

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進研究事業

食品用途となるナノマテリアルの暴露による毒性評価に関する研究

(H29-食品-一般-003)

平成29年度 ～ 令和元年度 総合研究報告書

研究代表者 小川 久美子

令和2(2020)年 6月

目 次

I. 総合研究報告書

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
---	------	---

(資料) 【実験 A1-2】	Figure 1~13 Table 1~2	----	41
【実験 A3-4】	Figure 1~13 Table 1	----	48
【実験 A5】	Figure 1~8	----	55
【実験 A6-7】	Figure 1~11 Table 1~7	----	62
【実験 A8】	Figure 1~4 Table 1~2	----	72
【実験 A9-10】	Figure 1~5 Table 1~4	----	76
【実験 B1-3】	Figure A-H29-1~6 Table A-H29-1~2	----	82
【実験 B4-6】	Figure A-H30-1~8 Table A-H30-1~3		
【実験 B7-8】	Figure A-R1-1~7		

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	95
--------------------	-------	----

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)  
総合研究報告書(平成29年度～令和元年度)

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、毒性発現機序及び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。

**経皮経口暴露による免疫毒性におけるナノ銀のアジュバント効果に関する研究では、**

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証するため、雌性 BALB/c マウスを用いた卵白アルブミン(OVA)を感作物質として用いる評価系を研究分担者と協力し確立してきた。平成 29 年度から、皮膚暴露によるアジュバント作用の陽性対照候補としてコレラトキシンを用いた免疫毒性増強作用について、アナフィラキシーを確実に誘発する皮膚暴露・腹腔内投与惹起の系で検討を開始した。平成 30 年度の検討において、条件を最適化することによって OVA の皮膚暴露に対して、コレラトキシン及びコレラトキシン B サブユニットが感作を増強することを示し、本系でアジュバント作用を検出可能であることが明らかとなった。同時に、OVA の皮膚暴露に引き続いて OVA を複数回経口投与することによって、腹腔内投与をしなくてもアナフィラキシー反応が誘発されることを示した。令和元年度には、最終的に決定されたプロトコールに沿って誘発した OVA の経皮経口暴露による感作及びアナフィラキシー反応に対して、これまでの検討で最も毒性が強いと考えられた直径 10 nm の AgNP の同時暴露がアジュバント作用を示すか否か検討した。OVA の経皮経口暴露によって、OVA 特異抗原の産生及び経口投与による下痢や直腸温低下等が誘導されたが、AgNP の同時投与による増強作用は認められなかったことから、本モデル系において、AgNP はアジュバント作用を示さないと考えられた。本モデル系においては、小麦タンパク分解物も皮膚暴露で感作を誘導すること(平成 29 年度)、及び皮膚暴露による感作の判定に所属リンパ節の免疫染色によって Ki67 陽性の濾胞の割合(Ki67 陽性 2 次濾胞の数/濾胞の数 x 100 (%))が有用な指標となること(平成 29,30 年度)も示された。

**ナノ銀の腹腔内投与による急性毒性に関する研究では、**

これまでの研究において、我々はマウスに直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP を 0.2 mg 腹腔内投与したところ、AgNP 10 nm を投与した全動物のみにおいて 24 時間内の死亡又は瀕死例が認めら

れ、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死、脾臓のうっ血及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に観察され、その結果を報告した (Cho YM et. al., Toxicol Pathol.2018;31,73-80)。本研究においては、AgNP がサイズによって異なる毒性を示す機序をさらに検討した。平成 29 年度は表面積を同等とするため、直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP をそれぞれ 0.2 mg、1.2 mg 及び 2 mg 腹腔内投与したところ、投与 6 時間及び 24 時間後の肝臓中の銀濃度は 10 nm 投与群よりも 60 nm 及び 100 nm 投与群の方が高値あるいは高値傾向を示したにも関わらず、肝臓での毒性変化は 10 nm 投与群のみに観察され、表面積や重量よりも粒子径が小さいことが毒性を規定することが明らかとなった。合わせて、AgNP による活性酸素の影響を検討するため、抗酸化作用をしめす N-acetyl-l-cysteine、Vitamin C、Vitamin E をマウスに経口投与し、1 時間後に 10 nm の AgNP を腹腔内投与し影響を検討した。GSH の前駆体である NAC は AgNP の急性毒性を有効に抑制できたが、直接活性酸素類を消去する Vit C 及び Vit E は抑制を示さず、活性酸素種の発生のみでは毒性機序の説明はできなかつた。平成 30 年度は、表面修飾の影響を検討するためポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone, PVP) で表面修飾した直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm の AgNP を 0.2 mg 単回腹腔内投与し、その影響を検討した。その結果、直径 5 nm の AgNP PVP 投与群では、体温低下に加え、肝臓の肉眼及び病理組織学的検査において著しい変化が観察されたことから AgNP の急性毒性は PVP コートでは抑制されず、粒子のサイズに相関することが確認された。令和元年度は、AgNP の形状の影響を検討するため 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 0.2 mg 単回腹腔内投与による急性毒性を検討した。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つた。一方で、何れのサイズの AgNP PVP プレートでも、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。

**酸化チタン等の経皮 / 経口暴露による免疫毒性の解析では、**

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、及び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ついて検討した。今回用いた酸化チタン B (ルチル型、35 nm) 及び酸化亜鉛 B (35 nm)、酸化亜鉛 C (80nm) では、抗原 i.p. 時のアジュバント効果は見られたが、抗原経皮感作時の増強効果は見られなかつた。先行研究における結果と考え合わせ、ナノマテリアルの経皮感作増強効果は粒子径により異なり、粒子径が小さいナノマテリアルの方が経皮感作増強効果が大きいことが示唆された。酸化亜鉛については、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ところ、肝臓、腎臓、及び胸腺やリンパ節に影響を与える可能性が示された。また、これまでの経皮感作実験系と経口投与を組み合わせ、経皮感作後に複数回の経口追加免疫を行い、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、粒子径の小さいナノ酸化チタ

ン(アナターゼ型、粒子径 6 nm)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。本研究の結果は、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に影響を与えることを示すものであり、今後さらに科学的知見を集積することが重要である。

**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**では、

ナノマテリアルの食品関連分野を中心とした暴露状況やリスク評価に関する国際動向を調査すること目的とした。研究期間をとおして欧州食品安全機関(EFSA)が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワークおよび、食品接触材料の科学ネットワークに関する調査を行った他、H29年度は2011年のEFSAのリスクアセスメントに関するガイダンス改訂版の第1部、「ヒトおよび動物の健康」についての概要を調査すると共に、食品接触材料の科学ネットワークにおける容器等の印刷用インクに含まれるナノサイズの顔料に関する分析法や今後の評価指針等の方向性について調査した。H30年度は改訂版ガイダンスの実用性に関する議論と食品添加物および食品に添加する栄養源に関する科学パネルによる、二酸化ケイ素の再評価、ケイ酸カルシウム・ケイ酸マグネシウム・三ケイ酸マグネシウム及びタルクの再評価、銀ヒドロゾルの安全性および生物学的利用能に関する意見についての情報収集を行った。R1年度は、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のステートメントとマイクロプラスチックの経口曝露に関連してWHOの飲料水における技術文書などの調査を行った。

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

研究協力者: 五十嵐 智女

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 研究助  
手

## A. 研究目的

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては、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。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 の経皮曝露 (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曝露されるのみならず、消臭・殺菌剤として化粧品にも含まれており、皮膚からも曝露される。酸化チタンや酸化亜鉛は多くの日焼け止め製品に配合されており、ヒト皮膚と接触する頻度が非常に高い。その経皮曝露の影響に関しては、これまでに皮膚透過性試験や皮膚感作性試験等が行われているが、いずれも明らかな作用は認められていない。金属はアレルギーの原因となりうるが、一般に、銀やチタンのアレルギーとしての性質は低いとされている。しかし、経口曝露では免疫寛容が成立する物質でも、ナノ材料として経皮的に繰り返し曝露された後に、経口曝露されることにより、アレルギー反応が惹起される可能性や、他のアレルギー曝露に対してアジュバント効果を示す可能性の検討は十分ではない。

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。研究分担者である安達らは、即時型アレルギー誘発経皮感作モデル実験系を用いると、小麦タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因が経皮感作性に与える影響について解析ができ、被験物質をマウス皮膚曝露後に腹腔内投与によって惹起させると、所属リンパ節の腫大を伴うアレルギー反応を示す事を病理組織学的に見いだしてきた。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)。また、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材料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、これらのナノ材料が、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、経口及び経皮から曝露されるナノ材料について、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積することであり、このモデル系を進展させ、ナノ材料の経皮経口曝露による免疫毒性、特にアジュバント作用について検討することを目的とした。まず、マウスを用いて感作物質として卵白アルブミン (OVA)を経皮的に感作するモデル系でアジュバントの陽性対照候補物質であるコレラトキシンによって免疫毒性の増強作用が検出可能か検討し、次に、OVA の経皮曝露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確立したうえで、ナノ銀、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を評価することとした。

また、これまでの研究において、我々はマウスに直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP を 0.2 mg 腹腔内投与したところ、AgNP 10 nm を投与した全動物のみにおいて 24 時間内の死亡又は瀕死例が認められ、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死、脾臓のうっ血及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に観察され、その結果を報告した (Cho YM et. al., Toxicol Pathol.2018;31,73-80)。本研究においては、AgNP がサイズによって異なる毒性を示す機序について検討することとした。

さらに、ナノ材料の安全性に対する懸念は

年々高まってきており、健康影響への可能性が指摘されている。しかし、現状では、ナノマテリアルの安全性や曝露などに関する科学的知見に乏しいことから、有害性に関する研究が積極的に進められている。一方、欧州連合では、ナノ材料の安全性のデータの届出・登録の義務化への整備が進められており、米国においても EPA を主体に規制および監視を検討している。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。本研究では、ナノマテリアルの食品関連分野を中心とした曝露状況やリスク評価に関する国際動向を調査すること目的として、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」に関する調査を中心として、食品接触材料や既存の食品添加物および近年環境汚染で懸念となっているマイクロ・ナノプラスチックのリスク評価や曝露評価に関する情報を収集した。

## 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 A1】コレラトキシンのアジュバント作用**

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

OVA をアジュバントの陽性対照であるコレラトキシン (CT) 又はコレラトキシン B サブユニット (CTB) を混合して処置する群を設定し、感作及び惹起に関する比較を行った。

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

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とし、各群は以下の通りに構成した、① Vehicle 群、② OVA 群、③ OVA + CT 群、④ OVA + CTB (Figure 1)。

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

更に、全身状態観察、体重、脾臓重量、腋窩および鼠経リンパ節重量の測定を行った。病理組織学的検査は、脾臓、暴露皮膚局所、各所のリンパ節について実施し、リンパ組織については、リンパ球の増殖状態を検討した。

#### **【実験 A2】グルテン加水分解物の抗原性**

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

付近に調整したものをを用いた。

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

動物実験において、Day 25に行うアレルギー反応の惹起を感作抗原270 µgを用いて腹腔内投与して行う以外は、【実験 A1】と同様に実施した。

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

### 【実験 A3】コレラトキシン B サブユニットのアジュバント作用

コレラトキシン B サブユニット (CTB)のアジュバント陽性対照としての効果を検討するため、OVAをより高濃度のCTBと混合して処置する群を設定し、感作及び惹起に関する比較を行った。

抗原懸濁液はOVA (Sigma A5503-1g)を2 µg、CTB (LBL 103B)を各々1、5及び25 µg/50 µL/マウスとなるようリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)に加えて投与する前に調製した。

動物は、7週齢の雌性BALB/cマウスを日本エスエルシーより購入し、MF飼料を給餌した。1群の匹数は5匹とし、各群は以下の通りに構成した、① Vehicle 群、② OVA 群、③ OVA + CTB 1 µg 群、④ OVA + CTB 5 µg 群、⑤ OVA + CTB 25 µg (Figure 1)。

動物実験において、血中のOVA特異抗体に加えて総IgE及び総IgG抗体の測定及び脾臓細

胞の再刺激培地においてIL-13の測定以外は、【実験 A1】と同様に実施した。

### 【実験 A4】経皮経口暴露による評価系検討

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

動物は、7週齢の雌性BALB/cマウスを日本エスエルシーより購入し、MF飼料を給餌した。1群の匹数は5匹とし、各群は以下の通りに構成した、① PBS p.c.⇒i.g. (Vehicle)群、② OVA 腹腔内投与後強制経口投与 (OVA i.p.⇒i.g.)群、③ OVA 経皮投与後強制経口投与、追加免疫4回 (OVA p.c.⇒i.g.)群、④ OVA 経皮投与後強制経口投与、追加免疫7回 (OVA p.c.⇒i.g. long)群 (Figure 2)。

①、③及び④群は8週齢時に背面片側を剃毛し、実験1と同様に4週間経皮感作を行った。②群は実験4週目から2回 (1回/1週) OVAの腹腔内投与による感作を行った。実験6週目から①、②及び③群は4回/1週、④群は7回/2週の追加免疫を行った。実験6、7及び8週目に、血中のOVA抗原特異的IgE、IgG1及びIgG2a抗体並びに総IgE及び総IgGをELISA法で測定した。①、②及び③群は実験8週に、④群は9週目に、感作抗原100 mgを強制経口投与してアレルギー反応の惹起を行った。追加免疫及び惹起時、OVAの強制経口投与60分間後のマウスの直腸内体温変化及び下痢症状の観察を行い、下痢症状についてはFigure 12の基準に従ってスコアリングした。サイトカインの測定は実験1と同様に行った。

### 【実験 A5】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  $\mu$ g) 単独または OVA と AgNP (直径 10nm 49  $\mu$ g) 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  $\mu$ g) 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  $\mu$ g、AgNP は 49  $\mu$ g/50  $\mu$ L/mouse とし、経口追加免疫では OVA は 30 mg、AgNP は 50  $\mu$ g/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  $\mu$ L の抗原懸濁液を浸潤させ剃毛部に貼付した。パッチの上から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  $\mu$ 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度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  $\mu$ 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- $\gamma$  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 A6】ナノ銀のサイズと表面積の影響**

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

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌した。1 週間の馴化後、1 群の匹数は 5-6 匹とし、各群は以下の通りに構成した、① 溶媒対照 (Vehicle)6 時間群、② 10 nm AgNP 群、③ 60 nm AgNP 群、④ 100 nm AgNP 群。腹腔内投与 (2 ml /マウス)し、6 及び 24 時間後、2 時間の絶食後、深麻酔下で腹大動脈から採血後、放血し、解剖した (Figure 1)。

全身状態観察を行い、解剖前の体重及び投与 1、3、6 及び 24 時間後の体温を測定した。肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節、胃、小腸、大腸、胸腺、心臓、肺及び膵臓についてはホルマリン固定後、パラフィン包埋切片、HE 標本作製し、病理組織学的検討を行った。肝臓及び全血の凍結サンプルを採取し、ICP-MS を用いて銀濃度を測定した。

#### **【実験 A7】ナノ銀の毒性に対する抗酸化剤の影響**

動物実験は実験 1 と同様に実施した。Citrate

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

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

#### **【実験 A8】ナノ銀の毒性と表面修飾の影響**

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

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌した。1 週間の馴化後、1 群の匹数は 5-6 匹 (投与 6 時間後解剖群)又は 3 匹 (投与 24 時間後解剖群)とし、各群は以下の通りに構成した、① 溶媒対照 (Saline、Vehicle) 群、② 5 nm AgNP PVP 群、③ 10 nm AgNP PVP 群、④ 60 nm AgNP PVP 群、⑤ 100 nm AgNP PVP 群。単回腹腔内投与 (0.2 ml /マウス)し、6 及び 24 時間後、2 時間の絶食後、深麻酔下で腹大動脈から採血後、放血し、解剖した (Figure 1)。

全身状態観察を行い、解剖前の体重及び投与 1、3、6 及び 24 時間後の体温を測定した。肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節、胃、小腸、大腸、胸腺、心臓、肺及び膵臓についてはホルマリン固定後、パラフィン包埋切片、HE 標本作製し、病理組織学的検討を行った。

#### **【実験 A9】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 標本作製し、病理組織学的検討を行った。

#### **【実験 A10】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 RT<sup>2</sup> 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**

##### **試料及試薬**

被験物質としては、

酸化チタン B (ルチル型、粒子径 35 nm)

酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm)

酸化チタン D (アナターゼ型、粒子径 15 nm)

酸化亜鉛 A (粒子径 25 nm)

酸化亜鉛 B (粒子径 35 nm)

酸化亜鉛 C (粒子径 80 nm)

(全て表面未処理)

の 6 種のナノマテリアルを用いた。

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

薬は特級グレードのものを用いた。

### 酸化チタン及び酸化亜鉛ナノマテリアルの懸濁液調製

酸化チタン及び酸化亜鉛は、それぞれ 50 mg/mL の濃度で PBS に懸濁し、2.5 分間の超音波処理の後に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 B1】抗原の腹腔内投与による感作に対する酸化チタン及び酸化亜鉛の影響に関する検討**

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー(株)より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業(株))を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。各群の共存物質等の実験条件を Table A-H29-1 に示す。7 週齢時に、酸化亜鉛 A、B、及び酸化チタン D のそれぞれについて、OVA 20 $\mu$ g 及びナノマテリアル(2 mg あるいは 10 mg)を生理食塩水 300  $\mu$ L に懸濁し、腹腔内投与(i.p.)した (Day 0、1 次免疫)。陽性対照アジュバントとしては Alum(水酸化アルミニウムゲル(コスモ・バイオ(株))、2 mg)を用いた。14 日後(Day 14)に再度投与し(2 次免疫)、翌日(Day 15)に血液を採取して、血清中の OVA 特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。

### **抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタン及び酸化亜鉛の影響に関する検討 (【実験 B2, B3, B4】)**

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー(株)より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業(株))を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。実験全体のスケジュールを Fig. A-H29-1 に示す。また、各群の共存物質等の実験条件を Table A-H29-1、Table A-H30-1 に示す。8 週齢時に背面片側を剃毛し(Day 0)、翌日より 3 日間、OVA 溶液(1-2 $\mu$ g/50 $\mu$ L)、あるいは OVA 及び酸化チタン / 酸化亜鉛の混合懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った(Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリー」(鳥居薬品株式会社)を 2

cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 $\mu$ L の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し(Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1クールとし、4クールの感作後、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。アナフィラキシー反応の惹起は、Day 25 に OVA 1 mg/100 $\mu$ L を i.p.して行った。i.p.後 30 分間、マウスの直腸内体温を測定した。また、アナフィラキシー症状を観察し、Table A-H29-2 の基準に従ってスコアリングを行った。惹起 30 分後に麻酔下で採血し、血清中ヒスタミンの濃度を Histamine EIA Kit(SPI-BIO)にて測定した。

### **【実験 B5】酸化亜鉛ナノマテリアルの腹腔内投与による急性毒性に関する検討**

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー(株)より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業(株))を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。各群の実験条件を Table A-H30-1 に示す。実験は 7 週齢時に行った。酸化亜鉛 A、B、C それぞれ 10 mg を生理食塩水 300  $\mu$ L に懸濁し、腹腔内投与(i.p.)した。投与前、投与後 3 時間後及び 6 時間後に直腸温の測定、及び全身状態の観察を行った。体重測定及び採血の後解剖し、各臓器を摘出した。血液は遠心して血清を採取し、血液生化学検査を行った。検査項目は、TP:総タンパク、ALB:アルブミン、A/G:アルブミン/グロブリン比、BUN:尿素窒素、CRE:クレアチニン、Na、K、Cl、Ca、IP:無機リン、AST:アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ALT:アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP:アルカリホスファターゼ、 $\gamma$ -GT: $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ、T-CHO:総コレステロール、TG:中性脂肪、T-BIL:総ビリルビン、GLU:グルコースの 18 項目である。また、摘出した肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節、胸腺、心臓及び肺についてはホルマリン固定後、パラフィン包埋切片、HE 標本作製し、病理組織学的検討を行った。病理組織学的所見の発生頻度については、Fischer's

exact test による検定を実施し、いずれの検定も  $p < 0.05$  を有意とした。なお、図表中には \* 又は #  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  で有意差の程度を記した。

#### 【実験 B6】経口惹起実験系に関する検討

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー(株)より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業(株))を給餌した。予備検討として実施したので対照群は設定しなかった。1 群の匹数は 3 匹とした。各群の実験条件を Table A-H30-1 に示す。また、実験全体のスケジュールを Fig. A-H30-1 に示す。7 週齢時に、OVA あるいは OM 1 $\mu$ g と水酸化アルミニウムゲル (Imject Alum (ThermoFisher #77161))との混合懸濁液を腹腔内投与(i.p.)し(Day 0)、7 日後(Day 7)に再度投与して感作を行った。その後、Day 14, 16, 18, 21 に抗原 30 mg を経口投与(p.o.)し、追加免疫を行った。この時、絶食ありの群では、投与前 4 時間絶食させた。Day 0, 14, 22 には部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。Day 28 に OVA 100 mg あるいは OM 90 mg を経口投与し、アレルギー反応を惹起した。追加免疫及び惹起時の経口投与後 1 時間は、マウスの直腸温測定、及び下痢症状の観察を行い、下痢症状については Table A-H30-2 の基準に従ってスコアリングした。

#### 【実験 B7】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。予備検討として実施したので対照群は設定しなかった。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. A-R1-1 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 $\mu$ g/50 $\mu$ 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 $\mu$ 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 A-H30-2 の基準に従ってスコアリングした。

#### 【実験 B8】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 B1】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. A-R1-1 に示す。経皮感作時の OVA 用量は 2 $\mu$ g/50 $\mu$ 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、TiO<sub>2</sub>C po 群では、OVA 30mg と TiO<sub>2</sub> 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 B1】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/OVA 群を基準とした Dunnett の検定、あるいは Tukey-Kramer の検定を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。図中には、\* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$  で有意差の程度を示した。

(倫理面への配慮)

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

H29 年度から R 元年度までの各年に行われた欧州食品安全機関(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。H29 年度は食品接触材料に関する科学ネットワーク(Scientific Network of the food ingredients and food packaging (FIP) Unit on food contact materials (FCM))(第 5 回会議 2017 年 7 月開催)において、食品接触材料へのナノ粒子の敵に関する議題を調査した。H30 年度は「食品添加物および食品に添加する栄養源に関する科学パネル(EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food :ANS パネル)」より、ナノ成分を含有する既存物質:①二酸化ケイ素の再評価、②ケイ酸カルシウム・ケイ酸マグネシウム・三ケイ酸マグネシウム及びタルクの再評価、③銀ヒドロゾルの安全性および生物学的利用能に係る科学的意見書について調査を実施した。R 元年度は、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、マイクロプラスチックの経口曝露に関する最新動向について調査を実施した。

## C. 研究結果

### 経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について

#### **【実験 A1】コレラトキシンのアジュバント作用**

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

(Figure 3)。感作 4 週後のマウスにおいて、いずれの OVA 処置群でも、血中の OVA 特異的な IgG1 及び IgE が Vehicle 群と比較して有意に増加を示したが、CT 及び CTB 投与による影響は認められなかった (Figure 4)。また、いずれの OVA 投与群でも IgG2a の有意な変化は認めなかった。直腸内体温の変化については、惹起 10 分、20 分及び 30 分後、Vehicle 群と比較して全 OVA 群で統計学的に有意な体温の低下が認められ、OVA + CTB 群では惹起 5 分後から、体温の低下が示された (Figure 5)。30 分後に OVA 群、OVA + CT 群及び OVA + CTB 群では各々平均 3.2、4.4 及び 4.3 度の体温低下が認められた。体温が有意に低下した全ての OVA 処置群においては惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意に上昇していた (Figure 5)。惹起後 30 分間、アナフィラキシー症状をスコアリングした結果、全ての OVA 処置群でも平均 2.8 ~ 3.2 と統計学的に有意な高いスコア又は高い傾向のスコアであった (Figure 5)。抗原再暴露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を調べた結果、IL-2 においては、OVA + CT 群で Vehicle 群と比べ有意な増加が認められた (Figure 6)。IL-4、IL-5 及び IFN- $\gamma$  において、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 6)。皮膚病変のスコアリングを行った結果、OVA + CT 群で Vehicle 群と比較して有意な増加が認められた (Figure 7, Table 1)。OVA 群及び OVA + CTB 群で有意な増加はないものの、増加傾向を示した (Figure 7, Table 1)。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量については Vehicle 群と比較していずれの群においても有意な増加は認められなかった。一方、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の割合 (Ki67 陽性 2 次濾胞の数/濾胞の数 x 100 (%))については、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で有意な増加又は増加傾向が認められた (Figure 7)。

#### **【実験 A2】グルテン酸加水分解物の抗原性**

グルテンの酸加水分解物を 3 回作製し、BCA タンパク質アッセイにより、懸濁液上清の濃度を測定

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

暴露期間中の体重について、群間の差は認められなかったが、解剖時の脾臓の相対重量において、HWP 5.4 µg 群で有意な増加が示された (Figure 9)。感作4週後のマウスにおいて、HWP 5.4、27及び135 µg 群で、血中のHWP特異的なIgG1及びIgEがVehicle群と比較して有意に増加を示し、HWP 27及び135 µg 群で、IgG2aが有意に増加した (Figure 10)。直腸内体温の変化については、惹起20分及び30分後、Vehicle群と比較してHWP 27 µg以上の群で統計学的に有意な体温の低下が認められた (Figure 11)。30分後にHWP 5.4、27及び135 µg 群では各々平均0.4、2.0及び2.8度の体温低下が認められた (Figure 11)。体温が低下したHWP 5.4、27及び135 µg 群においては惹起30分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意な上昇又は上昇傾向を示した (Figure 11)。惹起後30分間、アナフィラキシー症状をスコアリングした結果、全てのHWP処置群でも平均1.4~3.0と統計学的有意な高いスコア又は高い傾向のスコアであった (Figure 11)。抗原再暴露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を調べた結果、何れのサイトカインにおいても、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 12)。皮膚病変のスコアリングを行った結果、HWP 5.4、27及び135 µg 群でVehicle群と比較して有意な増加が認められた (Figure 13、Table 2)。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量についてはVehicle群と比較してHWP 135 µg 群で有意な増加が認められた (Figure 13)。一方、細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す

濾胞の割合 (Ki67陽性2次濾胞の数/濾胞の数 x 100 (%))についても、Vehicle群と比較してHWP 5.4、27及び135 µg 群で有意な増加が認められた (Figure 13)。

### 【実験A3】コレラトキシンBサブユニットのアジュバント作用

暴露期間中の体重及び解剖時の脾臓の相対重量について、群間の差は認められなかった (Figure 3)。感作4週後のマウスにおいて、いずれのOVA処置群でも、血中のOVA特異的なIgG1及びIgEがVehicle群と比較して有意に増加を示し、IgG1がCTB群でOVA群と比較して有意な増加・増加傾向を示した (Figure 4)。また、いずれのCTB処置群でも、血中の総IgE及び総IgGがVehicle群と比較して有意な増加を示し、OVA + CTB 25 µg 群でOVA群と比較して有意な増加を示した (Figure 5)。また、OVA + CTB 25 µg 群でIgG2aの有意な高値が認められた。直腸内体温の変化については、惹起5分、10分、20分及び30分後、Vehicle群と比較して全OVA群で統計学的に有意な体温の低下又は低下傾向が認められ、OVA + CTB 1 µg 群及びOVA + CTB 25 µg 群では惹起5分後から、OVA + CTB 5 µg 群では惹起20分後から、体温の低下が示された (Figure 6)。30分後にOVA群、OVA + CTB 1 µg 群、OVA + CTB 5 µg 群及びOVA + CTB 25 µg 群では各々平均1.6、3.1、2.6及び3.6度の体温低下が認められた。体温が有意に低下したOVA群、OVA + CTB 1 µg 群及びOVA + CTB 25 µg 群で惹起30分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意に上昇し、OVA + CTB 5 µg 群では上昇傾向が見られた (Figure 6)。惹起後30分間、アナフィラキシー症状をスコアリングした結果、全てのOVA処置群でも平均2.6~3.0と統計学的に有意な高いスコア又は高い傾向のスコアであった (Figure 6)。抗原再暴露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を調べた結果、IL-2及びIL-17において、OVA + CTB 1 µg 群で、IL-5において、OVA + CTB 25 µg 群で、Vehicle群と

比べ有意な増加が認められた (Figure 7)。IL-4、IFN- $\gamma$  及び IL-13 において、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 7)。皮膚病変のスコアリングを行った結果、すべての CTB 投与群で Vehicle 群と比較して有意な増加が、OVA 群と比較して増加傾向が認められた (Figure 8、Table 1)。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量については Vehicle 群と比較していずれの群においても有意な増加は認められなかった。一方、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の割合 (Ki67 陽性 2 次濾胞の数/濾胞の数  $\times$  100 (%)) については、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で、OVA 群と比較して OVA + CTB 5  $\mu$ g 群及び OVA + CTB 25  $\mu$ g 群で有意な増加が認められた (Figure 8)。

#### 【実験 A4】経皮経口暴露による評価系検討

暴露期間中の体重及び解剖時の脾臓の相対重量について、群間の差は認められなかった (Figure 9)。実験 6 週目及び 7 週目のマウスにおいて、OVA p.c. $\Rightarrow$ i.g 群及び OVA p.c. $\Rightarrow$ i.g long 群で、血中の OVA 特異的な IgG1 及び IgE が各時点の Vehicle 群と比較して有意に増加を示し、実験 7 週目のマウスにおいて、OVA i.p. $\Rightarrow$ i.g 群で、IgG1 が有意に増加した (Figure 10)。また、実験 6 週目のマウスにおいて、OVA p.c. $\Rightarrow$ i.g 群で、Vehicle 群と比較して総 IgE 及び総 IgG の有意に増加を示し、実験 7 週目のマウスにおいて、OVA p.c. $\Rightarrow$ i.g 群及び OVA p.c. $\Rightarrow$ i.g long 群で総 IgE、OVA i.p. $\Rightarrow$ i.g 群で総 IgG の有意な高値が認められた (Figure 11)。直腸内体温の変化については、群間の差は認められなかった (Figure 12)。惹起後 60 分間、下痢症状をスコアリングした結果、OVA i.p. $\Rightarrow$ i.g 群及び OVA p.c. $\Rightarrow$ i.g long 群で Vehicle 群と比較して有意な高値を示した (Figure 12)。OVA i.p. $\Rightarrow$ i.g 群は追加免疫 3 回目から、OVA p.c. $\Rightarrow$ i.g long 群は追加免疫 5 回目から明らかな下痢スコアの高値が認められた (Figure 12)。抗原再暴露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を調べた結果、IL-4

及びにおいて、OVA i.p. $\Rightarrow$ i.g 群及び OVA p.c. $\Rightarrow$ i.g long で、IL-5 において、OVA i.p. $\Rightarrow$ i.g 群で、Vehicle 群と比べ有意な増加が認められた (Figure 13)。IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-17 及び IL-13 において、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 13)。

#### 【実験 A5】ナノ銀のアジュバント効果

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。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. $\rightarrow$ OVA i.g 群及び OVA p.c. $\rightarrow$ 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. $\rightarrow$ 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. $\rightarrow$ OVA + AgNP i.g 群及び OVA + AgNP p.c. $\rightarrow$ 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. $\rightarrow$ OVA i.g 群よりも軽度であり、特に OVA + AgNP p.c. $\rightarrow$ 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. $\rightarrow$ 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. $\rightarrow$ OVA i.g 群で IgE 及び IgG1 の有意な増加が見られ、OVA p.c. $\rightarrow$ 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。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- $\gamma$  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 A6】ナノ銀のサイズと表面積の影響**

AgNP 10 nm 群の 1 匹で投与 6 時間後より立毛が認められたが、何れの群においても 24 時間後まで有意な体温低下は認められなかった (Figure 3)。AgNP 投与 6 時間後の解剖時、AgNP 10 nm 群の肝臓は暗赤色調を呈していた (Figure 4)。投与 6 時間後の解剖時にすべての AgNP 投与群の腸間膜で僅かに認められた暗褐色顆粒は、投与 24 時間後の解剖時になると多く観察された (Figure 4)。何れの群においても相対肝臓重量の変化は観察されなかった (Figure 5)。病理組織学的には、投与後 6 時間、AgNP 10 nm

群で、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及び胆嚢の浮腫が有意な高頻度に認められた (Figure 6、Table 2)。腹膜における黒褐色色素沈着はすべての AgNP 投与群で高頻度に観察された (Table 2)。投与後 24 時間、病変における群間の変化は認めなかった (Table 3)。肝臓中の銀濃度において、AgNP 60 nm 6 時間及び 24 時間解剖群、並びに AgNP 100 nm 24 時間群で各々の vehicle 群及び AgNP 10 nm 群と比べて有意に高い値を示した (Figure 7)。血中の銀濃度において、すべての AgNP 6 時間群及び AgNP 60 nm 24 時間群で有意に高い濃度を示した (Figure 7)。

#### **【実験 A7】ナノ銀の毒性に対する抗酸化剤の影響**

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

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

#### 【実験 A8】ナノ銀の毒性と表面修飾の影響

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

5 nm AgNP PVP 群において、投与 3 時間後から有意な体温低下が認められた (Figure 2)。100 nm AgNP PVP 群において、AgNP 投与 24 時間後に僅かながら低温低下が認められた (Figure 2)。何れの群においても相対肝臓重量の変化は観察されなかった (Figure 2)。投与 6 時間後の

解剖時、5 nm AgNP PVP 群の肝臓及び脾臓は暗赤色調を呈していた (Figure 3)。投与 6 時間後の解剖時にすべての AgNP 投与群の腸間膜で僅かに認められた暗褐色顆粒は、投与 24 時間後の解剖時には、より多く観察された (Figure 3)。病理組織学的には、投与後 6 時間、5 nm AgNP PVP 群で、肝臓のうっ血、類洞内細胞数増加、肝細胞の空胞化、胆嚢の浮腫及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に認められ、10 nm AgNP PVP 群の全例で、肝臓類洞内の黒褐色色素沈着が、一部で核分裂像が見られた (Figure 4、Table 1)。腹膜における黒褐色色素沈着はすべての AgNP 投与群で高頻度に観察された (Table 1)。投与後 24 時間、病変における群間の変化は認めなかった (Table 2)。

#### 【実験 A9】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

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、腎臓の再生尿細管および心臓心外膜の鉍質沈着が散見された。

#### 【実験 A10】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、Ccrp, 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 B1】抗原の腹腔内投与による感作に及ぼす酸化チタンの影響に関する検討

酸化亜鉛及び酸化チタンナノ材料が免疫応答に及ぼす影響を検討するため、まず、動物実験における最も基本的な感作方法として、OVA の腹腔内投与による感作を実施し、その際にナノ材料を共存させることにより、そのアジュバント効果について検討した。(アジュバントとは、抗原と一緒に投与され、その抗原性を増強するために用いられる物質である。)酸化亜鉛 A, B どちらも、10 mg 投与群(OVA-ZnOA\_H 群、OVA-ZnOB\_H

群)では、投与翌日までに 5 匹全匹が死亡した。また、酸化亜鉛 A 2 mg 投与群(OVA-ZnOA\_L 群)では 1 次、2 次免疫のそれぞれ翌日に 1 匹ずつ死亡した。2 次免疫翌日(Day 15)の血清中の抗原特異的 IgE, IgG1 及び IgG2a 抗体産生を Fig. A-H29-2 に示す。IgE 及び IgG1 は Th2 細胞優位な免疫応答(アレルギーを含む)の際に産生される抗体であり、一方、IgG2a は Th1 細胞優位な免疫応答の際に産生される抗体である。OVA 腹腔感作時に陽性対照アジュバントとして Alum を使用した群(OVA-ALUM 群)では、抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体産生については、OVA のみを投与したアジュバント不使用群(OVA 群)と比較して増大していたことから、Alum の Th2 細胞優位な免疫応答を誘導するアジュバントとしての効果が確認された。OVA 腹腔感作時に酸化亜鉛 2 mg を共存させた場合(OVA-ZnOA\_L 群、OVA-ZnOB\_L 群)、IgE については、酸化亜鉛 A, B ともに OVA 群に対して有意な抗体産生の増大が見られた。IgG1 についても増大が見られ、酸化亜鉛 B の場合は有意に増大していた。また IgG2a についても、酸化亜鉛 A, B ともに OVA 群に対して有意な抗体産生の増大が見られた。一方、酸化チタン D を共存させた場合は、IgE, IgG1 産生とともに高用量群(OVA-TiO2D\_H 群)で OVA 群に対して有意な増大が見られた。IgG2a に関しては有意な増大は見られなかった。これらの結果から、今回実験に用いた 3 種のナノ材料は全て、OVA の i.p.感作を増強することが示された。また、酸化チタン D は Alum と同様に Th2 細胞有意な免疫応答を誘導したが、酸化亜鉛 A, B では IgG2a の産生も見られ、また i.p.による毒性も見られたことから、酸化亜鉛と酸化チタンではその生体影響が異なることが示された。

