

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全確保推進事業

食品及び食品用容器包装に使用される新規素材の安全性評価に関する研究

(20KA1006)

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 久美子

令和3（2021）年 5月

目 次

I. 総括研究報告書	
食品及び食品用容器包装に使用される新規素材の安全性評価に関する研究 小川久美子	----- 1
II. 分担研究報告書	
1. ナノ酸化チタン及びナノ銀の経口反復投与毒性と体内動態解析 小川久美子、赤木純一 (資料) Table 1-4, Figure 1-3	----- 14
2. ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析 安達 玲子、為広 紀正 (資料) Figure 1-7, Table 1	----- 24
3. ナノマテリアルを含む新規素材の安全性評価に関する国際動向調査 広瀬 明彦、大野 彰子	----- 33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 41

## 食品及び食品用容器包装に使用される新規素材の安全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

本研究は、食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータの蓄積、評価方法の検討並びにその暴露状況やリスク評価に関する国際動向の把握を目的としている。

本年度は、ラットを用いた酸化チタンの90日間反復投与毒性試験の用量設定試験として、強制経口投与による28日間反復投与試験を実施した。0.2% DSPに懸濁した結晶子径6 nmのアナターゼ型ナノサイズ二酸化チタン（50パーセントイル二次粒子径約200 nm）をF344/DuCrjラットに10、100、1000 mg/kg bw/dayの用量で28日間反復経口投与したところ、全ての群で死亡はみられず、体重、一般状態、血液学的検査、および臓器重量に毒性学的に有意な変化は見られなかった。血液生化学的検査では、雌の1000 mg/kg bw/day群でトリグリセリドの有意な増加が見られた。引き続き、肝臓中のチタン濃度定量および病理組織学的検査を実施してナノサイズ二酸化チタンの28日間反復経口投与による亜急性毒性を検討する。

また、化粧品等への配合とともに着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタンが、アレルギー経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討した。抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系については、OVA 2 $\mu$ g $\times$ 4回の経皮感作、OVA 30 mg $\times$ 7回の経口投与による追加免疫、その後のOVA 50 mg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、酸化チタン C（アナターゼ型、粒子径6 nm）、及び酸化チタン E（アナターゼ型、粒子径30 nm）が、抗原の経口投与による追加免疫を増強することが示された。一方、酸化チタン F（ルチル型、粒子径30-50 nm）ではこのような増強効果は見られなかった。今後、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、粒子径、結晶型、あるいは表面修飾状態等の点も含め、さらなる科学的知見の集積が必要と考えられた。

さらに、食品関連分野におけるナノマテリアル並びに新規素材の安全性評価に関する国際動向の調査については、米国食品医薬品局（FDA）のワークショップ「FDA's NanoDay Virtual Research Symposium」に参加し、ナノテクノロジーの現状やFDAの科学的な根拠に基づくナノテクノロジーの規制政策、ナノテクノロジーのレギュラトリーサイエンス研究の概要に関する調査を実施した。また、欧州食品安全機関（EFSA）の科学ネットワーク主催による「食品と試料のナノテクノロジーに関するネットワーク会議」に関する調査を行い、EFSAの新ガイドライン（2018年）を捕捉するテクニカルガイダンス案についての議論について調査した。その結果、FDAのワークショップでは、これまでにFDAが所管するナノマテリアル栄養補助食品を含む食品や化粧品などの分野において行ってきた政策やレギュラトリーサイエンス研究の紹介や現在行っている最新の研究紹介が行われた。2007年のナノテクノロジータスクフォース（NTF）の報告書に基づき、ナノテクノロジー製品に対する規制アプローチをとして、利害関係者が申請時に新技術の使用を検討する際には、ナノテクノロジー由来の製品の開発や分析技術における科学的な進歩に伴い、FDAに協議することを奨励している。ナノテクノロジーの規制政策として、これまで産業界向けのガイダンス文書を発行してきた。これらのガイダンス文書では、ナノテクノロジー製品の規制に対するFDAの包括的なアプローチのフレームワークを説明していた。FDAの食品安全・応用栄養センター（CFSAN）では、CFSANが規制する製品への将来的なナノテクノロジーの応用を審査する際に生じる可能性のある新しい課題に対してFDAの科学者が対応可能となるように研究を行ってきた。さらに、データギャップやナノテクノロジー製品審査の重要な側面に対処している科学者への訓練の実施や社内の科学的専門知識と能力を構築することで、ナノテクノロジーの応用を含むFDA規制製品の責任ある開発を

促進していくとしている。一方、EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議では、公開協議後の更新と修正を含む粒子に関するガイダンス-TR (Technical Requirements) のガイダンス草案の最終版を提示するものであった。また、ネットワークでは、ナノ特有のリスクアセスメントを適用するかどうかを決定するために、材料の物理化学的特徴（例：溶解性、溶出性、粒子径の特性）に基づく特定の基準と評価ルートを導入が必要であると考えている。さらに、既存の安全性研究がナノ断片を適切にカバーしていることを示すための基準も提示される必要もある。このガイダンスで提案された基準および関連する方法論は、この分野における技術調和を図るためと国際的な活動の現状を考慮するものであった。

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：赤木純一  
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官  
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

## A. 研究目的

ナノマテリアル等の新規素材は、様々な用途における応用が期待される一方で、その特性による予想外の健康影響の可能性が指摘されている。国際的にも、既存物質の再評価において、既存の評価は有効ではないことが確認され、ナノマテリアルの物理化学的な特性評価や、毒性的評価などの科学的知見についての情報は未だ不足しているとされている。我々のこれまでの検討において、ナノ銀のマウス腹腔内単回投与において、直径60 nm及び100 nmでは何ら毒性を示さないものの、等量の直径10 nm投与では肝臓のうっ血、単細胞壊死を伴い個体が瀕死や死亡に至る高度の毒性を示すことを明らかにした(Cho et al, J Toxicol Pathol. 2018)。また、毒性を示す 10 nm粒子投与群と同等の銀が肝臓で検出されるように、投与量を増量しても直径60 nm及び100 nm投与群では肝毒性を示さないことから、ナノ銀による肝毒性は肝臓内の銀濃度のみには依存せず、10 nm程度の小粒子の存在に依存すると考えられた。

更に、安達等はマウスの検討により、小粒子径（直径6 nm）の酸化チタンは、アレルギータンパク質の経皮感作時の共存による感作の増強及び、引き続きの経口追加免疫時の共存によ

るアレルギー症状の増強などのアジュバント作用を有することを明らかにしてきた。

これらの結果から、ナノマテリアルの安全性評価には、特に直径 10 nm 以下の小粒子を用いた反復投与による詳細な毒性試験を実施し、サイズによる相異の主原因と考えられる吸収及び分布等の体内動態について検討することが必要性と考えられた。

本研究は、食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータの蓄積、評価方法の検討並びにその暴露状況やリスク評価に関する国際動向の把握を目的とする。食品関連分野における国際動向を中心となるが、毒性評価に関する研究等は、食品用途に限らず分野を越えて共通する課題であるため、リスク評価手法の共通性の観点から関連する分野の動向も併せて調整の対象としている。

## B. 研究方法

### 1. ナノ酸化チタンの 28 日間反復投与毒性試験

#### 1-1. 被験物質および投与量

結晶子径 6 nm の 100%アナターゼ型ナノサイズ二酸化チタン（テイカ株式会社 AMT-100、純度 93%）を被験物質として使用した。食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針に基づき高用量を 1000 mg/kg bw/day とし、毒性情報がないこと、および粒子径 10 nm のナノサイズ銀投与により肝臓のうっ血、単細胞壊死を伴い個体が瀕死や死亡に至る高度の毒性が見られた（Cho et al, J. Toxicol. Pathol. 2018 31, 73–80）ことから用量範囲を広く取るために中用量、低用量をそれぞれ 100 および 10 mg/kg bw/day と設定した。

被験物質は固体であるため、ラットへの強制経口投与試験を実施するため、懸濁液の調製方法を検討した。投与量を 10 ml/kg bw としたときの高用量の投与液濃度である 100 mg/ml で AMT-100 を超純水に懸濁すると速やかに沈降分離が見られ、超音波照射（Bioruptor II-Type 12, ON 30 sec/OFF 30 sec × 60 cycles, High power）後も、非照射サンプル

とほぼ同様に沈降分離した。分散剤として0.2%リン酸水素二ナトリウム (DSP) を用いると、肉眼上、均一な乳状の懸濁液が得られ、静置30分以内に分離は見られなかった。この懸濁液中における個数分布に基づく50パーセントイル二次粒子径(液中粒子径)は約200nmであった。DSPは食品衛生法(昭和22年法律第233号)に基づく食品添加物として食品への使用が認められており、0.2% DSPを10ml/kg bw投与したときのリン摂取量は4.36mg/kg bwであり最大耐容摂取量70mg/kg bw(リンとして)(TRS 683-JECFA 26/25, 1982)を十分下回ることからDSPによる毒性影響はないと考えられた。以上より、0.2% DSPを分散剤として用いた100mg/ml AMT-100を投与液として使用することとした。

### 1-2. 動物および飼育条件

5週齢のF344/DuCrjラット雌雄各20匹を日本チャールス・リバーより購入し、基礎飼料(CRF-1; オリエンタル酵母工業)および水道水にて1週間馴化飼育後、6週齢で実験に供した。動物は温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 5\%$ 、換気回数20回/時、12時間の明暗サイクルに制御されたバリアシステムの飼育室で飼育した。床敷としてソフトチップ(三協ラボサービス)を敷いたポリカーボネート製箱型ケージに5匹ずつ収容し、ケージおよび床敷を週2回の頻度で交換した。動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て、同所の定める「動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して行った。動物は投与開始日の体重に基づいて、雌雄とも各群の平均体重の標準偏差が最小になるように1群5匹からなる4群に分け、試験期間中は基礎飼料および水道水を自由摂取させた。

### 1-3. 強制経口投与

ポリテトラフルオロエチレン製フレキシブルチューブ(長さ:85mm、外径:1.46mm、頭部:2.4mm、フチガミ器械)を用いて $\text{TiO}_2$ 懸濁液を毎日1回28日間強制経口投与した。実験期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重および摂餌量を週1回測定した。動物は投与期間終了後に一晩絶食させ、イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った後、放血により安楽死させた。

### 1-4. 血液学的および血液生化学的検査

採取した血液の一部を抗凝固剤(EDTA-2K)入りの試験管(ベノジェクトII真空採血管、テルモ株式会社)に移し、血液学的検査として赤血球数

(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、血小板数(PLT)および白血球数(WBC)、網状赤血球数(RET)、白血球分画(好中球;NEUT、好酸球;EO、好塩基球;BASO、単球;MONO、リンパ球;LYMPH)を自動血球計算装置IDEXXプロサイトDx(アイデックスラボラトリーズ株式会社)を用いて測定した。血清生化学的検査では、総タンパク(TP)、アルブミン/グロブリン比(A/G)、アルブミン(ALB)、総ビリルビン(T-BIL)、グルコース(GLU)、トリグリセリド(TG)、総コレステロール(T-CHO)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、ナトリウム(Na)、クロール(Cl)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、無機リン(IP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラントランスアミナーゼ(ALT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)および $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ( $\gamma$ -GT)の各項目を測定した。

### 1-5. 剖検および臓器重量

採血後に動物を放血死させ、剖検を実施するとともに、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、卵巣あるいは精巣を摘出し、重量を測定した。また、上記の組織に加え胸骨、気管、大動脈、甲状腺、舌、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(盲腸、結腸、直腸)、膵臓、膀胱、精囊、前立腺、精巣上体、子宮、膣、下垂体、大腿筋、坐骨神経、三叉神経、脊髄を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。

### 1-6. 統計学的処理

試験期間中の体重、摂餌量、血液学的・血清生化学的検査結果及び器官重量については各群の分散をBartlettの方法で検定し、多重比較をDunnett等の方法により対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行い、 $P < 0.05$ の場合を統計学的に有意と判定した。

### (倫理面への配慮)

動物実験は「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、国立医薬品食品衛生研究所実験動物倫理委員会の承認を得た上で、関係法令を遵守して実施した。動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置は倫理規定に十分配慮して熟練者が実施し、実験終了時、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安楽死させ、動物に与える苦痛を最小限に留めた

## 2. ナノ酸化チタンの免疫毒性解析

### 2-1. 試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン C

(アナターゼ型、粒子径 6 nm)

酸化チタン E

(アナターゼ型、粒子径 30 nm)

酸化チタン F

(ルチル型、粒子径 30-50 nm)

(全て表面未処理)

を使用した。

抗原タンパク質としては、卵アレルゲンである卵白アルブミン (OVA; Sigma A5503) を用いた。

その他の試薬は特級グレードのものを用いた。

### 2-2. 酸化チタンナノマテリアルの懸濁液調製

酸化チタンは、それぞれ 50 mg/mL の濃度で PBS に懸濁し、2.5 分間の超音波処理の後にボルトテックスミキサーにより攪拌するというサイクルを 4 回繰り返す、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。

### 2.3 【実験 1】経皮感作時の OVA 用量検討、及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー (株) より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業 (株)) を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。8 週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (1 or 2  $\mu$ 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 クールの経皮感作を行った。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 7 回)、追加免疫を行った。この時、ナノ酸化チタン投与群では、OVA 30mg と TiO<sub>2</sub>C 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 1, 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。Day 49 に OVA 50mg 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基準に従ってスコアリ

ングした。

### 2-4. 【実験 2】より大きいナノ酸化チタンの影響に関する検討

経皮感作の操作は【実験 1】と同様に行った。1 群の匹数は 5 匹とした (経口投与時にナノ酸化チタンのみを投与する陰性対照群については 1 群 2 匹とした)。経皮感作時の OVA 用量は 2  $\mu$ g/50  $\mu$ L とした。経口投与に関するスケジュール、OVA 及びナノ酸化チタンの用量は【実験 1】と同様である。抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体の測定、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についても【実験 1】と同様に行った。

### 2-5. 統計解析

データは Microsoft Excel により集計した。Vehicle 群を基準とした Dunnett の検定、あるいは Student t-test による OVA 投与群と OVA-ナノ酸化チタン投与群との有意差検定を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### (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。

## 3. 国際動向の把握

2020 年 10 月 Web 開催の FDA のワークショップ (FDA's NanoDay Virtual Research Symposium) に参加し FDA のナノマテリアルの現状とナノテクノロジーの規制政策やナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究の概要の調査を実施した。また、EFSA の新ガイドライン (2018 年) を捕捉するテクニカルガイダンス案について、第 10 回食品と試料のナノテクノロジーに関するネットワーク会議 (2020 年 10 月 21-22 日、Web 会議) に関する調査を実施した

## C. 研究結果

### 1. ナノ酸化チタンの 28 日間反復投与毒性試験

#### 1-1. 生存率、体重、摂餌量

試験期間中、雌雄すべての群において死亡はみられなかった。一部の動物で軟便および活動性の低下が一過性に観察されたが、群間に有意な差は見られなかった。雌雄ともに投与に伴う体重の変

化は見られず、摂餌量も同程度であった。

### 1-2. 血液学および血液生化学的検査

血液学的検査では、雄の 10 mg/kg bw/day 群で WBC の有意な低下が見られたが、軽微な変化であり、用量相関性がないことから偶発的な変動と考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群で MCH の有意な低下が見られたが、軽微な変化であり、RBC、HGB、MCV および MCHC には変動が見られなかったことから毒性学的な意義は乏しいと考えられた。

血液生化学的検査では、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な増加が見られた。また雄の 100 および 1000 mg/kg bw/day 群で CRE の有意な低下が見られたが、腎毒性を示唆する変動とは逆の変化であるため毒性学的な意義は乏しいと考えられた。

### 1-3. 臓器重量

剖検日体重及び臓器重量については、雄の 10 mg/kg bw/day 群で脾臓の相対重量の有意な増加が見られたが、軽微な変化であり、用量相関性がないことから偶発的な変動と考えられた。その他の臓器には相対重量、絶対重量とも有意な差は見られなかった。

## 2. ナノ酸化チタンの免疫毒性解析

### 2-1. 【実験 1】経皮感作時の OVA 用量検討、及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響

抗原経皮感作・経口追加免疫・経口惹起実験系に関するこれまでの筆者らの検討では、経皮感作時の OVA 用量を 2 µg とし、今回と同様のスケジュール及び経口投与用量にて、1 群 3 匹で予備的検討を行った。その結果、経口投与時に粒子径の小さいナノ酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm) を共存させた場合、OVA 経口投与時の体温低下及び下痢症状が増強される傾向が見られた。

本研究課題の初年度である今年度は、上記結果について 1 群 5 匹として再現性を検討した。また、これまでの経皮感作に関する検討の際と同様に、経皮感作時の OVA 用量を 1 µg 及び 2 µg の 2 段階に設定し、実験系の精緻化を目指した。ナノ酸化チタン C を共存させる群では、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。

経皮感作により血清中の抗原特異的 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。追加免疫時の酸化チタン C 共存による顕著な影響は見られなかった。

経口追加免疫、及び経口惹起時の体温に関して、

OVA2 群では、経口追加免疫時及び経口惹起時に、V 群と比較して有意な低下が見られた。OVA2-TiO<sub>2</sub>C po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られ、また、経口追加免疫 5 回目では、OVA2 群との比較においても有意な体温低下が見られた。一方、OVA1 群、OVA1-TiO<sub>2</sub>C po 群では、V 群と比較して有意な体温低下は見られなかった。下痢症状に関しては、OVA2 群及び OVA2-TiO<sub>2</sub>C po 群では、V 群と比較して有意に高いスコアとなった。経口追加免疫 5 回目、7 回目では、OVA2 群と比較して OVA2-TiO<sub>2</sub>C po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。一方、OVA1 群、OVA1-TiO<sub>2</sub>C po 群では、V 群と比較してやや高いスコアであったが、有意差は見られなかった。これらの結果から、本検討での実験系に関して、経皮感作時に 2 µg の OVA を用いることにより経口追加免疫・経口惹起が適切に検出可能であること、また、経口投与時の酸化チタン C の共存により経口追加免疫が増強されることが示された。

