

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3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小川 久美子

令和4(2022)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 ----- 1
小川久美子

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 ----- 16
小川久美子、赤木純一
(資料) Tables 1～7
Figures 1～5

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 ----- 39
安達 玲子、為広 紀正
(資料) Table 1
Figures 1～5

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 ----- 47
広瀬 明彦、大野 彰子、大畑 秀雄、最上 知子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 56

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
総括研究報告書(令和3年度)

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、ラットを用いた二酸化チタンの90日間反復経口投与毒性試験の用量設定試験である28日間反復経口投与毒性試験の結果に基づき、F344/DuCrj ラット雌雄を用いて、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)について、0、100、300、1000 mg/kg bw/dayの用量で90日間の反復強制経口投与毒性試験を実施し、併せて肝臓、腎臓及び脾臓中のTi量測定を行った。その結果、投与に関連した毒性学的に有意な変化は見られなかったことから、本試験におけるNOAELは1000 mg/kg bw/dayと結論した。また、90日試験の主要臓器におけるTi量を測定したところ、肝臓、腎臓および脾臓中のTi含量に対照群との差異は見られなかった。90日間の反復投与によって、28日間投与では確認されなかった回腸パイエル板等のリンパ組織に被験物質と考えられる黄褐色粒子の沈着が見られ、経口暴露によって消化管から生体内にTiO₂が微量ながら取り込まれることが示唆された。一方、28日間投与と試験検体と比較しても、肝臓、腎臓、脾臓におけるTiの蓄積は見られず、炎症反応や組織障害等の生体反応も伴っていないことから、微量のTiO₂の毒性学的意義は乏しいと考えられたが、生体への取込と粒子サイズの関係は更なる検討が必要と考えられた。

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。OVA 2µg×4回の経皮感作、OVA 30 mg×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抗原経皮感作-経口惹起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。本年度の検討では、粒子径15 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンについて、経口投与時の共存により経口追加免疫を増強する傾向が見られた。一方、これまでの検討で、粒子径30-50 nm・ルチル型、及び粒子径15 nm・ルチル型のナノ酸化チタンでは、このような経口追加免疫の増強効果や増強傾向は見られていない。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、欧州食品安全機関(EFSA)の科学ネットワーク主催による「食品と飼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。ネットワークでは、二つのEFSAガイダンス文章(粒子に関するガイダンス、ナノに関するリスクアセスメントガイダンス)

について議論された。さらに、最近、欧州委員会の要請を受けて EFSA FAF パネル (EFSA 食品添加物・香料に関するパネル) が再評価した食品添加物としての二酸化チタン (E171) の安全性評価に関する科学的意見を新たに発表した内容や、RIVM 社 (オランダ) の合成アモルファスシリカ (SAS) ナノ粒子の経口曝露のリスク評価に関する取り組みや、PAROLS の腸管 *in vitro* モデルについての紹介があった。一方、OECD ナノマテリアル作業グループの先端的ナノ材料についての Ad-Hoc Working Group に関する調査では、従来のナノ材料だけでなく、ナノマテリアルを含めた先端的材料やこれらを複合的に組み合わせた新規物質の製品開発・商品化の状況を見据えて、先端的材料 (アドバンスドマテリアル: AdMa) と呼ぶ革新的な材料について、現行の化学物質の法規制やリスク評価ツールが、規制への備えを強化するなどの潜在的リスクに適切に対処しているかを評価する必要性についての議論が行われた。

キーワード: ナノマテリアル、二酸化チタン、経口、経皮、毒性試験、国際動向

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

研究協力者: 井上 薫

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部
室長

A. 研究目的

ナノ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、アレルゲン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。

B. 研究方法

B-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について

B-1-1). 28 日間反復投与毒性試験

B-1-1)-1. 病理組織学的検査

対照群および最高用量群の全臓器について、常法に従いパラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、明視野顕微鏡下で組織病理学的検査を実施した。

B-1-1)-2. 臓器中の Ti 量測定

肝臓、腎臓、および脾臓中の Ti 濃度は一般財団法人日本食品分析センターに委託して、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) により測定した。試料調製には硝酸を用い、消化には Ultra WAVE 電子レンジ (Milestone General, Kawasaki, Japan) を使用した。ICP-MS 測定は、Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて実施した。分析条件は、電波出力：1550W、キャリアガス：Ar、流量：15 L/min、コリジョンガス：O₂、内部標準：Rh、ICP-MS 分析の対象元素は ⁴⁸Ti¹⁶O⁺ と ¹⁰³Rh (内部標準) であった。臓器中の総 Ti 含有量は、臓器中の Ti 濃度に剖検時の臓器絶対重量を乗じて算出した。

B-1-2). 90 日間反復投与毒性試験

B-1-2)-1. 被験物質および投与量

昨年度実施した 28 日間反復投与毒性試験と同様に、結晶子径 6 nm の 100% アナターゼ型ナノサイズ TiO₂ (テイカ株式会社 AMT-100、純度 93%) を 0.2% リン酸水素二ナトリウムに分散させ、10 mL/kg bw の液量で投与した。投与量は 28 日間反復投与毒性試験の NOAEL が 1000 mg/kg bw/day であったことより、高用量を 1000 mg/kg bw/day とし、中用量、低用量をそれぞれ 300 および 100 mg/kg bw/day と設定した。

B-1-2)-2. 動物および飼育条件

5 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 40 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 3 または 4 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 1 群 10 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。

B-1-2)-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 TiO₂ 懸濁液を毎日 1 回投与した。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。

B-1-2)-4. 尿検査

投与 13 週目に雌雄各群 10 匹中 5 匹を代謝ケージ (夏目製作所) に入れて個別飼育で絶食下 4 時間飼育し、自然尿を採取した。オーションスティックス (尿試験紙) 10EA (アークレイ) を新鮮尿に浸し、半自動尿分析装置オーションイダテン AE-4070 (アークレイ) にて測定した。

B-1-2)-5. 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、オリエンタル酵母工業株式会社に委託して、常法により総タンパク(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(Bil)、グルコース、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 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP)の各項目を測定した。

B-1-2)-6. 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。

B-1-2)-7. 病理組織学的検査

株式会社ボゾリサーチセンターに委託して、対照群および最高用量群の全臓器について、常法に従いパラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、明視野顕微鏡下で組織病理学的検査を実施した。

B-1-2)-8. 臓器中の Ti 量測定

肝臓、腎臓、および脾臓中の Ti 濃度は 28 日試験の検体と同様に実施した。

B-1-3). 統計学的処理

体重、摂餌量、血液学的・血清生化学的検査結

果、臓器重量、臓器中 Ti 濃度、および臓器中総 Ti 量については Dunnett 検定、尿検査のスコアについては Dunn 検定、病理組織学的所見の発生頻度については Fisher の正確確率検定により対照群と各被験物質投与群との間で有意水準 0.05 の両側検定により判定した。統計解析には GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を使用した。

(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。

B-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

試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン A

(粒子径 15 nm・ルチル型)

酸化チタン D

(粒子径 15 nm・アナターゼ型)

(両者とも表面未処理)

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。血清中の Mouse mast cell protease-1 (mMCP-1)の定量は、MCPT-1 (mMCP-1) Mouse Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific 88-7503-88)を用いて行った。その他の試薬は特級グレードのものを用いた。

酸化チタンナノマテリアルの懸濁液調製

酸化チタンは、それぞれ 50 mg/mL の濃度で PBS

に懸濁し、2.5 分間の超音波処理の後にボルテックスミキサーにより攪拌するというサイクルを 4 回繰り返し、最後に 25G 注射針付きのシリンジを用いて攪拌し均一化した。

・粒子径 15nm のナノ酸化チタンの影響に関する検討

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー（株）より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業（株）)を給餌した。1 群の匹数は 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 (2 μ g/50 μ L) を剃毛部に貼付して経皮感作を行った(Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社)を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し(Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1 クールとし、4 クールの経皮感作を行った。その後、Day 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 TiO₂A または D 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 60 分間は、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。また惹起時は、60 分後に採血し、血清中の mMCP-1 濃度を測定した。

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。

B-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

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 11 回食品と飼料のナノテクノロジーに関するネットワーク会議 (2021 年 10 月 29 日、Web 会議) に関する調査を実施した。また、OECD ナノマテリアル作業グループの先端的ナノ材料についての Ad-Hoc Working Group に関して 2 月に開催されたワークショップ (2022 年 2 月 9-10 日、Web 開催) に参加し、先端的ナノ材料について調査を実施した。

C. 研究結果

C-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

C-1-1). 28 日間反復投与毒性試験

C-1-1)-1. 病理組織学的検査

鼻腔において、嗅上皮の内腔および粘膜下組織に黄褐色の粒子が見られた。炎症や組織障害等の反応性変化は認められず、マクロファージマーカーである CD68 に対する免疫染色でもマクロファージの誘導は見られなかった。一方で、呼吸上皮では目視できる粒子がない領域において炎症反応が見られた。消化管では黄褐色の物質が内腔に見られたが、炎症は見られず、鼻腔とは異なり粘膜下組織に存在する粒子は明確には見られなかった。この他、種々の組織変化がみられたが、いずれも自然発生性病変として知られる所見であり、毒性学的意義のある病変は見られなかった。

C-1-1)-2. 臓器中の Ti 量

対照群を含む全ての個体で肝臓、腎臓、脾臓中

に Ti が検出された。多くのサンプルが検量線の下
限値以下の濃度であったものの、全てのサンプル
で定量下限 (limit of quantitation; LOQ) とされる
10 σ (空試験の平均値+標準偏差の 10 倍) 以上の
値が得られたことから、バックグラウンドノイズ
ではなく生体内に存在する微量の Ti 元素が検出
されたと考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群
では対照群と比べて有意に高い肝臓中 Ti (濃度、
総量ともに) が検出されたが、1000 mg/kg bw/day
群と対照群との肝臓中の総 Ti 量の差は 0.033 μ g
であり、投与量と比較すると最終週の 1 日平均投
与量の 0.41 ppm 相当であった。腎臓、脾臓では対
照群と比較して有意な差は見られなかった。

C-1-2). 90 日間反復投与毒性試験

C-1-2)-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。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。

C-1-2)-2. 尿検査

尿検査では、全ての項目で被験物質投与に関連
した変化は見られなかった。

C-1-2)-3. 血液学のおよび血液生化学的検査

血液学検査では、雄の 1000 mg/kg bw/day 群
で白血球分画の有意な変化 (NEUT、MONO、BASO
の高値、LYMPO の低値) が見られた。ただし、各
白血球分画の実測値では、統計学的に有意な差は
認められなかった。この他、雌の 1000 mg/kg
bw/day 群で MCH の低値と EO の絶対値の高値、
雌の 100 mg/kg bw/day 群で BASO 画分の低値と実
測値の高値が見られた。

血液生化学的検査では、雄の 300、1000 mg/kg
bw/day 群で TG の低値が見られた。この他、雄の
1000 mg/kg bw/day 群で Na の高値、雄の 100、300
mg/kg bw/day 群および雌の 1000 mg/kg bw/day 群
で Cl の低値が見られた。

C-1-2)-4. 臓器重量

雄の 100 mg/kg bw/day 群で腎臓相対重量の高値
が見られた。

C-1-2)-5. 病理組織学的検査

病理組織学的検査では、黄褐色物質が頸部リン
パ節、縦隔リンパ節、肺 (気管支随伴リンパ組織)、
気管 (上皮下) 及び回腸 (パイエル板) に見られ
たが、炎症や組織障害等の反応性変化は認められ
なかった。この他、種々の組織変化がみられたが、
自然発生性病変として知られる所見であり、毒性
学的意義のある病変は見られなかった。

C-1-2)-6. 臓器中の Ti 量

対照群を含む全ての個体で肝臓、腎臓、脾臓中
に Ti が検出された。90 日間投与において、雌の
1000 mg/kg bw/day 群のうち 1 匹 (動物番号 38)
の肝臓および脾臓の Ti 濃度において他の個体と
比べて約 10 倍程度高値を示したが、群間での有
意差は見られなかった。

C-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

・粒子径 15nm のナノ酸化チタンの影響に関する 検討

抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系を
用いた、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化
チタンの影響に関する令和 2 年度における検討で
は、粒子径 6 nm・アナターゼ型及び粒子径 30 nm・
アナターゼ型のナノ酸化チタンが経口追加免疫
を増強すること、粒子径 30-50 nm・ルチル型のナ
ノ酸化チタンではこのような増強効果は見られ
ないことが示された。

令和 3 年度においては、被験物質として、酸化
チタン A (粒子径 15 nm・ルチル型)、及び酸化チ
タン D (粒子径 15 nm・アナターゼ型) の 2 種を
用い、抗原経口暴露時のナノ酸化チタンの共存効
果についてさらに検討した。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 A あるいは D
を共存させる群を設定した。OVA:ナノ酸化チタン
重量比は、これまでと同様に、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 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 A、D の共存による影響は見られなかった。

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-TiO₂A po 群、OVA-TiO₂D po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られた。経口追加免疫 6 回目及び 7 回目において、OVA-TiO₂D po 群では OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。また経口惹起時には、OVA-TiO₂A po 群及び OVA-TiO₂D po 群で OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。下痢症状に関しては、OVA 群、OVA-TiO₂A po 群、OVA-TiO₂D 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-TiO₂D po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。

経口惹起 60 分後の血清中の mouse mast cell protease-1 (mMCP-1)の定量では、OVA 群、OVA-TiO₂A po 群、OVA-TiO₂D po 群では、経口惹起 60 分後の血清中の mMCP-1 濃度は、V 群の 6100-6600 倍ほどと非常に高く、V 群との間に有意差が見られた。OVA 群と OVA-TiO₂A po 群あるいは OVA-TiO₂D po 群の間では有意差は見られなかった。

なお、陰性対照群である酸化チタン A あるいは D のみを経口投与した群 (TiO₂A only 群、TiO₂D 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、血清中 mMCP-1 濃度増大のいずれも見られなかった。

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 15 nm の 2 種のナノ酸化チタンのうち、アナターゼ型の酸化チタン D では、経口投与時に共存させることにより、経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が示された。一方ルチル型の酸化チタン A では経口惹起でのみ増強する傾向が見られた。