##### 抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタン / 酸化亜鉛の影響に関する検討【実験 B2, B3, B4】

近年、加水分解コムギタンパク質を含有する洗顔石鹸の使用によるコムギアレルギー発症事例のように、タンパク質が皮膚から取り込まれて抗原と

なる経皮感作経路がアレルギー発症の重要な要因として注目されている。そこで先行研究では、抗原の経皮的な感作時に酸化チタンあるいは酸化亜鉛ナノマテリアルを共存させた場合の影響について検討した。

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

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

#### **【実験 B2】酸化チタン B の共存効果**

Fig. A-H29-3 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。OVA 群では IgE、IgG1 の産生が見られた。酸化チタン B を共存させた群では、OVA 群と比較して抗体産生の有意な増大は見られなかった。なお、IgG2a に関しては、全ての群において産生は見られなかった。

4 週間の経皮感作後に、抗原の i.p.によるアナフィラキシー（能動的全身性アナフィラキシー）反応の惹起を行った。惹起後 30 分間、直腸内体温の測定、及びアナフィラキシー症状のスコアリングを行った。また、惹起 30 分後の血清中のヒスタミン濃度を測定した。結果を Fig. A-H29-4 に示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、OVA 群では V 群と比較して直腸温が平均 3.5°C 低下していた。酸化チタン B を共存させた群では、OVA 群と比較して体温低下の増強は見られなかった。B には惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。OVA 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度が増大する傾向が見られた。酸

化チタン B を共存させた群では、OVA 群と比較してヒスタミン濃度の増大は見られなかった。C には惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果を示す。OVA 群では V 群と比較してスコアの大きな増大が見られた。酸化チタン B を共存させた群では、OVA 群と比較してスコアの増大は見られなかった。これらの結果から、酸化チタン B は OVA 経皮感作を増強しないことが示された。

#### **【実験 B3】酸化亜鉛 B の共存効果**

Fig. A-H29-5 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。OVA 群では IgE、IgG1 の産生が見られたが、酸化亜鉛 B を共存させたすべての群で、OVA 群と比較して抗体産生の増大は見られなかった。なお、IgG2a に関しては、全ての群において産生は見られなかった。

続いて Fig. A-H29-6 にはアナフィラキシー反応惹起後の結果を示す。惹起後 30 分間の直腸内体温の変化(A)について、30 分後、OVA 群では V 群と比較して平均 3.9°C 低下していた。酸化亜鉛 B を共存させた群では、OVA 群と比較して体温低下の増強は見られなかった。惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度(B)について、OVA 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度が増大していた。酸化亜鉛 B を共存させた群では、OVA 群と比較してヒスタミン濃度の有意な増大は見られなかった。惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリング(C)について、OVA 群では V 群と比較してスコアの大きな増大が見られた。酸化亜鉛 B を共存させた群では、OVA 群と比較してスコアの増大は見られなかった。これらの結果から、酸化亜鉛 B は OVA 経皮感作を増強しないことが示された。

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

#### **【実験 B4】酸化亜鉛 C の共存効果**

Fig. A-H30-2 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。IgE 及び IgG1 は Th2 細胞優位な免疫応答(アレルギーを含む)の際に産生される抗体であり、一方、IgG2a は Th1 細胞

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

4 週間の経皮感作後に、抗原の i.p.によるアナフィラキシー（能動的全身性アナフィラキシー）反応の惹起を行った。惹起後 30 分間、直腸温の測定、及びアナフィラキシー症状のスコアリングを行った。また、惹起 30 分後の血清中のヒスタミン濃度を測定した。結果を Fig. A-H30-3 に示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、OVA 群では V 群と比較して直腸温が平均 2.7°C 低下していた。酸化亜鉛 C を共存させた群では、OVA 群と比較して体温低下の有意な増強は見られなかった。B には惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。OVA 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度が増大する傾向が見られた。酸化亜鉛 C を共存させた群では、OVA 群と比較してヒスタミン濃度の有意な増大は見られなかった。C には惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果を示す。OVA 群では V 群と比較してスコアの有意な増大が見られた。酸化亜鉛 C を共存させた群では、OVA 群と比較してスコアの有意な増大は見られなかった。これらの結果から、酸化亜鉛 C は OVA 経皮感作を増強しないことが示された。

#### 【実験 B5】酸化亜鉛ナノ材料の腹腔内投与による急性毒性に関する検討

酸化亜鉛ナノ材料が免疫応答に及ぼす影響を検討するため、29 年度には、動物実験における最も基本的な感作方法として、OVA の i.p.による感作を実施し、その際にナノ材料を共存させることにより、そのアジュバント効果について検討した。（アジュバントとは、抗原と一緒に投与され、その抗原性を増強するために用いられる物質である。）その結果酸化亜鉛による感作増強作用が認められたが、その際、酸化亜鉛 A、B どちらも、10

mg 投与群で投与翌日までに 5 匹全匹が死亡し、また、酸化亜鉛 A 2 mg 投与群では 1 次、2 次免疫のそれぞれ翌日に 1 匹ずつ死亡した。このように、酸化亜鉛の i.p.により急性毒性が見られ、その際粒子径による違いが見られたことから、30 年度においては、酸化亜鉛の急性毒性に関する検討を行った。酸化亜鉛 A、B、C を 10 mg/匹にて i.p.し、3 時間後及び 6 時間後に直腸温測定、採血、解剖による臓器採取を行った。Fig. A-H30-4 に直腸温測定結果を示す。酸化亜鉛投与群では経時的な体温低下が見られ、酸化亜鉛 A、B、C 投与群でそれぞれ 3 時間後には平均 5.8°C、7.8°C、4.7°C 低下、6 時間後には平均 9.5°C、11.0°C、10.0°C 低下したが、酸化亜鉛の粒子径による違いは見られなかった。Fig. A-H30-5-1 には、血液生化学検査において Vehicle 群との間に有意差があった項目の測定結果を示す。尿素窒素、ALT、グルコースは Vehicle 群と比較して増大しており、かつ酸化亜鉛 A、B では C と比較してより増大していた。一方ナトリウムは、Vehicle 群と比較して低下しており、かつ酸化亜鉛 A、B では C と比較してより低下していた。カリウム、無機リン、AST、ALP、総コレステロール、及び中性脂肪は Vehicle 群と比較して増大し、一方塩素は Vehicle 群と比較して低下していた。総タンパク、アルブミン、アルブミン/グロブリン比、クレアチン、Ca、総ビリルビンに関しては、Vehicle 群と酸化亜鉛投与群との間に有意差は見られなかった。なお、 $\gamma$ -GT に関しては全ての検体で検出限界以下であった。

病理組織学的解析の結果を Table A-H30-3 及び Fig. A-H30-5-2 に示す。ナノ酸化亜鉛投与 3 時間及び 6 時間後、すべてのナノ酸化亜鉛投与群及び ZnO-A 6 h 群で、それぞれ胸腺皮質及び髄質のアポトーシスが Vehicle 群と比較して有意な増加を示した。又、群間の有意な差は認められなかったが、ナノ酸化亜鉛投与群でのみ胆嚢の浮腫並びに胸腺リンパ節の褐色色素及び無構造物質の沈着が認められた。一方、肝臓、腎臓及び脾臓においては、被験物質による明らかな所見は認められなかった。

### 【実験 B6】経口惹起実験系に関する検討

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

各群の実験条件を Table A-H30-1 に示す。また、実験全体のスケジュールを Fig. A-H30-1 に示す。抗原としては OVA 及び OM を用い、2 回の i.p.の後に p.o.にて 4 回の追加免疫を行い、その後、p.o.にてアレルギー反応を惹起した。Fig. A-H30-6 には血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。OVA では i.p.のみでも抗体産生が見られるが、p.o.追加免疫によって特に IgE 産生が増大した。OM では i.p.による抗体産生は OVA と比較して少なく、p.o.追加免疫の効果が明確に見られた。(なお、通常 Vehicle 群では、IgE、IgG1 の蛍光値はそれぞれ 100 及び 50 程度である。)

次に、p.o.追加免疫、及び p.o.惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果を示す (Fig. A-H30-7, 8)。追加免疫 1、2 回目では体温低下、下痢症状ともほとんど見られなかったが、追加免疫 3、4 回目、及び p.o.惹起時には、OVA 投与群で体温が低下し、また、OVA 投与群、OM 投与群の両方で下痢症状が見られた。(なお、通常の Vehicle 群での体温変動は OM 投与群での変動とほぼ同様である。)これらの結果から、抗原の i.p.感作後に p.o.追加免疫を行うことにより、最終的に p.o.によりアレルギー反応を惹起することが可能であることが示された。

### 【実験 B7】経皮感作-経口惹起実験系に関する検討

実験 6 では、抗原腹腔内投与後の経口投与により、ある程度の体温低下や下痢症状が見られた。引き続き、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. A-R1-1 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. A-R1-2 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. A-R1-3, 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 B8】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マテリアル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 (TiO<sub>2</sub>C 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. A-R1-1 に示す。

Fig. A-R1-5 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. A-R1-6, 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、TiO<sub>2</sub>C 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、TiO<sub>2</sub>C 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 TiO<sub>2</sub>C 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 TiO<sub>2</sub>C 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

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

H29 年度は、2017 年の EFSA 科学ネットワーク会議で議論された「食品および飼料連鎖におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーのリスクアセスメントに関するガイダンス: 第 1 部、ヒトおよび動物の健康」の概要についての調査を行った。このガイダンスは、2011 年に作成したガイダンスの発表以降に得られた新しい知見を考慮に入れている。ガイダンスは、ナノ物質の物理化学的特性、暴露評価、およびハザード特性に関するより多くの洞察

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

H30 年度は、このネットワーク会議で議題となった EU 加盟国内の活動報告について調査した。EFSA ではガイダンスにおいて主要な論点となるナノマテリアルの定義として範囲を含む粒径や物理化学的特性評価をどのような方法論で測定するかについて、電顕による測定を含む複数の測定系の必要性が議論されていた。特に消化管内での粒子分布や溶解性の測定は腸管吸収性に関連して安全性評価の問題としての重要性を改めて示している。いくつかの加盟国では、ガイダンスに基づいて検証した酸化チタン (E171) と銀 (E174) 中のナノサイズ粒子の割合についての市場調査や曝露推定などの検証を行っていることやナノ粒子の腸管毒性および肝臓毒性を決定する要因を研究するための細胞への取り込みや害性発現経路 (AOP) の解明に関するプロジェクトが行われていることが報告されていた。

2019年の年次ネットワーク会議は、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)に組み込まれて開催された。

GSRS2019では約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、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した。いくつかの論点としては、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、ナノスケール粒子を含む可能性のある規制製品(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等)の評価に関して、EFSA内のユニットおよびパネルへ助言の必要性。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では、現時点でまだ利用状況はかなり低いものであったこと。EFSAが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の技術的ガイダンスの作成を依頼され、草案のパブコメが2020年半ばに予定されていること。化学物質のリスク評価に最新の評価手法(NAM: New Approach Methodologie)を規制に利用するための世界的な取組であるAPCRA(Accelerating the Pace of Chemical Risk Assessments)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の報告もあった。

➤ **食品接触材料の科学ネットワークにおける容器等の印刷用インクに含まれるナノサイズの顔料の評価等の方向性**

印刷インキは通常、溶媒、高分子バインダー、添加剤、および着色成分の4つの主要成分からな

り、ほとんどが着色成分として顔料を含む。印刷されたインク膜の高い光沢および高い透明性を達成するためには、顔料粉末中の凝集物および凝集物を分割して細かく分散させると共に、分散させた顔料粒子を安定させなければならない。乾燥した印刷インキフィルムは、通常1~1.5 $\mu\text{m}$ の厚さであるが、埋め込まれた粒子の全ては、通常、1 $\mu\text{m}$ よりかなり小さい。実際には、すべての印刷インキはナノオブジェクトを含む。液体印刷インキサンプルのレーザー回折分析による分散有機顔料上の粒子分布の測定は、印刷インキ中の顔料が<100nmの範囲に相当なパーセンテージを含むことを証明している。また、走査電子顕微鏡(SEM)でも<100nmの範囲の粒子を確認できる。レーザー回折分析の結果は、平均粒子サイズとしてCu-フタロシアニンについて80~90nmであり、二酸化チタンについて200~300nmであった。小板状のアルミニウム顔料は、30~40nmの平均厚さを有するため、ナノ材料としても明確に考慮する必要がある。

一方、EuPIA(European Printing Ink Association)ではまだ評価に生物学的試験を導入していないが、将来的には取り込むべきであることを示すと共に、インクの移行量が10ppbを超えると予想される場合には、物質の評価申請書をドイツおよびスイス当局に申請することを業界に推奨している。ナノフォーム顔料に関する活動については、EuPIAはドイツのペイントとインク協会「German Paint and Ink Association」が、ナノスケールの顔料粒子の食品パッケージの印刷層から食品への移行挙動の分析「ドイツ連邦栄養農業省(BMEL)とBfRとの間で議論が行われていることを紹介した。

➤ **食品添加物としての二酸化ケイ素(E 551)の再評価**

H30年度にEFSAは、ANSパネル(EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food)が行った食品添加物として使用される際の二酸化ケイ素(E 551)の安全性を再評価するための科学的意見について公表した。これまで二酸化ケイ素(E551)は体内に吸収

されにくいものと考えられていたが、一部の組織からケイ素含有物質が検出された報告があった。また、ナノ二酸化ケイ素を用いた亜慢性毒性試験、生殖毒性試験、発生毒性試験において有害影響を示さず、遺伝毒性に関する懸念はないと報告されている。しかし、二酸化ケイ素(E 551)中にはナノ粒子が存在している可能性があることから、従来のナノ粒子を含んでいない慢性毒性試験の結果を、現行の二酸化ケイ素(E 551)の成分規格に適合する試料に外挿して推定することはできないとした。一方、利用可能なデータベースに基づくと、報告されている使用方法と使用量では、二酸化ケイ素(E551)の毒性を示す兆候は認められなかったとしている。しかし、利用可能なデータベースが限られており、現行の ADI を「設定不要」という状況については承認せず、二酸化ケイ素(E551)の EU の規格を一部変更するよう勧告するよう結論付けている。

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

これまでケイ酸カルシウム(E 552)、ケイ酸マグネシウム(E 553a(i))、及びタルク(E 553b)の遺伝毒性、発生毒性は無く、また、三ケイ酸マグネシウム(E553a(ii))は、何十年にも亘り、最大 4g/人/日の高用量で使用されているにも関わらず、欧州連合(EU)加盟国共有の医薬品副作用情報データベースには腎臓への影響に関する症例について報告されていないものの、ラットの実験で、ケイ酸カルシウム(E552)由来のケイ素の蓄積が報告されていることや、ケイ酸塩類及びタルク(E553b)の亜慢性及び慢性毒性、発がん性、及び生殖毒性に関する信頼できるデータがないことを考慮すると、食品添加物として使用されるケイ酸塩類(E 552、E553a(i)、E553a(ii))及びタルク(E553b)の安全性について評価することはできないと結論付けている。結論的には、ANS パネルは、ケイ酸塩類(E552、E553a(i)、E553a(ii))及びタルク(E551)のグループ ADI にメカニズム的根拠は無く、1991

年に SCF が設定したグループ ADI は時代に即さないものであると位置づけられと共に、ADI を設定することが出来なかったと結論づけている。

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

サプリメントに栄養目的で添加される銀源としての銀ヒドロゾルの安全性と生物学的利用能に関する科学的意見書を公表した。粒子サイズ分析に関する情報は、この材料がナノ範囲にあることを示したが、ナノ材料の評価のための特性評価は提供されておらず、どのナノ特性が評価にデータを必要とするかを確かめることは不可能であった。また、経口投与量は胃からの消失試験の結果として示されており、銀の全身吸収に関する情報は提供されていなかった。ANS パネルは、提出されたデータは、食品サプリメントに栄養目的とする銀の供給源とした銀ヒドロゾルの食品添加物に加えることへの安全性だけでなく、生物学的利用能の評価に対しても不十分なものであるとして結論づけている。

➤ **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**

2019年にANSESは、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(2017年)に関連し、それ以後の調査を行い、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の遺伝毒性効果に関する情報などから、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があったが、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かった。ANSESの意見としては遺伝子や遺伝子と相互作用するような他の分子に対して二酸化チタンナノ粒子が直接的な影響を示す可能性については排除できないと結論付けており、発がん性の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。

一方、EFSA は、2016 年の E171 の評価において、生殖毒性のデータ不足から一日摂取許容量(ADI)や最大量を設定するのに適切ではないとしており、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るとしている。

#### ➤ 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し、今後の課題への提言や研究の必要性として以下の様に述べている。

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としている。

## D. 考察

### 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 A1】コレラトキシンのアジュバント作用**

平成 29 年度の条件においては、陽性アジュバント物質として検討した CT 及び CTB については明らかなアジュバント効果を示さなかった。それ以前に、CT を用いた検討では明らかなアジュバント作用を認めており、再現性及び濃度依存性など更なる検討が必要であると考えられた。CT 群の OVA 抗原特異的 IgE 及び IgG1 値が OVA 群に比べ増加傾向はあったものの、有意な増加を示さなかったことから、OVA の濃度の最適化が必要と考えられた。

#### **【実験 A2】グルテン酸加水分解物の抗原性**

大きな話題になったある特定の小麦タンパク質加水分解物 (グルパール 19S) を含有する洗顔石鹸 (茶のしづく石鹸: 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た問題で、当所生化学部で確立された本モデルを使用し、グルパール 19S による経皮感作性が証明された (Adachi R et al., Allergy. 2012; 67,1392-1399)。健康問題になっているグルパール 19S のような小麦タンパク加水分解物、HWP を用いて、OVA に代わる抗原物質としての有効性を検討した。小麦タンパク、グルテンの酸加水分解 0.5 時間の SDS-PAGE のパターンは 100 kDa 以下に広くスメアなパターンを示したが、酸加水分解 0 時間の SDS-PAGE のパターンより高分子の産生も認められた。一般的にペプチド結合の加水分解に関して、酸性条件では可逆反応であり、逆反応が進行する可能性があるため、一旦生成したペ

ブチド鎖がまた別のペプチド鎖と結合し、鎖長の長い新たなアミノ酸配列が出現する可能性が考えられる。OVA の場合、2 µg という低濃度で抗原性を示すが、今回検討した HWP も 5.4 µg で抗原性を示し、経皮感作性試験の抗原としての有効性が認められた。更に、惹起時の抗原濃度が OVA を用いた実験の約 30%に過ぎなかったにも関わらず HWP 27 µg 以上の群で明らかなアナフィラキシー反応を示した。皮膚病変においても、HWP 5.4 µg 以上の群で有意に高いスコアを示した。以前検討したグルパール 19S に比べ、HWP は弱いながら皮膚毒性を有する可能性等が考えられる。皮膚毒性を示さず、かつ抗原性を維持する濃度の検索が必要と考えられた。

#### 【実験 A3】コレラトキシン B サブユニットのアジュバント作用

平成 30 年度の実験条件においては、経皮感作性試験における CTB の陽性アジュバントとしての有効性が明らかとなった。

平成 26 年度に行った皮膚感作性試験のアジュバント陽性対照の検討において、Alum は明らかなアジュバント効果を示さなかった。Alum は分子量が大きいことで表皮を通過し、皮膚暴露によるアジュバントの陽性対照としては不適切と推測された。一方、CT は消化管の粘膜においては、アジュバント作用が示されており、経口ワクチンのアジュバントとして期待された(Holmgren J et al., *Vaccine*. 1993;11,1179-1184)。27 年度に CT の経皮感作性試験におけるアジュバント陽性対照物質として検討した結果、検討したすべての濃度 (0.1–10 µg)で OVA 特異的抗体の有意な増加が認められ、CT は有効な陽性対照アジュバントであることが明らかとなった。しかし、CT は毒物であり、購入・保管・使用・廃棄に制限が多いことから、無毒な陽性対照が望ましい。CT は有毒な CTA と無毒な CTB で構成されており、CTB は有望なアジュバントとして期待されていることから (Stratmann T, *Vaccine (Basel)*. 2015; 3,579-596)、CTB を用いた検討を行った。平成 29 年度の検討では、1 µg

CT と同じモル数に相当する、0.7 µg を投与したが、明らかなアジュバント作用は認められず、それまでの検討で CT がアジュバント効果を示したのは 0.3 µg の CTA による影響が否定できなかった。平成 30 年度は、より高濃度での検討で CTB の陽性アジュバントとして有効性を検討した。CTB 処置によって IgE 値に変化はなかったが、濃度依存性はないものの IgG1 値及び僅かに濃度依存性を示す IgG2a 値の増加が認められ、総 IgE 及び総 IgG の値が CTB の濃度依存的に増加したことから、CTB 処置は、Th2 細胞のみならず、Th1 細胞による免疫にも関与している可能性が考えられた。更に、摘出した脾細胞を ova で再刺激したところ、サイトカイン IL-2 及び IL-17 の分泌量が多いことから、CTB 処置によって Th1 細胞に加え、Th17 細胞の関与も検討する必要があると考えられた。細胞毒性を示さないとされている CTB の処置による皮膚病変スコアの高値及び Ki67 陽性を示す濾胞の高い割合も Th2 細胞以外の免疫毒性経路の活性が推測された。CTB の経皮処置によって Th1 細胞からサイトカイン INF-γ の産生並びに処置した表皮や真皮における樹状細胞の集簇が報告されている (Anjuère F dt al., *J Immunol*. 2003;170, 1586-1592)。

#### 【実験 A4】経皮経口暴露による評価系検討

OVA の経皮投与と追加の経口投与によって感作及びアレルギー症状の惹起を示し、本条件での経皮感作経口惹起系は有効であることが明らかとなった。

ある特定の小麦タンパク質加水分解物 (グルパール 19S)を含有する洗顔石鹸 (茶のしずく石鹸: 医薬部外品)の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告された問題で、当所生化学部で確立された本モデルを使用し、グルパール 19S による経皮感作性が証明された (Adachi R et al., *Allergy*. 2012; 67,1392-1399)。このモデルに改良を加え、OVA を抗原とした経皮感作経口惹起試験モデルの開発を試みた。Muto ら (*Int Immunol*. 2014;26,539-549)の報告を参考

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

#### 【実験 A5】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。

#### ナノ銀の腹腔内投与による急性毒性について

##### 【実験 A6】ナノ銀のサイズと表面積の影響

AgNP の表面積を考量した投与量による検討に  
おいて、AgNP 10、60 及び 100 nm の表面積は  
各々 55.1、9.4 及び 5.4 m<sup>2</sup>/g であることから  
AgNP 60 及び 100 nm 群の投与量は AgNP 10  
nm 群の各々 6 及び 10 倍に設定した。投与 6 時  
間後、何れの AgNP 投与群でも体温の低下及び  
明らかな臨床症状は見られなかった。また、AgNP  
10 nm 群で肝臓における肉眼病変及び肝臓並び  
に胆嚢における病理組織学的変化が認められた  
が、28 年度までの検討で観察された変化より弱い  
病変であった。28 年度までの検討において、  
AgNP の投与量は 300 µl/マウスであったが、今  
回の検討では被験物質の納品時の濃度から全群 2  
ml/マウスで行うことになった。27 年の研究から

Balb/c マウスに AgNP の急性毒性は少なくとも AgNP 10 nm 0.02 mg 以上が必要と考えられたが、今回の結果から、AgNP の急性毒性は総暴露量のみならず、暴露濃度によっても影響を受ける可能性が考えられた。また、AgNP 10 nm 群では肝臓及び胆嚢の病変が Vehicle 群に比べ有意に高頻度に認められたが、その 6 及び 10 倍の量を投与した AgNP 60 及び 100 nm 群の肝臓及び胆嚢において、AgNP による病変は認められなかったことから、AgNP の毒性はサイズ依存性であることが示唆された。

肝臓及び血中の銀濃度について、AgNP 投与後の肝臓中の銀濃度は AgNP 10 nm 群より投与量の多かった AgNP 60 及び 100 nm 群で 6 時間及び 24 時間まで高い濃度に達し、維持したが、2 群間の平均値に大きな差がなかったことから、腹腔内投与したナノ銀が肝臓内に蓄積可能な量には限界があることが示唆された。又、肝臓内の銀濃度と病変には相関がないことから AgNP の急性毒性は粒子のサイズに相関することが再確認できた。今回の検討で用いた ICP-MS は金属イオンのみを検出できることから、肝臓内に存在する AgNP が粒子のままなのか、イオン化したのかは不明である。28 年度の結果から AgNP 溶液の超遠心上清における銀濃度は、AgNP 10 nm 群で 60 及び 100 nm 群に比べ高い値を示し、AgNP のサイズによるイオン化の違いが示唆された。AgNP の毒性がナノ粒子によるものなのか銀イオンによるものなのかについても議論が続いている (Reidy B et. al., Materials. 2013;6,2295-2350) AgNP の毒性は AgNP の大きさのみならず (Park MVDZ et. al., Biomaterials. 2011; 32,9810-9817)、表面化学成分、電荷、コーティングの有無、凝集性及び動物実験での投与経路によって影響を受ける可能性が示唆されている。一方、AgNP 10 nm 群の肝臓内濃度は経時的な減少がみられ、60 及び 100 nm 群と異なる動態を示した。AgNP の急性毒性は肝臓内蓄積量より初期暴露量及び粒子のサイズに相関することが明らかとなった。毒性が投与濃度によって観察されにくくなる問題について

はさらなる検討が必要と考えられた。

#### **【実験 A7】ナノ銀の毒性に対する抗酸化剤の影響**

AgNP の急性毒性における様々な抗酸化剤の影響を調べたところ、NAC を除く何れの投与群でも明らかな抑制作用は認められなかった。直接活性酸素類を消去する Vit C 及び Vit E よりも GSH の前駆体である NAC の方が AgNP の急性毒性を有効に抑制された。NAC は 28 年度の研究においても同様の結果を示した。NAC のみではあるが、抗酸化剤の投与によって AgNP による毒性が著しく抑制されたことは、少なくとも一部は酸化ストレスによる AgNP の毒性メカニズムの関与を支持する結果と考えられた。また、GSH 合成抑制剤である BSO による毒性亢進作用も観察されなかった。BSO は GSH 生合成に重要な役割を果たす酵素である  $\gamma$ -グルタミルシステインシンターゼを阻害することにより、GSH 欠損を誘導し、細胞内プロセスにおける GSH の役割を検討するために用いられる (Drew R et. al., Biochemical Pharmacology. 1984;33,2989-2994)。平成 29 年度の検討で認められた AgNP の急性毒性は 26 ~ 28 年度までの検討で認められた臨床症状などに比して弱い傾向はあるものの、病理組織学的検討において、同様の病変が観察された。臨床症状及び病理組織病変の強弱は被験物質のロット差等も考慮が必要と考えた。

#### **【実験 A8】ナノ銀の毒性と表面修飾の影響**

平成 30 年度は、高分子化合物、PVP で表面修飾した AgNP の急性毒性について、AgNP (直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg) で腹腔内投与を行い、その影響について検討した。

AgNP の毒性がナノ粒子によるものなのか銀イオンによるものなのかについて議論が続いている (Reidy B et. al., Materials. 2013;6,2295-2350)。AgNP の毒性は AgNP の大きさのみならず (Park MVDZ et. al., Biomaterials.

2011;32,9810-9817)、表面化学成分、電荷、コーティングの有無、凝集性及び動物実験での投与経路によって影響を受ける可能性が示唆されている。ナノマテリアルの高い分散性及び安定性のため、クエン酸、PVP、シリカ、1-ドデカンチオール及びアミノ化による表面修飾が行われている (<https://nanocomposix.com>)。我々は今までクエン酸修飾 AgNP を用いて研究を行ってきたが、表面修飾の異なる AgNP を用いて様々な検討が行われている。PVP で修飾した AgNP がラットの脳細胞に細胞毒性を誘発し、それには粒子のサイズ及び形態に依存した炎症の誘発と考えられ、*in vitro*の結果ではあるが、AgNP の毒性におけるサイズによる違いについて一致した結果がほうこくされた (Trickler WJ et. al., Toxicol Sci. 2010;118,160-170)。また、クエン酸又は PVP に表面修飾した AgNP をラットに気管内注入を行った結果、PVP 修飾 AgNP はクエン酸修飾 AgNP に比較して、BALF 中の マークロファージ中の銀は急速に減少し、肺組織からも迅速に排泄されていたことから、AgNP の表面修飾によって体内分布及び排泄の違いを誘発する可能性が示唆されている (Anderson DS et. al., Nanotoxicology. 2015;9,591-602)。

AgNP は酸性状態でイオン化が早まることが知られており、PVP はそのもの自体が弱い酸性を示すことから、40 nm 以下の PVP 修飾 AgNP はイオン化が早いとの報告がある (<https://nanocomposix.com/pages/stability-and-shelf-life-of-small-pvp-silver-nanoparticles>)。これまで、クエン酸修飾 AgNP は投与 6 時間後まで死亡例は認められていないが、今回の検討において PVP 修飾 AgNP は投与 4 時間後から死亡例が認められ、強い毒性を示した。しかし、同じ 10 nm の AgNP において、クエン酸修飾 AgNP 投与群でのみ急性毒性が認められ、PVP 修飾 AgNP 投与によって毒性は認められなかった。考えられる理由としては、PVP 修飾によって細胞内分布に制限が生じた可能性が推測できる。実際、10 nm AgNP PVP 投与群で肝臓の類洞内黒褐色色素

の沈着が認められたものの、病変は殆ど認められなかった。10 nm AgNP PVP 投与群の一部で認められた、核分裂像はクエン酸修飾 60 nm AgNP 投与群においても認められた病変であり、細胞の明らかな病変を示さないが、防御反応との関連が疑われる。何れの実験でも、検討したサイズの中で最小の AgNP で強い毒性が認められ、サイズが小さい程、強い毒性を示す、我々の今までの報告と一致した結果が得られた。修飾の異なる両物質の毒性メカニズムは大きく異なることは無いと思われるが、PVP 修飾 AgNP の狭い安全域及び毒性強度の違いに関する詳細な研究が必要と考えられた。

#### 【実験 A9】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ともう結節状のリンパ球集簇巣が 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とも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 A10】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。

### **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の検討を行う。

**【実験 B1】**抗原 i.p.時のアジュバント効果について検討した。抗原 i.p.時に酸化亜鉛 B(35 nm)を共存させたところ、感作を増強する効果が見られた。また、先行研究において使用した酸化亜鉛 A(25 nm)及び酸化チタン D(アナターゼ型、15 nm)についても、i.p 感作を増強する効果が見られた。先行研究では、この他に、酸化チタン A(ルチル型、15 nm)、酸化チタン B(ルチル型、35 nm)、酸化チタン C(アナターゼ型、6 nm)についてもこのような増強効果があることを示している。従って、酸化チタン、酸化亜鉛等のナノマテリアルは、抗原 i.p.による感作においてアジュバント効果を示すことが明らかとなった。但し、酸化亜鉛の i.p.では急性毒性が認められた。酸化亜鉛 A, B の高用量群(10 mg 投与)では、1 次免疫の翌日までに各群 5 匹全匹が死亡し、酸化亜鉛低用量群(2 mg 投与)では感作期間中に 5 匹中 2 匹が死亡した。酸化チタンではこのような急性毒性は見られなかった。酸化亜鉛 A の方が酸化亜鉛 B と比較してより強い毒性が見られたことから、粒子径が小さい方が強い毒性を示す可能性が考えられた。また、酸化チタンを共存させた場合は、Alum と同様に OVA 特異的 IgE 及び IgG1 の産生が増強され、IgG2a 産生は見ら

れなかったのに対し、酸化亜鉛を共存させた場合は IgG2a 産生の増強効果も見られた。これらの結果から、酸化亜鉛と酸化チタンでは生体影響が異なることが示された。これは化学的特性の違いを反映しているものと考えられる。

**【実験 B2、B3、B4】**酸化チタン B、酸化亜鉛 B、C について、抗原経皮感作に対する影響に関して検討した結果、経皮感作を増強する効果は見られなかった。先行研究では、酸化チタン C(アナターゼ型、6 nm)、酸化チタン A(ルチル型、15 nm)、及び酸化チタン D(アナターゼ型、15 nm)の共存により経皮感作が増強されること、また、酸化チタン C が最も強い増強効果を示すことが明らかとなっている。これらの結果、及び本研究における酸化チタン B の結果より、酸化チタンの経皮感作増強効果は粒子径により異なり、粒子径が小さい酸化チタンの方が経皮感作増強効果が大きいことが示された。また、酸化亜鉛の場合も、先行研究において、酸化亜鉛 A(25 nm)では経皮感作を増強する傾向が見られていることから、酸化チタンの場合と同様に、この増強効果は粒子径に依存している可能性が示唆された。

**【実験 B5】**29 年度の検討において、酸化亜鉛の i.p.時に急性毒性が見られ、かつこの毒性が粒子径に依存している(粒子径が小さい方が毒性が強い)傾向があったことから、30 年度は、酸化亜鉛の i.p.による急性毒性に関して検討した。マウス 1 匹当たり酸化亜鉛 10 mg を i.p.したところ、6 時間後には 10 度前後の体温低下が見られた。3 時間後の時点では酸化亜鉛 A、B と比較して酸化亜鉛 C では体温低下の度合いが小さい傾向が見られたが、全体としては粒子径による明確な差は無かった。血液生化学検査の結果からは、腎機能の指標である尿素窒素や肝機能の指標である AST、ALT、ALP が酸化亜鉛投与により増大すること、かつ、尿素窒素及び ALT では、酸化亜鉛 A、B の方が酸化亜鉛 C と比較してより大きく増大していることが示された。従って、酸化亜鉛は肝臓や腎臓の機

能に影響を与えていることが示唆された。また、病理組織学的解析において、酸化亜鉛投与群で認められた胸腺皮質及び髄質のアポトーシスは、被験物質による他のリンパ組織の萎縮などの明らかな免疫抑制作用が認められなかったことから、具体的なメカニズムは不明であるが、被験物質による物理的又は化学的刺激に起因した変化と考えられる。また、胸腺リンパ節では褐色色素及び無構造物質の沈着が認められたことから、腹腔内投与した被験物質はリンパ循環したと考えられた。

**【実験 B6】**経皮感作-経口惹起実験系の確立を目指して行った経口惹起に関する予備検討においては、抗原の i.p.感作後に 4 回の経口追加免疫を実施することにより、最終的に抗原経口投与によりアレルギー反応を惹起することが可能であることが示された。

**【実験 B7】**実験 6 の結果を受け、抗原経皮感作-経口惹起実験系について検討を行った。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。

**【実験 B8】**実験 7 で確立した実験系を用いて、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。

近年のアレルギーに関する研究、また、最近のわが国における加水分解コムギタンパク質を含有する洗顔石鹸の事例等から示されるように、タンパク質が皮膚を透過して体内に取り込まれ抗原となる経皮感作経路が、現在、アレルギー発症の重要な

要因として注目されている。本研究の結果は、この抗原タンパク質の経皮感作によるアレルギー発症において、酸化チタンや酸化亜鉛のようなナノマテリアルが共存することにより感作が増強される可能性を示したものである。これまでの検討結果を考えると、粒子径 30nm 未満程度のナノマテリアルを皮膚に適用するには注意が必要であると考えられる。また、抗原の i.p.感作時の検討及び急性毒性の検討から、酸化亜鉛の場合は、酸化チタンとは異なり、おそらく亜鉛由来すると考えられる生体影響の可能性が示されており、やはり注意すべきであろう。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。本研究の結果は、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に影響を与えることを示すものである。従って、これらのナノマテリアルについてはさらに詳細な科学的知見を集積することが重要である。

### 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

「食品および飼料連鎖におけるナノサイエンスおよびナノテクノロジーのリスクアセスメントに関するガイダンス」が 2011 年のガイダンスの公表以降に得られた新しい知見をもとに、より詳細で具体的な分析法や分解性など評価法、生物学的試験 (*in vivo/in vitro*)法を用いた体系的な評価指針が示されたものになっているが、まず、依然ナノマテリアルの定義について、EC の定義との整合性とケースバイケースで決定される科学的な判断についてどちらに従うべきなのかについて曖昧になっている。また、EC のナノマテリアルの定義に明確に含まれていない物質を評価する際ための指針にいくつかの状況が概説されているが、一般論としては一般食品法とこのガイダンスの原則が適用されことになる。例えば、ナノスケールに関連する特定の特性に起因する潜在的なリスクは、それらの特性および関連する危険性に焦点を当てて評価されなければならないが、100nm 未満のサイズの材料を構成

する粒子の割合に関して閾値を確立する科学的根拠はなく、分析技術における不確実性や検出の限界の問題がある。また、ガイダンスには、網羅的な評価手法が記されているが、申請者が申請に必要な最小限の情報が、ガイダンスに記載されている広範なリストから明確化しにくく、その妥当性の説明は申請者に任されている。

