

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)

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 久美子

令和2(2020)年 6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作用について 小川久美子、曹 永晩、西川 秋佳 (資料) Figure 1~8	----- 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 1~5 Table 1~4	----- 34
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 1~7 Table 1	----- 46
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、大野 彰子、井上 薫	----- 55

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 65
---------------------	----------

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
総括研究報告書(平成30年度)

食品用途となるナノマテリアルの暴露による毒性評価に関する研究

研究代表者: 小川 久美子 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長)

研究要旨

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。また、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、免疫毒性を含む安全性評価に資するデータを蓄積するとともに、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である。

我々は、研究分担者と協力して、今年度の中旬までにナノマテリアルの経皮経口複合暴露による免疫毒性について、特にアジュバント作用の有無を検討するため、卵白アルブミン(OVA)を感作物質として用いる評価系を確立してきた。本年度は、その系を用いて、ナノ銀及びナノ酸化チタンの経皮経口暴露によるアジュバント作用並びに抗原経皮感作に与える影響を検討した。

また、形状の異なるナノ銀として、PVP でコートされた微細な板状のナノプレート(AgNP PVP プレート;厚さ 10nm、長径 30 nm, 50 nm, 100nm)を用いてマウスへの腹腔内投与による急性毒性を検討するとともに、これまでに得られた直径 10 nm, 60 nm 及び 100 nm の AgNP を等量単回腹腔内投与したマウス肝臓組織の遺伝子発現パターンについて PCR array を用いてクラスタリング解析を実施した。さらに、29 年度腹腔内投与時に急性毒性が見られたことから、ナノ酸化亜鉛の腹腔内投与による急性毒性に関する検討を行った。国際動向調査については、欧州食品安全機関(EFSA)の科学ネットワーク主催による「2019 年食品及び飼料中のナノテクノロジーのリスクアセスメントの年次報告」に関する調査を行い、これまでの EFSA ガイダンスの技術的な実装と普及、および今後開発予定の規制製品についての補足的なテクニカルガイダンスの議論について調査した。また、フランス食品環境労働衛生安全庁(ANSES)による二酸化チタンの安全性に関する再度勧告と、それに対する EFSA のステートメントに関する調査を実施した。

その結果、AgNP によるアジュバント作用検討期間中、体重に群間の差は見られなかった。下痢スコア及び直腸温については、OVA 投与群では Vehicle 群に比べ、経口による追加免疫を経ることに OVA 投与後の下痢スコアの上昇傾向及び直腸温の低下の増強並びに持続時間の延長が認められたが、経皮及び経口暴露時に AgNP を同時暴露させた群では、その程度が減弱される傾向が見られた。また、惹起後の下痢スコア及び直腸温の変動についても同様の傾向が見られた。剖検時、体重、絶対及び相対脾臓重量、腋窩及び鼠径リンパ節重量並びに大腸の長さには、群間の差異は認めなかった。OVA 特異抗体の測定では、皮膚感作を終了した 4 週時点では OVA 単独群で IgE 及び IgG1 の有意な増加が見られ、経口

AgNP 追加群でも IgE の有意な増加が見られた。経口追加免疫翌日では全ての OVA 投与群で IgE 及び IgG1 の有意な増加が見られ、経口 AgNP 追加群及び経皮及び経口 AgNP 追加群では IgG2a の有意な増加も見られた。また、経口追加免疫翌日の OVA 非特異的抗体の測定では、全ての OVA 投与群で IgE、IgG 及び IgA が有意に増加、あるいは増加傾向を示した。惹起 60 分後の血清サイトカイン測定では、全ての OVA 投与群で単球遊走因子(MCP-1)及び IL-13 の有意な増加並びに経皮及び経口 AgNP 追加群では IL-6 の有意な増加が見られ、経口 AgNP 追加群では OVA 単独群より MCP-1 が有意に高値を示した。血清ヒスタミン濃度はいずれも背景値程度であった。一方、脾臓細胞における 72 時間抗原再暴露による IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 及び INF- γ 分泌については、経口 AgNP 追加群で僅かに IL-4 及び IL-13 の増加が見られたが、OVA 単独群との差異は見られなかった。以上の結果から、OVA の経皮経口感作及び OVA の経口暴露によってアレルギー惹起が誘発される条件下において、直径 10 nm の AgNP の皮膚および経口追加暴露は明らかなアジュバント作用を示さないことが明らかとなった。

一方、ナノ酸化チタンについては、抗原の経口投与による追加免疫やアレルギー症状惹起を増強する可能性が示され、ナノマテリアルの経皮 / 経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要と考えられた。

AgNP PVP プレートの毒性については、投与 6 時間及び 24 時間後において、いずれの投与群も体温、肝臓重量、脾臓重量、及び肝臓での病理組織学的変化には明らかな毒性学的変化は認めなかった。一方で、何れのサイズの AgNP PVP プレートにおいても、投与部位である腹膜の炎症及び血管炎が誘発された。また、これまでの検討で得られた粒子状の AgNP の腹腔内投与 6 時間後のマウス肝臓における遺伝子発現を検討したところ、10 nm AgNP 投与群の肝臓は、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の肝臓とは異なるクラスターに分類され、直径 10 nm の AgNP 腹腔内投与 6 時間後のマウス肝臓における遺伝子発現が増加しているものとして、Slc2a1, Hmox1, Mmp9, Serpine1 等の Hypoxia response 関連因子および、Crp, Ccl12 等の Inflammatory response 関連因子が検出され、10 nm の AgNP 特異的な急性肝毒性には、肝臓局所あるいは全身の低酸素応答が関連している可能性が示唆された。

ANSES から再度勧告された食品添加物の二酸化チタン(E171)の安全性に関して、2017 年のラットによる発がん性促進作用の可能性を示した E171 の経口毒性に関する評価以後、25 件の試験について文献レビューが実施された。幾つかの研究では、細胞生物学的な新しいシグナルの存在や酸化ストレスを介した *in vitro* 遺伝毒性を明らかにしたが、いずれも E171 の潜在的な発癌促進効果を議論するには不十分であったとしている。また、マイクロプラスチックによる暴露に関する最新動向を調査した。2019 年 8 月に WHO は「飲料水中マイクロプラスチック」に関する技術文章を公表し、現在の飲用水中のマイクロプラスチックの存在に関するデータは限られており、入手できる限られたエビデンスに基づくと、飲用水中のマイクロプラスチックに関連するヒトの健康に対する懸念は低く、プラスチック粒子、特にナノサイズの粒子の物理的ハザードに関連する毒性について確固たる結論を導くには情報が不十分であるとされていた。一方で市販のプラスチック製ティーバッグから過去に報告された他の食品よりも数桁高いマイクロプラスチックの放出が確認されるという報告もあった。これらのことから、ヒトの健康リスク評価に適したマイクロプラスチックとナノプラスチックの摂取と吸収後の運命に関するより深い研究が必要であると共に、食品や大気を含め様々な環境媒体を介した、より広範囲の環境からのマイクロプラスチックへの総合的な暴露の研究が必要であることを示しているものと考えられた。

キーワード: ナノ銀、酸化チタン、酸化亜鉛、経皮経口感作、経口惹起系、アジュバント作用、マウスモデル、急性毒性、マウス、肝臓、遺伝子発現パターン、国際動向、EFSA、ANSES

研究分担者: 曹 永暁
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長
研究分担者: 西川 秋佳
国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員
研究協力者: 安達 玲子
国立医薬品食品衛生研究所 生化学部
室長
研究分担者: 広瀬 明彦
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測
評価部 部長
研究協力者: 為広 紀正
国立医薬品食品衛生研究所 生化学部
主任研究官
研究協力者: 大野 彰子
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測
評価部 主任研究官
研究協力者: 井上 薫
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測
評価部 室長

A. 研究目的

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

(Park MVDZ et. al., *Biomaterials.* 2011;32 (9810-9817)), 動物を用いた検討での報告はない。更に、AgNPの経皮暴露 (p.c)による免疫毒性に及ぼす影響に関する報告も乏しい。

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

平成24年頃から、ある特定の小麦タンパク質加水分解物 (グルパール19S)を含有する洗顔石鹸 (茶のしずく石鹸: 医薬部外品)の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告され、非常に大きな問題となった。我々は、当所生化学部との共同研究で、即時型アレルギー誘発経皮感作モデル実験系を用いると、小麦タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因が経皮感作性に与える影響について解析ができ、被験物質をマウス皮膚暴露後に腹腔内投与によって惹起させると、所属リンパ節の腫大を伴うアレルギー反応を示す事を病理組織学的に見いだしてきた。また、Yamashitaらによって、被験物質をマウス腹腔内投与による感作後、強制経口投与によって惹起させる評価系の開発も試みられ、有用な結果を示している (Yamashita H et. al., *Allergy.* 2012;67, (201-209), Matsui T et. al., *Int Arch Allergy Immunol.* 2017;173, (71-83)).

さらに、この系を発展させ、マウスを用いて経皮感作後、経口投与による追加免疫、その後経口投与によりアレルギー症状を惹起するプロトコールによる免疫毒性の評価系を検討してきた。特に

AgNPのアジュバント作用の有無を検討するため、卵白アルブミン (OVA)を感作物質として用いる評価系を確立してきた。昨年度の検討において、本評価系では、皮膚感作性の陽性アジュバント物質としてコレラ菌 (*Vibrio cholerae*)が産生するコレラ菌由来毒素 (コレラトキシン、CT)のBサブユニットであるCTBについてはOVAと同時の皮膚暴露によってOVA特異的抗体(IgG1及びIgG2a)産生がOVA単独群よりも有意に増加することから、皮膚感作のアジュバント作用が評価可能であることを示した。

本年度は、このOVAをアレルゲンとする系を用いて、AgNPの経皮経口暴露によるアジュバント作用を検討した。

また、26年度及び27年度の検討において、我々はAgNPの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OVAの有無にかかわらず、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、その結果を報告した(CHO YM et. al., *Toxicol Pathol.* 2018;31 (73-80))。30年度には、ナノマテリアルの立体安定剤として使用されているポリビニルピロリドン(Polyvinylpyrrolidone, PVP)で表面修飾したAgNP(直径5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg)をマウスの腹腔内投与し、その影響について検討したところ、5 nm AgNP PVP投与群において、体温低下に加え、肝臓の肉眼及び病理組織学的検査で著しい変化が認められたことから、AgNPの急性毒性は粒子のサイズに相関することが再確認された。AgNPの急性毒性メカニズムについては十分に知られておらず、ナノ粒子のサイズ及び表面修飾に加え、酸化的ストレスの関与に関する解析を進めることが必要と考えられた。本年度は、形状の異なるナノ銀として微細な板状のナノプレート(厚さ10nm、長径

30 nm、50 nm、100nm)を用いてマウスへの腹腔内投与による急性毒性を検討するとともに、これまでに得られた直径10 nm、60 nm及び100 nmのAgNPを等量単回腹腔内投与したマウス肝臓組織の遺伝子発現パターンについてPCR arrayを用いて比較検討した。

さらに、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。平成29年度においては、ナノ酸化チタン、ナノ酸化亜鉛について、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果、及び、抗原経皮感作に与える影響について検討した。平成30年度においては、引き続きナノ酸化亜鉛が抗原

経皮感作に与える影響について検討するとともに、29年度腹腔内投与時に急性毒性が見られたことから、ナノ酸化亜鉛の腹腔内投与による急性毒性に関する検討を行った。また、抗原経口投与によるアレルギー反応惹起実験系に関する検討を開始した。令和元年度においては、抗原経皮感作-経口惹起実験系を確立し、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討した。

近年、ナノマテリアルを用いた材料は、産業分野において消費者に幅広く利用されており、今後、更なる応用が期待されている。一方、ナノマテリアルの安全性に対する懸念は年々高まってきており、健康影響への可能性が指摘されている。しかし、現状では、ナノマテリアルの安全性や暴露などに関する科学的知見に乏しいことから、有害性に関する研究が積極的に進められている。一方、欧州連合では、ナノ材料の安全性のデータの届出・登録の義務化への整備が進められており、米国においても EPA を主体に規制および監視を検討している。ナノテクノロジーの応用により食品・食品容器分野においても積極的な利用が期待される一方で、マイクロプラスチックと同様にナノプラスチックの有害性も問題となってきた。また、食品添加物や食品サプリメントなどへの使用が増えてきているが、毒性学的評価などの科学的知見についての情報は依然不足している。令和元年度は、欧州食品安全機関(EFSA)の科学ネットワーク主催による「2019年食品及び飼料中のナノテクノロジーのリスクアセスメントの年次報告」に関する調査、およびフランス食品環境労働衛生安全庁(ANSES)による二酸化チタン安全性に関する再度勧告と、それに対するEFSAのステートメントに関する調査を実施した。さらに、市販のプラスチック製ティーバッグについて文献調査を実施した。

B. 研究方法

経皮経口感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について

【実験1】ナノ銀のアジュバント効果

動物実験は Adachi ら (Allergy. 2012;67

(1392-1399)) の方法を応用して実施した。

感作のため、卵白アルブミン (OVA; 2 µg) 単独または OVA と AgNP(直径 10nm 49 µg) を混合して、週 3 日間 4 週間にわたり剃毛部にパッチを貼付することで経皮暴露 (p.c.) した。続いて、OVA (30 mg) 単独または OVA と AgNP(直径 10nm 50 µg) を混合して強制経口投与 (i.g.) による追加免疫 (7 回/2 週) で感作を増強させた。その後、OVA (50 mg) の単回経口投与によるアレルギー症状惹起を行い、60 分後に屠殺剖検した。

抗原には OVA (Sigma A5503) を用い、AgNP にはこれまでの検討において最も毒性を持つと考えられた直径 10 nm の AgNP (nanoComposix AGCB10) を用いた。皮膚暴露では OVA は 2 µg、AgNP は 49 µg/50 µL/mouse とし、経口追加免疫では OVA は 30 mg、AgNP は 50 µg/0.2 ml/mouse となるように AgNP の溶媒である 2 mM クエン酸ナトリウム水溶液 (Citrate) を vehicle として投与直前に調製した。経口惹起時は全動物に OVA を 50 mg/0.2 ml/mouse となるよう注射用水(大塚製薬)を Vehicle として投与直前に調製した。

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、SPF 環境下にて 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 p.c.→Vehicle i.g. 群、② OVA p.c.→OVA i.g. 群、③ OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群、④ OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g. 群、⑤ AgNP p.c.→AgNP i.g. 群。

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 クール感作させた。強制経口投与

による追加免疫は Day 28 より隔日に合計 7 回/2 週行った。Day 0, Day 25, Day 43 にマウスの浅側頭静脈よりランセット(animal lancet 4 mm, MEDIpoint)を用いて 50 μ l 採血し、血中の OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体を ELISA 法で測定した。総 IgE、総 IgG 及び総 IgA 抗体については追加免疫後の 7w(Day 43)のみ測定した。強制経口投与によるアレルギー反応の惹起は Day 49 に実施した。追加免疫及び惹起時、OVA 強制経口投与 60 分間までのマウスの直腸温変化及び下痢症状の観察を 15 分ごとに行い、下痢症状については基準に従ってスコアリング(0: 正常、1:軟便、2:下痢、3:水溶性下痢)した。惹起 60 分後にイソフルラン深麻酔下で全血を採取し、血清中ヒスタミンを Histamine EIA Kit (Bertin Bioreagent) で、単球遊走因子(MCP-1)、IL-13 及び IL-6 濃度を Mouse Quantikine ELISA Kit(bio-technique)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 100 μ g/ml)を添加、37°C 72 時間培養し、培地中のサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2、IL-17、IL-13 及び IFN- γ の濃度を、mouse Quantikine ELISA Kit(bio-technique)にて測定した。

更に、体重、脾臓重量、腋窩及び鼠経リンパ節重量並びに大腸長の計測を行った。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エクセル統計 (BellCurve for Excel)ソフトウェアを用いて、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett 法により有意差検定を行った。不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett 法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及び強制経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの深吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

ナノ銀の腹腔内投与による急性毒性について

【実験 2】ナノプレートの急性毒性

AgNP は nanoComposix 社の PVP コートナノ銀プレート (厚さ 10 nm, 長径 30 nm (SPPH550-10M)、50 nm (SPPH750-10M)、及び 100 nm (SPPH950-10M)、濃度 1 mg/ml in aqueous 5 mM Borate)を用いることとした。

AgNP を 0.2 mg/0.2 ml/マウスとなるよう希釈せずに投与した。購入時のデータシートでは、プレートは角が丸みを帯びた正三角形～円形を呈しており、それぞれのサイズ分布は 15-65, 50-170, 70-190 nm で、ピークは 35, 90, 110 nm であった。

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌した。1 週間の馴化後、1 群の匹数は 5-6 匹 (投与 6 時間後解剖群)又は 5 匹 (投与 24 時間後解剖群)とし、各群は以下の通りに構成した、① 溶媒対照 (5 mM Borate, Vehicle)群、② 30 nm AgNP PVP プレート群、③ 50 nm AgNP PVP プレート群、④ 100 nm AgNP PVP プレート群。単回腹腔内投与 (0.2 ml/マウス)し、6 及び 24 時間後、2 時間の絶食後、深麻酔下で腹大動脈から採血後、放血し、解剖した。

全身状態観察を行い、解剖前の体重及び投与 1, 3, 6 及び 24 時間後の体温を測定した。肝臓、腎臓、脾臓、腸管膜、腸管膜リンパ節、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。

【実験 3】ナノ銀投与マウス肝臓の PCR-array

これまでの検討で得られて凍結保存されていた、直径 10, 60, 100 nm の球状の AgNP を単回腹腔内投与 6 時間後に摘出したマウス肝臓(n=3)から mRNA を抽出し、QUAGEN 社の RT² Profiler PCR アレイの mouse stress and toxicity pathway finder, mouse molecular toxicology pathway finder, Cellular stress responses を用いて、搭載されているそれぞれ 84 の遺伝子発現について、プロトコールに沿って検討した。10 nm の AgNP 投与マウスの肝臓 3 サンプルにおいて、対照群および 60 nm ならびに 100 nm AgNP 投与群の肝臓サンプルと異なる発現を示す遺伝子を抽出した。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エクセル統計 (BellCurve for Excel)ソフトウェアを用いて、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett 法により有意差検定を行った。病理組織学的所見の発生頻度については、Fischer's exact test による検定を実施し、いずれの検定も $p < 0.05$ を有意とした。なお、図中には * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で有意差の程度を記した。

(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。

酸化チタン等の経皮 / 経口暴露による免疫毒性の解析

試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm)
(表面未処理)

を使用した。

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

酸化チタンナノマテリアルの懸濁液調製

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

【実験 4】経皮感作-経口惹起実験系に関する検討

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー (株) より購入し、MF 飼料 (オリエンタル酵母工業 (株)) を給餌した。1 群の匹数は 3 匹とした。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。8 週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (500 μ g/50 μ L) を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1 クールとし、4 クールの経皮感作を行った。その後、Day 35、37、39、42、44、46、49、51、53、56 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回 / 週、計 10 回)、追加免疫を行った。この時、OVA-S 群では、投与前 3 時間絶食させた。Day 0、35、57 には部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。Day 63 に OVA 100 mg を経口投与し、アレルギー反応を惹起した。追加免疫及び惹起時の経口投与後 1 時間は、マウスの直腸温測定、及

び下痢症状の観察を行い、下痢症状については Table 1 の基準に従ってスコアリングした。

【実験 5】アレルギー経皮感作後の経口投与に対するナノ酸化チタンの影響に関する検討

経皮感作の操作は【実験 4】と同様に行った。1 群の匹数は 3 匹とした。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。経皮感作時の OVA 用量は 2 μ g/50 μ L とした。その後、Day 28、30、32、35、37、39、42 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回 / 週、計 10 回)、追加免疫を行った。この時、TiO₂C po 群では、OVA 30mg と TiO₂ 1.88mg (OVA: ナノ酸化チタン重量比=16:1) を懸濁させて経口投与した。Day 0、25、43 には部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。経口投与後 1 時間の直腸温測定及び下痢症状スコアリングは【実験 4】と同様に行った。

統計解析

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

(倫理面への配慮)

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

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

欧州食品安全機関 (EFSA) の科学ネットワーク主催による「2019 年食品及び飼料中のナノテクノロジーのリスクアセスメントの年次報告」に関する調査を実施した。また、フランス食品環境労働衛生安全庁 (ANSES) による二酸化チタンの安全性に関する再度勧告と、それに対する EFSA のステートメ

ント (EFSA STATEMENT, 10 May 2019) に関する調査を実施した。さらに、プラスチックについて文献調査を実施した。

C. 研究結果

経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について

【実験 1】

実験期間中の体重、剖検時の体重、絶対及び相対脾臓重量、腋窩及び鼠径リンパ節重量並びに大腸の長さには、群間の差異は認めなかった。

経口追加免疫時の下痢スコアについては、OVA 投与群では Vehicle 群に比べ、回数を経ることに OVA 投与 60 分後の下痢スコアの上昇傾向が見られ、7 回目では OVA p.c. → OVA i.g. 群及び OVA p.c. → OVA + AgNP i.g. 群において有意な高値を示した。経口追加免疫時の直腸温も同様に回数を経る毎に低下の増強並びに持続時間の延長傾向が見られ、OVA p.c. → OVA i.g. 群においては 2、3 回目は投与後 15 分時点のみ有意な 1°C 以下の低下を示したが、4 回目以降は 6 回目の 60 分後を除き、投与後 15 分から 60 分まで有意な低値を示し、5 回目以降は 45 分及び 60 分後に 3°C 以上の低下を示した。OVA p.c. → OVA + AgNP i.g. 群及び OVA + AgNP p.c. → OVA + AgNP i.g. 群においても有意な低下が見られたが、その持続時間及び低下の程度は OVA p.c. → OVA i.g. 群よりも軽度であり、特に OVA + AgNP p.c. → OVA + AgNP i.g. 群では、変動が減弱している傾向が見られた。惹起後においては、下痢スコアは全ての OVA 投与群で有意な高値を示した。直腸温の変動は全ての OVA 投与群において惹起の 15 分後には有意に低下したが、OVA + AgNP p.c. → OVA + AgNP i.g. 群では、45 分及び 60 分後には回復傾向を示し、有意差はみられなかった。

OVA 特異抗体の測定では、皮膚感作を終了した 4 週 (Day 25) 時点では OVA p.c. → OVA i.g. 群で IgE 及び IgG1 の有意な増加が見られ、OVA p.c. → OVA + AgNP i.g. 群でも IgE の有意

な増加が見られた。7週経口追加免疫翌日 (Day 43) では全ての OVA 投与群で IgE 及び IgG1 の有意な増加が見られ、OVA p.c.→OVA + AgNP i.g.群及び OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g.群では IgG2a の有意な増加も見られた。また、経口追加免疫翌日 (Day 43) の OVA 非特異的抗体の測定では、全ての OVA 投与群で IgE 及び IgA の有意な増加がみられ、IgG は増加傾向を示し OVA p.c.→OVA + AgNP i.g.群では有意であった。惹起 60 分後の血清サイトカイン測定では、全ての OVA 投与群で単球遊走因子 (MCP-1) 及び IL-13 の有意な増加がみられ、IL-6 は増加傾向を示し OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g.群では有意であった。MCP-1 については、OVA p.c.→OVA + AgNP i.g.群では OVA p.c.→OVA i.g.群よりも有意に高値を示した。血清ヒスタミン濃度は背景値程度であった。一方、脾臓細胞における 72 時間抗原再暴露による IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 及び INF- γ 分泌については、OVA p.c.→OVA + AgNP i.g.群で僅かに IL-4 及び IL-13 の増加が見られたが、OVA p.c.→OVA i.g.群との差異は見られなかった。

また、OVA の投与をせず AgNP のみを経皮経口暴露した群においては、これまでの背景値の範囲であり毒性学的意義のないと考えられる血清ヒスタミン値の高値以外には、いずれの検討も Vehicle 群と差異は認めなかった。

ナノ銀の腹腔内投与による急性毒性について

【実験 2】ナノプレートの急性毒性

AgNP PVP プレート投与群を含め、いずれのマウスにおいても全身状態の異常は見られなかった。投与後の直腸温変化について、6 時間観察群では、50 nm 群 (1, 3, 6 時間後) 及び 30 nm 群 (3 時間後) で有意な変動が見られた。また、6 時間後の相対肝臓重量、相対脾臓重量、及び、24 時間後の体重、相対肝臓重量、相対脾臓重量には群間に差異は見られなかった。

血液生化学検査では、投与 6 時間後において、Cl の有意な高値が 100 nm 群に、T-cho の有

意な低値が 30 nm および 100 nm 群に、TG の有意な低値が 50 nm 群に認められた。また、投与 24 時間後において、ALB の有意な低値が 30 nm 群に、ALP の有意な低値が 30 nm および 50 nm 群に認められた。

剖検時、6 時間後及び 24 時間後とも、AgNP PVP プレート投与群では、腸間膜表面や胸腺近傍のリンパ節が黒色調を呈していた。

病理組織学的検査では、投与 6 および 24 時間後において、いずれの群でも肝臓には投与に関連した明らかな変化は見られなかった。ナノ銀と考えられる微細な黒褐色色素沈着は、投与 6 および 24 時間後にすべての AgNP PVP プレート投与群において、腹膜表面および気管周囲リンパ節で観察された。腹膜表面のリンパ球浸潤は投与 6 および 24 時間後に溶媒投与群にも観察されたが、AgNP PVP プレート投与群でやや高度であった。また、色素沈着部の近傍において腹膜脂肪織内への好中球浸潤を伴う、血管炎が投与 6 時間後の全ての AgNP PVP プレート投与群に観察され、30 nm 群では 24 時間後にも 3 匹中 1 匹に観察された。血管炎は血管壁に好中球主体の炎症細胞浸潤を示すと共に血管内腔に好中球の集簇が認められた。また、いずれの群においても、腎臓の再生尿管および心臓心外膜の鉍質沈着が散見された。