C-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

■ EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議

2021 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、新しく発行された「粒子に関するガイダンス-技術的要求事項 (TR)」と「ナノに関するガイダンス-リスクアセスメント (RA)」の背景とその対象範囲について説明した。2 つのナノガイダンスは、ドラフトの段階で EFSA が各分野のパネルやユニット、ナノネットワークのメンバーやオブザーバー、関連するステークホルダーと複数回の協議を行い、国際的な動向を考慮されていた。

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の食品および飼料製品申請のための技術要件に関するガイダンス (粒子に関するガイダンス-TR) 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評価するために作成された。本ガイダンスは、評価対象の材料が「ナノに関するガイダンス-RA」の適用への必要性 (すなわち、ナノ特異的なリスクアセスメントの必要性の有無について) を判断するための情報要件と評価ルートを提供するものであった。

食料および飼料製品に適用されるナノマテリアルのリスク評価に関するガイダンス: ヒトと動物の健康 (Guidance on Nano - RA) は、2018 年に初版が発行され、その後、更新版が発行された。本ガイダンスの更新は、新たな科学的知見、「粒子に関するガイダンス-TR」で得られた新たな成果との調和や本ガイダンスを利用したステークホルダーからのフィードバックによって実施された。また、更新版では、材料がナノ特異的なリスク評価を必要とする場合に従うべき段階的アプローチが図示されていた。

ナノガイドラインは相互に補完的なものであり、申請者及びリスク評価者は、製品の最終用途に依存し、安全性評価のメインフレームであり続ける特定の部門別リスク評価の枠組みに統合されることを考慮する必要があると述べていた。

この紹介の後、ナノネットワークは、ナノテクノロジーの横断的ワーキンググループ (WG) のメンバーによって、ガイドラインの実施例と共に

提示された。このプレゼンテーションでは、食品添加物、食品接触材料及び新規食品の分野におけるリスク評価書に関して、EFSA や他のパネル及びユニットからWGに寄せられた要望が取り上げられた。実施事例は、新たに公表されたナノガイドランス文書の最終化と、それらの実用性の改善にも役立つものであった。さらに得られた経験と教訓についての公開討論が実施された。

➤ 二酸化チタン (E171) 意見書

ナノネットワークは、Ana Rincon 氏 (EFSA 食品成分・包装 (FIP) ユニット) と Jose Tarazona 氏 (EFSA 科学委員会・新興リスク (SCER) ユニット) らにより、欧州委員会の要請を受けて EFSA FAF パネル (EFSA 食品添加物・香料に関するパネル) で最近再評価された食品添加物としての二酸化チタン (E171) の安全性評価に関する科学意見が新たに公表されたことを紹介していた

(<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2021.6585>)。

再評価の意見書では、TiO₂ ナノ粒子 (NP) で得られたデータおよび拡張一世代生殖毒性 (EOGRT) 試験研究からのデータを含みパネルが信頼できると考えた新たな関連する科学的証拠に基づくものであり、食品添加物二酸化チタン (E 171) の最新の安全性評価を扱っている。E 171 の構成粒子のうち、最小外形寸法が 100 nm 未満のものは 50%未満であり、30 nm 未満の構成粒子は、粒子数の 1% 未満であることに留意するものであった。したがって、当委員会は、30 nm 未満の TiO₂NP を用いた研究は、E 171 の安全性評価との関連性は限定的であるとみなしていた。さらに当委員会は、TiO₂ 粒子の消化管吸収は低い、体内に蓄積する可能性がある」と結論付けていた。

一般毒性および臓器毒性に関する試験では、E171 では 1,000 mg/kg 体重/日まで、TiO₂ NP (>30 nm) では試験した最高用量の 100 mg/kg 体重/日まで有害影響を示さなかった。生殖および発生毒性に対する影響は、EOGRT 試験で実施された最高

用量である 1,000 mg E 171/kg 体重/日まで観察されなかった。しかし、E171 による免疫毒性と炎症の可能性、及び TiO₂ NP による神経毒性の可能性の観察は、E171 による異常腺窩巢の誘導の可能性と共に、有害事象の可能性を示唆するものであった。

遺伝毒性に関する試験では、当委員会は、TiO₂ 粒子は DNA 鎖切断および染色体損傷を誘発する可能性があるが、遺伝子突然変異を誘発する可能性はないと結論づけた。TiO₂ 粒子の物理化学的性質と *in vitro* または *in vivo* 遺伝毒性試験の結果の間には明確な相関関係は観察されなかったが、E 171 に存在する可能性のある TiO₂ 粒子の遺伝毒性に対する懸念は否定できなかった。遺伝毒性に対する複数の作用様式が並行して作用する可能性があり、TiO₂ 粒子により誘発される異なる分子メカニズムの相対的な寄与は不明であった。また、閾値作用様式が想定できるかどうかについても不明であった。加えて、遺伝毒性に関する TiO₂ 粒子サイズのカットオフ値は同定できなかった。TiO₂NP (ナノ粒子) の潜在的な発がん作用を検討するために、適切にデザインされた研究はなく、入手可能なすべての証拠に基づいて、遺伝毒性の懸念は否定できず、多くの不確実性を考慮すると、当委員会は E 171 を食品添加物として使用した場合、もはや安全とは考えられないと結論づけていた。

また、ANS 委員会は、TiO₂ の吸収は限定的であると推測されることを考慮し、ラットの発がん性試験で確認された 2,250 mg/kg 体重/日の無毒性量 (NOAEL) から算出された安全域 (MoS) と、報告された使用量と分析データに基づいて算出された暴露量に基づき、E 171 は懸念されないと結論づけていた。

この評価には、E171 に関する FAF パネルの専門作業部会 (WG) が参加し、EFSA 科学委員会のナノテクノロジーと遺伝毒性に関する横断的 (cc) WG が支援するものであった。

本ネットワークは、評価に使用された背景、データ、方法論について紹介された。さらに、12000 件

近い文献が内部文献レビューで選別され、in vivo と in vitro の実験研究を含む 500 件の文献が最終的に選択された。in vivo 毒性試験の評価では、関連性、信頼性、およびナノ材料試験特有の考慮事項について検討された。また、in vivo 毒性試験の評価では、関連性、信頼性、およびナノマテリアルを試験するための特別な考慮事項が検討され、さらに、遺伝毒性試験の評価では、結果の信頼性と妥当性についても検討されていた。結果の関連性が十分なレベルにある出版物のみがリスク評価の対象として考慮された。本ネットワークでは、E171 の FAF パネル WG への研究設計と結果の関連性に関するナノに特化した考慮事項についての助言の基礎として、ナノテクノロジーに関する ccWG が考慮した要素を提示した。意見書の結果が示された後、将来の結果と影響について議論が行われた。

➤ 新たな展開に対する加盟国からのフィードバック

RIVM (オランダ国立公衆衛生環境研究所) の SAS (synthetic amorphous silica: 合成非晶質シリカ) に関する取り組みが紹介された。ナノネットワークでは、アニエス・オーメン氏 (オランダ、ccWG ナノテクノロジーメンバー) により、SAS ナノ粒子の経口曝露のリスク評価から得た経験について述べた (<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390.2021.1931724>)。

合成非晶質シリカ (SAS) は、食品添加物 E551 として食品に適用されており、凝集体や凝集塊を形成する非晶質二酸化ケイ素 (SiO_2) ナノ粒子で構成されているものであった。アニエス・オーメン氏は、SAS を用いた最近の経口毒性試験をレビューし、そのいくつかはケイ素 (Si) の組織内濃度を報告しているものであった。本ネットワークは、背景と評価に利用できる実験データの概要が紹介された後に、作業の結論と残された不確実性を提示し、このテーマに関する更なる情報と研究の必要性に関する提言が議論された。

PATROLS プロジェクトの腸管 in vitro モデル

本ネットワークでは、Angela K・mpfer 氏 (IUF - ライプニッツ環境医学研究所) により、PATROLS で開発・応用されている先進的な腸管 in vitro モデルの概要が発表された。PATROLS は、組織のコンソーシアムによる現実的なナノマテリアルのハザード評価のための生理学的に定着したツールの開発と実施に焦点を当てた欧州プロジェクトである。主な目的は、一連の革新的な次世代ハザード評価ツールを確立し標準化することで、ヒトおよび環境システムにおける長期的かつ低用量の人工ナノ材料の曝露によって生じる悪影響をより適切に予測し、規制上のリスクの決定を支援することである。開発されたモデルが発表され、その実用化と規制当局への導入について短い議論が行われた。

The GRACIOUS フレームワーク: ナノマテリアルのリスク評価を支援するためのグルーピングとリードアクロスへの応用

本ネットワークでは、最近終了した GRACIOUS (Grouping, Read-Across, Characterisation and classification framework for regulatory risk assessment of manufactured nanomaterials and Safer design of nano-enabled products) プロジェクトの活動について、Vicki Stone 氏 (GRACIOUS Project Coordinator, Heriot-Watt University) によって紹介された。GRACIOUS は、ナノマテリアルとナノフォームのリードアクロスやクラス分類につながるグループ化の実用化を可能にすることで、非常に革新的な科学に基づくフレームワークを生成することを目的とした Horizon 2020 プロジェクトである。また、ナノマテリアルのグループ化とリード・アクロスリードアクロスフレームワークと試験・評価への統合アプローチ (IATA)、および SiO_2 ナノフォームの経口曝露への適用例が紹介された。その後、規制リスク評価へのこのアプローチの導入の可能性について議論が行われた。

その他、食品中のナノ粒子のスクリーニングと
同定に関する欧州委員会 (EC) の共同研究センタ
ー (JRC : The Joint Research Centre) 主催のトレ
ーニングに関心のある研究室についても情報提供
が求められていた。また、ネットワークでは、
RiskGONE (Science-based Risk Governance of Nano-
Technology) というリスク管理の実践、およびすべ
ての利害関係者に対するリスクの認識に関する
明確な理解に基づき、ナノテクノロジーに関する
リスク・ガバナンスの枠組みおよび科学に基づく
確固たる学際的リスク管理手順を促進すること
を目的とした H2020 プロジェクトについての最
近の活動についても報告された。このプロジェク
トの進行中の活動やワークプランについての紹
介や、ナノテクノロジーのリスク・ガバナンス協
議会の設立、およびナノテクノロジー対応材料の
Safety by Design のコンセプトの推進が含まれてい
た。

■ OECD 先端的材料 Ad-Hoc Working Group のワー
クショップ (2022 年 2 月 9-10 日、Web 開催)

ナノマテリアル曝露により懸念されるヒト健康影
響へのリスク評価の必要性の国際的な高まりを
受けて、15 年以上にわたり、これまでの化学物質
のリスク評価・管理の枠組みを拡張する方向で
様々な評価法の開発が進められている。経済協力
開発機構 (OECD) の工業ナノ材料作業部会
(WPMN) では、従来のナノ材料だけでなく、ナ
ノマテリアルを含めた先端的材料やそれらを複
合的に組み合わせた新規物質の製品開発・商品化
の状況を見据えて、先端的材料 (アドバンスドマ
テリアル: AdMa) と呼ぶ革新的な材料について、
2021 年より WPMN 活動の対象とすることが正式
にされ、新たな化学物質管理について議論の加速
化を決定していた。また、これまでの工業用材料
の登録や評価を対象とした活動範囲から、食品や
医薬品も含めた先端的分野で使用される材料一
般も対象として拡大してきている。さらに国際標
準化機構 (ISO) においても、TC229 (ナノテクノ
ロジー) において、AdMa について検討が始まっ

ている。本会議では、予測的なリスク・ガバナン
スアプローチを開発することで、先端的ナノ材料
の潜在的な予想外のリスクの発生を積極的に回
避することが最も重要であると述べており、イノ
ベーション・チェーンの初期段階で安全性と持続
可能性の問題に取り組むことで、後の段階での問
題を防ぎ、イノベーションを支援することができ
ることが示された。この目標に向けた先端的ナノ
材料の新たな課題を系統的に同定するためのシ
ステム (EWARN システム) を利用して議論が行
われた。また、ナノスケール(すなわち、ナノ材料
を含むか、ナノ構造を特徴づける)に関して製造さ
れた材料である AdMa に焦点を当て、そのライフ
サイクル全体を考慮した安全性、持続可能性、規
制問題に関連する可能性が示された。さらに
AdMa は、知識のギャップと行動の勧告を特定す
る戦略的アプローチの中で、安全性、持続可能性、
および規制の適用範囲の改善について評価する
ことを目指しており、AdMa に関する知識と、安
全性、持続可能性、規制上の問題との関連性が高
まった場合には、作業記述は後に改訂される可能
性があるとされた。

D. 考察

D-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について

昨年度に引き続き、結晶子径 6 nm のアナター
ゼ型ナノサイズ TiO₂ (D₅₀ = 約 200 nm) を
F344/DuCrj ラット雌雄に 10、100、1000 mg/kg
bw/day の用量で投与した 28 日間反復投与毒性試
験について検討したところ、病理組織学的検査に
おいて、黄褐色の粒状物質が鼻腔および消化管
(食道、胃、小腸、大腸) に認められた。黄褐色
の粒状物質は投与したナノサイズ TiO₂ であると
考えられ、経口投与液の体重あたり投与体積が 10
mL/kg bw と比較的多かったため、意図せず鼻腔へ
逆流した可能性が推察された。嗅上皮では内腔だ
けでなく粘膜下組織においても黄褐色の粒状物
質が見られた。マクロファージによる貪食像は認
められず、被験物質がどのようにして粘膜下組織

に移行したかは明らかではないが、炎症や組織障害等の反応性変化は見られなかったことから、病理組織学的に毒性影響はないものと考えられた。呼吸上皮では炎症反応が見られたが、当該部位に黄褐色物質の存在は認められなかった。昨年度の検討において投与期間中全ての群で死亡はみられず、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が、その他体重、一般状態、血液学的検査、臓器重量において投与に関連する可能性のある変化は認められなかったことと総合して、28 日間試験における NOAEL は 1000 mg/kg bw/day と考えられた。

100、300、1000 mg/kg bw/day の用量で実施した 90 日間の反復経口投与においても、投与期間中全ての群で死亡はみられず、体重、一般状態、血液学的検査、臓器重量、および尿検査結果に毒性学的に有意な変化は見られなかった。