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

2019 年ネットワーク会議において、EFSA が 2020 年中に科学的ガイダンスの最終化や製品中のナノスケールの粒子の存在を定義するための技術的ガイダンスの作成を行うことにより、EFSA と加盟国との協力体制に貢献することを提唱した。さらに、2019 年の会議は(GSRS2019)のグローバルサミットに組み込まれ、EU 以外の国を含む約 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としても行われていた。本会議では、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取り組みは、NAM の促進を目的とする国際的な化学物質のリスク評価の進展に対する取り組みの下でも行われている事が表明された。

食品接触材料(FCM)ネットワーク会議では、従来その懸念が指摘されてきた、印刷用インク顔料に含まれるナノサイズの顔料についても議論が及んできたことを示している。しかし、食品接触材料の評価では、一般化学物質としての顔料の評価手

法の確立自体もこれからの課題であり、未だナノマテリアルとしての評価を議論するには、科学的知見も含めてさらなる知見の収集が必要であると考えられた。

二酸化ケイ素(E551)は体内に吸収されにくいものと考えられていたが、一部の組織からケイ素含有物質が検出された報告により、遺伝毒性や亜慢性毒性試験、生殖発生毒性試験において有害影響が示されていないものの、ナノを含む製品による慢性毒性試験の情報が必要であると評価されている。計算マグネシウムも発生毒性による情報不足でEFSAでは原稿の基準値は適用できないと評価されている。

二酸化チタンについては、E171の経口投与実験による発がん性促進作用の可能性を示した報告以後調査により、細胞生物学的メカニズムの変化や発達異常などの新しいシグナル、酸化ストレスを介した遺伝毒性効果に関する情報などが示された報告があるものの、決定的な証拠となるデータはないことから、発がん性の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が指摘されている。

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、飲料水経路による曝露とそのリスクに対する見解がWHOより公表された。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示された。今後、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が必要であると考えられる。

## E. 結論

### 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

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証するため、雌性BALB/cマウスを用いた卵白アルブミン(OVA)を感作物質として用いる評価系を研究分担者と協力し確立してきた。平成29年度から、皮膚暴露によるアジュバント作用の陽性対照候補としてコレラトキシンを用いた免疫毒性増強作用について、アナフィラキシーを確実に誘発する皮膚暴露・腹腔内投与惹起の系で検討を開始した。平成30年度の検討において、条件を最適化することによってOVAの皮膚暴露に対して、コレラトキシン及びコレラトキシンBサブユニットが感作を増強することを示し、本系でアジュバント作用を検出可能であることが明らかとなった。同時に、OVAの皮膚暴露に引き続いてOVAを複数回経口投与することによって、腹腔内投与をしなくてもアナフィラキシー反応が誘発されることを示した。令和元年度には、最終的に決定されたプロトコルに沿って誘発したOVAの経皮経口暴露による感作及びアナフィラキシー反応に対して、これまでの検討で最も毒性が強いと考えられた直径10nmのAgNPの同時暴露がアジュバント作用を示すか否か検討した。OVAの経皮経口暴露によって、OVA特異抗原の産生及び経口投与による下痢や直腸温低下等が誘導されたが、AgNPの同時投与による増強作用は認められなかったことから、本モデル系において、AgNPはアジュバント作用を示さないと考えられた。本モデル系においては、小麦タンパク分解物も皮膚暴露で感作を誘導すること(平成29年度)、及び皮膚暴露による感作の判定に所属リンパ節の免疫染色によってKi67陽性の濾胞の割合(Ki67陽性2次濾胞の数/濾胞の数×100(%))が有用な指標となること(平成29,30年度)も示された。

### ナノ銀の腹腔内投与による急性毒性について

本研究においては、AgNP がサイズによって異なる毒性を示す機序をさらに検討した。平成 29 年度は表面積を同等とするため、直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP をそれぞれ 0.2 mg、1.2 mg 及び 2 mg 腹腔内投与したところ、投与 6 時間及び 24 時間後の肝臓中の銀濃度は 10 nm 投与群よりも 60 nm 及び 100 nm 投与群の方が高値あるいは高値傾向を示したにも関わらず、肝臓での毒性変化は 10 nm 投与群のみに観察され、表面積や重量よりも粒子径が小さいことが毒性を規定することが明らかとなった。合わせて、AgNP による活性酸素の影響を検討するため、抗酸化作用をしめす N-acetyl-l-cysteine、Vitamin C、Vitamin E をマウスに経口投与し、1 時間後に 10 nm の AgNP を腹腔内投与し影響を検討した。GSH の前駆体である NAC は AgNP の急性毒性を有効に抑制できたが、直接活性酸素類を消去する Vit C 及び Vit E は抑制を示さず、活性酸素種の発生のみでは毒性機序の説明はできなかった。平成 30 年度は、表面修飾の影響を検討するためポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone, PVP) で表面修飾した直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm の AgNP を 0.2 mg 単回腹腔内投与し、その影響を検討した。その結果、直径 5 nm の AgNP PVP 投与群では、体温低下に加え、肝臓の肉眼及び病理組織学的検査において著しい変化が観察されたことから AgNP の急性毒性は PVP コートでは抑制されず、粒子のサイズに相関することが確認された。令和元年度は、AgNP の形状の影響を検討するため 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 0.2 mg 単回腹腔内投与による急性毒性を検討した。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 プレートでも、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

#### 酸化チタン等の経皮 / 経口暴露による免疫毒性の解析

食品・食品容器包装用途、及び化粧品等の両方に用いられ、経口及び経皮にて暴露される可能性があるナノマテリアルである酸化チタン及び酸化亜鉛について、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 i.p. 時のアジュバント効果、及び抗原経皮感作、及び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ついて検討した。今回用いた酸化チタン B (ルチル型、35 nm) 及び酸化亜鉛 B (35 nm)、酸化亜鉛 C (80nm) では、抗原 i.p. 時のアジュバント効果は見られたが、抗原経皮感作時の増強効果は見られなかった。先行研究における結果と考え合わせ、ナノマテリアルの経皮感作増強効果は粒子径により異なり、粒子径が小さいナノマテリアルの方が経皮感作増強効果が大きいことが示唆された。また、酸化亜鉛に関しては、酸化チタンと異なり急性毒性が見られ、肝臓、腎臓、及び胸腺やリンパ節に影響を与える可能性が示された。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、粒子径の小さいナノ酸化チタン(アナターゼ型、粒子径 6 nm)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。

本研究の結果は、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に影響を与えることを示すものである。従って、これらのナノマテリアルについてはさらに詳細な科学的知見を集積することが重要である。

### 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

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した。研究期間をとおして、欧州食品安全機関(EFSA)が主催している食品及び飼料分野におけるナノテクノロジーのリスク評価に関する科学ネットワークおよび、食品接触材料の科学ネットワークに関する調査を行った他、H29年度は2011年のEFSAのリスクアセスメントに関するガイダンス改訂版の第1部、「ヒトおよび動物の健康」についての概要を調査すると共に、食品接触材料の科学ネットワークにおける容器等の印刷用インクに含まれるナノサイズの顔料に関しての分析法や今後の評価指針等の方向性について調査した。H30年度は改訂版ガイダンスの実用性に関する議論と食品添加物および食品に添加する栄養源に関する科学パネルによる、二酸化ケイ素の再評価、ケイ酸カルシウム・ケイ酸マグネシウム・三ケイ酸マグネシウム及びタルクの再評価、銀ヒドロゾルの安全性および生物学的利用能に関する意見についての情報収集を行った。R1年度は、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のステートメントと、マイクロプラスチックの経口曝露に関連してWHOの飲料水における技術文書などの調査を行った。何れにおいても、現状の限られた情報では安全性評価を完結することはできず、摂取後のナノマテリアルの体内運命に関する信頼性の高いデータや、特に慢性影響や発生影響に関する毒性情報の不

足が指摘されており、さらなる研究の必要性が指摘されていた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol.* 31: 73-80, 2018.
- 2) Shoji M, Adachi R, Akiyama H. Japanese food allergen labeling regulation: an update. *JAOC Int.* 101, 8-13, 2018.
- 3) Koizumi D, Shirota K, Oda H, Adachi R, Sakai, S, Akiyama H, Nishimaki-Mogami T, Teshima R. Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Nonpoisonous Extraction System for the Determination of Crustacean Protein in Processed Foods. *JAOC Int.* 101, 798-804, 2018.
- 4) Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigo M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Tsuda H, Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci.* 109(7):2164-2177. 2018.
- 5) El-Gazzar AM, Abdelgied M, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigo M, Naiki A, Takahashi S, Takase H, Hirose A, Kanno J, Elokke OS, Nazem AM, Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats. *Arch Toxicol.* 93:49-59. 2019.
- 6) Liao D, Wang Q, He J, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Futakuchi

- M, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Xu J, Tsuda H. Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes. *Chem Res Toxicol.* 31(10):1025-1031. 2018.
- 7) Sakamoto Y, Hojo M, Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A, Inomata A, Suzuki T, Nakae D. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci.* 43(10):587-600. 2018.
- 8) 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.
- 9) 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
- 10) Abdelgied M., El-Gazzar 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(1) :34, 2019.
- 11) 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
- 12) 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
2. 学会発表
- 1) 曹永晩, 水田保子, 赤木純一, 豊田武士, 小川久美子: 経皮暴露感作性試験におけるコレラトキシン及びコレラトキシンBサブユニットのアジュバント作用. 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2018.1.26)
- 2) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K: Adjuvant effects of transcutaneously exposed cholera toxin and its B sub-unit. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2018.3.12)
- 3) 曹永晩, 赤木純一, 水田保子, 豊田武士, 小川久美子: サイズによって異なるナノ銀の急性毒性. 第44回日本毒性学会学術年会 (2017.7.12)

- 4) 曹永晩, 赤木純一, 水田保子, 豊田武士, 小川久美子: コレラトキシン及びコレラトキシンB サブユニットの経皮曝露感作性試験におけるアジュバントとしての可能性. 第45回日本毒性学会学術年会(2018.7.19)
- 5) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Tamehiro N, Kimura Y, Adachi R, Ogawa K: Dose-dependent sensitization effects of transcutaneously exposed acid-hydrolyzed wheat protein. 54th Congress of the European Societies of Toxicology(2018.9.4)
- 6) Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Ogawa K: Effects of antioxidants on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. The Korean Society of Toxicologic Pathology 2018(2018.10.25)
- 7) 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抗酸化剤の影響. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2019.1.31)
- 8) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K: Effects of N-acetyl-L-cysteine on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology(2019.3.12)
- 9) 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)
- 10) Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Ide T, Toyoda T, Ogawa K: Effects of antioxidant and inhibitor of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. IUTOX 15th International Congress of Toxicology(2019.7.16)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 為広紀正, 安達玲子, 木村美恵, 酒井信夫, 崔 紅艶, 最上(西巻)知子, 近藤一成. ナノ酸化チタンの結晶構造の違いが抗原の経皮感作性に与える影響. 第44回日本毒性学会学術年会(2017年7月)
- 15) 酒井信夫, 田原麻衣子, 曾我慶介, 安達玲子, 近藤一成, 五十嵐良明. ヒト急性単球性白血病細胞株(THP-1)より分化誘導した樹状細胞様細胞の抗原提示におけるナノ酸化チタン共存の影響について. 第24回日本免疫毒性学会学術年会(2017年9月)
- 16) Adachi R, Tamehiro N, Sakai S, Kimura Y, Cui HY, Nishimaki-Mogami T, Kondo K. Enhancement of transdermal protein sensitization by titanium dioxide nanomaterials. 57<sup>th</sup> SOT Annual Meeting & ToxExpo(2018年3月)
- 17) Miyazaki A, Watanabe S, Hirao T, Kokutani R, Minegishi Y, Ogata K, Nagatomi Y, Tamehiro N, Sakai S, Adachi R. Specific Detection of Food Allergens (Wheat, Buckwheat, and

- Peanut) by Real-Time PCR Methods Using the Reference Plasmids. 132<sup>nd</sup> AOAC Annual Meeting & Exposition (2018年8月)
- 18) 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
- 19) 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. 133<sup>rd</sup> AOAC Annual Meeting & Exposition 2019年9月
- 20) 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. 133<sup>rd</sup> AOAC Annual Meeting & Exposition 2019年9月
- 21) Akihiko Hirose. International trends and necessity of chronic studies on risk assessment of nanomaterials. 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄
- 22) 坂本義光, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の経気管投与ラットに見られた肺胞過形成病変の免疫組織学的性状, 第76回日本癌学会学術総会, 横浜 (2017年9月28日~30日)
- 23) 北條幹, 坂本義光, 山本行男, 村上詩歩, 長谷川悠子, 前野愛, 五十嵐海, 湯澤勝廣, 生嶋清美, 多田幸恵, 清水本武, 長澤明道, 久保喜一, 安藤弘, 海鉾藤文, 田中和良, 矢野範男, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大: ラットにおける多層カーボンナノチューブおよびクリソタイル誘発中皮腫の病理学的性状の比較, 第34回日本毒性病理学会学術集会, 那覇 (2018年1月25日~26日)
- 24) 坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブの経気管反復投与によりラット肺に誘発された増殖性病変の免疫組織学的解析, 第34回日本毒性病理学会学術集会, 那覇 (2018年1月25日~26日)
- 25) Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, David Alexander, William Alexander, Takamasa Numano, Satoru Takahashi, Hirotsugu Takase, Akihiro Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Hiroyuki Tsuda. Potassium octatitanate(K<sub>2</sub>O·8TiO<sub>2</sub>) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury – A comparative study to titanium dioxide nano particles. 第44回日本毒性学会学術年会、7月10-12日、横浜
- 26) Ahmed M. El-Gazzar<sup>1</sup>, Mohamed Abdelgied, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi, Ashraf Mohamed Nazem, Osama Saeid Elokke and Hiroyuki Tsuda. Comparative Pulmonary toxicity of DWCNT and MWCNT-7 in Rats 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄
- 27) Mohamed Abdelgied, Ahmed M. El-Gazzar, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Khaled Abbas Abdou, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi and Hiroyuki Tsuda. Potassium octatitanate fiber (K<sub>2</sub>O·8TiO<sub>2</sub>) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury in male Fischer 344

- rats: A comparative study of titanium dioxide nano particles 第 34 回日本毒理学病理学会総会、1 月 25-26 日、沖縄
- 28) Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2018) (2018.3.14 San Antonio, TX, USA)
- 29) Norihiro Kobayashi, Ryota Tanaka, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Developmental toxicity assessment of four different preparations of multi-wall carbon nanotubes in mice after repeated intratracheal instillation. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2018) (2018.3.14 San Antonio, TX, USA).
- 30) Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Abdelhamed M., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Takahashi S., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers are possibly carcinogenic in male Fisher 344 rats. *54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018)* (September 2018 Brussels, Belgium)
- 31) Hirose A., Hojo M., Kobayashi N., Impact of sample preparation of MWCNT for developmental toxicity by intratracheal instillation. *The 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC2018)* (April 2018 Belgrade, Serbia)
- 32) Hojo M, Kobayashi N, Hasegawa Y, Sakamoto Y, Murakami S, Yamamoto Y, Tada Y, Maeno A, Kubo Y, Ando H, Shimizu M, Taquahashi Y, Suzuki T, Nakae D, Hirose A: Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. *54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018)* (September 2018 Brussels, Belgium)
- 33) Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A, Yoshida H, Kurokawa M. Effects of double-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. *54th Congress of the European Societies of Toxicology*, (September 2018 Brussels, Belgium)
- 34) Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Hirabayashi Y, Hirose A, Kanno J. Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System. *58th Annual Meeting of the Society of Toxicology*, (March 11-14, 2019, Baltimore)
- 35) 坂本義光, 北條幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大: 多層カ - ボンナノチューブ(MWCNT)を単回経気管噴霧投与した後終生飼育したラットの肺および中皮組織における増殖性病変の発生. 第 45 回日本毒理学学会学術年会 (2018 年 7 月大阪)
- 36) 坂本義光, 多田幸恵, 北條幹, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 中江大: ラットにおいて DHPN で誘発されたメソテリン陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性状. 第 35 回日本毒理学病理学会学術集会 (2019 年 1 月東京)
- 37) 津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬明彦, 菅野純. ナノマテリアルの気管支内投与による毒性と発がん性の簡易検出システムの開発 第 45 回日本毒理学学会学術年会 大阪 2018 年 7 月
- 38) 津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB, Abdelgied M, Elgazzar A, 沼野琢旬, 広瀬明彦, 菅野純. ナノマテリアル特にカーボンナノチューブによる肺・胸膜中皮障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 試験法の開発 第 45 回日本毒理学学会学術年会 (2018 年 7 月大阪)
- 39) 北條幹, 小林憲弘, 長谷川悠子, 安藤弘, 久保喜一, 海鉾藤文, 田中和良, 五十嵐海, 村上詩歩, 多田幸恵, 生嶋清美, 湯澤勝廣, 坂

- 本義光, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 高橋祐次, 広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブのマウス気管内投与による発生毒性と肺の炎症との関連性. 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 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
- 43) 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, 海鉾藤文, 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)
- 44) 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)
- 45) 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)
- 46) 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)
- 47) 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)
- 48) 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)
- 49) 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)

- 50) 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 $\beta$  secretion via  
inflammasome activation (EUROTOX  
2019) (September 2019 Helsinki,

Finland)

- 51) 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

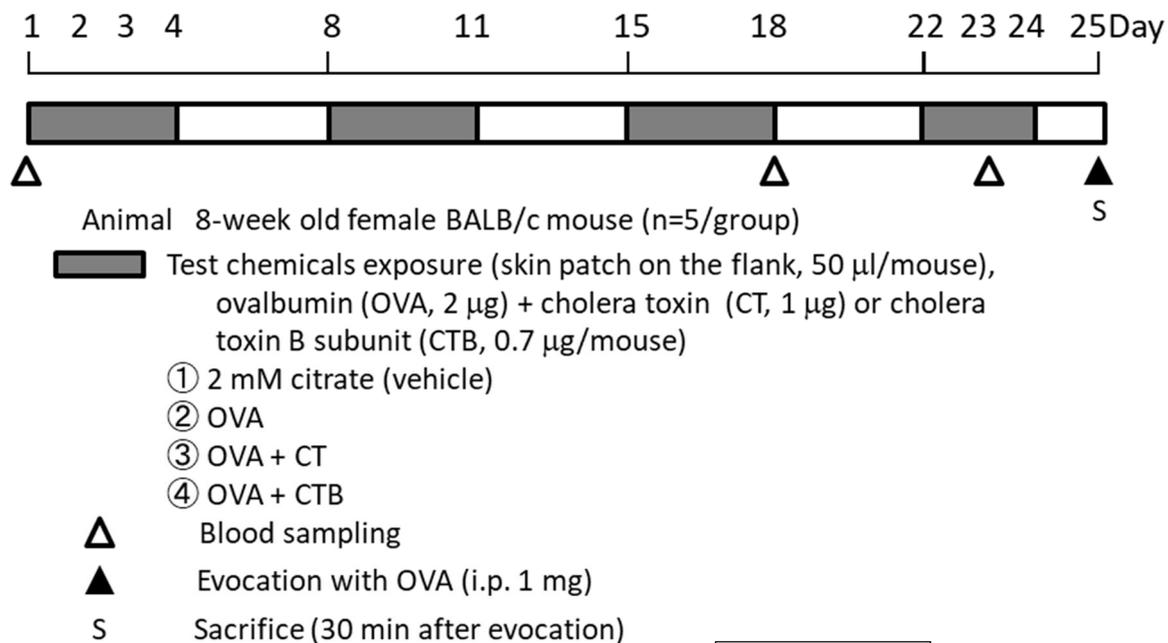


Figure 1. 実験デザイン **【実験 A1】**

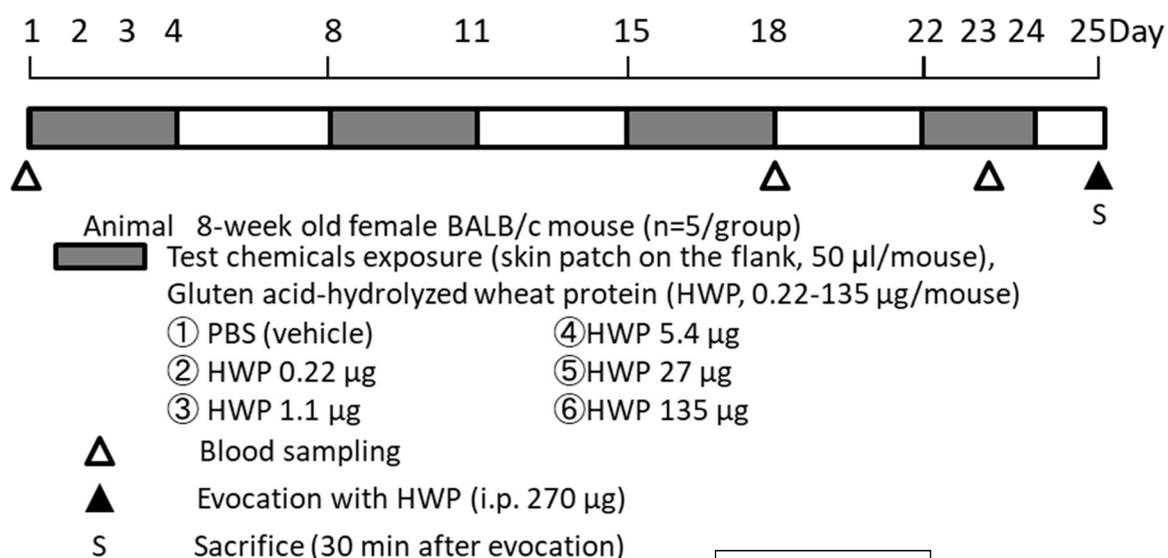


Figure 2. 実験デザイン **【実験 A2】**

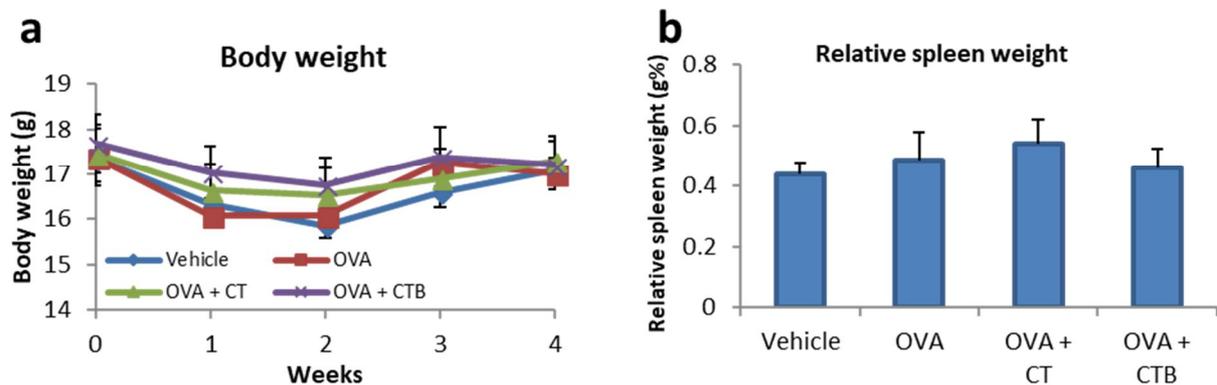


Figure 3. 体重 (a) 及び 相対脾臓重量 (b) **【実験 A1】**

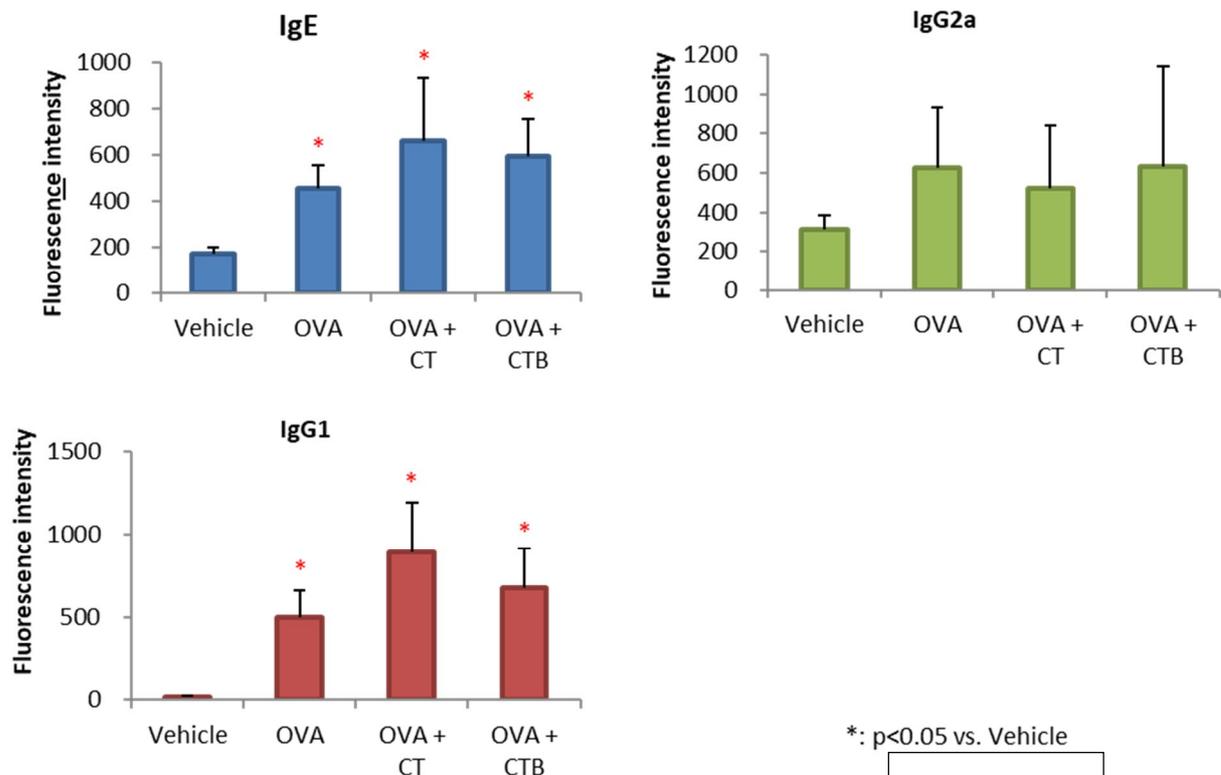
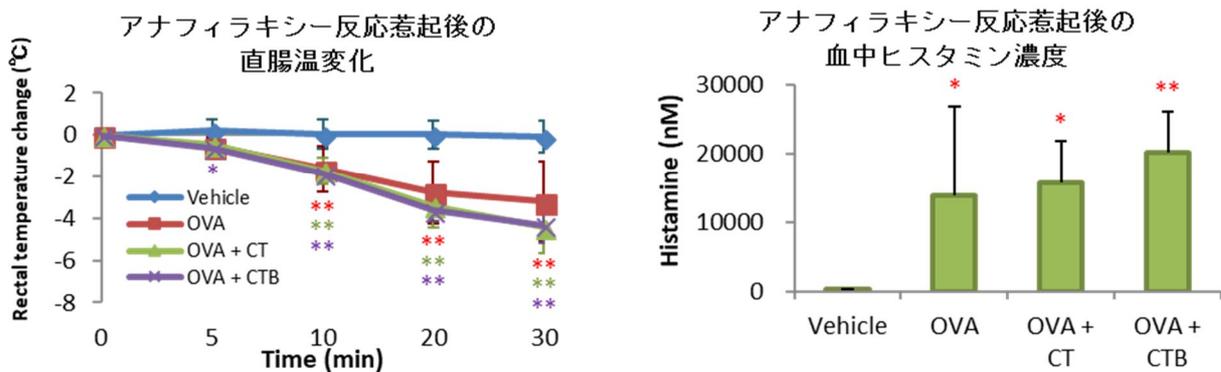
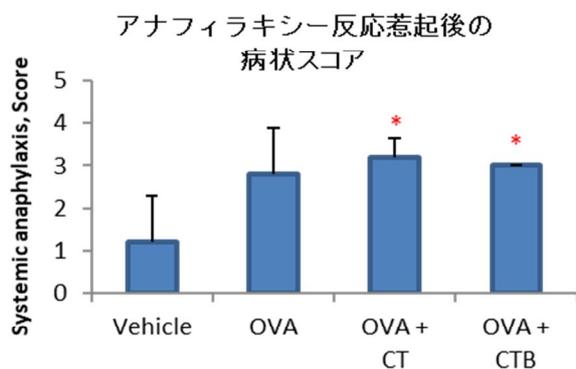


Figure 4. 血清中のOVA特異的抗体産生【実験 A1】



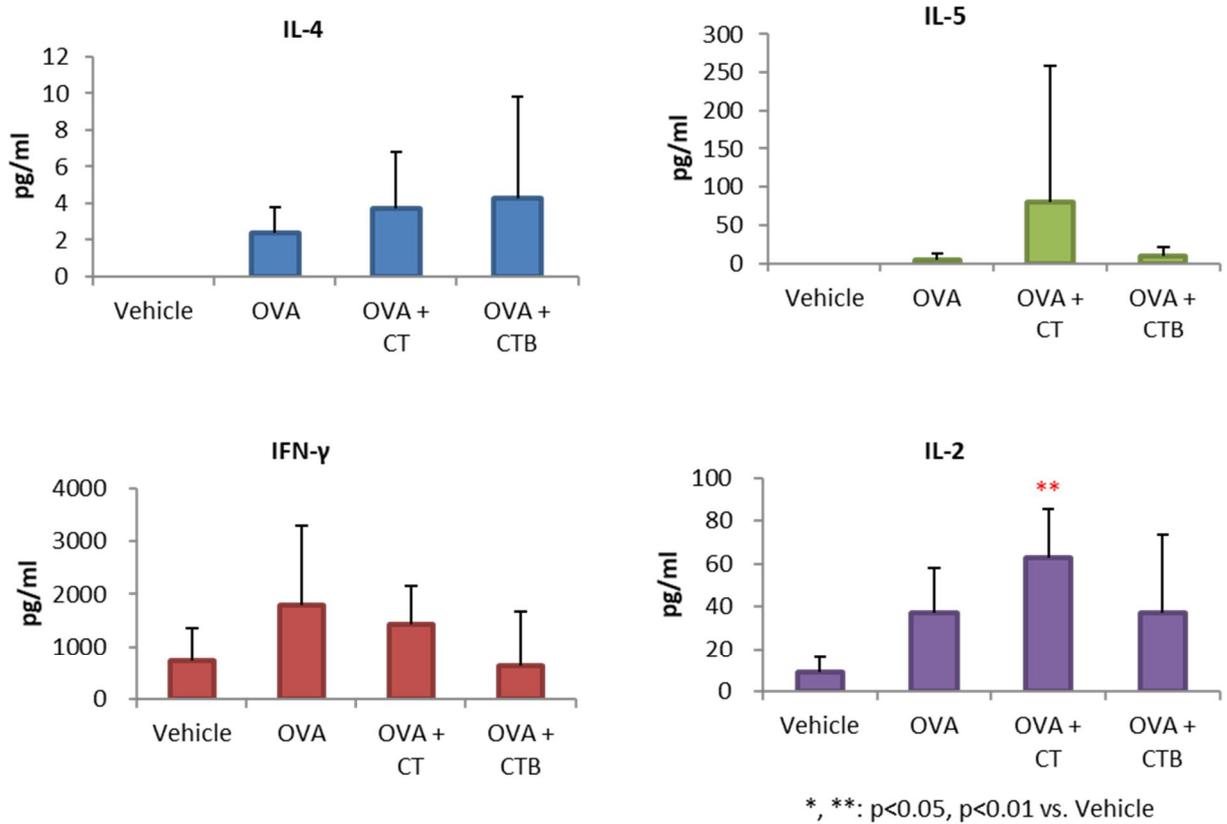
アナフィラキシー症状のスコアリング

- Score 0 症状なし
- 1 口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ肢で耳の穴を掻く
  - 2 活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛
  - 3 1分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣
  - 4 ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣
  - 5 死亡