【実験 3】ナノ銀投与マウス肝臓の PCR-array

3 セットの pathway finder について PCR-array を用いてクラスタリング解析を実施したところ、10 nm AgNP 投与群の 3 サンプルは、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の合計 9 サンプルとは異なる発現パターンをとっていることが示された。10 nm AgNP 投与群の 3 サンプルで共通して発現増加している遺伝子として Slc2a1, Hmox1, Mmp9, Serpine1 等の Hypoxia response 関連因子および、Crp, Ccl12 等の Inflammatory response 関連因子が検出された。

酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析

[実験 4] 経皮感作-経口惹起実験系に関する検討

平成 30 年度においては、抗原の腹腔内投与による感作に続いて経口投与を行い、追加免疫及びアレルギー反応を惹起する実験系に関する検討を行った。OVA 30mg×4 回の追加免疫を行い、その 1 週間後に OVA 100mg を経口投与してアレルギー反応を惹起したところ、ある程度の体温低下や下痢症状は見られたが、顕著な反応ではなかった。令和元年度においては、経皮感作-経口惹起実験系を確立するため、これまでの経皮感作実験系と同様に OVA による 4 週間の経皮感作の後、OVA 30mg×10 回の追加免疫を行い、その 1 週間後に OVA 100mg を経口投与してアレルギー反応惹起を行った。経口投与前の絶食無しの群(OVA 群)と絶食有りの群(OVA+S 群)で比較した。

血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果は、経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ、その後の経口追加免疫によってさらに増加した。経口投与前の絶食の影響は特に見られなかった。(なお、通常 Vehicle 群では、IgE、IgG1 の蛍光値はそれぞれ 100 及び 50 程度である。)

次に、経口追加免疫、及び経口惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果は、追加免疫 4 回までは体温低下、下痢症状ともほとんど見られなかったが、追加免疫 7 回目以降、及び経口惹起においては、顕著な体温低下及び下痢症状が見られた。(なお、通常の Vehicle 群では体温変動や下痢症状はほとんど見られない。)これらの結果から、抗原経皮感作後に複数回の経口追加免疫を行うことにより、最終的に経口投与によるアレルギー反応を惹起することが可能であることが示された。

[実験 5] アレルゲン経皮感作後の経口投与に対するナノ酸化チタンの影響に関する検討

上記[実験 4]において経皮感作-経口惹起実験系が確立されたので、この実験系を用いて酸化チタンナノ材料の影響について検討した。用いたのは、これまでに OVA による経皮感作を増強す

ることが示されているナノ酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm) である。[実験 4]と同様、4 週間の OVA 経皮感作の後、OVA 30mg×7 回の追加免疫を行い、その 1 週間後に OVA 50mg を経口投与してアレルギー反応惹起を行った。OVA のみを経口投与する群(OVA 群)に加え、OVA の経口追加免疫時にナノ酸化チタン C を共存させる群(TiO₂C po 群)を設定した。OVA:ナノ酸化チタン重量比は、経皮感作においてナノ酸化チタンによる増強効果が見られた 16:1 とした。

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

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

ナノ材料の暴露評価(食品等を含む)に関する国際動向調査

1. 2019 年食品及び飼料中のナノテクノロジーのリスクアセスメントに関する EFSA の科学ネットワークの年次報告書

2019 年 Nano Network 会議

食品および飼料分野におけるナノテクノロジーのリスクアセスメントの科学的ネットワーク(Nano Network)は、EFSA の加盟国との協力およびネットワーク化への構築に従い、EFSA アドバイザリ

ーフォーラム(Advisory Forum: AF)によって2010年に設立されたものである。このNano Networkは、EFSAと加盟国間において情報や専門知識について交換することにより、加盟国間の対話の強化や、リスクアセスメントの原則について相互理解を図り、EUで実施される科学的評価の知識と信頼を向上していくことを掲げている。

今回、2019年Nano Networkの年次報告書では、Nano Networkの具体的な活動と成果について、一般市民、利害関係者、および研究コミュニティへ提供するものであった。2019年の年次会議は、レギュラトリーサイエンス2019のナノテクノロジーおよびナノプラスチック(GSRS2019)のグローバルサミット(イタリア、9月)に組み込まれており、約30か国のリスクアセスメント機関との間で、レギュラトリーサイエンスの優先事項について世界的規模での議論が行われていた。本会議の目的は、EFSA Nano Networkが、ナノテクノロジー分野のレギュラトリーサイエンスの研究優先事項に関する国際的な議論や、ナノプラスチックによる新たなリスクを網羅するような研究ニーズに関する評価を議論するものであった。今回、ネットワーク議長のReinhilde Schoonjansより、本会議への期待およびGSRS2019の一部としての活動への統合について議論された。

以下、幾つかの論点について述べている。

➤ EFSA横断的作業部会(ccWG Nano)は、ナノテクノロジーに関するccWG Nanoの活動と、リスクアセスメントに関する科学的ガイダンス文書の更新と実施の状況について述べていた。中でもナノスケール内の小さな粒子で構成されている、若しくは、これらの粒子を含む可能性のある規制製品の評価に関して、幾つかのEFSAのユニットおよびパネルへ助言するものであった。具体的には、フッ化物修飾アルミナ、イノシトール安定化アルギニンケイ酸塩、バクテリアセルロース、第二鉄ナトリウムEDTA、またはオルトケイ酸とバニリンの複合体で処理された二酸化チタンの規制用途について示していた。

➤ 加盟国代表は、加盟国レベルでのリスクアセスメントに関するEFSAの科学的ガイダンスの利用状況へのフィードバックを実施したが、現時点では、まだ利用状況はかなり低いものであると強調していた。ネットワークでは、規制製品に関する申請書や書類を作成する際のガイダンスの推奨事項を検討するために、申請者へのガイダンスの普及に向けて特に注意を払うべきであると述べている。従って、加盟国代表は、市場への新製品の参入を希望する当事者へのアウトリーチを継続するよう求めていくことを提唱した。

➤ José Tarazonaは、ccWG Nanoの支援を受けたEFSAと欧州委員会との対話後、EFSAはDG SANTE[欧州委員会(EC)の保健衛生・食の安全総局(Directore-General for Health and Food Safety)から規制食品および飼料製品中のナノスケールの粒子の存在を定義するために技術的ガイダンスへの委任の承諾を伝えるものであった。また、議論中、規制(EU)2015/2283に基づく工学的ナノ材料の定義は、食品香味料、食品添加物、飼料添加物にも直接/間接的に適用され、新しい食品に加え、他の規制食品も対象とすることを示すものであった。EFSAの方針に沿って、技術ガイダンスの草案は、2020年半ばに予定されている公開協議の対象となっている。ネットワークは、この活動への普及に貢献することが期待されており、公開協議中に意見やコメントを提供することが可能であると報告している。また、このような方針は、ネットワークの使命に沿って、2020年のネットワークワークプランに含まれるものであった。

➤ 上記に示したように、José Tarazonaは、APCRAの世界的なイニシアチブの下で開始されるナノファイバーに関するレギュラトリーサイエンスへの提案についても概説するものであった。消化管内のナノファイバーの動態を評価するための*in vitro*手法に焦点を当てており、上皮細胞によるそのもの、または消化

されたナノファイバーの取り込みについて、または血液への移動について網羅するものであると述べていた。このネットワークは、この活動およびこの分野での NAM(New Approach Methodologie) の促進を目的とする他の活動について定期的に通知されることを述べていた。

- Reinhilde Schoonjans 議長は、2020 年の EFSA 作業計画について、ccWGNano の主要な活動については、科学的ガイダンスの最終化であり、また、DG SANTE からの委任を受けてパイロットフェーズからのすべての知見とその後の新しい補完的な技術的ガイダンスについて検討することが必要であると述べていた。

以上、Nano Network のメンバーは、年次 Nano Network 会議へ参加することにより、他国との専門的知識の意見交換や、各国家レベルでのリスクアセスメントに関する EFSA ガイダンスへの普及と、食品/飼料分野の特定の事例に関するガイダンスの実施へ貢献するものであった。さらに Nano Network のメンバーは、加盟国レベルで EFSA からの科学的情報や教育への定期的な普及と、利用者へのフィードバックアンケートを開始した H2020 研究プロジェクトへの貢献に期待されると結論付けている。

2. フランス食品環境労働衛生安全庁(ANSES)による二酸化チタン安全性に関する再度勧告と、それに対する欧州食品安全機関(EFSA)のステートメント

食品添加物 E171 は、主にナノ粒子形状の二酸化チタン(TiO₂)粒子として多様な食品に使われている。2017 年に実施された専門家評価以後、2019 年 2 月にフランス食品安全衛生局(ANSES)は、E171 の経口毒性に関する最新の研究に関するレビューとその助言を更新するよう求められた。2019 年 4 月 15 日に ANSES は、利用可能な最新の科学研究について検討し、食品添加物の二酸化チタン(E171)の暴露に関する

リスクについて意見を述べていた。さらに、欧州委員会は EFSA に対し、ANSES が発行した意見に関する緊急の科学のおよび技術的支援を提供するよう要請するものであった。

ANSES の意見では、2017 年のラットによる発がん性促進作用の可能性を示した E171 の経口毒性に関する専門家による評価(NANOGUT 試験、Bettini 他、2016 年)を発表したが、当時 ANSES は、その試験で報告された効果について確認若しくは否定するような新たな毒性試験の実施の必要性を強調するものであった。さらに、E171 の正確な物理化学的特性評価は、食品添加物のリスクアセスメントに必要な最初のステップとして認めるものであった。また、推奨事項においては、ナノ領域に含まれる食品添加物二酸化チタン(E171)の粒子の割合について言及していた。

一方、欧州規則に従って食品添加物を評価する責任を負う欧州食品安全機関(EFSA)は、2016 年の E171 の評価において、生殖毒性のデータは一日摂取許容量(ADI)や最大量を設定するのに適切ではないと強調していた。従って、2016 年以後の 2017 年から 2019 年の間に公開された 25 件の新たな試験の文献レビューを実施した。幾つかの試験で、マウスの細胞生物学的メカニズムの変化や無脊椎動物の発達異常などの新しいシグナル、および酸化ストレスを介した *in vitro* の遺伝毒性効果について明らかにしたが、いずれも NANOGUT 試験で報告された E171 の潜在的な発癌促進効果を議論するには不十分なものであった。

以下、幾つかの試験調査について示されている。

- マウスの細胞生物学的メカニズムの変化(発がん作用に関する研究)

ANSES の意見では、Unitane®(サイズ分布が指定されていないアナターゼ型の二酸化チタン)を用いた発がん性試験 NTP(1979 年)の研究結果に関する発がん作用の証拠の欠如について、ANS パネルの結論を認めていたが、試験物質の特性の欠如について言及するものであり、食品添加物の発がん性の評価に関

する研究との関連性については、疑問視するものであった。

2016年のEFSAの意見では、Unitane®で得られた研究結果に基づきE171の発がん性は無いものと結論付けていた。しかし、Unitane®とE171の物理化学的特性に関する類似性を保証するような情報記載はなかったと述べている。Urrutia-Ortega(2016年)ら、Bettini(2017年)らによって実験的に立証したE171の潜在的な腫瘍促進の効果については、幾つかのバイオマーカー(異常陰窩巣(ACF)、ムチン枯渇巣、ベータカテニン蓄積陰窩等)を含む新しい研究の実施により確認する必要があると述べている。Proquin(2018年)らによって実施された研究において、E171は癌の発生を促進するような生物学的メカニズムに影響を及ぼし、更に、アゾキシメタン(AOM)/デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)処理によって結腸の発がん性を促進させるものであったと結論付けていた。また、「TiO₂」緊急専門家評価グループ(GECU)は、7日間の処理後のヒストンの発現レベルがエピジェネティックな変化の基となる可能性に注目していた。

➤ 発達障害に関する研究

ANSESは、無脊椎動物種の研究から二酸化チタン(E171)の暴露後の発達異常の出現を報告するものであった(Jovanovic et al., 2018; Savic-Zdravkovic et al., 2018; Ma et al., 2019)。

Jovanovic(2018年)らは、分化メカニズムを研究するためのモデルとしてショウジョウバエを用いた多世代の研究を実施した。ショウジョウバエに関するこの研究の主な特徴として、ヒトへの暴露を想定する用量でE171を摂取させた後に発達障害(非遺伝的起源)の出現が認められた。また、ユスリカの幼虫の段階と発達障害の出現に関するSavic(2018年)らの研究では、E171への暴露によって誘導される発達障害の出現が認められ、Jovanovic(2018年)らのショウジョウバエを用いた研究結果と一致するもの

であったと述べている。ANSESは、これらのモデルはヒト(哺乳類)との種間の外挿が困難であるために、食品添加物のリスクアセスメントとしては適さないという見解を認めている。しかし、その結果は、潜在的に悪影響を示すとして更なる調査の必要性について言及していた。この推奨事項は、Heringa et al(2016年)が強調している生殖器官への影響と内分泌攪乱に関する見解の欠如によって裏付けられると結論付けている。

➤ 酸化ストレスを介した遺伝毒性作用に関する研究

これまで、TiO₂粒子の遺伝毒性効果に関して多くの研究が実施されているが、Charles(2018年)らによるレビューでは、*in vitro* 遺伝毒性データを含む36文献において調査するものであった。その結果、特定のTiO₂(結晶性、サイズ、コーティング)との関連性を見出すことはできなかったが、遺伝毒性研究の60%が遺伝毒性の作用について報告する内容であった。このレビューでは、調査した殆どの文献で遺伝毒性作用は、酸化ストレスを介した二次的なメカニズムによって引き起こされたことを示すものであったと述べている。さらに、新たに調査した研究では、Charles(2018)らの結論を覆すものはなかったと結論付けている。

3. マイクロ・ナノプラスチックに関する調査

近年、プラスチックのゴミ、小さなプラスチックの破片に加えて、いわゆるマイクロプラスチックは主に海洋環境で検出され、さらに、淡水、土壌、空气中に存在する可能性があり、今日の知識に基づくと、限られた範囲の食品中に存在する可能性があるため、大きな懸念となっている。関連する研究プロジェクトの数は増加しているが、マイクロプラスチックの検出と定量化のための適切で、検証された分析方法がまだ欠けており、それらのリスク評価を可能にするハザードと運命データが欠けていることを強調する必要がある。この状況のなか、2019年8月に

WHO は「飲料水中マイクロプラスチック」に関する技術文章を作成し、現状におけるマイクロプラスチックによる健康影響への懸念について情報を整理すると共に、今後の課題についての提言を公表した。その文書における要旨を以下に示す。

- **環境水系における検出:** マイクロプラスチックは環境中に遍在しており、海水、廃水、淡水、食品、空気、飲料水（ボトル水と水道水の両方）で検出されている。マイクロプラスチックは、多くの経路から淡水環境に入るが、それらの寄与を定量化するためのデータは限られている。限られた証拠から、飲料水中に含まれる一部のマイクロプラスチックは、水道水の処理および配水システムおよび/またはボトル水の瓶詰め由来する可能性があることが示されている。最近の文献の系統的レビューにより、いくつかの初期の結論を引き出すとすれば、淡水では、ポリマー種類による微小プラスチック粒子の頻度は、プラスチック生産量およびプラスチック密度と一致した。飲料水中のマイクロプラスチックを分析した研究（9 件のみ）で、主な形状は破片と繊維であり、最も頻繁に検出されたポリマーは、ポリエチレンテレフタレートおよびポリプロピレンであった。
- **飲料水中マイクロプラスチックの健康懸念:** マイクロプラスチックに関連する潜在的な危険性には、物理的危険性を示す**粒子**そのもの、**化学物質**（環境中の非結合モノマー、添加剤、および吸着化学物質）、および**バイオフィーム**として知られるマイクロプラスチックに付着して定着する可能性のある微生物の 3 つの形態がある。利用可能な限られた証拠に基づくと、飲料水中のマイクロプラスチックに関連する化学物質および微生物病原体は、ヒトの健康に対する懸念は低い。ナノ粒子の毒性に関する確固とした結論を引き出すための情報は不十分であるが、それが懸念であることを示唆する信頼できる情報もなかった。
- **粒子:** 粒子の暴露による毒性は、サイズ、表面積、形状および表面特性、ならびに粒子の化学組成を含む物理的特性に依存する。摂取後のマイクロプラスチックの運命、輸送および健康への影響は十分に研究されておらず、摂取されたマイクロプラスチックに関する疫学的またはヒトの研究は確認されていない。毒性に関するデータベースは非常に限られており、いくつかの影響は生物学的クリアランス機構を圧倒するような非常に高い濃度でのみ観察されている。現時点では、飲料水を介したマイクロプラスチック粒子への暴露に関連した明白な健康上の懸念を示唆するデータはない。
- **化学物質:** マイクロプラスチックの疎水性性質は、疎水性残留有機汚染物質（POPs）を蓄積する可能性を有することを意味するが、POPs は環境中の有機炭素に無差別に吸着するため、マイクロプラスチックに吸着される POPs の割合は、他の環境媒体と比較して小さいと考えられる。マイクロプラスチックに関連する化学物質への暴露に関連する潜在的な健康リスクを評価するために、WHO は化学物質への高暴露と組み合わせたマイクロプラスチックへの高暴露を想定した保守的暴露シナリオを開発し、暴露マージン（MOE）アプローチを適用した。リスク評価から導かれた MOE は十分に保護的であることが判明し、極端なば暴露状況であっても、飲料水の摂取による化学物質へのヒトの暴露に対する健康上の懸念は低いことが示された。
- **バイオフィーム:** 飲料水中のバイオフィームは、飲料水用のパイプやその他の表面で微生物が増殖する際に形成される。バイオフィーム中のほとんどの微生物は非病原性であると考えられているが、いくつかのバイオフィームには、自由生活微生物や、緑膿菌・レジオネラ等の病原体が含まれている。バイオフィームを形成する微生物は、親水性の表面よりも、プラスチックのような疎水性の非極性表面に速く付着する。淡水での限られた測定研究

は、マイクロプラスチックが病原体の長距離輸送を可能にし、微生物間の抗菌耐性遺伝子の移動を促進する可能性を示しているが、飲料水中のマイクロプラスチック関連バイオフィルムによるヒトの健康リスクを示唆する証拠はない。

➤ **提言と研究の必要性:**

飲料水中のマイクロプラスチックの日常的なモニタリングは、ヒトの健康への懸念を示す証拠がないため、現時点では推奨されない。水安全計画の一環として、水供給事業者は、微粒子除去と微生物学的安全性のための水処理プロセスを最適化すべきであり、結果としてマイクロプラスチック粒子の除去も改善できる。しかし、淡水と飲料水中のマイクロプラスチックの発生源と発生状況、様々な水処理プロセスとその組み合わせの有効性、および処理廃棄物の流れからのマイクロプラスチックの環境への流入の可能性を理解するための研究を行うことが適切であろう。健康影響の可能性に関しては、ヒトの健康リスク評価に関連するプラスチック粒子の最も一般的な形態について、質の保証された毒性学的データが必要である。さらに、摂取後のマイクロプラスチックとナノプラスチックの取り込みと運命に関するより良い理解が必要である。

市販のプラスチック製ティーバッグからのナノ粒子の放出(Environmental Science & Technology, Hernandez LM et.al., 53(21):12300-12310, 2019)

カナダのマギル大学の研究チームによって、プラスチック製の素材からなる4種のティーバッグについて、茶葉を取り出しカップに熱湯を注ぐと、マイクロ/ナノプラスチックと呼ばれる微小なプラスチック粒子が1袋につき百億も放出されるという最新の研究結果が報告された。この研究結果、単一のプラスチック製ティーバッグを95°Cの抽出温度に浸すと、マイクロプラスチックは約116億個、さらに小さいナノプラスチックは約31億個もの粒子が抽出液中に存在したことが明らかとなった。また、放出

された粒子の組成解析は、ティーバッグの素材であるナイロンおよびポリエチレンテレフタレート(PET)と一致した。しかし、ナイロンとPETが分解してナノ粒子を形成するメカニズムは、まだ研究されていないと述べている。興味深いことに、この研究で用いた4種のティーバッグのうち2種から放出されたマイクロおよびナノ粒子は、同様の形状(球状)とサイズ分布:大きく(約50~100 μ m)不均一なサイズと、サブミクロンの粒子(約10~400 nm)サイズを有していた。また、ティーバッグ別の2種から放出されるマイクロおよびナノ粒子も同様の形状(凝集体)とサイズ分布:小さな(約1~50 μ m)不均一なサイズと、サブミクロンの粒子(50~600 nm)サイズを示していた。幾つかの研究で、食物連鎖で比較的低濃度のマイクロプラスチックを検出したという報告はあるが、この研究では、プラスチック製のティーバッグに入れたお茶を飲む際に摂取される可能性のあるプラスチックの量が、以前に他の食品で報告されたレベルよりも数桁高いものであったと報告されている。

D. 考察

【実験1】ナノ銀のアジュバント効果

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ことを目的とし、特にアジュバント作用についての評価に主眼を置いた。前年度までの検討により、OVAの経皮及び経口暴露で感作を成立させた後、OVAの経口暴露によってアレルギー反応を惹起させる評価系を確立し、コレラトキシンBサブユニットを追加で皮膚暴露するとアジュバント作用が検出できることを示してきた。本年度は確立された評価系を用いてAgNPの追加暴露でアジュバント作用が見られるか検討した。

今回の検討において、マウスへのOVAの皮膚暴露後、経口暴露によって血清中OVA特異抗体価及びMCP-1、IL-13、が有意に増加するとともに、下痢や体温低下などの生体反応も経時的に増強するなど、経皮経口複合暴露によるアレルギー反応の成立が確認された。10 nmのAgNPを

経皮または経皮及び経口で追加暴露してもほぼ全てのパラメータにおいて明らかな増強作用は見られなかった。血清 MCP-1 については OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では OVA p.c.→OVA i.g. 群よりも有意に高値を示したが、他のパラメータでは変動は見られず、その意義は不明である。むしろ、経口追加免疫において、下痢スコア及び直腸温低下の程度や持続時間については、AgNP 追加投与群では減弱化傾向を示していると考えられた。

また、AgNP 単独の経皮経口暴露では総 IgE、IgG 及び IgA 並びに各種サイトカインの変動はなく、本投与系においては免疫毒性は示唆されなかった。

【実験 2】ナノプレートの急性毒性

我々はこれまでの検討において、の球状 AgNP がサイズによって毒性発現が異なることを示してきた。本年度はプレート状の PVP コートナノ銀プレート（厚さ 10 nm、長径 30 nm、50 nm、及び 100 nm）について検討した。その結果、厚さ 10 nm、長径 30 nm の AgNP PVP プレートについても、明らかな一般状態、肝重量、脾重量の変化は見られなかった。投与後の直腸温変化では、6 時間観察群において、50 nm 群（1、3、6 時間後）及び 30 nm 群（3 時間後）で有意な変動が見られるものの、同群では溶媒対照群で軽度の体温低下が見られていること、24 時間観察群では、1、3、24 時間後のいずれも直腸温の変動は見られないことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。血液生化学検査では、投与 6 時間後において、Cl の有意な高値が 100 nm 群に認められたが、他の電解質に変動は見られず、意義は乏しいと考えられた。T-cho の有意な低値が 30 nm および 100 nm 群に、TG の有意な低値が 50 nm 群に認められ、脂質代謝がわずかに抑えられる傾向がみられた。投与 24 時間後において、ALB の有意な低値が 30 nm 群に、ALP の有意な低値が 30 nm および 50 nm 群に認められたが、肝臓に関連する他のパラメーター及び病理組織学的検討において明らかな変化は伴っておらず、毒性学的意義は

乏しいと考えられた。これまで検討において、直径 10 nm のクエン酸コート AgNP 粒子及び直径 5 nm の PVP コート AgNP 粒子の腹腔内投与によって肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死等が観察されたが、今回の AgNP PVP コートプレートを用いた検討では、肝臓の変化は認めなかった。形状の相違による生態反応の相違の検討を目的としたが、今回用いたプレート状のナノ粒子は 1 辺は 10 nm とされているが他辺の大きさとしては、これまでに明らかな毒性が認められた粒子状の AgNP に比較すると大きいと考えられ、肝臓内への分布は起こらなかったと考えられる。一方で、AgNP PVP プレート投与 6 時間後において、AgNP 粒子と同様に腹腔内のリンパ節には、黒褐色色素沈着は見られず、気管周囲リンパ節では色素沈着が見られた。また、腹膜表面へのリンパ球集簇は溶媒群でも認められるが、黒褐色色素沈着をともなう結節状のリンパ球集簇が AgNP PVP プレート投与 6 時間後は全群に、投与 24 時間後は 30 nm 及び 50 nm 群に認められ、小型の AgNP PVP プレートは長く留まる可能性が見られた。また、腹膜脂肪織内への好中球浸潤を伴う、血管炎が投与 6 時間後の全ての AgNP PVP プレート投与群に観察され、30 nm 群では 24 時間後にも 3 匹中 1 匹に観察された。血管炎は血管壁への炎症細胞浸潤と血管内腔での好中球集簇があり、出血及び血流の乱れ並びに血栓形成を誘発する可能性があると考えられた。黒褐色色素沈着をともなうリンパ球集簇の近傍で観察されており、ナノ銀の存在との関連が示唆されるが、発生機序及び毒性学的意義については、今後の検討が必要と考えられた。

【実験 3】ナノ銀投与マウス肝臓の PCR-array

3 セットの pathway finder を用いた PCR-array による遺伝子発現のクラスタリング解析において、10 nm AgNP 投与群の肝臓では、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の肝臓とは異なるクラスターに分類された。異なる発現パターンをとる遺伝子として、Slc2a1、Hmox1、Mmp9、Serpine1 等の Hypoxia

response 関連因子および、Crp, Ccl12 等の Inflammatory response 関連因子が検出され、10 nm の AgNP 特異的な急性肝毒性には、肝臓局所あるいは全身の低酸素応答が関連している可能性が示唆された。