血液学的検査では、雄の 1000 mg/kg bw/day 群で白血球分画の有意な変化が見られたが、総白血球数および各白血球分画の実測値には有意な差はなかったことから、毒性学的な意義は乏しいと考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群で見られた MCH の低値は極めて軽微な変化であり、他の赤血球マーカーにも変動がないことから毒性学的意義は乏しいと考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群で見られた EO の絶対値の高値は分画の変動を伴わない軽微な変化であり、毒性学的意義は乏しいと考えられた。雌の 100 mg/kg bw/day 群で BASO 画分の低値と実測値の高値が見られたが、用量相関性がないことから偶発的な変動と考えられた。血液生化学的検査では雄の 300、1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な低下が見られたが、脂質代謝異常を示唆するその他の血液生化学的変化は見られず、肝機能障害を示唆する血液学的変化や組織病理学的所見も見られなかったことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。また、28 日試験で見られた雌の 1000 mg/kg bw/day 群における TG の有意な増加は、90 日試験では見られなかった。その他、雄の 1000 mg/kg bw/day 群で Na の高値、雄の 100、300 mg/kg bw/day 群および

雌の 1000 mg/kg bw/day 群で Cl の低値が見られたが、軽微な変化であり、腎機能異常に関連する所見は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。

臓器重量では雄の 100 mg/kg bw/day 群で腎臓相対重量の高値が見られたが、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、雌雄ともに臓器重量の有意な変化は見られなかった。

病理組織学的検査では、被験物質であると考えられる黄褐色の物質が頸部リンパ節、縦隔リンパ節、肺（気管支随伴リンパ組織; BALT）、気管（上皮）及び回腸（パイエル板）に見られた。28 日試験と同様に、頸部リンパ節、縦隔リンパ節、肺及び気管の組織中にみられた黄褐色物質は逆流等による誤嚥により気道から肺胞に入った被験物質と考えられた。しかし、28 日試験とは異なり、回腸パイエル板にも黄褐色物質が見られたことから、消化管内においてもナノサイズ TiO₂ が生体内に取り込まれる可能性が示された。またパイエル板や肺の BALT を含む各リンパ組織では、軽度ながらマクロファージによる黄褐色物質の貪食像が見られており、長期間の曝露により異物反応が誘導されている可能性が考えられた。一方で、90 日試験においても黄褐色物質に対する炎症反応や組織障害等の反応性変化は認められなかったことから、生体への影響は軽度と推察された。以上の結果から、90 日間試験における NOAEL は 1000 mg/kg bw/day と考えられた。

肝臓、腎臓、脾臓中の Ti 濃度測定では、28 日試験、90 日試験ともに対照群を含む全ての個体で LOQ 以上の Ti 濃度を示したことから、生体内の微量 Ti 元素が検出されたと考えられた。28 日間投与において雌の 1000 mg/kg bw/day で対照群と比べて有意に高い肝臓中 Ti 量が検出されたものの、対照群との差分（すなわち、投与によって増加した可能性のある Ti 量）は最終週の 1 日平均投与量と比較してわずか 0.41 ppm であり、90 日間投与では有意な差は見られなかったことから偶発的な変動であった可能性が考えられた。90 日間投与において、1000 mg/kg bw/day 群で肝臓および

脾臓の Ti 濃度において他の個体と比べて 10 倍程度高値を示す 1 例が見られたものの、群間での有意差は見られなかったことから偶発的な変動と判断した。以上の結果から、ナノサイズ TiO₂ は反復経口投与により一部が粘膜下およびリンパ節中に見られ、リンパ行性に組織中に移行する可能性が示唆されたものの、それに伴う炎症や組織傷害などの反応性変化は見られず、肝臓、腎臓、脾臓における蓄積は 90 日間の反復投与においても見られなかった。

D-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

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、マウスを用いた抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系を使用して、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討し、酸化チタン C (粒子径 6 nm・アナターゼ型) 及び酸化チタン E (粒子径 30 nm・アナターゼ型) が経口追加免疫を有意に増強すること、酸化チタン F (粒子径 30-50 nm・ルチル型) ではこのような増強効果は見られないことを示した。

令和 3 年度においては、粒子径及び結晶型の影響についてさらに検討するため、酸化チタン A (粒子径 15 nm・ルチル型)、及び酸化チタン D (粒子径 15 nm・アナターゼ型) の 2 種に関して、抗原経口暴露時の共存効果について検討した。筆者らのこれまでの検討では、酸化チタン A 及び D は、OVA 経皮感作、及び OVA 腹腔内感作において増強効果を示している。本研究の検討においては、酸化チタン D は、経口投与時に共存させることに

より、経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が示された。一方ルチル型の酸化チタン A では経口惹起でのみ増強する傾向が見られた。これらの結果から、経口投与時の共存効果に関して、粒子径 6-30 nm・アナターゼ型の酸化チタンは、抗原経口追加免疫を増強する、または増強する傾向がみられることが示された。今後、アナターゼ型でより粒子径が大きいナノ酸化チタンや、表面修飾等の影響についても検討を進める必要があると考えられる。

また、本年度は、経口惹起後の血清中の mMCP-1 濃度について検討を行った。mMCP-1 はマウス小腸粘膜のマスト細胞の顆粒に含有されているプロテアーゼであり、小腸粘膜マスト細胞の活性化に伴う脱顆粒により細胞外に放出されることが知られている。そのため、マウスを用いた食物アレルギーモデル実験等において血中濃度の増大がアレルギー反応の指標として利用されている。本研究では、体温低下や下痢等のアナフィラキシー症状が見られた OVA 群、OVA-TiO₂A po 群、OVA-TiO₂D po 群において、経口惹起 60 分後の血清中の mMCP-1 濃度は V 群と比較して非常に高く、V 群との間に有意差が認められた。また濃度も 65µg/mL 程度であり、過去の報告例 (Clin Exp Allergy. 2017;47:1204-1213) とも合致していることから、本研究で使用しているマウスモデル系の妥当性が示されたものと考えられる。今後、本モデル実験系を用いて、経口追加免疫時のナノ酸化チタンの増強効果の作用機序についても検討が必要であろう。

D-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

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、ネットワークメンバーは、ナノマテリアルのリスク評価に関する専門知識や EFSA との将来的な協力関係についてフィードバックを求められていた。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ることから、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が奨励されている。

アドバンスドマテリアル (AdMa) に関しては、再生可能エネルギー、電子移動、デジタル化、医療、資源の効率的な利用もしくは節約など、さまざまな分野で大きな可能性を秘めている。また、AdMa の中には、リサイクルや廃棄物処理など、ライフサイクル全体の持続可能性に関する課題を提起するものも含まれる。AdMa と革新的な製造プロセスは、イノベーション研究の焦点となっており、経済、社会、環境に対して将来的にも期待されるものである。AdMa のいくつかについては、従来の化学物質安全性の枠組みの中で、ナノマテリアルについて特定されたものと同様な課題や追加的な課題が生じることが予想される。AdMa の潜在的リスクは、化学組成以外の物理的性質な要素によって決定されると述べている。従って、従来のリスク評価が全ての AdMa の安全な適用と使用に対して常に保証できるかどうかという問題が生じてくる。従って、現行の化学物質の法規制やリスク評価ツールが、AdMa の潜在的リスクに適切に対処しているかについて評価する必要があると考えられる。

E. 結論

E-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について

結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ TiO_2 (D_{50} = 約 200 nm) を F344/DuCrj ラット雌雄に 100、300、1000 mg/kg bw/day の用量で 90 日間反復投与したところ、経口投与に関連した毒性学的に有意な変化は見られなかったことから、本試験における NOAEL は 1000 mg/kg bw/day と結論した。90 日間の反復投与によって、28 日間投与では確認されなかった回腸パイエル板等のリ

ンパ組織において被験物質と考えられる黄褐色粒子の沈着が見られ、経口暴露によって消化管から生体内に TiO_2 が微量ながら取り込まれることが示唆された。肝臓、腎臓、脾臓における Ti の蓄積は見られず、炎症や組織傷害などの生体反応も伴っていないことから毒性学的意義は乏しいと考えられたが、生体への取込と粒子サイズの関係は更なる検討が必要と考えられた。

E-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

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。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 50mg の経口投与によりアレルギー症状を惹起する抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起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 D (粒子径 15 nm・アナターゼ型) では、経口投与時に共存させることにより、経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が示された。一方、酸化チタン A (粒子径 15 nm・ルチル型) では経口惹起でのみ増強する傾向が見られた。今後、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

E-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

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。R3 年度は、欧州食品安全機関 (EFSA) の科学ネットワーク主催による「食品と飼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、二つのEFSAガイダンス文章（粒子に関するガイダンス：Guidance on Particle - TR、ナノに関するガイダンス-リスクアセスメント：Guidance on Nano - RA）について議論された。さらに、最近、欧州委員会の要請を受けてEFSA FAF パネル（EFSA 食品添加物・香料に関するパネル）が再評価した食品添加物としての二酸化チタン（E171）の安全性評価に関する科学的意見を新たに発表した内容や、RIVM 社（オランダ）の合成アモルファスシリカ（SAS）ナノ粒子の経口曝露のリスク評価に関する取り組みや、PAROLS の腸管 *in vitro* モデルについての紹介があった。

一方、OECD ナノマテリアル作業グループの先端的ナノ材料についてのAd-Hoc Working Groupに関する調査では、従来のナノ材料だけでなく、ナノマテリアルを含めた先端的材料やこれらを複合的に組み合わせた新規物質の製品開発・商品化の状況を見据えて、先端的材料（アドバンスドマテリアル：AdMa）と呼ぶ革新的な材料について、現行の化学物質の法規制やリスク評価ツールが、規制への備えを強化するなどの潜在的リスクに適切に対処しているかを評価する必要性についての議論が行われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Akiyama H, Adachi R. Japanese food allergy-labeling system and comparison with the international experience; detection and thresholds. *Food Safety* 2021; 9(4) 101-116.
2. Ohno A., Okiyama Y., Hirose A., Fukuhara K., The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2022, 441, 115974
3. Maeno A, Sakamoto Y, Hojo M, Tada Y, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Kemuriyama N, Miyajima K, Nakae D. A case of spontaneous Zymbal's gland carcinoma with lung metastasis in an aged Fischer 344 rat. *J Toxicol Pathol.* 2021 Oct;34(4):353-358.
4. Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T. Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 β production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2021 Jun;188: 114580.
5. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198.

2. 学会発表

1. F344 ラットを用いたナノサイズ酸化チタン (IV) の 28 日間反復経口投与毒性試験. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. 第 38 回日本毒性病理学会学術集会 2022 年 1 月 27 日~28 日 神戸国際会議場.
2. Akiko OHNO, Masatoshi WATANABE, Akihiko HIROSE : ナノマテリアルの物理化学的性状に基づく毒性評価手法への応用, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (Hybrid 開催(2021.7.7-9) (神戸))
3. 前野愛、北條幹、坂本義光、湯澤勝廣、長谷川悠子、長澤明道、生嶋清美、平松恭子、海鋒藤文、山本行男、安藤弘、田中和良、鈴木仁、猪又明子、守安貴子、高橋祐次、横田理、小林憲弘、広瀬明彦、中江大. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の 2 年間ラット気管内反復投与試験における投与器具の違いによる毒性の比較 : 1 年経過時点での報告. 第 48 回日本毒性学会学術年会. (Hybrid 開催 (2021.7.7-9) (神戸))
4. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : Docking study on the position of nitro groups affecting the mutagenicity of

- nitroarenes, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催) , Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA)
5. Akiko Ohno, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : The position of nitro group affecting the mutagenicity of nitrated benzo[a]pyrenes、第 80 回日本癌学会学術総会 (Hybrid 開催) (2021.9.30- 10.2) (横浜)
 6. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : In silico analysis of mutagenicity of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons, 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会 (Hybrid 開催) (2021.11.1-2) (横須賀)
 7. 大野彰子、西田明日香、飯島一智、高橋祐次、広瀬明彦、足利太可雄. *in silico* による TiO₂NPs の物性と THP-1 細胞への活性化の関連性解析、日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (Hybrid 開催) (2021.11.13, 沖縄)
 8. Ohno A, Watanabe M, Hirose A. Application to toxicity evaluation of silicone dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, The international chemical congress of PACIFIC BASIN SOCIETIES 2021 (2021.12.16-21, Online)
 9. 広瀬明彦、大野彰子、ナノマテリアルの有害性評価と今後の課題：ナノマテリアル曝露に対するリスク評価法における国際動向、日本薬学会第 142 年会シンポジウム (オンライン開催) (2022. 3. 26)
 10. Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J. Preliminary report of the two-year, every 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube in male mice, the 61st Annual Meeting of the Society of Toxicology, (Virtual, March 27-31, 2022)
 11. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Two-Year study for the Assessment of the carcinogenic and toxic effect of double walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation. the 61st Annual Meeting of the Society of Toxicology, (Virtual, March 27-31, 2022)
- G. 知的所有権の取得状況**
1. 特許所得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
分担研究報告書(令和3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%リン酸水素二ナトリウムに懸濁した結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ酸化チタン (TiO₂) を F344/DuCrj ラット雌雄 (1群5匹) に 10、100、1000 mg/kg bw/day の用量で 28 日間反復経口投与した亜急性毒性試験について、昨年度に引き続き病理組織学的検査及び肝臓、腎臓及び脾臓中の Ti 濃度定量を実施した。その結果、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で見られた TG の有意な増加の他に、投与に関連する可能性のある変化は認められなかったことから、28 日間投与における無毒性量 (NOAEL) は 1000 mg/kg bw/day と結論した。また、28 日試験の臓器における Ti 量については、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で肝臓中 Ti 量の有意な増加が見られたが、極めて微量であった。また腎臓および脾臓中の Ti 含量に対照群との差異は見られなかった。以上の結果より 90 日間反復投与毒性試験の投与量を 100、300、1000 mg/kg bw/day と設定し、F344/DuCrj ラット雌雄 (1群10匹) に 90 日間の強制経口投与を行った。投与期間中は一般状態、体重変化、摂餌量を観察し、投与 13 週目に尿検査、投与終了時は血液検査、血液生化学検査、臓器重量測定、病理組織学的検査、および肝臓、腎臓及び脾臓中の Ti 量測定を行った。その結果、全ての群で死亡および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。臓器重量では、雌雄ともに相対および絶対重量の有意な変化は見られなかった。血液学的検査では、雄の 1000 mg/kg bw/day 群で白血球分画の有意な変化が見られたが、総白血球数および各白血球分画の実測値には有意な差はなかったことから、毒性学的な意義は乏しいと考えられた。血液生化学検査では雄の 300、1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な低下が見られたが、脂質代謝異常や肝機能障害に関連するその他の所見は見られなかったことから毒性学的意義は乏しいと考えられた。病理組織学的検査では投与物質と考えられる黄褐色物質が頸部リンパ節、縦隔リンパ節、肺 (BALT)、気管 (上皮下) 及び回腸 (パイエル板) にみられたが、炎症反応や組織障害等の反応性変化は認められなかった。以上より、結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ TiO₂ (D₅₀ = 約 200 nm) を F344/DuCrj ラット雌雄に 100、300、1000 mg/kg bw/day の用量で 90 日間反復投与したところ、経口投与に関連した毒性学的に有意な変化は見られなかったことから、本試験における NOAEL は 1000 mg/kg bw/day と結論した。また、90 日試験の主要臓器における Ti 量を測定したところ、肝臓、腎臓および脾臓中の Ti 含量に対照群との差異は見られなかった。90 日間の反復投与によって、28 日間投与では確認されなかった回腸パイエル板等のリンパ組織に被験物質と考えられる黄褐色粒子の沈着が見られ、経口暴露によって消化管から生体内に TiO₂ が微量ながら取り込まれることが示唆された。一方、28 日間投与試験検体と比較しても、肝臓、腎臓、脾臓における Ti の蓄積は見られず、炎症反応や組織障害等の生体反応も伴っていないことから、微量の TiO₂ の毒性学的意義は乏しいと考えられたが、生体への取込と粒子サイズの関係は更なる検討が必要と考えられた。