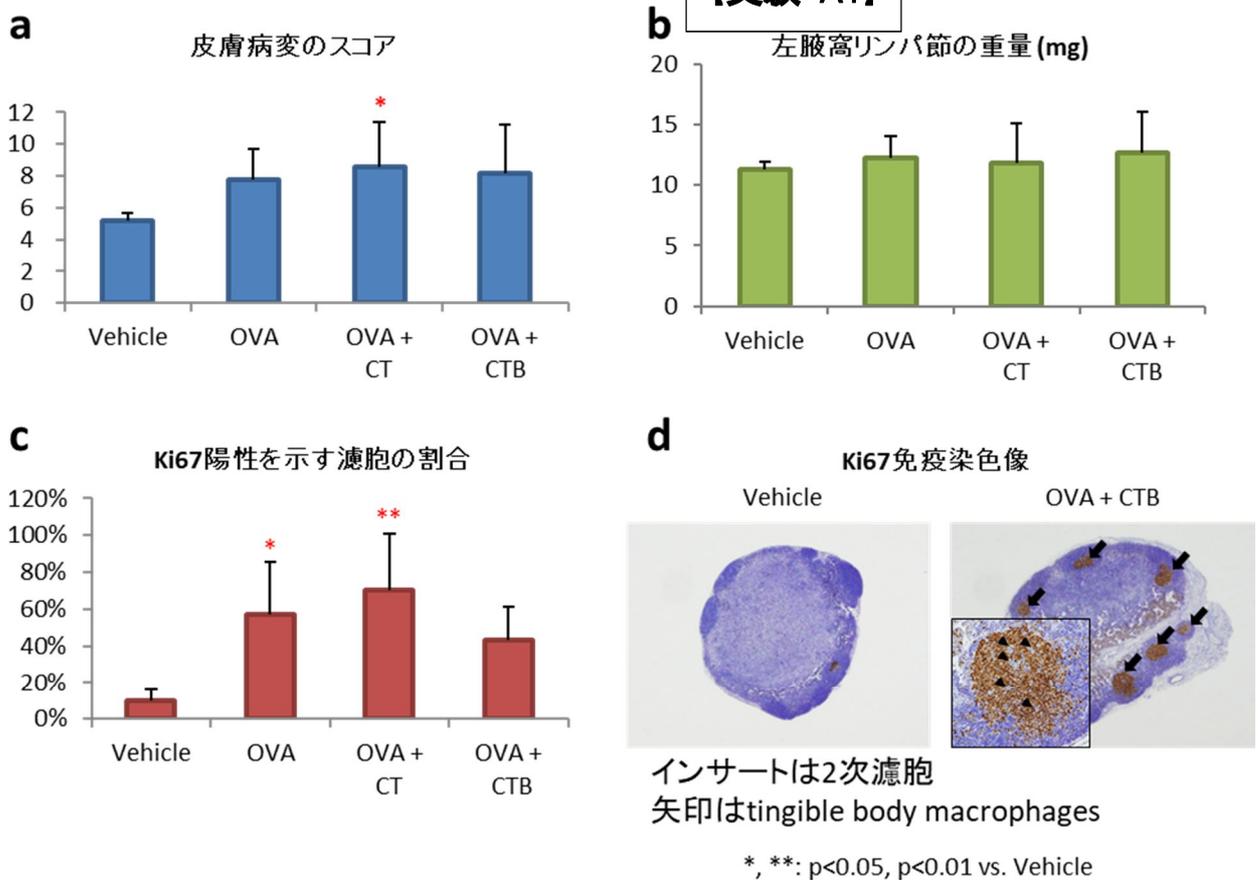


\*, \*\*: p<0.05, p<0.01 vs. Vehicle

Figure 5. アナフィラキシー反応惹起の反応【実験 A1】



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



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

**【実験 A1】**

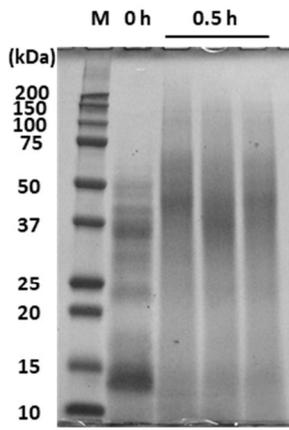


Figure 8.グルテン酸加水分解物の電気泳動像 **【実験 A2】**

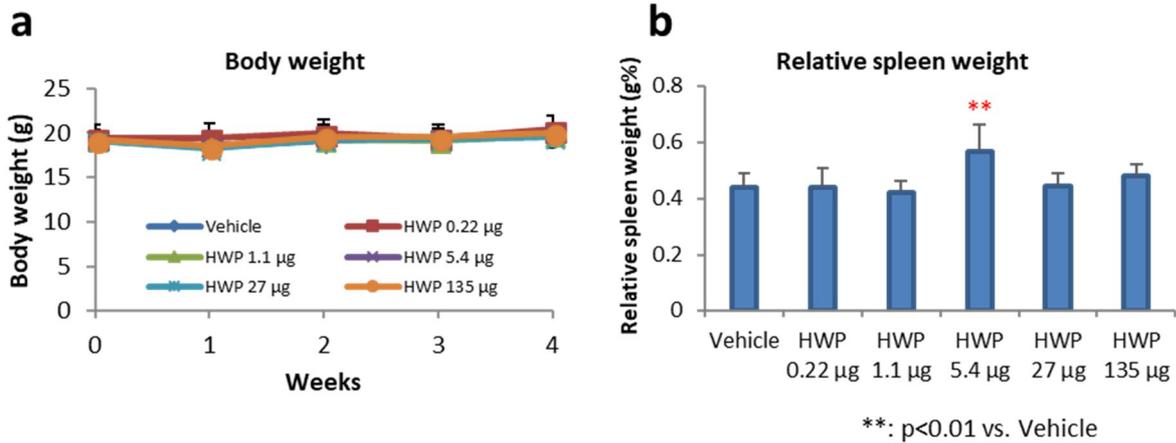


Figure 9.体重 (a)及び相対脾臓重量 (b) **【実験 A2】**

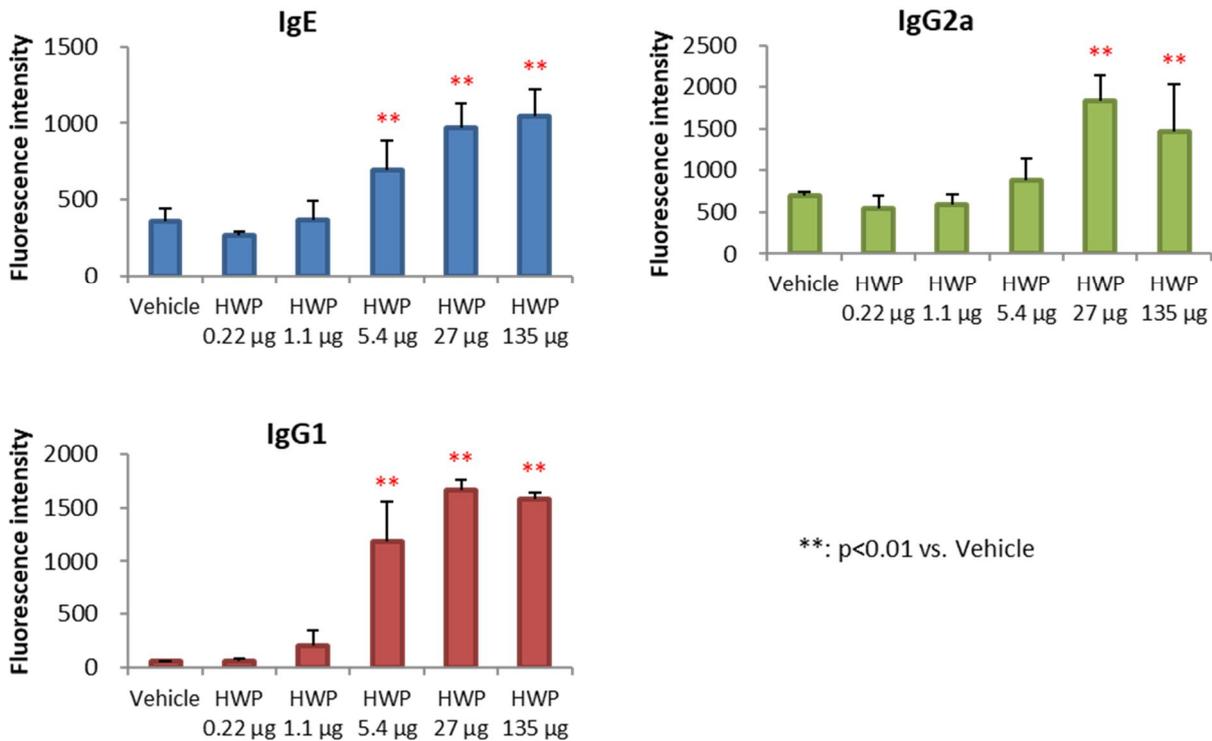
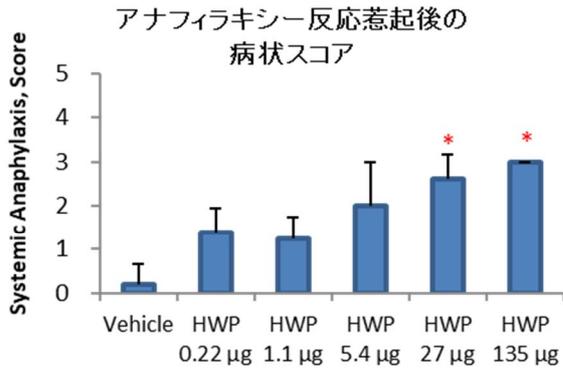
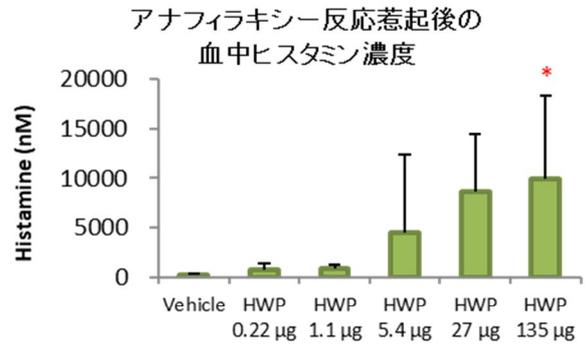
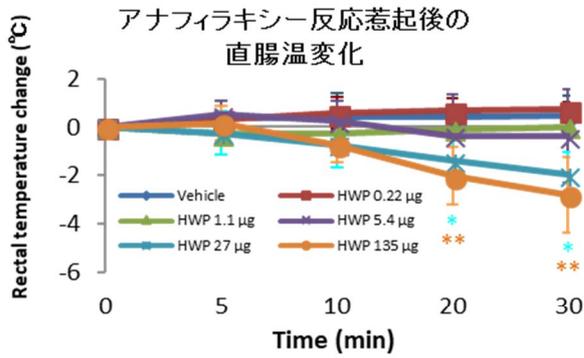


Figure 10.血清中のOVA特異的抗体産生 **【実験 A2】**



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

Figure 11. アナフィラキシー反応惹起の反応 **【実験 A2】**

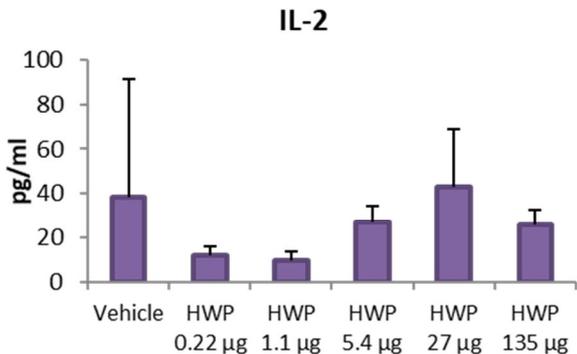
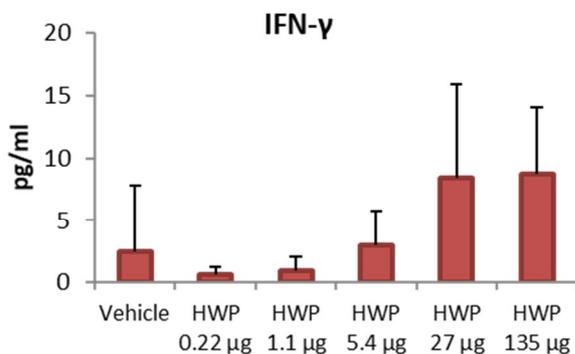
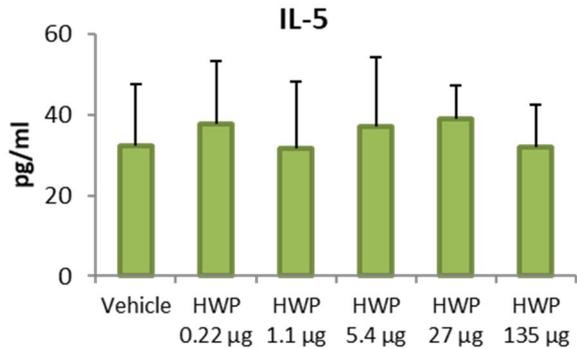
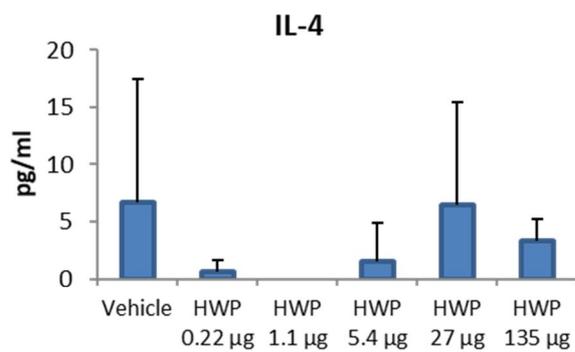
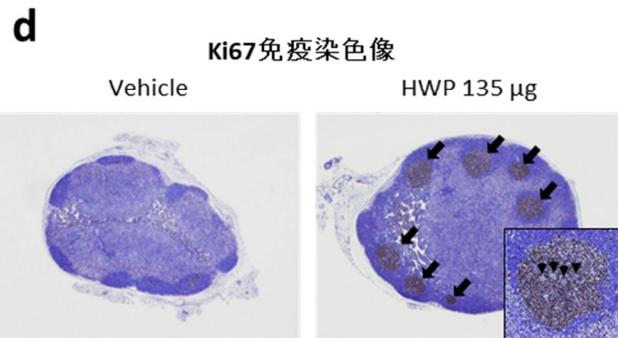
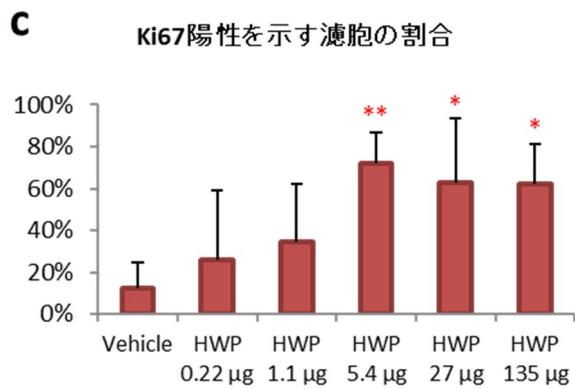
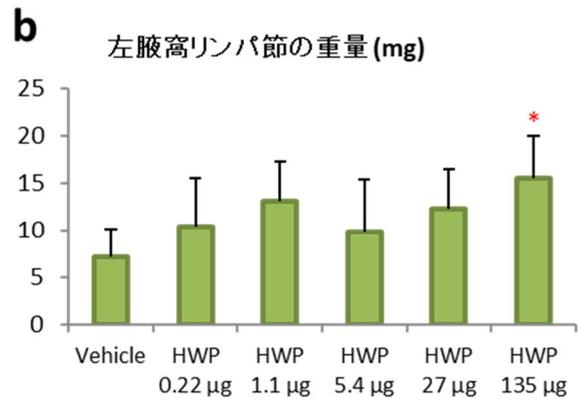
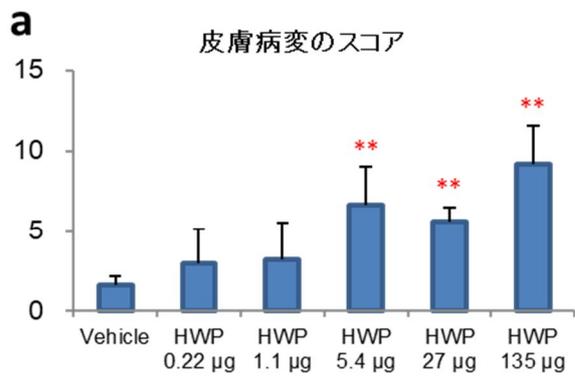


Figure 12. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 **【実験 A2】**



矢印は2次濾胞  
矢頭はtingible body macrophages

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

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

**【実験 A2】**

**【実験 A1】**

**Table 1. 病理組織学的所見 (実験1)**

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

**Grading standard**

Grade	Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration
+: mild	4層以上の有棘細胞層 1-3箇所	びまん性角化亢進	隣接した3個以上の細胞による病変 1-10箇所	炎症細胞が真皮に浸潤 集簇無し
++: moderate	4-6箇所	びまん性角化亢進 有棘細胞2層以上の高さ、皮脂腺 1個分以上の高さを示す限局性角 化亢進 1-3箇所	11-20箇所	炎症細胞が真皮に浸潤 限局性集簇有り
+++: severe	7箇所以上	4箇所以上	21箇所以上	炎症細胞が皮下組織まで浸潤 びまん性浸潤

**【実験 A2】**

**Table 2. 病理組織学的所見 (実験2)**

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



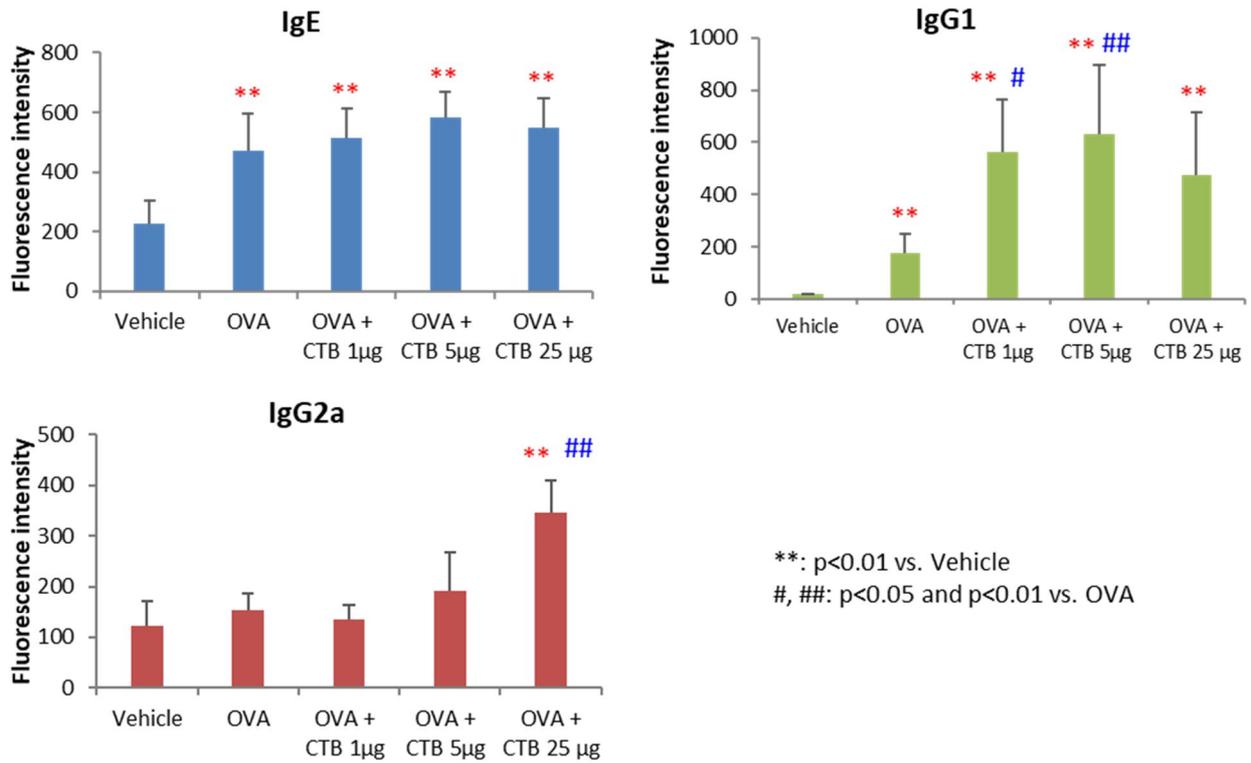


Figure 4. 血清中の OVA 特異的抗体産生 **【実験 A3】**

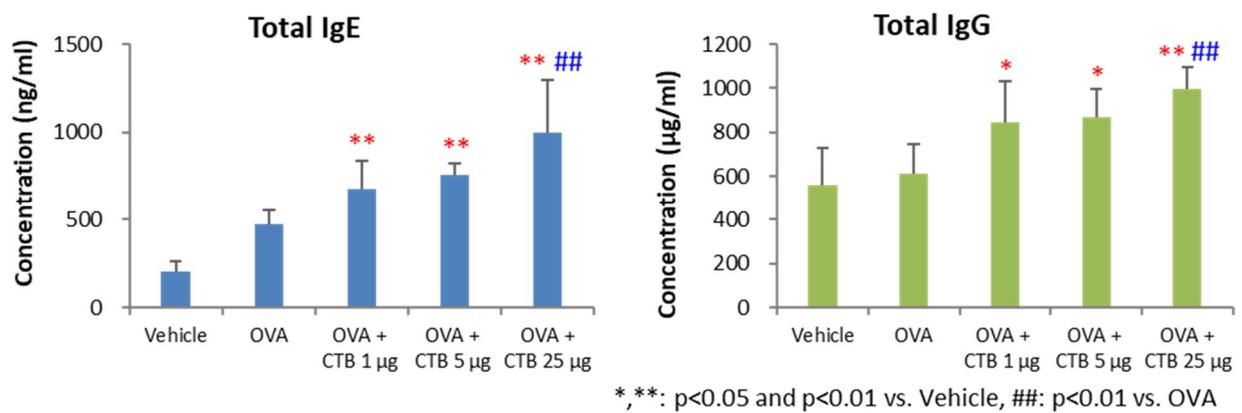
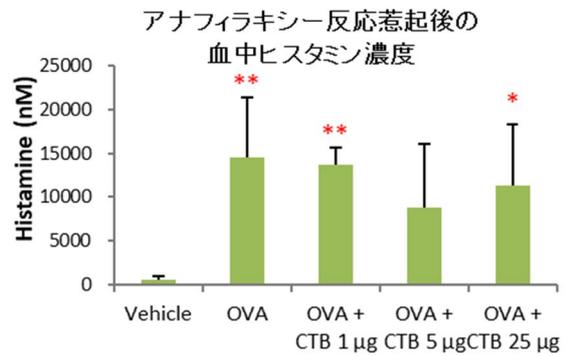
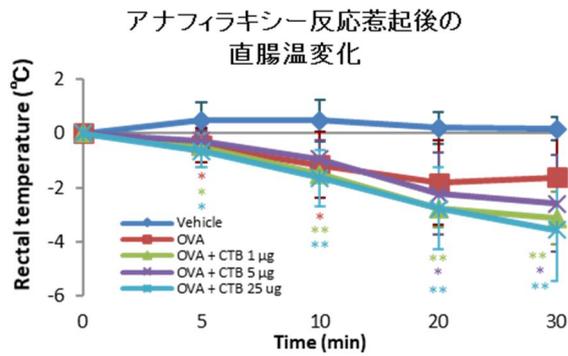
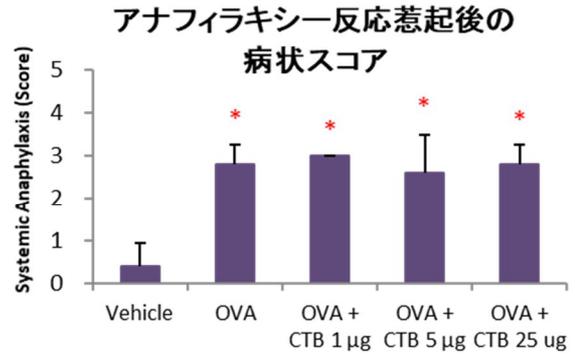


Figure 5. 血清中の総 IgE 及び総 IgG 抗体産生 **【実験 A3】**



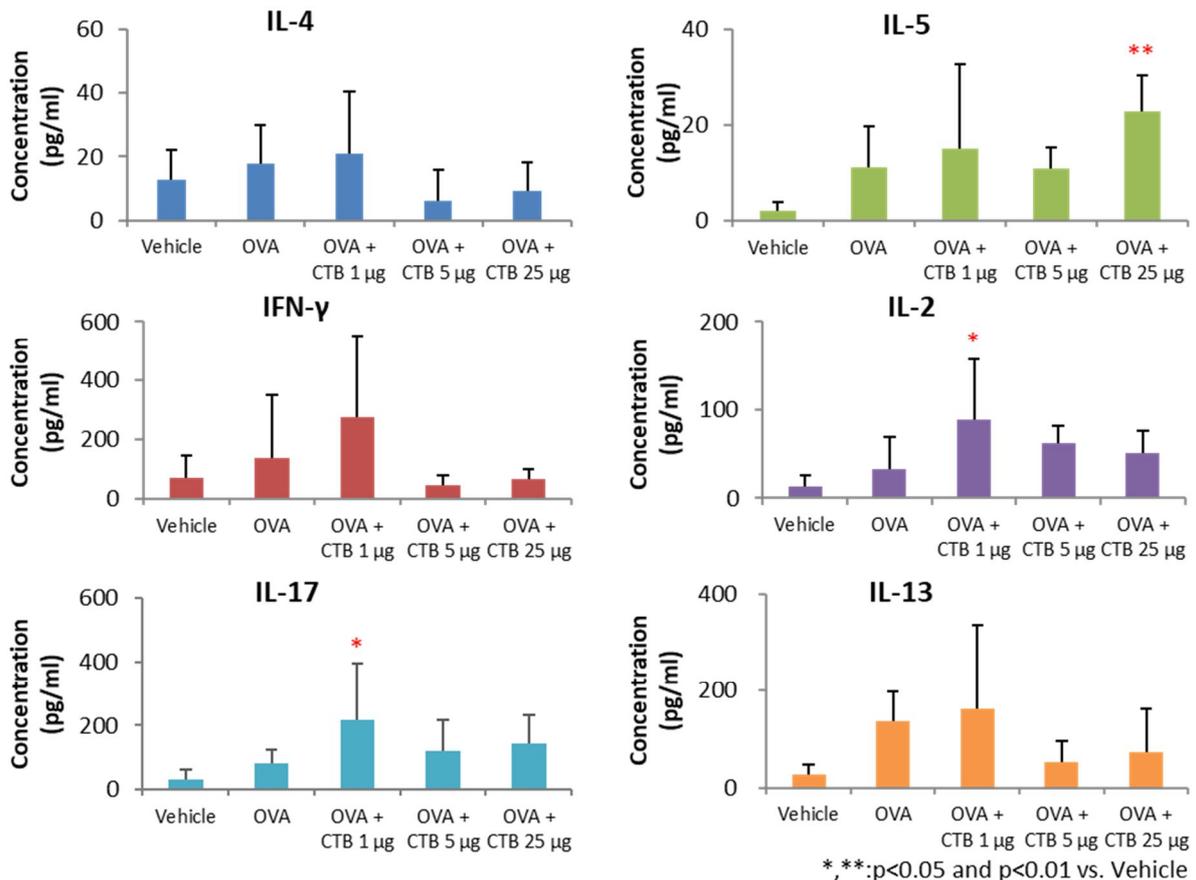
アナフィラキシー症状のスコアリング

- Score 0 症状なし
- 1 □、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ肢で耳の穴を掻く
  - 2 活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛
  - 3 1分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣
  - 4 ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣
  - 5 死亡



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

Figure 6. アナフィラキシー反応惹起の反応 **【実験 A3】**



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

Figure 7. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 **【実験 A3】**

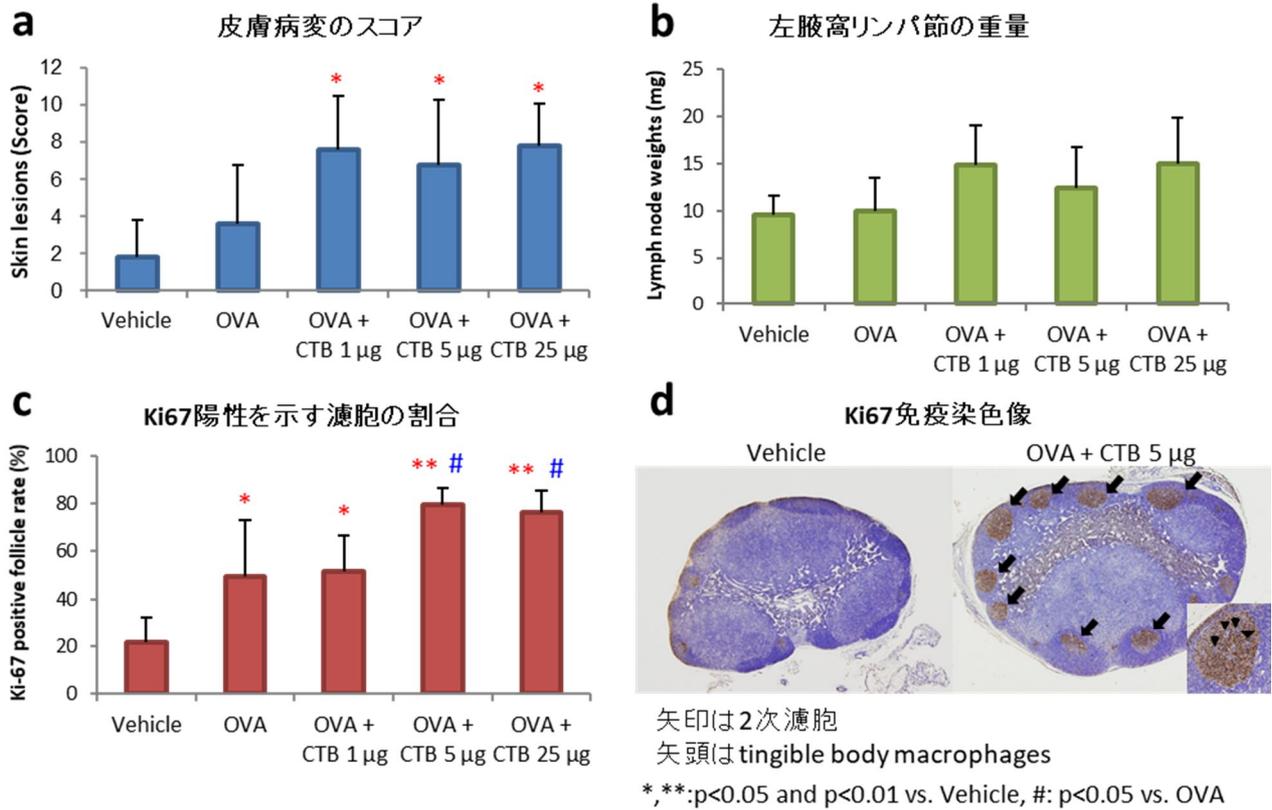


Figure 8. 皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)、細胞増殖マーカーである Ki67陽性を示す濾胞の割合 (c)及び Ki67免疫染色像 (d)

【実験 A3】

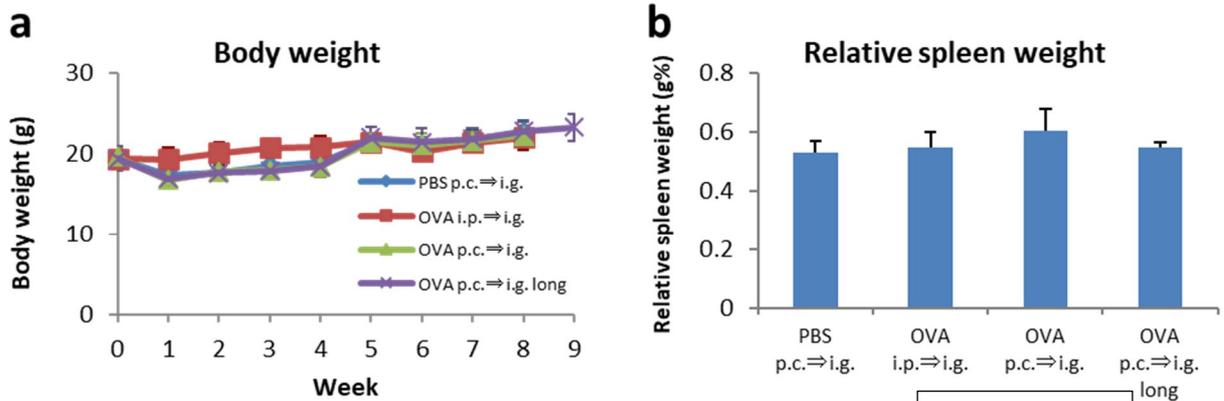


Figure 9. 体重 (a)及び相対脾臓重量 (b)

【実験 A4】

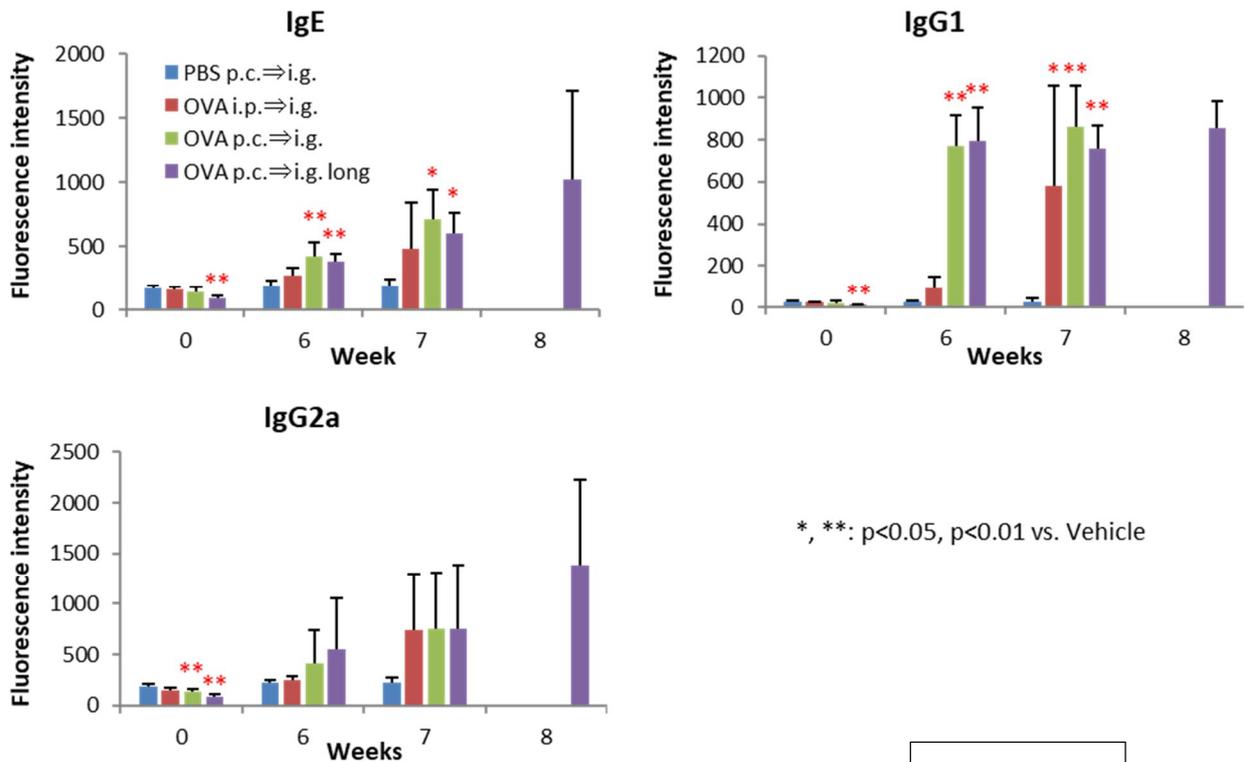


Figure 10. 血清中のOVA特異的抗体産生 **【実験 A4】**

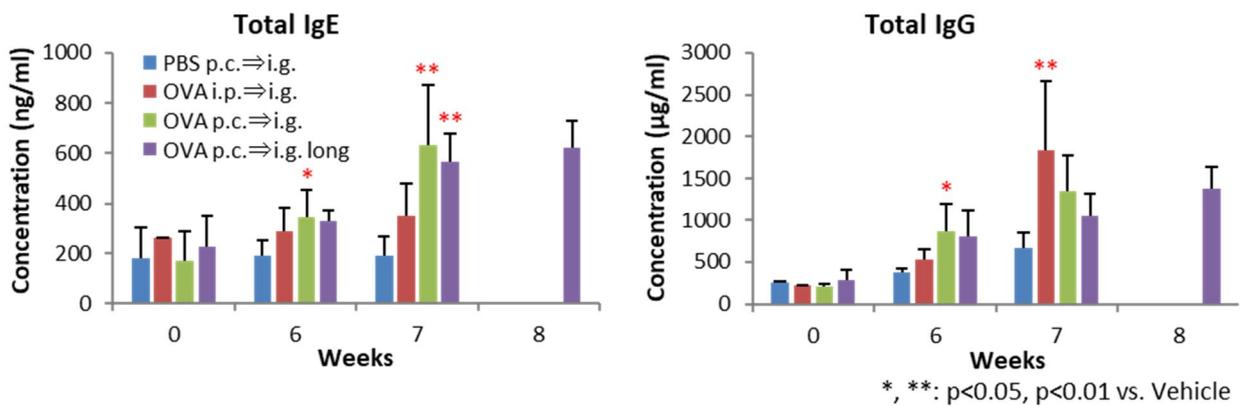
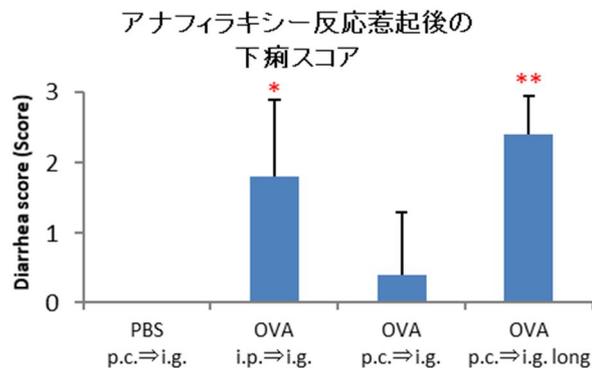
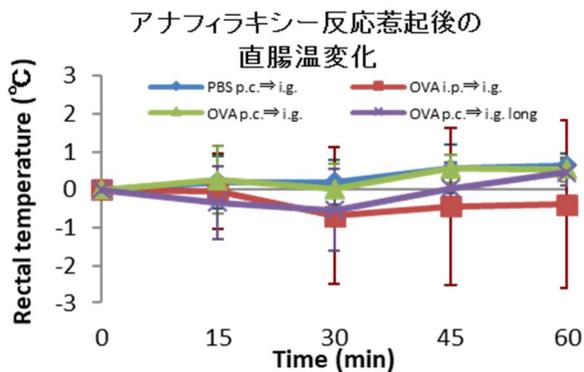


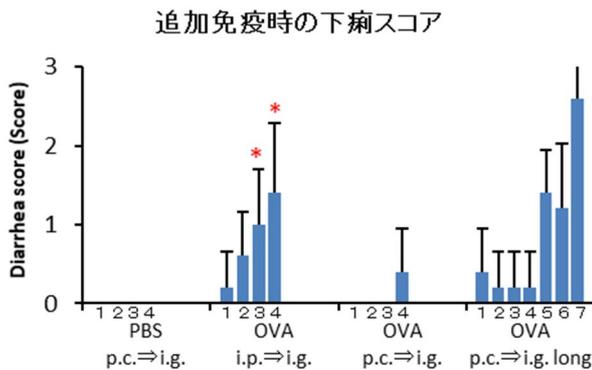
Figure 11. 血清中の総IgE及び総IgG抗体産生 **【実験 A4】**



下痢症状のスコアリング

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

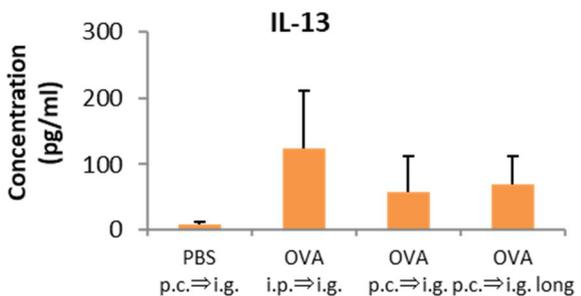
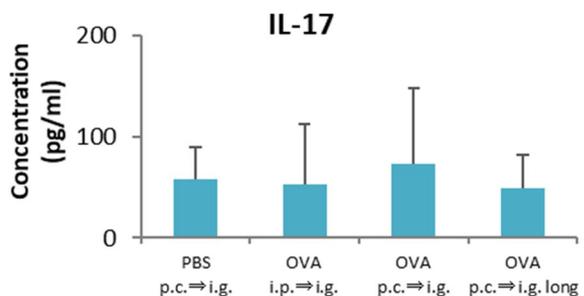
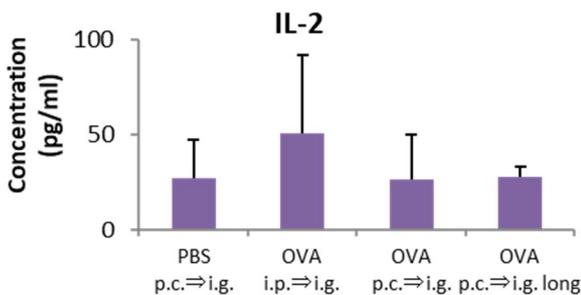
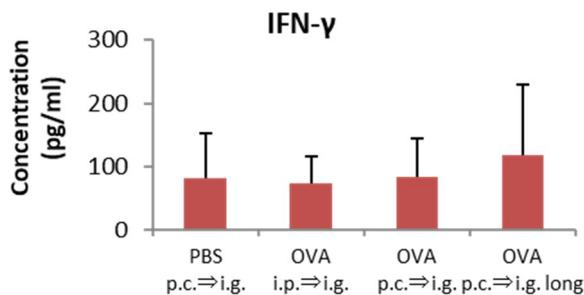
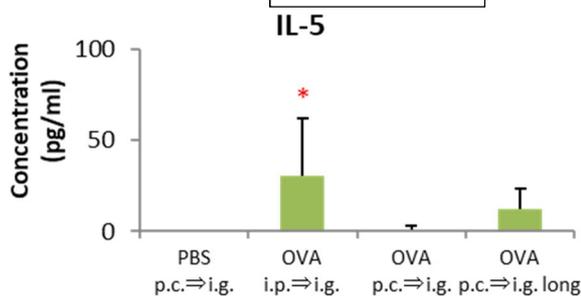
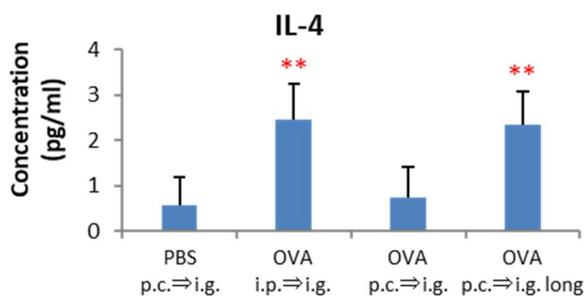
Allergy. 2012;67 (201-9)



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

Figure 12. アナフィラキシー反応惹起の反応

【実験 A4】



\*, \*\*: p<0.05, p<0.01 vs. PBS p.c.=>i.p.