### 2-2. 【実験 2】より大きいナノ酸化チタンの影響に関する検討

ここまで、粒子径の小さい酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm) に関して、経口投与時の共存効果を検討してきた。そこで次に、より粒子径の大きなナノ酸化チタンである、酸化チタン E (アナターゼ型、粒子径 30 nm)、及び酸化チタン F (ルチル型、粒子径 30-50 nm) の 2 種について、同様に経口投与時の共存効果を検討した。1 群 5 匹とし、経口投与時に酸化チタン E あるいは F を共存させる群を設定した。OVA:ナノ酸化チタン重量比は、酸化チタン C の場合と同様に 16:1 とした。経皮感作時の OVA 用量は 2 µg とした。

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。追加免疫時の酸化チタン E、F の共存による顕著な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に関して、OVA 群では、経口追加免疫時及び経口惹起時に、V 群と比較して有意な低下が見られた。OVA-TiO<sub>2</sub>E po 群、OVA-TiO<sub>2</sub>F po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られた。また、経口追加免疫 7 回目において、OVA-TiO<sub>2</sub>E po 群では OVA 群との比較においても有意な体温低下が見られ、経口投与時の共存により追加免疫が増強されることが示された。また経口追加免疫 4 回目においても OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。一方 OVA-TiO<sub>2</sub>F po 群では、OVA 群の体温低下との間に有意な差は見られな

かった。下痢症状に関しては、OVA 群、OVA-TiO<sub>2</sub>E po 群、OVA-TiO<sub>2</sub>F po 群で、V 群と比較して有意に高いスコアとなった。また、経口追加免疫 4 回目では、OVA 群と比較して OVA-TiO<sub>2</sub>E po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。

なお、陰性対照群である酸化チタン E あるいは F のみを経口投与した群 (TiO<sub>2</sub>E only 群、TiO<sub>2</sub>F only 群) では、OVA 特異的抗体産生、OVA 経口投与時の体温低下、下痢症状とも見られなかった。

これらの結果から、経皮感作・経口追加免疫・経口惹起実験系において、粒子径の小さい酸化チタン C (6 nm) だけでなく、同じアナターゼ型で粒子径がより大きい酸化チタン E (30 nm) に関しても、経口投与時に共存させることにより経口追加免疫が増強されることが示された。

### 3. 国際動向の把握

#### ■ FDA's NanoDay Virtual Research Symposium

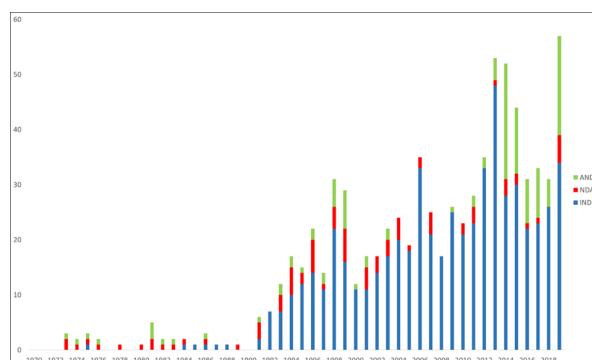
2000 年に国家ナノテクノロジー戦略 (NNI) が設立され、米国政府機関によるナノテクノロジーへの研究開発投資への活発化と共に、ナノテクノロジーの分野は大きく発展してきている。当時の FDA の副長官は、ナノテクノロジーを応用した製品の米国食品医薬品局 (FDA) への提出が増加することを予想し、2006 年にナノテクノロジー・タスクフォース (NTF) を立ち上げ、ナノテクノロジー科学の現状に関する FDA 規制当局の評価を支援した。2007 年に NTF は、その調査結果とコミッショナーへの勧告を公表した。その後、FDA は規制審査に提出されたナノマテリアルを含む製品の提出件数が徐々に増加した状況を受け、今回のワークショップでは科学的な根拠に基づくナノテクノロジーの規制政策やナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究の概要の報告となった。

#### ➤ FDA 規制対象製品におけるナノマテリアルサイエンスとナノテクノロジーの現状

2007 年の報告書以降、生命科学や、工学、医学などの分野の急速な進歩により、ナノテクノロジーに関する知識や理解が深まり、FDA 規制対象製品へのナノテクノロジーへの応用の現状と可能性が高まっている。また、ナノテクノロジーはバイオテクノロジーなどの他の分野とも融合しており、分子レベルでバイオシステムへの理解を深めていくものであった。このような進歩が FDA 審査の薬事申請に含まれる製品の多様性、複雑性や、生産量に反映されるものであった。

1970 年以降、FDA の医薬品評価研究センター (CDER) は、ナノマテリアルを含むヒト医薬品の 600 件以上の申請 (治験薬 (IND)、新薬申請 (NDA)、

簡略新薬申請 (ANDA)) を受理しており、そのうちの半分は過去 10 年以内に提出されたものであった。図 1 は、CDER に提出されたナノマテリアルを含む医薬品の長年にわたる提出傾向を示す。





開発を促す規制へのアプローチの特定や、FDA が革新的な製品を評価し公衆衛生を守るために必要な知識や政策のギャップに対処する方法を特定し推奨した。

2007年、NTFは報告書を発表し、ナノテクノロジーの使用は、他の新興技術を使用した製品と同様に規制上の課題をもたらすことを明らかにすることを示した。この報告書では、公衆衛生を保護・促進するというFDAの使命を果たすために、ナノテクノロジーに関する科学的・規制的な政策課題に対して、FDAが活動するためのいくつかの提言がされていた。

2007年のNTFの報告書の実施の一環として、FDAはナノテクノロジー製品に対する規制アプローチを明確にし、業界向けのガイダンスの発行を提言した。FDAは、ナノテクノロジー製品を本質的に無害か有害かというような分類として判断しておらず、むしろ、科学的根拠に基づき製品に焦点を当てた規制方針を適用することで、FDAは既存の法的権限のもと、FDAの管轄下にある各タイプの製品に適用される特定の法的基準に従って、ナノテクノロジー製品を規制することであると述べている。規制へのアプローチとしては、製品の安全性、有効性、公衆衛生への影響、または規制状況の評価の一環として、ナノテクノロジーの使用によってもたらされる可能性のある独自の特性や動きについて考慮することが求められる。FDAの政策としては、①製品開発の初期段階で、安全性や規制の状況に関する疑問点を特定し対処するために、産業界がFDAと協議することを奨励していることや、②一般市民と積極的にコミュニケーションをとって情報を共有し、意見を求めること、また、③国内外のカウンターパートと協力してレギュラトリーサイエンスを進めることなど、重要な特徴を兼ね備えるものであった。

#### ➤ FDAの産業界向けのガイダンス文書

FDAは産業界に対して、ナノテクノロジー製品の規制状況の判断や安全性の評価へのアドバイスを含むガイダンスを発行してきた。これらのガイダンス文書は、拘束力のない推奨事項を提供するものであったが、FDAがあるテーマについて現在の考え方を伝えるための貴重なツールとして、且つステークホルダーに対してさらなる明確性を提供するのに役立つものであった。現在までに、FDAは5つの最終ガイダンス文書を発行しており、1つは現在、草案中である。

#### ➤ 5つの産業界向けの最終ガイダンス

- FDA規制製品がナノテクノロジーを使用の

#### 有無について検討

本ガイダンスは、ナノテクノロジー製品の規制に対するFDAの包括的なアプローチのフレームワークを説明するものであり、すべてのFDA規制製品に広く適用可能な2つの考慮すべきポイントを明らかにしていた。

- 1) 材料や最終製品は、少なくとも1つの外部寸法または内部構造や表面構造にナノスケール範囲(約1nmから100nm)を持つように設計されている。
- 2) 材料や最終製品は、たとえその寸法が1マイクロメートル(1,000nm)までのナノスケールの範囲外であっても、その寸法に起因するような物理的・化学的特性や生物学的効果などの特性や現象を示すように設計されている。

これら2つの留意点については、全てのFDA規制製品に広く適用すべきとの見解であった。いずれかの留意点で肯定的な知見が得られた場合には、その製品の安全性、有効性、公衆衛生への影響、または規制状況に対する潜在的な影響を特定していき、その製品への対処についてFDAや業界がその製品に対して特別に留意する必要性を提唱するものであった。

これに関連し、FDAは、新たな技術を含む製造工程の大幅な変更のある食品成分および食品接触物質の安全性と規制状況に及ぼす影響への評価、化粧品中のナノマテリアルの安全性、動物用食品へのナノマテリアルの使用、リポソーム製剤に関するナノマテリアルの使用、ナノマテリアルを含む生物学的製剤を含む医薬品(案)に対してのガイダンスを作成してきている(概略は、補足情報として末尾に開催)。

#### ➤ 産業界向けのガイダンス草案

##### ナノマテリアルを含む生物学的製剤を含む医薬品

パブリックコメント用に公表された本ガイダンス草案は、ナノマテリアルを含む医薬品を開発する際に、簡略化された承認経路に従って提出された申請書に記載された製品を含む一般的な原則と具体的な検討事項について説明するものである。本文書では、製品の開発と製造を通じて、ナノマテリアルを含む医薬品に関連する品質、非臨床、臨床試験の留意点について説明されており、コメント期間は2018年3月19日に終了し、FDAは最終ガイダンス文書を発行する前に、どのような修正が必要かを判断するために寄せられたパ

ブリックインプットを検討している。

➤ ナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究

ナノテクノロジー関連の研究を強化するためのFDAの戦略は、全てのFDA製品センターのレギュラトリーサイエンス活動を調整への強固なフレームワークによるものであった。2013年ナノテクノロジーレギュラトリーサイエンス研究計画でFDAは、ナノマテリアルを含む製品のレギュラトリーサイエンス活動において協調的なリーダーシップを発揮するためのフレームワークと実施計画を示した。このフレームワークは、FDAが規制上の意思決定に必要な科学的知識や、方法、ツールのギャップを特定することで対処できるように設計されていた。

➤ ナノテクノロジー研究基盤の強化

2011年、FDAはナノテクノロジーに関わるレギュラトリーサイエンス研究を支援・促進し、全てのFDAの製品センターで規制上の課題に取り組むために2つのナノテクノロジーコア施設を設立した。

1つはメリーランド州のFDA本部であり、もう1つはアーカンソー州のジェファーソンラボに設置された。これらのコア施設は以下のように設計されていた。

- 1) FDAの研究者に、ナノテクノロジー関連の研究を行うための特性評価に関するツールや技術サポートを集中的に提供する。
- 2) FDAの審査官にナノテクノロジーとナノマテリアルの特性評価に関する実践的なトレーニングの場を提供し、製品審査とレギュラトリーサイエンスにおける知識のギャップを埋める。
- 3) 規制上の特定の問題に対処し、科学的根拠に基づき決定する基礎を確立するために、FDAが規制する製品について研究を実施する。

アーカンソー州のナノテクノロジーコア施設(ナノコア)は、NCTR、FDAの規制局アーカンソー研究所(ORA/ARKL)と、米国保健福祉省の国家毒性プログラム(NTP)が共同で運営している。また、ナノコア施設は、NCTRとORAのレギュラトリーサイエンス研究や、CDER、CFSAN、CDRHなど他のFDAセンターの活動をサポートしている。さらに、ナノコア施設には、分光法、粒子径、表面組成、安定性分析、特性評価、元素分析、顕微鏡、分離・分画、ク

ロマトグラフィーなどの最先端の装置があり、ナノテクノロジーに関する分析を行うNCTRおよびORA/ARKLの研究者や研究員のニーズをサポートすることが可能である。ナノコア施設にある機器についてFDAは、ナノテクノロジーをベースにしたFDA規制製品を正確にモニターし、安全性や必要に応じて有効性を確保するための分析方法の開発が可能であることを述べていた。

ナノコア施設/NCTRの主な研究は、FDA規制製品におけるナノマテリアルの同定と特性評価や、日焼け止めとその皮膚浸透性の評価、*in vivo*や*in vitro*との相関関係をサポートする薬物動態、有効性、生体内分布の研究、細胞および遺伝子毒性、ナノ粒子の生物への蓄積の影響を決定するような宿主抵抗性アッセイなどであった。

➤ NTPの支援を受けているNCTRのある重要な研究の一例

Sprague-Dawleyラットに13週間毎日経口投与した場合の銀の蓄積、分布、形態、毒性の違いについて、銀の粒子状およびイオン状の形態と銀の粒子径を評価した。また、酢酸銀を投与したラットと比較して、銀ナノ粒子を投与したラットでは、銀の蓄積の分布パターンと形態の違いや、銀の有意な用量依存性および銀ナノ粒子サイズ依存性の組織蓄積、銀の組織蓄積の有意な性差が見られたという結果が報告されていた。

➤ CORES ( Collaborative Opportunities for Research Excellence in Science) 内部補助金プログラム

ナノテクノロジーのレギュラトリーサイエンス研究は、化学、生物学、物理学などの科学分野から成り立っており、学際的なものである。さらに、学際的な研究の進歩により、新しい科学技術を応用して開発される製品や、複数のFDA製品センターで規制される製品が増えてきていた。このように、FDAは複雑化する規制の状況に対応し、これらの新技術が製品の安全性、有効性、品質にどのような影響を与えるかを理解し、イノベーションに関連する規制政策の策定に役立つ情報を提供するためには内部の協力が不可欠であると考えられた。このようなニーズに応えるためにもFDAは、2010年にナノテクノロジーの分野の横断的な研究活動を促進するためのCORES内部助成プログラムを開発した。

CORES助成プログラムは、FDAのレギュラトリーサイエンスにおけるナノテクノロジー研究の優先度の高いニーズに対応するため、センター

間および外部との共同研究の機会を促進することを目的とするものである。ここでの研究ニーズには、ナノマテリアルの特性評価、生体適合性の評価、トキシコキネティクス、*in vitro* や *in vivo* 毒性試験の調査など、国家ナノテクノロジー戦略 (NNI)-環境、健康、および安全性研究戦略の優先事項を反映するものであった。CORES 補助金から得た研究成果は、産業界向けのガイダンス文書の発行や、FDA が規制対象製品のナノテクノロジーを評価する際に使用するアッセイや評価方法、試験プロトコルなどの重要なレギュラトリーサイエンスツールの開発を支援するデータを提供するものであった。さらに、CORES プログラムは、FDA 全体の協力関係を促進し、学界、産業界、他の連邦機関との関係を強化してきた。

(補足情報)

#### 新たな技術を含む製造工程の大幅な変更のある食品成分および食品接触物質(着色料である食品成分を含む)の安全性と規制状況に及ぼす影響への評価

本ガイダンスは、ナノテクノロジーを含む重要な製造工程の変更のある食品物質の安全性と規制状況に与える潜在的な影響について製造者に通知するものであった。本ガイダンスでは、既に市場に出回っている食品物質の製造工程での重要な変更において、食品物質の同一性、食品物質の使用の安全性、および食品物質の使用の規制状況に影響を与えるかどうかや、変更についての FDA への規制当局への提出を保証するものかどうかについて判断する際に、製造業者が考慮すべき要素について説明するものであった。

#### 化粧品中のナノマテリアルの安全性

本ガイダンスは、化粧品に含まれるナノマテリアルの安全性評価に関する FDA の現在の考え方を示すものであった。本ガイダンスでは、一般的に、化粧品の安全性評価の原則としてナノマテリアルを含む化粧品にも適用されると説明されている。しかし、化粧品に使用されているナノマテリアルが起因するような特性や効果を考慮することにより、データの必要性や試験方法を評価する必要があることを提唱していた。

#### 動物用食品へのナノマテリアルの使用

本ガイダンスは、動物用食品にマテリアルを添加するための法的な枠組みについて述べており、ナノマテリアル動物用食品成分の食品添加物申立書 (FAP) を提出するための推奨事項を含むものであった。また、本ガイダンスで

は、メーカーがナノマテリアル動物用食品成分の開発の初期段階で、FAP を提出する前に FDA と協議することを推奨するものであった。リポソーム製剤に関するナノマテリアルの使用

本ガイダンスでは、CDER が審査するリポソーム製剤の新薬申請 (NDA) または簡略新薬申請 (ANDA) において、申請者が提出すべき情報の種類について説明されていた。また、化学、製造、管理、ヒト薬物動態、生物学的利用能、或いは生物学的同等性、ならびにラベル付けについても説明がされていた。本ガイダンスは、特定の種類のナノマテリアルに関する初の「クラス別」ガイダンスであり、リポソームに関しては CDER が受け取るナノテクノロジーの申請の 3 分の 1 以上を占めていた。

#### ■ EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議

2020 年 10 月に開催された食品及び飼料のナノテクノロジーに関する EFSA の科学ネットワーク会議で議長は、粒子状 (ナノ) 物質に関連する 2 つの EFSA ガイダンス文章 (粒子に関するガイダンス - TR : Guidance on Particle on Technical Requirements、ナノに関するガイダンス - RA : Guidance on Nano - Risk Assessment) について、その背景と対象範囲について説明した。

2018 年に食品および飼料中におけるナノ科学およびナノテクノロジーの適用のリスクアセスメントに関するガイダンス」(Guidance on the risk assessment of the application of the nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain 第 1 部、ヒトと動物の健康」(ナノに関するガイダンス - RA) の初版が発行され、現在レビュー中である。ナノネットワークは、歴史的背景や当初と新たなマנדート、あるいは関連する法的な事への明確化について情報提供を受けるものであった。「粒子に関するガイダンス-TR (ナノ粒子を含む小さな粒子の存在を確認するための規制対象食品・飼料製品申請のための技術的要件に関するガイダンス)」は、EFSA の管轄下にある従来材料にナノ粒子が存在する可能性を確認するために作成された。更にこのガイダンスは、「ナノに関するガイダンス - RA」への適用への必要性の有無を判断するために、評価対象の材料に関する情報要件を示していた。