【実験 4.5】酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析

本研究班の目的は、食品・食品容器包装用途に用いられ、経口及び経皮から暴露されるナノマテリアルについて、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積することである。本分担研究では、ナノ酸化チタンやナノ酸化亜鉛が、経皮的アレルギー感作時やその後の経口惹起に与える影響について検討を行った。平成 29 年度においては、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果、及び、抗原経皮感作に与える影響について検討した。平成 30 年度においては、引き続きナノ酸化亜鉛が抗原経皮感作に与える影響について検討するとともに、29 年度の検討を受けてナノ酸化亜鉛の腹腔内投与による急性毒性に関する検討を行った。粒子径の小さなナノ酸化チタン(6nm)やナノ酸化亜鉛(25nm)が経皮感作を増強することから、これらのナノマテリアルの作用は粒子径に依存する(粒子径が小さい場合に増強効果がある)可能性が示唆された。また平成 30 年度には、抗原経口投与によるアレルギー反応惹起実験系に関する検討を開始した。

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

近年、アレルギー発症の要因として、タンパク質が皮膚を透過して体内に取り込まれ抗原となる経皮感作経路が注目されている。本研究のこれまでの検討結果は、抗原タンパク質の経皮感作によるアレルギー発症において、酸化チタンや酸化亜鉛のようなナノマテリアルが共存することにより感作が増強される可能性を示しており、粒子径 30nm 未満程度のナノマテリアルを皮膚に適用する際には注意が必要であると考えられる。また、経皮感作後の抗原経口投与においても、ナノ酸化チタンが、抗原追加免疫やアレルギー症状惹起を増強する可能性が示された。今後、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる検討を行い、科学的知見を集積することが必要である。

E. 結論

これまでに検討してきた OVA の経皮経口複合暴露によるアジュバント作用の評価系を用いて AgNP のアジュバント作用を検討した。OVA による免疫反応の成立が確認され、評価系としての有用性が確認されるとともに、AgNP については本系において経皮経口複合暴露によるアジュバント作用は認めなかった。

また、プレート状の PVP コートナノ銀プレート(厚さ 10 nm, 長径 30 nm、50 nm、及び 100 nm)についてマウスの腹腔内投与による急性毒性を検討した。その結果、厚さ 10 nm, 長径 30 nm 以上の AgNP PVP プレートにおいては、全身状態への影響を及ぼす変化は認めなかった。一方で、何れのサイズの AgNP PVP プレートにおいても、投与部位である腹膜の炎症及び血管炎が誘発された。また、これまでの検討で得られた粒子状の AgNP の腹腔内投与後のマウス肝臓における遺伝子発現を検討したところ、10 nm AgNP 投与群の肝臓は、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の肝臓とは異なるクラスターに分類され、低酸素及び炎症関連の遺伝子発現が肝臓での毒性影響に関連していると考えられた。

食品・食品容器包装用途、及び化粧品等の両方に用いられ、経口及び経皮にて暴露される可能性があるナノマテリアルについて、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積するため、抗原経皮感作-経口惹起実験系の確立、及びアレルギーの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討した。抗原経皮感作-経口惹起実験系については、OVA 30mg×7 回以上の経口投与による追加免疫と、その後のOVAの経口投与によりアレルギー症状を惹起する実験系を確立することができた。この実験系を用いて抗原経口投与時のナノ酸化チタンの共存による影響について検討したところ、ナノ酸化チタンが、抗原の経口投与による追加免疫やアレルギー症状惹起を増強する可能性が示された。今後は、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

国際動向に関して、EFSA Nano Network は、農業/食品/飼料製品中のナノ材料のリスクアセスメントに関する科学的な情報を交換するためのプラットフォームとして機能するものであり、収集した情報については、効率的な方法へと変換していき、作業の重複を避けるために利用されることを述べていた。2019年の年次総会で、EFSAの横断的作業部会のメンバーおよび関連するEFSAスタッフと共に、19の加盟国代表が参加していた。参加者らは、EUの法律の策定、EFSAガイダンスの実施、および研究活動に関する最新情報を受け取るものであった。メンバーは、EFSAガイダンスの技術的な実装と普及、および欧州委員会(EC)のDG SANTE(保健衛生・食の安全総局)の委任に沿って開発される規制製品の補足的なテクニカルガイダンスについて引き続き焦点を当てていく予定であると結論付けている。

今回のEFSAの声明では、2019年4月に公表されたANSESの意見で、2016年と2018年のANSパネルでEFSAが発行した食品添加物の二酸化チタン(E171)の安全性に関する2つの科学的意見の結論を覆すような新しい発見を特定するものではなかった。また、最新のANSESの

意見では、以前に特定された不確実性とのデータのギャップについて繰り返し述べるものであった。現在は、以前に実施されたEFSAの評価とその推奨事項から成るフォローアップ作業の状況の中で対処されていた。このフォローアップ作業に加えて、ANSESは*in vivo* 遺伝毒性の更なる調査を推奨について提唱していた。従って、EFSAは、現在進めている食品添加物二酸化チタン(E171)の物理化学的特徴についての作業完了後に、推奨事項の再検討の必要性があると結論付けている。

ナノプラスチックのヒト健康影響へのリスクについては、ナノプラスチックに関するヒトへの暴露と潜在的な毒性に関するデータの不足により、まだ予測には至らないものであった。しかし、ナノプラスチック粒子の取り込みの速度/潜在的な生物学的応答/生体への毒性メカニズムに関するこれまでの工業的ナノ粒子のナノ毒物学的研究成果から、ヒトへの外挿性についてより深い議論が必要であることを示している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyazaki A, Watanabe S, Ogata K, Nagatomi Y, Kokutani R, Minegishi Y, Tamehiro N, Sakai S, Adachi R, Hirao T. Real-time PCR Detection Methods for Food Allergens (Wheat, Buckwheat, and Peanuts) Using Reference Plasmids. *J Agric Food Chem.* 2019 May 15; 67(19): 5680-5686.
- 2) Landsiedel R., Gamo M. Hirose A. The Role of *In vivo* Screening Studies in Assessing Manufactured Nanomaterials, *In vivo* Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials, Takebayashi T., Landsiedel R., Gamo M. eds, In *Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine*, Springer (Springer

Nature Singapore Pte Ltd), pp1-21, 2019,
DOI:10.1007/978-981-13-8433-2

- 3) Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander TW., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid, M., Khaled AA., Takahashi S., Alexander BD, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitrate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration, *Particle and Fibre Toxicology*
<https://doi.org/10.1186/s12989-019-0316-2> 16:34, 2019.
- 4) Numano T., Higuchi H., Alexander D., Alexander W., Abdelgied M., Elgazzar AM., Saleh D, Takase H., Hirose A., Naiki-Ito A., Suzuki S., Takahashi S., Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats, *Cancer Sci.*, 110 (8): 2485-2492, 2019
- 5) Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid M., Tsuda H., Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats, *Arch. Toxicol.*, 93(4): 909-920, 2019
- 6) Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Elokke OM., Nasem AM., Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats, *Arch. Toxicol.*, 93: 49-59, 2019

2. 学会発表

- 1) 曹永晩, 水田保子, 赤木純一, 井手鉄哉, 安達玲子, 為広紀正, 木村美恵, 近藤一成, 小川久美子: 経皮感作及び経口惹起によるマウス食物アレルギーモデルの開発.
第46回日本毒性学会学術年会(2019.6.27)
- 2) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Ide T, Toyoda T, Ogawa K: Effects of antioxidant and inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice.
IUTOX 15th International Congress of Toxicology(2019.7.16)
- 3) 曹永晩, 水田保子, 赤木純一, 井手鉄哉, 豊田武士, 山下修司, 平田岳史, 小川久美子: 腹腔内投与銀ナノ粒子によるBALB/cマウスの急性毒性に関する検討.
第34回発癌病理研究会(2019.8.28)
- 4) 曹永晩, 水田保子, 赤木純一, 豊田武士, 井手鉄哉, 小川久美子: 腹腔内投与銀ナノ粒子によるBALB/cマウスの急性毒性におけるN-acetyl-l-cysteineの影響.
第5回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2019.9.14)
- 5) Ogawa K, Cho YM, Ide T, Akagi J, Toyoda T, Yamashita S, Hirata T: Size-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Global Summit on Regulatory Science 2019* (2019.9.25)
- 6) 安達玲子, 為広紀正, 木村美恵, 曹永晩, 水田保子, 小川久美子, 近藤一成
酸化亜鉛ナノマテリアルの抗原経皮感作への効果及び急性毒性における粒子径の影響
第46回日本毒性学会学術年会 2019年6月
- 7) Adachi R, Tamehiro N, Kondo K, Miyazaki A, Watanabe S, Hirao T. Interlaboratory validation of real-time PCR methods for the detection of wheat, buckwheat, and

- peanuts in processed foods.
133rd AOAC Annual Meeting & Exposition
2019年9月
- 8) Watanabe S, Miyazaki A, Hashimoto M, Unno H, Yonekawa Y, Adachi R, Hirao T. Novel DNA reference material by bioprinting IX: Application for quality control of the qualitative real-time PCR method for food allergens.
133rd AOAC Annual Meeting & Exposition
2019年9月
- 9) J. Kanno, Y. Taquahashi, A. Hirose., Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials. EUROTOX 2019(55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019.9.10), Helsinki, Finland, Poster
- 10) Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose, Jun Kanno., Improved Aerosol Generation Method and Newly Designed Whole Body Rodent Inhalation Apparatus for the Testing of Nanomaterials in Human-Relevant Exposure Scenario. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.16), Hawaii, USA, Poster
- 11) Y. Taquahashi, S. Yokota, K. Morita, M. Tsuji, Y. Hirabayashi, A. Hirose, and J. Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing (Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System). Society of Toxicology (SOT) 58th Annual Meeting (SOT2019) and ToxExpo, (2019.3.12), Baltimore, USA, Poster
- 12) 前野 愛、坂本 義光、北條 幹、湯澤 勝廣、長谷川 悠子、長澤 明道、久保 喜一、安藤 弘、海鋒 藤文、田中 和良、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、広瀬 明彦、中江大. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のラット気管内投与試験の生体内分布と呼吸器毒性における投与器具の比較. 第46回日本毒性学会学術年会 2019.6.27(徳島)
- 13) Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Onuki A, Hasegawa Y, Yuzawa K, Kubo Y, Nagasawa A, Ohnishi M, Goto Y, Suzuki T, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Nakae D. Clearance of multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation: a comparison of different instillation devices. 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019) 2019.9.10 (Helsinki, Finland)
- 14) 坂本義光、広瀬明彦、中江大 Time course of histopathology and the status of involved humoral factors during the carcinogenesis of MWCNT in rats. 第78回日本癌学会学術総会 2019.9.28(京都)
- 15) 北條 幹、坂本 義光、山本 行男、前野 愛、多田 幸恵、長谷川 悠子、湯澤 勝廣、長澤 明道、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. MWCNT 誘発性のラット腹膜中皮腫発症過程における炎症および免疫関連因子に着目した病理組織学的解析. 第36回日本毒性病理学会学術集会. 2019.2.14(東京)
- 16) 坂本 義光、北條 幹、前野 愛、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、広瀬 明彦、中江 大. 多層カーボンナノチューブを反復気管内投与したラットにおける肺神経内分泌細胞(PNEC)の増生. 第36回日本毒性病理学会学術集会 2019.2.14(東京)
- 17) 前野 愛、坂本 義光、北條 幹、湯澤 勝廣、長谷川 悠子、長澤 明道、大貫 文、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、後藤 裕子、大西 誠、小林 憲弘、広瀬 明彦、中江 大. 異なる投与器具を用いた多層カーボンナノチューブ

(MWCNT)のラット気管内投与試験における肺毒性と肺負荷量の比較. 第36回日本毒性病理学会学術集会 2019.2.14(東京)

- 18) Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A, Yoshida H, Kurokawa M. Effects of double-walled carbon nanotubes on the early phase of respiratory syncytial virus infection in mice. 55th Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2019 Helsinki, Finland)
- 19) Nishimaki-Mogami T, Cui H, Soga K, Adachi R, Tamehiro N, Hachisuka A, Kondo K, Hirose A: Discovery of an inhibitor of multiwall carbon nanotubes-stimulated IL-1 β secretion via inflammasome activation (EUROTOX 2019) (September 2019 Helsinki, Finland)
- 20) 大野彰子、渡邊昌俊、広瀬明彦. 多変量解析手法を用いた二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状に基づく毒性評価への応用. 日本薬学会第140年会 2020年3月27日(京都)

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)
「食品用途となるナノマテリアルの暴露による毒性評価に関する研究」
分担研究報告書 (令和元年度)

分担研究課題名: 経皮経口感作性試験におけるナノ銀のアジュバント作用について

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 部長
研究分担者: 曹 永暁 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長
研究分担者: 西川 秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 客員研究員

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。我々は、昨年度までにAgNPの経皮経口複合暴露による免疫毒性について、特にアジュバント作用の有無を検討するため、卵白アルブミン(OVA)を感作物質として用いる評価系を確立してきた。本年度は、その系を用いて、AgNPの経皮経口暴露によるアジュバント作用を検討した。感作のため、卵白アルブミン (OVA; 2 µg)単独またはOVAとAgNP(直径10nm 49 µg)を混合して、週3日間4週間にわたり剃毛部にパッチを貼付することで経皮暴露 (p.c.)した。続いて、OVA (30 mg)単独またはOVAとAgNP(直径10nm 50 µg)を混合して強制経口投与 (i.g.)による追加免疫 (7回/2週)で感作を増強させた。その後、OVA (50 mg)の単回経口投与によるアレルギー症状惹起を行い、60分後に屠殺剖検した。追加免疫中およびアレルギー惹起後の症状観察、血清中OVA特異抗体量および各種サイトカインパラメータ等を検討し、AgNPによるアジュバント作用を評価した。実験期間中、体重に群間の差は見られなかった。下痢スコア及び直腸温については、OVA投与群ではVehicle群に比べ、経口による追加免疫を経ることにOVA投与後の下痢スコアの上昇傾向及び直腸温の低下の増強並びに持続時間の延長が認められたが、経皮及び経口暴露時にAgNPを同時暴露させた群では、その程度が減弱される傾向が見られた。また、惹起後の下痢スコア及び直腸温の変動についても同様の傾向が見られた。剖検時、体重、絶対及び相対脾臓重量、腋窩及び鼠径リンパ節重量並びに大腸の長さには、群間の差異は認めなかった。OVA特異抗体の測定では、皮膚感作を終了した4週時点ではOVA単独群でIgE及びIgG1の有意な増加が見られ、経口AgNP追加群でもIgEの有意な増加が見られた。経口追加免疫翌日では全てのOVA投与群でIgE及びIgG1の有意な増加が見られ、経口AgNP追加群及び経皮及び経口AgNP追加群ではIgG2aの有意な増加も見られた。また、経口追加免疫翌日のOVA非特異的抗体の測定では、全てのOVA投与群でIgE、IgG及びIgAが有意に増加、あるいは増加傾向を示した。惹起60分後の血清サイトカイン測定では、全てのOVA投与群で単球遊走因子(MCP-1)及びIL-13の有意な増加並びに経皮及び経口AgNP追加群ではIL-6の有意な増加が見られ、経口AgNP追加群ではOVA単独群よりMCP-1が有意に高値を示した。血清ヒスタミン濃度はい

れも背景値程度であった。一方、脾臓細胞における 72 時間抗原再暴露による IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 及び INF- γ 分泌については、経口 AgNP 追加群で僅かに IL-4 及び IL-13 の増加が見られたが、OVA 単独群との差異は見られなかった。以上の結果から、OVA の経皮経口感作及び OVA の経口暴露によってアレルギー惹起が誘発される条件下において、直径 10 nm の AgNP の皮膚および経口追加暴露は明らかなアジュバント作用を示さないことが明らかとなった。

キーワード: ナノ銀、経皮経口感作、経口惹起系、アジュバント作用、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 (i.g.)による単回及び 90 日間反復投与毒性試験等において肝臓や腎臓に軽度の変化が示され (Bergin IL et. al., *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol.* 2013;3. doi: 10.1504/IJBNN.2013.054515.)、経皮あるいは静脈内投与試験では脾臓への影響が報告されている (Korani M et. al., *Int J Nanomedicine.* 2011;6, 855-862, Schäfer B et.al., *Arch Toxicol.* 2013;87, (2249-2262)) もの、十分な評価は行われていない。また、免疫毒性についての報告は限られている (Shin S-H et al., *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology.* 2012;4 (222-227))。AgNP のサイズによる毒性の違いについて、細胞を用いた検討では可能性が指摘されているが (Park MVDZ et. al., *Biomaterials.* 2011;32 (9810-9817))、動物を用いた検討での報告はない。更に、AgNP の経皮暴露 (p.c)による免疫毒性に及ぼす影響に関する報告も乏しい。

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

平成 24 年頃から、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 (茶のしづく石鹸:医薬部外品)の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告され、非常に大きな問題となった。我々は、当所生化学部との共同研究で、即時型アレルギー誘発経皮感作モデル実験系を用いると、小麦タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因が経皮感作性に与える影響について解析ができ、被験物質をマウス皮膚暴露後に腹腔内投与によって惹起させると、所属リンパ節の腫大を伴うアレルギー反応を示す事を病理組織学的に見いだしてきた。また、Yamashita らによって、被験物質をマウス腹腔内投与による感作後、強制経口投与によって惹起させる評価系の開発も試みられ、有用な結果を示している (Yamashita H et. al., *Allergy.* 2012;67, (201-209), Matsui T et. al., *Int Arch Allergy Immunol.* 2017;173, (71-83))。

さらに、この系を発展させ、マウスを用いて経皮感作後、経口投与による追加免疫、その後経口投与によりアレルギー症状を惹起するプロトコールによる免疫毒性の評価系を検討してきた。特に AgNP のアジュバント作用の有無を検討するため、卵白アルブミン (OVA)を感作物質として用いる評価系を確立してきた。昨年度の検討において、本評価系では、皮膚感作性の陽性アジュバント物質としてコレラ菌 (*Vibrio cholerae*)が産生するコレラ菌由来毒素 (コレラトキシン、CT)の B サブユニットである CTB については OVA と同時の皮膚暴露によって OVA 特異的抗体 (IgG1 及び IgG2a)産生が OVA 単独群よりも有意に増加することから、皮膚感作のアジュバント作用が評価可能であることを示した。

本年度は、この OVA をアレルゲンとする系を用

いて、AgNPの経皮経口暴露によるアジュバント作用を検討した。

B. 研究方法

動物実験は Adachi ら (Allergy. 2012;67 (1392-1399)) の方法を応用して実施した。

感作のため、卵白アルブミン (OVA; 2 µg) 単独または OVA と AgNP (直径 10nm 49 µg) を混合して、週 3 日間 4 週間にわたり剃毛部にパッチを貼付することで経皮暴露 (p.c.) した。続いて、OVA (30 mg) 単独または OVA と AgNP (直径 10nm 50 µg) を混合して強制経口投与 (i.g.) による追加免疫 (7 回/2 週) で感作を増強させた。その後、OVA (50 mg) の単回経口投与によるアレルギー症状惹起を行い、60 分後に屠殺剖検した。

抗原には OVA (Sigma A5503) を用い、AgNP にはこれまでの検討において最も毒性を持つと考えられた直径 10 nm の AgNP (nanoComposix AGCB10) を用いた。皮膚暴露では OVA は 2 µg、AgNP は 49 µg/50 µL/mouse とし、経口追加免疫では OVA は 30 mg、AgNP は 50 µg/0.2 ml/mouse となるように AgNP の溶媒である 2 mM クエン酸ナトリウム水溶液 (Citrates) を vehicle として投与直前に調製した。経口惹起時は全動物に OVA を 50 mg/0.2 ml/mouse となるよう注射用水 (大塚製薬) を Vehicle として投与直前に調製した。

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、SPF 環境下にて 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 p.c. → Vehicle i.g. 群、② OVA p.c. → OVA i.g. 群、③ OVA p.c. → OVA + AgNP i.g. 群、④ OVA + AgNP p.c. → OVA + AgNP i.g. 群、⑤ AgNP p.c. → AgNP i.g. 群 (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 クール感作させた。強制経口投与による追加免疫は Day 28 より隔日に合計 7 回/2 週行った。Day 0, Day 25, Day 43 にマウスの浅側頭静脈よりランセット (animal lancet 4 mm, MEDIpoin) を用いて 50 µl 採血し、血中の OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体を ELISA 法で測定した。総 IgE、総 IgG 及び総 IgA 抗体については追加免疫後の 7w (Day 43) のみ測定した。強制経口投与によるアレルギー反応の惹起は Day 49 に実施した。追加免疫及び惹起時、OVA 強制経口投与 60 分間までのマウスの直腸温変化及び下痢症状の観察を 15 分ごとに行い、下痢症状については基準に従ってスコアリング (0: 正常、1: 軟便、2: 下痢、3: 水溶性下痢) した。惹起 60 分後にイソフルラン深麻酔下で全血を採取し、血清中ヒスタミンを Histamine EIA Kit (Bertin Bioreagent) で、単球遊走因子 (MCP-1)、IL-13 及び IL-6 濃度を Mouse Quantikine ELISA Kit (bio-technique) 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 100 µg/ml) を添加、37°C 72 時間培養し、培地中のサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2、IL-17、IL-13 及び IFN-γ の濃度を、mouse Quantikine ELISA Kit (bio-technique) にて測定した。

更に、体重、脾臓重量、腋窩及び鼠経リンパ節重量並びに大腸長の計測を行った。

統計解析

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

は、Dunnett 法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及び強制経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの深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

実験期間中の体重、剖検時の体重、絶対及び相対脾臓重量、腋窩及び鼠径リンパ節重量並びに大腸の長さには、群間の差異は認めなかった (Figure 2)。

経口追加免疫時の下痢スコアについては、OVA 投与群では Vehicle 群に比べ、回数を経ることに OVA 投与 60 分後の下痢スコアの上昇傾向が見られ、7 回目では OVA p.c.→OVA i.g. 群及び OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群において有意な高値を示した。経口追加免疫時の直腸温も同様に回数を経る毎に低下の増強並びに持続時間の延長傾向が見られ、OVA p.c.→OVA i.g. 群においては 2、3 回目は投与後 15 分時点のみ有意な 1°C 以下の低下を示したが、4 回目以降は 6 回目の 60 分後を除き、投与後 15 分から 60 分まで有意な低値を示し、5 回目以降は 45 分及び 60 分後に 3°C 以上の低下を示した。OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群及び OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g. 群においても有意な低下が見られたが、その持続時間及び低下の程度は OVA p.c.→OVA i.g. 群よりも軽度であり、特に OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では、変動が减弱している傾向が見られた (Figure 3)。惹起後においては、下痢スコアは全ての OVA 投与群で有意な高値を示した。直腸温の変動は全ての OVA

投与群において惹起の 15 分後には有意に低下したが、OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では、45 分及び 60 分後には回復傾向を示し、有意差はみられなかった (Figure 4)。

OVA 特異抗体の測定では、皮膚感作を終了した 4 週 (Day 25) 時点では OVA p.c.→OVA i.g. 群で IgE 及び IgG1 の有意な増加が見られ、OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群でも IgE の有意な増加が見られた。7 週の経口追加免疫翌日 (Day 43) では全ての OVA 投与群で IgE 及び IgG1 の有意な増加が見られ、OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群及び OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では IgG2a の有意な増加も見られた (Figure 5)。また、経口追加免疫翌日 (Day 43) の OVA 非特異的抗体の測定では、全ての OVA 投与群で IgE 及び IgA の有意な増加がみられ、IgG は増加傾向を示し OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では有意であった (Figure 6)。惹起 60 分後の血清サイトカイン測定では、全ての OVA 投与群で単球遊走因子 (MCP-1) 及び IL-13 の有意な増加がみられ、IL-6 は増加傾向を示し OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では有意であった。MCP-1 については、OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では OVA p.c.→OVA i.g. 群よりも有意に高値を示した。血清ヒスタミン濃度は背景値程度であった (Figure 7)。一方、脾臓細胞における 72 時間抗原再暴露による IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 及び INF- γ 分泌については、OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群で僅かに IL-4 及び IL-13 の増加が見られたが、OVA p.c.→OVA i.g. 群との差異は見られなかった (Figure 8)。

また、OVA の投与をせず AgNP のみを経皮経口暴露した群においては、これまでの背景値の範囲であり毒性学的意義のないと考えられる血清ヒスタミン値の高値以外には、いずれの検討も Vehicle 群と差異は認めなかった。

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ことを目的と

し、特にアジュバント作用についての評価に主眼を置いた。前年度までの検討により、OVA の経皮及び経口暴露で感作を成立させた後、OVA の経口暴露によってアレルギー反応を惹起させる評価系を確立し、コレラトキシン B サブユニットを追加で皮膚暴露するとアジュバント作用が検出できることを示してきた。本年度は確立された評価系を用いて AgNP の追加暴露でアジュバント作用が見られるか検討した。

今回の検討において、マウスへの OVA の皮膚暴露後、経口暴露によって血清中 OVA 特異抗体価及び MCP-1、IL-13、が有意に増加するとともに、下痢や体温低下などの生体反応も経時的に増強するなど、経皮経口複合暴露によるアレルギー反応の成立が確認された。10 nm の AgNP を経皮または経皮及び経口で追加暴露してもほぼ全てのパラメータにおいて明らかな増強作用は見られなかった。血清 MCP-1 については OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では OVA p.c.→OVA i.g. 群よりも有意に高値を示したが、他のパラメータでは変動は見られず、その意義は不明である。むしろ、経口追加免疫において、下痢スコア及び直腸温低下の程度や持続時間については、AgNP 追加投与群では減弱化傾向を示していると考えられた。

また、AgNP 単独の経皮経口暴露では総 IgE、IgG 及び IgA 並びに各種サイトカインの変動はなく、本投与系においては免疫毒性は示唆されなかった。

E. 結論

これまでに検討してきた OVA の経皮経口複合暴露によるアジュバント作用の評価系を用いて AgNP のアジュバント作用を検討した。OVA による免疫反応の成立が確認され、評価系としての有用性が確認されるとともに、AgNP については本系において経皮経口複合暴露によるアジュバント作用は認めなかった。

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)

曹永晩, 水田保子, 赤木純一, 井手鉄哉, 安達玲子, 為広紀正, 木村美恵, 近藤一成, 小川久美子: 経皮感作及び経口惹起によるマウス食物アレルギーモデルの開発.