キーワード: ナノサイズ TiO₂、亜急性毒性、亜慢性毒性

A. 研究目的

酸化チタン (TiO₂) 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。TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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、ナノ材料リスク評価書 -二酸化チタン(TiO₂)-, 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 TiO₂ (AEROXIDER TiO₂ 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 TiO₂ (投与液中の 50 パーセントアル粒子径 (D₅₀) = 42~213 nm) の無毒性量 (NOAEL) は、いずれも最高投与量である 1000 mg/kg bw/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 TiO₂ (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 TiO₂ 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)。これまでに一次粒子径 10 nm 以下の TiO₂ を用いた亜慢性毒性

試験の報告はないことから、昨年度は一次粒子径 6 nm のアナターゼ型 TiO₂ (D₅₀ = 約 200 nm) をラットに 28 日間反復経口投与し、一般状態、体重、臓器重量、血液学的検査、および血液生化学検査について検討した。今年度は引き続き、病理組織学的検査および主要臓器 (肝臓、腎臓、脾臓) の Ti 濃度定量を実施して 28 日間投与における無毒性量 (NOAEL) を判断するとともに、90 日間の反復投与毒性試験を実施して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した。

B. 研究方法

1. 28 日間反復投与毒性試験

1-1. 病理組織学的検査

対照群および最高用量群の全臓器について、常法に従いパラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、明視野顕微鏡下で組織病理学的検査を実施した。

1-2. 臓器中の Ti 量測定

肝臓、腎臓、および脾臓中の Ti 濃度は一般財団法人日本食品分析センターに委託して、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) により測定した。試料調製には硝酸を用い、消化には Ultra WAVE 電子レンジ (Milestone General, Kawasaki, Japan) を使用した。ICP-MS 測定は、Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて実施した。分析条件は、電波出力: 1550W、キャリアガス: Ar、流量: 15 L/min、コリジョンガス: O₂、内部標準: Rh、ICP-MS 分析の対象元素は ⁴⁸Ti¹⁶O⁺ と ¹⁰³Rh (内部標準) であった。臓器中の総 Ti 含有量は、臓器中の Ti 濃度に剖検時の臓器絶対重量を乗じて算出した。

2. 90 日間反復投与毒性試験

2-1. 被験物質および投与量

昨年度実施した 28 日間反復投与毒性試験と同

様に、結晶子径 6 nm の 100%アナターゼ型ナノサイズ TiO₂ (テイカ株式会社 AMT-100、純度 93%) を 0.2%リン酸水素二ナトリウムに分散させ、10 mL/kg bw の液量で投与した。投与量は 28 日間反復投与毒性試験の NOAEL が 1000 mg/kg bw/day であったことより、高用量を 1000 mg/kg bw/day とし、中用量、低用量をそれぞれ 300 および 100 mg/kg bw/day と設定した。

2-2. 動物および飼育条件

5 週齢の F344/DuCrj ラット雌雄各 40 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 3 または 4 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 1 群 10 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。

2-3. 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 TiO₂ 懸濁液を毎日 1 回投与した。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。

2-4. 尿検査

投与 13 週目に雌雄各群 10 匹中 5 匹を代謝ケージ

(夏目製作所) に入れて個別飼育で絶食下 4 時間飼育し、自然尿を採取した。オーションスティックス (尿試験紙) 10EA (アークレイ) を新鮮尿に浸し、半自動尿分析装置オーションイダテン AE-4070 (アークレイ) にて測定した。

2-5. 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、オリエンタル酵母工業株式会社に委託して、常法により総タンパク (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 (Bil)、グルコース、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 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GTP) の各項目を測定した。

2-6. 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。

2-7. 病理組織学的検査

株式会社ボゾリサーチセンターに委託して、対照群および最高用量群の全臓器について、常法に従いパラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、明視野顕微鏡下で組織病理学的検査を実施した。

2-8. 臓器中の Ti 量測定

肝臓、腎臓、および脾臓中の Ti 濃度は 28 日試験の検体と同様に実施した。

3. 統計学的処理

体重、摂餌量、血液学的・血清生化学的検査結果、臓器重量、臓器中 Ti 濃度、および臓器中総 Ti 量については Dunnett 検定、尿検査のスコアについては Dunn 検定、病理組織学的所見の発生頻度については Fisher の正確確率検定により対照群と各被験物質投与群との間で有意水準 0.05 の両側検定により判定した。統計解析には GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。

(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. 28 日間反復投与毒性試験

1-1. 病理組織学的検査

鼻腔において、嗅上皮の内腔および粘膜下組織

に黄褐色の粒子が見られた (Figure 1A)。炎症や組織障害等の反応性変化は認められず、マクロファージマーカーである CD68 に対する免疫染色でもマクロファージの誘導は見られなかった。一方で、呼吸上皮では目視できる粒子がない領域において炎症反応が見られた。消化管では黄褐色の物質が内腔に見られたが、炎症は見られず、鼻腔とは異なり粘膜下組織に存在する粒子は明確には見られなかった (Figure 1B)。この他、種々の組織変化がみられたが、いずれも偶発性の変化であり毒性学的意義のある病変は見られなかった (Table 1)。

1-2. 臓器中の Ti 量

対照群を含む全ての個体で肝臓、腎臓、脾臓中に Ti が検出された。多くのサンプルが検量線の下限值以下の濃度であったものの、全てのサンプルで定量下限 (limit of quantitation; LOQ) とされる 10σ (空試験の平均値+標準偏差の 10 倍) 以上の値が得られたことから、バックグラウンドノイズではなく生体内に存在する微量の Ti 元素が検出されたと考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群では対照群と比べて有意に高い肝臓中 Ti (濃度、総量ともに) が検出されたが、1000 mg/kg bw/day 群と対照群との肝臓中の総 Ti 量の差は $0.033 \mu\text{g}$ であり、投与量と比較すると最終週の 1 日平均投与量の 0.41 ppm 相当であった。腎臓、脾臓では対照群と比較して有意な差は見られなかった (Figure 2)。

2. 90 日間反復投与毒性試験

2-1. 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。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)。

2-2. 尿検査

尿検査では、全ての項目で被験物質投与に関連した変化は見られなかった (Table 2)。

2-3. 血液学的および血液生化学的検査

血液学的検査では、雄の 1000 mg/kg bw/day 群で白血球分画の有意な変化 (NEUT、MONO、BASO の高値、LYMPO の低値) が見られた。ただし、各白血球分画の実測値では、統計学的に有意な差は認められなかった (Table 3)。この他、雌の 1000 mg/kg bw/day 群で MCH の低値と EO の絶対値の高値、雌の 100 mg/kg bw/day 群で BASO 画分の低値と実測値の高値が見られた。

血液生化学的検査では、雄の 300、1000 mg/kg bw/day 群で TG の低値が見られた (Table 4)。この他、雄の 1000 mg/kg bw/day 群で Na の高値、雄の 100、300 mg/kg bw/day 群および雌の 1000 mg/kg bw/day 群で Cl の低値が見られた。

2-4. 臓器重量

雄の 100 mg/kg bw/day 群で腎臓相対重量の高値が見られた (Table 5)。

2-5. 病理組織学的検査

病理組織学的検査では、黄褐色物質が頸部リンパ節、縦隔リンパ節、肺 (気管支随伴リンパ組織)、気管 (上皮) 及び回腸 (パイエル板) に見られた (Table 6) が、炎症や組織障害等の反応性変化は認められなかった (Figure 4)。この他、種々の組織変化がみられたが、自然発生性病変として知られる所見であり、毒性学的意義のある病変は見られなかった (Table 7)。

2-6. 臓器中の Ti 量

対照群を含む全ての個体で肝臓、腎臓、脾臓中に Ti が検出された。90 日間投与において、雌の 1000 mg/kg bw/day 群のうち 1 匹 (動物番号 38) の肝臓および脾臓の Ti 濃度において他の個体と比べて約 10 倍程度高値を示したが、群間での有意差は見られなかった (Figure 5)。

D. 考察

昨年度に引き続き、結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ TiO₂ (D₅₀ = 約 200 nm) を F344/DuCrj ラット雌雄に 10、100、1000 mg/kg

bw/day の用量で投与した 28 日間反復投与毒性試験について検討したところ、病理組織学的検査において、黄褐色の粒状物質が鼻腔および消化管 (食道、胃、小腸、大腸) に認められた。黄褐色の粒状物質は投与したナノサイズ TiO₂ であると考えられ、経口投与液の体重あたり投与体積が 10 mL/kg bw と比較的多かったため、意図せず鼻腔へ逆流した可能性が推察された。嗅上皮では内腔だけでなく粘膜下組織においても黄褐色の粒状物質が見られた。マクロファージによる貪食像は認められず、被験物質がどのようにして粘膜下組織に移行したかは明らかではないが、炎症や組織障害等の反応性変化は見られなかったことから、病理組織学的に毒性影響はないものと考えられた。呼吸上皮では炎症反応が見られたが、当該部位に黄褐色物質の存在は認められなかった。昨年度の検討において投与期間中全ての群で死亡はみられず、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が、その他体重、一般状態、血液学的検査、臓器重量において投与に関連する可能性のある変化は認められなかったことと総合して、28 日間試験における NOAEL は 1000 mg/kg bw/day と考えられた。

100、300、1000 mg/kg bw/day の用量で実施した 90 日間の反復経口投与においても、投与期間中全ての群で死亡はみられず、体重、一般状態、血液学的検査、臓器重量、および尿検査結果に毒性学的に有意な変化は見られなかった。

血液学的検査では、雄の 1000 mg/kg bw/day 群で白血球分画の有意な変化が見られたが、総白血球数および各白血球分画の実測値には有意な差はなかったことから、毒性学的な意義は乏しいと考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群で見られた MCH の低値は極めて軽微な変化であり、他の赤血球マーカーにも変動がないことから毒性学的意義は乏しいと考えられた。雌の 1000 mg/kg bw/day 群で見られた EO の絶対値の高値は、分画の変動を伴わない軽度な変化であり、毒性学的意義は乏しいと考えられた。雌の 100 mg/kg bw/day 群で BASO 画分の低値と実測値の高値が見られた

が、用量相関性がないことから偶発的な変動と考えられた。血液生化学的検査では雄の 300, 1000 mg/kg bw/day 群で TG の有意な低下が見られたが、脂質代謝異常を示唆するその他の血液生化学的变化は見られず、肝機能障害を示唆する血液学的変化や組織病理学的所見も見られなかったことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。また、28 日試験で見られた雌の 1000 mg/kg bw/day 群における TG の有意な増加は、90 日試験では見られなかった。その他、雄の 1000 mg/kg bw/day 群で Na の高値、雄の 100, 300 mg/kg bw/day 群および雌の 1000 mg/kg bw/day 群で Cl の低値が見られたが、軽微な変化であり、腎機能異常に関連する所見は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。

臓器重量では雄の 100 mg/kg bw/day 群で腎臓相対重量の高値が見られたが、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、雌雄ともに臓器重量の有意な変化は見られなかった。

病理組織学的検査では、被験物質であると考えられる黄褐色の物質が頸部リンパ節、縦隔リンパ節、肺（気管支随伴リンパ組織; BALT）、気管（上皮）及び回腸（パイエル板）に見られた。28 日試験と同様に、頸部リンパ節、縦隔リンパ節、肺及び気管の組織中にみられた黄褐色物質は逆流等による誤嚥により気道から肺胞に入った被験物質と考えられた。しかし、28 日試験とは異なり、回腸パイエル板にも黄褐色物質が見られたことから、消化管内においてもナノサイズ TiO_2 が生体内に取り込まれる可能性が示された。またパイエル板や肺の BALT を含む各リンパ組織では、軽度ながらマクロファージによる黄褐色物質の貪食像が見られており、長期間の曝露により異物反応が誘導されている可能性が考えられた。一方で、90 日試験においても黄褐色物質に対しての炎症反応や組織障害等の反応性変化は認められなかったことから、生体への影響は軽度と推察された。以上の結果から、90 日間試験における NOAEL は 1000 mg/kg bw/day と考えられた。

肝臓、腎臓、脾臓中の Ti 濃度測定では、28 日

試験、90 日試験ともに対照群を含む全ての個体で LOQ 以上の Ti 濃度を示したことから、生体内の微量 Ti 元素が検出されたと考えられた。28 日間投与において雌の 1000 mg/kg bw/day で対照群と比べて有意に高い肝臓中 Ti 量が検出されたものの、対照群との差分（すなわち、投与によって増加した可能性のある Ti 量）は最終週の 1 日平均投与量と比較してわずか 0.41 ppm であり、90 日間投与では有意な差は見られなかったことから偶発的な変動であった可能性が考えられた。90 日間投与において、1000 mg/kg bw/day 群で肝臓および脾臓の Ti 濃度において他の個体と比べて 10 倍程度高値を示す 1 例が見られたものの、群間での有意差は見られなかったことから偶発的な変動と判断した。以上の結果から、ナノサイズ TiO_2 は反復経口投与により一部が粘膜下およびリンパ節中に見られ、リンパ行性に組織中に移行する可能性が示唆されたものの、それに伴う炎症や組織傷害などの反応性変化は見られず、肝臓、腎臓、脾臓における蓄積は 90 日間の反復投与においても見られなかった。

E. 結論

結晶子径 6 nm のアナターゼ型ナノサイズ TiO_2 (D_{50} = 約 200 nm) を F344/DuCrj ラット雌雄に 100, 300, 1000 mg/kg bw/day の用量で 90 日間反復投与したところ、経口投与に関連した毒性学的に有意な変化は見られなかったことから、本試験における NOAEL は 1000 mg/kg bw/day と結論した。90 日間の反復投与によって、28 日間投与では確認されなかった回腸パイエル板等のリンパ組織において被験物質と考えられる黄褐色粒子の沈着が見られ、経口暴露によって消化管から生体内に TiO_2 が微量ながら取り込まれることが示唆された。肝臓、腎臓、脾臓における Ti の蓄積は見られず、炎症や組織傷害などの生体反応も伴っていないことから毒性学的意義は乏しいと考えられたが、生体への取込と粒子サイズの関係は更なる検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

F344 ラットを用いたナノサイズ酸化チタン(IV)の28日間反復経口投与毒性試験. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. 第38回日本毒性病理学会学術集会 2022年1月27日~28日 神戸国際会議場.