これら 2 つのガイダンス文書は補完的なものであり、また、製品の最終用途に依存する特定の分野の枠組みに統合すべきものであり、安全性評価のメインフレームであると述べられている。

▶ 粒子ガイダンスに関する EFSA ガイダンス -

### 技術要件 (TR)に対する ANSES のコメント

Bruno Teste 氏 (フランス) は、2020 年 6 月に発表された「食品中のナノマテリアル」に関する ANSES の意見をナノネットワークに伝えた。意見の第 1 部は、社会的認知、食品添加物および食品接触材料についてのナノ材料の特定、およびリスクアセスメント戦略を定義する支援ツールの提案に焦点を当てるものであった。現在作成中の意見書の第 2 部は、ナノ特有のリスクアセスメントの開発に焦点を当てており、特に Nano E171 (2016 年と 2018 年の ANS パネルで EFSA が発行した食品添加物の二酸化チタン) をケーススタディとした暴露とハザードの特性評価に焦点を当てている。本文書では、ナノマテリアルの識別基準を提案しており、評価のための主な手法として電子顕微鏡を推奨している。また、リスクアセスメントのプロセス (ナノ特有のリスクアセスメント、または従来のリスクアセスメント) を決定するために開発された意思決定ツールとして、被験物質の溶解性を評価するための 2 つの戦略的アプローチを示している。引き続き、Bruno Teste 氏は、ANSES が公聴会で提出した「粒子に関するガイダンス - TR」に関するコメントを発表した。このコメントは、ANSES の意見書の最初の部分を対象としている第 2 節と第 3 節 (溶解度、溶解速度、粒子の特性評価など) に特化して提出されたものであった。

#### ➤ ナノファイバーの有害性評価への新たなアプローチ手法 (NAMs) の使用

##### ナノセルロースのケーススタディ

ナノファイバーの有害性評価のための NAMs の使用に関する提案募集が開始された。この助成金は、次の 2 つの項目に焦点を当てていた。

- 1) ナノセルロースの経口曝露：胃腸での消化、ナノファイバーの取り込みと局所的な影響
- 2) gut-on-a-chip モデルの使用の検討。

##### ナノマテリアルと NAMs

ナノネットワークでは、ナノマテリアルの有害性評価における NAMs の現状と貢献について議論していた。更にナノネットワークのメンバーの国レベルでの進行中の活動状況 (例：ポルトガル、ギリシャ、スロバキア) や国際機関レベルでの参加 (イタリアとオランダの OECD 活動への参加など) について最新情報が紹介された。

#### ➤ 加盟国の活動

##### EFSA ナノプロジェクトと ScienSano ワークショップ

Eveline Verleysen 氏 (ベルギー) は、EFSA ナノプロジェクト「有害性評価における食品添加物中のナノ材料の物理化学的特性評価と暴露分析」について発表した。このプロジェクトは、ベルギーの Health, Food Chain Safety and Environment の助成を受けて実施された「EC 承認食品添加物中のナノ材料を評価するための分析手法の実施と検証」に関する Nanofood@プロジェクトの延長線上にあるものである。EFSA ナノプロジェクトの主な目的は、電子顕微鏡をベースとした技術と分光学的技術を組み合わせることにより、食品マトリックス中のナノ粒子の物理化学的特性を評価するため標準化した検証済みの手法を開発し、適用することである。

#### D. 考察

ナノ酸化チタンの反復投与毒性影響については、0.2% DSP に懸濁した結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ TiO<sub>2</sub> (50 パーセントイル二次粒子径約 200 nm) を F344/DuCrj ラットに 10、100、1000 mg/kg bw/day の用量で 28 日間反復経口投与したところ、全ての群で死亡はみられず、体重および一般状態に変化は見られなかった。血液生化学的検査では、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な増加が見られた。

ナノ酸化チタンの免疫毒性については、これまで検討してきた抗原経皮感作・経口追加免疫・経口惹起実験系を精緻化し、OVA 経口投与時の酸化チタン C の影響について検討した。その結果、2 μg OVA による経皮感作後に OVA を経口投与することにより、経口追加免疫・経口惹起を誘導できること、この時酸化チタン C を共存させることにより経口追加免疫が増強されることが示された (【実験 1】)。この【実験 1】において、OVA 1 群と OVA 2 群を比較すると、OVA 特異的抗体産生に大きな差は無かったが、経口投与に関しては、OVA 2 群では明らかなアレルギー症状が誘発されたのに対し OVA 1 群では顕著なアレルギー症状発現は見られなかった。これは、血中の OVA 特異的抗体濃度には反映されない感作状態の違い (樹状細胞、T 細胞等の活性化状態の違い) のためではないかと考えられる。

また、【実験 2】では、より大きい粒子径のナノ酸化チタン 2 種 (E: アナターゼ型・粒子径 30 nm、F: ルチル型・粒子径 30-50 nm) が OVA 経口追加免疫・経口惹起に与える影響について検討した。今回使用した酸化チタン F に関しては、経口投与により大腸炎モデルマウスの炎症を増悪させることが報告されている (Gut 2017; 66: 1216-

1224)。また、粒子径 66 nm のナノ酸化チタンの経口投与によりマウス小腸に炎症が誘導されることが報告されている (World J Gastroenterol 2012; 18(34): 4729-4735)。筆者らのこれまでの検討では、OVA 経皮感作に関して、酸化チタン C は増強効果を示したが、酸化チタン E は増強効果を示さなかった一方で、OVA 腹腔内感作においては両者とも増強効果を示した。酸化チタン F は本検討で初めて使用する検体である。本研究の検討においては、酸化チタン E が酸化チタン C と同様に経口追加免疫が増強されることが示された。酸化チタン F ではこのような増強効果は見られなかった。これらの結果から、経口投与時の共存効果に関しては、これまで検討していた小粒子径の酸化チタン C (6 nm、アナターゼ型) の他に、より粒子径が大きいナノ酸化チタンについても今後さらに検討する必要がある、またその際に結晶型あるいは表面修飾等の影響についても考慮する必要があると考えられる。

また、本モデル実験系における経口投与時のナノ酸化チタンの増強効果については、最終的な症状惹起時ではなく、7 回の経口追加免疫時にナノ酸化チタン非投与群との差が見られていることから、ナノ酸化チタンの作用機序についても今後の検討が必要であろう。

ナノマテリアルの国際動向については、米国では 2000 年に国家ナノテクノロジー戦略 (NNI) が設立されたことで、米国政府機関によるナノテクノロジーへの研究開発投資が活発化し、ナノテクノロジーの分野で大きな進歩を遂げ、複雑な問題に対する新たな解決策を可能にしてきた。FDA は、ヒトや動物の医薬品、ワクチン、その他の生物学的製品、医療機器の安全性、有効性、品質、セキュリティを確保することで、国民の健康を守る責任と、国内の殆どの食料品、化粧品、放射線を発する製品の安全性にも責任を負っている組織として活動している。2006 年に FDA は、ナノテクノロジーを応用した製品の FDA への申請が増加することを予想して、ナノテクノロジータスクフォース (NTF) を立ち上げ、ナノテクノロジーに関する科学の現状に対する FDA の規制当局の評価を支援してきた。NTF は 2007 年に、調査結果と長官への提言をまとめた包括的な公開レポートを発表したが、この報告書が発表されて以来、FDA では規制審査のために提出されたナノマテリアルを含む製品の申請件数が徐々に増加してきた。ナノテクノロジー専用の予算を持つ FDA は、ナノテクノロジーレギュラトリーサイエンス研究をサポートし、科学的専門知識と能力を構築す

るために 2 つのコア施設を設立することで、研究インフラの強化を続けてきた。FDA は、ナノマテリアルの重要な品質特性を確認するために、高度な物理化学的特性評価、in vitro の生体適合性、および in vivo の安全性に関する内部研究を実施し、FDA の科学者と審査官を新たな製品に対応できるように備えていくことの必要性について考慮するものであった。ナノテクノロジー製品は、単純なシステムから高度に複雑な多成分・多機能材料へと進化し続けており、FDA は科学を理解し、有益なナノテクノロジー製品を開発するためのイノベーションを支援することで公衆衛生を向上させる努力をしていくと考えてきた。ナノテクノロジーの規制政策では、産業界向けのガイダンス文書を発行してきており、ナノテクノロジー製品の規制に対する FDA の包括的なアプローチのフレームワークについて説明してきた。また、ナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究では、研究をサポートするための研究インフラを強化し、ナノテクノロジーに特化した学内助成プログラムを通じてセンター間の連携を促進させてきた。このように、データギャップやナノテクノロジー製品審査の重要な側面に対処している科学者に対する訓練の実施や社内の科学的専門知識と能力を構築することで、ナノテクノロジーの応用を含む FDA 規制製品の責任ある開発が今後も促進していくと考えられる。

EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議では、ナノマテリアルやナノ断片を含む材料の適用件数が増加しているにもかかわらず、各国の開発者や関係者による EFSA 2018 ガイダンスの直接的な利用頻度は、現時点でまだかなり低いものであった。従って、ナノネットワークでは、国家レベルでの申請者やリスク評価者による実施を促進するためにも、セミナーや教育で 2 つのガイダンス文書を普及させることを奨励することを結論付けている。また、ナノネットワークでは、植物保護製品 (すなわち、製剤または活性物質) におけるナノフォームの実施を検討すべきであり、更新された「ナノに関するガイダンス - RA」の採択に先立ち、ガイダンス文書への最終的なフィードバックを提供するため再度協議を行う予定であると結論付けている。

## E. 結論

ナノ酸化チタンの反復投与毒性影響については、引き続き、血液生化学検査、肝臓中のチタン濃度定量、および病理組織学的検査を実施しナノサイズ TiO<sub>2</sub> の 28 日間反復経口投与による亜急性毒性を検討する。

ナノ酸化チタンの免疫毒性については、食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータを蓄積するため、化粧品等への配合とともに着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタンが、アレルゲン経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討した。抗原経皮感作-経口惹起実験系については、OVA  $2 \mu\text{g} \times 4$  回の経皮感作、OVA  $30 \text{ mg} \times 7$  回の経口投与による追加免疫、その後のOVA  $50 \text{ mg}$  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、酸化チタンC(アナターゼ型、粒子径  $6 \text{ nm}$ )、及び酸化チタンE(アナターゼ型、粒子径  $30 \text{ nm}$ ) が、抗原の経口投与による追加免疫を増強することが示された。一方、酸化チタンF(ルチル型、粒子径  $30\text{-}50 \text{ nm}$ ) ではこのような増強効果は見られなかった。今後、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

ナノマテリアルの国際動向については、FDAは、ナノテクノロジーの応用を含む製品の科学技術の進歩を監視し続けていくことを提唱していた。今後、ナノテクノロジーを応用した次世代の製品は、ナノテクノロジーと最新の分子技術、ナノファイバーやナノマテリアルを含むデバイス(3Dプリントなど)の技術的な融合を含む可能性や、製品とその用途の複雑性と多様性が増す可能性があるため、新しい開発や製品の用途を把握していくことで、公衆衛生の保護や促進という使命を果たしていくことを結論付けている。

EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議では、公開協議後の更新と修正を含む粒子に関するガイダンス-TRのガイダンス草案の最終版を提示するものであった。また、ネットワークでは、ナノ特有のリスクアセスメントを適用するかどうかを決定するために、材料の物理化学的特徴(例:溶解性、溶出性、粒子径の特性)に基づく特定の基準と評価ルートを導入が必要であると考えている。さらに、既存の安全性研究がナノ断片を適切にカバーしていることを示すための基準も提示される必要もある。このガイダンスで提案された基準および関連する方法論は、この分野における技術調和を図るためと国際的な活動の現状を考慮するものであった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Tamehiro N, Adachi R, Kondo K. Assessment of immune responses in an animal model of wheat food allergy via epicutaneous sensitization. *Methods Mol Biol* 2021; 2223: 37-47.

Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. *Part Fibre Toxicol.* 2020 Oct 15;17(1):48. doi: 10.1186/s12989-020-00382-y.

### 2. 学会発表

Tamehiro N, Adachi R, Kondo K. Functional food ingredients modulate mast cell signaling.

JSA/WAO Joint Congress 2020

2020年9月

Maeno A, Hojo M, Sakamoto Y, Yuzawa K, Hasegawa Y, Kubo Y, Nagasawa A, Ando H, Tanaka K, Kaihoko F, Ikushima K, Yamamoto Y, Suzuki T, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Hirose A, Nakae D. Chronic toxicity study of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in rats by repeated intratracheal instillations: a progress report at 1 year. 第47回日本毒性学会学術年会 (Online) 2020.6.29

Akiko OHNO, Masatoshi WATANABE, Akihiko HIROSE. Development to toxicity assessment method of nanomaterials using multivariate analysis. 47回日本毒性学会学術集会 (2020.6.29-7.1, web開催)

Akiko OHNO, Masatoshi WATANABE, Akihiko HIROSE: Application to toxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, 260<sup>th</sup> ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koich Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th NANO Conference (Online), 2020.11.12-

13.

Hirose A, Hojo M, Taquahashi Y, Kanno J, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Ohnishi M, Goto Y, Nakae D. Development of an intermittent exposure type chronic toxicity assessment method for MWCNT as an alternative to the continuous two-year inhalation protocol. 9th NANO Conference (Online), 2020.11.12-13.

Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Ohnuki A, Maeno A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A and Nakae D. Declines in serum levels of apolipoproteins during the development of peritoneal mesothelioma by multiwalled carbon nanotube in rats. 60th SOT annual meeting

(SOT2021) (Online), 2021.3.12.

Iijima K, Nishida A, Ohno A, Hirose A, Ashikaga T. Comparison of Sensitization Potentials between Silver Nanoparticles and Silver Ions using Monocytic Cell Line THP-1. 60th SOT annual meeting (SOT2021) (Online), 2021.3.22.

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分 担 研 究 報 告 書（令和2年度）

ナノ酸化チタン及びナノ銀の経口反復投与毒性と体内動態解析

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）

研究協力者： 赤木 純一（国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官）

**研究要旨**

0.2% DSP に懸濁した結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ二酸化チタン（50 パーセントイル二次粒子径約 200 nm）を F344/DuCrj ラットに 10、100、1000 mg/kg bw/day の用量で 28 日間反復経口投与したところ、全ての群で死亡はみられず、体重、一般状態、血液学的検査、および臓器重量に毒性学的に有意な変化は見られなかった。血液生化学的検査では、雌の 1000 mg/kg bw/day 群でトリグリセリドの有意な増加が見られた。引き続き、肝臓中のチタン濃度定量および病理組織学的検査を実施してナノサイズ二酸化チタンの 28 日間反復経口投与による亜急性毒性を検討する。

キーワード： ナノサイズ二酸化チタン、亜急性毒性

**A. 研究目的**

二酸化チタン（TiO<sub>2</sub>）は産業界で最も多く製造されているナノ材料の一つである。TiO<sub>2</sub>は不溶性かつ不活性であるため、一般には人体に影響の少ない化合物とされている。経口摂取による TiO<sub>2</sub>の安全性について、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）による安全性評価では TiO<sub>2</sub>は毒性の低い A(1) に分類され、毒性学的に摂取量を制限する必要がないとされており、日本および各国において食品添加物として認可されている（蒲生昌志 編(2011)ナノ材料リスク評価書 -二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)-, 最終報告版: 2011.7.22)。動物実験では食品添加物として用いられている TiO<sub>2</sub>（AEROXIDER TiO<sub>2</sub> P25, KRISS CRM 301-03-001、一次粒子径 14-21nm、平均二次粒子径 142.9 ± 43.97 nm、アナターゼ 80%ルチル 20%、純度 99.9%）の 90 日間混餌投与における無毒性量（NOAEL）は最高投与量である 1000 mg/kg であり（Heo, M.B. et al. *Particle Fibre Toxicol.* (2020) 17, 34）、発生毒性試験において異なる粒子径を持つ顔料グレードまたは超微粒子/

ナノスケール TiO<sub>2</sub>（投与液中の 50 パーセントイル粒子径（D<sub>50</sub>）= 42~213 nm）の NOAEL は、いずれも最高投与量である 1000 mg/kg/日である（Warheit, D.B. et al., *Regul. Toxicol. Pharmacol.* (2015) 73, 887-896)。一方で、食品グレードの TiO<sub>2</sub>（E171）を 100 日間投与した場合には、ヘルパー T 細胞の増殖が抑制されるとともに大腸の微小炎症が促進され、前腫瘍性病変（異常陰窩巣）が発生するとともに、化学的に誘発された発がんモデルで異常陰窩巣の成長の促進が見られたとの報告がある（Bettini, S. et al., *Sci. Rep.* (2017) 7, 40373)。また TiO<sub>2</sub> ナノ粒子のラットへの経口投与では肝、腎、心、雄性生殖器の障害、酸化ストレスの誘発、炎症性サイトカインの増加、免疫系のバランス異常などの毒性が報告されている（Shakeel, M. et al., *Biol. Trace. Elem. Res.* (2016) 172, 1-36)。これまで一次粒子径 10 nm 以下の TiO<sub>2</sub>を用いた亜慢性毒性試験の報告はないことから、本実験では一次粒子径 6 nm のアナターゼ型 TiO<sub>2</sub>（D<sub>50</sub> = 約 200 nm）をラットに 28 日間反復経口投与し、生体への影響を明らか



にすることで、ヒトに対する健康影響リスク評価に役立てることを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質および投与量