Figure13. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌

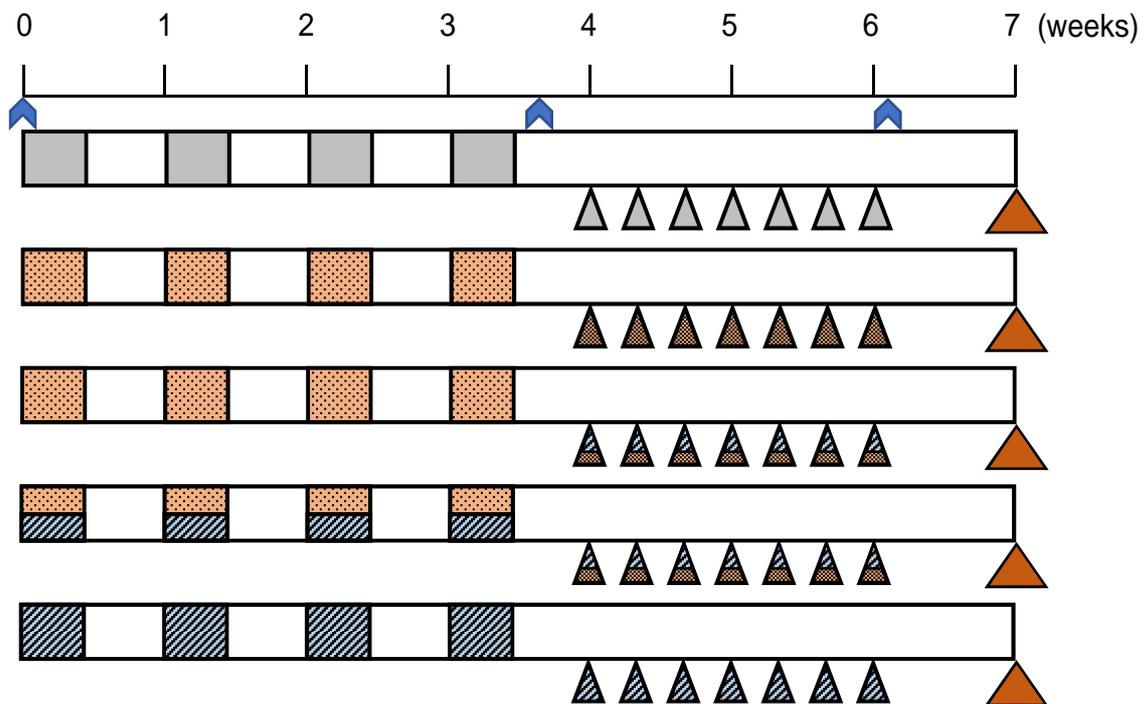
【実験 A4】

Table 1. 病理組織学的所見 **【実験 A3】**

Treatment	No. of animal	Skin				
		Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration	Erosion
		+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++
Vehicle	5	3/0/0	0/0/0	0/2/0	2/0/0	0/0/0
OVA	5	2/3/0	1/0/0	1/1/0	2/0/1	1/0/0
OVA + CTB 1 µg	5	1/2/2	2/2/0	1/0/3	3/2/0	1/0/1
OVA + CTB 5 µg	5	1/2/2	0/2/2	2/1/0	3/2/0	2/0/0
OVA + CTB 25 µg	5	0/2/3	0/3/1	0/3/1	3/2/0	1/0/0

**Grading standard**

Grade	Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration	Erosion
+: mild	4層以上の有棘細胞層 1箇所	びまん性角化亢進 1箇所	隣接した3個以上の細胞による病変 1-3箇所	炎症細胞が真皮に浸潤 集簇集無し	1個
++: moderate	2-3箇所	びまん性角化亢進 有棘細胞2層以上の高さ、 皮脂腺1個分以上の高さを 示す限局性角化亢進 2-3箇所	4-10箇所	炎症細胞が真皮に浸潤 限局性集簇集有り	2個
+++: severe	4箇所以上	4箇所以上	11箇所以上	炎症細胞が皮下組織まで浸潤 びまん性浸潤	3個以上

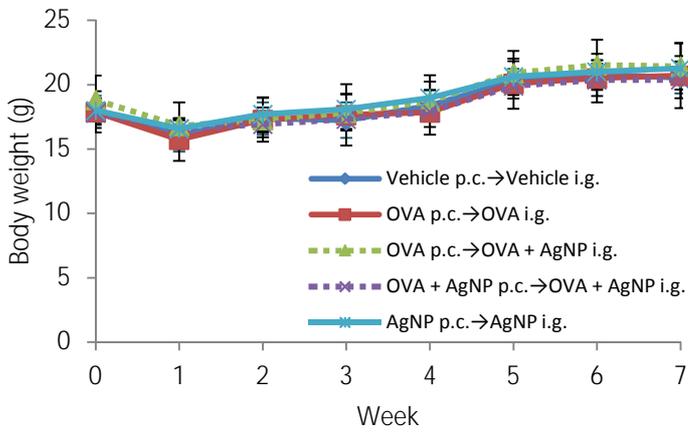


Animal : 8- week old female BALB/c mouse (n=5/group)

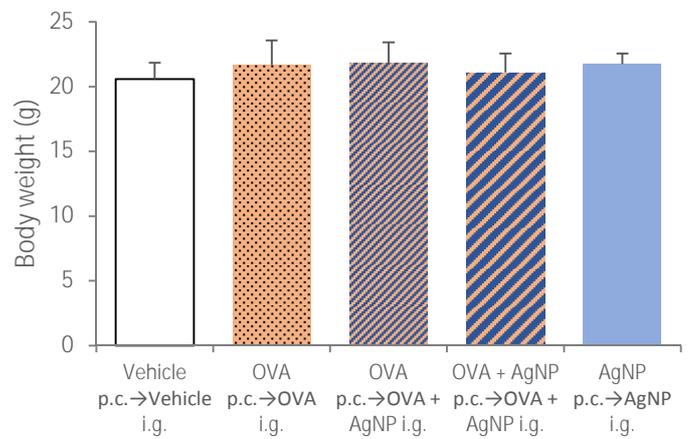
-  : 2 mM Citrate percutaneous (p.c.) exposure with skin patch on the flank (50  $\mu$ L/mouse)
-  : Ovalbumin (OVA 2  $\mu$ g) p.c.
-  : AgNP (10 nm, 49  $\mu$ g) p.c.
-  : 2 mM Citrate intragastric (i.g.) with gastric tube (0.2mL/mouse)
-  : OVA (30 mg) in citrate i.g.
-  : OVA (30 mg) + AgNP (10 nm, 50  $\mu$ g) i.g.
-  : AgNP (10 nm, 50  $\mu$ g) i.g.
-  : OVA (50 mg) in citrate i.g. with gastric tube (0.2mL/mouse)
-  : Blood sampling

Figure 1. 実験プロトコール **【実験 A5】**

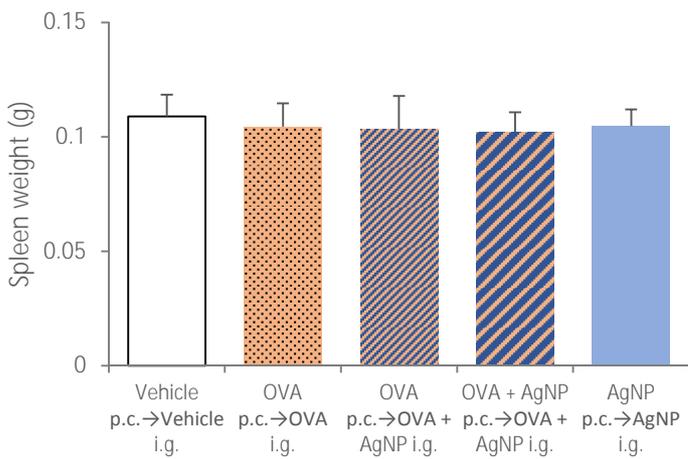
### Sequential change of body weight



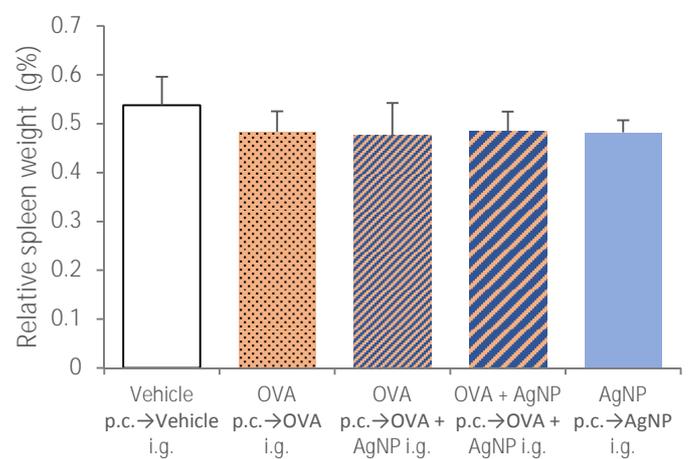
### Body weight



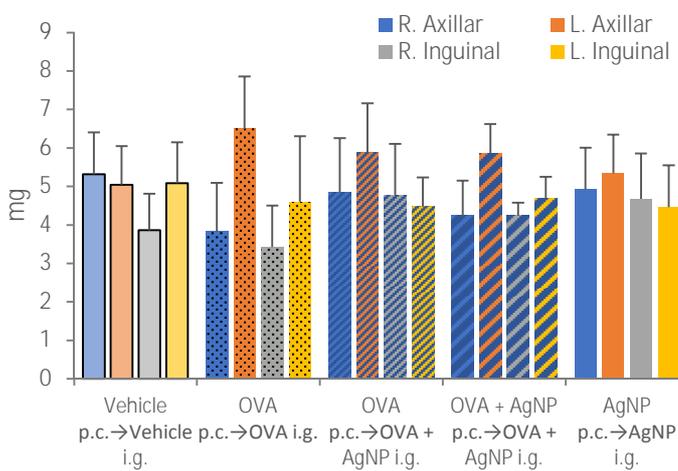
### Spleen weight



### Relative spleen weight



### 部位別のリンパ重量



### Length of colon

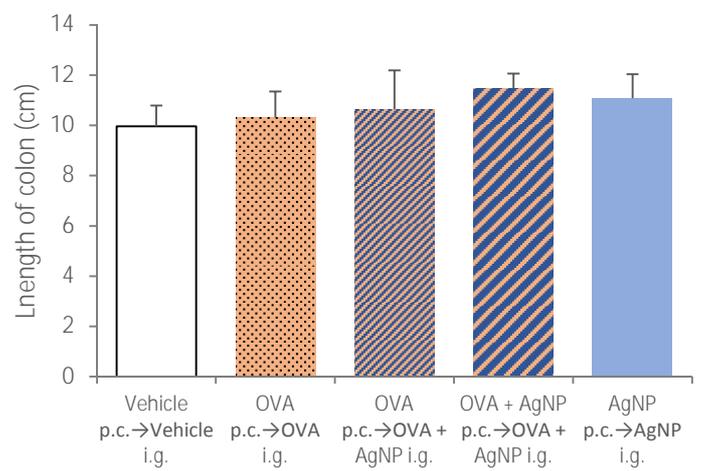
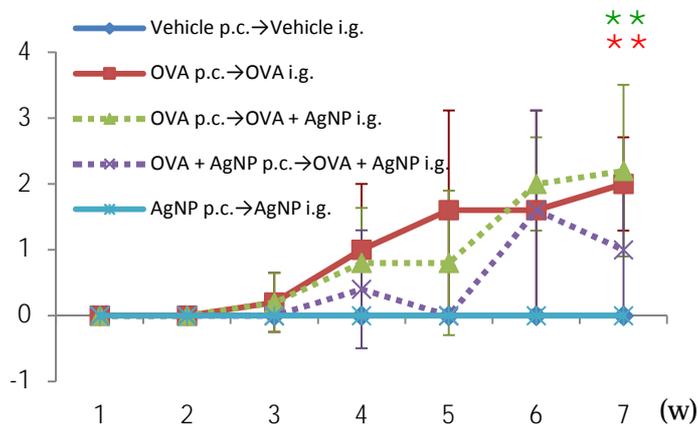
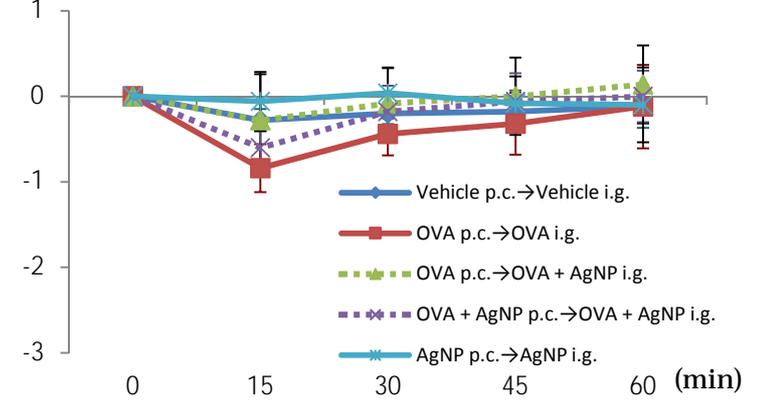


Figure 2. 体重変化・脾臓重量・リンパ節重量・大腸長 **【実験 A5】**

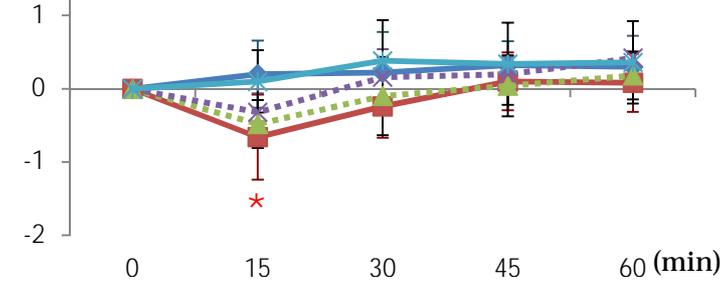
### Booster時の下痢スコア推移



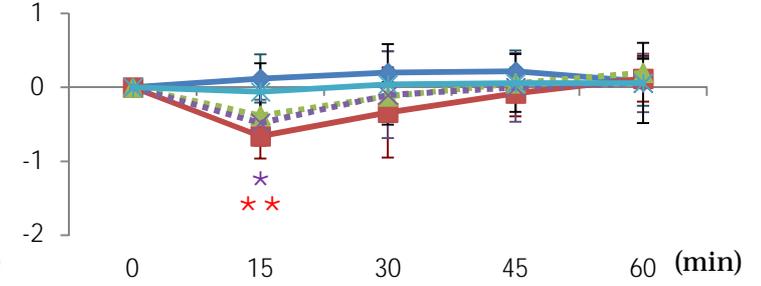
### Booster Rectal temperature (1)



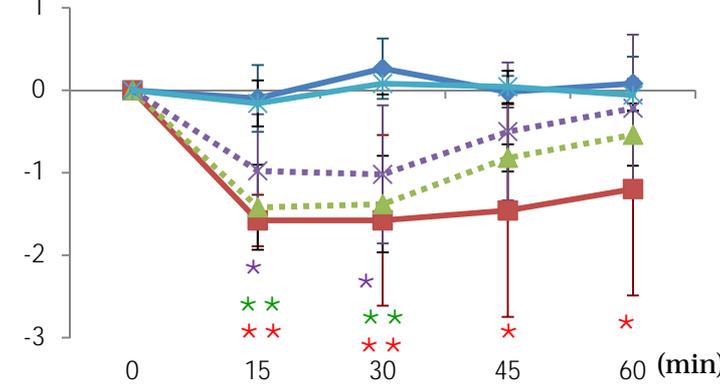
### Booster Rectal temperature (2)



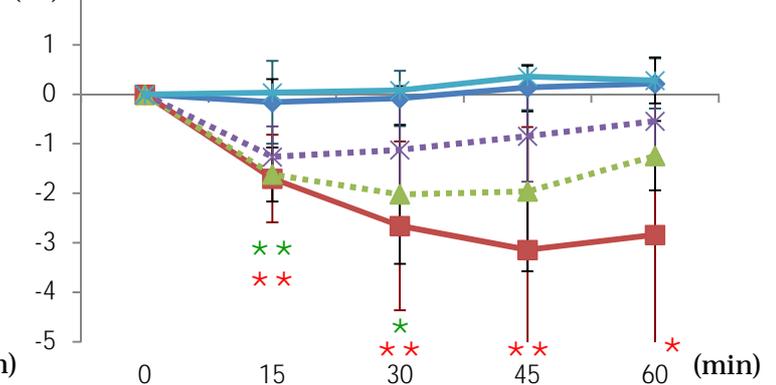
### Booster Rectal temperature (3)



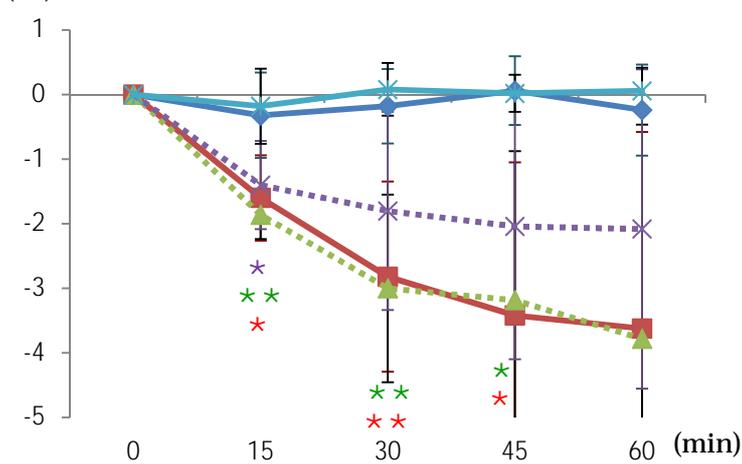
### Booster Rectal temperature (4)



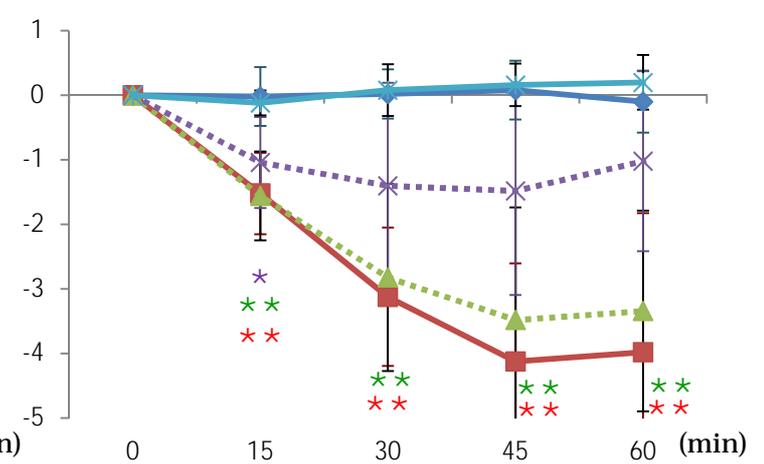
### Booster Rectal temperature (5)



### Booster Rectal temperature (6)



### Booster rectal temperature (7)



\*\* , \* : 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

**【実験 A5】**

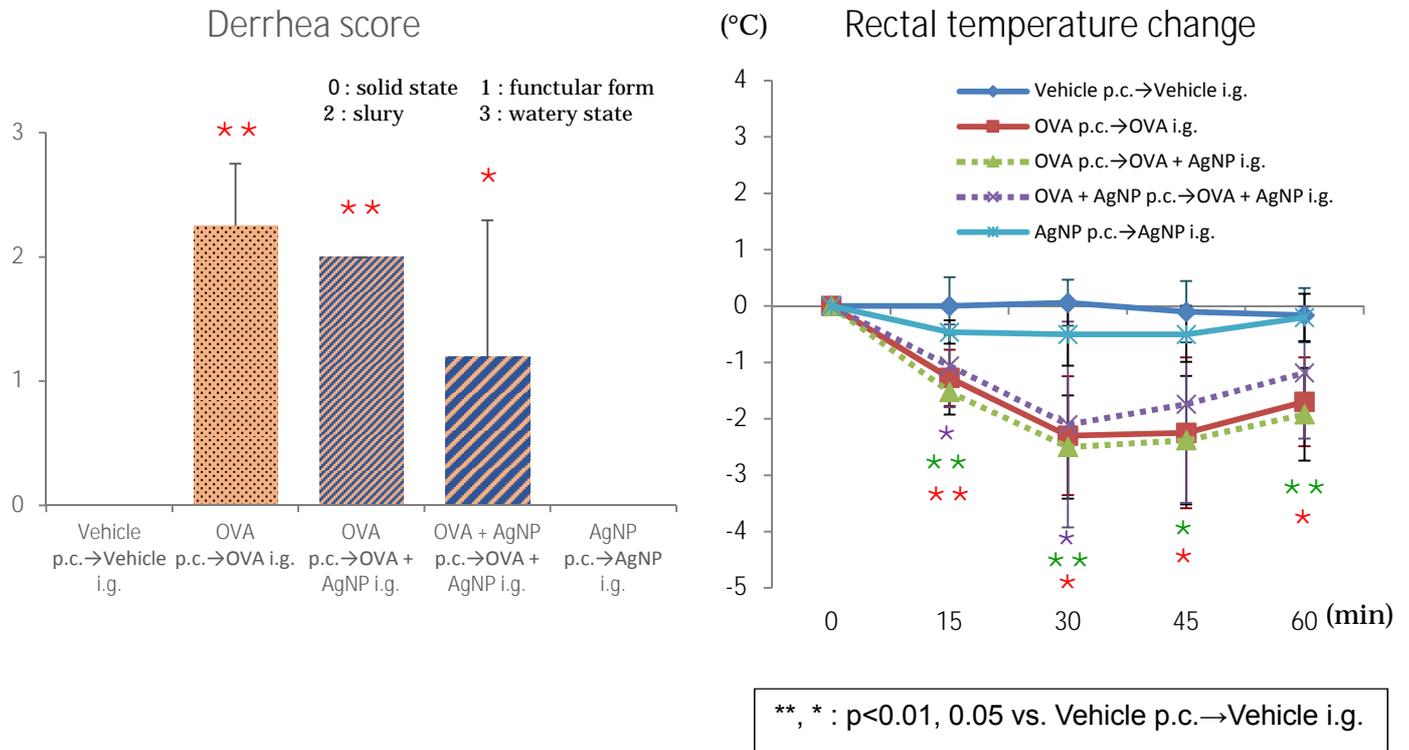


Figure 4. 惹起後下痢スコア・直腸温の経時変化【実験 A5】

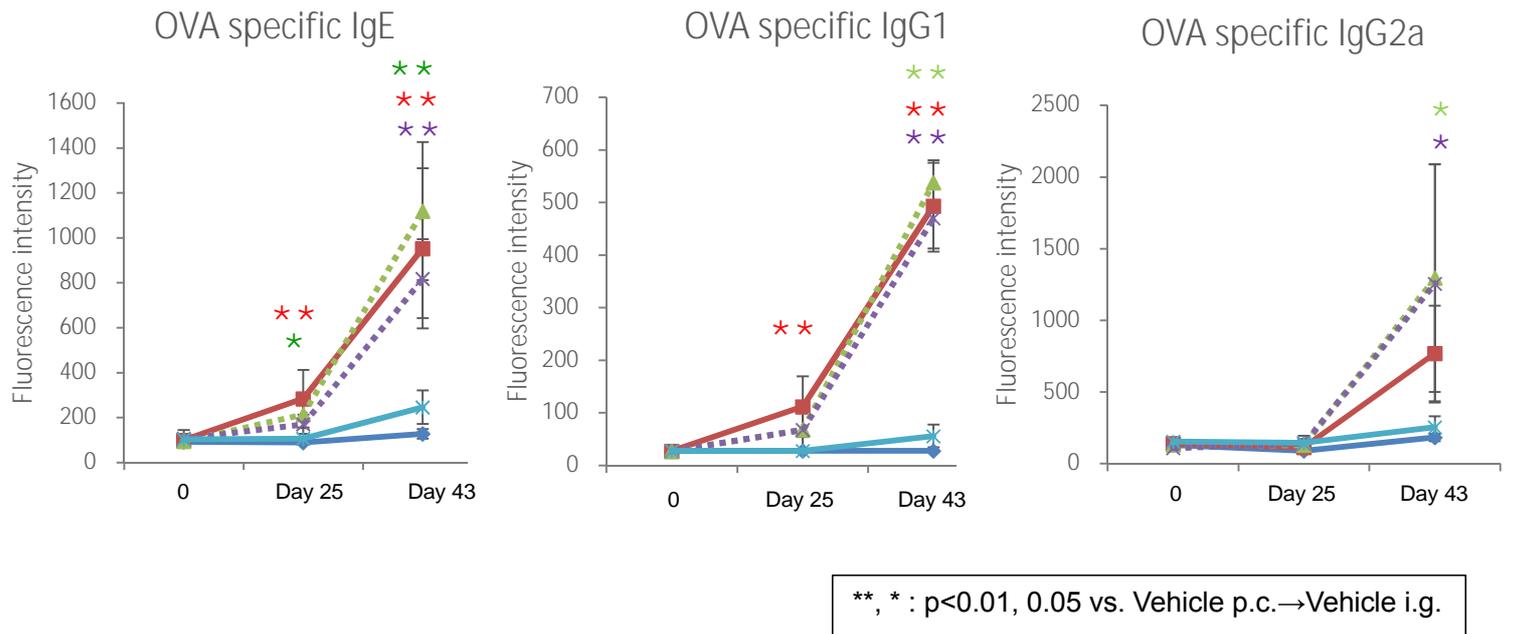
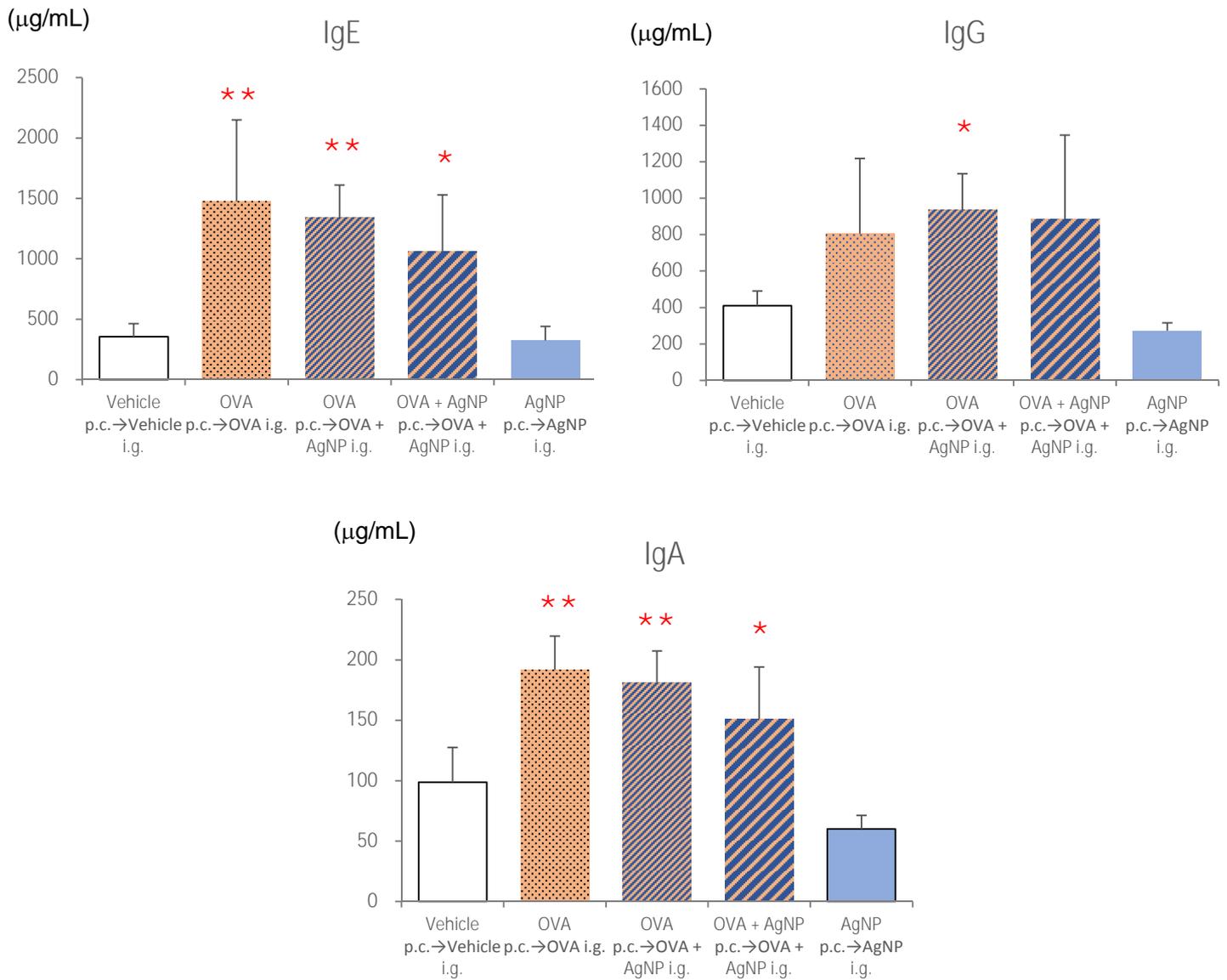


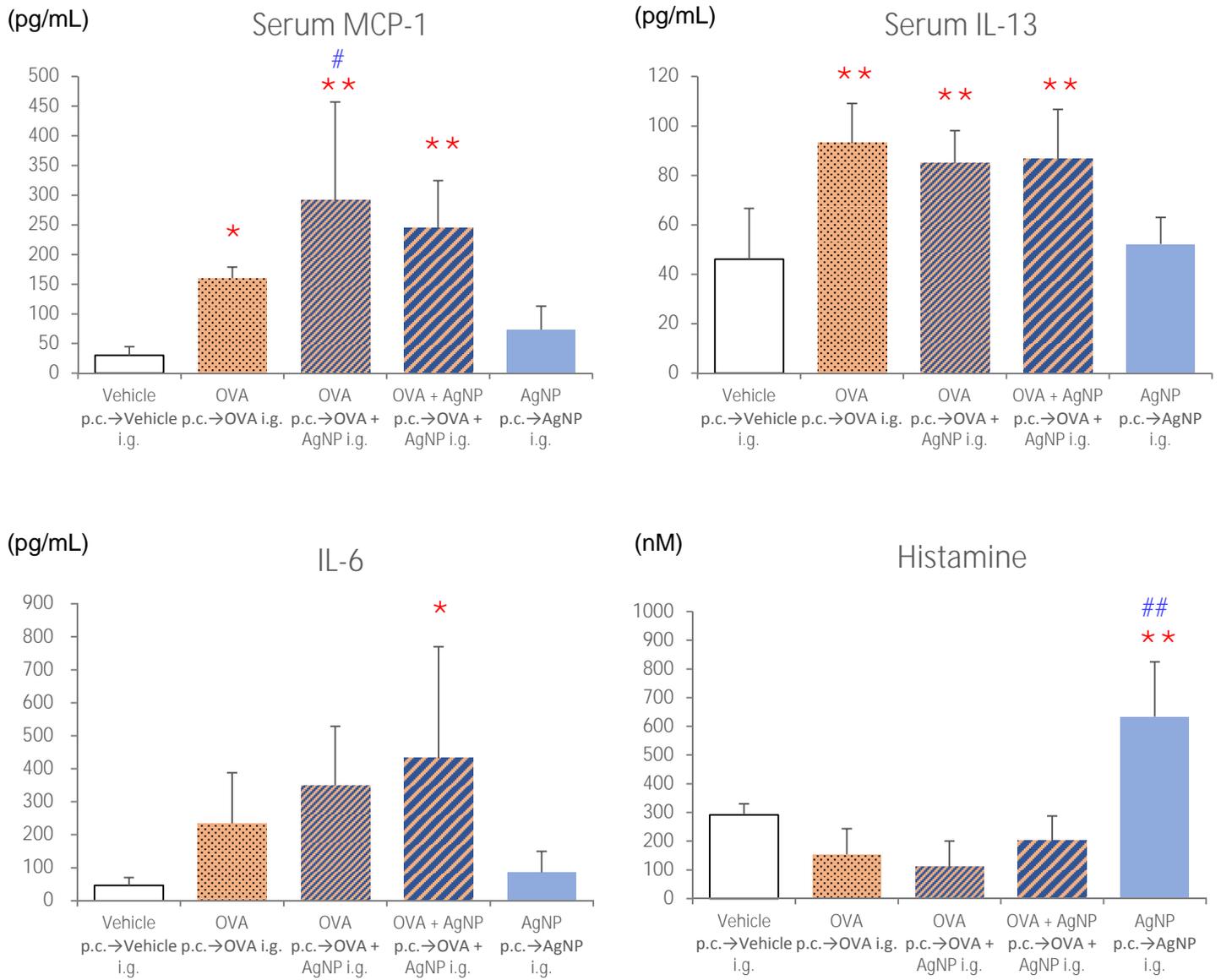
Figure 5. 血清中 OVA 特異抗体の経時的変化【実験 A5】



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

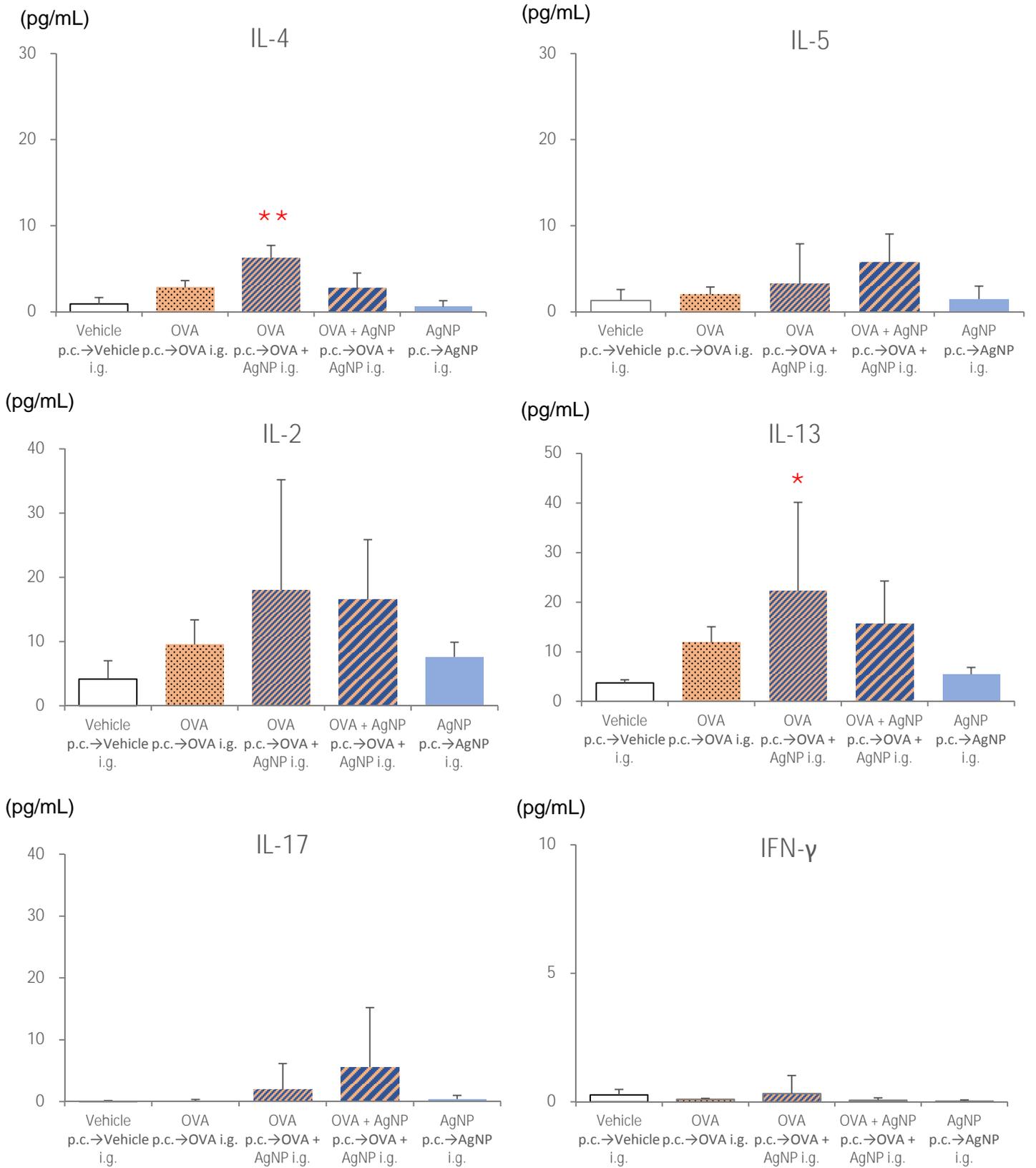
Figure 6. 血清中非特異抗体量

**【実験 A5】**



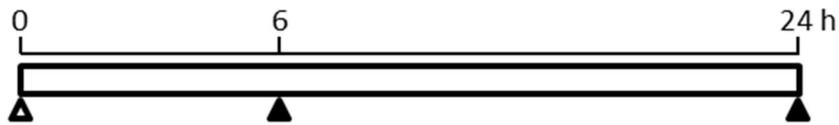
\*\* , \* : p<0.01, 0.05 vs. Vehicle p.c.→Vehicle i.g.  
 ##, # : p<0.01, 0.05 vs. OVA p.c.→OVA i.g.