第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.27)

Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Ide T, Toyoda T, Ogawa K : Effects of antioxidant and inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice.

IUTOX 15th International Congress of Toxicology (2019.7.16)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

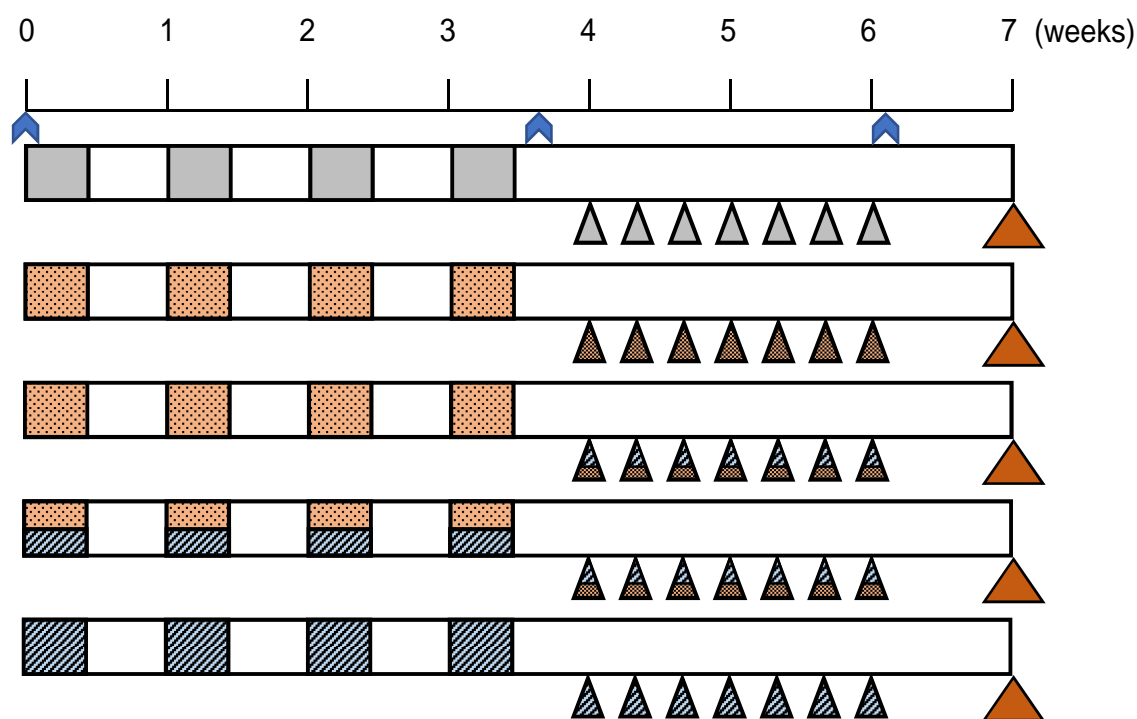
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



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

Grey square : 2 mM Citrate percutaneous (p.c.) exposure with skin patch on the flank (50 μ L/mouse)

Orange dotted square : Ovalbumin (OVA 2 μ g) p.c.

Blue hatched square : AgNP (10 nm, 49 μ g) p.c.

White triangle : 2 mM Citrate intragastric (i.g.) with gastric tube (0.2mL/mouse)

Orange triangle : OVA (30 mg) in citrate i.g.

Blue hatched triangle : OVA (30 mg) + AgNP (10 nm, 50 μ g) i.g.

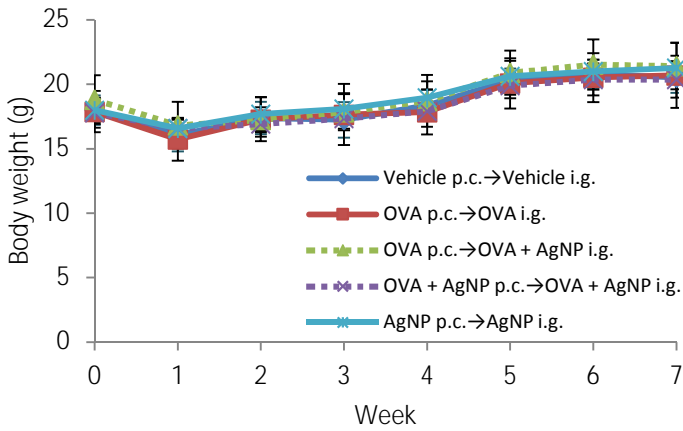
Blue triangle : AgNP (10 nm, 50 μ g) i.g.

Orange triangle : OVA (50 mg) in citrate i.g. with gastric tube (0.2mL/mouse)

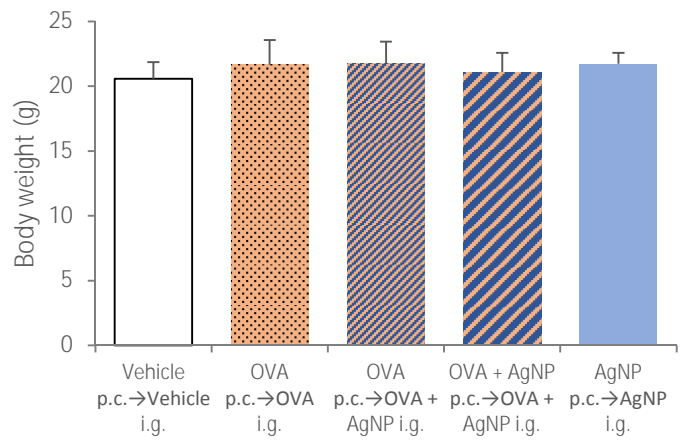
Blue arrow : Blood sampling

Figure 1. 実験プロトコール

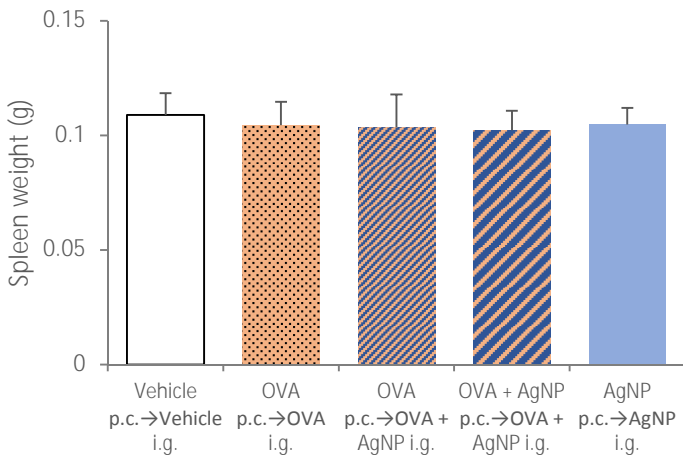
Sequential change of body weight



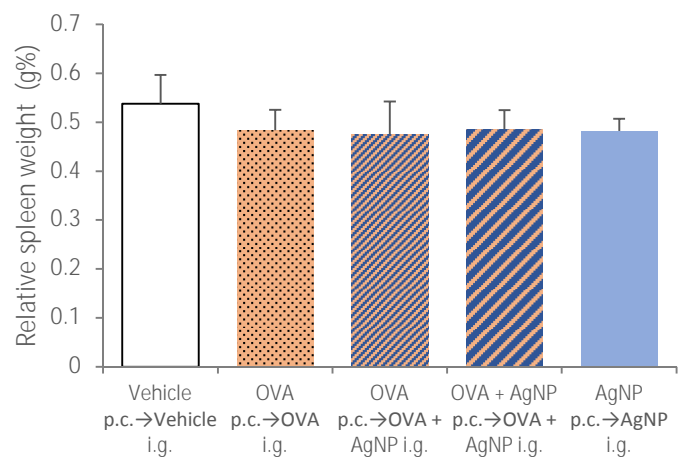
Body weight



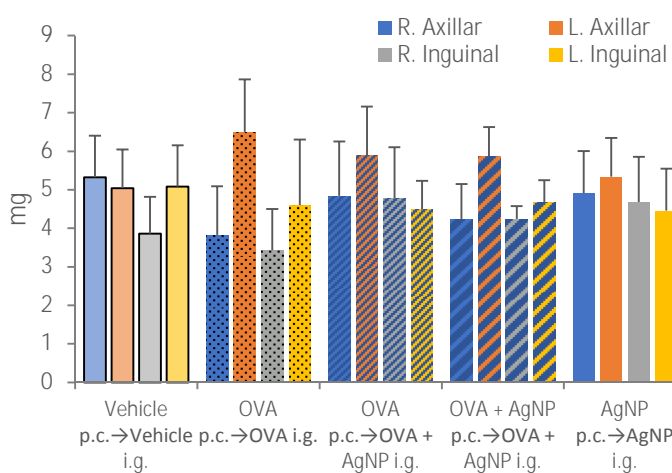
Spleen weight



Relative spleen weight



部位別のリンパ重量



Length of colon

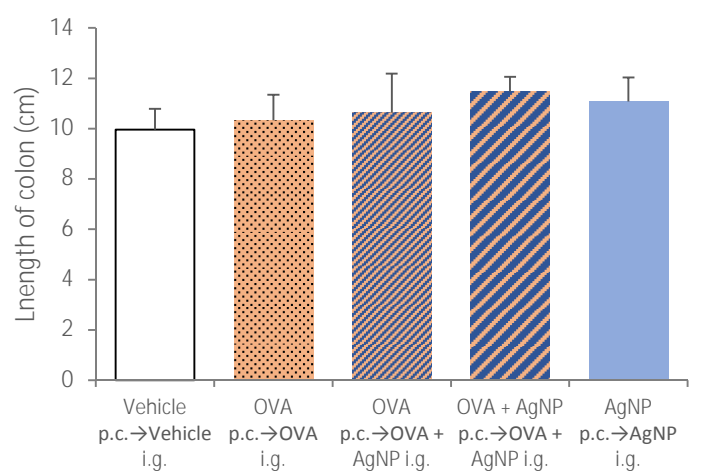
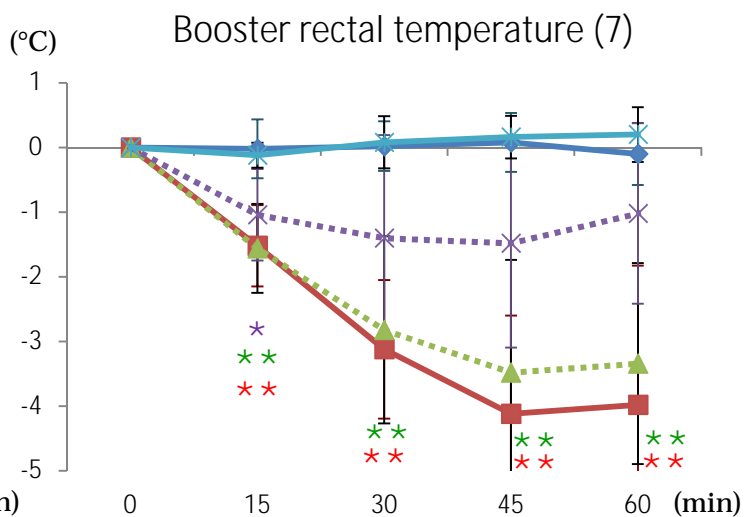
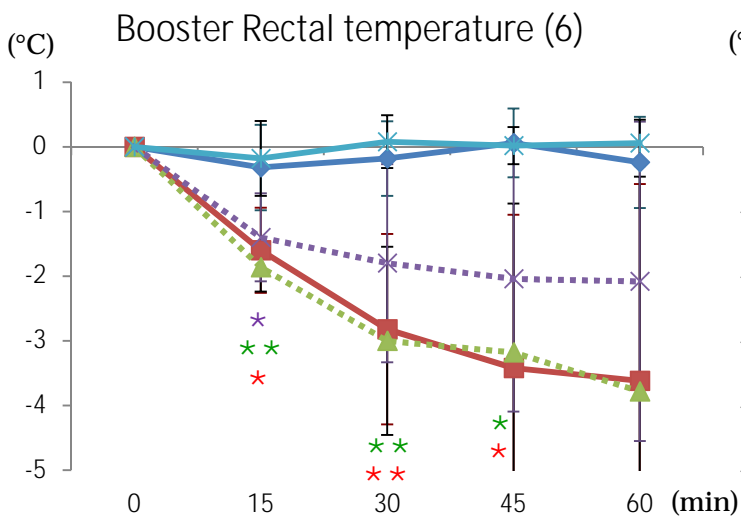
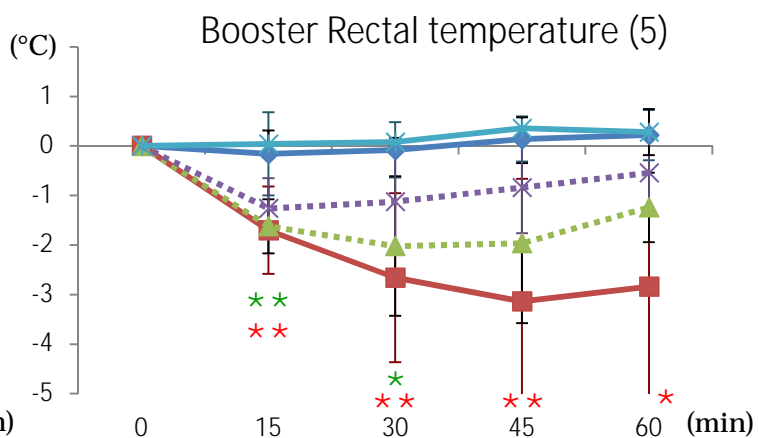
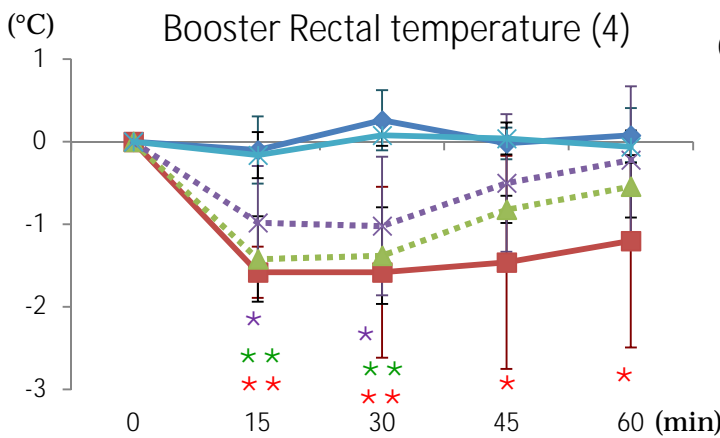
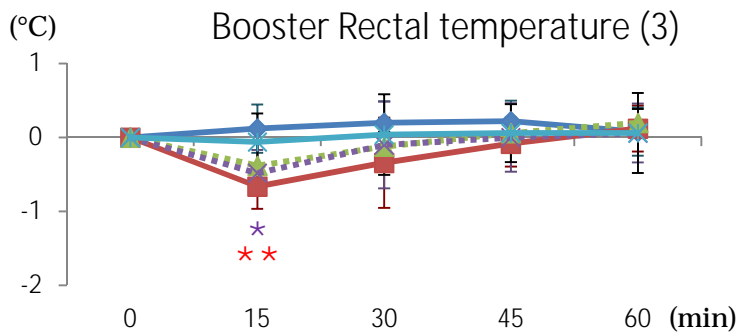
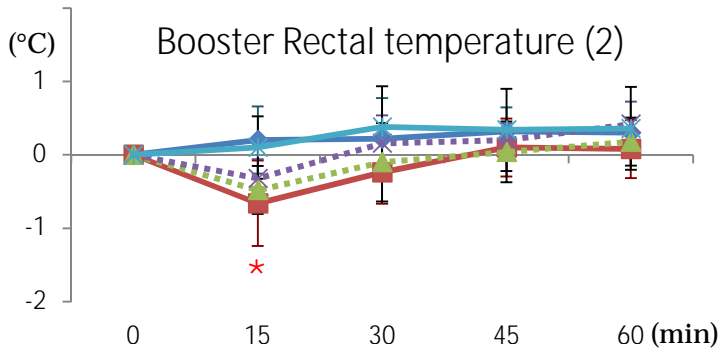
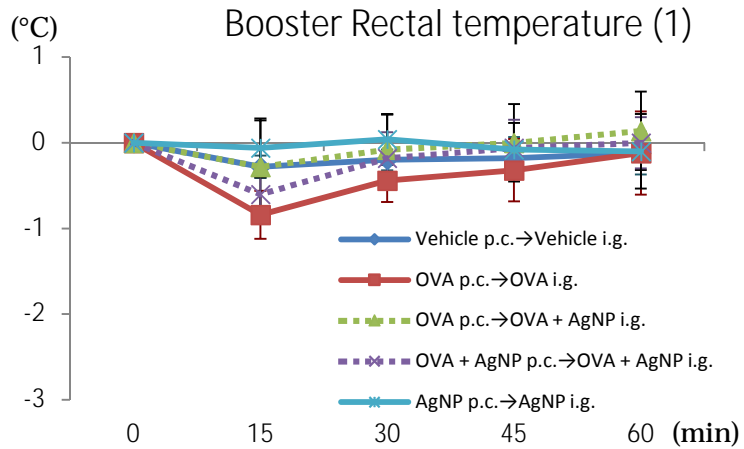
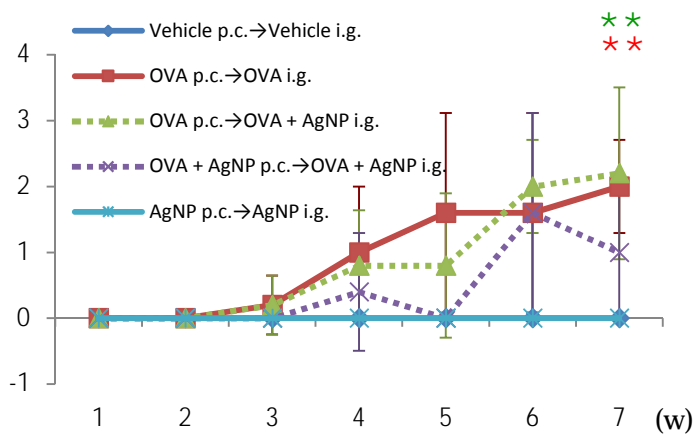