結晶子径 6 nm の 100%アナターゼ型ナノサイズ二酸化チタン（テイカ株式会社 AMT-100、純度 93%）を被験物質として使用した。食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針に基づき高用量を 1000 mg/kg bw/day とし、毒性情報がないこと、および粒子径 10 nm のナノサイズ銀投与により肝臓のうっ血、単細胞壊死を伴い個体が瀕死や死亡に至る高度の毒性が見られた（Cho et al, J. Toxicol. Pathol. 2018 31, 73–80）ことから用量範囲を広く取るために中用量、低用量をそれぞれ 100 および 10 mg/kg bw/day と設定した。

被験物質は固体であるため、ラットへの強制経口投与試験を実施するため、懸濁液の調製方法を検討した。投与量を 10 ml/kg bw としたときの高用量の投与液濃度である 100 mg/ml で AMT-100 を超純水に懸濁すると速やかに沈降分離が見られ、超音波照射（Bioruptor II-Type 12, ON 30 sec/OFF 30 sec × 60 cycles, High power）後も、非照射サンプルとほぼ同様に沈降分離した。分散剤として 0.2% リン酸水素二ナトリウム（DSP）を用いると、肉眼上、均一な乳状の懸濁液が得られ、静置 30 分以内に分離は見られなかった（Figure 1）。この懸濁液中における個数分布に基づく 50 パーセントイル二次粒子径（液中粒子径）は約 200 nm であった（Figure 2）。DSP は食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）に基づく食品添加物として食品への使用が認められており、0.2% DSP を 10 ml/kg bw 投与したときのリン摂取量は 4.36 mg/kg bw であり最大耐容摂取量 70 mg/kg bw（リンとして）（TRS 683-JECFA 26/25, 1982）を十分下回ることから DSP による毒性影響はないと考えられた。以上より、0.2% DSP を分散剤として用いた 100 mg/ml AMT-100 を投与液として使用することとした。

### 2. 動物および飼育条件

5 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 20 匹を日本チャールス・リバーより購入し、基礎飼料（CRF-1；オリエンタル酵母工業）および水道水にて 1 週間馴化飼育後、6 週齢で実験に供した。動物は温度 23±1°C、湿度 50±5%、換気回数 20 回/時、12 時間の明暗サイクルに制御されたバリアーシステムの飼育室で飼育した。床敷としてソフトチップ（三協ラボサービス）を敷いたポリカーボネート製箱型ケージに 5 匹ずつ収容し、ケージおよび床敷を週 2 回の頻度で交換した。動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て、同所の定める「動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して行った。動物は投与開始日の体重に基づいて、雌雄とも各群の平均体重の標準偏差が最小になるように 1 群 5 匹からなる 4 群に分け、試験期間中は基礎飼料および水道水を自由摂取させた。

### 3. 強制経口投与

ポリテトラフルオロエチレン製フレキシブルチューブ（長さ：85mm、外径：1.46mm、頭部：2.4mm、フチガミ器械）を用いて TiO<sub>2</sub> 懸濁液を毎日 1 回 28 日間強制経口投与した。実験期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重および摂餌量を週 1 回測定した。動物は投与期間終了後に一晩絶食させ、イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った後、放血により安楽死させた。

### 4. 血液学および血液生化学的検査

採取した血液の一部を抗凝固剤（EDTA-2K）入りの試験管（ベノジェクト II 真空採血管、テルモ株式会社）に移し、血液学的検査として赤血球数（RBC）、ヘモグロビン量（HGB）、ヘマトクリット値（HCT）、平均赤血球容積（MCV）、平均赤血球血色素量（MCH）、平均赤血球血色素濃度（MCHC）、血小板数（PLT）および白血球数（WBC）、網状赤血球数（RET）、白血球分画（好中球；NEUT、好酸球；EO、好塩基球；BASO、単球；MONO、リンパ球；LYMPH）を自動血球計算装置 IDEXX

プロサイト Dx (アイデックスラボラトリーズ株式会社) を用いて測定した。

血清生化学的検査では、総タンパク (TP)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、アルブミン (ALB)、総ビリルビン (T-BIL)、グルコース (GLU)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (T-CHO)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、ナトリウム (Na)、クロール (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP) および  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GT) の各項目を測定した。

#### 5. 剖検および臓器重量

採血後に動物を放血死させ、剖検を実施するとともに、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、副腎、腎臓、卵巣あるいは精巣を摘出し、重量を測定した。また、上記の組織に加え胸骨、気管、大動脈、甲状腺、舌、食道、胃、小腸 (十二指腸、空腸、回腸)、大腸 (盲腸、結腸、直腸)、膵臓、膀胱、精囊、前立腺、精巣上体、子宮、膣、下垂体、大腿筋、坐骨神経、三叉神経、脊髄を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した。

#### 6. 統計学的処理

試験期間中の体重、摂餌量、血液学的・血清生化学的検査結果及び器官重量については各群の分散を Bartlett の方法で検定し、多重比較を Dunnett 等の方法により対照群と各被験物質投与群との間で有意差検定を行い、 $P < 0.05$  の場合を統計学的に有意と判定した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は「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、国立医薬品食品衛生研究所実験動物倫理委員会の承認を得た上で、関係法令を遵守して実施した。動物愛護の精神に則って動物飼育を行い、動物の処置は倫理規定に十分配慮して熟練者が実施し、実験終了時、

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安楽死させ、動物に与える苦痛を最小限に留めた。

### C. 研究結果

#### 1. 生存率、体重、摂餌量

試験期間中、雌雄すべての群において死亡はみられなかった。一部の動物で軟便および活動性の低下が一過性に観察されたが、群間に有意な差は見られなかった (Table 1)。雌雄ともに投与に伴う体重の変化は見られず、摂餌量も同程度であった (Figure 3)。

#### 2. 血液学的および血液生化学的検査

血液学的検査結果を Table 2 に示した。雄の 10 mg/kg bw/day 群で WBC の有意な低下が見られたが、軽微な変化であり、用量相関性がないことから偶発的な変動と考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群で MCH の有意な低下が見られたが、軽微な変化であり、RBC、HGB、MCV および MCHC には変動が見られなかったことから毒性学的な意義は乏しいと考えられた。

血液生化学的検査では、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な増加が見られた (Table 3)。また雄の 100 および 1000 mg/kg bw/day 群で CRE の有意な低下が見られたが、腎毒性を示唆する変動とは逆の変化であるため毒性学的な意義は乏しいと考えられた。

#### 3. 臓器重量

剖検日体重及び臓器重量を Table 5 (雄) 及び 6 (雌) に示した。雄の 10 mg/kg bw/day 群で脾臓の相対重量の有意な増加が見られたが、軽微な変化であり、用量相関性がないことから偶発的な変動と考えられた。その他の臓器には相対重量、絶対重量とも有意な差は見られなかった。

### D. 考察

0.2% DSP に懸濁した結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ TiO<sub>2</sub> (50 パーセントイル二次粒子

径約 200 nm) を F344/DuCrj ラットに 10、100、1000 mg/kg bw/day の用量で 28 日間反復経口投与したところ、全ての群で死亡はみられず、体重および一般状態に変化は見られなかった。血液生化学的検査では、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な増加が見られた。

#### **E. 結論**

引き続き、血液生化学検査、肝臓中のチタン濃度定量、および病理組織学的検査を実施しナノサイズ TiO<sub>2</sub> の 28 日間反復経口投与による亜急性毒性を検討する。

#### **F. 研究発表**

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### **G. 知的所有権の取得状況**

1. 特許所得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

Table 1. General conditions of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 4 weeks

Dose (mg/kg bw/day)		0	10	100	1000
Findings	Day				
<i>Male</i>					
No. of animals		5	5	5	5
Loose stools	9	-	-	1	-
	18	1	1	-	-
	23	-	-	1	-
Low activity	16	-	-	-	1
<i>Female</i>					
No. of animals		5	5	5	5
Loose stools	9	-	-	-	1
Low activity	14	-	1	-	-

Table 2. Haemaology of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 4 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	0	10	100	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	5	5	5	5
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	8.90 $\pm$ 0.53	8.91 $\pm$ 0.25	8.90 $\pm$ 0.42	9.03 $\pm$ 0.21
HGB (g/dL)	15.5 $\pm$ 0.8	15.4 $\pm$ 0.4	15.5 $\pm$ 0.6	15.5 $\pm$ 0.2
HCT (%)	45.2 $\pm$ 3.0	45.1 $\pm$ 1.6	45.3 $\pm$ 2.0	45.7 $\pm$ 0.7
MCV (fL)	50.7 $\pm$ 0.7	50.5 $\pm$ 0.4	50.9 $\pm$ 0.6	50.6 $\pm$ 0.4
MCH (pg)	17.5 $\pm$ 0.2	17.2 $\pm$ 0.2	17.4 $\pm$ 0.2	17.2 $\pm$ 0.1
MCHC (g/dL)	34.4 $\pm$ 0.5	34.1 $\pm$ 0.4	34.2 $\pm$ 0.3	34.0 $\pm$ 0.1
RET (%)	3.16 $\pm$ 0.35	3.03 $\pm$ 0.20	2.97 $\pm$ 0.18	3.01 $\pm$ 0.20
PLT ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	512 $\pm$ 289	751 $\pm$ 60	730 $\pm$ 76	774 $\pm$ 22
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	6.75 $\pm$ 1.10	4.73 $\pm$ 0.83 *	5.89 $\pm$ 1.21	5.10 $\pm$ 0.74
Differential Cell count				
NEUT (%)	19.7 $\pm$ 5.18	23.7 $\pm$ 4.05	28.6 $\pm$ 7.14	26.5 $\pm$ 2.03
LYMPH (%)	75.8 $\pm$ 5.50	72.9 $\pm$ 4.13	66.8 $\pm$ 6.95	69.8 $\pm$ 2.49
MONO (%)	2.78 $\pm$ 0.99	2.56 $\pm$ 0.46	3.30 $\pm$ 1.80	2.72 $\pm$ 0.49
EO (%)	1.52 $\pm$ 0.99	0.72 $\pm$ 0.15	0.98 $\pm$ 0.45	0.76 $\pm$ 0.20
BASO (%)	0.20 $\pm$ 0.06	0.12 $\pm$ 0.10	0.24 $\pm$ 0.10	0.26 $\pm$ 0.12
<i>Female</i>				
No. of animals	5	5	5	5
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	9.06 $\pm$ 0.22	9.05 $\pm$ 0.25	9.23 $\pm$ 0.31	9.17 $\pm$ 0.10
HGB (g/dL)	16.1 $\pm$ 0.3	16.1 $\pm$ 0.5	16.3 $\pm$ 0.5	16.1 $\pm$ 0.2
HCT (%)	46.8 $\pm$ 1.0	46.4 $\pm$ 1.6	47.4 $\pm$ 1.7	46.8 $\pm$ 0.6
MCV (fL)	51.6 $\pm$ 0.6	51.2 $\pm$ 0.4	51.3 $\pm$ 0.4	51.1 $\pm$ 0.5
MCH (pg)	17.8 $\pm$ 0.1	17.8 $\pm$ 0.1	17.7 $\pm$ 0.2	17.5 $\pm$ 0.1 **
MCHC (g/dL)	34.4 $\pm$ 0.3	34.8 $\pm$ 0.3	34.4 $\pm$ 0.1	34.3 $\pm$ 0.3
RET (%)	2.52 $\pm$ 0.16	2.62 $\pm$ 0.24	2.58 $\pm$ 0.27	2.53 $\pm$ 0.40
PLT ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	707 $\pm$ 43	670 $\pm$ 184	598 $\pm$ 237	740 $\pm$ 98
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	4.35 $\pm$ 1.26	4.04 $\pm$ 1.07	4.18 $\pm$ 1.11	4.90 $\pm$ 1.97
Differential Cell count				
NEUT (%)	17.6 $\pm$ 2.76	17.7 $\pm$ 4.36	16.9 $\pm$ 4.83	18.1 $\pm$ 5.89
LYMPH (%)	77.4 $\pm$ 2.79	74.4 $\pm$ 10.86	78.1 $\pm$ 4.14	77.2 $\pm$ 6.29
MONO (%)	3.24 $\pm$ 0.48	3.26 $\pm$ 0.80	3.24 $\pm$ 0.48	2.80 $\pm$ 0.53
EO (%)	1.52 $\pm$ 0.45	4.34 $\pm$ 5.78	1.56 $\pm$ 1.03	1.64 $\pm$ 0.44
BASO (%)	0.18 $\pm$ 0.10	0.36 $\pm$ 0.32	0.20 $\pm$ 0.11	0.30 $\pm$ 0.11

Values are mean  $\pm$  S.D. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with 0 mg/kg bw/day group.

Table 3. Serum biochemistry of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 4 weeks

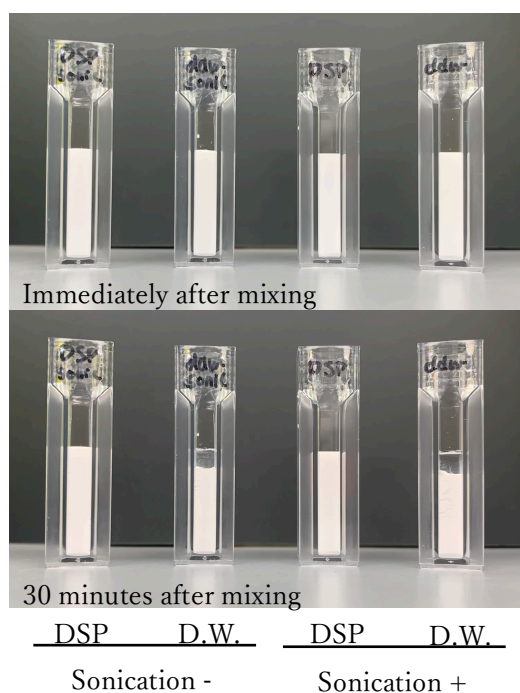
Dose (mg/kg bw/day)	0	10	100	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	5	5	5	5
TP (g/dL)	6.02 ± 0.17	6.10 ± 0.11	6.18 ± 0.15	6.02 ± 0.07
ALB (g/dL)	4.26 ± 0.16	4.34 ± 0.05	4.40 ± 0.09	4.26 ± 0.10
A/G	2.42 ± 0.10	2.48 ± 0.17	2.48 ± 0.17	2.44 ± 0.19
BUN (mg/dL)	21.82 ± 2.74	20.68 ± 0.72	20.56 ± 1.09	20.16 ± 1.59
CRE (mg/dL)	0.348 ± 0.047	0.296 ± 0.022	0.282 ± 0.017 *	0.280 ± 0.020 *
Na (mEq/L)	142.6 ± 0.8	143.4 ± 1.0	143.8 ± 0.7	142.6 ± 1.0
K (mEq/L)	5.06 ± 1.41	4.30 ± 0.38	4.02 ± 0.19	4.28 ± 0.10
Cl (mEq/L)	100.8 ± 2.0	101.6 ± 0.5	101.2 ± 1.2	101.2 ± 0.4
Ca (mg/dL)	10.56 ± 0.72	10.54 ± 0.28	10.44 ± 0.26	10.24 ± 0.27
IP (mg/dL)	8.24 ± 1.43	7.26 ± 1.07	6.92 ± 0.54	7.18 ± 0.24
AST (IU/L)	100.8 ± 25.2	108.6 ± 46.3	88.0 ± 9.5	80.4 ± 2.9
ALT (IU/L)	41.6 ± 1.6	43.2 ± 2.1	42.2 ± 2.5	39.8 ± 3.8
ALP (IU/L)	809.8 ± 42.3	790.4 ± 51.2	815.6 ± 32.2	796.6 ± 12.0
r-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
T-CHO (mg/dL)	58.2 ± 3.7	55.2 ± 6.5	56.0 ± 4.1	56.4 ± 4.2
TG (mg/dL)	61.6 ± 13.4	47.8 ± 6.6	54.0 ± 9.7	54.4 ± 4.5
T-BIL (mg/dL)	0.048 ± 0.007	0.048 ± 0.004	0.056 ± 0.008	0.050 ± 0.011
GLU (mg/dL)	157.0 ± 38.9	139.2 ± 15.7	136.0 ± 10.9	145.2 ± 11.4
<i>Female</i>				
No. of animals	5	5	5	5
TP (g/dL)	5.80 ± 0.21	5.86 ± 0.12	5.96 ± 0.33	5.94 ± 0.15
ALB (g/dL)	4.24 ± 0.14	4.30 ± 0.11	4.36 ± 0.23	4.34 ± 0.05
A/G	2.74 ± 0.10	2.80 ± 0.11	2.76 ± 0.17	2.72 ± 0.26
BUN (mg/dL)	20.82 ± 1.19	19.52 ± 1.75	21.04 ± 1.44	21.08 ± 1.24
CRE (mg/dL)	0.324 ± 0.019	0.312 ± 0.021	0.338 ± 0.050	0.318 ± 0.017
Na (mEq/L)	143.4 ± 1.0	143.4 ± 0.5	143.2 ± 0.7	143.0 ± 0.6
K (mEq/L)	3.90 ± 0.11	3.92 ± 0.07	3.96 ± 0.29	3.92 ± 0.12
Cl (mEq/L)	103.8 ± 0.7	103.2 ± 1.2	103.6 ± 1.0	103.6 ± 0.5
Ca (mg/dL)	9.80 ± 0.46	9.90 ± 0.30	10.14 ± 0.08	10.10 ± 0.17
IP (mg/dL)	6.44 ± 0.22	6.80 ± 0.50	6.58 ± 0.61	6.82 ± 0.39
AST (IU/L)	106.0 ± 28.8	88.0 ± 12.5	87.8 ± 9.2	77.0 ± 4.6
ALT (IU/L)	35.4 ± 2.2	32.6 ± 2.3	33.0 ± 2.8	34.6 ± 3.6
ALP (IU/L)	567.6 ± 25.0	589.0 ± 56.6	585.2 ± 24.1	592.2 ± 33.5
r-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
T-CHO (mg/dL)	74.0 ± 6.5	78.6 ± 8.0	75.8 ± 8.7	78.8 ± 3.2
TG (mg/dL)	21.4 ± 8.3	24.8 ± 7.7	21.2 ± 7.8	42.8 ± 10.2 **
T-BIL (mg/dL)	0.054 ± 0.010	0.056 ± 0.008	0.046 ± 0.015	0.056 ± 0.016
GLU (mg/dL)	92.8 ± 9.1	89.2 ± 4.3	92.4 ± 15.6	102.6 ± 5.1

Values are mean ± S.D. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with 0 mg/kg bw/day group.