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

Table 1. Histopathological findings of F344/DuCrj rats treated with titanium(IV) oxide for 4 weeks

Dose (mg/kg bw/day)		Male		Female	
		0	1000	0	1000
No. of animals		5	5	5	5
Heart	Infiltration, mononuclear cell, myocardium, focal (minimal)	0	1	0	0
Pituitary gland	Cyst (minimal)	0	1	0	0
Nasal cavity	Yellowish brown material, nasal lumen (mild)	0	1	0	1
	Yellowish brown material, submucosa (minimal)	0	4 *	0	4 *
	Inflammation, acute (minimal, mild, moderate)	1 (0, 1, 0)	3 (0, 1, 2)	0	1 (1, 0, 0)
	Hyperplasia, mucous cell, respiratory epithelium (minimal, mild)	1 (1, 0)	2 (1, 1)	0	0
	Metaplasia, squamous cell, transitional epithelium (minimal)	1	2	0	0
Lung	Alveolar macrophage aggregation, containing yellowish brown material (minimal)	0	1	0	0
	Infiltration, eosinophile/mononuclear cell, perivascular (minimal)	0	0	1	0
	Hemorrhage, alveoli, focal (minimal)	1	0	0	0
Tongue	Inflammation, neutrophile/eosinophile, lingual gland (minimal)	0	0	1	0
Parotid gland	Focus, hypertrophic, basophilic (minimal)	1	1	0	1
Esophagus	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	3	0	2
Stomach	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	5 **	0	4 *
Duodenum	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	4 *	0	3
Jejunum	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	5 **	0	3
Ileum	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	4 *	0	4 *
Cecum	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	5 **	0	4 *
Colon	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	3	0	2
Rectum	Yellowish brown material, lumen (minimal)	0	2	0	2
Liver	Necrosis, focal (minimal)	1	1	0	1
Testis	Atrophy, tubular, unilateral (severe)	0	1	-	-
Prostate	Infiltration, monocuclear cell, interstitial (minimal)	1	1	-	-

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with 0 mg/kg bw/day group.

Table 2. Urinalysis data at week 13 in F344/DuCrj rats treated with titanium(IV) oxide for 13 weeks

Dose (mg/kg bw/day)		Male				Female			
		0	100	300	1000	0	100	300	1000
No. of animals		5	5	5	5	5	5	5	5
Glucose	—	5	5	5	5	5	5	5	4
	±	0	0	0	0	0	0	0	1
Protein	—	0	2	0	1	1	3	3	2
	±	3	1	3	3	3	2	2	2
	1+	2	2	2	1	1	0	0	1
Bilirubin	—	5	5	5	5	5	5	5	5
Urobilinogen	Normal	5	5	5	5	5	5	5	5
pH	7	0	1	0	0	0	2	1	0
	7.5	5	3	1	4	1	0	1	3
	8	0	1	4	1	4	3	3	2
Supecific grabvity	< 1.005	0	2	0	0	0	0	0	0
	1.01	1	1	0	1	0	1	0	0
	1.015	3	0	3	2	2	2	3	3
	1.02	0	1	2	1	2	2	2	1
	1.025	0	0	0	1	0	0	0	1
	> 1.03	0	1	0	0	1	0	0	0
Occult blood	-	3	5	5	5	5	5	5	5
	±	1	0	0	0	0	0	0	0
	1+	1	0	0	0	0	0	0	0
Ketone body	—	5	3	5	5	4	5	5	4
	±	0	1	0	0	1	0	0	1
	1+	0	1	0	0	0	0	0	0
Nitrile	—	5	5	5	5	5	5	5	5
Leukocytes	—	5	3	4	5	5	5	5	5
	25 Leu/μl	0	1	1	0	0	0	0	0
	75 Leu/μl	0	1	0	0	0	0	0	0
Color	Colorless	0	2	1	2	0	1	0	0
	Light yellow	3	1	3	3	1	2	1	1
	Yellow	2	2	1	0	4	2	4	4

Table 3. Haemaology of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 13 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	0	100	300	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	10	10	10	10
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	9.38 \pm 0.19	9.23 \pm 0.29	9.21 \pm 0.33	9.34 \pm 0.18
HGB (g/dL)	15.4 \pm 0.2	15.1 \pm 0.6	15.0 \pm 0.6	15.3 \pm 0.3
HCT (%)	45.1 \pm 0.8	44.6 \pm 1.8	44.0 \pm 1.9	44.9 \pm 1.1
MCV (fL)	48.0 \pm 0.3	48.3 \pm 0.7	47.8 \pm 0.7	48.1 \pm 0.4
MCH (pg)	16.4 \pm 0.2	16.4 \pm 0.2	16.3 \pm 0.2	16.4 \pm 0.1
MCHC (g/dL)	34.2 \pm 0.3	34.0 \pm 0.2	34.1 \pm 0.2	34.1 \pm 0.2
RET (%)	2.42 \pm 0.22	2.51 \pm 0.26	2.41 \pm 0.19	2.42 \pm 0.19
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	643 \pm 53	621 \pm 90	640 \pm 27	625 \pm 69
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	4.01 \pm 0.70	3.67 \pm 0.69	3.36 \pm 0.81	3.58 \pm 1.12
Differential Cell count				
NEUT (%)	22.7 \pm 3.35	27.2 \pm 4.75	27.0 \pm 2.76	33.5 \pm 6.81 **
LYMPH (%)	72.3 \pm 3.60	67.7 \pm 4.76	67.6 \pm 2.83	60.0 \pm 7.08 **
MONO (%)	3.64 \pm 0.54	3.69 \pm 0.53	3.87 \pm 0.65	4.34 \pm 0.61 *
EO (%)	1.01 \pm 0.39	1.10 \pm 0.52	1.14 \pm 0.32	1.71 \pm 1.48 *
BASO (%)	0.30 \pm 0.08	0.29 \pm 0.14	0.41 \pm 0.15	0.47 \pm 0.18 *
NEUT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.91 \pm 0.21	0.99 \pm 0.22	0.90 \pm 0.21	1.16 \pm 0.32
LYMPH ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	2.90 \pm 0.52	2.49 \pm 0.55	2.28 \pm 0.60	2.20 \pm 0.86
MONO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.15 \pm 0.04	0.14 \pm 0.03	0.13 \pm 0.03	0.16 \pm 0.06
EO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.04 \pm 0.01	0.04 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01	0.06 \pm 0.05
BASO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00	0.02 \pm 0.01
<i>Female</i>				
No. of animals	10	10	10	10
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	8.85 \pm 0.18	8.89 \pm 0.24	8.89 \pm 0.15	8.84 \pm 0.31
HGB (g/dL)	15.6 \pm 0.3	15.6 \pm 0.4	15.6 \pm 0.2	15.5 \pm 0.5
HCT (%)	45.3 \pm 1.1	45.4 \pm 1.3	45.4 \pm 0.8	45.0 \pm 1.6
MCV (fL)	51.2 \pm 0.4	51.0 \pm 0.3	51.1 \pm 0.4	50.9 \pm 0.2
MCH (pg)	17.6 \pm 0.1	17.5 \pm 0.1	17.6 \pm 0.1	17.5 \pm 0.1 **
MCHC (g/dL)	34.4 \pm 0.2	34.4 \pm 0.3	34.4 \pm 0.3	34.4 \pm 0.2
RET (%)	2.33 \pm 0.19	2.24 \pm 0.25	2.41 \pm 0.38	2.30 \pm 0.44
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	677 \pm 69	674 \pm 34	719 \pm 40	701 \pm 100
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	4.32 \pm 1.12	3.89 \pm 1.02	4.04 \pm 0.41	4.19 \pm 0.96
Differential Cell count				
NEUT (%)	23.4 \pm 6.81	25.8 \pm 6.07	25.0 \pm 4.14	24.0 \pm 3.96
LYMPH (%)	71.4 \pm 7.08	69.3 \pm 6.32	70.0 \pm 4.24	69.9 \pm 4.33
MONO (%)	3.68 \pm 0.61	3.53 \pm 0.68	3.53 \pm 0.42	3.37 \pm 0.63
EO (%)	2.52 \pm 1.48	1.01 \pm 0.30	1.15 \pm 0.29	2.40 \pm 1.63
BASO (%)	0.47 \pm 0.18	0.34 \pm 0.07 *	0.37 \pm 0.11	0.43 \pm 0.09
NEUT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1.03 \pm 0.32	0.99 \pm 0.28	1.02 \pm 0.25	0.99 \pm 0.25
LYMPH ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	3.07 \pm 0.86	2.70 \pm 0.80	2.82 \pm 0.24	2.94 \pm 0.73
MONO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.16 \pm 0.06	0.14 \pm 0.05	0.14 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03
EO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.05 \pm 0.05	0.04 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01	0.10 \pm 0.07 *
BASO ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0.02 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00 *	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00

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

Table 4. Serum biochemistry of F344/DuCrj rats treated with titanium(IV) oxide for 13 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	0	100	300	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	10	10	10	10
TP (g/dL)	6.30 ± 0.16	6.27 ± 0.18	6.25 ± 0.24	6.31 ± 0.17
ALB (g/dL)	4.19 ± 0.09	4.17 ± 0.13	4.13 ± 0.15	4.16 ± 0.12
A/G	2.01 ± 0.07	2.02 ± 0.10	1.97 ± 0.08	1.96 ± 0.07
BUN (mg/dL)	21.85 ± 1.77	21.80 ± 1.80	20.11 ± 1.68	21.66 ± 1.85
CRE (mg/dL)	0.368 ± 0.033	0.346 ± 0.028	0.337 ± 0.032	0.336 ± 0.027
Na (mEq/L)	140.9 ± 1.4	141.3 ± 0.8	142.0 ± 1.4	142.2 ± 0.8 *
K (mEq/L)	4.26 ± 0.16	4.30 ± 0.16	4.20 ± 0.21	4.09 ± 0.18
Cl (mEq/L)	99.1 ± 1.4	100.4 ± 0.8 *	100.2 ± 0.9 *	100.1 ± 0.6
Ca (mg/dL)	9.96 ± 0.23	9.88 ± 0.27	9.83 ± 0.18	9.94 ± 0.18
IP (mg/dL)	5.06 ± 0.34	4.98 ± 0.38	4.82 ± 0.49	5.06 ± 0.42
AST (IU/L)	97.0 ± 22.0	87.2 ± 16.1	99.8 ± 22.9	108.3 ± 36.0
ALT (IU/L)	59.9 ± 10.2	52.1 ± 9.0	56.5 ± 8.2	67.6 ± 14.4
ALP (IU/L)	388.3 ± 35.6	375.4 ± 28.8	381.0 ± 34.1	393.9 ± 34.0
r-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
T-CHO (mg/dL)	66.2 ± 8.4	66.7 ± 5.1	64.3 ± 3.6	59.6 ± 6.0
TG (mg/dL)	93.1 ± 25.4	78.2 ± 11.5	66.1 ± 13.7 **	73.9 ± 14.2 *
T-BIL (mg/dL)	0.043 ± 0.012	0.048 ± 0.009	0.040 ± 0.009	0.043 ± 0.008
GLU (mg/dL)	179.7 ± 20.8	172.7 ± 20.8	171.1 ± 25.9	175.5 ± 26.9
<i>Female</i>				
No. of animals	10	10	10	10
TP (g/dL)	6.53 ± 0.16	6.43 ± 0.19	6.58 ± 0.14	6.57 ± 0.16
ALB (g/dL)	4.43 ± 0.16	4.36 ± 0.13	4.47 ± 0.13	4.50 ± 0.14
A/G	2.10 ± 0.12	2.11 ± 0.11	2.13 ± 0.12	2.19 ± 0.14
BUN (mg/dL)	22.10 ± 3.57	22.00 ± 2.92	20.58 ± 2.35	20.63 ± 1.78
CRE (mg/dL)	0.355 ± 0.029	0.368 ± 0.034	0.349 ± 0.015	0.354 ± 0.024
Na (mEq/L)	141.8 ± 1.0	142.2 ± 1.0	142.1 ± 0.9	142.6 ± 0.8
K (mEq/L)	3.85 ± 0.18	3.90 ± 0.27	3.88 ± 0.15	3.93 ± 0.16
Cl (mEq/L)	101.3 ± 0.8	102.0 ± 1.2	102.4 ± 0.7	103.1 ± 1.3 **
Ca (mg/dL)	10.16 ± 0.16	9.90 ± 0.35	9.93 ± 0.21	9.91 ± 0.35
IP (mg/dL)	4.79 ± 0.66	5.01 ± 0.64	4.33 ± 0.89	4.49 ± 0.65
AST (IU/L)	76.5 ± 6.3	75.7 ± 5.1	75.9 ± 4.4	80.8 ± 5.7
ALT (IU/L)	38.4 ± 2.8	39.0 ± 4.5	38.4 ± 4.3	40.8 ± 6.4
ALP (IU/L)	282.3 ± 41.7	275.8 ± 23.5	292.3 ± 54.3	266.9 ± 30.7
r-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
T-CHO (mg/dL)	91.7 ± 6.0	86.3 ± 5.7	95.2 ± 6.7	88.4 ± 5.4
TG (mg/dL)	52.4 ± 16.6	38.9 ± 19.5	42.6 ± 17.1	52.3 ± 27.1
T-BIL (mg/dL)	0.051 ± 0.012	0.047 ± 0.012	0.043 ± 0.013	0.047 ± 0.009
GLU (mg/dL)	131.4 ± 24.6	134.3 ± 17.0	132.6 ± 16.0	120.9 ± 13.8