Figure 2. 体重変化・脾臓重量・リンパ節重量・大腸長

Booster時の下痢スコア推移



** , * : p<0.01, 0.05 vs. Vehicle p.c.→Vehicle i.g.

Figure 3. 追加免疫時下痢スコア・直腸温の経時変化

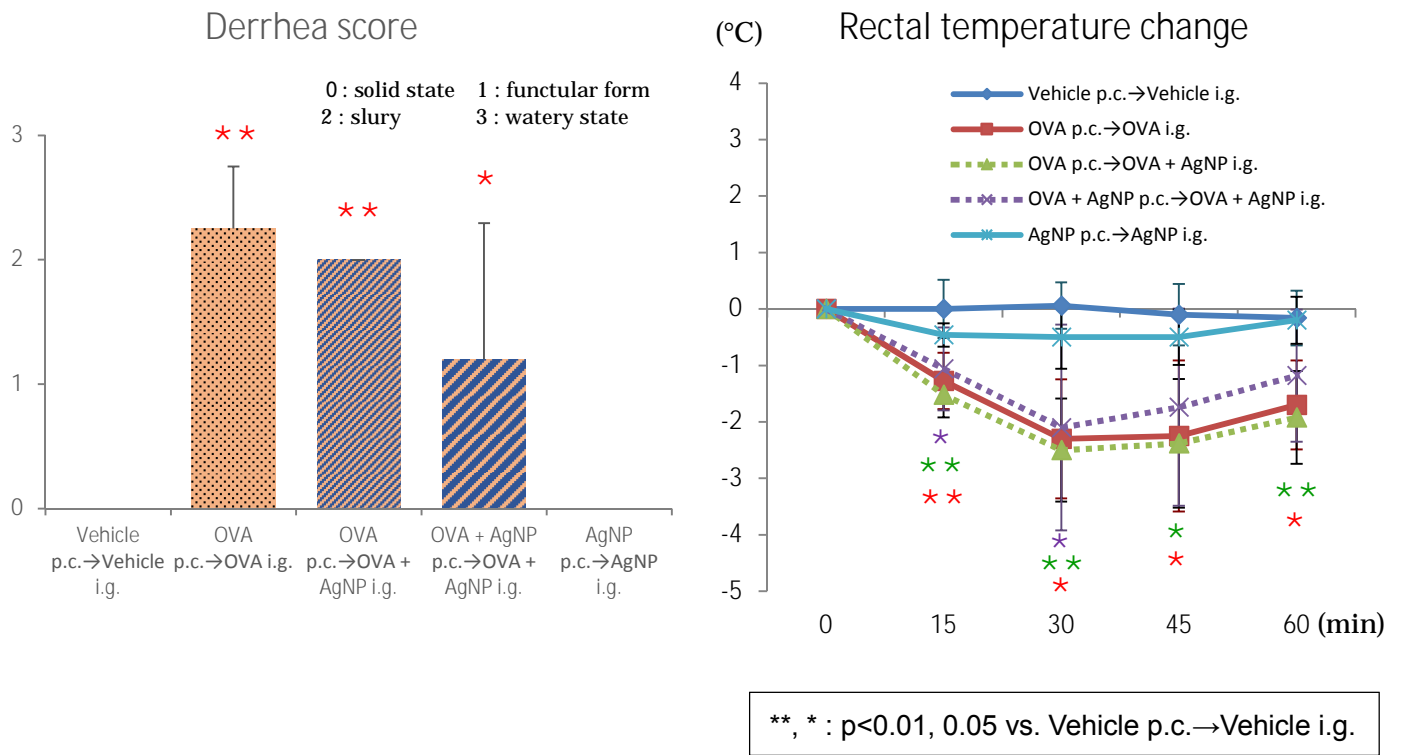


Figure 4. 惹起後下痢スコア・直腸温の経時変化

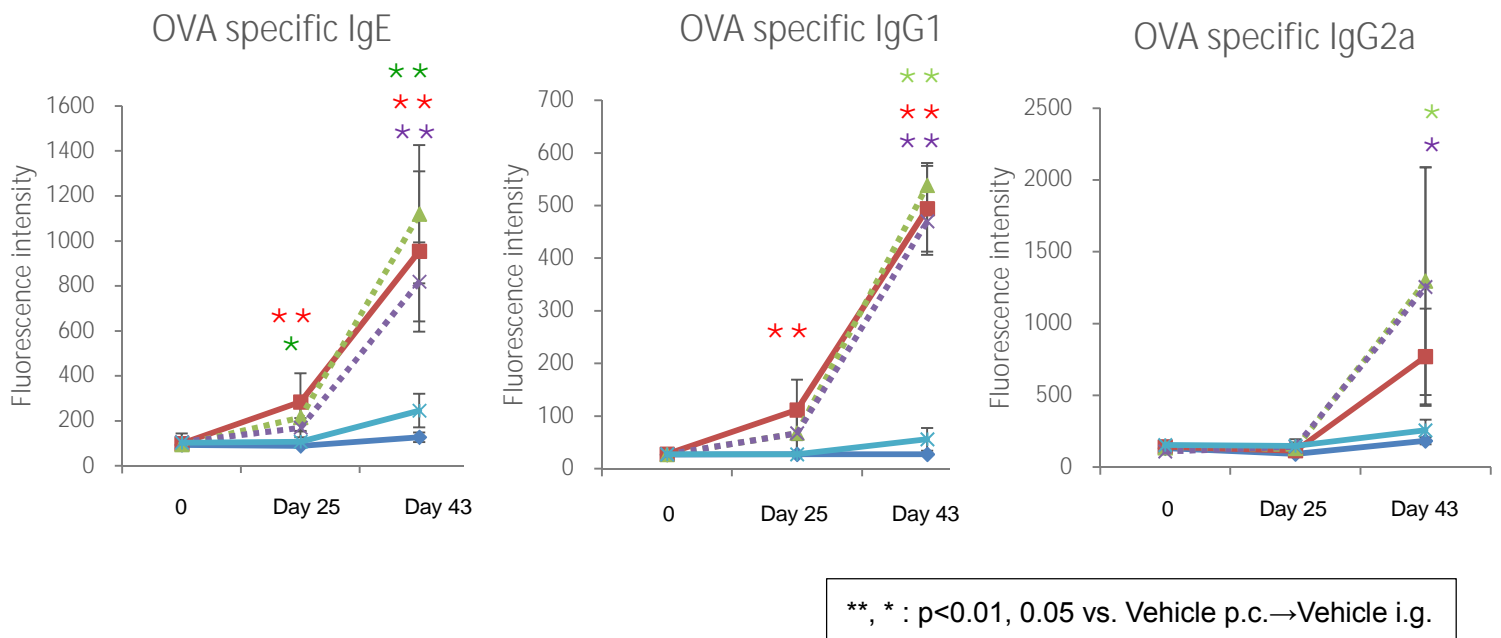
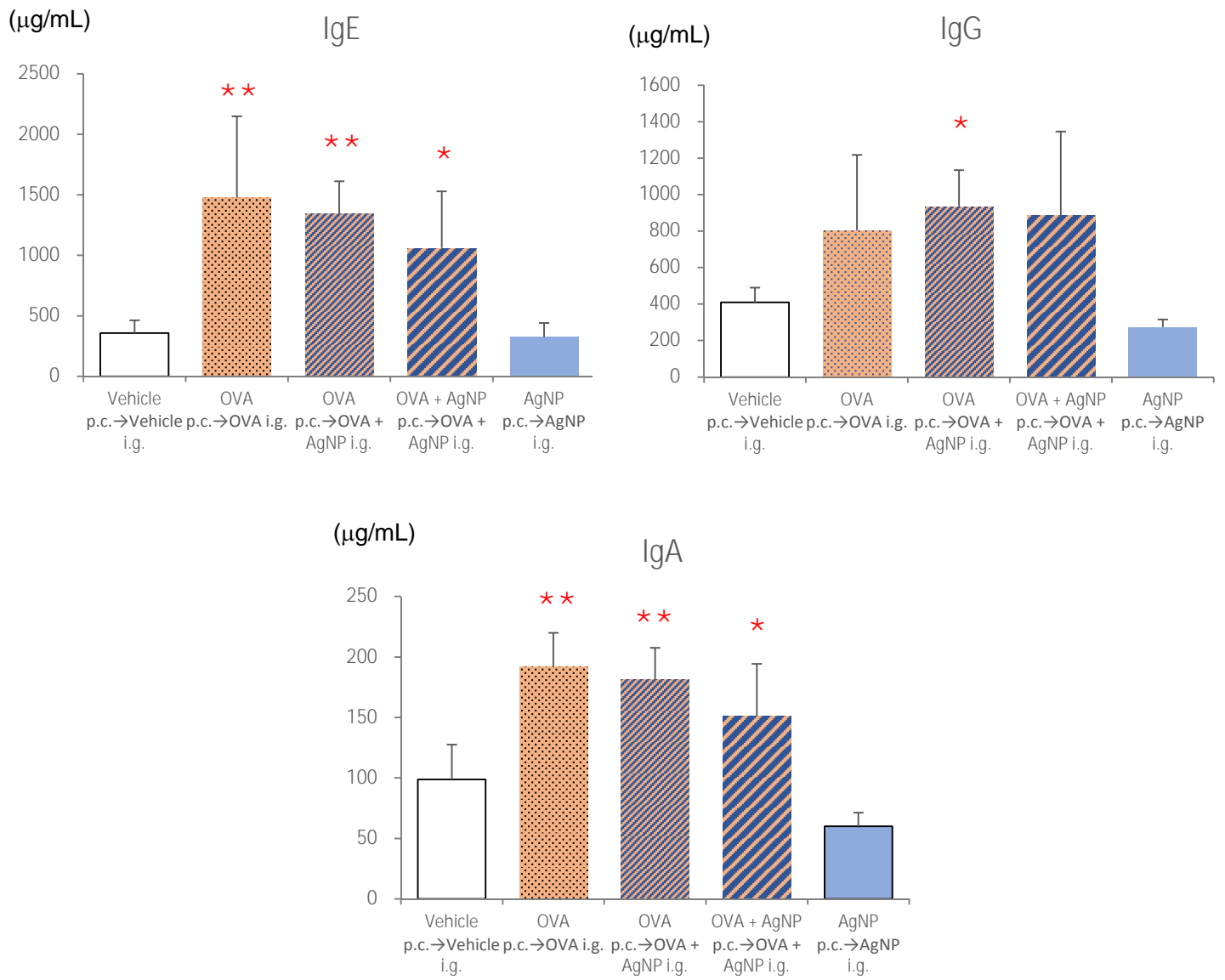
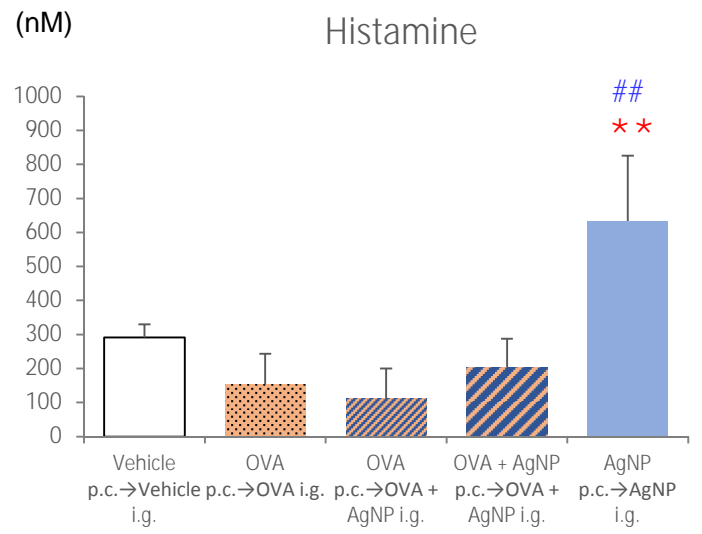
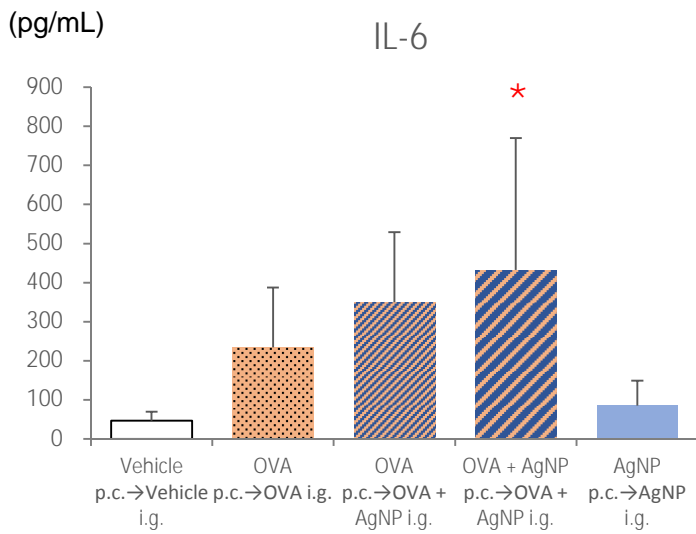
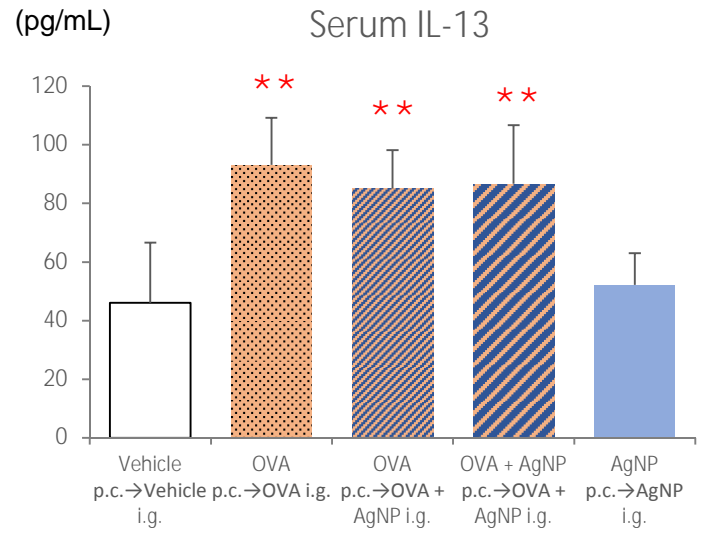
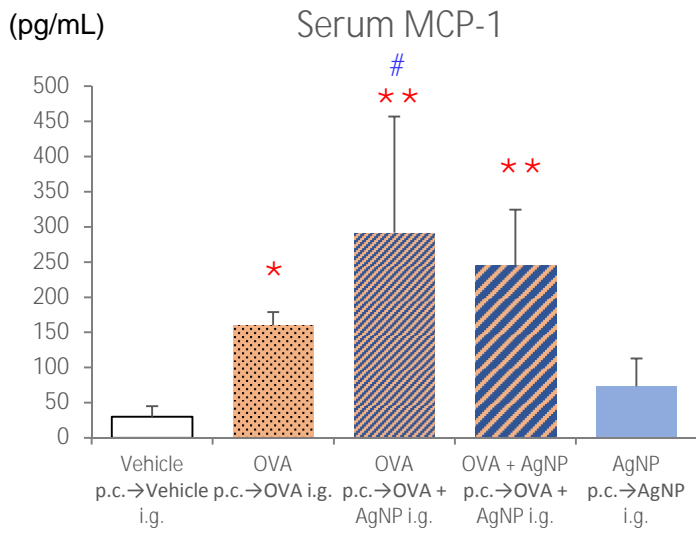


Figure 5. 血清中 OVA 特異抗体の経時的変化



** , * : p<0.01, 0.05 vs. Vehicle p.c.→Vehicle i.g.

Figure 6. 血清中非特異抗体量



** , * : p<0.01, 0.05 vs. Vehicle p.c.→Vehicle i.g.
##, # : p<0.01, 0.05 vs. OVA p.c.→OVA i.g.

Figure 7. 血清中サイトカイン濃度

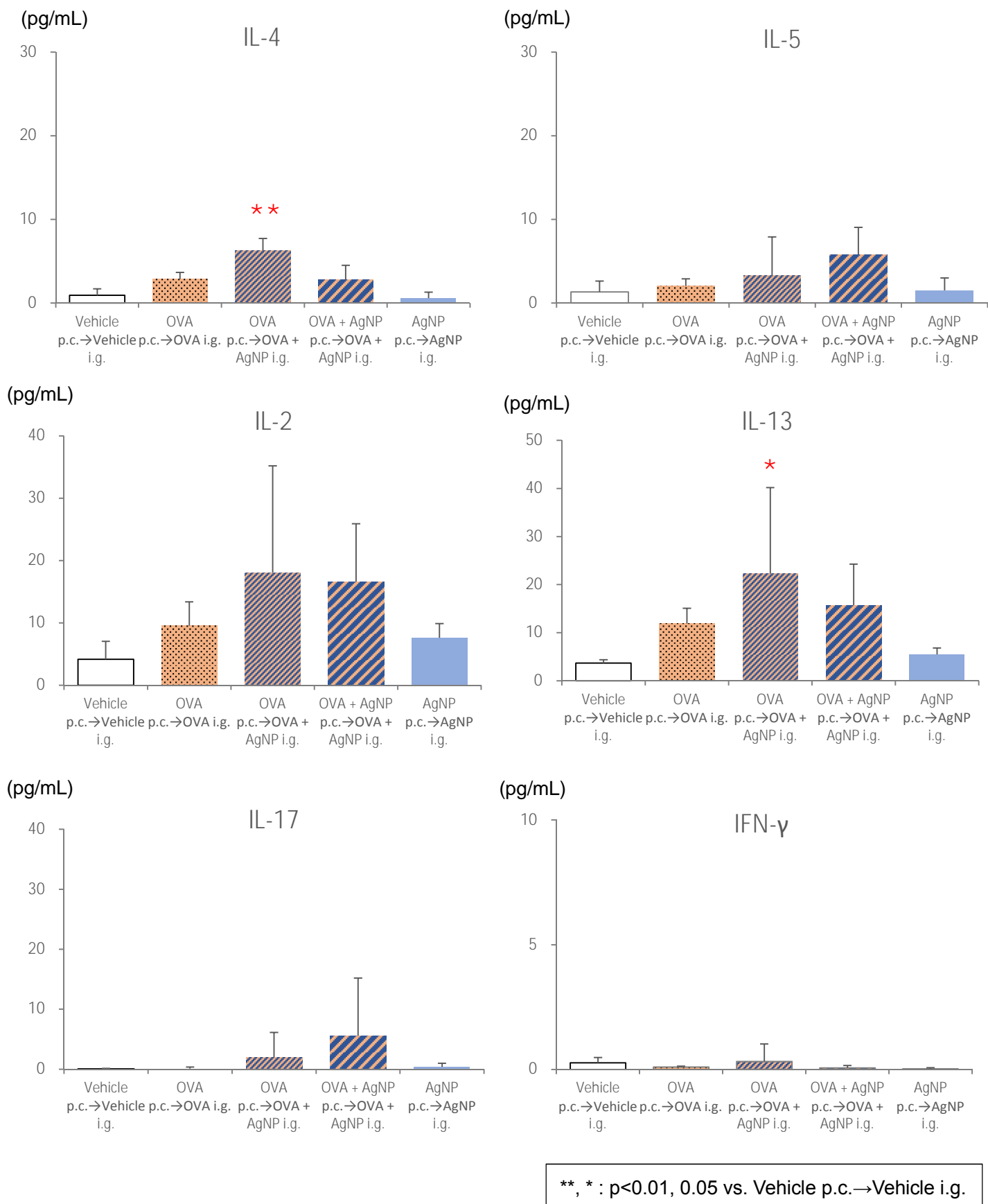


Figure 8. 脾臓細胞再抗原暴露誘導サイトカイン濃度

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」
分担研究報告書 (令和元年度)

分担研究課題名: 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 部長
研究分担者: 西川 秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 客員研究員
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 年度の検討において、我々はマウスに直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP を等量単回腹腔内投与したところ、10 nm の AgNP 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誘導されることを見出した。30 年度には、ポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone, PVP) で表面修飾した AgNP (直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg)を単回腹腔内投与したところ、直径 5 nm AgNP PVP 投与群のみにおいて、体温低下に加え、肝臓の肉眼及び病理組織学的検査で著しい変化が認められ、AgNP の毒性影響は粒子のサイズに相関することが再確認された。本年度は、形状の異なるナノ銀として、PVP でコートされた微細な板状のナノプレート(AgNP PVP プレート;厚さ 10nm、長径 30 nm, 50 nm, 100nm)を用いてマウスへの腹腔内投与による急性毒性を検討するとともに、これまでに得られた直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP を等量単回腹腔内投与したマウス肝臓組織の遺伝子発現パターンについて PCR array を用いてクラスタリング解析を実施した。AgNP PVP プレートの毒性については、投与 6 時間及び 24 時間後において、いずれの投与群も体温、肝臓重量、脾臓重量、及び肝臓での病理組織学的変化には明らかな毒性学的変化は認めなかった。一方で、何れのサイズの AgNP PVP プレートにおいても、投与部位である腹膜の炎症及び血管炎が誘発された。また、これまでの検討で得られた粒子状の AgNP の腹腔内投与 6 時間後のマウス肝臓における遺伝子発現を検討したところ、10 nm AgNP 投与群の肝臓は、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の肝臓とは異なるクラスターに分類され、直径 10 nm の AgNP 腹腔内投与 6 時間後のマウス肝臓における遺伝子発現が増加しているものとして、Slc2a1, Hmox1, Mmp9, Serpine1 等の Hypoxia response 関連因子および、Ccrp, Ccl12 等の Inflammatory response 関連因子が検出され、10 nm の AgNP 特異的な急性肝毒性には、肝臓局所あるいは全身の低酸素応答が関連している可能性が示唆された。

キーワード: ナノ銀、急性毒性、マウス、肝臓、遺伝子発現パターン

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と試験では脾臓への影響が報告されている (Korani M et. al., Int J Nanomedicine. 2011;6, 855-862, Schäfer B et.al., Arch Toxicol. 2013;87, 2249-2262)ものの、十分な評価は行われていない。AgNP のサイズによる毒性の違いについて、細胞を用いた検討では可能性が指摘されているが (Park MVDZ et. al., Biomaterials. 2011;32 (94-99))、動物を用いた検討での報告は少ない。Balb/c マウスに腹腔内投与した高濃度の AgNP による急性毒性に関して報告があった (Elkhawass E.A.et. al., International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;6 (9810-9817))。

26 年度及び 27 年度の検討において、我々は AgNP の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 OVA の有無にかかわらず、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、その結果を報告した (CHO YM et. al., Toxicol Pathol. 2018;31 (73-80))。30 年度には、ナノマテリアルの立体安定剤として使用されているポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone, PVP) で表面修飾した AgNP (直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg) をマウスの腹腔内投与し、その影響について検討したところ、5 nm AgNP PVP 投与群において、体温低下に加え、肝臓の肉眼及び病理組織学的検査で著しい変化が認められたことから、AgNP の急性毒性は粒子のサイズに相関することが再確認された。AgNP の急性毒性メカニズムについては十分に知られておらず、ナノ粒子のサイズ及び表面修飾に加え、酸化的ストレスの関与に関する解析を進めることが必要と考えられた。本年度は、形状の異なるナノ銀として微細な

板状のナノプレート(厚さ 10nm、長径 30 nm, 50 nm, 100nm)を用いてマウスへの腹腔内投与による急性毒性を検討するとともに、これまでに得られた直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP を等量単回腹腔内投与したマウス肝臓組織の遺伝子発現パターンについて PCR array を用いて比較検討した。

B. 研究方法

実験1) ナノプレートの急性毒性

AgNP は nanoComposix 社の PVP コートナノ銀プレート (厚さ 10 nm, 長径 30 nm (SPPH550-10M)、50 nm (SPPH750-10M)、及び 100 nm (SPPH950-10M)、濃度 1 mg/ml in aqueous 5 mM Borate)を用いることとした。AgNP を 0.2 mg/0.2 ml/マウスとなるよう希釈せずに投与した。購入時のデータシートでは、プレートは角が丸みを帯びた正三角形～円形を呈しており、それぞれのサイズ分布は 15-65, 50-170, 70-190 nm で、ピークは 35, 90, 110 nm であった。

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社) を給餌した。1 週間の馴化後、1 群の匹数は 5-6 匹 (投与 6 時間後解剖群) 又は 5 匹 (投与 24 時間後解剖群) とし、各群は以下の通りに構成した、① 溶媒対照 (5 mM Borate, Vehicle) 群、② 30 nm AgNP PVP プレート群、③ 50 nm AgNP PVP プレート群、④ 100 nm AgNP PVP プレート群。単回腹腔内投与 (0.2 ml /マウス) し、6 及び 24 時間後、2 時間の絶食後、深麻酔下で腹大動脈から採血後、放血し、解剖した (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、腸管膜、腸管膜リンパ節、胸腺、心臓、肺及び膵臓についてはホルマリン固定後、パラフィン包埋切片、HE 標本作製し、病理組織学的検討を行った。

実験2) ナノ銀投与マウス肝臓の PCR-array

これまでの検討で得られて凍結保存されていた、直径 10, 60, 100 nm の球状の AgNP を単回腹腔内投与 6 時間後に摘出したマウス肝臓(n=3)から mRNA を抽出し、QUAGEN 社の RT² Profiler PCR アレイの mouse stress and toxicity pathway finder, mouse molecular toxicology pathway finder, Cellular stress responses を用いて、搭載されているそれぞれ 84 の遺伝子発現について、プロトコールに沿って検討した。10 nm の AgNP 投与マウスの肝臓 3 サンプルにおいて、対照群および 60 nm ならびに 100 nm AgNP 投与群の肝臓サンプルと異なる発現を示す遺伝子を抽出した。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エクセル統計 (BellCurve for Excel)ソフトウェアを用いて、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett 法により有意差検定を行った。病理組織学的所見の発生頻度については、Fischer's exact test による検定を実施し、いずれの検定も $p < 0.05$ を有意とした。なお、図中には * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で有意差の程度を記した。

(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) ナノプレート投与の急性毒性

AgNP PVP プレート投与群を含め、いずれのマウスにおいても全身状態の異常は見られなかつ

た。投与後の直腸温変化について、6 時間観察群では、50 nm 群(1, 3, 6 時間後)及び 30 nm 群(3 時間後)で有意な変動が見られた(Figure 2)。また、6 時間後の相対肝臓重量、相対脾臓重量、及び、24 時間後の体重、相対肝臓重量、相対脾臓重量には群間に差異は見られなかった(Figure 3)。

血液生化学検査では、投与 6 時間後において、Cl の有意な高値が 100 nm 群に、T-cho の有意な低値が 30 nm および 100 nm 群に、TG の有意な低値が 50 nm 群に認められた。また、投与 24 時間後において、ALB の有意な低値が 30 nm 群に、ALP の有意な低値が 30 nm および 50 nm 群に認められた(Table 1,2)。

剖検時、6 時間後及び 24 時間後とも、AgNP PVP プレート投与群では、腸間膜表面や胸腺近傍のリンパ節が黒色調を呈していた。

病理組織学的検査では、投与 6 および 24 時間後において、いずれの群でも肝臓には投与に関連した明らかな変化は見られなかった。ナノ銀と考えられる微細な黒褐色色素沈着は、投与 6 および 24 時間後にすべての AgNP PVP プレート投与群において、腹膜表面および気管周囲リンパ節で観察された(Figure 4, Table 3,4)。腹膜表面のリンパ球浸潤は投与 6 および 24 時間後に溶媒投与群にも観察されたが、AgNP PVP プレート投与群でやや高度であった。また、色素沈着部の近傍において腹膜脂肪織内への好中球浸潤を伴う、血管炎が投与 6 時間後の全ての AgNP PVP プレート投与群に観察され、30 nm 群では 24 時間後にも 3 匹中 1 匹に観察された。血管炎は血管壁に好中球主体の炎症細胞浸潤を示すと共に血管内腔に好中球の集簇が認められた(Figure 4, Table 3, 4)。また、いずれの群においても、腎臓の再生尿細管および心臓心外膜の鉍質沈着が散見された。

実験2) ナノ銀投与マウス肝臓の PCR-array

3 セットの pathway finder について PCR-array を用いてクラスタリング解析を実施したとこ

ろ、10 nm AgNP 投与群の 3 サンプルは、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の合計 9 サンプルとは異なる発現パターンをとっていることが示された。10 nm AgNP 投与群の 3 サンプルで共通して発現増加している遺伝子として Slc2a1, Hmox1, Mmp9, Serpine1 等の Hypoxia response 関連因子および、Crp, Ccl12 等の Inflammatory response 関連因子が検出された(Figure 5)。

D. 考察

実験1) ナノプレートの急性毒性

我々はこれまでの検討において、の球状 AgNP がサイズによって毒性発現が異なることを示してきた。本年度はプレート状の PVP コートナノ銀プレート (厚さ 10 nm, 長径 30 nm、50 nm、及び 100 nm) について検討した。その結果、厚さ 10 nm, 長径 30 nm の AgNP PVP プレートについても、明らかな一般状態、肝重量、脾重量の変化は見られなかった。投与後の直腸温変化では、6 時間観察群において、50 nm 群(1, 3, 6 時間後) 及び 30 nm 群(3 時間後) で有意な変動が見られるものの、同群では溶媒対照群で軽度の体温低下が見られていること、24 時間観察群では、1, 3, 24 時間後のいずれも直腸温の変動は見られないことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。血液生化学検査では、投与 6 時間後において、Cl の有意な高値が 100 nm 群に認められたが、他の電解質に変動は見られず、意義は乏しいと考えられた。T-cho の有意な低値が 30 nm および 100 nm 群に、TG の有意な低値が 50 nm 群に認められ、脂質代謝がわずかに抑えられる傾向がみられた。投与 24 時間後において、ALB の有意な低値が 30 nm 群に、ALP の有意な低値が 30 nm および 50 nm 群に認められたが、肝臓に関連する他のパラメーター及び病理組織学的検討において明らかな変化は伴っておらず、毒性学的意義は乏しいと考えられた。これまで検討において、直径 10 nm のクエン酸コート AgNP 粒子及び直径 5 nm の PVP コート AgNP 粒子の腹腔内投与によ

って肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死等が観察されたが、今回の AgNP PVP コートプレートを用いた検討では、肝臓の変化は認めなかった。形状の相違による生態反応の相違の検討を目的としたが、今回用いたプレート状のナノ粒子は 1 辺は 10 nm とされているが他辺の大きさとしては、これまでに明らかな毒性が認められた粒子状の AgNP に比較すると大きいと考えられ、肝臓内への分布は起こらなかったと考えられる。一方で、AgNP PVP プレート投与 6 時間後において、AgNP 粒子と同様に腹腔内のリンパ節には、黒褐色色素沈着は見られず、気管周囲リンパ節では色素沈着が見られた。また、腹膜表面へのリンパ球集簇は溶媒群でも認められるが、黒褐色色素沈着をともなう結節状のリンパ球集簇が AgNP PVP プレート投与 6 時間後は全群に、投与 24 時間後は 30 nm 及び 50 nm 群に認められ、小型の AgNP PVP プレートは長く留まる可能性が見られた。また、腹膜脂肪織内への好中球浸潤を伴う、血管炎が投与 6 時間後の全ての AgNP PVP プレート投与群に観察され、30 nm 群では 24 時間後にも 3 匹中 1 匹に観察された。血管炎は血管壁への炎症細胞浸潤と血管内腔での好中球集簇があり、出血及び血流の乱れ並びに血栓形成を誘発する可能性があると考えられた。黒褐色色素沈着をともなうリンパ球集簇の近傍で観察されており、ナノ銀の存在との関連が示唆されるが、発生機序及び毒性学的意義については、今後の検討が必要と考えられた。

実験2) ナノ銀投与マウス肝臓の PCR-array

3 セットの pathway finder を用いた PCR-array による遺伝子発現のクラスタリング解析において、10 nm AgNP 投与群の肝臓では、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の肝臓とは異なるクラスターに分類された。異なる発現パターンをとる遺伝子として、Slc2a1, Hmox1, Mmp9, Serpine1 等の Hypoxia response 関連因子および、Crp, Ccl12 等の Inflammatory response 関連因子が検出され、

10 nm の AgNP 特異的な急性肝毒性には、肝臓局所あるいは全身の低酸素応答が関連している可能性が示唆された。

E. 結論

本研究では、プレート状の PVP コートナノ銀プレート (厚さ 10 nm, 長径 30 nm、50 nm、及び 100 nm) についてマウスの腹腔内投与による急性毒性を検討した。その結果、厚さ 10 nm, 長径 30 nm 以上の AgNP PVP プレートにおいては、全身状態への影響を及ぼす変化は認めなかった。一方で、何れのサイズの AgNP PVP プレートにおいても、投与部位である腹膜の炎症及び血管炎が誘発された。また、これまでの検討で得られた粒子状の AgNP の腹腔内投与後のマウス肝臓における遺伝子発現を検討したところ、10 nm AgNP 投与群の肝臓は、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の肝臓とは異なるクラスターに分類され、低酸素及び炎症関連の遺伝子発現が肝臓での毒性影響に関連していると考えられた。

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)

曹永晩, 水田保子, 赤木純一, 井手鉄哉, 豊田武士, 山下修司, 平田岳史, 小川久美子: 腹腔内投与銀ナノ粒子による BALB/c マウスの急性毒性に関する検討.

第 34 回発癌病理研究会 (2019.8.28)

曹永晩, 水田保子, 赤木純一, 豊田武士, 井手鉄哉, 小川久美子: 腹腔内投与銀ナノ粒子による BALB/c マウスの急性毒性における *N*-acetyl-l-cysteine の影響.