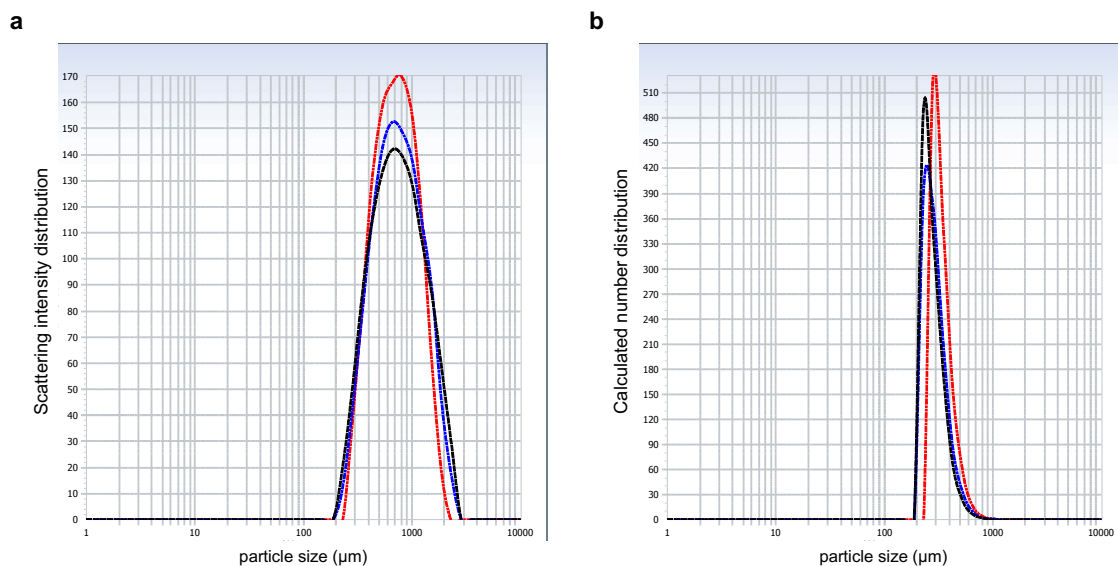
Table 4. Organ weights of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 4 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	0	10	100	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	5	5	5	5
Body weight (g)	209.5 ± 6.1	207.6 ± 8.5	207.8 ± 14.6	209.2 ± 9.7
Absolute (g)				
Brain	1.801 ± 0.063	1.839 ± 0.044	1.831 ± 0.024	1.816 ± 0.024
Thymus	0.279 ± 0.025	0.282 ± 0.019	0.291 ± 0.016	0.276 ± 0.035
Lungs	0.739 ± 0.052	0.772 ± 0.054	0.756 ± 0.055	0.783 ± 0.044
Heart	0.717 ± 0.059	0.719 ± 0.047	0.715 ± 0.058	0.702 ± 0.047
Spleen	0.480 ± 0.024	0.498 ± 0.017	0.476 ± 0.033	0.481 ± 0.026
Liver	6.007 ± 0.984	5.573 ± 0.269	5.500 ± 0.515	5.518 ± 0.435
Adrenals	0.034 ± 0.003	0.035 ± 0.002	0.036 ± 0.005	0.038 ± 0.003
Kidneys	1.417 ± 0.098	1.439 ± 0.085	1.377 ± 0.088	1.369 ± 0.090
Testes	2.652 ± 0.097	2.754 ± 0.032	2.700 ± 0.208	2.620 ± 0.264
Relative (%)				
Brain	0.860 ± 0.019	0.887 ± 0.021	0.885 ± 0.061	0.870 ± 0.046
Thymus	0.133 ± 0.011	0.136 ± 0.008	0.141 ± 0.008	0.132 ± 0.015
Lungs	0.352 ± 0.020	0.372 ± 0.014	0.364 ± 0.007	0.374 ± 0.012
Heart	0.342 ± 0.020	0.346 ± 0.014	0.344 ± 0.016	0.335 ± 0.009
Spleen	0.229 ± 0.006	0.240 ± 0.005 **	0.229 ± 0.004	0.230 ± 0.002
Liver	2.858 ± 0.383	2.685 ± 0.061	2.642 ± 0.082	2.634 ± 0.087
Adrenals	0.016 ± 0.002	0.017 ± 0.001	0.017 ± 0.002	0.018 ± 0.001
Kidneys	0.676 ± 0.029	0.693 ± 0.021	0.663 ± 0.014	0.654 ± 0.019
Testes	1.267 ± 0.051	1.329 ± 0.053	1.299 ± 0.039	1.257 ± 0.149
<i>Female</i>				
No. of animals	5	5	5	5
Body weight (g)	134.0 ± 5.5	131.8 ± 2.8	133.4 ± 3.8	131.0 ± 4.4
Absolute (g)				
Brain	1.693 ± 0.046	1.678 ± 0.057	1.680 ± 0.042	1.699 ± 0.031
Thymus	0.228 ± 0.014	0.233 ± 0.009	0.225 ± 0.017	0.214 ± 0.012
Lungs	0.625 ± 0.032	0.611 ± 0.054	0.586 ± 0.025	0.566 ± 0.023
Heart	0.504 ± 0.007	0.507 ± 0.034	0.492 ± 0.023	0.497 ± 0.010
Spleen	0.347 ± 0.016	0.342 ± 0.008	0.356 ± 0.017	0.344 ± 0.021
Liver	3.421 ± 0.094	3.446 ± 0.111	3.326 ± 0.134	3.267 ± 0.150
Adrenals	0.041 ± 0.004	0.043 ± 0.004	0.040 ± 0.003	0.040 ± 0.002
Kidneys	0.928 ± 0.067	0.929 ± 0.046	0.949 ± 0.030	0.956 ± 0.033
Ovaries	0.053 ± 0.004	0.055 ± 0.008	0.055 ± 0.016	0.048 ± 0.010
Relative (%)				
Brain	1.266 ± 0.076	1.273 ± 0.026	1.259 ± 0.018	1.298 ± 0.052
Thymus	0.171 ± 0.011	0.177 ± 0.004	0.168 ± 0.014	0.164 ± 0.011
Lungs	0.466 ± 0.015	0.463 ± 0.036	0.439 ± 0.016	0.433 ± 0.019
Heart	0.377 ± 0.014	0.384 ± 0.019	0.369 ± 0.023	0.380 ± 0.013
Spleen	0.259 ± 0.003	0.260 ± 0.006	0.267 ± 0.008	0.263 ± 0.017
Liver	2.556 ± 0.095	2.614 ± 0.052	2.493 ± 0.100	2.494 ± 0.102
Adrenals	0.031 ± 0.003	0.033 ± 0.003	0.030 ± 0.001	0.031 ± 0.001
Kidneys	0.692 ± 0.023	0.704 ± 0.022	0.711 ± 0.024	0.730 ± 0.028
Ovaries	0.040 ± 0.002	0.042 ± 0.006	0.041 ± 0.011	0.037 ± 0.007

Values are mean ± S.D. \*\*  $P < 0.01$  compared with 0 mg/kg bw/day group.

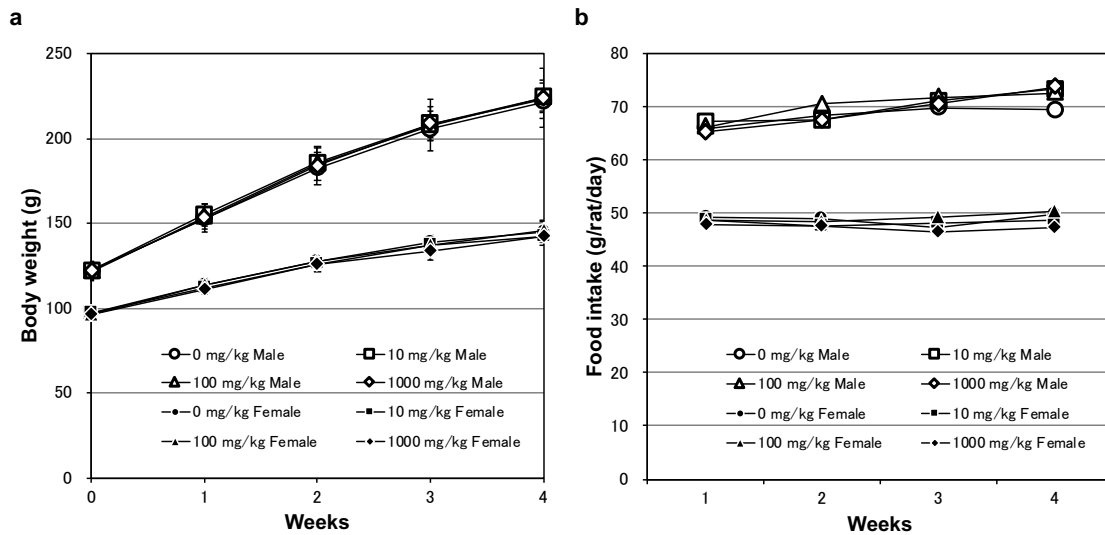


**Figure 1.** Comparison of solvents for TiO<sub>2</sub>  
 TiO<sub>2</sub> : AMT-100 (primary diameter 6 nm)  
 Concentration : 100 mg/ mL  
 Solvent : 0.2% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (DSP) or distilled water (D.W.)



**Figure 2.** Scattering intensity distribution (a) and calculated number distribution (b) of titanium dioxide suspended in 0.2% disodium phosphate measured by dynamic light scattering.





**Figure 3.** Body weight (a) and daily food intake (b) of male and female F344/DuCrj rats orally administered titanium dioxide for 4 weeks.

## ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析

研究分担者：安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長  
研究協力者：為広 紀正 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官

### 研究要旨

食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータを蓄積するため、化粧品等への配合とともに着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタンが、アレルギー経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討した。抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系については、OVA 2 $\mu$ g $\times$ 4回の経皮感作、OVA 30 mg $\times$ 7回の経口投与による追加免疫、その後のOVA 50 mg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、酸化チタンC（アナターゼ型、粒子径 6 nm）、及び酸化チタンE（アナターゼ型、粒子径 30 nm）が、抗原の経口投与による追加免疫を増強することが示された。一方、酸化チタンF（ルチル型、粒子径 30-50 nm）ではこのような増強効果は見られなかった。今後、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、粒子径、結晶型、あるいは表面修飾状態等の点も含め、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

### A. 研究目的

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては、更なる応用が期待されている一方で、健康影響についてはまだ十分な安全性情報がないとされており、今日も引き続き議論がなされている。酸化チタンは食品・食品用容器包装用途に使用されている一方で、多くの日焼け止め製品に配合されており、経皮及び経口暴露の頻度が高い。ナノ酸化チタン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。一方で、最近、タンパク質が皮膚から取り込まれ抗原となる経皮感作経路が食物アレルギー発症の重要な要因として注目されている。そこで、研究分担

者である安達らはこれまでにナノ酸化チタンがアレルギー経皮感作に与える影響についてマウスモデル実験系を用いて検討し、小粒子径（直径 6 nm）のナノ酸化チタンは、経皮感作時の共存により感作の増強すること、また、経皮感作後の経口追加免疫時の共存によりアレルギー症状を増強する可能性があること等を示してきた。

本研究班の目的は、食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータの蓄積であり、本分担研究では、化粧品等への配合とともに、着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタン等が、アレ

ルゲン経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討する。

令和2年度においては、抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系を精緻化し、アレルギーの経口投与に対する小粒子径ナノ酸化チタン、及びより粒子径の大きなナノ酸化チタンの影響について検討した。

## B. 研究方法

### 試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン C

(アナターゼ型、粒子径 6 nm)

酸化チタン E

(アナターゼ型、粒子径 30 nm)

酸化チタン F

(ルチル型、粒子径 30-50 nm)

(全て表面未処理)

を使用した。

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

### 酸化チタンナノ材料の懸濁液調製

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

### 【実験 1】経皮感作時の OVA 用量検討、及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響

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。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。8 週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (1 or 2µg/50µL) 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 50µL 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 28、30、32、35、37、39、42 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回/週、計 7 回)、追加免疫を行った。この時、ナノ酸化チタン投与群では、OVA 30mg と TiO<sub>2</sub>C 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 1、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。Day 49 に OVA 50mg を経口投与し、アレルギー反応を惹起した。追加免疫及び惹起時の経口投与後 1 時間は、マウスの直腸温測定、及び下痢症状の観察を行い、下痢症状については Table 1 の基準に従ってスコアリングした。

### 【実験 2】より大きいナノ酸化チタンの影響に関する検討

経皮感作の操作は【実験 1】と同様に行った。1 群の匹数は 5 匹とした (経口投与時にナノ酸化チタンのみを投与する陰性対照群については 1 群 2 匹とした)。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。経皮感作時の OVA 用量は 2µg/50µL とした。経口投与に関するスケジュール、OVA 及びナノ酸化チタンの用量は【実験 1】と同様である。抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体の測定、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についても【実験 1】と同様に行った。

### 統計解析

データは Microsoft Excel により集計した。Vehicle 群を基準とした Dunnett の検定、あるいは Student t-test による OVA 投与群と OVA-ナノ

酸化チタン投与群との有意差検定を行い、 $p<0.05$  を有意とした。

(倫理面への配慮)

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

## C.研究結果

### 【実験 1】経皮感作時の OVA 用量検討、及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響

抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系に関するこれまでの筆者らの検討では、経皮感作時の OVA 用量を  $2\mu\text{g}$  とし、今回と同様のスケジュール及び経口投与用量にて、1 群 3 匹で予備的検討を行った。その結果、経口投与時に粒子径の小さいナノ酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm) を共存させた場合、OVA 経口投与時の体温低下及び下痢症状が増強される傾向が見られた。

本研究課題の初年度である今年度は、上記結果について 1 群 5 匹として再現性を検討した。また、これまでの経皮感作に関する検討の際と同様に、経皮感作時の OVA 用量を  $1\mu\text{g}$  及び  $2\mu\text{g}$  の 2 段階に設定し、実験系の精緻化を目指した。ナノ酸化チタン C を共存させる群では、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。

Fig. 2 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ、その後の経口追加免疫によってさらに増加した。追加免疫時の酸化チタン C 共存による顕著な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、Fig.3 及び Fig.4 に示す。体温に関して、OVA2 群では、経

口追加免疫時及び経口惹起時に、V 群と比較して有意な低下が見られた。OVA2-TiO<sub>2</sub>C po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られ、また、経口追加免疫 5 回目では、OVA2 群との比較においても有意な体温低下が見られた。一方、OVA1 群、OVA1-TiO<sub>2</sub>C po 群では、V 群と比較して有意な体温低下は見られなかった。下痢症状に関しては、OVA2 群及び OVA2-TiO<sub>2</sub>C po 群では、V 群と比較して有意に高いスコアとなった。経口追加免疫 5 回目、7 回目では、OVA2 群と比較して OVA2-TiO<sub>2</sub>C po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。一方、OVA1 群、OVA1-TiO<sub>2</sub>C po 群では、V 群と比較してやや高いスコアであったが、有意差は見られなかった。これらの結果から、本検討での実験系に関して、経皮感作時に  $2\mu\text{g}$  の OVA を用いることにより経口追加免疫・経口惹起が適切に検出可能であること、また、経口投与時の酸化チタン C の共存により経口追加免疫が増強されることが示された。

### 【実験 2】より大きいナノ酸化チタンの影響に関する検討

ここまで、粒子径の小さい酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm) に関して、経口投与時の共存効果を検討してきた。そこで次に、より粒子径の大きなナノ酸化チタンである、酸化チタン E (アナターゼ型、粒子径 30 nm)、及び酸化チタン F (ルチル型、粒子径 30-50 nm) の 2 種について、同様に経口投与時の共存効果を検討した。各群の実験条件、及び実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。1 群 5 匹とし、経口投与時に酸化チタン E あるいは F を共存させる群を設定した。OVA: ナノ酸化チタン重量比は、酸化チタン C の場合と同様に 16:1 とした。経皮感作時の OVA 用量は  $2\mu\text{g}$  とした。

Fig. 5 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ、その後の経口追加免疫によってさらに増加した。追加免疫時の酸化チタン E、

Fの共存による顕著な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、Fig.6 及び Fig.7 に示す。体温に関して、OVA 群では、経口追加免疫時及び経口惹起時に、V 群と比較して有意な低下が見られた。OVA-TiO<sub>2</sub>E po 群、OVA-TiO<sub>2</sub>F po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られた。また、経口追加免疫 7 回目において、OVA-TiO<sub>2</sub>E po 群では OVA 群との比較においても有意な体温低下が見られ、経口投与時の共存により追加免疫が増強されることが示された。また経口追加免疫 4 回目においても OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。一方 OVA-TiO<sub>2</sub>F po 群では、OVA 群の体温低下との間に有意な差は見られなかった。下痢症状に関しては、OVA 群、OVA-TiO<sub>2</sub>E po 群、OVA-TiO<sub>2</sub>F po 群で、V 群と比較して有意に高いスコアとなった。また、経口追加免疫 4 回目では、OVA 群と比較して OVA-TiO<sub>2</sub>E po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。