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

Table 5. Organ weights of F344/DuCrj rats treated with titanium dioxide for 13 weeks

Dose (mg/kg bw/day)	0	100	300	1000
<i>Male</i>				
No. of animals	10	10	10	10
Body weight (g)	291.4 ± 16.4	285.8 ± 17.0	297.3 ± 16.8	284.4 ± 16.7
Absolute				
Brain (g)	1.911 ± 0.046	1.914 ± 0.034	1.916 ± 0.030	1.902 ± 0.035
Thymus (g)	0.168 ± 0.016	0.162 ± 0.028	0.182 ± 0.018	0.159 ± 0.026
Lungs (g)	0.906 ± 0.042	0.875 ± 0.061	0.923 ± 0.057	0.893 ± 0.061
Heart (g)	0.829 ± 0.058	0.829 ± 0.042	0.851 ± 0.039	0.833 ± 0.054
Spleen (g)	0.570 ± 0.043	0.569 ± 0.049	0.583 ± 0.035	0.553 ± 0.035
Liver (g)	6.553 ± 0.644	6.400 ± 0.468	6.649 ± 0.399	6.183 ± 0.501
Adrenals (g)	0.035 ± 0.004	0.034 ± 0.003	0.034 ± 0.003	0.035 ± 0.003
Kidneys (g)	1.578 ± 0.076	1.622 ± 0.104	1.613 ± 0.086	1.586 ± 0.098
Testes (g)	2.944 ± 0.116	2.964 ± 0.293	2.912 ± 0.268	2.949 ± 0.346
pituitary (mg)	6.61 ± 0.83	6.68 ± 0.80	7.12 ± 0.77	6.91 ± 0.75
thyroid (mg)	14.63 ± 1.61	12.59 ± 2.44	13.87 ± 2.69	12.33 ± 1.84
salivary gland (g)	0.453 ± 0.033	0.448 ± 0.026	0.465 ± 0.018	0.446 ± 0.030
seminal vesicle (g)	0.844 ± 0.122	0.804 ± 0.097	0.897 ± 0.093	0.830 ± 0.087
prostate gland (g)	0.638 ± 0.082	0.667 ± 0.064	0.696 ± 0.072	0.680 ± 0.071
Relative (%)				
Brain	0.659 ± 0.035	0.672 ± 0.039	0.646 ± 0.031	0.671 ± 0.035
Thymus	0.059 ± 0.005	0.056 ± 0.008	0.061 ± 0.008	0.056 ± 0.010
Lungs	0.312 ± 0.017	0.340 ± 0.109	0.311 ± 0.014	0.314 ± 0.018
Heart	0.284 ± 0.009	0.290 ± 0.008	0.286 ± 0.011	0.293 ± 0.015
Spleen	0.196 ± 0.014	0.199 ± 0.008	0.196 ± 0.008	0.194 ± 0.007
Liver	2.245 ± 0.107	2.238 ± 0.046	2.236 ± 0.029	2.172 ± 0.073
Adrenals	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.012 ± 0.001
Kidneys	0.538 ± 0.026	0.568 ± 0.022 **	0.543 ± 0.011	0.558 ± 0.019
Testes	1.012 ± 0.054	1.039 ± 0.099	0.981 ± 0.084	1.036 ± 0.085
pituitary	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.002 ± 0.000
thyroid	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.004 ± 0.001
salivary gland	0.155 ± 0.007	0.157 ± 0.005	0.157 ± 0.008	0.157 ± 0.009
seminal vesicle	0.290 ± 0.042	0.281 ± 0.029	0.303 ± 0.038	0.292 ± 0.030
prostate gland	0.219 ± 0.024	0.234 ± 0.020	0.235 ± 0.027	0.240 ± 0.027
<i>Female</i>				
No. of animals	10	10	10	10
Body weight (g)	173.0 ± 5.3	171.1 ± 5.3	170.3 ± 7.1	169.4 ± 7.1
Absolute				
Brain (g)	1.796 ± 0.028	1.787 ± 0.031	1.779 ± 0.030	1.784 ± 0.037
Thymus (g)	0.158 ± 0.015	0.152 ± 0.018	0.147 ± 0.008	0.154 ± 0.015
Lungs (g)	0.676 ± 0.029	0.694 ± 0.036	0.674 ± 0.134	0.686 ± 0.039
Heart (g)	0.555 ± 0.018	0.548 ± 0.032	0.554 ± 0.030	0.540 ± 0.027
Spleen (g)	0.386 ± 0.019	0.385 ± 0.013	0.372 ± 0.023	0.374 ± 0.027
Liver (g)	3.751 ± 0.122	3.693 ± 0.149	3.640 ± 0.182	3.624 ± 0.176
Adrenals (g)	0.040 ± 0.003	0.041 ± 0.004	0.039 ± 0.006	0.040 ± 0.006
Kidneys (g)	1.021 ± 0.057	1.027 ± 0.032	1.000 ± 0.051	1.001 ± 0.041
Ovaries (g)	0.049 ± 0.006	0.045 ± 0.009	0.044 ± 0.006	0.043 ± 0.007
pituitary (mg)	11.49 ± 2.02	11.72 ± 1.33	10.58 ± 1.97	11.44 ± 1.92
thyroid (mg)	10.95 ± 2.36	9.54 ± 0.94	11.35 ± 1.35	11.07 ± 1.12
salivary gland (g)	0.326 ± 0.012	0.335 ± 0.011	0.333 ± 0.018	0.333 ± 0.023
Relative (%)				
Brain	1.039 ± 0.029	1.045 ± 0.028	1.047 ± 0.048	1.055 ± 0.061
Thymus	0.091 ± 0.007	0.089 ± 0.009	0.087 ± 0.005	0.091 ± 0.008
Lungs	0.391 ± 0.014	0.406 ± 0.023	0.396 ± 0.076	0.405 ± 0.026
Heart	0.321 ± 0.016	0.321 ± 0.016	0.325 ± 0.013	0.319 ± 0.013
Spleen	0.223 ± 0.009	0.225 ± 0.009	0.218 ± 0.011	0.221 ± 0.020
Liver	2.169 ± 0.063	2.160 ± 0.095	2.138 ± 0.061	2.140 ± 0.092
Adrenals	0.023 ± 0.001	0.024 ± 0.003	0.023 ± 0.003	0.023 ± 0.004
Kidneys	0.590 ± 0.029	0.601 ± 0.020	0.587 ± 0.020	0.592 ± 0.029
Ovaries	0.028 ± 0.003	0.026 ± 0.005	0.026 ± 0.003	0.025 ± 0.004
pituitary	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001
thyroid	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001
salivary gland	0.189 ± 0.006	0.196 ± 0.009	0.195 ± 0.008	0.197 ± 0.010

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

Table 6. Test material related histopathological findings of F344/DuCrj rats treated with titanium(IV) oxide for 13 weeks

Dose (mg/kg bw/day)		0	100	300	1000	0	100	300	1000
		<i>Male</i>				<i>Female</i>			
No. of animals:		10	10	10	10	10	10	10	10
Organs									
Findings									
Lymph node, cervical	G	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>
Yellowish brown material	1	0	0	6*	10**	0	4	6*	8**
Lymph node, mediastinal	G	<10>	<10>	<10>	<10>	<9>	<9>	<10>	<10>
Yellowish brown material	1	0	3	4	7**	0	2	3	4*
	2	0	0	0	0	0	0	1	1*
Lung	G	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>
Yellowish brown material, Bronchus-associated lymphoid tissue	1	0	2	1	5*	0	2	3	3
	2	0	0	1	0	0	0	0	1
Trachea	G	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>
Yellowish brown material, subepithelial	1	0	2	2	7**	0	2	1	4
Intestine, ileum	G	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>	<10>
Yellowish brown material, Peyer's patch	1	0	0	0	4	0	0	0	3

< >, Number of animals examined. G (Grade) 1, Minimal; 2, Mild.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with 0 mg/kg bw/day group.

Table 7-1 Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
	Dose (mg/kg) :	0	100	300	1000
Findings	Number:	10	10	10	10
Adrenal					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Aorta					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Bone, femur					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Bone, sternum					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Brain					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Bulbourethral gland					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Coagulating gland					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Epididymis					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	9
Sperm, decreased, lumen		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Esophagus					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	1
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	9*
Present		0	0	0	9
Eye					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		6	0	0	10
Atrophy, outer retina		4	0	0	0
minimal		4	0	0	0
Heart					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		4	0	0	6
Infiltrate, inflammatory cell		6	0	0	4
minimal		6	0	0	3
mild		0	0	0	1
Intestine, cecum					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	0

M : Male

Fisher Exact test * = p < 0.025

Table 7-2 Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
	Dose (mg/kg):	0	100	300	1000
Findings	Number:	10	10	10	10
Intestine, cecum (continued)					
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	10*
Present		0	0	0	10
Intestine, colon					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	0
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	10*
Present		0	0	0	10
Intestine, duodenum					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	0
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	10*
Present		0	0	0	10
Intestine, ileum					
Number examined		10	10	10	10
Not remarkable		10	4	4	0
Yellowish brown material, lumen		0	6*	6*	10*
Present		0	6	6	10
Yellowish brown material, Peyer's patch		0	0	0	4
minimal		0	0	0	4
Intestine, jejunum					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	1
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	9*
Present		0	0	0	9
Intestine, rectum					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	0
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	10*
Present		0	0	0	10
Kidney					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Liver					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		7	0	0	9
Hepatodiaphragmatic nodule		3	0	0	1
Present		3	0	0	1
Lung					
Number examined		10	10	10	10
Not remarkable		10	8	7	2
Yellowish brown material, alveolar		0	1	3	8*
Present		0	1	3	8
Yellowish brown material, bronchus-associated lymphoid tissue		0	2	2	5*
minimal		0	2	1	5
mild		0	0	1	0

M : Male

Fisher Exact test * = p < 0.025

Table 7-3 Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
	Dose (mg/kg):	0	100	300	1000
Findings	Number:	10	10	10	10
Lymph node, cervical					
Number examined		10	10	10	10
Not remarkable		10	10	4	0
Yellowish brown material		0	0	6*	10*
minimal		0	0	6	10
Lymph node, mediastinal					
Number examined		10	10	10	10
Not remarkable		10	7	6	3
Yellowish brown material		0	3	4	7*
minimal		0	3	4	7
Lymph node, mesenteric					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Mammary gland					
Number examined		9	0	0	10
Not remarkable		9	0	0	10
No sample		1	0	0	0
Muscle, femur					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Pancreas					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Parathyroid					
Number examined		10	0	0	9
Not remarkable		10	0	0	9
No sample		0	0	0	1
Pituitary					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	9
Aberrant craniopharyngeal structure		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Prostate					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		8	0	0	7
Infiltrate, inflammatory cell		2	0	0	3
minimal		2	0	0	3
Salivary gland, sublingual					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Salivary gland, submandibular					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10

M : Male

Fisher Exact test * = $p < 0.025$

Table 7-4 Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
Findings	Dose (mg/kg):	0	100	300	1000
	Number:	10	10	10	10
Sciatic nerve					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Seminal vesicle					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Skin					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Spinal cord (cervical, thoracic, lumbar)					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Spleen					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Stomach					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	0
Yellowish brown material, lumen		0	0	0	10*
Present		0	0	0	10
Testis					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	8
Dilatation, tubule		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Degeneration/Atrophy, tubule		0	0	0	1
mild		0	0	0	1
Thymus					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Thyroid					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Tongue					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10
Trachea					
Number examined		10	10	10	10
Not remarkable		10	8	8	3
Yellowish brown material, subepithelial		0	2	2	7*
minimal		0	2	2	7
Trigeminal nerve					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10

M : Male

Fisher Exact test * = p < 0.025

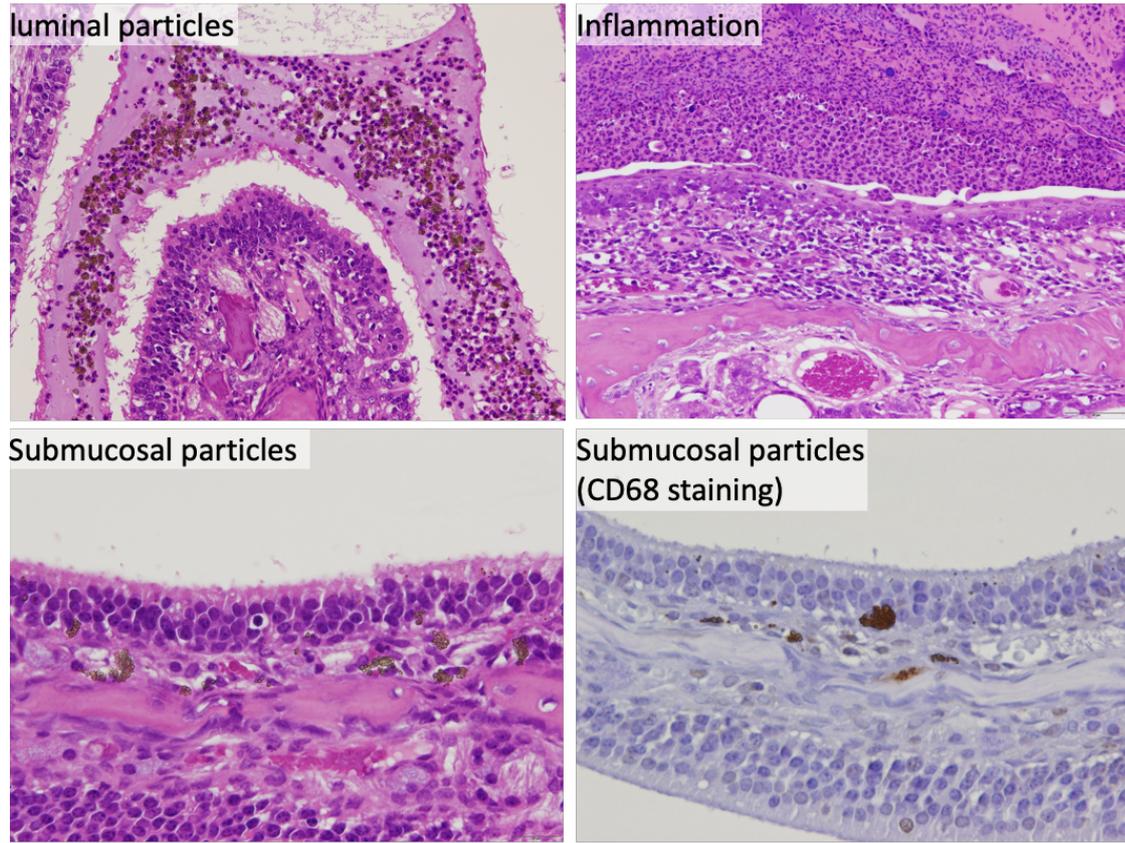
Table 7-5 Histopathological examination of "90-day repeated-dose toxicity study on titanium dioxide (AMT-100) in rats"
Histopathological findings