第 5 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2019.9.14)

Ogawa K, Cho YM, Ide T, Akagi J, Toyoda T,

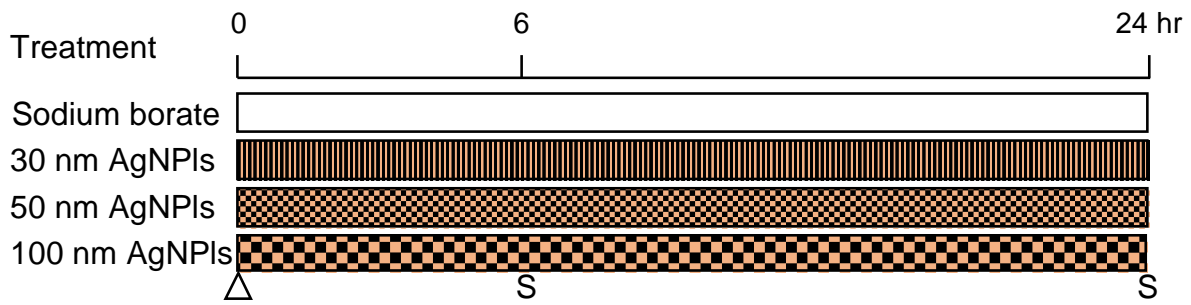
Yamashita S, Hirata T: Size-dependent toxicity of silver nanoparticles. Global Summit on Regulatory Science 2019 (2019.9.25)

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



Animal ; 6 week old, BALB/c, female

△ Sodium borate (5 mM, i.p., 0.3 ml/mouse)

▨ Silver nanoplates (30 nm AgNPI, i.p., 0.2 mg/mouse)

▩ Silver nanoplates (50 nm AgNP, i.p., 0.2 mg/mouse)

▧ Silver nanoplates (100 nm AgNPI, i.p., 0.2 mg/mouse)

S Sacrifice (n=5 at 6 hr and n=3 at 24 hr)

Figure 1. ナノ銀プレートのマウス腹腔内投与

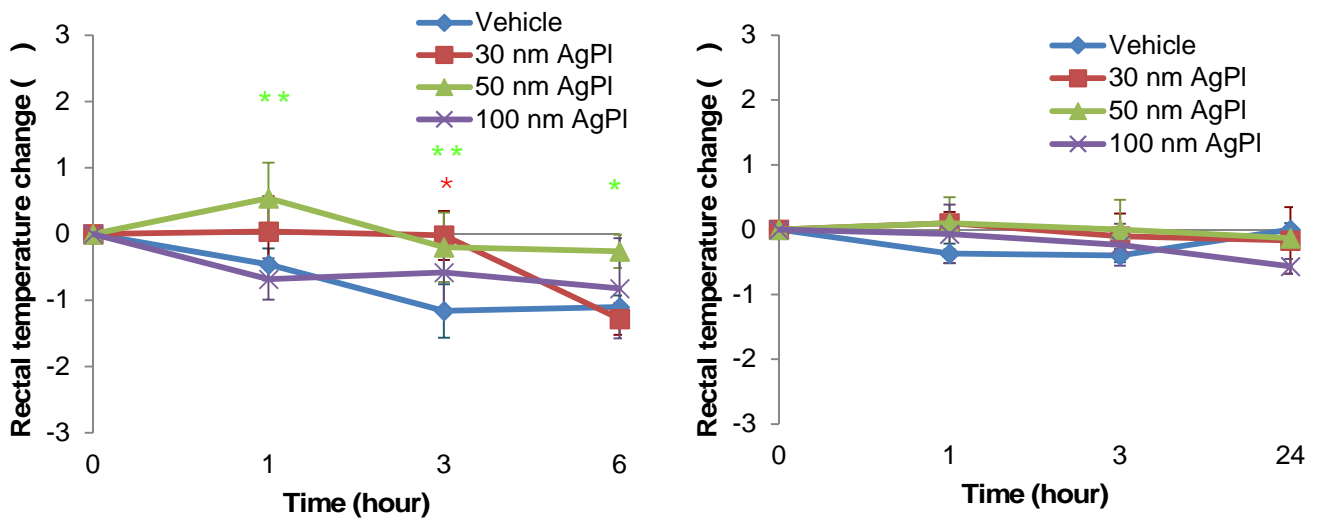
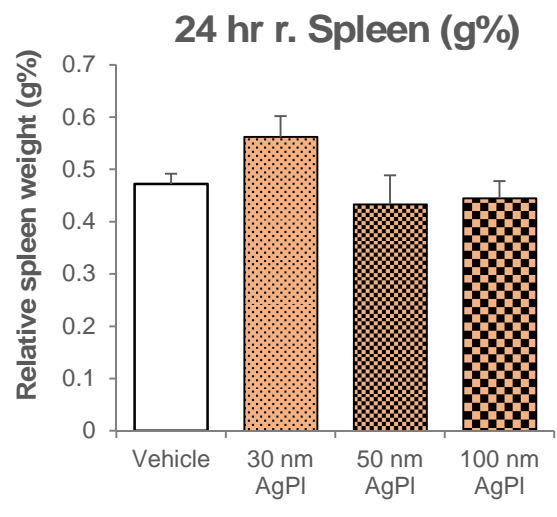
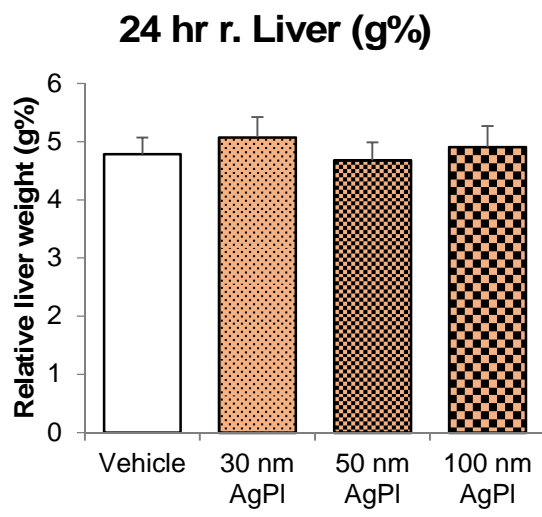
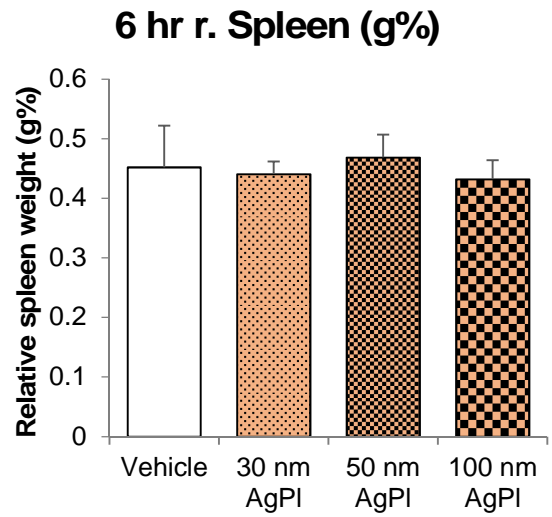
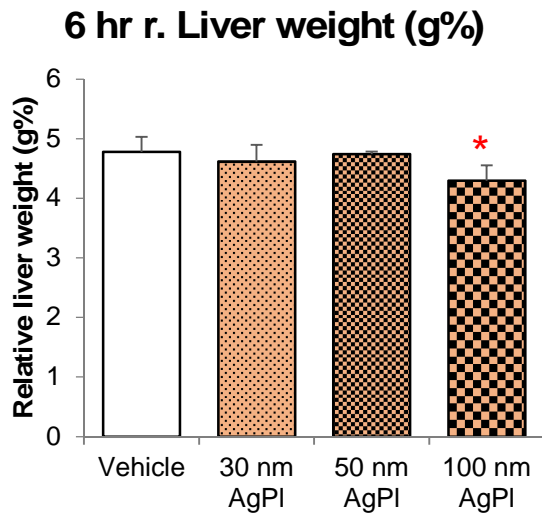


Figure 2. 直腸温の変化 (6 時間試験 , 24 時間試験)



* : p<0.05 vs. Vehicle

Figure 3. 相对肝重量及び相对脾重量 (投与 6 時間後及び 24 時間後)

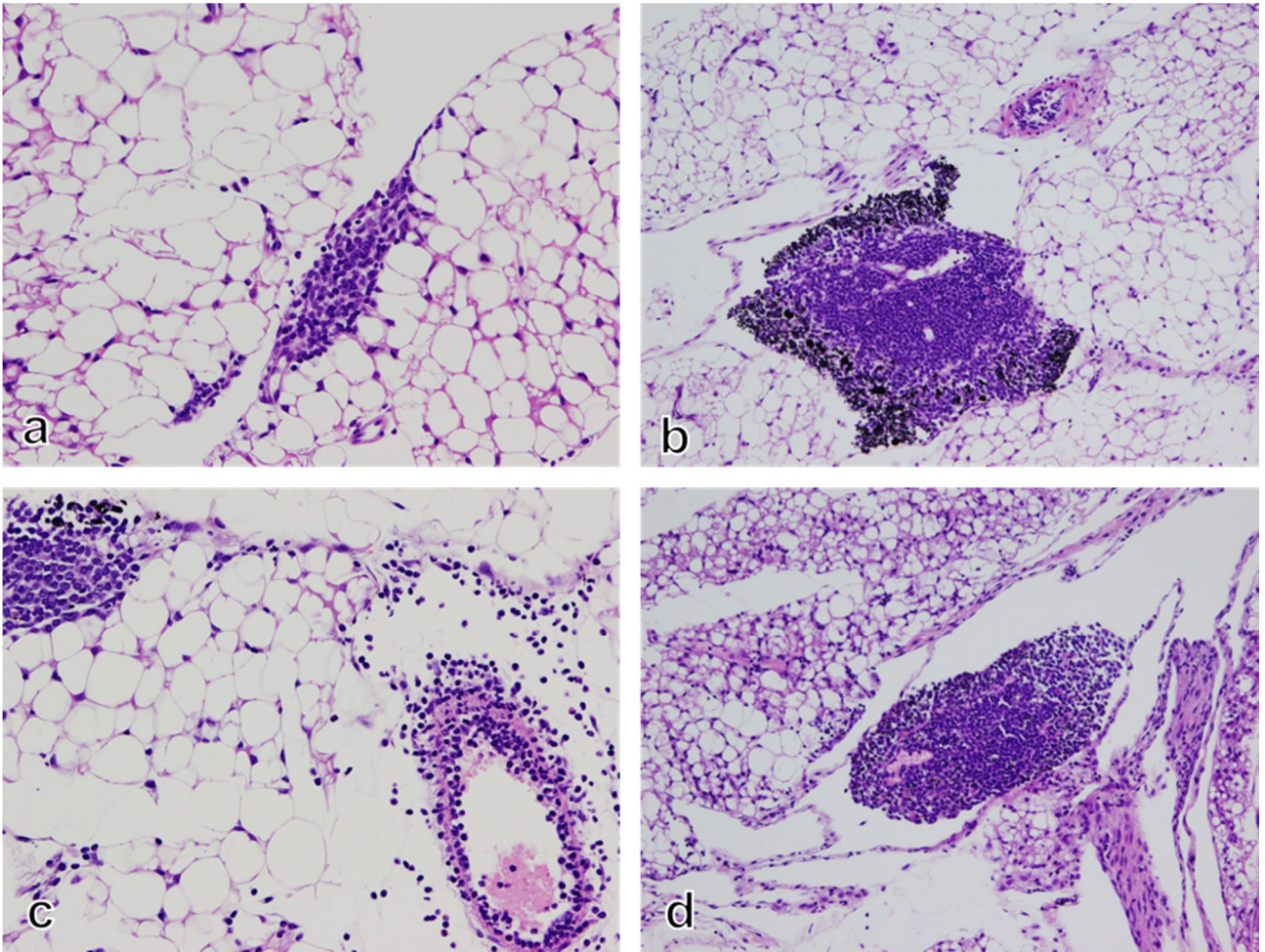


Figure 4. 病理組織学的変化

a; 腹膜へのリンパ球浸潤(溶媒対照群, 6 時間後)

b; 腹膜への黒褐色色素沈着を伴うリンパ球浸潤(30 nm AgNP PVP プレート群, 6 時間後)

c; 腹膜脂肪織の好中球浸潤を伴う血管炎(30 nm AgNP PVP プレート群, 6 時間後)

d; 腹膜へのリンパ球浸潤(30 nm AgNP PVP プレート群, 24 時間後)

Table 1. Serum biochemistry in BALB/c mouse treated with AgNpls after 6 hours

		6 h			
		Vehicle	AgNP plate		
			30 nm	50 nm	100 nm
No. of animals		5	5	5	5
TP	g/dL	4.3 ± 0.2	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.2
ALB	g/dL	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1
A/G		2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1
BUN	mg/dL	19.5 ± 2.3	20.1 ± 2.9	18.3 ± 1.3	17.4 ± 2.7
Cre	mg/dL	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Na	mEq/L	152 ± 2	152 ± 1	152 ± 1	151 ± 1
K	mEq/L	3.9 ± 0.4	4.0 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.1 ± 0.2
Cl	mEq/L	111 ± 1	113 ± 1	113 ± 1	115 ± 1**
Ca	mg/dL	7.8 ± 0.3	7.1 ± 0.7	7.2 ± 0.4	7.2 ± 0.5
IP	mg/dL	9.6 ± 1.4	10.9 ± 1.7	10.9 ± 1.6	10.4 ± 1.0
AST	IU/L	60 ± 4	71 ± 19	58 ± 4	57 ± 7
ALT	IU/L	32 ± 3	29 ± 5	27 ± 4	26 ± 9
ALP	IU/L	489 ± 31	479 ± 11	469 ± 49	479 ± 31
LDH	IU/L	421 51	436 137	406 128	327 69
γ-GTP	IU/L	<3	<3	<3	<3
T-CHO	mg/dL	72 ± 3	63 ± 3**	67 ± 5	62 ± 5**
TG	mg/dL	36 ± 8	35 ± 8	25 ± 5*	28 ± 2
BIL	mg/dL	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Glucose	mg/dL	219 ± 11	199 ± 18	190 ± 22	199 ± 46

Each value represents the mean ± S.D.

** , *; Significantly different vs. vehicle at p < 0.01 and 0.05, respectively

Table 2. Serum biochemistry for BALB/c mouse treated with AgNpls after 24 hours

		24 h			
		Vehicle	AgNP plate		
			30 nm	50 nm	100 nm
No. of animals		3	3	3	3
TP	g/dL	4.4 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1
ALB	g/dL	3.0 ± 0.0	2.7 ± 0.1 *	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.2
A/G		2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.2
BUN	mg/dL	22.5 ± 4.4	16.7 ± 2.4	21.4 ± 7.1	24.6 ± 5.8
Cre	mg/dL	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Na	mEq/L	151 ± 1	151 ± 1	152 ± 2	152 ± 2
K	mEq/L	4.6 ± 1.1	4.6 ± 0.7	4.6 ± 0.4	4.9 ± 0.4
Cl	mEq/L	112 ± 2	112 ± 1	113 ± 1	113 ± 2
Ca	mg/dL	8.5 ± 0.2	8.4 ± 0.6	8.4 ± 0.4	8.4 ± 0.2
IP	mg/dL	8.0 ± 0.3	7.7 ± 0.6	8.6 ± 1.2	9.6 ± 1.4
AST	IU/L	48 ± 3	47 ± 5	47 ± 8	62 ± 11
ALT	IU/L	22 ± 3	16 ± 0	18 ± 8	36 ± 18
ALP	IU/L	516 ± 6	407 ± 35 *	391 ± 44*	437 ± 61
LDH	IU/L	402 34	546 108	451 77	435 25
γ-GTP	IU/L	<3	<3	<3	<3
T-CHO	mg/dL	72 ± 12	76 ± 8	79 ± 5	75 ± 4
TG	mg/dL	61 ± 27	39 ± 9	47 ± 25	57 ± 11
BIL	mg/dL	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Glucose	mg/dL	213 ± 23	186 ± 38	175 ± 13	191 ± 9

Each value represents the mean ± S.D.

*; Significantly different vs. vehicle at p < 0.05

Table 3. Histopathological findings in BALB/c mice 6 hour after intraperitoneal injection of AgNP plate

Organ and lesion		Treatment	6 hr			
			Vehicle	AgNP plate		
				30 nm	50 nm	100 nm
No.of animals		5	5	5	5	
Liver	Nectosis, focul		0	0	2	
	Mitosis,hepatocyte		1	0	2	
	Microgranuloma		4	2	4	
Gall bladder	Edema, submucosa		0	1	2	
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition		0	5**	5**	
Mesenterium	Inflammatory cell foci, lymphocyte		4	5	5	
	Inflammatory cell foci, lymphocyte, +		4	2	3	
	Inflammatory cell foci, lymphocyte, ++		0	3	2	
	Inflammatory cell, neutrophil		0	3	5**	
	Vasculitis		0	5**	4*	
	Dark brown pigment deposition		0	5**	5**	
Kidney	Regenerative tubules		4	3	3	
Heart	Mineralization, epicardium		2	3	3	

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

Table 4. Histopathological findings in BALB/c mice 24 hour after intraperitoneal injection of AgNP plate

Organ and lesion		Treatment	24 hr			
			Vehicle	AgNP plate		
				30 nm	50 nm	100 nm
No.of animals		3	3	3	3	
Liver	Microgranuloma		3	3	2	
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition		0	3	3	
Mesenterium	Inflammatory cell foci, lymphocyte		3	3	3	
	Inflammatory cell foci, lymphocyte, +		3	0	1	
	Inflammatory cell foci, lymphocyte, ++		0	3	2	
	Inflammatory cell, neutrophil		1	3	3	
	Vasculitis		0	1	0	
	Dark brown pigment deposition		0	3	3	
Kidney	Regenerative tubules		2	3	2	
Heart	Mineralization, epicardium		3	2	2	

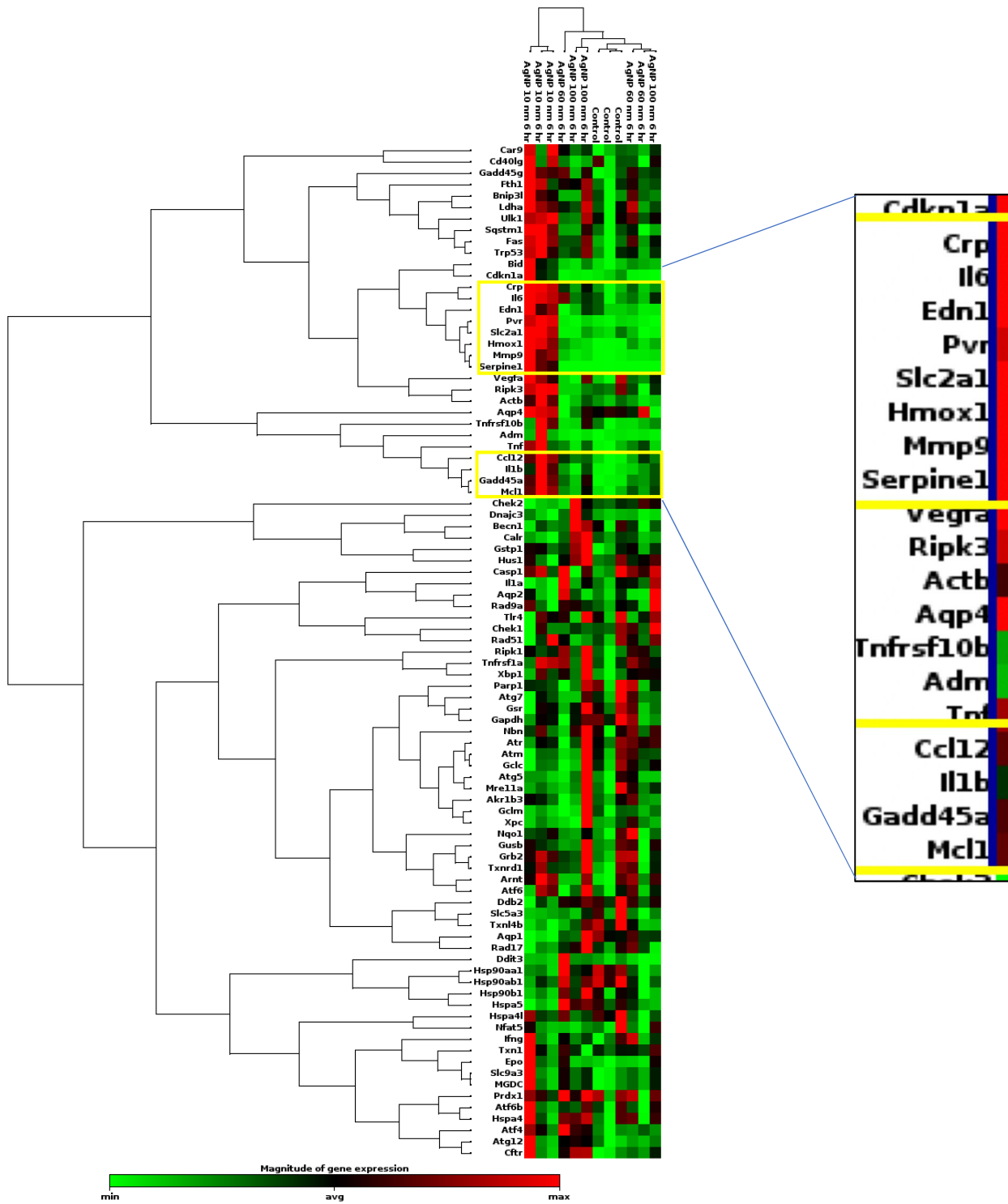


Figure 5. 直径 10, 60 及び 100 nm AgNP 粒子腹腔内投与 6 時間後のマウス肝臓の PCR array クラスタリング解析

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性確保推進研究事業）
「食品用途となるナノマテリアルの暴露による毒性評価に関する研究」
分担研究報告書（令和元年度）

分担研究課題名：酸化チタン等の経皮／経口暴露による免疫毒性の解析

研究分担者：安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長

研究協力者：為広 紀正 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官

研究要旨

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては、その特性による予想外の健康影響の可能性が指摘されている。酸化チタンや酸化亜鉛は、日焼け止め製品等の化粧品類へ配合されており、かつ着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装にも使用されている。本研究班の目的は、食品・食品容器包装用途に用いられ、経口及び経皮から暴露されるナノマテリアルについて、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積することである。29年度においては、ナノ酸化チタン、ナノ酸化亜鉛について、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果、及び、抗原経皮感作に与える影響について検討した。平成30年度においては、引き続きナノ酸化亜鉛が抗原経皮感作に与える影響について検討するとともに、29年度腹腔内投与時に急性毒性が見られたことから、ナノ酸化亜鉛の腹腔内投与による急性毒性に関する検討を行った。また、抗原経口投与によるアレルギー反応惹起実験系に関する検討を開始した。令和元年度においては、抗原経皮感作-経口惹起実験系を確立し、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討した。経皮感作-経口惹起実験系については、経皮感作後に複数回の経口投与による追加免疫を行い、その後経口投与によりアレルギー症状を惹起する実験系を確立することができた。この実験系を用いて抗原経口投与時のナノ酸化チタンの共存による影響について検討したところ、ナノ酸化チタンが、抗原の経口投与による追加免疫やアレルギー症状惹起を増強する可能性が示された。今後、ナノマテリアルの経皮／経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

A．研究目的

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては、更なる応用が期待されている一方で、その特性による予想外の健康影響の可能性が指摘されている。酸化チタンや酸化亜鉛は多くの日焼け止め製品に配合されており、ヒト皮膚と接触する頻度が非常に高い。その経皮暴露の影響に関しては、これまでに皮膚透過性試験

や皮膚感作性試験等が行われているが、いずれも明らかな作用は認められていない。一方で、最近、タンパク質が皮膚から取り込まれ抗原となる経皮感作経路が食物アレルギー発症の重要な要因として注目されている。そこで、研究分担者である安達らは、平成26-28年度の先行研究（厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業）において、動物モデルを用いた

検討により、数種の酸化チタン等のナノマテリアルが抗原経皮感作を増強することを示し、また、培養細胞を用いた in vitro 実験系により、これらのナノマテリアルが、アジュバント物質の活性発現において重要であるマクロファージのインフラマソーム活性化・炎症性サイトカインの産生を誘導することを示してきた。

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

B . 研究方法

試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン α (アナターゼ型、粒子径 6 nm)
(表面未処理)

を使用した。

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

いた。

酸化チタンナノマテリアルの懸濁液調製

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

【実験 1】経皮感作-経口惹起実験系に関する検討

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー (株) より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業 (株)) を給餌した。1 群の匹数は 3 匹とした。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。8 週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (500 μ g/50 μ L) を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1 クールとし、4 クールの経皮感作を行った。その後、Day 35、37、39、42、44、46、49、51、53、56 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回/週、計 10 回) 追加免疫を行った。この時、OVA-S 群では、投与前 3 時間絶食させた。Day 0、35、57 には部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。Day 63 に OVA 100 mg を経口投与し、アレルギー反応を惹起した。追加免疫及び惹起時の経口投与後 1 時間は、マウスの直腸温測定、及び下痢症状の観察を行い、下痢症状については Table 1 の基準に従ってスコアリングした。

【実験 2】アレルギー経皮感作後の経口投与に

対するナノ酸化チタンの影響に関する検討

経皮感作の操作は【実験 1】と同様に行った。1 群の匹数は 3 匹とした。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。経皮感作時の OVA 用量は $2\mu\text{g}/50\mu\text{L}$ とした。その後、Day 28、30、32、35、37、39、42 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回 / 週、計 10 回) 追加免疫を行った。この時、TiO₂C po 群では、OVA 30mg と TiO₂ 1.88mg (OVA:ナノ酸化チタン重量比=16:1) を懸濁させて経口投与した。Day 0, 25, 43 には部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。経口投与後 1 時間の直腸温測定及び下痢症状スコアリングは【実験 1】と同様に行った。