なお、陰性対照群である酸化チタン E あるいは F のみを経口投与した群 (TiO<sub>2</sub>E only 群、TiO<sub>2</sub>F only 群) では、OVA 特異的抗体産生、OVA 経口投与時の体温低下、下痢症状とも見られなかった。

これらの結果から、経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系において、粒子径の小さい酸化チタン C (6 nm) だけでなく、同じアナターゼ型で粒子径がより大きい酸化チタン E (30 nm) に関しても、経口投与時に共存させることにより経口追加免疫が増強されることが示された。

#### D. 考察

本研究班の目的は、食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、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、化粧品等への配合とともに、着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタン等

が、アレルゲン経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討する。

令和 2 年度においては、これまで検討してきた抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系を精緻化し、OVA 経口投与時の酸化チタン C の影響について検討した。その結果、2µg OVA による経皮感作後に OVA を経口投与することにより、経口追加免疫・経口惹起を誘導できること、この時酸化チタン C を共存させることにより経口追加免疫が増強されることが示された (【実験 1】)。この【実験 1】において、OVA 1 群と OVA2 群を比較すると、OVA 特異的抗体産生に大きな差は無かったが、経口投与に関しては、OVA2 群では明らかなアレルギー症状が誘発されたのに対し OVA1 群では顕著なアレルギー症状発現は見られなかった。これは、血中の OVA 特異的抗体濃度には反映されない感作状態の違い (樹状細胞、T 細胞等の活性化状態の違い) のためではないかと考えられる。

また、【実験 2】では、より大きい粒子径のナノ酸化チタン 2 種 (E : アナターゼ型・粒子径 30 nm、F : ルチル型・粒子径 30-50 nm) が OVA 経口追加免疫・経口惹起に与える影響について検討した。今回使用した酸化チタン F に関しては、経口投与により大腸炎モデルマウスの炎症を増悪させることが報告されている (Gut 2017; 66: 1216-1224)。また、粒子径 66 nm のナノ酸化チタンの経口投与によりマウス小腸に炎症が誘導されることが報告されている (World J Gastroenterol 2012; 18(34): 4729-4735)。筆者らのこれまでの検討では、OVA 経皮感作に関して、酸化チタン C は増強効果を示したが、酸化チタン E は増強効果を示さなかった一方で、OVA 腹腔内感作においては両者とも増強効果を示した。酸化チタン F は本検討で初めて使用する検体である。本研究の検討においては、酸化チタン E が酸化チタン C と同様に経口追加免疫が増強されることが示された。酸化チタン F ではこのような増強効果は見られなかった。これら

の結果から、経口投与時の共存効果に関しては、これまで検討していた小粒子径の酸化チタン C (6 nm、アナターゼ型) の他に、より粒子径が大きいナノ酸化チタンについても今後さらに検討する必要がある、またその際に結晶型あるいは表面修飾等の影響についても考慮する必要があると考えられる。

また、本モデル実験系における経口投与時のナノ酸化チタンの増強効果については、最終的な症状惹起時ではなく、7 回の経口追加免疫時にナノ酸化チタン非投与群との差が見られていることから、ナノ酸化チタンの作用機序についても今後の検討が必要であろう。

## E. 結論

食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等から暴露されるナノマテリアル等の新規素材について、安全性評価に資するデータを蓄積するため、化粧品等への配合とともに着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタンが、アレルギー経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討した。抗原経皮感作-経口惹起実験系については、OVA 2 $\mu$ g $\times$ 4 回の経皮感作、OVA 30 mg $\times$ 7 回の経口投与による追加免疫、その後の OVA 50 mg 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、酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm)、及び酸化チタン E (アナターゼ型、粒子径 30 nm) が、抗原の経口投与による追加免疫を増強することが示された。一方、酸化チタン F (ルチル型、粒子径 30-50 nm) ではこのような増強効果は見られなかった。今後、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Tamehiro N, Adachi R, Kondo K. Assessment of immune responses in an animal model of wheat food allergy via epicutaneous sensitization. *Methods Mol Biol* 2021; 2223: 37-47.

### 2. 学会発表

1) Tamehiro N, Adachi R, Kondo K. Functional food ingredients modulate mast cell signaling. *JSA/WAO Joint Congress 2020*  
2020 年 9 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

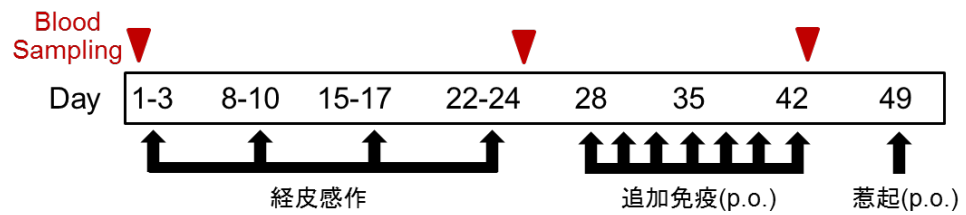
### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

投与スケジュール



実験1 経皮感作時のOVA用量検討、及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響(1群5匹 x 5群)

群名	経皮感作	追加免疫(p.o.)	惹起(p.o.)
Vehicle (V)	PBS	Saline	OVA 50mg
OVA1	OVA 1 $\mu$ g	OVA 30mg	OVA 50mg
OVA2	OVA 2 $\mu$ g	OVA 30mg	OVA 50mg
OVA1-TiO <sub>2</sub> C po	OVA 1 $\mu$ g	OVA 30mg+TiO <sub>2</sub> C 1.88mg	OVA 50mg
OVA2-TiO <sub>2</sub> C po	OVA 2 $\mu$ g	OVA 30mg+TiO <sub>2</sub> C 1.88mg	OVA 50mg

※ TiO<sub>2</sub>C: 粒子径6nm, アナターゼ型

実験2 より大きいナノ酸化チタンの影響に関する検討(1群5匹 x 4群、1群2匹 x 2群)

群名	経皮感作	追加免疫(p.o.)	惹起(p.o.)
Vehicle (V)	PBS	Saline	OVA 50mg
OVA	OVA 2 $\mu$ g	OVA 30mg	OVA 50mg
OVA-TiO <sub>2</sub> E po	OVA 2 $\mu$ g	OVA 30mg +TiO <sub>2</sub> E 1.88mg	OVA 50mg
OVA-TiO <sub>2</sub> F po	OVA 2 $\mu$ g	OVA 30mg+TiO <sub>2</sub> F 1.88mg	OVA 50mg
TiO <sub>2</sub> E only (2匹)	PBS	TiO <sub>2</sub> E 1.88mg	OVA 50mg
TiO <sub>2</sub> F only (2匹)	PBS	TiO <sub>2</sub> F 1.88mg	OVA 50mg

※ TiO<sub>2</sub>E: 粒子径30nm, アナターゼ型. TiO<sub>2</sub>F: 粒子径35-50nm, ルチル型.

Figure 1 各実験群の設定および投与スケジュール

Table 1 下痢症状スコアリングの基準

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

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

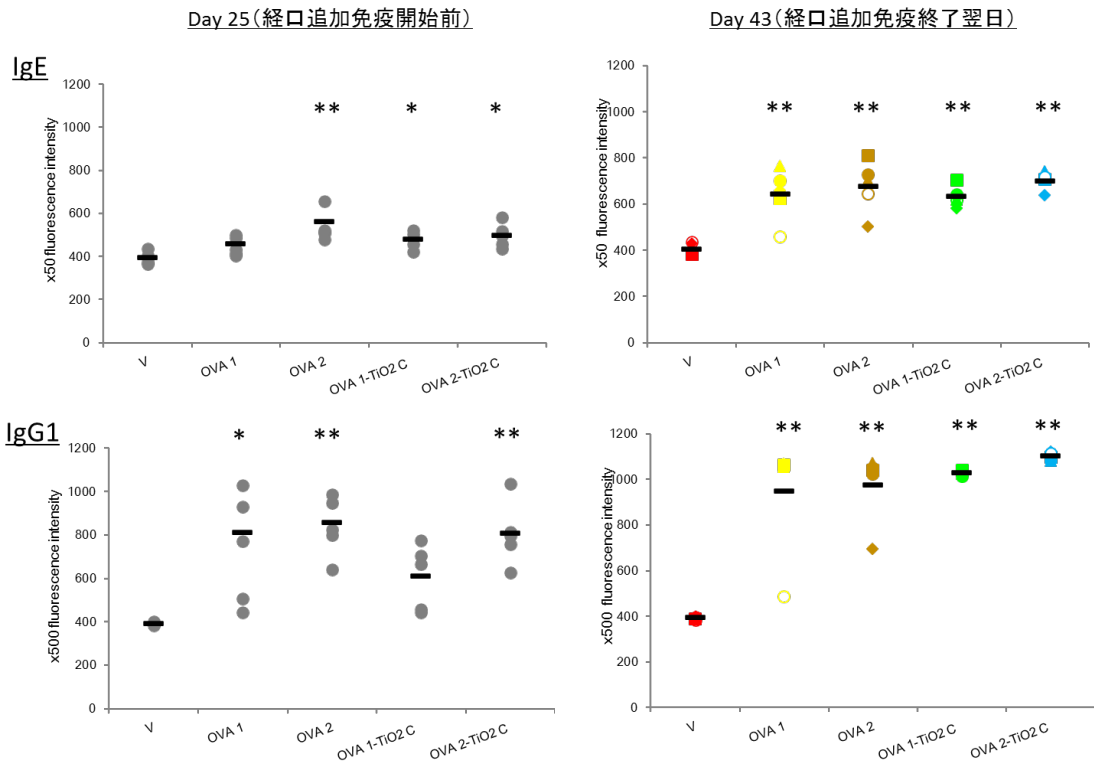
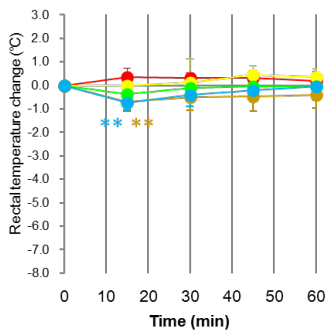
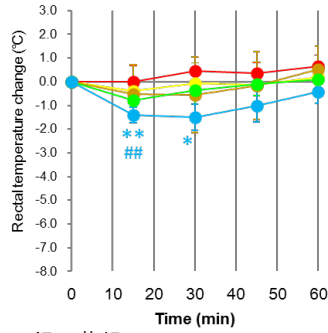


Figure 2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生(【実験1】)  
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs V group by Dunnett's test.

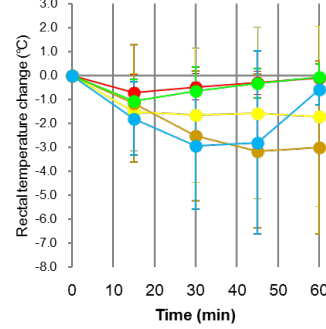
経口追加免疫  
1回目



5回目



7回目



経口惹起

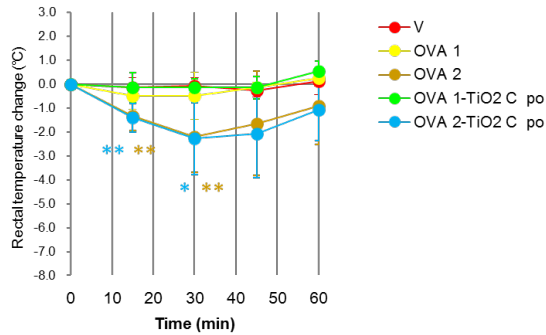


Figure 3 抗原経口投与後の体温低下(【実験1】)  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs V group by Dunnett's test.  
## $p < 0.01$  vs OVA2 group by Student's t-test.



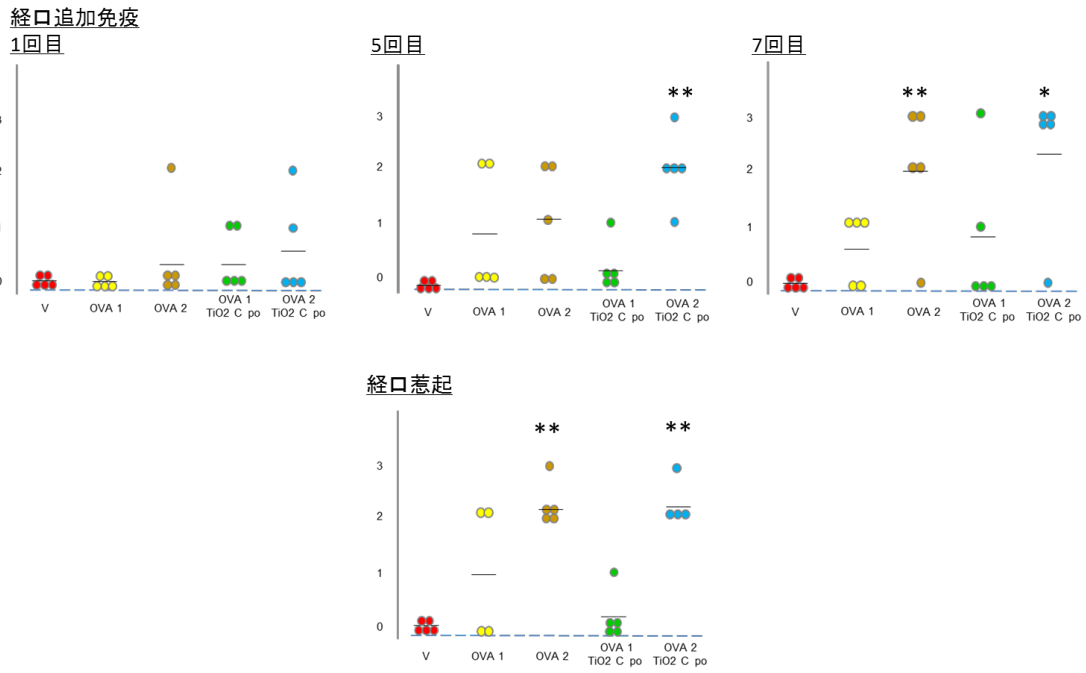


Figure 4 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング(【実験1】)  
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs V group by Dunnett's test.

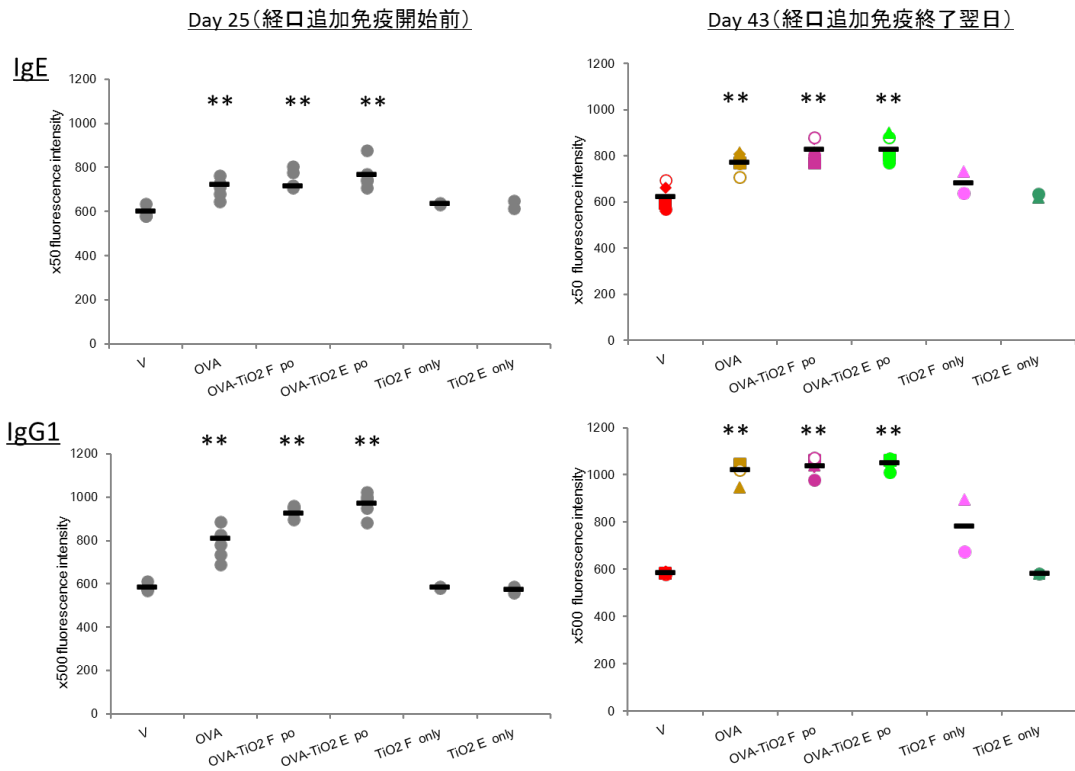
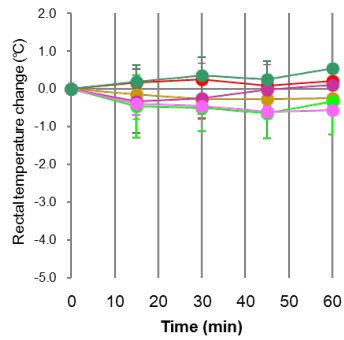
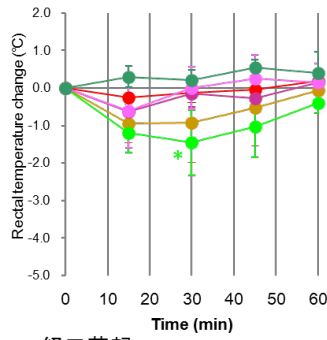


Figure 5 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生(【実験2】)  
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs V group by Dunnett's test.