Figure 7. 血清中サイトカイン濃度 **【実験 A5】**



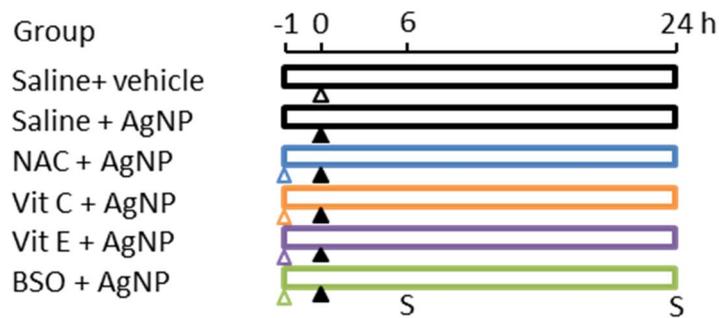
\*\* , \* : p<0.01, 0.05 vs. Vehicle p.c.→Vehicle i.g.

Figure 8. 脾臓細胞再抗原暴露誘導サイトカイン濃度 **【実験 A5】**



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

**Figure 1. 実験デザイン** 【実験 A6】



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

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

**Figure 2. 実験デザイン** 【実験 A7】

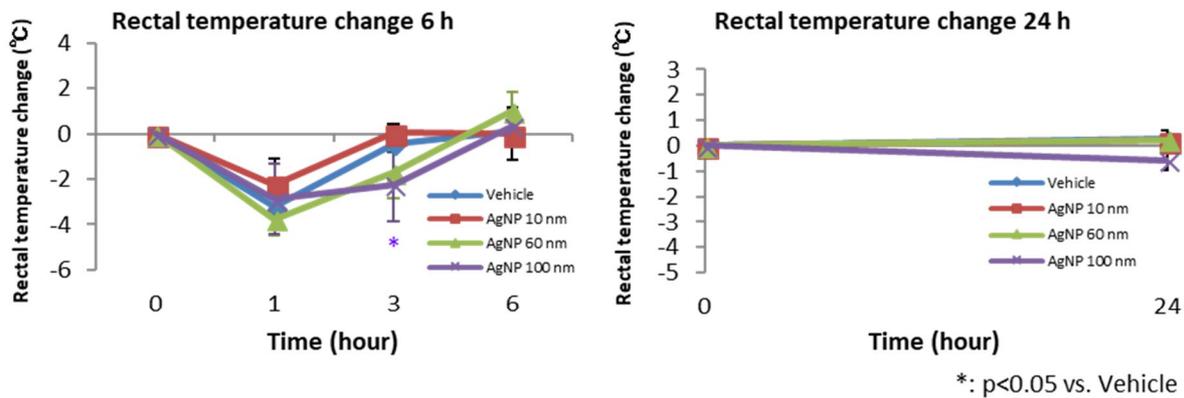


Figure 3. 相対肝重量及び体温変化【実験 A6】

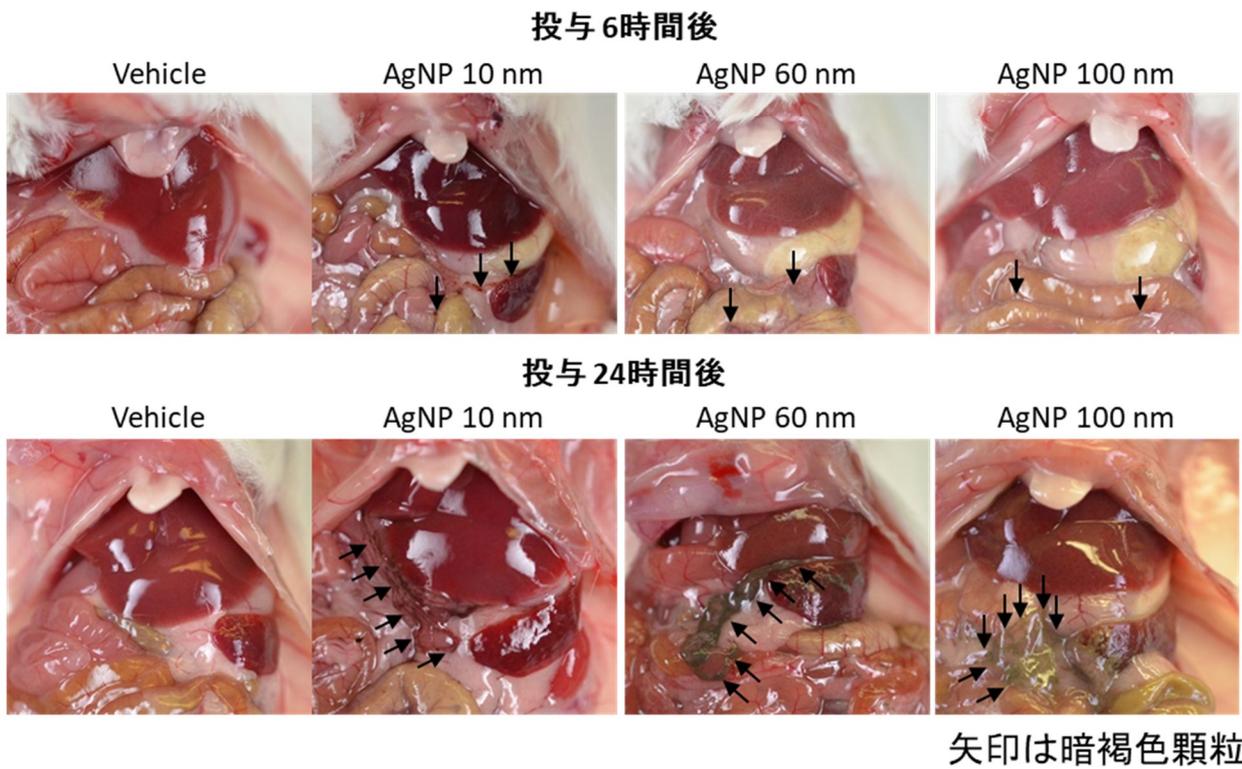


Figure 4. 剖検時の肉眼変化【実験 A6】

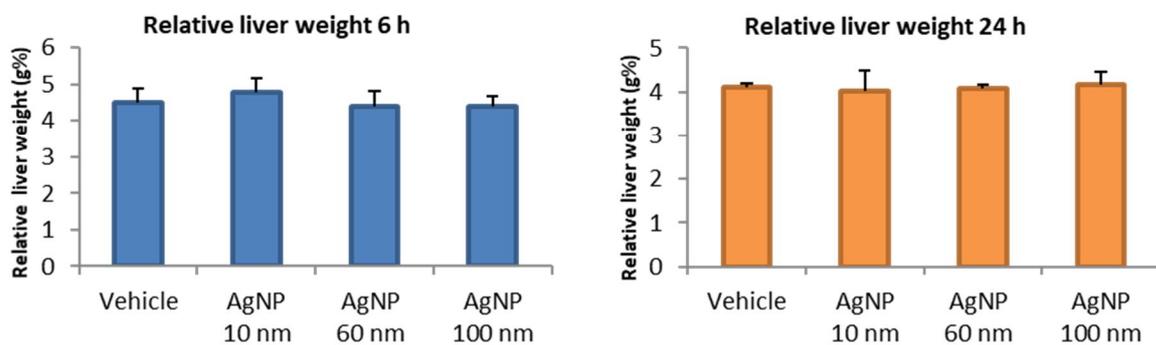


Figure 5. 相対肝重量【実験 A6】

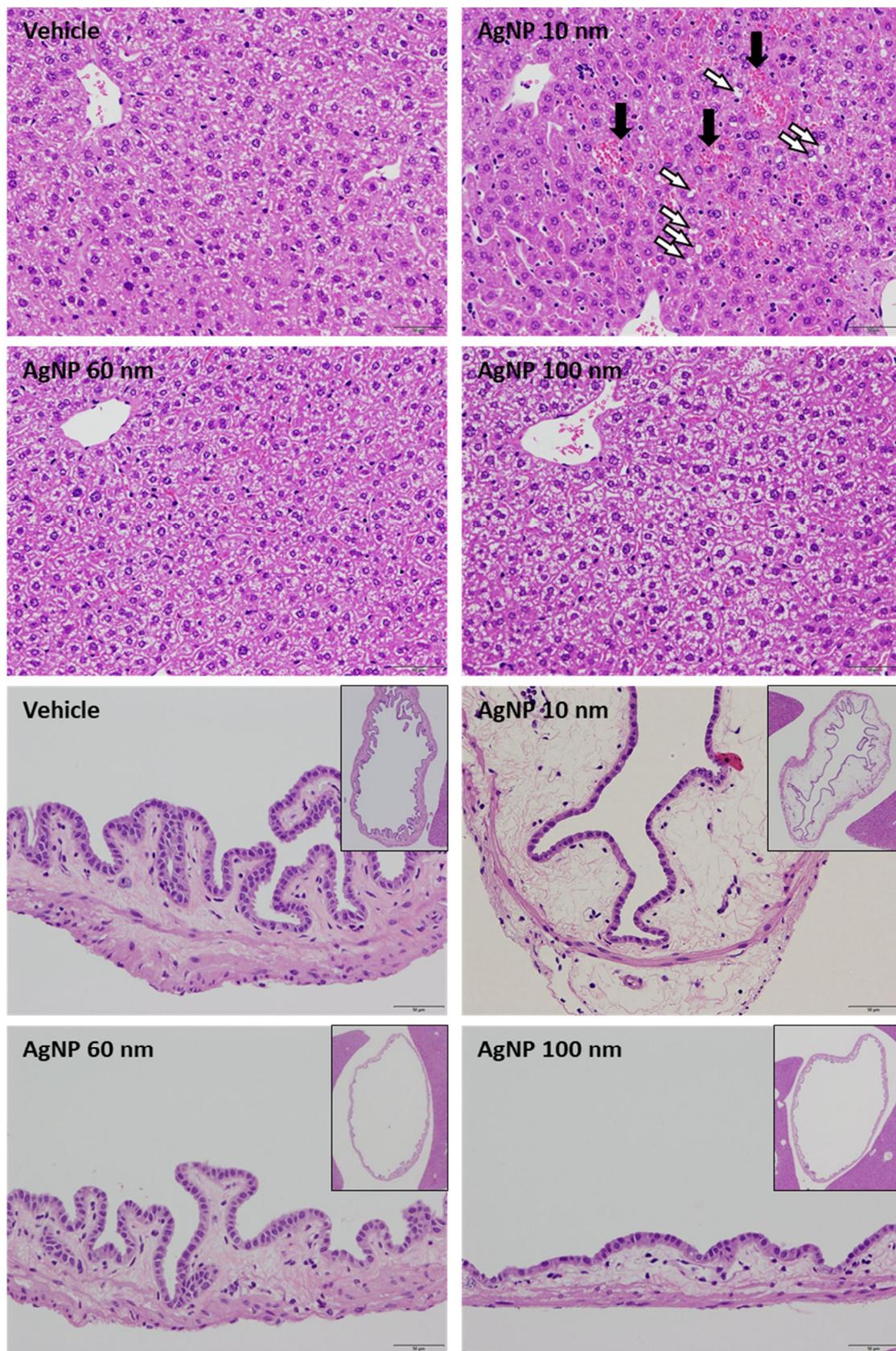
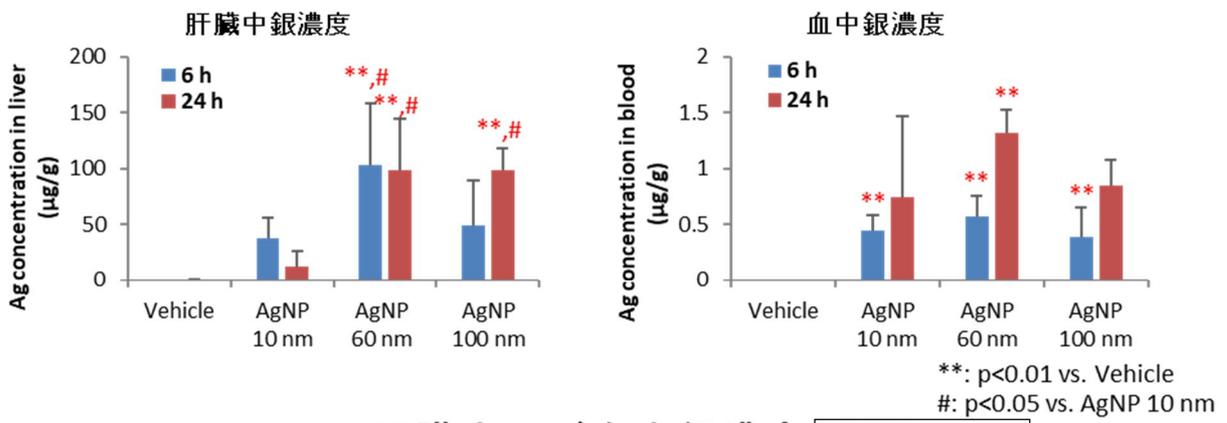
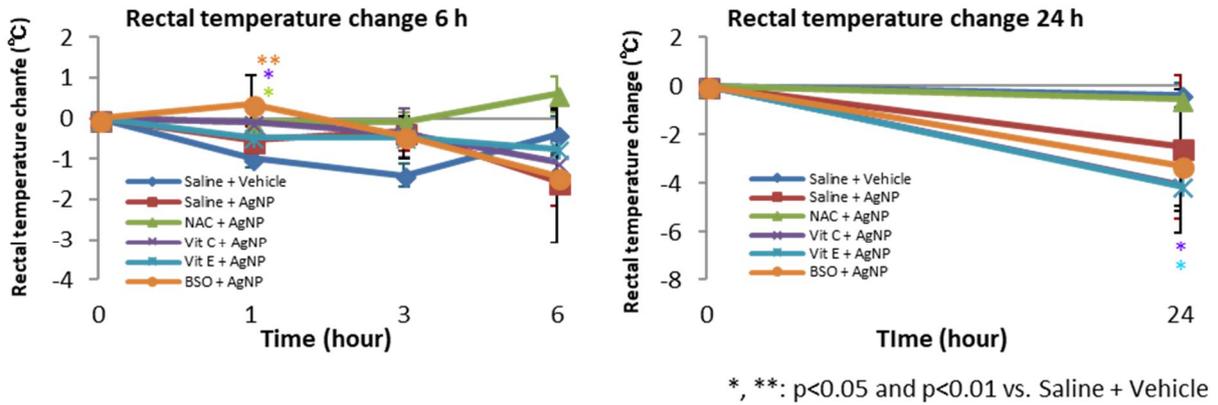


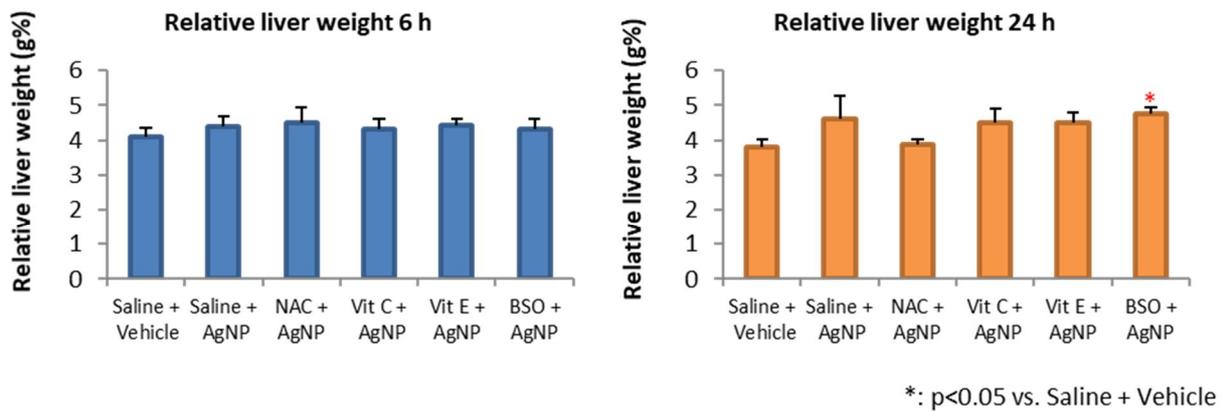
Figure 6. 肝臓及び胆嚢の病理組織写真 **【実験 A6】**  
 AgNP 10 nm 群の肝臓のうっ血（黒矢印）、肝細胞の空胞化（白矢印）及び胆嚢粘膜下並びに漿膜の浮腫が認められた。



**Figure 7. 肝臓中及び血中銀濃度** 【実験 A6】



**Figure 8. 相对肝重量及び体温変化** 【実験 A7】



**Figure 9. 相对肝重量** 【実験 A7】

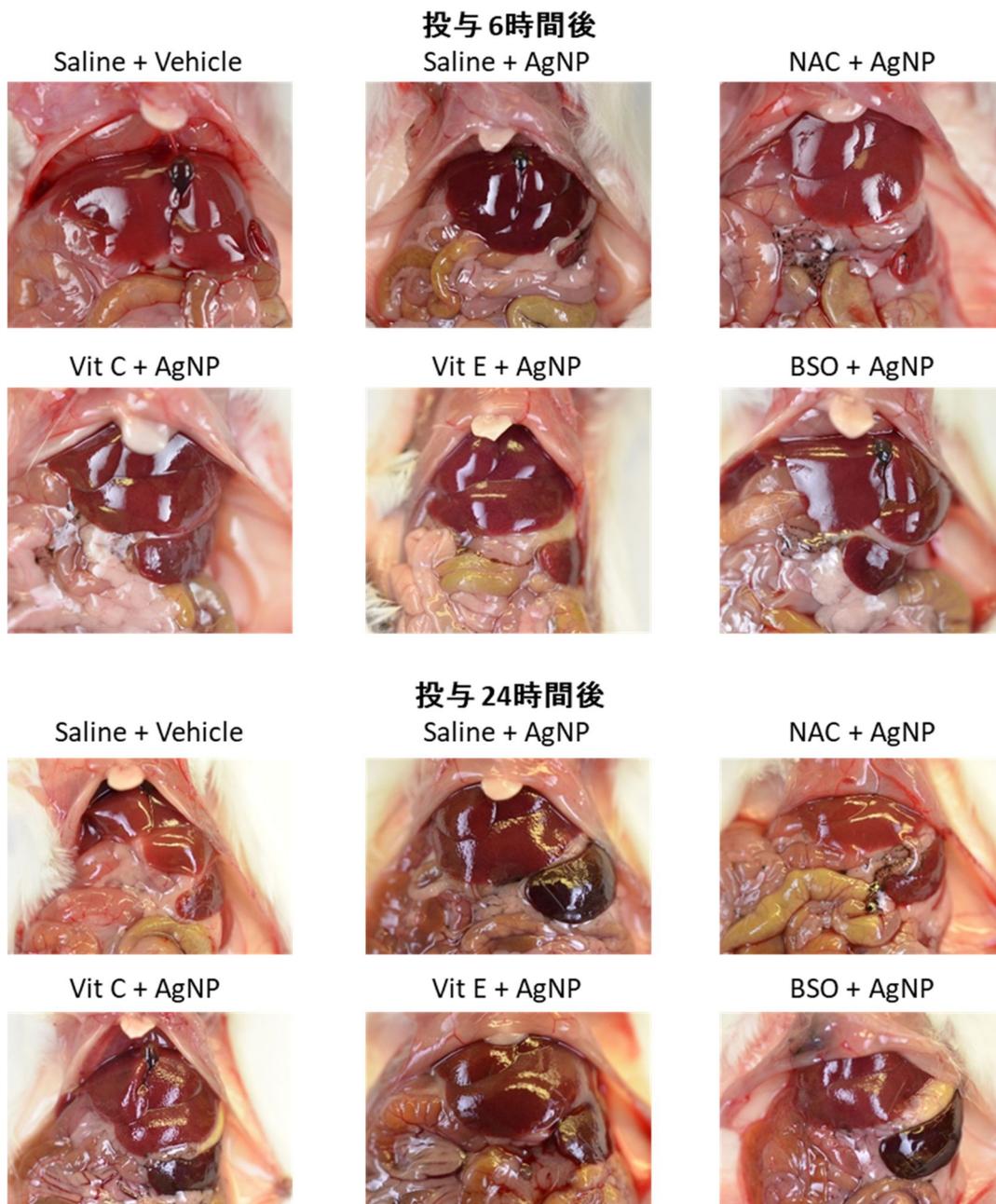


Figure 10. 剖検時の肉眼変化 【実験 A7】

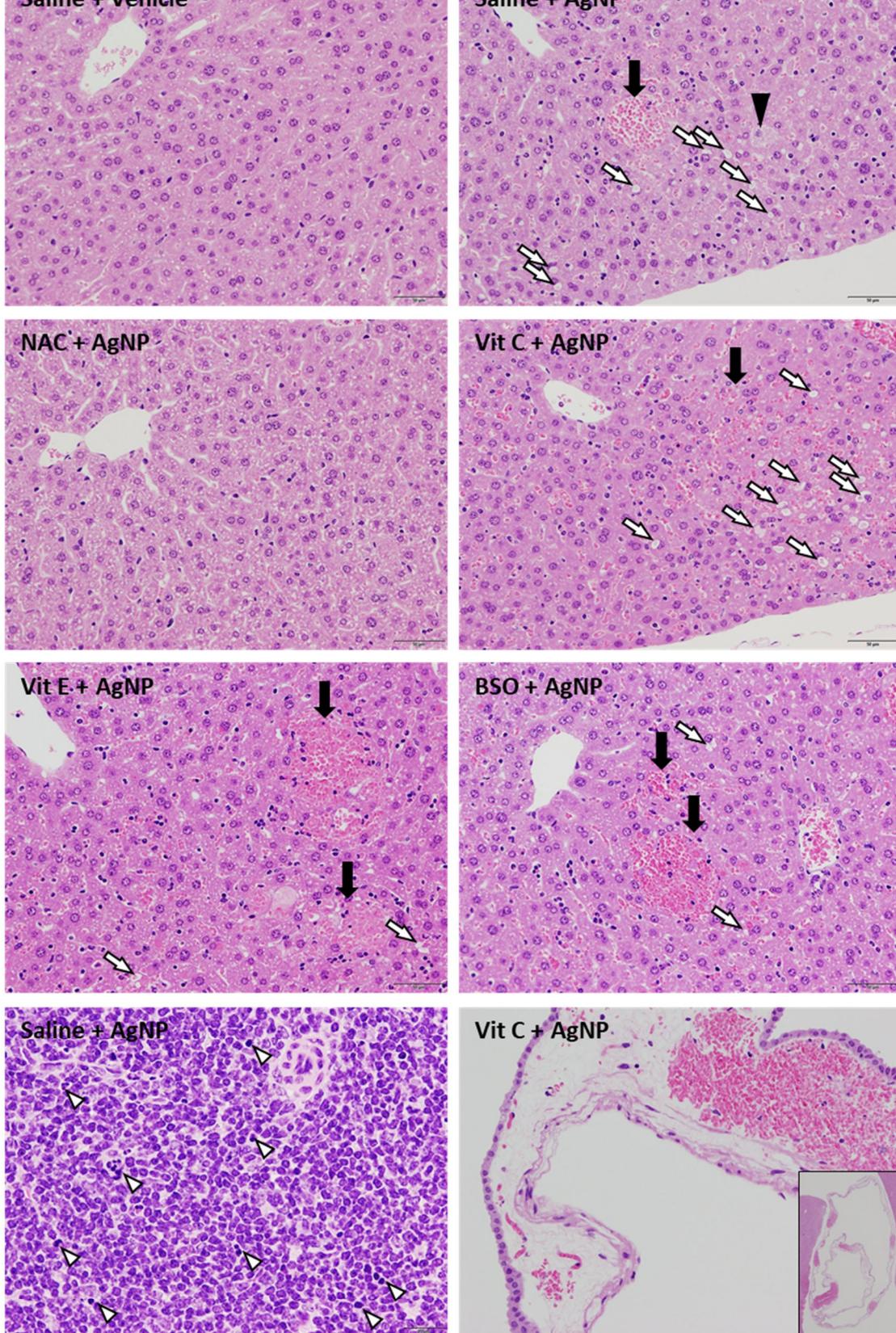


Figure 11. 肝臓、胆嚢、脾臓及び胆嚢の病理組織写真 **【実験 A7】**

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

**Table 1. Characteristics of tested AgNP reported by the manufacturer in the datasheet** 【実験 A6】

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

**Table 2. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP up to 6 hours** 【実験 A6】

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

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

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

**Table 4. Serum biochemistry for Balb/C mouse treated with AgNP and antioxidants** 【実験 A7】

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

Each value represents the mean ± S.D.

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

**Table 5. Serum biochemistry for Balb/C mouse treated with AgNP and antioxidants** 【実験 A7】

No. of animals		24 h					
		Saline + Vehicle	Saline + AgNP	NAC + AgNP	Vit C + AgNP	Vit E + AgNP	BSO + AgNP
		3	2	3	3	3	2
TP	g/dL	5.0 ± 0.1	4.4 ± 0.6	4.7 ± 0.1	4.1 ± 0.2**	4.3 ± 0.1*	4.2 ± 0.0*
ALB	g/dL	3.3 ± 0.1	2.9 ± 0.4	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.1*	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.1*
A/G		2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.8 ± 0.3
BUN	mg/dL	24.3 ± 2.7	21.6 ± 8.5	22.5 ± 1.5	29.3 ± 4.2	31.5 ± 3.1	24.8 ± 3.1
Cre	mg/dL	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.15 ± 0.02
Na	mEq/L	156 ± 2	154 ± 2	155 ± 0	156 ± 1	159 ± 5	157 ± 1
K	mEq/L	4.2 ± 0.3	3.8 ± 0.8	4.5 ± 0.2	3.9 ± 0.4	3.6 ± 0.4	3.6 ± 0.3
Cl	mEq/L	112 ± 7	109 ± 9	117 ± 1	105 ± 8	101 ± 4	110 ± 11
Ca	mg/dL	8.4 ± 0.3	8.0 ± 0.6	8.7 ± 0.2	7.8 ± 0.6	8.0 ± 0.0	8.1 ± 0.7
IP	mg/dL	10.2 ± 1.0	8.4 ± 2.2	9.9 ± 0.6	8.2 ± 0.7	8.5 ± 0.9	8.2 ± 1.7
AST	IU/L	79 ± 4	304 ± 359	69 ± 10	514 ± 166*	395 ± 46	384 ± 102
ALT	IU/L	34 ± 6	27 ± 16	20 ± 6	91 ± 105	22 ± 12	91 ± 47
ALP	IU/L	429 ± 88	400 ± 1	383 ± 29	389 ± 16	441 ± 9	360 ± 6
γGTP	IU/L	<3	<3	<3	<3	<3	<3
T-CHO	mg/dL	84 ± 6	71 ± 2*	78 ± 2	75 ± 3	97 ± 4*	77 ± 6
TG	mg/dL	36 ± 12	31 ± 5	29 ± 10	24 ± 12	29 ± 2	21 ± 18
BIL	mg/dL	0.07 ± 0.03	0.13 ± 0.07	0.07 ± 0.01	0.18 ± 0.05	0.18 ± 0.09	0.16 ± 0.01
Glucose	mg/dL	174 ± 20	125 ± 77	131 ± 18	97 ± 22	87 ± 28	82 ± 14

Each value represents the mean ± S.D.

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

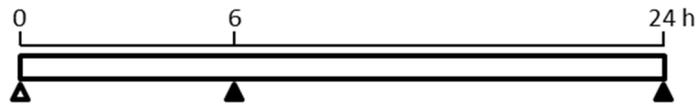
**Table 6. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP up to 6 hours** 【実験 A7】

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

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

**Table 7. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP up to 24 hours** 【実験 A7】

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



- ▲ Test chemicals exposure (i.p., 0.2 ml/mouse)
- Silver nanoparticles (5-100 nm AgNP PVP, i.p., 0.2 mg/mouse)
  - ① Saline (vehicle)
  - ② 5 nm AgNP PVP
  - ③ 10 nm AgNP PVP
  - ④ 60 nm AgNP PVP
  - ⑤ 100 nm AgNP PVP
- ▲ Sacrifice

Figure 1. 実験デザイン 【実験 A8】

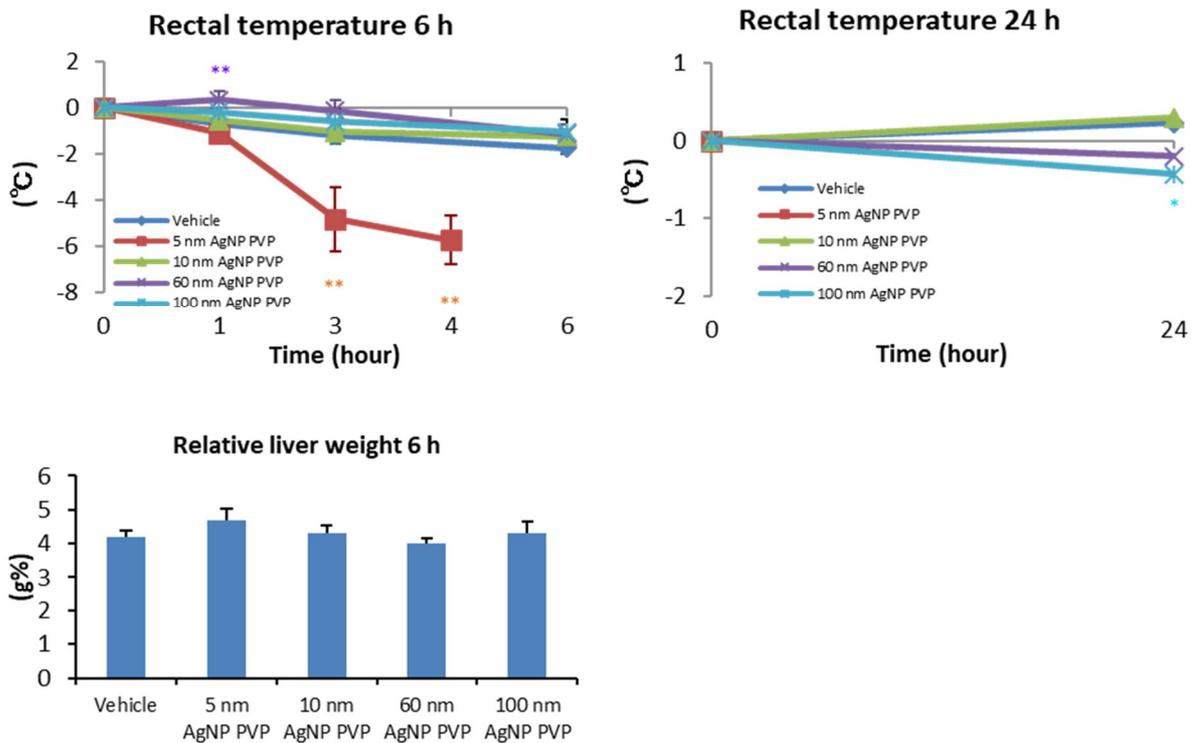
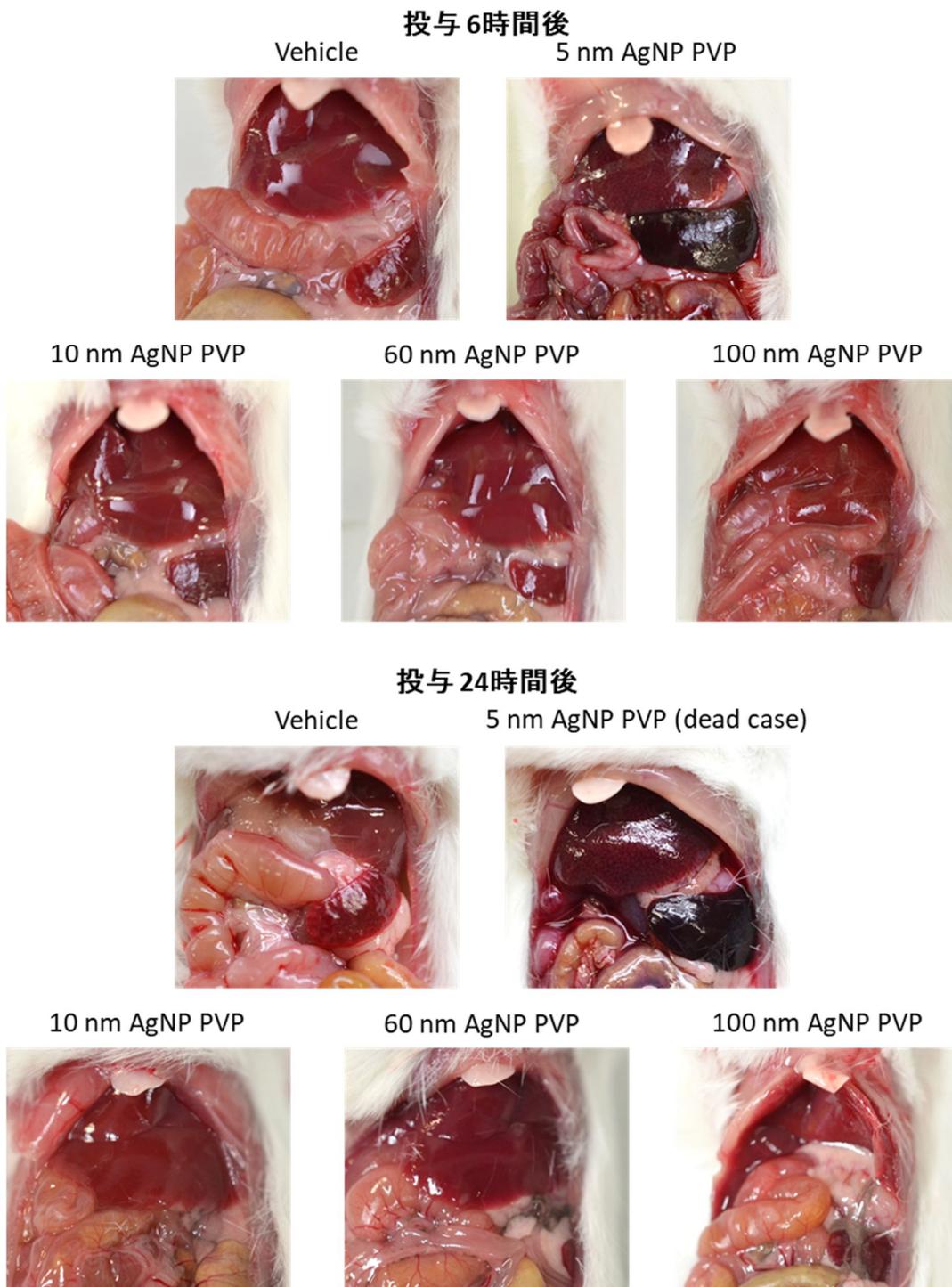


