男, 村上詩歩, 長谷川悠子, 前野愛, 五十嵐海, 湯澤勝廣, 生嶋清美, 多田幸恵, 清水本武, 長澤明道, 久保喜一, 安藤弘, 海鋒藤文, 田中和良, 矢野範男, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大: ラットにおける多層カーボンナノチューブおよびクリソタイル誘発中皮腫の病理学的性状の比較, 第34回日本毒性病理学会学術集会, 那覇(2018年1月25日~26日)

坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブの経気管反復投与によりラット肺に誘発された増殖性病変の免疫組織学的解析, 第34回日本毒性病理学会学術集会, 那覇(2018年1月25日~26日)

Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, David Alexander, William Alexander, Takamasa Numano, Satoru Takahashi, Hirotsugu Takase, Akihiro Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate($K_2O \cdot 8TiO_2$) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury - A comparative study to titanium dioxide nano particles. 第44回日本毒性学会学術年会、7月10-12日、横浜

Ahmed M. El-Gazzar¹, Mohamed Abdelgied, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi, Ashraf Mohamed Nazem, Osama Saeid Elokke and Hiroyuki Tsuda. Comparative Pulmonary toxicity of DWCNT and MWCNT-7 in Rats 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄

Mohamed Abdelgied, Ahmed M. El-Gazzar, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Khaled Abbas Abdou, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi and Hiroyuki Tsuda. Potassium octatitanate fiber ($K_2O \cdot 8TiO_2$) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury in male Fischer 344 rats: A comparative study of titanium dioxide nano particles 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2018) (2018.3.14 San Antonio, TX, USA)

Norihiro Kobayashi, Ryota Tanaka, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Developmental toxicity assessment of four different preparations of multi-wall carbon nanotubes

in mice after repeated intratracheal instillation. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2018) (2018.3.14 San Antonio, TX, USA).

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
Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K.	Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice.	J Toxicol Pathol.	31	73-80	2018
Shoji M, Adachi R, Akiyama H	Japanese food allergen labeling regulation: an update.	J AOAC Int	101	8-13	2018
Abdelgied M., El-Gazzar A., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou K. A., 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.			2018 May 17. doi: 10.1111/cas.13643. in press