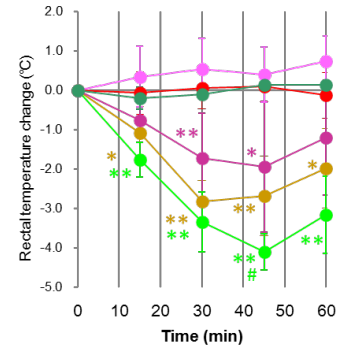
経口追加免疫  
1回目



4回目



7回目



経口惹起

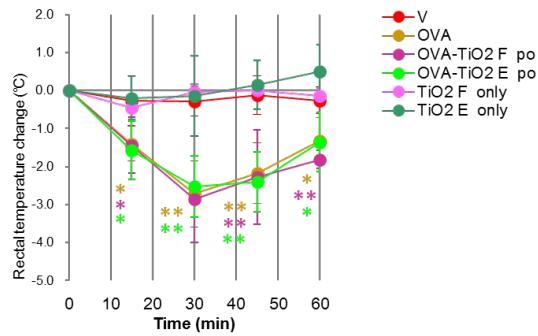
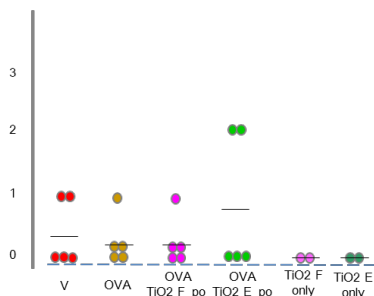
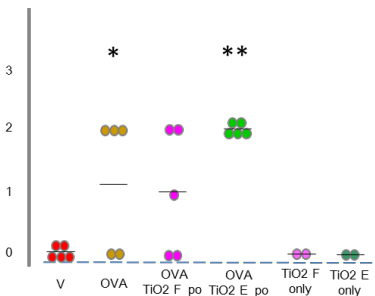


Figure 6 抗原経口投与後の体温低下(【実験1】)  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs V group by Dunnett's test.  
## $p < 0.05$  vs OVA group by Student's t-test.

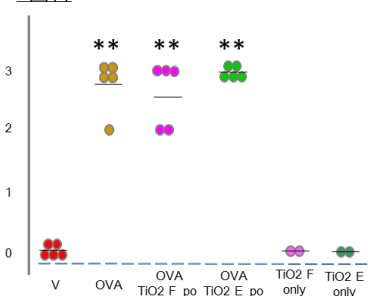
経口追加免疫  
1回目



4回目



7回目



経口惹起

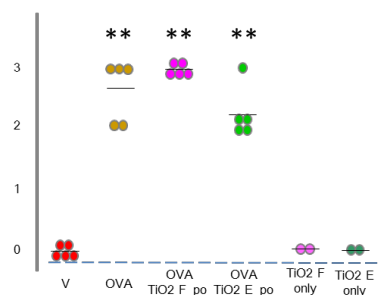


Figure 7 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング(【実験2】)  
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs V group by Dunnett's test.

令和2年度 厚生労働科学研究費（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

研究課題名：食品及び食品用容器包装に使用される新規素材の安全性評価に関する研究  
分担研究課題名：食品関連分野のナノマテリアル並びに新規素材の安全性評価に関する  
国際動向調査

研究分担者：広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長  
研究協力者：大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官

**研究要旨**

本研究では、食品関連分野におけるナノマテリアル並びに新規素材の安全性評価に関する国際動向を調査することを目的とする。令和2年度は、米国食品医薬品局（FDA）のワークショップ「FDA's NanoDay Virtual Research Symposium」に参加し、ナノテクノロジーの現状やFDAの科学的な根拠に基づくナノテクノロジーの規制政策、ナノテクノロジーのレギュラトリーサイエンス研究の概要に関する調査を実施した。また、欧州食品安全機関（EFSA）の科学ネットワーク主催による「食品と試料のナノテクノロジーに関するネットワーク会議」に関する調査を行い、EFSAの新ガイドライン（2018年）を捕捉するテクニカルガイダンス案についての議論について調査した。その結果、FDAのワークショップでは、これまでにFDAが所管するナノマテリアル栄養補助食品を含む食品や化粧品などの分野において行ってきた政策やレギュラトリーサイエンス研究の紹介や現在行っている最新の研究紹介が行われた。2007年のナノテクノロジータスクフォース（NTF）の報告書に基づき、ナノテクノロジー製品に対する規制アプローチとして、利害関係者が申請時に新技術の使用を検討する際には、ナノテクノロジー由来の製品の開発や分析技術における科学的な進歩に伴い、FDAに協議することを奨励している。ナノテクノロジーの規制政策として、これまで産業界向けのガイダンス文書を発行してきている。これらのガイダンス文書では、ナノテクノロジー製品の規制に対するFDAの包括的なアプローチのフレームワークを説明していた。FDAの食品安全・応用栄養センター（CFSAN）では、CFSANが規制する製品への将来的なナノテクノロジーの応用を審査する際に生じる可能性のある新しい課題に対してFDAの科学者が対応可能となるように研究を行ってきた。さらに、データギャップやナノテクノロジー製品審査の重要な側面に対処している科学者への訓練の実施や社内の科学的専門知識と能力を構築することで、ナノテクノロジーの応用を含むFDA規制製品の責任ある開発を促進していくとしている。一方、EFSAテクニカルガイダンスに関するネットワーク会議では、公開協議後の更新と修正を含む粒子に関するガイダンス-TR（Technical Requirements）のガイダンス草案の最終版を提示するものであった。また、ネットワークでは、ナノ特有のリスクアセスメントを適用するかどうかを決定するために、材料の物理化学的特徴（例：溶解性、溶出性、粒子径の特性）に基づく特定の基準と評価ルートを導入が必要であると考えている。さらに、既存の安全性研究がナノ断片を適切にカバーしていることを示すための基準も提示される必要もある。このガイダンスで提案された基準および関連する方法論は、この分野における技術調和を図るためと国際的な活動の現状を考慮するものであった。

## A. 研究目的

近年、革新的なテクノロジーの進展に伴い、世界的にもナノマテリアルを用いた材料は、産業分野において消費者に幅広く利用され、今後、物質材料分野の新しい素材として更なる応用が期待されている。一方、ナノマテリアルの安全性に対する懸念は年々高まってきており、健康影響への可能性の指摘や、リスク管理において重要な課題となっている。しなしながら、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。欧州連合では、ナノマテリアル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、米国においても米国環境保護庁(EPA)を主体に規制および監視の検討や、食品医薬品局 (FDA) によるナノテクノロジー製品への規制および安全性評価に向けた業界向けに幾つかのガイダンス文書の作成が進められている。更に、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、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、食品関連分野における国際動向を中心とするが、毒性評価に関する研究等は、食品用途に限らず分野を越えて共通する課題であるため、リスク評価手法の共通性の観点から関連する分野の動向も併せて調整の対象としている。

令和 2 年度は、2020 年 10 月 Web 開催の FDA のワークショップ (FDA's NanoDay Virtual Research Symposium) に参加し FDA のナノマテリアルの現状とナノテクノロジーの規制政策やナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究の概要の調査を実施した。また、EFSA の新ガイドライン (2018 年) を捕捉するテクニカルガイダンス案について、第 10 回食品と試料のナノテクノロジーに関するネットワーク会議 (2020 年 10 月 21-22 日、Web 会議) に関する調査を実施した。

## B. 研究方法

2020 年 10 月 Web 開催の FDA のワークショップ (FDA's NanoDay Virtual Research Symposium) に参加し FDA のナノマテリアルの現状とナノテクノロジーの規制政策やナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究の概要の調査を実施した。また、EFSA の新ガイドライン (2018 年) を捕捉するテクニカルガイダンス案について、第 10 回食品と試料のナノテクノロジーに関する

ネットワーク会議 (2020 年 10 月 21-22 日、Web 会議) に関する調査を実施した。

## C. 研究結果

### ■ FDA's NanoDay Virtual Research Symposium

2000 年に国家ナノテクノロジー戦略 (NNI) が設立され、米国政府機関によるナノテクノロジーへの研究開発投資への活発化と共に、ナノテクノロジーの分野は大きく発展してきている。当時の FDA の副長官は、ナノテクノロジーを応用した製品の米国食品医薬品局 (FDA) への提出が増加することを予想し、2006 年にナノテクノロジー・タスクフォース (NTF) を立ち上げ、ナノテクノロジー科学の現状に関する FDA 規制当局の評価を支援した。2007 年に NTF は、その調査結果とコミッショナーへの勧告を公表した。その後、FDA は規制審査に提出されたナノマテリアルを含む製品の提出件数が徐々に増加した状況を受け、今回のワークショップでは科学的な根拠に基づくナノテクノロジーの規制政策やナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究の概要の報告となった。

### ▶ FDA 規制対象製品における ナノマテリアルサイエンスとナノテクノロジーの現状

2007 年の報告書以降、生命科学や、工学、医学などの分野の急速な進歩により、ナノテクノロジーに関する知識や理解が深まり、FDA 規制対象製品へのナノテクノロジーへの応用の現状と可能性が高まっている。また、ナノテクノロジーはバイオテクノロジーなどの他の分野とも融合しており、分子レベルでバイオシステムへの理解を深めていくものであった。このような進歩が FDA 審査の薬事申請に含まれる製品の多様性、複雑性や、生産量に反映されるものであった。

1970 年以降、FDA の医薬品評価研究センター (CDER) は、ナノマテリアルを含むヒト医薬品の 600 件以上の申請 (治験薬 (IND)、新薬申請 (NDA)、簡略新薬申請 (ANDA)) を受理しており、そのうちの半分は過去 10 年以内に提出されたものであった。図 1 は、CDER に提出されたナノマテリアルを含む医薬品の長年にわたる提出傾向を示す。

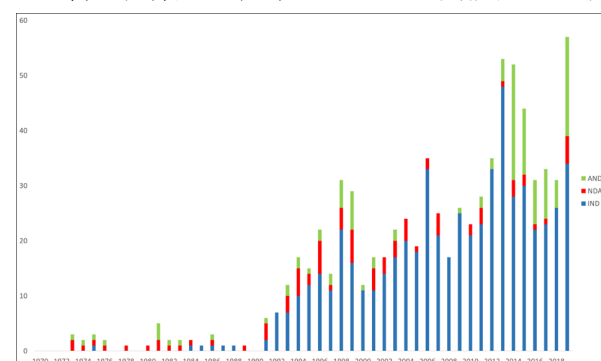


Figure 1: Human drug product submissions to FDA containing nanomaterials between 1970-2019.

FDA は、動物用医薬品へのナノマテリアルの使用に関する研究についても認識しており、FDA の獣医学センター (CVM) では、ナノテクノロジーを使用した幾つかの動物用医薬品について新規申請を承認していた。さらに、栄養補助食品を含む食品や化粧品においては、ナノテクノロジー由来の製品の開発や分析に期待される科学的進歩に伴ったことから FDA は、このような申請において新技術の使用を検討する際には、利害関係者が FDA に協議するように奨励していた。

また、FDA の食品安全・応用栄養センター (CFSAN) は、医薬品等で先行しているナノテクノロジーが食品分野にも展開されていく状況を踏まえ、CFSAN が規制する製品へのナノテクノロジーの将来的な応用を審査する際に生じる可能性のある新しい課題に対して、FDA の科学者が対応可能となるように研究を行ってきた。規制局 (ORA) では、FDA の規制対象製品に含まれるナノマテリアルの検出と特性評価の分析方法を開発するために共同研究を続けてきた。このようにして、FDA は市販前および市販後の監視を通じて、ナノマテリアルを含む製品に関連する潜在的なリスクが特定可能となったことを述べていた。

#### ➤ 科学的根拠に基づき、製品に焦点を当てたナノテクノロジーの規制政策

2006 年に FDA は、ナノテクノロジー製品がもたらす規制上の課題に FDA の科学者が対応できるよう、ナノテクノロジーに関する科学的知識を向上させるプロセスを開始した。また、FDA はナノテクノロジータスクフォース (NTF) を設置し、ここではナノテクノロジーを利用した革新的で安全かつ効果的な FDA 規制対象製品の継続的な開発を促す規制へのアプローチの特定や、FDA が革新的な製品を評価し公衆衛生を守るために必要な知識や政策のギャップに対処する方法を特定し推奨した。

2007 年、NTF は報告書を発表し、ナノテクノロジーの使用は、他の新興技術を使用した製品と同様に規制上の課題をもたらすことを明らかにすることを示した。この報告書では、公衆衛生を保護・促進するという FDA の使命を果たすために、ナノテクノロジーに関する科学的・規制的な政策課題に対して、FDA が活動するためのいくつかの

提言がされていた。

2007 年の NTF の報告書の実施の一環として、FDA はナノテクノロジー製品に対する規制アプローチを明確にし、業界向けのガイダンスの発行を提言した。FDA は、ナノテクノロジー製品を本質的に無害か有害かというような分類として判断しておらず、むしろ、科学的根拠に基づき製品に焦点を当てた規制方針を適用することで、FDA は既存の法的権限のもと、FDA の管轄下にある各タイプの製品に適用される特定の法的基準に従って、ナノテクノロジー製品を規制することであると述べている。規制へのアプローチとしては、製品の安全性、有効性、公衆衛生への影響、または規制状況の評価の一環として、ナノテクノロジーの使用によってもたらされる可能性のある独自の特性や動きについて考慮することが求められる。FDA の政策としては、①製品開発の初期段階で、安全性や規制の状況に関する疑問点を特定し対処するために、産業界が FDA と協議することを奨励していることや、②一般市民と積極的にコミュニケーションをとって情報を共有し、意見を求めること、また、③国内外のカウンターパートと協力してレギュラトリーサイエンスを進めることなど、重要な特徴を兼ね備えるものであった。

#### ➤ FDA の産業界向けのガイダンス文書

FDA は産業界に対して、ナノテクノロジー製品の規制状況の判断や安全性の評価へのアドバイスを含むガイダンスを発行してきた。これらのガイダンス文書は、拘束力のない推奨事項を提供するものであったが、FDA があるテーマについて現在の考え方を伝えるための貴重なツールとして、且つステークホルダーに対してさらなる明確性を提供するのに役立つものであった。現在までに、FDA は 5 つの最終ガイダンス文書を発行しており、1 つは現在、草案中である。

#### ➤ 5 つの産業界向けの最終ガイダンス

##### • FDA 規制製品がナノテクノロジーを使用の有無について検討

本ガイダンスは、ナノテクノロジー製品の規制に対する FDA の包括的なアプローチのフレームワークを説明するものであり、すべての FDA 規制製品に広く適用可能な 2 つの考慮すべきポイントを明らかにしていた。

- 1) 材料や最終製品は、少なくとも 1 つの外部寸法または内部構造や表面構造にナノスケール範囲 (約 1nm から 100nm) を持つよう

に設計されている。

- 2) 材料や最終製品は、たとえその寸法が1マイクロメートル(1,000nm)までのナノスケールの範囲外であっても、その寸法に起因するような物理的・化学的特性や生物学的効果などの特性や現象を示すように設計されている。

これら2つの留意点については、全てのFDA規制製品に広く適用すべきとの見解であった。いずれかの留意点で肯定的な知見が得られた場合には、その製品の安全性、有効性、公衆衛生への影響、または規制状況に対する潜在的な影響を特定していき、その製品への対処についてFDAや業界がその製品に対して特別に留意する必要性を提唱するものであった。

これに関連し、FDAは、新たな技術を含む製造工程の大幅な変更のある食品成分および食品接触物質の安全性と規制状況に及ぼす影響への評価、化粧品中のナノマテリアルの安全性、動物用食品へのナノマテリアルの使用、リポソーム製剤に関するナノマテリアルの使用、ナノマテリアルを含む生物学的製剤を含む医薬品(案)に対してのガイダンスを作成してきている(概略は、補足情報として末尾に開催)。

➤ 産業界向けのガイダンス草案  
ナノマテリアルを含む生物学的製剤を含む医薬品

パブリックコメント用に公表された本ガイダンス草案は、ナノマテリアルを含む医薬品を開発する際に、簡略化された承認経路に従って提出された申請書に記載された製品を含む一般的な原則と具体的な検討事項について説明するものである。本文書では、製品の開発と製造を通じて、ナノマテリアルを含む医薬品に関連する品質、非臨床、臨床試験の留意点について説明されており、コメント期間は2018年3月19日に終了し、FDAは最終ガイダンス文書を発行する前に、どのような修正が必要かを判断するために寄せられたパブリックインプットを検討している。

➤ ナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究

ナノテクノロジー関連の研究を強化するためのFDAの戦略は、全てのFDA製品センターのレギュラトリーサイエンス活動を調整への強固なフレームワークによるものであった。2013年ナノテクノロジーレギュラトリーサイエンス研究計

画でFDAは、ナノマテリアルを含む製品のレギュラトリーサイエンス活動において協調的なリーダーシップを発揮するためのフレームワークと実施計画を示した。このフレームワークは、FDAが規制上の意思決定に必要な科学的知識や、方法、ツールのギャップを特定することで対処できるように設計されていた。

➤ ナノテクノロジー研究基盤の強化

2011年、FDAはナノテクノロジーに関わるレギュラトリーサイエンス研究を支援・促進し、全てのFDAの製品センターで規制上の課題に取り組むために2つのナノテクノロジーコア施設を設立した。

1つはメリーランド州のFDA本部であり、もう1つはアーカンソー州のジェファーソンラボに設置された。これらのコア施設は以下のように設計されていた。

- 1) FDAの研究者に、ナノテクノロジー関連の研究を行うための特性評価に関するツールや技術サポートを集中的に提供する。
- 2) FDAの審査官にナノテクノロジーとナノマテリアルの特性評価に関する実践的なトレーニングの場を提供し、製品審査とレギュラトリーサイエンスにおける知識のギャップを埋める。
- 3) 規制上の特定の問題に対処し、科学的根拠に基づき決定する基礎を確立するために、FDAが規制する製品について研究を実施する。