Organs	Sex:	M	M	M	M
	Dose (mg/kg):	0	100	300	1000
Findings	Number:	10	10	10	10
Urinary bladder					
Number examined		10	0	0	10
Not remarkable		10	0	0	10

M : Male

No statistically significant difference

A. Nasal cavity



B. Gastrointestinal tract

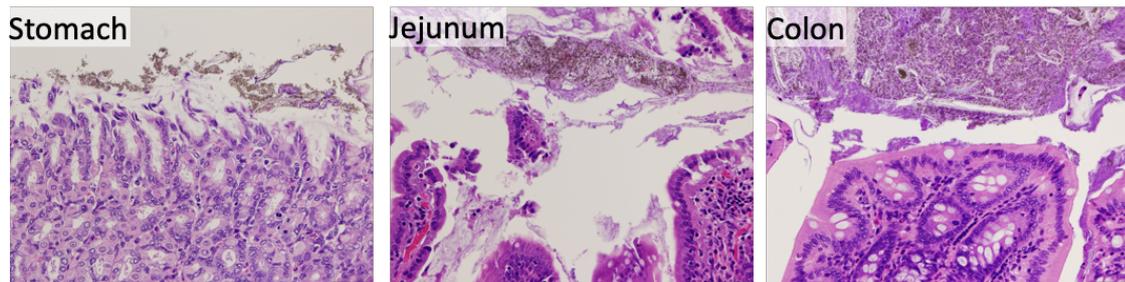


Figure 1. Representative images of yellowish brown materials found at submucosa of nasal cavity (**A**) and gastrointestinal tract (**B**) of male and female F344/DuCrj rats orally administered titanium(IV) oxide for 4 weeks.

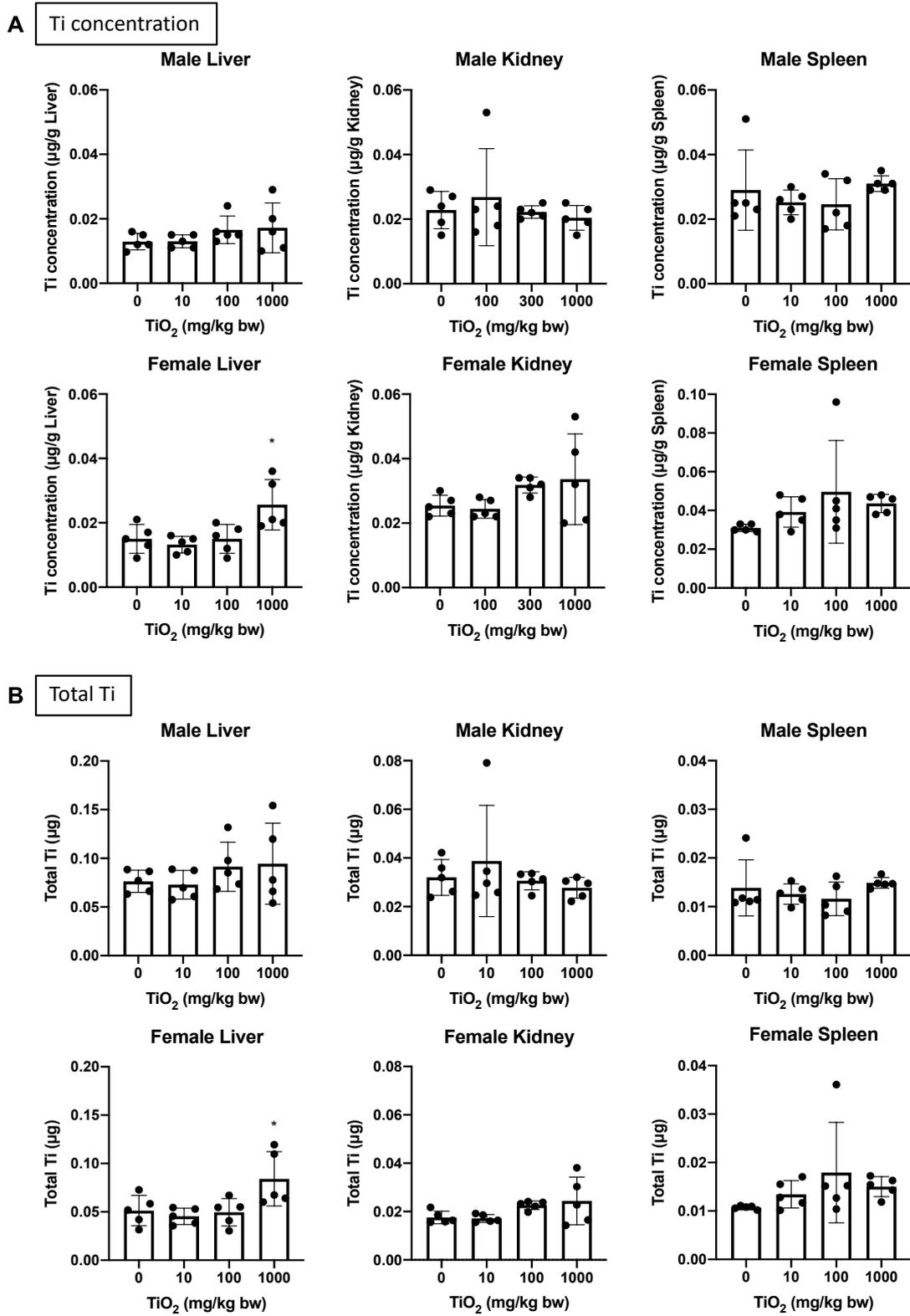
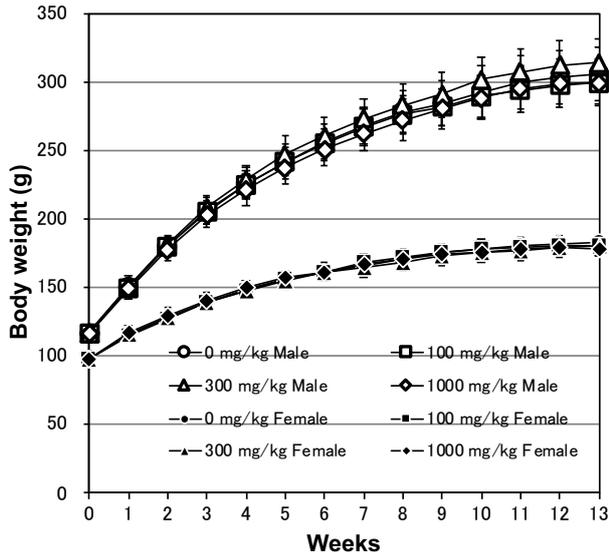


Figure 2.

Titanium concentration (A) and total titanium (B) of the liver, kidney, and spleen of male and female F344/DuCrj rats administered titanium(IV) oxide for 4 weeks. * $P < 0.05$ compared with control group.

A 体重



B 摂餌量

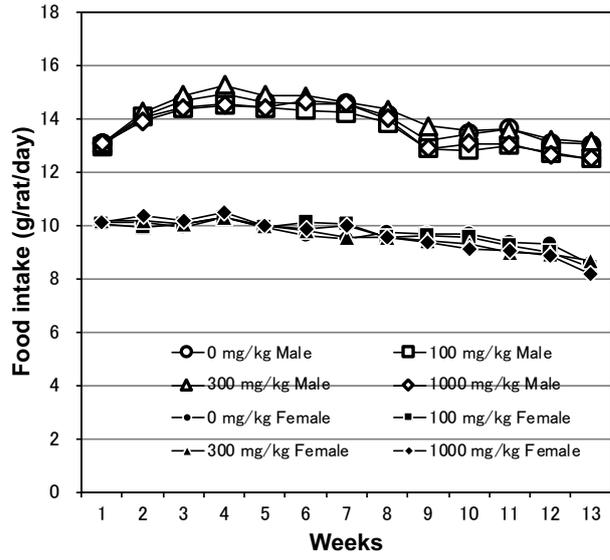


Figure 3. Body weight (A) and daily food intake (B) of male and female F344/DuCrj rats orally administered titanium(IV) oxide for 13 weeks.

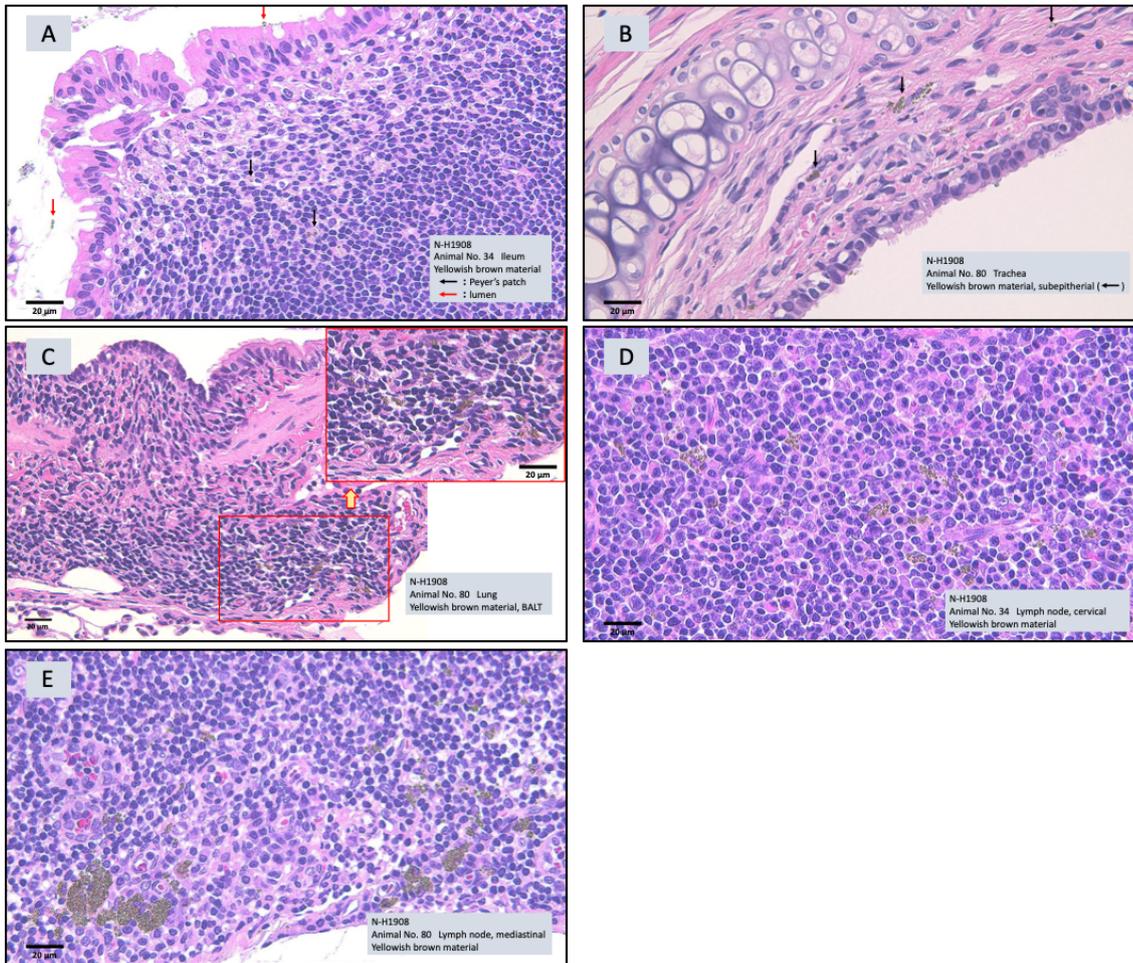


Figure 4. Representative images of yellowish brown materials found at ileum (A), trachea (B), lung (C), cervical lymph node (D), and mediastinal lymph node (E) of male and female F344/DuCrj rats orally administered titanium(IV) oxide for 13 weeks.