Figure 2. 体温変化及び相対肝重量 【実験 A8】



**Figure 3. 剖検時の肉眼変化** 【実験 A8】

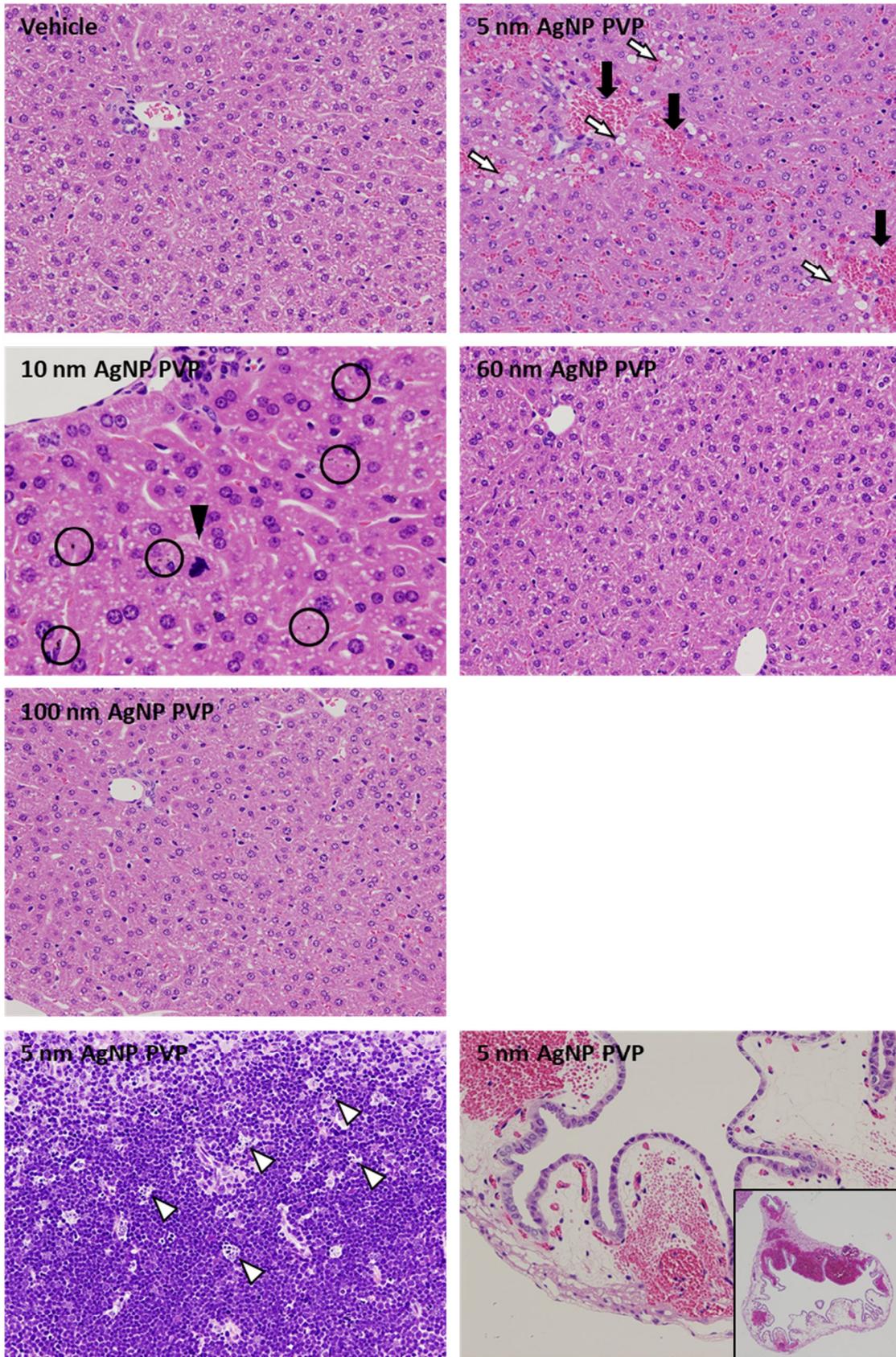


Figure 4. 肝臓、胆嚢、胸腺及び胆嚢の病理組織写真。

5 nm AgNP PVP 群の肝臓のうっ血 (黒矢印)、肝細胞の空胞化 (白矢印)、胸腺のアポトーシス (白矢頭) 及び胆嚢粘膜下・漿膜の浮腫並びに出血が認められた。10 nm AgNP PVP 群の肝臓の類洞内黒褐色色相沈着 (円内) 及び核分裂像 (黒矢頭) が観察された。

**【実験 A8】**

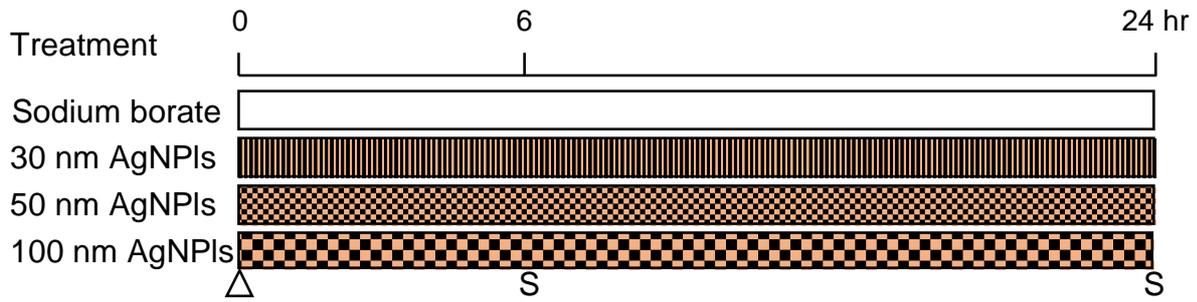
Table 1. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP PVP up to 6 hours

Organ and lesions	Treatment	6 hr				
		Vehicle	5 nm AgNP PVP	10 nm AgNP PVP	60 nm AgNP PVP	100 nm AgNP PVP
	No. of animals	5	4	5	5	5
Liver	Congestion, intermediate zone	0	4 **	0	0	0
	Increased cellular component in sinusoid	0	3 *	0	0	0
	Vacuolation, hepatocyte	0	4 **	0	0	0
	Single cell necrosis, hepatocyte	0	1	1	0	0
	Mitosis, hepatocyte	0	0	1	0	0
	Degeneration	0	0	1	0	0
	Dark brown pigment deposition in sinusoid	0	0	5 **	0	0
	Microgranuloma	1	0	0	2	2
Gallbladder	Edema, submucous	0	4 **	0	0	1
	Edema, subserosa	0	4 **	0	0	1
	Hemorrhage	0	1	0	0	0
Spleen	Congestion	0	1	0	1	0
Thymus	Apoptosis, cortex	0	4 **	0	0	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	3 *	5 **	5 **	4 *
Intestine	Congestion, small intestine, lamina propria	0	1	0	0	0
Mesenterium	Inflammatory cell foci +/-	5	4	2	3	2
	Inflammatory cell foci +	0	0	2	0	1
	Inflammatory cell foci ++	0	0	1	2	2
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	4 **	5 **	5 **	5 **
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, increased, lymphocyte	3	3	4	1	2
	Hemorrhage	0	1	0	0	0
Kidney	Regenerative tubules	4	3	5	3	3
Heart	Mineralization, epicardium	5	4	4	4	5
	Karyomegaly	0	0	0	1	0
Pancreatic lymph node	Hemorrhage	0	1	0	0	0

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

Table 2. Histopathological findings for Balb/C mice treated with PVP AgNP up to 24 hours

Organ and lesions	Treatment	24 hr				
		Vehicle	5 nm AgNP PVP	10 nm AgNP PVP	60 nm AgNP PVP	100 nm AgNP PVP
	No. of animals	3	0	3	3	3
Liver	Microgranuloma	0	0	0	1	2
Gallbladder	Edema, submucous	0	0	1	0	0
	Edema, subserosa +	0	0	1	0	0
Spleen	Congestion	0	0	1	0	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte +	0	0	2	3	3
Mesenterium	Inflammatory cell foci +/-	3	0	1	0	1
	Inflammatory cell foci +	0	0	1	2	0
	Inflammatory cell foci ++	0	0	1	1	2
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	0	3	3	3
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, increased, lymphocyte	1	0	0	0	0
Kidney	Regenerative tubules	1	0	2	1	2
Heart	Mineralization, epicardium	2	0	2	1	0
	Mineralization, myocardium	1	0	0	0	0
Pancreatic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	0	0	1	0
Cerebellum	Vacuolation	3	0	3	3	3



Animal ; 6 week old, BALB/c, female

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

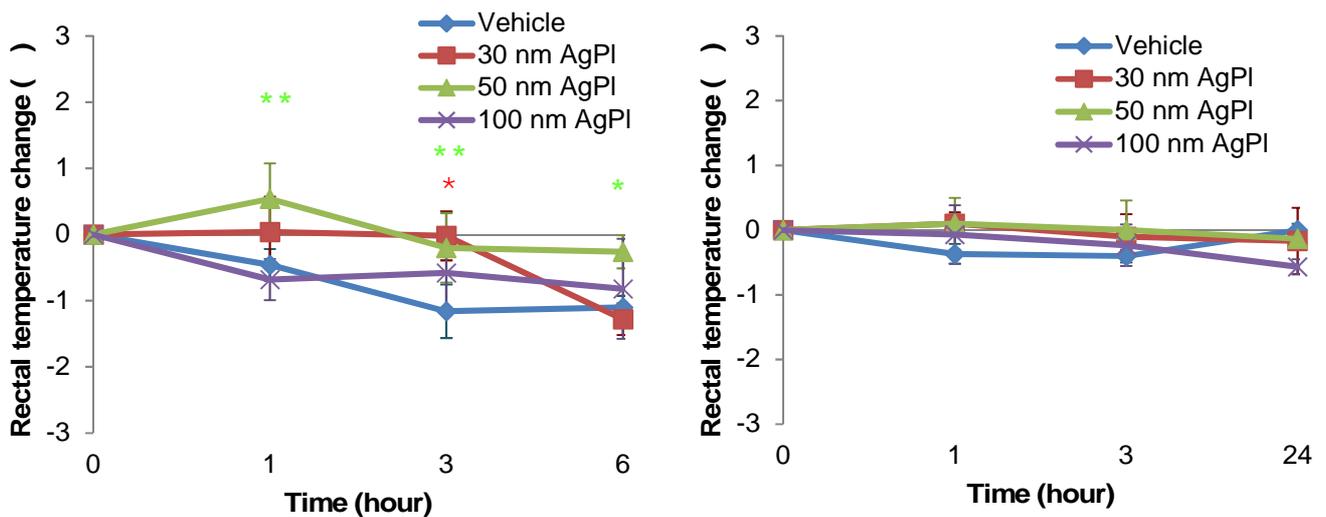
▨ Silver nanoplates (30 nm AgNPI, i.p., 0.2 mg/mouse)

▩ 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)

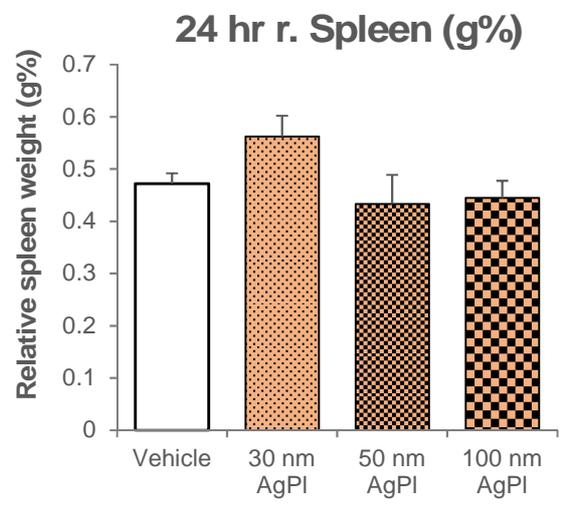
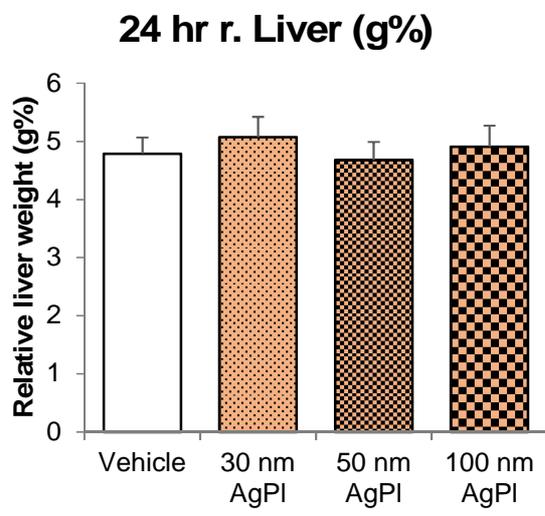
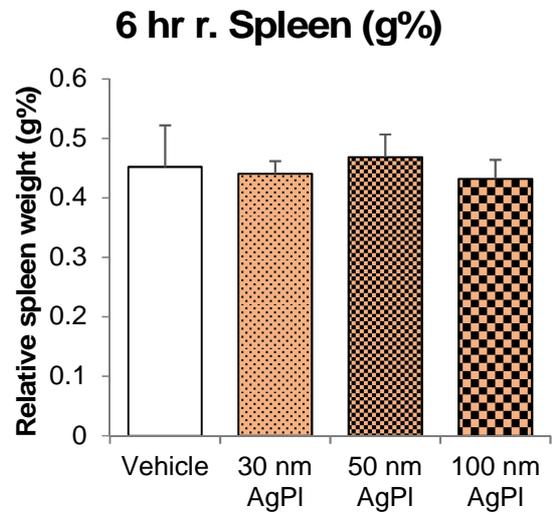
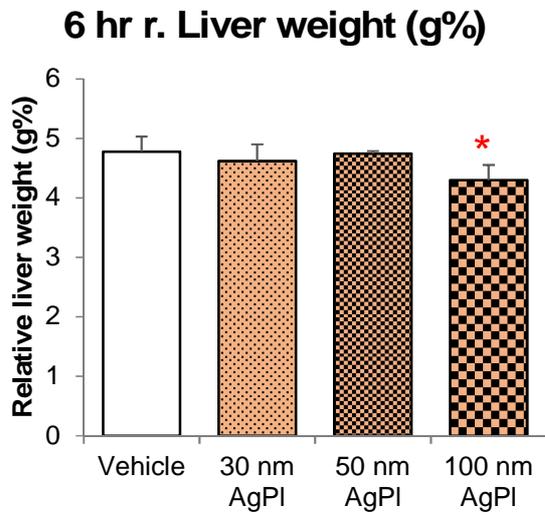
Figure 1. ナノ銀プレートのマウス腹腔内投 **【実験 A9】**



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

Figure 2. 直腸温の変化 (6 時間試験 , 24 時間試験)

**【実験 A9】**



\* : 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)

【実験 A9】

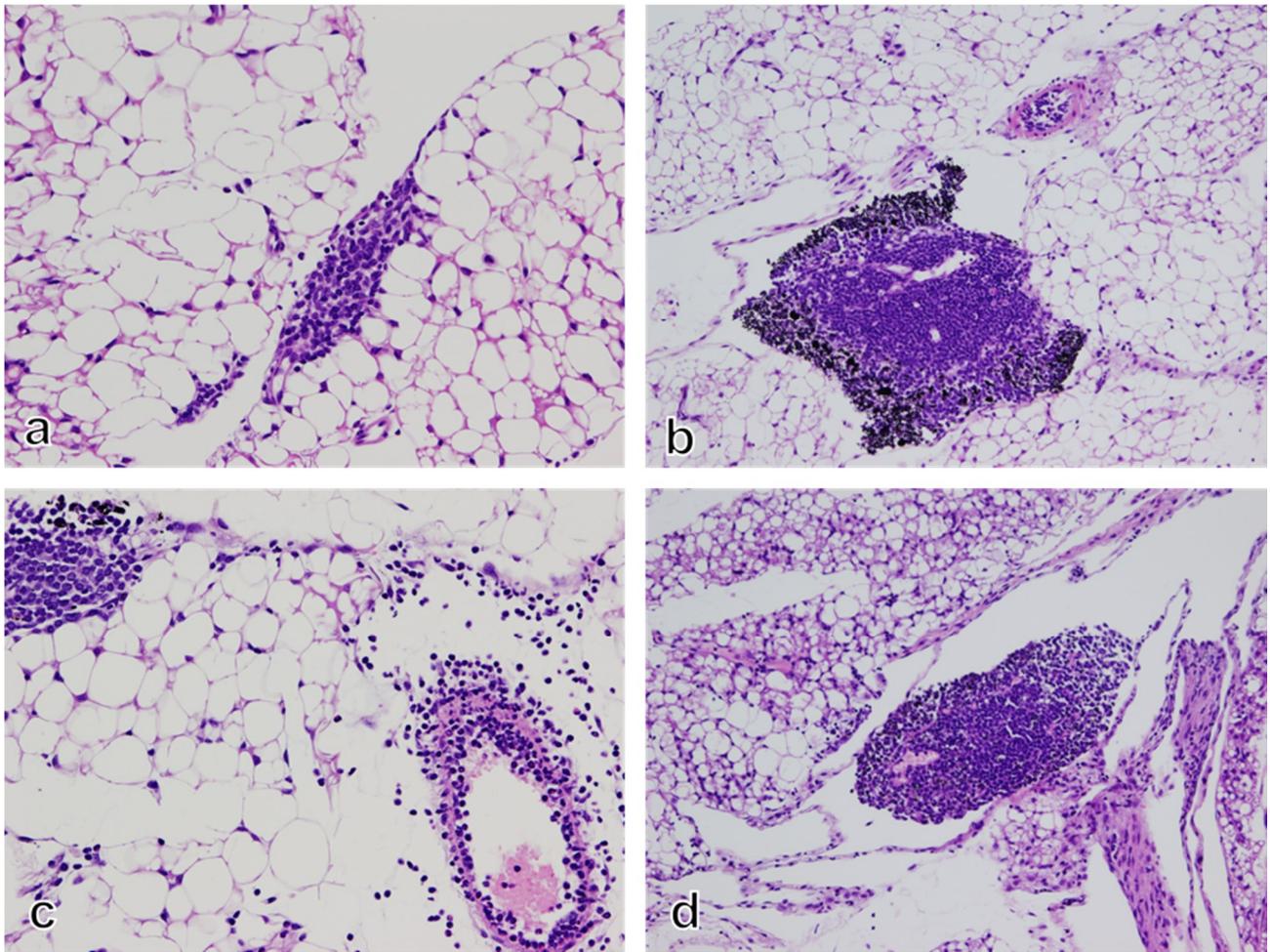


Figure 4. 病理組織学的変化

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)

【実験 A9】

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	

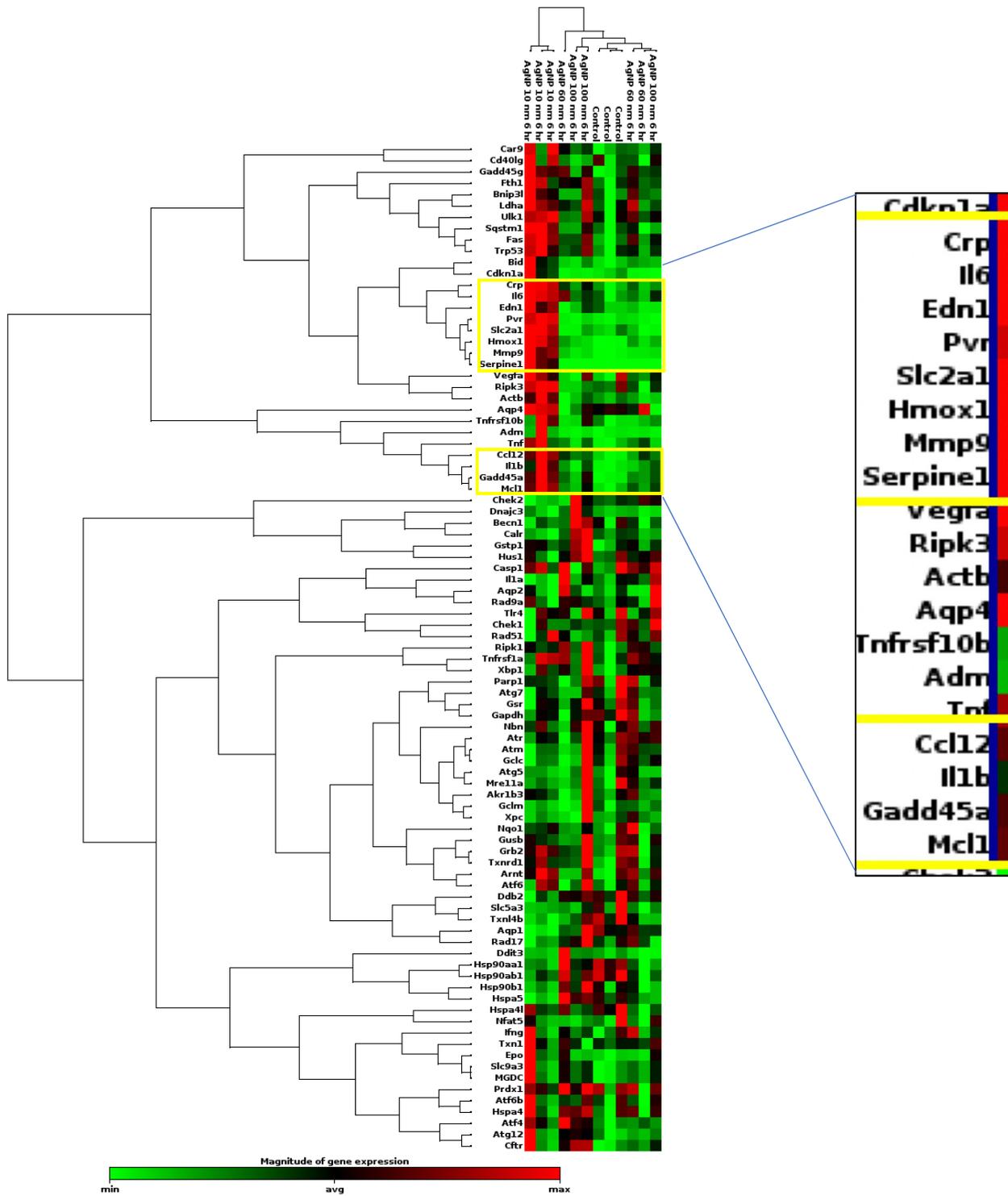


Figure 5. 直径 10, 60 及び 100 nm AgNP 粒子腹腔内投与 6 時間後のマウス肝臓の PCR array クラスタリング解

【実験 A10】

Table A-H29-1 各実験群の感作検体及び共存物質

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

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

**【実験 B1】**

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

実験2 抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタンの影響(1群5匹 x 8群)

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

**【実験 B2】**

※酸化チタンB(ルチル型、粒子径:35nm)

実験3 抗原の経皮感作に及ぼす酸化亜鉛の影響(1群5匹 x 8群)

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

**【実験 B3】**

※酸化亜鉛B(粒子径:35nm)

Table A-H30-1 各実験群の感作検体及び共存物質

実験4 抗原の経皮感作に及ぼす酸化亜鉛ナノマテリアルの影響(1群5匹 x 8群)

群名	感作検体	共存物質
V	PBS	—
OVA1	OVA 1 µg	—
OVA1 ZnO 1.25mg	OVA 1 µg	酸化亜鉛 1.25 mg
OVA1 ZnO 125µg	OVA 1 µg	酸化亜鉛 125 µg
OVA1 ZnO 12.5µg	OVA 1 µg	酸化亜鉛 12.5 µg
OVA1 ZnO 1.25µg	OVA 1 µg	酸化亜鉛 1.25 µg
OVA1 ZnO 125ng	OVA 1 µg	酸化亜鉛 125 ng
OVA1 ZnO 12.5ng	OVA 1 µg	酸化亜鉛 12.5 ng

※酸化亜鉛C(粒子径: 80 nm)

**【実験 B4】**

実験5 酸化亜鉛ナノマテリアルの腹腔内投与による急性毒性に関する検討(1群5匹 x 8群)

群名	投与物質	解剖時間
V-3h	Saline	3時間後
V-6h	Saline	6時間後
ZnO-A_3h	酸化亜鉛A (10 mg)	3時間後
ZnO-A_6h	酸化亜鉛A (10 mg)	6時間後
ZnO-B_3h	酸化亜鉛B (10 mg)	3時間後
ZnO-B_6h	酸化亜鉛B (10 mg)	6時間後
ZnO-C_3h	酸化亜鉛C (10 mg)	3時間後
ZnO-C_6h	酸化亜鉛C (10 mg)	6時間後

※酸化亜鉛A(粒子径: 25 nm)、B(35 nm)、C(80 nm)

**【実験 B5】**

実験6 経口惹起実験系に関する検討(1群3匹 x 4群)

群名	検体	感作(i.p.)	追加免疫(p.o.)	惹起(p.o.)	p.o.前絶食
OVA	OVA	1 µg+Alum	30 mg	100 mg	なし
OVA+S	OVA	1 µg+Alum	30 mg	100 mg	あり
OM	OM	1 µg+Alum	30 mg	90 mg	なし
OM+S	OM	1 µg+Alum	30 mg	90 mg	あり

**【実験 B6】**

Table A-H29-2 アナフィラキシー症状のスコアリング

Score 0	症状なし
1	口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ足で耳の穴を掻く
2	活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛
3	1分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣
4	ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣
5	死亡

**【実験 B1-B3】**

Table A-H30-2 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。

【実験 B4-B6】

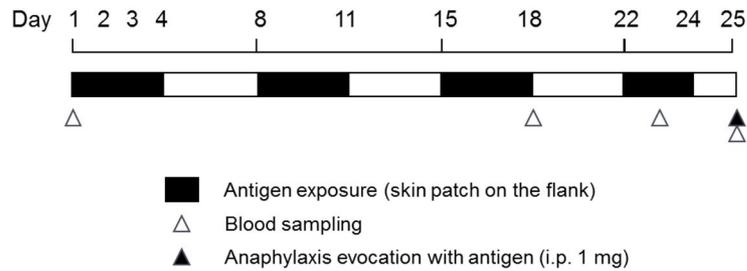


Figure A-H29-1 経皮感作試験スケジュール

【実験 B1-B3】

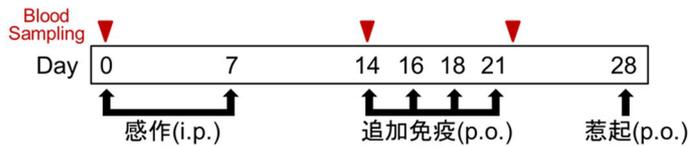
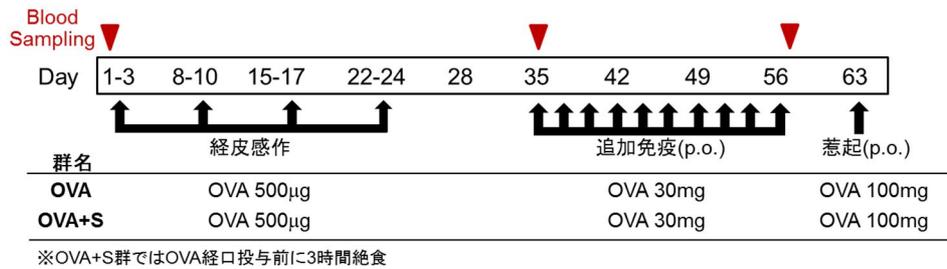


Figure A-H30-1 経口惹起試験のスケジュール

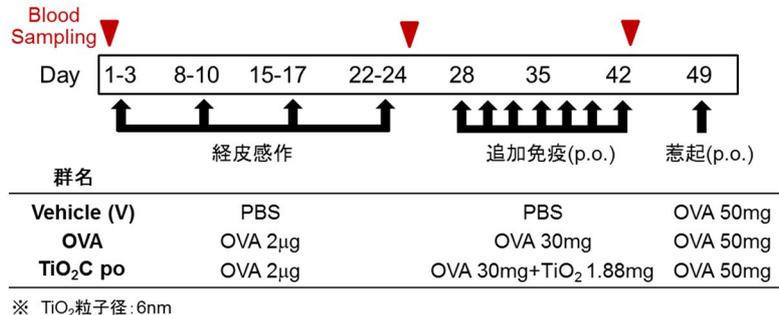
【実験 B4-B6】

実験7 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 B7】

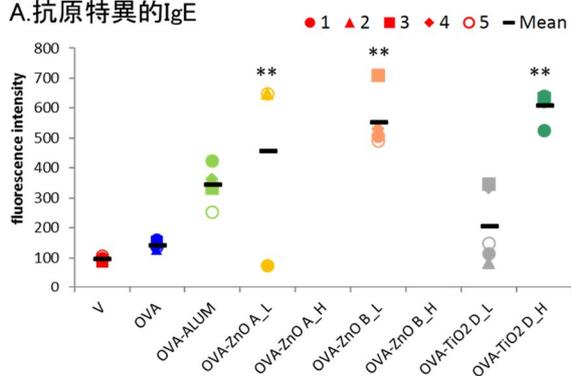
実験8 アレルゲン経皮感作後の経口投与に対するナノ酸化チタンの影響に関する検討(1群3匹 x 3群)



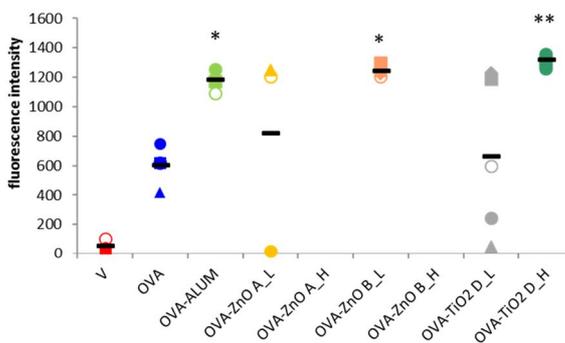
【実験 B8】

Figure A-R1-1 各実験群の設定および投与スケジュール

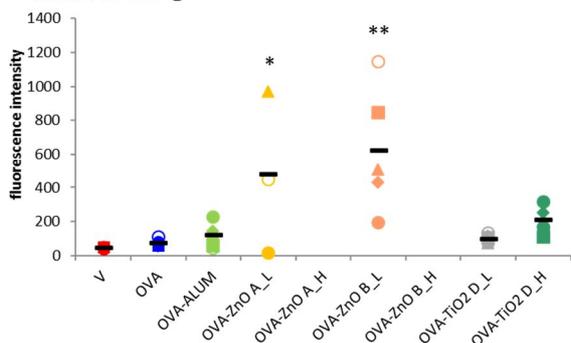
A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1



C. 抗原特異的IgG2a

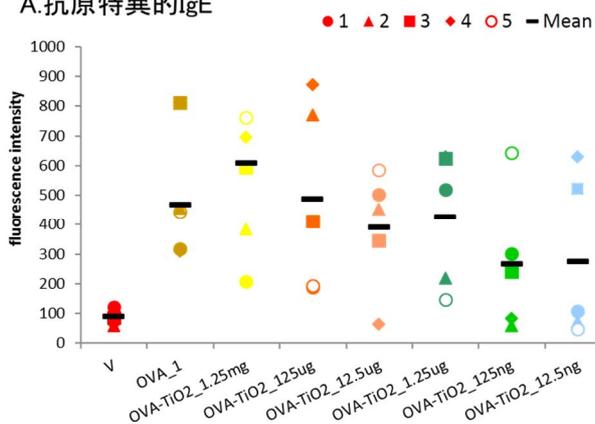


**【実験 B1】**

Figure A-H29-2 抗原の腹腔内投与による感作における抗原特異的抗体産生(【実験1】)

各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。  
\*p<0.05, \*\*p<0.01 by Dunnett's test vs. OVA group.

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

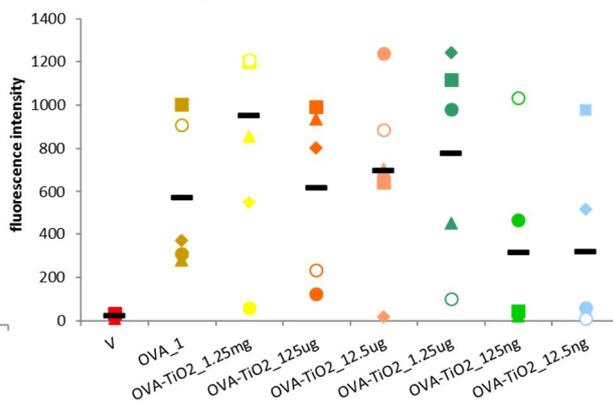
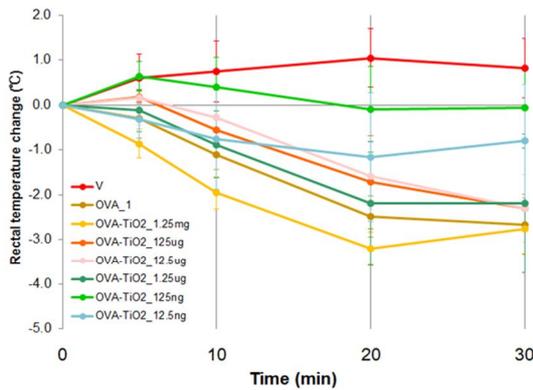


Figure A-H29-3 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験2】酸化チタンB)

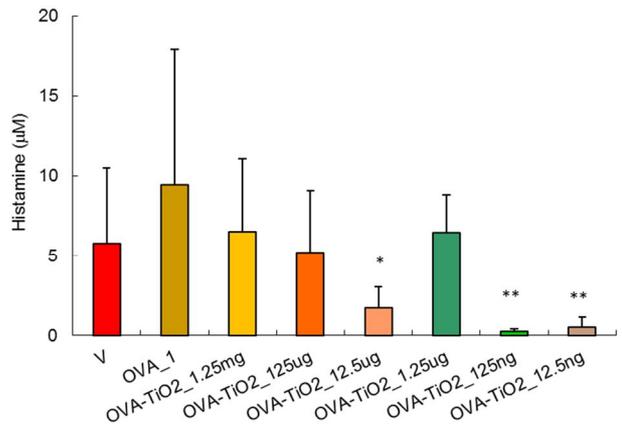
各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。  
OVA群と酸化チタン共存群との間で有意差は見られなかった。

**【実験 B2】**

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

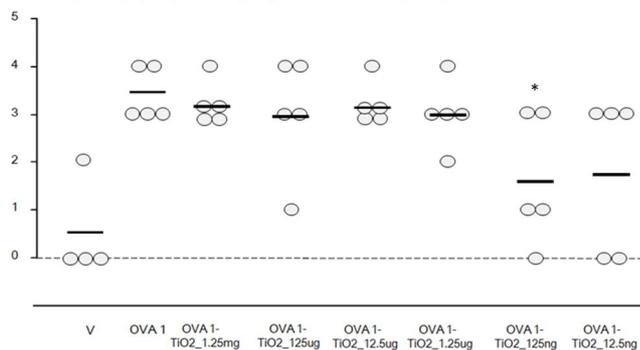
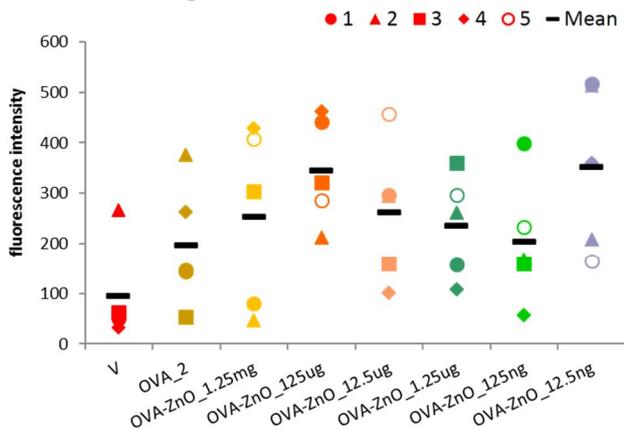


Figure A-H29-4 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験2】酸化チタンB)  
 A, B: 各群のデータをMean±S.D.で示す。C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。  
 \*p<0.05, \*\*p<0.01 by Dunnett's test vs. OVA group.