アーカンソー州のナノテクノロジーコア施設(ナノコア)は、NCTR、FDAの規制局アーカンソー研究所(ORA/ARKL)と、米国保健福祉省の国家毒性プログラム(NTP)が共同で運営している。また、ナノコア施設は、NCTRとORAのレギュラトリーサイエンス研究や、CDER、CFSAN、CDRHなど他のFDAセンターの活動をサポートしている。さらに、ナノコア施設には、分光法、粒子径、表面組成、安定性分析、特性評価、元素分析、顕微鏡、分離・分画、クロマトグラフィーなどの最先端の装置があり、ナノテクノロジーに関する分析を行うNCTRおよびORA/ARKLの研究者や研究員のニーズをサポートすることが可能である。ナノコア施設にある機器についてFDAは、ナノテクノロジーをベースにしたFDA規制製品を正確にモニターし、安全性や必要に応じて有効性を確保するための分析方法の開発が可能であることを述べて

いた。

ナノコア施設/NCTRの主な研究は、FDA規制製品におけるナノマテリアルの同定と特性評価や、日焼け止めとその皮膚浸透性の評価、in vivoやin vitroとの相関関係をサポートする薬物動態、有効性、生体内分布の研究、細胞および遺伝子毒性、ナノ粒子の生物への蓄積の影響を決定するような宿主抵抗性アッセイなどであった。

➤ NTPの支援を受けているNCTRのある重要な研究の一例

Sprague-Dawleyラットに13週間毎日経口投与した場合の銀の蓄積、分布、形態、毒性の違いについて、銀の粒子状およびイオン状の形態と銀の粒子径を評価した。また、酢酸銀を投与したラットと比較して、銀ナノ粒子を投与したラットでは、銀の蓄積の分布パターンと形態の違いや、銀の有意な用量依存性および銀ナノ粒子サイズ依存性の組織蓄積、銀の組織蓄積の有意な性差が見られたという結果が報告されていた。

➤ CORES ( Collaborative Opportunities for Research Excellence in Science) 内部補助金プログラム

ナノテクノロジーのレギュラトリーサイエンス研究は、化学、生物学、物理学などの科学分野から成り立っており、学際的なものである。さらに、学際的な研究の進歩により、新しい科学技術を応用して開発される製品や、複数のFDA製品センターで規制される製品が増えてきていた。このように、FDAは複雑化する規制の状況に対応し、これらの新技術が製品の安全性、有効性、品質にどのような影響を与えるかを理解し、イノベーションに関連する規制政策の策定に役立つ情報を提供するためには内部の協力が不可欠であると考えられた。このようなニーズに応えるためにもFDAは、2010年にナノテクノロジーの分野の横断的な研究活動を促進するためのCORES内部助成プログラムを開発した。

CORES助成プログラムは、FDAのレギュラトリーサイエンスにおけるナノテクノロジー研究の優先度の高いニーズに対応するため、センター間および外部との共同研究の機会を促進することを目的とするものである。ここでの研究ニーズには、ナノマテリアルの特性評価、生体適合性の評価、トキシコキネティクス、in vitroやin vivo毒性試験の調査など、国家ナノテクノロジー戦略(NNI)-環境、健康、および安全性研究戦略の優先事項を反映するものであった。CORES補助金から

得た研究成果は、産業界向けのガイダンス文書の発行や、FDAが規制対象製品のナノテクノロジーを評価する際に使用するアッセイや評価方法、試験プロトコルなどの重要なレギュラトリーサイエンスツールの開発を支援するデータを提供するものであった。さらに、CORESプログラムは、FDA全体の協力関係を促進し、学界、産業界、他の連邦機関との関係を強化してきた。

(補足情報)

新たな技術を含む製造工程の大幅な変更のある

食品成分および食品接触物質(着色料である食品成分を含む)の安全性と規制状況に及ぼす影響への評価

本ガイダンスは、ナノテクノロジーを含む重要な製造工程の変更のある食品物質の安全性と規制状況に与える潜在的な影響について製造者に通知するものであった。本ガイダンスでは、既に市場に出回っている食品物質の製造工程での重要な変更において、食品物質の同一性、食品物質の使用の安全性、および食品物質の使用の規制状況に影響を与えるかどうかや、変更についてのFDAへの規制当局への提出を保証するものかどうかについて判断する際に、製造業者が考慮すべき要素について説明するものであった。

化粧品中のナノマテリアルの安全性

本ガイダンスは、化粧品に含まれるナノマテリアルの安全性評価に関するFDAの現在の考え方を示すものであった。本ガイダンスでは、一般的に、化粧品の安全性評価の原則としてナノマテリアルを含む化粧品にも適用されると説明されている。しかし、化粧品に使用されているナノマテリアルが起因するような特性や効果を考慮することにより、データの必要性や試験方法を評価する必要があることを提唱していた。

動物用食品へのナノマテリアルの使用

本ガイダンスは、動物用食品にマテリアルを添加するための法的な枠組みについて述べており、ナノマテリアル動物用食品成分の食品添加物申立書(FAP)を提出するための推奨事項を含むものであった。また、本ガイダンスでは、メーカーがナノマテリアル動物用食品成分の開発の初期段階で、FAPを提出する前にFDAと協議することを推奨するものであった。

リポソーム製剤に関するナノマテリアルの使用

本ガイダンスでは、CDERが審査するリポ

ソーム製剤の新薬申請 (NDA) または簡略新薬申請 (ANDA) において、申請者が提出すべき情報の種類について説明されていた。また、化学、製造、管理、ヒト薬物動態、生物学的利用能、或いは生物学的同等性、ならびにラベル付けについても説明がされていた。本ガイダンスは、特定の種類のナノマテリアルに関する初の「クラス別」ガイダンスであり、リポソームに関しては CDER が受け取るナノテクノロジーの申請の 3 分の 1 以上を占めていた。

## ■ EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議

2020 年 10 月に開催された食品及び飼料のナノテクノロジーに関する EFSA の科学ネットワーク会議で議長は、粒子状 (ナノ) 物質に関連する 2 つの EFSA ガイダンス文章 (粒子に関するガイダンス - TR : Guidance on Particle on Technical Requirements、ナノに関するガイダンス - RA : Guidance on Nano - Risk Assessment) について、その背景と対象範囲について説明した。

2018 年に食品および飼料中におけるナノ科学およびナノテクノロジーの適用のリスクアセスメントに関するガイダンス (Guidance on the risk assessment of the application of the nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. 第 1 部、ヒトと動物の健康) (ナノに関するガイダンス - RA) の初版が発行され、現在レビュー中である。ナノネットワークは、歴史的背景や当初と新たなマנדート、あるいは関連する法的な事への明確化について情報提供を受けるものであった。「粒子に関するガイダンス-TR (ナノ粒子を含む小さな粒子の存在を確認するための規制対象食品・飼料製品申請のための技術的要件に関するガイダンス)」は、EFSA の管轄下にある従来の材料にナノ粒子が存在する可能性を確認するために作成された。更にこのガイダンスは、「ナノに関するガイダンス - RA」への適用への必要性の有無を判断するために、評価対象の材料に関する情報要件を示していた。

これら 2 つのガイダンス文書は補完的なものであり、また、製品の最終用途に依存する特定の分野の枠組みに統合すべきものであり、安全性評価のメインフレームであると述べられている。

➤ 粒子ガイダンスに関する EFSA ガイダンス - 技術的要件 (TR) に対する ANSES のコメント

Bruno Teste 氏 (フランス) は、2020 年 6 月に発表された「食品中のナノマテリアル」に関する

ANSES の意見をナノネットワークに伝えた。意見の第 1 部は、社会的認知、食品添加物および食品接触材料についてのナノ材料の特定、およびリスクアセスメント戦略を定義する支援ツールの提案に焦点を当てるものであった。現在作成中の意見書の第 2 部は、ナノ特有のリスクアセスメントの開発に焦点を当てており、特に Nano E171 (2016 年と 2018 年の ANS パネルで EFSA が発行した食品添加物の二酸化チタン) をケーススタディとした暴露とハザードの特性評価に焦点を当てたものである。本文書では、ナノマテリアルの識別基準を提案しており、評価のための主な手法として電子顕微鏡を推奨している。また、リスクアセスメントのプロセス (ナノ特有のリスクアセスメント、または従来のリスクアセスメント) を決定するために開発された意思決定ツールとして、被験物質の溶解性を評価するための 2 つの戦略的アプローチを示している。引き続き、Bruno Teste 氏は、ANSES が公聴会で提出した「粒子に関するガイダンス - TR」に関するコメントを発表した。このコメントは、ANSES の意見書の最初の部分を対象としている第 2 節と第 3 節 (溶解度、溶解速度、粒子の特性評価など) に特化して提出されたものであった。

➤ ナノファイバーの有害性評価への新たなアプローチ手法 (NAMs) の使用

ナノセルロースのケーススタディ

ナノファイバーの有害性評価のための NAMs の使用に関する提案募集が開始された。この助成金は、次の 2 つの項目に焦点を当てていた。

- 1) ナノセルロースの経口曝露：胃腸での消化、ナノファイバーの取り込みと局所的な影響
- 2) gut-on-a-chip モデルの使用の検討。

ナノマテリアルと NAMs

ナノネットワークでは、ナノマテリアルの有害性評価における NAMs の現状と貢献について議論していた。更にナノネットワークのメンバーの国レベルでの進行中の活動状況 (例：ポルトガル、ギリシャ、スロバキア) や国際機関レベルでの参加 (イタリアとオランダの OECD 活動への参加など) について最新情報が紹介された。

➤ 加盟国の活動

EFSA ナノプロジェクトと ScienSano ワークショップ

Eveline Verleysen 氏 (ベルギー) は、EFSA ナノプロジェクト「有害性評価における食品添加物中



のナノ材料の物理化学的特性評価と暴露分析」について発表した。このプロジェクトは、ベルギーの Health, Food Chain Safety and Environment の助成を受けて実施された「EC 承認食品添加物中のナノ材料を評価するための分析手法の実施と検証」に関する Nanofood@プロジェクトの延長線上にあるものである。EFSA ナノプロジェクトの主な目的は、電子顕微鏡をベースとした技術と分光学的技術を組み合わせることにより、食品マトリックス中のナノ粒子の物理化学的特性を評価するため標準化した検証済みの手法を開発し、適用することである。

#### D. 考察

米国では 2000 年に国家ナノテクノロジー戦略 (NNI) が設立されたことで、米国政府機関によるナノテクノロジーへの研究開発投資が活発化し、ナノテクノロジーの分野で大きな進歩を遂げ、複雑な問題に対する新たな解決策を可能にしてきた。FDA は、ヒトや動物の医薬品、ワクチン、その他の生物学的製品、医療機器の安全性、有効性、品質、セキュリティを確保することで、国民の健康を守る責任と、国内の殆どの食料品、化粧品、放射線を発する製品の安全性にも責任を負っている組織として活動している。2006年にFDAは、ナノテクノロジーを応用した製品の FDA への申請が増加することを予想して、ナノテクノロジータスクフォース (NTF) を立ち上げ、ナノテクノロジーに関する科学の現状に対する FDA の規制当局の評価を支援してきた。NTF は 2007 年に、調査結果と長官への提言をまとめた包括的な公開レポートを発表したが、この報告書が発表されて以来、FDA では規制審査のために提出されたナノマテリアルを含む製品の申請件数が徐々に増加してきた。ナノテクノロジー専用の予算を持つ FDA は、ナノテクノロジーレギュラトリーサイエンス研究をサポートし、科学的専門知識と能力を構築するために 2 つのコア施設を設立することで、研究インフラの強化を続けてきた。FDA は、ナノマテリアルの重要な品質特性を確認するために、高度な物理化学的特性評価、*in vitro* の生体適合性、および *in vivo* の安全性研究に関する内部研究を実施し、FDA の科学者と審査官を新たな製品に対応できるように備えていくことの必要性について考慮するものであった。ナノテクノロジー製品は、単純なシステムから高度に複雑な多成分・多機能材料へと進化し続けており、FDA は科学を理解し、有益なナノテクノロジー製品を開発するためのイノベーションを支援することで公衆衛生

を向上させる努力をしていくと考えてきた。ナノテクノロジーの規制政策では、産業界向けのガイダンス文書を発行してきており、ナノテクノロジー製品の規制に対する FDA の包括的なアプローチのフレームワークについて説明してきた。また、ナノテクノロジーにおけるレギュラトリーサイエンス研究では、研究をサポートするための研究インフラを強化し、ナノテクノロジーに特化した学内助成プログラムを通じてセンター間の連携を促進させてきた。このように、データギャップやナノテクノロジー製品審査の重要な側面に対処している科学者に対する訓練の実施や社内の科学的専門知識と能力を構築することで、ナノテクノロジーの応用を含む FDA 規制製品の責任ある開発が今後も促進していくと考えられる。

EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議では、ナノマテリアルやナノ断片を含む材料の適用件数が増加しているにもかかわらず、各国の開発者や関係者による EFSA 2018 ガイダンスの直接的な利用頻度は、現時点でまだかなり低いものであった。従って、ナノネットワークでは、国家レベルでの申請者やリスク評価者による実施を促進するためにも、セミナーや教育で 2 つのガイダンス文書を普及させることを奨励することを結論付けている。また、ナノネットワークでは、植物保護製品（すなわち、製剤または活性物質）におけるナノフォームの実施を検討すべきであり、更新された「ナノに関するガイダンス - RA」の採択に先立ち、ガイダンス文書への最終的なフィードバックを提供するため再度協議を行う予定であると結論付けている。

#### E. 結論

FDA は、ナノテクノロジーの応用を含む製品の科学技術の進歩を監視し続けていくことを提唱していた。今後、ナノテクノロジーを応用した次世代の製品は、ナノテクノロジーと最新の分子技術、ナノフィーチャやナノマテリアルを含むデバイス (3D プリントなど) の技術的な融合を含む可能性や、製品とその用途の複雑性と多様性が増す可能性があるため、新しい開発や製品の用途を把握していくことで、公衆衛生の保護や促進という使命を果たしていくことを結論付けている。

EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議では、公開協議後の更新と修正を含む粒子に関するガイダンス-TR のガイダンス草案の最終版を提示するものであった。また、ネットワークでは、ナノ特有のリスクアセスメントを適用するかどうかを決定するために、材料の物理化学的

特徴（例：溶解性、溶出性、粒子径の特性）に基づく特定の基準と評価ルートを導入が必要であると考えている。さらに、既存の安全性研究がナノ断片を適切にカバーしていることを示すための基準も提示される必要もある。このガイダンスで提案された基準および関連する方法論は、この分野における技術調和を図るためと国際的な活動の現状を考慮するものであった。

## F. 研究発表 (論文発表)

Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. Part Fibre Toxicol. 2020 Oct 15;17(1):48. doi: 10.1186/s12989-020-00382-y.

(学会発表)

Maeno A, Hojo M, Sakamoto Y, Yuzawa K, Hasegawa Y, Kubo Y, Nagasawa A, Ando H, Tanaka K, Kaihoko F, Ikushima K, Yamamoto Y, Suzuki T, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Hirose A, Nakae D. Chronic toxicity study of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in rats by repeated intratracheal instillations: a progress report at 1 year. 第47回日本毒性学会学術年会 (Online) 2020.6.29

Akiko OHNO, Masatoshi WATANABE, Akihiko HIROSE. Development to toxicity assessment method of nanomaterials using multivariate analysis. 47回日本毒性学会学術集会 (2020.6.29-7.1, web開催)

Akiko OHNO, Masatoshi WATANABE, Akihiko HIROSE: Application to toxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, 260<sup>th</sup> ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koich Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th NANO Conference (Online), 2020.11.12-13.

Hirose A, Hojo M, Taquahashi Y, Kanno J, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Ohnishi M, Goto Y, Nakae D. Development of an intermittent exposure type chronic toxicity assessment method for MWCNT as an alternative to the continuous two-year inhalation protocol. 9th NANO Conference (Online), 2020.11.12-13.

Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Ohnuki A, Maeno A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A and Nakae D. Declines in serum levels of apolipoproteins during the development of peritoneal mesothelioma by multiwalled carbon nanotube in rats. 60th SOT annual meeting (SOT2021) (Online), 2021.3.12.

Iijima K, Nishida A, Ohno A, Hirose A, Ashikaga T. Comparison of Sensitization Potentials between Silver Nanoparticles and Silver Ions using Monocytic Cell Line THP-1. 60th SOT annual meeting (SOT2021) (Online), 2021.3.22.

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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

別添 5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, <u>Hirose A</u> , Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H.	Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat.	Part Fibre Toxicol.	17(1)	48. doi: 10.1186/s12989-020-00382-y.	2020
<u>Tamehiro N</u> , <u>Adachi R</u> , Kondo K.	Assessment of immune responses in an animal model of wheat food allergy via epicutaneous sensitization.	Methods Mol Biol	2223	37-47.	2021

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品安全衛生研究センター  
 所属研究機関長 職名 所長  
 氏名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品及び食品用容器包装に使用される新規素材の安全性評価に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・部長  
 (氏名・フリガナ) 小川 久美子 ・ オガワ クミコ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。  
 (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品  
 所属研究機関長 職名 所長  
 氏名 合田 幸雄

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品及び食品用容器包装に使用される新規素材の安全性評価に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性予測評価部・部長  
 (氏名・フリガナ) 広瀬 明彦・ヒロセ アキヒコ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。  
 (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 食品及び食品用容器包装に使用される新規素材の安全性評価に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 生化学部・室長  
(氏名・フリガナ) 安達 玲子 (アダチ レイコ)

4. 倫理審査の状況

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

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

その他(特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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