統計解析

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

【実験 1】経皮感作-経口惹起実験系に関する検討

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

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

Fig. 2 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ、その後の経口追加免疫によってさらに増加した。経口投与前の絶食の影響は特に見られなかった。(なお、通常 Vehicle 群では、IgE、IgG1 の蛍光値はそれぞれ 100 及び 50 程度である。)

次に、経口追加免疫、及び経口惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果を示す (Fig. 3, 4)。追加免疫 4 回までは体温低下、下痢症状ともほとんど見られなかったが、追加免疫 7 回目以降、及び経口惹起においては、顕著な体温低下及び下痢症状が見られた。(なお、通常の Vehicle 群では体温変動や下痢症状はほとんど見られない。) これらの結果から、抗原経皮感作後に複数回の経口追加免疫を行うことにより、最終的に経口投与によるアレルギー反応を惹起することが可能であることが示された。

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

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

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

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

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

D. 考察

本研究班の目的は、食品・食品容器包装用途に用いられ、経口及び経皮から暴露されるナノマテリアルについて、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積することである。本分担研究では、ナノ酸化チタンやナノ酸化亜鉛が、経皮的アレルギー感作時やその後の経口惹起に与える影響について検討を行った。平成 29 年度においては、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果、及び、抗原経皮感作に与える影響に

ついて検討した。平成 30 年度においては、引き続きナノ酸化亜鉛が抗原経皮感作に与える影響について検討するとともに、29 年度の検討を受けてナノ酸化亜鉛の腹腔内投与による急性毒性に関する検討を行った。粒子径の小さなナノ酸化チタン(6nm)やナノ酸化亜鉛(25nm)が経皮感作を増強することから、これらのナノマテリアルの作用は粒子径に依存する(粒子径が小さい場合に増強効果がある)可能性が示唆された。また平成 30 年度には、抗原経口投与によるアレルギー反応惹起実験系に関する検討を開始した。

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

近年、アレルギー発症の要因として、タンパク質が皮膚を透過して体内に取り込まれ抗原となる経皮感作経路が注目されている。本研究のこれまでの検討結果は、抗原タンパク質の経皮感作によるアレルギー発症において、酸化チタンや酸化亜鉛のようなナノマテリアルが共存することにより感作が増強される可能性を示しており、粒子径 30nm 未満程度のナノマテリアルを皮膚に適用する際には注意が必要であると考えられる。また、経皮感作後の抗原経口投与においても、ナノ酸化チタンが、抗原追加免疫やアレルギー症状惹起を増強する可能性が示された。今後、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、さ

らなる検討を行い、科学的知見を集積することが必要である。

E. 結論

食品・食品容器包装用途、及び化粧品等の両方に用いられ、経口及び経皮にて暴露される可能性があるナノマテリアルについて、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積するため、抗原経皮感作-経口惹起実験系の確立、及びアレルギーの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討した。抗原経皮感作-経口惹起実験系については、OVA 30mg×7回以上の経口投与による追加免疫と、その後のOVAの経口投与によりアレルギー症状を惹起する実験系を確立することができた。この実験系を用いて抗原経口投与時のナノ酸化チタンの共存による影響について検討したところ、ナノ酸化チタンが、抗原の経口投与による追加免疫やアレルギー症状惹起を増強する可能性が示された。今後は、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

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

133rd AOAC Annual Meeting & Exposition
2019年9月

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

133rd AOAC Annual Meeting & Exposition
2019年9月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

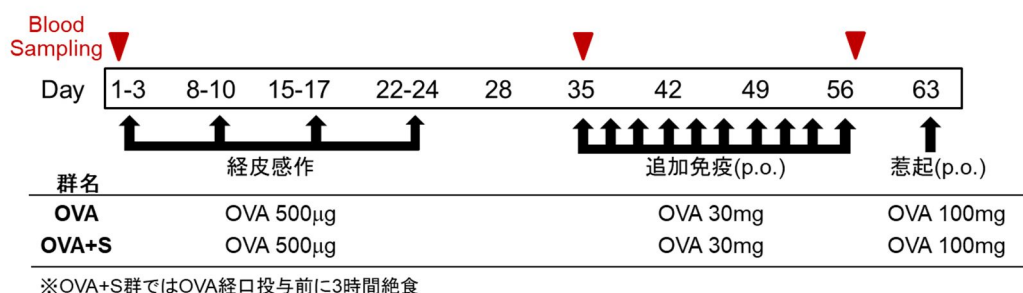
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

実験1 経皮感作-経口惹起実験系に関する検討(1群3匹 x 2群)



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

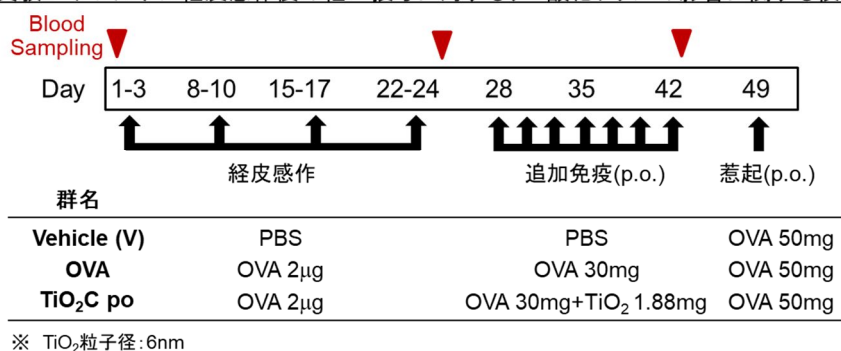


Figure 1 各実験群の設定および投与スケジュール

Table 1 下痢症状スコアリングの基準

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

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

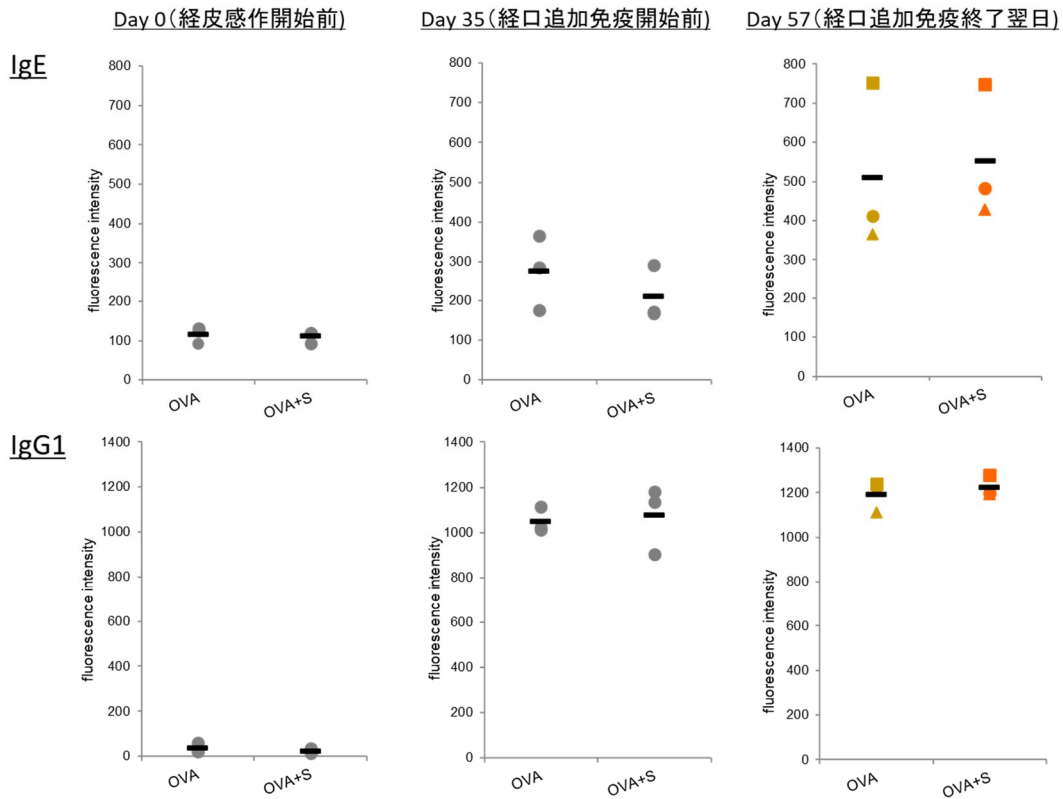


Figure 2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生(【実験1】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

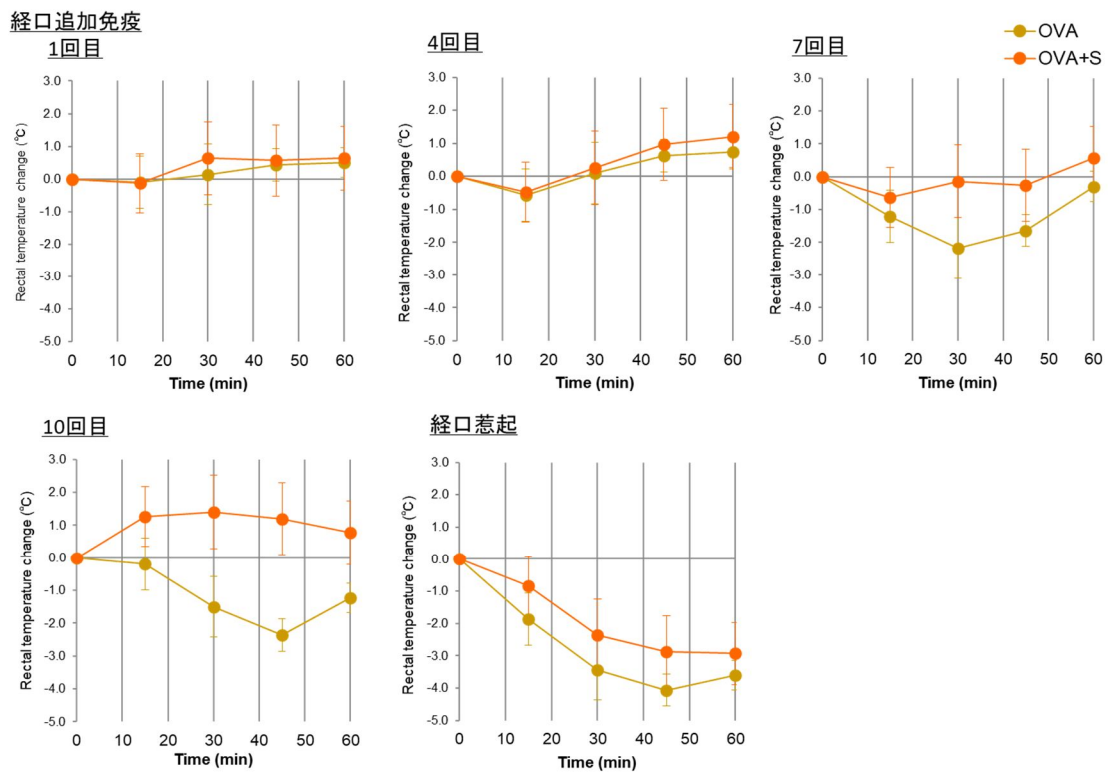


Figure 3 抗原経口投与後の体温低下(【実験1】)

経口追加免疫

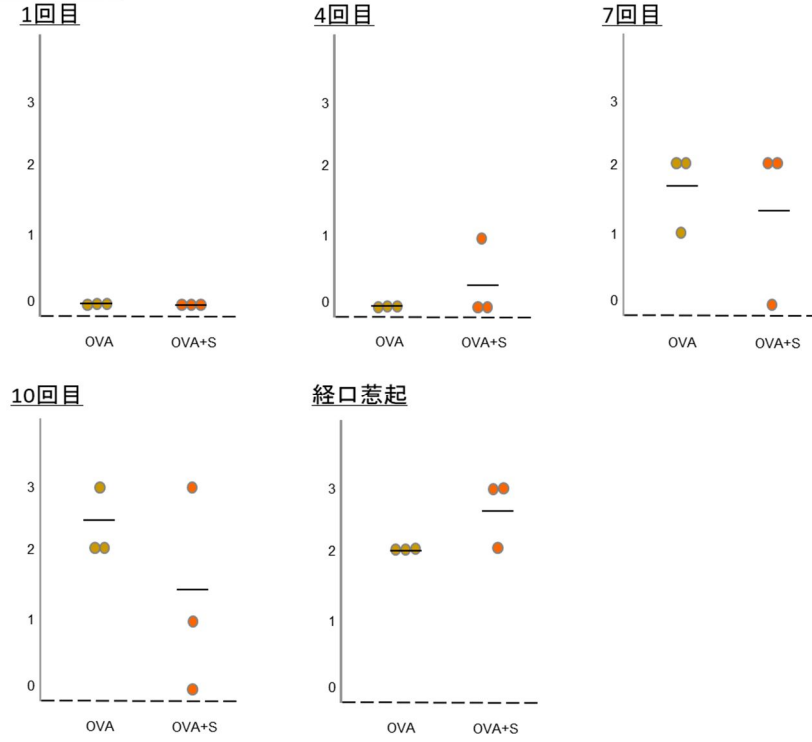


Figure 4 抗原経口投与後60分間の下病症状スコアリング(【実験1】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

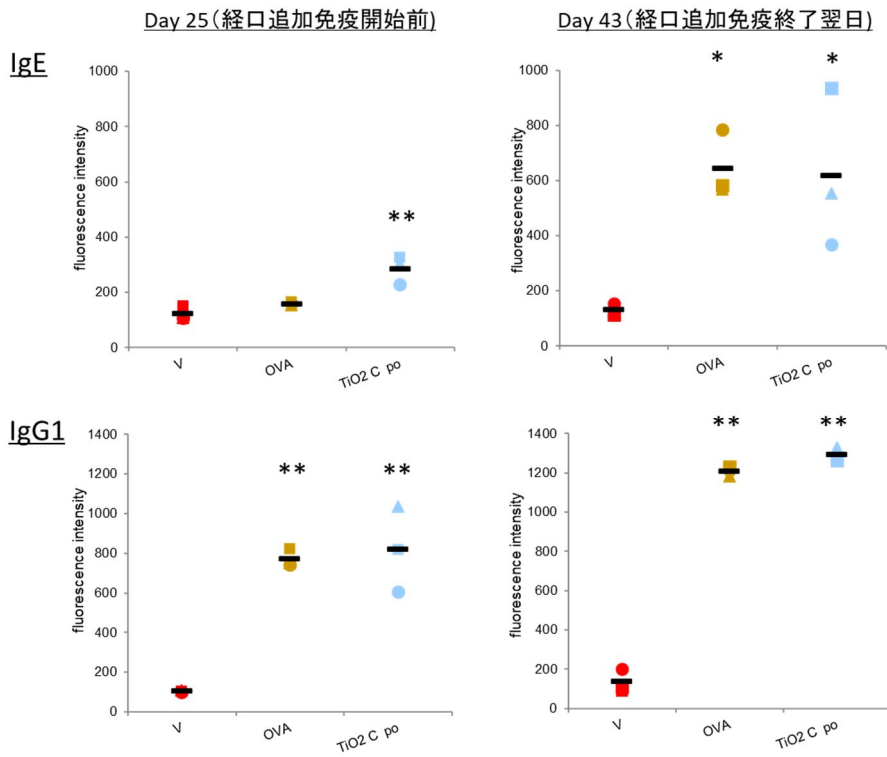
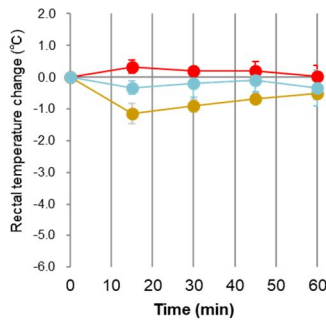


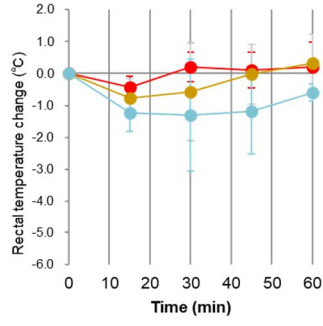
Figure 5 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生(【実験2】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group.

経口追加免疫

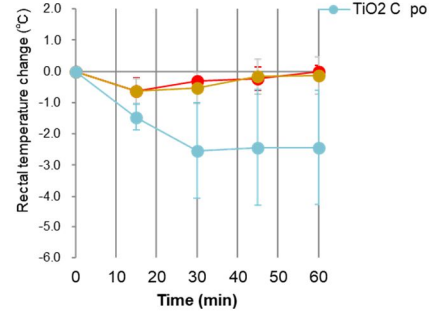
1回目



4回目



7回目



経口惹起

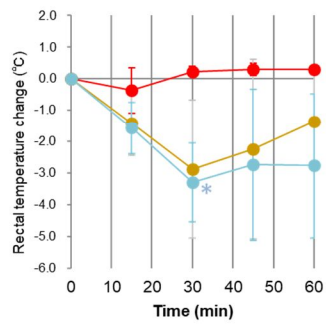
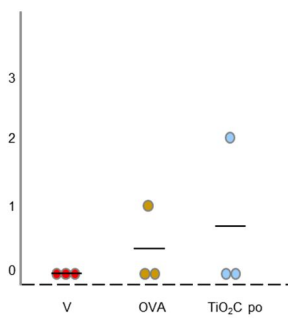


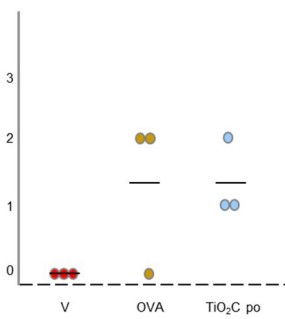
Figure 6 抗原経口投与後の体温低下(【実験2】)
*p<0.05 vs V group.

経口追加免疫

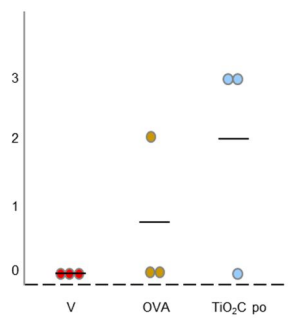
1回目



4回目



7回目



経口惹起

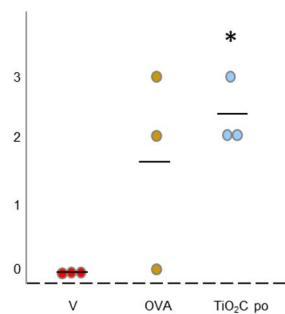


Figure 7 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング(【実験2】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。*p<0.05 vs V group.

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」
分担研究報告書（令和元年度）

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：大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官
研究協力者：井上 薫 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 第一室長

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を目的とする。令和元年度は欧州食品安全機関（EFSA）の科学ネットワーク主催による「2019年食品及び飼料中のナノテクノロジーのリスクアセスメントの年次報告」に関する調査を行い、これまでのEFSAガイダンスの技術的な実装と普及、および今後開発予定の規制製品についての補足的なテクニカルガイダンスの議論について調査した。また、フランス食品環境労働衛生安全庁（ANSES）による二酸化チタンの安全性に関する再度勧告と、それに対するEFSAのステートメントに関する調査を実施した。その結果、ANSESから再度勧告された食品添加物の二酸化チタン（E171）の安全性に関して、2017年のラットによる発がん性促進作用の可能性を示したE171の経口毒性に関する評価以後、25件の試験について文献レビューが実施された。幾つかの研究では、細胞生物学的な新しいシグナルの存在や酸化ストレスを介した*in vitro* 遺伝毒性を明らかにしたが、いずれもE171の潜在的な発癌促進効果を議論するには不十分であったとしている。また、マイクロプラスチックによる暴露に関する最新動向を調査した。2019年8月にWHOは「飲料水中マイクロプラスチック」に関する技術文章を公表し、現在の飲用水中のマイクロプラスチックの存在に関するデータは限られており、入手できる限られたエビデンスに基づくと、飲用水中のマイクロプラスチックに関連するヒトの健康に対する懸念は低く、プラスチック粒子、特にナノサイズの粒子の物理的ハザードに関連する毒性について確固たる結論を導くには情報が不十分であるとされていた。一方で市販のプラスチック製ティーバッグから過去に報告された他の食品よりも数桁高いマイクロプラスチックの放出が確認されるという報告もあった。これらのことから、ヒトの健康リスク評価に適したマイクロプラスチックとナノプラスチックの摂取と吸収後の運命に関するより深い研究が必要であると共に、食品や大気を含め様々な環境媒体を介した、より広範囲の環境からのマイクロプラスチックへの総合的な暴露の研究が必要であることを示しているものと考えられる。

A. 研究目的

近年、ナノマテリアルを用いた材料は、産業分野において消費者に幅広く利用されており、今後、更なる応用が期待されている。一方、ナノマテリアルの安全性に対する懸念は年々高まってきており、健康影響への可能性が指摘されている。しかし、現状では、ナノマテリアルの安全性や暴露などに関する科学的知見に乏しいことから、有害性に関する研究が積極的に進められている。一方、欧州連合では、ナノ材料の安全性のデータの届

出・登録の義務化への整備が進められており、米国においてもEPAを主体に規制および監視を検討している。ナノテクノロジーの応用により食品・食品容器分野においても積極的な利用が期待される一方で、マイクロプラスチックと同様にナノプラスチックの有害性も問題となってきている。また、食品添加物や食品サプリメントなどへの使用が増えてきているが、毒性学的評価などの科学的知見についての情報は依然不足している。令和元年度は、欧州食品安全機関（EFSA）の科学

ネットワーク主催による「2019年食品及び飼料中のナノテクノロジーのリスクアセスメントの年次報告」に関する調査、およびフランス食品環境労働衛生安全庁(ANSES)による二酸化チタン安全性に関する再度勧告と、それに対するEFSAのステートメントに関する調査を実施した。さらに、市販のプラスチック製ティーバッグについて文献調査を実施した。

B. 研究方法

欧州食品安全機関(EFSA)の科学ネットワーク主催による「2019年食品及び飼料中のナノテクノロジーのリスクアセスメントの年次報告」に関する調査を実施した。また、フランス食品環境労働衛生安全庁(ANSES)による二酸化チタンの安全性に関する再度勧告と、それに対するEFSAのステートメント(EFSA STATEMENT, 10 May 2019)に関する調査を実施した。さらに、プラスチックについて文献調査を実施した。

C. 研究結果

1. 2019年食品及び飼料中のナノテクノロジーのリスクアセスメントに関するEFSAの科学ネットワークの年次報告書

2019年Nano Network会議

食品および飼料分野におけるナノテクノロジーのリスクアセスメントの科学的ネットワーク(Nano Network)は、EFSAの加盟国との協力およびネットワーク化への構築に従い、EFSAアドバイザリーフォーラム(Advisory Forum: AF)によって2010年に設立されたものである。このNano Networkは、EFSAと加盟国間において情報や専門知識について交換することにより、加盟国間の対話の強化や、リスクアセスメントの原則について相互理解を図り、EUで実施される科学的評価の知識と信頼を向上していくことを掲げている。

今回、2019年Nano Networkの年次報告書では、Nano Networkの具体的な活動と成果について、一般市民、利害関係者、および研究コミュニ

ティへ提供するものであった。2019年の年次会議は、レギュラトリーサイエンス2019のナノテクノロジーおよびナノプラスチック

(GSR2019)のグローバルサミット(イタリア、9月)に組み込まれており、約30か国のリスクアセスメント機関との間で、レギュラトリーサイエンスの優先事項について世界的規模での議論が行われていた。本会議の目的は、EFSA Nano Networkが、ナノテクノロジー分野のレギュラトリーサイエンスの研究優先事項に関する国際的な議論や、ナノプラスチックによる新たなリスクを網羅するような研究ニーズに関する評価を議論するものであった。今回、ネットワーク議長のReinhilde Schoonjansより、本会議への期待およびGSGR2019の一部としての活動への統合について議論された。

以下、幾つかの論点について述べている。

- EFSA横断的作業部会(ccWG Nano)は、ナノテクノロジーに関するccWG Nanoの活動と、リスクアセスメントに関する科学的ガイダンス文書の更新と実施の状況について述べていた。中でもナノスケール内の小さな粒子で構成されている、若しくは、これらの粒子を含む可能性のある規制製品の評価に関して、幾つかのEFSAのユニットおよびパネルへ助言するものであった。具体的には、フッ化物修飾アルミナ、イノシトール安定化アルギニンケイ酸塩、バクテリアセルロース、第二鉄ナトリウムEDTA、またはオルトケイ酸とバニリンの複合体で処理された二酸化チタンの規制用途について示していた。
- 加盟国代表は、加盟国レベルでのリスクアセスメントに関するEFSAの科学的ガイダンスの利用状況へのフィードバックを実施したが、現時点では、まだ利用状況はかなり低いものであると強調していた。ネットワークでは、規制製品に関する申請書や書類を作成する際のガイダンスの推奨事項を

検討するために、申請者へのガイダンスの普及に向けて特に注意を払うべきであると述べている。従って、加盟国代表は、市場への新製品の参入を希望する当事者へのアウトリーチを継続するよう求めていくことを提唱した。

- José Tarazona は、ccWG Nano の支援を受けた EFSA と欧州委員会との対話後、EFSA は DG SANTE[欧州委員会 (EC) の保健衛生・食の安全総局 (Directorate-General for Health and Food Safety) から規制食品および飼料製品中のナノスケールの粒子の存在を定義するために技術的ガイダンスへの委任の承諾を伝えるものであった。また、議論中、規制 (EU) 2015/2283 に基づく工学的ナノ材料の定義は、食品香料、食品添加物、飼料添加物にも直接/間接的に適用され、新しい食品に加え、他の規制食品も対象とすることを示すものであった。EFSA の方針に沿って、技術ガイダンスの草案は、2020 年半ばに予定されている公開協議の対象となっている。ネットワークは、この活動への普及に貢献することが期待されており、公開協議中に意見やコメントを提供することが可能であると報告している。また、このような方針は、ネットワークの使命に沿って、2020 年のネットワークワークプランに含まれるものであった。
- 上記に示したように、José Tarazona は、APCRA の世界的なイニシアチブの下で開始されるナノファイバーに関するレギュラトリーサイエンスへの提案についても概説するものであった。消化管内のナノファイバーの動態を評価するための *in vitro* 手法に焦点を当てており、上皮細胞によるそのもの、または消化されたナノファイバーの取り込みについて、または血液への移動について網羅するものであると述べていた。このネットワークは、この活動およびこの分