【実験 B2】

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

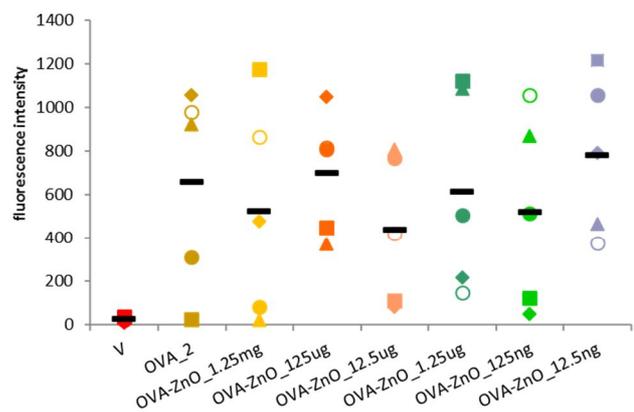
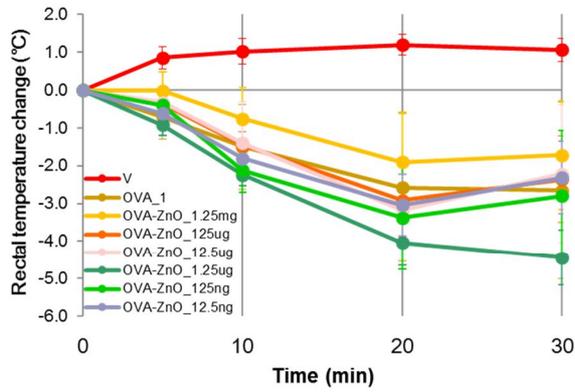


Figure A-H29-5 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験3】酸化亜鉛B)  
 各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。  
 OVA群と酸化チタン共存群との間で有意差は見られなかった。

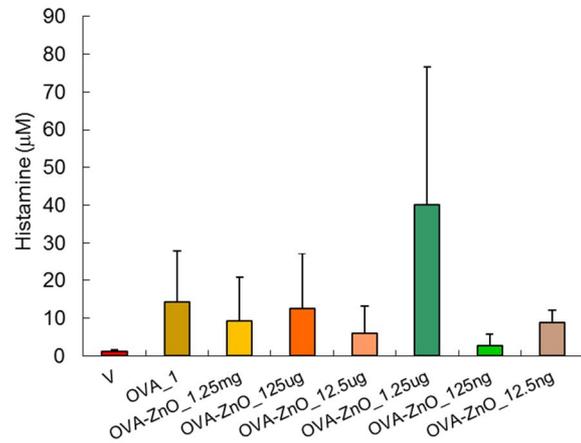
【実験 B3】



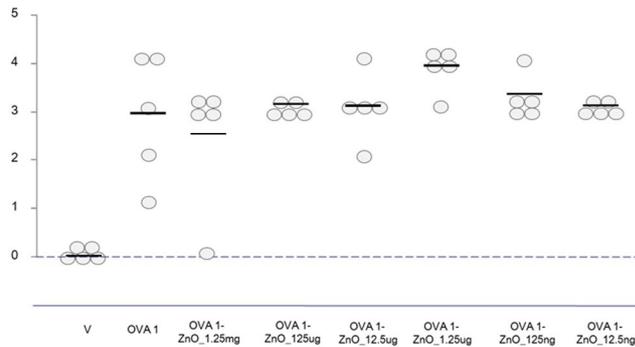
A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング



【実験 B4】

Figure A-H30-3 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験4】酸化亜鉛C)

A, B: 各群のデータをMean±S.D.で示す。C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。OVA群と酸化亜鉛共存群との間で有意差は見られなかった。

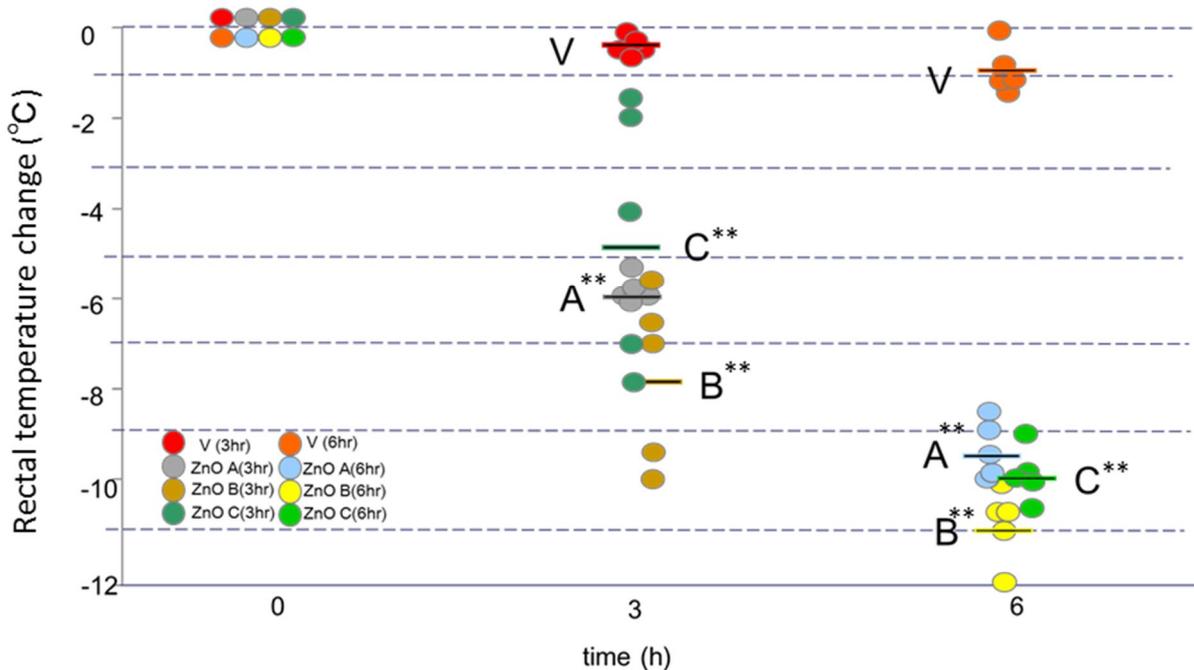


Figure A-H30-4 酸化亜鉛腹腔内投与後の体温変化(【実験5】)

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<0.01 by Dunnett's test vs. V group.

【実験 B5】

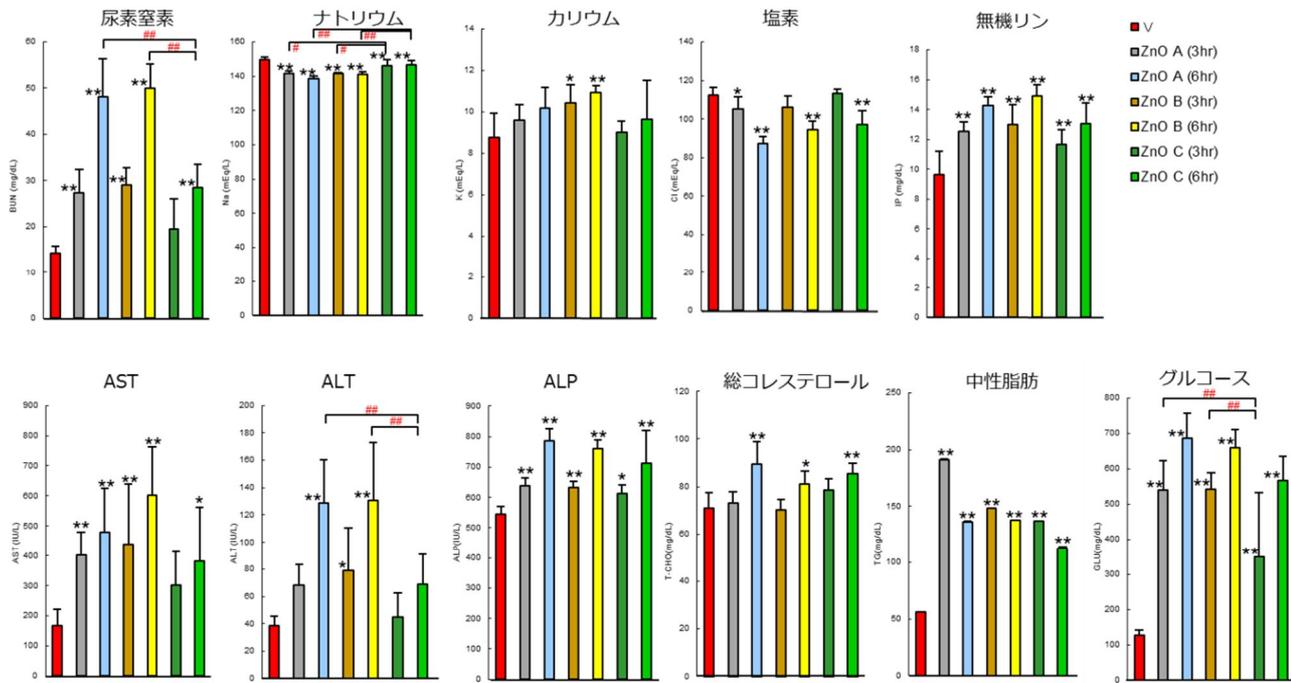


Figure A-H30-5-1 血液生化学検査の結果(【実験5】)

V群と酸化亜鉛投与群との比較において有意差が見られた項目を示す。

\*p<0.05, \*\*p<0.01 by Dunnett's test vs. V group.

#p<0.05, ##p<0.01 by Tukey-Kramer's test.

【実験 B5】

【実験 B5】

Table A-H30-3 Histopathological findings for Balb/C mice

Organ and lesions	Treatment No. of animals	V-3 h	V-6 h	ZnO-A 3 h	ZnO-A 6 h	ZnO-B 3 h	ZnO-B 6 h	ZnO-C 3 h	ZnO-C 6 h
		胸腺	アポトーシス(皮質) アポトーシス(髄質)	0 0	0 0	5** 0	5** 4*	5** 1	5** 1
胸腺(胸腔)リンパ節	褐色色素沈着 無構造物質の沈着	0 <sup>b</sup> 0 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup> 0 <sup>a</sup>	0 <sup>d</sup> 0 <sup>d</sup>	1 <sup>d</sup> 0 <sup>d</sup>	1 <sup>b</sup> 1 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup> 0 <sup>c</sup>	1 <sup>d</sup> 0 <sup>d</sup>	3 <sup>a</sup> 3 <sup>a</sup>
胆嚢	浮腫(粘膜下) 浮腫(漿膜下)	0 0	0 <sup>a</sup> 0 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup> 0 <sup>b</sup>	2 0	2 <sup>a</sup> 1 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup> 0 <sup>b</sup>	3 0	1 0

\*,\*\*; Significantly different from the V-3 h group at p<0.05 and 0.01, respectively. a; n=4, b; n=3, c; n=2, d; n=1.

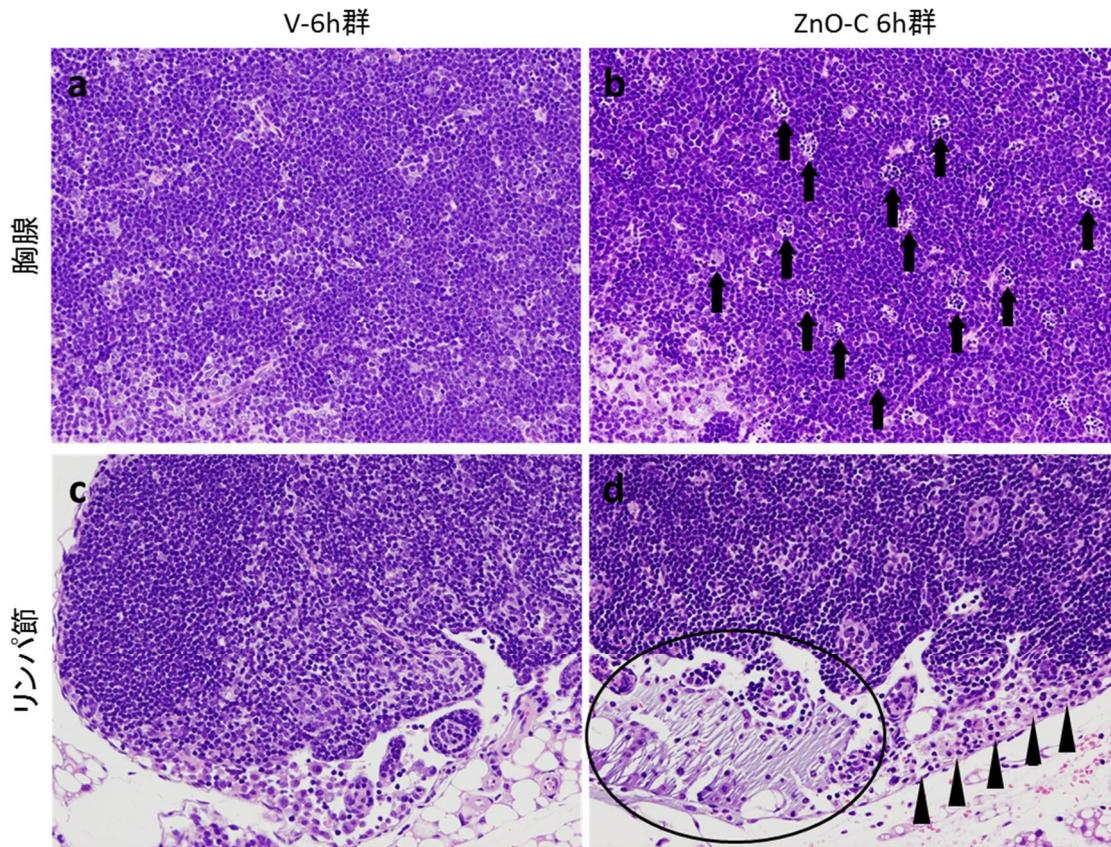
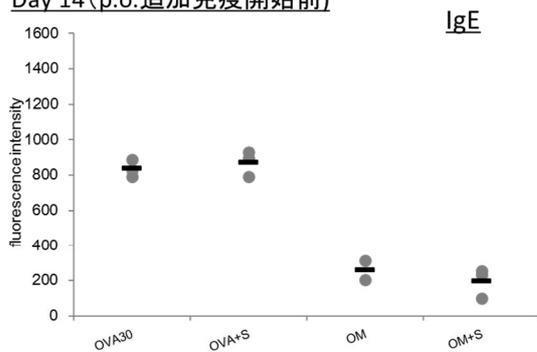


Figure A-H30-5-2 病理組織像(【実験5])

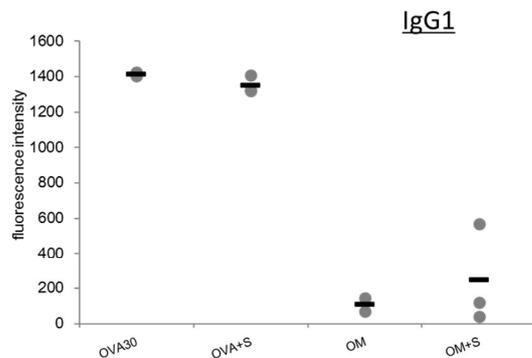
【実験 B5】

a 正常胸腺 (V-6h 群)、b 胸腺皮質のアポトーシス (矢印、ZnO-C 6h 群)、  
c 正常リンパ節 (V-6h 群)、d リンパ節の褐色色素 (矢頭) 及び無構造物質の沈着 (円内、ZnO-C 6h 群)

Day 14 (p.o.追加免疫開始前)



IgE



IgG1

Day 22 (p.o.追加免疫終了翌日)

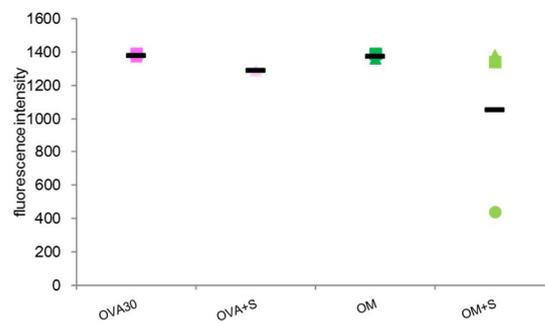
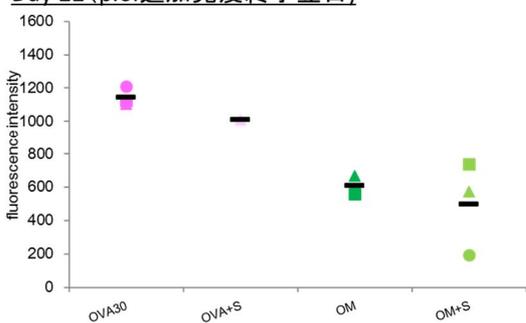
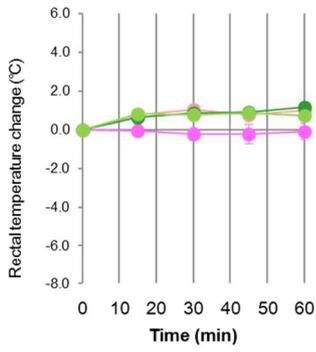


Figure A-H30-6 抗原i.p.感作及びp.o.追加免疫による抗体産生(【実験6])

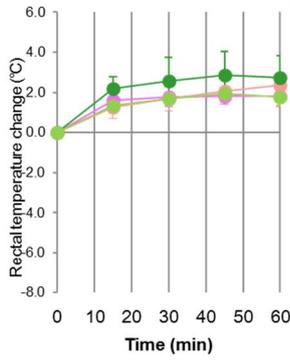
各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

【実験 B6】

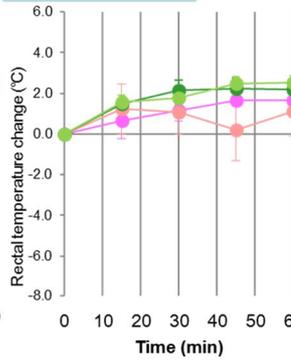
Day 14: 追加免疫1回目



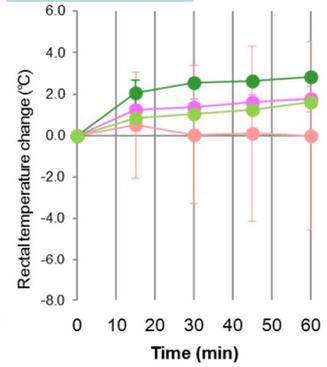
Day 16: 2回目



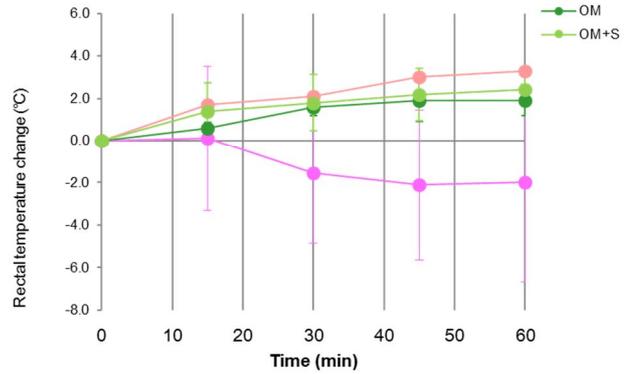
Day 18: 3回目



Day 21: 4回目



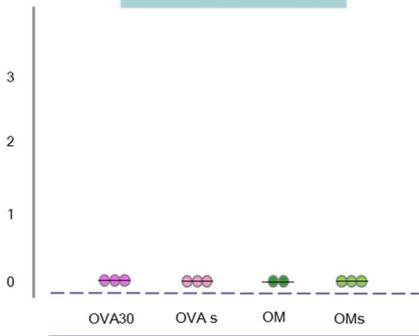
Day 28: 惹起



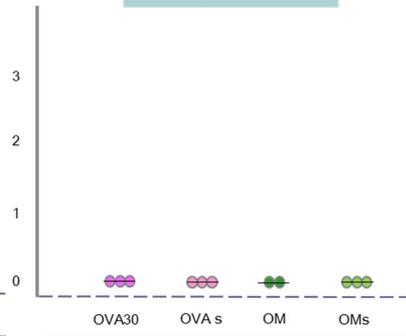
【実験 B6】

Figure A-H30-7 p.o.追加免疫及びp.o.惹起後1時間の体温変化(【実験6】) 各群のデータをMean±S.D.で示す。

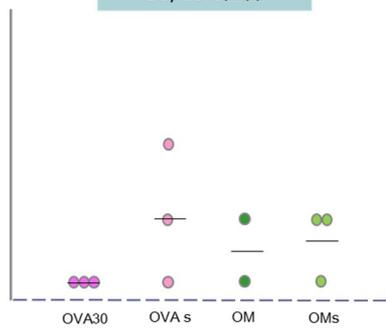
Day 14: 追加免疫1回目



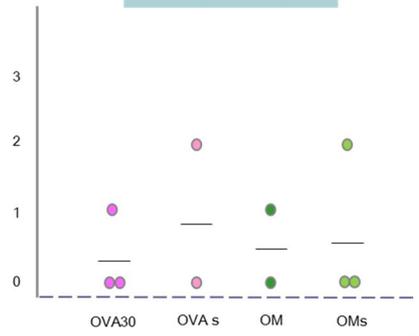
Day 16: 2回目



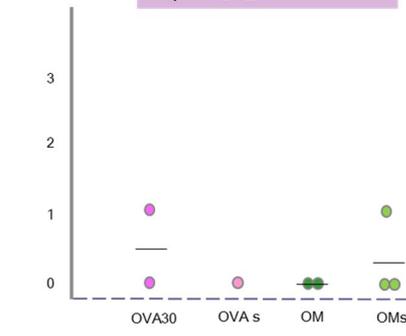
Day 18: 3回目



Day 21: 4回目



Day 28: 惹起



【実験 B6】

Figure A-H30-8 p.o.追加免疫及びp.o.惹起後1時間の下痢症状スコアリング(【実験6】) 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。

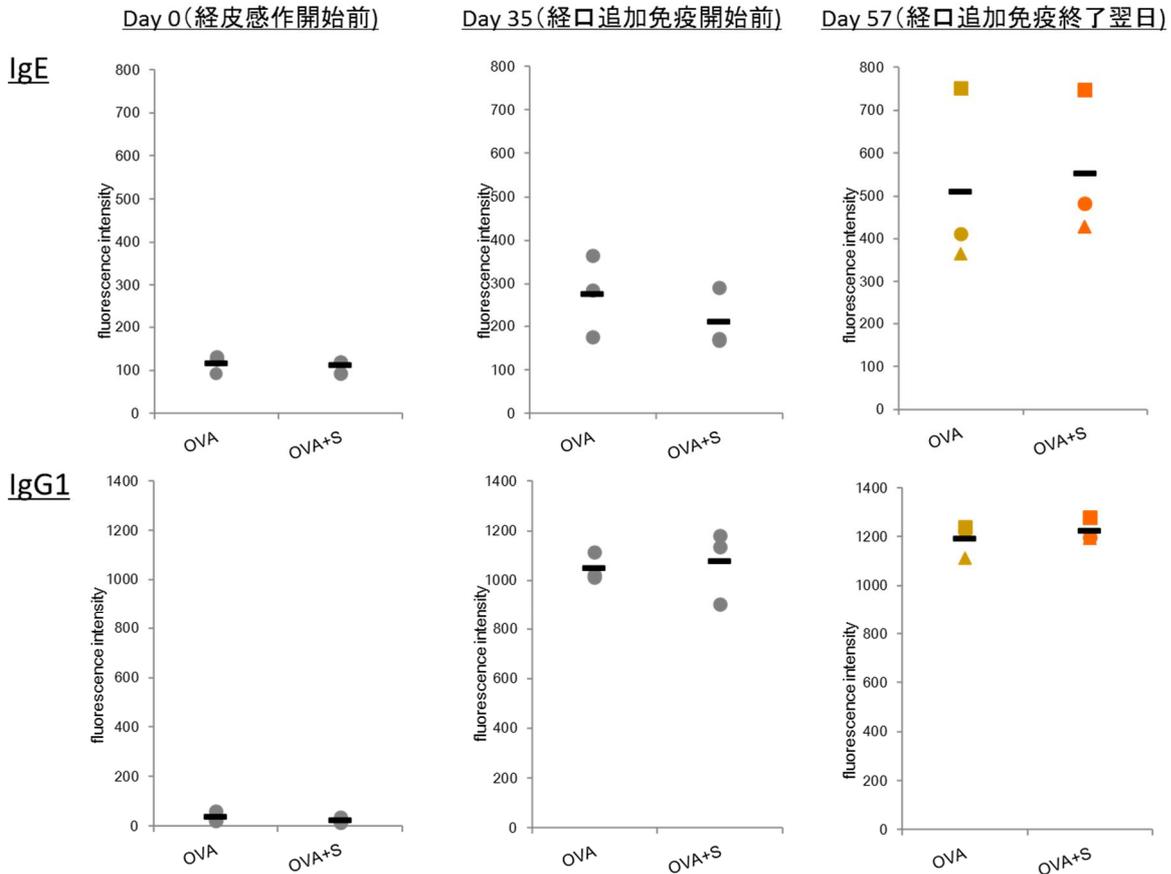


Figure A-R1-2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生 (【実験7】) **【実験 B7】**  
 ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

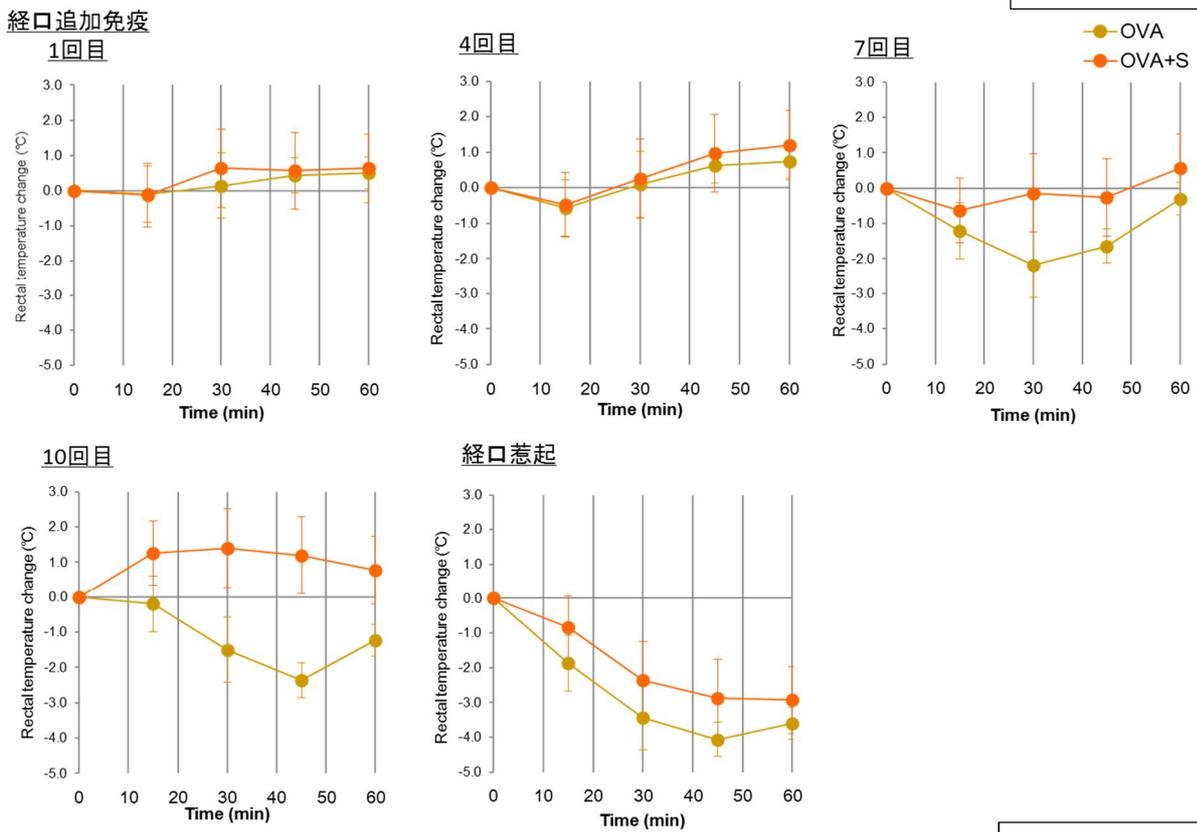
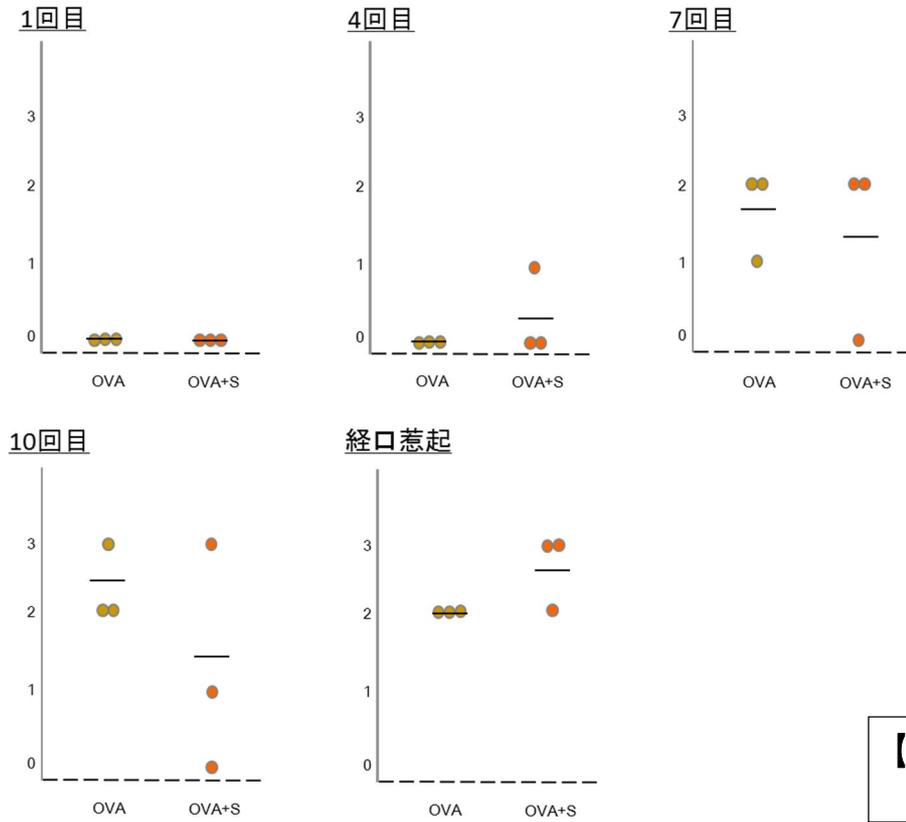


Figure A-R1-3 抗原経口投与後の体温低下 (【実験7】)

**【実験 B7】**

経口追加免疫



【実験 B7】

Figure A-R1-4 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング (【実験7】)  
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。

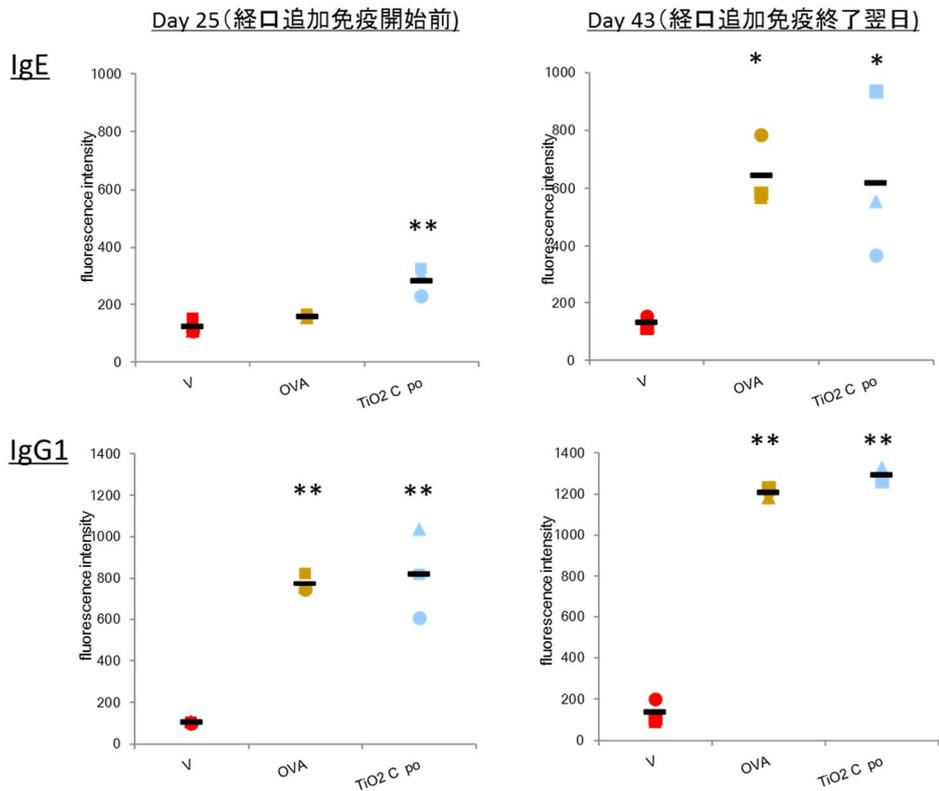
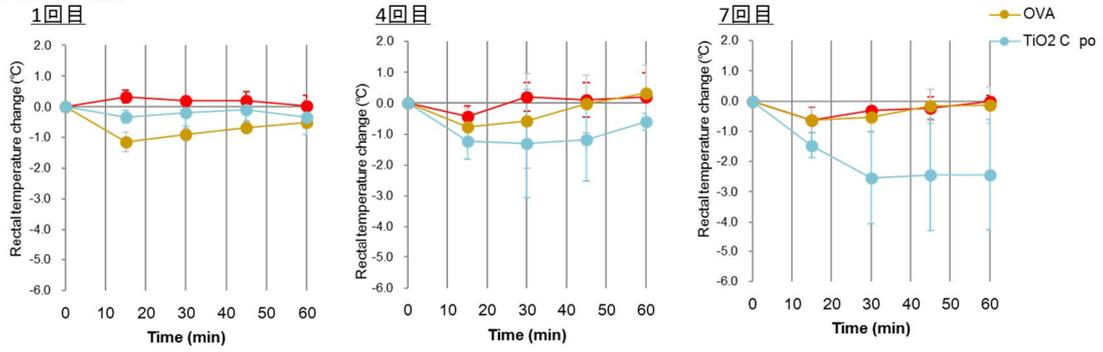


Figure A-R1-5 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生 (【実験8】)  
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs V group.

【実験 B8】

経口追加免疫



経口惹起

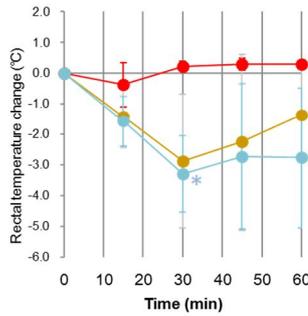
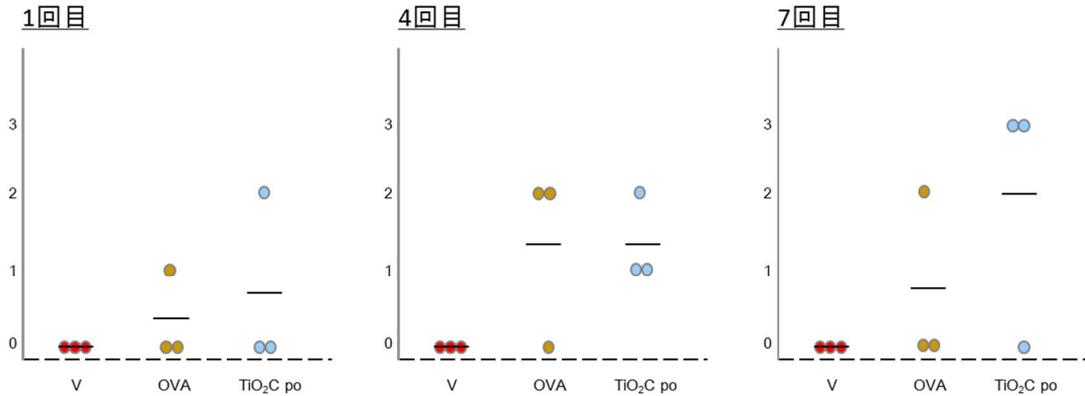


Figure A-R1-6 抗原経口投与後の体温低下(【実験8】)  
\* $p < 0.05$  vs V group.

【実験 B8】

経口追加免疫



経口惹起

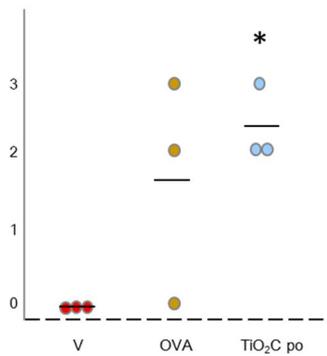


Figure A-R1-7 抗原経口投与後60分間の下病症状スコアリング(【実験8】)  
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。\* $p < 0.05$  vs V group.

【実験 B8】

## 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 octatitrate (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
El-Gazzar 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
Koizumi D, Shirota K, Oda H, Adachi R, Sakai, S, Akiyama H, Nishimaki-Mogami T, Teshima R	Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Nonpoisonous Extraction System for the Determination of Crustacean Protein in Processed Foods.	J AOAC Int	101	798-804	2018
Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigo M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Tsuda H, Takahashi S.	Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats.	Cancer Sci.	109	2164-2177	2018
Liao D, Wang Q, He J, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Futakuchi M, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Xu J, Tsuda H.	Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes.	Chem Res Toxicol.	15	1025-1031	2018

Sakamoto Y, Hojo M, Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A, Inomata A, Suzuki T, Nakae D.	Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats.	J Toxicol Sci.	43	587-600	2018
Shoji M, Adachi R, Akiyama H	Japanese food allergen labeling regulation: an update.	J AOAC Int	101	8-13	2018
Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K.	Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice.	J Toxicol Pathol.	31	73-80	2018