野での NAM (New Approach Methodologie) の促進を目的とする他の活動について定期的に通知されることを述べていた。

- Reinhilde Schoonjans 議長は、2020 年の EFSA 作業計画について、ccWGNano の主要な活動については、科学的ガイダンスの最終化であり、また、DG SANTE からの委任を受けてパイロットフェーズからのすべての知見とその後の新しい補完的な技術的ガイダンスについて検討することが必要であると述べていた。

以上、Nano Network のメンバーは、年次 Nano Network 会議へ参加することにより、他国との専門的知識の意見交換や、各国家レベルでのリスクアセスメントに関する EFSA ガイダンスへの普及と、食品/飼料分野の特定の事例に関するガイダンスの実施へ貢献するものであった。さらに Nano Network のメンバーは、加盟国レベルで EFSA からの科学的情報や教育への定期的な普及と、利用者へのフィードバックアンケートを開始した H2020 研究プロジェクトへの貢献に期待されると結論付けている。

2. フランス食品環境労働衛生安全庁 (ANSES) による二酸化チタン安全性に関する再度勧告と、それに対する欧州食品安全機関 (EFSA) のステートメント

食品添加物 E171 は、主にナノ粒子形状の二酸化チタン(TiO₂)粒子として多様な食品に使われている。2017 年に実施された専門家評価以後、2019 年 2 月にフランス食品安全衛生局 (ANSES) は、E171 の経口毒性に関する最新の研究に関するレビューとその助言を更新するよう求められた。2019 年 4 月 15 日に ANSES は、利用可能な最新の科学研究について検討し、食品添加物の二酸化チタン (E171) の暴露に関するリスクについて意見を述べていた。さらに、欧州委員会は EFSA に対し、ANSES が発行

した意見に関する緊急の科学のおよび技術的支援を提供するよう要請するものであった。

ANSES の意見では、2017 年のラットによる発がん性促進作用の可能性を示した E171 の経口毒性に関する専門家による評価(NANOGUT 試験、Bettini 他、2016 年)を発表したが、当時 ANSES は、その試験で報告された効果について確認若しくは否定するような新たな毒性試験の実施の必要性を強調するものであった。さらに、E 171 の正確な物理化学的特性評価は、食品添加物のリスクアセスメントに必要な最初のステップとして認めるものであった。また、推奨事項においては、ナノ領域に含まれる食品添加物二酸化チタン (E 171) の粒子の割合について言及していた。

一方、欧州規則に従って食品添加物を評価する責任を負う欧州食品安全機関(EFSA)は、2016 年の E171 の評価において、生殖毒性のデータは一日摂取許容量(ADI)や最大量を設定するのに適切ではないと強調していた。従って、2016 年以後の 2017 年から 2019 年の間に公開された 25 件の新たな試験の文献レビューを実施した。幾つかの試験で、マウスの細胞生物学的メカニズムの変化や無脊椎動物の発達異常などの新しいシグナル、および酸化ストレスを介した *in vitro* の遺伝毒性効果について明らかにしたが、いずれも NANOGUT 試験で報告された E171 の潜在的な発癌促進効果を議論するには不十分なものであった。

以下、幾つかの試験調査について示されている。

➤ マウスの細胞生物学的メカニズムの変化 (発がん作用に関する研究)

ANSES の意見では、Unitane® (サイズ分布が指定されていないアナターゼ型の二酸化チタン) を用いた発がん性試験 NTP (1979 年) の研究結果に関する発がん作用の証拠の欠如について、ANS パネルの結論を認めていたが、試験物質の特性の欠如について言及する

ものであり、食品添加物の発がん性の評価に関する研究との関連性については、疑問視するものであった。

2016 年の EFSA の意見では、Unitane® で得られた研究結果に基づき E171 の発がん性は無いものと結論付けていた。しかし、Unitane® と E171 の物理化学的特性に関する類似性を保証するような情報記載はなかったと述べている。Urrutia-Ortega (2016 年) ら、Bettini (2017 年) らによって実験的に立証した E171 の潜在的な腫瘍促進の効果については、幾つかのバイオマーカー (異常陰窩巢 (ACF)、ムチン枯湯巢、ベータカテニン蓄積陰窩等) を含む新しい研究の実施により確認する必要があると述べている。Proquin (2018 年) らによって実施された研究において、E171 は癌の発生を促進するような生物学的メカニズムに影響を及ぼし、更に、アゾキシメタン (AOM) /デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 処理によって結腸の発がん性を促進させるものであったと結論付けていた。また、「TiO₂」緊急専門家評価グループ (GECU) は、7 日間の処理後のヒストンの発現レベルがエピジェネティックな変化の基となる可能性に注目していた。

➤ 発達障害に関する研究

ANSES は、無脊椎動物種の研究から二酸化チタン (E 171) の暴露後の発達異常の出現を報告するものであった (Jovanovic et al., 2018; Savic-Zdravkovic et al., 2018; Ma et al., 2019) 。

Jovanovic (2018 年) らは、分化メカニズムを研究するためのモデルとしてショウジョウバエを用いた多世代の研究を実施した。ショウジョウバエに関するこの研究の主な特徴として、ヒトへの暴露を想定する用量で E171 を摂取させた後に発達障害 (非遺伝的起源) の出現が認められた。また、ユスリカの幼虫の段階と発達障害の出現に関する Savic (2018

年)らの研究では、E171への暴露によって誘導される発達障害の出現が認められ、Jovanovic(2018年)らのショウジョウバエを用いた研究結果と一致するものであったと述べている。ANSESは、これらのモデルはヒト(哺乳類)との種間の外挿が困難であるために、食品添加物のリスクアセスメントとしては適さないという見解を認めている。しかし、その結果は、潜在的に悪影響を示すとして更なる調査の必要性について言及していた。この推奨事項は、Heringa et al(2016年)が強調している生殖器官への影響と内分泌攪乱に関する見解の欠如によって裏付けられると結論付けている。

➤ 酸化ストレスを介した遺伝毒性作用に関する研究

これまで、TiO₂粒子の遺伝毒性効果に関して多くの研究が実施されているが、Charles(2018年)らによるレビューでは、*in vitro* 遺伝毒性データを含む36文献において調査するものであった。その結果、特定のTiO₂(結晶性、サイズ、コーティング)との関連性を見出すことはできなかったが、遺伝毒性研究の60%が遺伝毒性の作用について報告する内容であった。このレビューでは、調査した殆どの文献で遺伝毒性作用は、酸化ストレスを介した二次的なメカニズムによって引き起こされたことを示すものであったと述べている。さらに、新たに調査した研究では、Charles(2018)らの結論を覆すものはなかったと結論付けている。

3. マイクロ・ナノプラスチックに関する調査

近年、プラスチックのゴミ、小さなプラスチックの破片に加えて、いわゆるマイクロプラスチックは主に海洋環境で検出され、さらに、淡水、土壌、空気中に存在する可能性があり、今日の知識に基づくと、限られた範囲の食品中に存在する可能性があるため、大き

な懸念となっている。関連する研究プロジェクトの数は増加しているが、マイクロプラスチックの検出と定量化のための適切で、検証された分析方法がまだ欠けており、それらのリスク評価を可能にするハザードと運命データが欠けていることを強調する必要がある。この状況のなか、2019年8月にWHOは「飲料水中マイクロプラスチック」に関する技術文章を作成し、現状におけるマイクロプラスチックによる健康影響への懸念について情報を整理すると共に、今後の課題についての提言を公表した。その文書における要旨を以下に示す。

➤ 環境水系における検出: マイクロプラスチックは環境中に遍在しており、海水、廃水、淡水、食品、空気、飲料水(ボトル水と水道水の両方)で検出されている。マイクロプラスチックは、多くの経路から淡水環境に入るが、それらの寄与を定量化するためのデータは限られている。限られた証拠から、飲料水中に含まれる一部のマイクロプラスチックは、水道水の処理および配水システムおよび/またはボトル水の瓶詰め由来する可能性があることが示されている。最近の文献の系統的レビューにより、いくつかの初期の結論を引き出すとすれば、淡水では、ポリマー種類による微小プラスチック粒子の頻度は、プラスチック生産量およびプラスチック密度と一致した。飲料水中のマイクロプラスチックを分析した研究(9件のみ)で、主な形状は破片と繊維であり、最も頻繁に検出されたポリマーは、ポリエチレンテレフタレートおよびポリプロピレンであった。

➤ 飲料水中マイクロプラスチックの健康懸念: マイクロプラスチックに関連する潜在的な危険性には、物理的危険性を示す**粒子**そのもの、**化学物質**(環境中の非結合モノマー、添加剤、および吸着化学物質)、および

バイオフィルムとして知られるマイクロプラスチックに付着して定着する可能性のある微生物の3つの形態がある。利用可能な限られた証拠に基づくと、飲料水中のマイクロプラスチックに関連する化学物質および微生物病原体は、ヒトの健康に対する懸念は低い。ナノ粒子の毒性に関する確固とした結論を引き出すための情報は不十分であるが、それが懸念であることを示唆する信頼できる情報もなかった。

- **粒子**：粒子の暴露による毒性は、サイズ、表面積、形状および表面特性、ならびに粒子の化学組成を含む物理的特性に依存する。摂取後のマイクロプラスチックの運命、輸送および健康への影響は十分に研究されておらず、摂取されたマイクロプラスチックに関する疫学的またはヒトの研究は確認されていない。毒性に関するデータベースは非常に限られており、いくつかの影響は生物学的クリアランス機構を圧倒するような非常に高い濃度でのみ観察されている。現時点では、飲料水を介したマイクロプラスチック粒子への暴露に関連した明白な健康上の懸念を示唆するデータはない。
- **化学物質**：マイクロプラスチックの疎水性性質は、疎水性残留有機汚染物質 (POPs) を蓄積する可能性を有することを意味するが、POPs は環境中の有機炭素に無差別に吸着するため、マイクロプラスチックに吸着される POPs の割合は、他の環境媒体と比較して小さいと考えられる。マイクロプラスチックに関連する化学物質への暴露に関連する潜在的健康リスクを評価するために、WHO は化学物質への高暴露と組み合わせたマイクロプラスチックへの高暴露を想定した保守的暴露シナリオを開発し、暴露マージン (MOE) アプローチを適用した。リスク評価から導かれた MOE は十分に保護的であることが判明し、極端なばく露状況であ

っても、飲料水の摂取による化学物質へのヒトのばく露に対する健康上の懸念は低いことが示された。

- **バイオフィルム**：飲料水中のバイオフィルムは、飲料水用のパイプやその他の表面で微生物が増殖する際に形成される。バイオフィルム中のほとんどの微生物は非病原性であると考えられているが、いくつかのバイオフィルムには、自由生活微生物や、緑膿菌・レジオネラ等の病原体が含まれている。バイオフィルムを形成する微生物は、親水性の表面よりも、プラスチックのような疎水性の非極性表面に速く付着する。淡水での限られた測定研究は、マイクロプラスチックが病原体の長距離輸送を可能にし、微生物間の抗菌耐性遺伝子の移動を促進する可能性を示しているが、飲料水中のマイクロプラスチック関連バイオフィルムによるヒトの健康リスクを示唆する証拠はない。

- **提言と研究の必要性**：

飲料水中のマイクロプラスチックの日常的なモニタリングは、ヒトの健康への懸念を示す証拠がないため、現時点では推奨されない。水安全計画の一環として、水供給事業者は、微粒子除去と微生物学的安全性のための水処理プロセスを最適化すべきであり、結果としてマイクロプラスチック粒子の除去も改善できる。しかし、淡水と飲料水中のマイクロプラスチックの発生源と発生状況、様々な水処理プロセスとその組み合わせの有効性、および処理廃棄物の流れからのマイクロプラスチックの環境への流入の可能性を理解するための研究を行うことが適切であろう。健康影響の可能性に関しては、ヒトの健康リスク評価に関連するプラスチック粒子の最も一般的な形態について、質の保証された毒性学的データが必要である。さらに、摂取後のマイクロプラスチックとナノプラスチックの取り

込みと運命に関するより良い理解が必要である。

市販のプラスチック製ティーバッグからのナノ粒子の放出(Environmental Science & Technology, Hernandez LM et.al., 53(21):12300-12310, 2019)

カナダのマギル大学の研究チームによって、プラスチック製の素材からなる4種のティーバッグについて、茶葉を取り出しカップに熱湯を注ぐと、マイクロ/ナノプラスチックと呼ばれる微小なプラスチック粒子が1袋につき百億も放出されるという最新の研究結果が報告された。この研究結果、単一のプラスチック製ティーバッグを95°Cの抽出温度に浸すと、マイクロプラスチックは約116億個、さらに小さいナノプラスチックは約31億個もの粒子が抽出液中に存在したことが明らかとなった。また、放出された粒子の組成解析は、ティーバッグの素材であるナイロンおよびポリエチレンテレフタレート(PET)と一致した。しかし、ナイロンとPETが分解してナノ粒子を形成するメカニズムは、まだ研究されていないと述べている。興味深いことに、この研究で用いた4種のティーバッグのうち2種から放出されたマイクロおよびナノ粒子は、同様の形状(球状)とサイズ分布:大きく(約50~100 μm)不均一なサイズと、サブミクロンの粒子(約10~400 nm)サイズを有していた。また、ティーバッグ別の2種から放出されるマイクロおよびナノ粒子も同様の形状(凝集体)とサイズ分布:小さな(約1~50 μm)不均一なサイズと、サブミクロンの粒子(50~600 nm)サイズを示していた。幾つかの研究で、食物連鎖で比較的低濃度のマイクロプラスチックを検出したという報告はあるが、この研究では、プラスチック製のティーバッグに入れたお茶を飲む際に摂取される可能性のあるプラスチックの量が、以前に他の食品で報告されたレベルよりも数桁高いものであったと報告されている。

D. 考察

2019年Nano Network会議においてReinhilde Schoonjans議長は、2020年にネットワークが科学的ガイダンスの最終化や技術的ガイダンスへの草案への任務を果たし、EFSAと加盟国との協力体制に貢献するきっかけとなることを提唱していた。今回の議論は、ナノサイエンスやナノテクノロジーのみならず「高度な材料」へのネットワークの関わりと、その範囲を広げていくための、将来に向けた予備的な提案について検討するものであった。これにより、多くの分野が新規素材の生産に統合されていく中で、得られた教訓を新規開発へ生かすことができると考えられた。

2017年にANSESによって発行された以前の推奨事項では、結腸における二酸化チタン(E171)の腫瘍促進能を調査するための新たな毒学的なデータに関して繰り返し述べるものであった。また、推奨事項には、複数のバイオマーカー(異常陰窩巣(ACF)、ムチン枯渇巣、ベータカテニン蓄積陰窩など)を統合するような、より長期的な暴露研究を含むものであり、二酸化チタン(E171)の腫瘍発生因子の可能性に関する調査への必要性についても繰り返し述べるものであった。ANSESの意見で「TiO₂」緊急専門家評価グループ(GECU)は、発達障害に関する研究で評価された内容は、ヒトが摂取する暴露レベルに置き換えることが困難であるため、ヒトへのリスクアセスメントとして考慮することはできないが、この研究で、発達障害に関するいくつかの警告を強調するものであったと述べている。*in vitro*試験の酸化ストレスの生成に関しては、食品用二酸化チタンがDNA損傷を引き起こすメカニズムの1つであると考えられ、2017年以降、E171の*in vivo*試験では1件のみ特定するものであった。ANSESの意見では、遺伝毒性活性と酸化ストレス生成の欠如を指摘するものであったが、この研究のプロトコルとの関

連性はなかったと述べている。また、二酸化チタンナノ粒子とDNA および/または紡錘体との直接的な相互作用を示すような研究報告はないが、遺伝物質または遺伝物質と相互作用するような他の分子に関する二酸化チタンナノ粒子の直接的な影響については排除できないと結論付けている。

マイクロプラスチックおよびナノプラスチックの主なヒト暴露経路の1つとして、経口摂取による可能性が高く、その可能性の一つとして、飲料水経路による暴露とそのリスクに対する見解が公表された。それによれば、マイクロプラスチックは環境中に広く遍在している他、水道水の処理および配水システムおよび/またはボトル水の瓶詰め由来などの、多くの環境経路から飲料水中に含まれる可能性が示された。利用可能な限られた証拠に基づく、飲料水中のマイクロプラスチックに関連する化学物質および微生物病原体は、ヒトの健康に対する懸念は低いく、ナノ粒子の毒性に関する確固とした結論を引き出すための情報は不十分であることがしめされた。一方で、市販のプラスチック製のティーバッグから過去に報告されたレベルよりも数桁高いマイクロ・ナノプラスチックの放出と、経口摂取の可能性があることが報告された。この報告に対して大手企業ではすでに材質の変更などで対策を講じており、実質的な懸念はなくなっているところではあるが、プラスチック製品に依存した現代社会では、いつでも起こりえるリスクであることも顕在化した。WHOの提言に示されているように、ヒトの健康リスク評価に関連するプラスチック粒子形態や、毒性データの収集と共に、摂取後のマイクロプラスチックとナノプラスチックの取り込みと運命に関する研究は必要であると考えられる。

E. 結論

EFSA Nano Network は、農業/食品/飼料製品中のナノ材料のリスクアセスメントに関する科学

的な情報を交換するためのプラットフォームとして機能するものであり、収集した情報については、効率的な方法へと変換していき、作業の重複を避けるために利用されることを述べていた。2019年の年次総会で、EFSAの横断的作業部会のメンバーおよび関連するEFSAスタッフと共に、19の加盟国代表が参加していた。参加者らは、EUの法律の策定、EFSAガイダンスの実施、および研究活動に関する最新情報を受け取るものであった。メンバーは、EFSAガイダンスの技術的な実装と普及、および欧州委員会(EC)のDG SANTE(保健衛生・食の安全総局)の委任に沿って開発される規制製品の補足的なテクニカルガイダンスについて引き続き焦点を当てていく予定であると結論付けている。

今回のEFSAの声明では、2019年4月に公表されたANSESの意見で、2016年と2018年のANSパネルでEFSAが発行した食品添加物の二酸化チタン(E171)の安全性に関する2つの科学的意見の結論を覆すような新しい発見を特定するものではなかった。また、最新のANSESの意見では、以前に特定された不確実性とのデータのギャップについて繰り返し述べるものであった。現在は、以前に実施されたEFSAの評価とその推奨事項から成るフォローアップ作業の状況の中で対処されていた。このフォローアップ作業に加えて、ANSESは*in vivo* 遺伝毒性の更なる調査を推奨について提唱していた。従って、EFSAは、現在進めている食品添加物二酸化チタン(E171)の物理化学的特徴についての作業完了後に、推奨事項の再検討の必要性があると結論付けている。

ナノプラスチックのヒト健康影響へのリスクについては、ナノプラスチックに関するヒトへの暴露と潜在的な毒性に関するデータの不足により、まだ予測には至らないものであった。しかし、ナノプラスチック粒子の取り込みの速度/潜在的な生物学的応答/生体への毒性メカニズムに関するこれまでの工業的ナノ粒子のナノ

毒物学的研究成果から、ヒトへの外挿性についてより深い議論が必要であることを示している。

F. 研究発表 (論文発表)

Miyazaki A, Watanabe S, Ogata K, Nagatomi Y, Kokutani R, Minegishi Y, Tamehiro N, Sakai S, Adachi R, Hirao T. Real-time PCR Detection Methods for Food Allergens (Wheat, Buckwheat, and Peanuts) Using Reference Plasmids.

J Agric Food Chem. 2019 May 15; 67(19): 5680-5686.

Landsiedel R., Gamo M. Hirose A. The Role of *In vivo* Screening Studies in Assessing Manufactured Nanomaterials, *In vivo* Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials, Takebayashi T., Landsiedel R., Gamo M. eds, In Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine, Springer (Springer Nature Singapore Pte Ltd), pp1-21, 2019, DOI:10.1007/978-981-13-8433-2

Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander TW., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid, M., Khaled AA., Takahashi S., Alexander BD, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitanate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration, Particle and Fibre Toxicology <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0316-2> 16:34, 2019.

Numano T., Higuchi H., Alexander D., Alexander W., Abdelgied M., Elgazzar AM., Saleh D, Takase H., Hirose A, Naiki-Ito A., Suzuki S., Takahashi S., Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats, Cancer Sci., 110 (8): 2485-2492, 2019

Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid M., Tsuda H., Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats, Arch. Toxicol., 93(4): 909-920, 2019

Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Elokke OM., Nasem AM., Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats, Arch. Toxicol., 93: 49-59, 2019

(学会発表)

J. Kanno, Y. Taquahashi, A. Hirose., Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials. EUROTOX 2019(55th Congress of the European Societies of Toxicology) (2019.9.10), Helsinki, Finland, Poster

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose, Jun Kanno., Improved Aerosol Generation Method and Newly Designed Whole Body Rodent Inhalation Apparatus for the Testing of Nanomaterials in Human-Relevant Exposure Scenario. 第15回国際毒性学会(ICT XV) (2019.7.16), Hawaii, USA, Poster

Y. Taquahashi, S. Yokota, K. Morita, M. Tsuji, Y. Hirabayashi, A. Hirose, and J. Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing (Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System). Society of Toxicology (SOT) 58th Annual Meeting (SOT2019) and ToxExpo, (2019.3.12), Baltimore, USA, Poster

前野 愛、坂本 義光、北條 幹、湯澤 勝廣、長谷川 悠子、長澤 明道、久保 喜一、安藤 弘、

海鋒 藤文、田中 和良、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、広瀬 明彦、中江大．多層カーボンナノチューブ（MWCNT）のラット気管内投与試験の生体内分布と呼吸器毒性における投与器具の比較．第 46 回日本毒性学会学術年会 2019.6.27（徳島）

Hojō M, Maeno A, Sakamoto Y, Onuki A, Hasegawa Y, Yuzawa K, Kubo Y, Nagasawa A, Ohnishi M, Goto Y, Suzuki T, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Nakae D. Clearance of multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation: a comparison of different instillation devices. 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019) 2019.9.10 (Helsinki, Finland)

坂本義光、広瀬明彦、中江大 Time course of histopathology and the status of involved humoral factors during the carcinogenesis of MWCNT in rats.第 78 回日本癌学会学術総会 2019.9.28（京都）

北條 幹、坂本 義光、山本 行男、前野 愛、多田 幸恵、長谷川 悠子、湯澤 勝廣、長澤 明道、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．MWCNT 誘発性のラット腹膜中皮腫発症過程における炎症および免疫関連因子に着目した病理組織学的解析．第 36 回日本毒性病理学会学術集会．2019.2.14（東京）

坂本 義光、北條 幹、前野 愛、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、広瀬 明彦、中江 大．多層カーボンナノチューブを反復気管内投与したラットにおける肺神経内分泌細胞（PNEC）の増生．第 36 回日本毒性病理学会

学術集会 2019.2.14（東京）

前野 愛、坂本 義光、北條 幹、湯澤 勝廣、長谷川 悠子、長澤 明道、大貫 文、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、後藤 裕子、大西 誠、小林 憲弘、広瀬 明彦、中江 大．異なる投与器具を用いた多層カーボンナノチューブ（MWCNT）のラット気管内投与試験における肺毒性と肺負荷量の比較．第 36 回日本毒性病理学会学術集会 2019.2.14（東京）

Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A, Yoshida H, Kurokawa M. Effects of double-walled carbon nanotubes on the early phase of respiratory syncytial virus infection in mice. 55th Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2019 Helsinki, Finland)

Nishimaki-Mogami T, Cui H, Soga K, Adachi R, Tamehiro N, Hachisuka A, Kondo K, Hirose A: Discovery of an inhibitor of multiwall carbon nanotubes-stimulated IL-1 β secretion via inflammasome activation (EUROTOX 2019) (September 2019 Helsinki, Finland)

大野彰子、渡邊昌俊、広瀬明彦．多変量解析手法を用いた二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状に基づく毒性評価への応用．日本薬学会第 140 年会 2020 年 3 月 27 日（京都）

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）

別添 5

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
Landsiedel R., Gamo M. Hirose A.	The Role of <i>In vivo</i> Screening Studies in Assessing Manufactured Nanomaterials, <i>In vivo</i> Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials	Takebayashi T., Landsiedel R., Gamo M. eds,	Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine	Springer Nature Singapore Pte Ltd	Springer	2019	1-21

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
Miyazaki A, Watanabe S, Ogata K, Nagatomi Y, Kokutani R, Minegishi Y, Tamehiro N, Sakai S, Adachi R, Hirao T	Real-time PCR detection methods for food allergens (wheat, buckwheat, and peanuts) using reference plasmids.	J Agric Food Chem	67(19)	5680-5686	2019
Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander TW., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid, M., Khaled AA., Takahashi S., Alexander BD, Tsuda H.	Carcinogenic effect of potassium octatitnate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration	Particle and Fibre Toxicology	16	34	2019

Numano T., Higuchi H., Alexander D., Alexander W., Abdelgied M., Elgazzar AM., Saleh D., Takase H., Hirose A., Naiki-Ito A., Suzuki S., Takahashi S., Tsuda H.	MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats	Cancer Sci.	110	2485-2492	2019
Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid M., Tsuda H., Takahashi S.	Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats	Arch. Toxicol.	93	909-920	2019
Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Elokke OM., Nasem AM., Tsuda H.	Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats	Arch. Toxicol.	93	49-59	2019

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴彦

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 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

3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部 部長

(氏名・フリガナ) 小川 久美子 (オガワ クミコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴彦

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター 病理部 室長
(氏名・フリガナ) チョウ ヨンマン (チョウ ヨンマン)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴彦

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 生化学部 第3室 室長
(氏名・フリガナ) 安達 玲子 (アダチ レイコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性予測評価部 部長
(氏名・フリガナ) 広瀬 明彦 (ヒロセ アキヒコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター 病理部 客員研究員
(氏名・フリガナ) 西川 秋佳 (ニシカワ アキヨシ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。