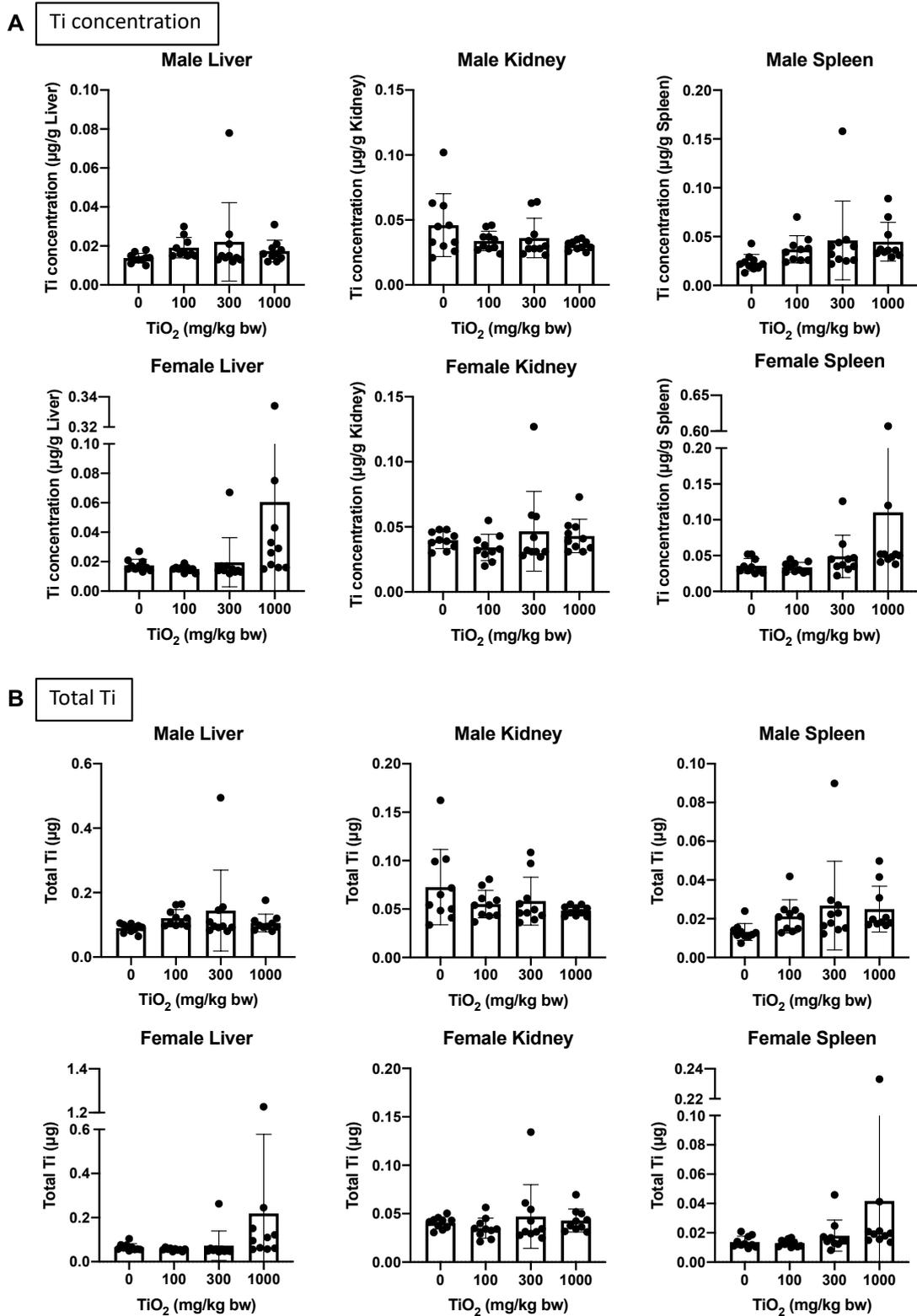


Figure 5. Titanium concentration (A) and total titanium (B) of the liver, kidney, and spleen of male and female F344/DuCrj rats administered titanium(IV) oxide for 13 weeks.

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。OVA $2\mu\text{g}$ × 4回の経皮感作、OVA 30mg × 7回の経口投与による追加免疫、その後のOVA 50mg の経口投与によりアレルギー症状を惹起する抗原経皮感作-経口惹起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。令和2年度においては、粒子径 6nm ・アナターゼ型、及び粒子径 30nm ・アナターゼ型のナノ酸化チタンが経口追加免疫を有意に増強することを示した。令和3年度においては、粒子径 15nm ・アナターゼ型のナノ酸化チタンについて、経口投与時の共存により経口追加免疫を増強する傾向が見られた。一方、これまでの検討では、粒子径 $30\text{-}50\text{nm}$ ・ルチル型、及び粒子径 15nm ・ルチル型のナノ酸化チタンでは、このような経口追加免疫の増強効果や増強傾向は見られていない。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と考えられる。

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、いずれも明確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ゲン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、粒子径 6nm ・アナターゼ型のナノ酸化チタンが経皮感作時の共存により感作を増強すること、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の、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、検討を続けていた抗原経皮感作・経口追加免疫・経口惹起実験系を精緻化して、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討し、粒子径 6 nm・アナターゼ型及び粒子径 30 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンが経口追加免疫を増強すること、粒子径 30-50 nm・ルチル型のナノ酸化チタンではこのような増強効果は見られないことを示した。

令和3年度においては、粒子径及び結晶型の影響についてさらに検討するため、粒子径 15 nm・アナターゼ型、及び粒子径 15 nm・ルチル型のナノ酸化チタンに関して、抗原経口暴露時の共存効果について検討した。

B. 研究方法

試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン A

(粒子径 15 nm・ルチル型)

酸化チタン D

(粒子径 15 nm・アナターゼ型)

(両者とも表面未処理)

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。血清中の Mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) の定量は、MCPT-1 (mMCP-1) Mouse Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific 88-7503-88) を用いて行った。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】粒子径 15nm のナノ酸化チタンの影響に関する検討

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー (株) より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業 (株)) を給餌した。1 群の匹数は 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 (2 μ g/50 μ L) を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1 クールとし、4 クールの経皮感作を行った。その後、Day 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 TiO₂A または D 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 60 分間は、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。また惹起時は、60 分後に採血し、血清中の mMCP-1 濃度を測定した。

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】粒子径 15nm のナノ酸化チタンの影響に関する検討

抗原経皮感作・経口追加免疫・経口惹起実験系を用いた、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響に関する令和2年度における検討では、粒子径 6 nm・アナターゼ型及び粒子径 30 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンが経口追加免疫を増強すること、粒子径 30-50 nm・ルチル型のナノ酸化チタンではこのような増強効果は見られないことが示された。

令和3年度においては、被験物質として、酸化チタン A (粒子径 15 nm・ルチル型)、及び酸化チタン D (粒子径 15 nm・アナターゼ型) の2種を用い、抗原経口暴露時のナノ酸化チタンの共存効果についてさらに検討した。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 A あるいは D を共存させる群を設定した。OVA:ナノ酸化チタン重量比は、これまでと同様に、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 A、D 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、Fig.3 及び

Fig.4 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-TiO₂A po 群、OVA-TiO₂D po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られた。経口追加免疫 6 回目及び 7 回目において、OVA-TiO₂D po 群では OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。また経口惹起時には、OVA-TiO₂A po 群及び OVA-TiO₂D po 群で OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。下痢症状に関しては、OVA 群、OVA-TiO₂A po 群、OVA-TiO₂D 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-TiO₂D po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。

Fig.5 には、経口惹起 60 分後の血清中の mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) の定量結果を示す。mMCP-1 はマウス小腸粘膜のマスト細胞のプロテアーゼであり、マスト細胞の活性化時に細胞外に放出される。Fig.5 に示すとおり、OVA 群、OVA-TiO₂A po 群、OVA-TiO₂D po 群では、経口惹起 60 分後の血清中の mMCP-1 濃度は、V 群の 6100-6600 倍ほどと非常に高く、V 群との間に有意差が見られた。OVA 群と OVA-TiO₂A po 群あるいは OVA-TiO₂D po 群との間では有意差は見られなかった。

なお、陰性対照群である酸化チタン A あるいは D のみを経口投与した群 (TiO₂A only 群、TiO₂D 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、血清中 mMCP-1 濃度増大のいずれも見られなかった。

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 15 nm の2種のナノ酸化チタンのうち、アナターゼ型の酸化チタン D では、経口投与時に共存させることにより、経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が示された。一方ルチル型の酸化チタン A では経口惹起でのみ増強する傾向が見られた。

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する。

令和2年度においては、マウスを用いた抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系を使用して、アレルギーの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討し、酸化チタンC(粒子径6nm・アナターゼ型)及び酸化チタンE(粒子径30nm・アナターゼ型)が経口追加免疫を有意に増強すること、酸化チタンF(粒子径30-50nm・ルチル型)ではこのような増強効果は見られないことを示した。

令和3年度においては、粒子径及び結晶型の影響についてさらに検討するため、酸化チタンA(粒子径15nm・ルチル型)、及び酸化チタンD(粒子径15nm・アナターゼ型)の2種に関して、抗原経口暴露時の共存効果について検討した。筆者らのこれまでの検討では、酸化チタンA及びDは、OVA経皮感作、及びOVA腹腔内感作において増強効果を示している。本研究の検討においては、酸化チタンDは、経口投与時に共存させることにより、経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が示された。一方ルチル型の酸化チタンAでは経口惹起でのみ増強する傾向が見られた。これらの結果から、経口投与時の共存効果に関して、粒子径6-30nm・アナターゼ型の酸化チタンは、抗原経口追加免疫を増強する、または増強する傾向がみられることが示された。今後、アナターゼ型でより粒子径が大きいナノ酸化チタンや、表面修飾等の影響についても検討を進める必要があると考えられる。

また、本年度は、経口惹起後の血清中の

mMCP-1濃度について検討を行った。mMCP-1はマウス小腸粘膜のマスト細胞の顆粒に含有されているプロテアーゼであり、小腸粘膜マスト細胞の活性化に伴う脱顆粒により細胞外に放出されることが知られている。そのため、マウスを用いた食物アレルギーモデル実験等において血中濃度の増大がアレルギー反応の指標として利用されている。本研究では、体温低下や下痢等のアナフィラキシー症状が見られたOVA群、OVA-TiO₂A po群、OVA-TiO₂D po群において、経口惹起60分後の血清中のmMCP-1濃度はV群と比較して非常に高く、V群との間に有意差が認められた。また濃度も65µg/mL程度であり、過去の報告例(Clin Exp Allergy. 2017;47:1204-1213)とも合致していることから、本研究で使用しているマウスモデル系の妥当性が示されたものと考えられる。今後、本モデル実験系を用いて、経口追加免疫時のナノ酸化チタンの増強効果の作用機序についても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。OVA2µg×4回の経皮感作、OVA30mg×7回の経口投与による追加免疫、その後のOVA50mgの経口投与によりアレルギー症状を惹起する抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起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D(粒子径15nm・アナターゼ型)では、経口投与時に共存させることにより、経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が示された。一方、酸化チタンA(粒子径15

nm・ルチル型)では経口惹起でのみ増強する傾向が見られた。今後、ナノマテリアルの経皮／経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akiyama H, Adachi R. Japanese food allergy-labeling system and comparison with the international experience; detection and thresholds. Food Safety 2021; 9(4) 101-116.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

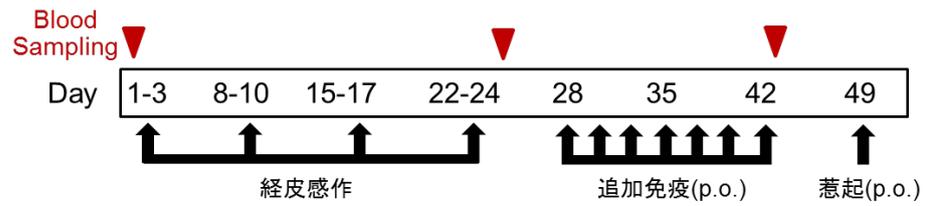
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

投与スケジュール



粒子径15nmの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 μ g	OVA 30mg	OVA 50mg
OVA-TiO ₂ A po	OVA 2 μ g	OVA 30mg + TiO ₂ A 1.88mg	OVA 50mg
OVA-TiO ₂ D po	OVA 2 μ g	OVA 30mg + TiO ₂ D 1.88mg	OVA 50mg
TiO ₂ A only (2匹)	PBS	TiO ₂ A 1.88mg	OVA 50mg
TiO ₂ D only (2匹)	PBS	TiO ₂ D 1.88mg	OVA 50mg

※ TiO₂A: 粒子径15nm、ルチル型、TiO₂D: 粒子径15nm、アナターゼ型。

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。

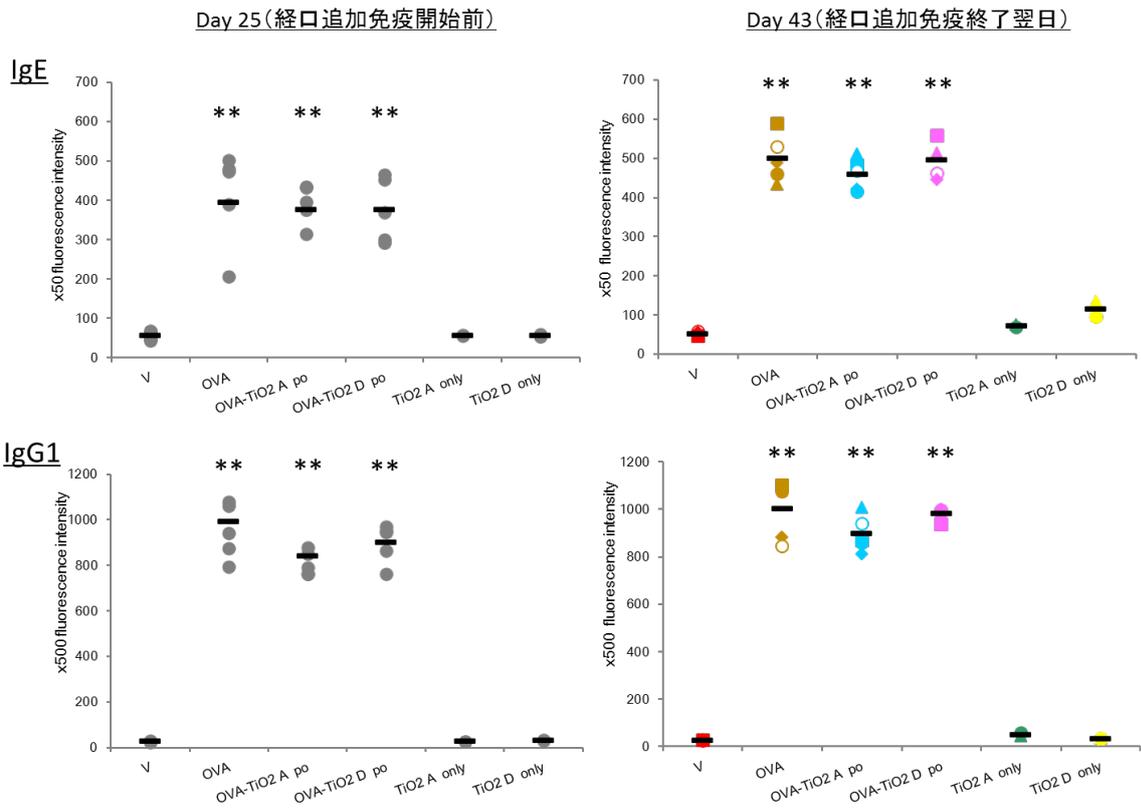


Figure 2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.

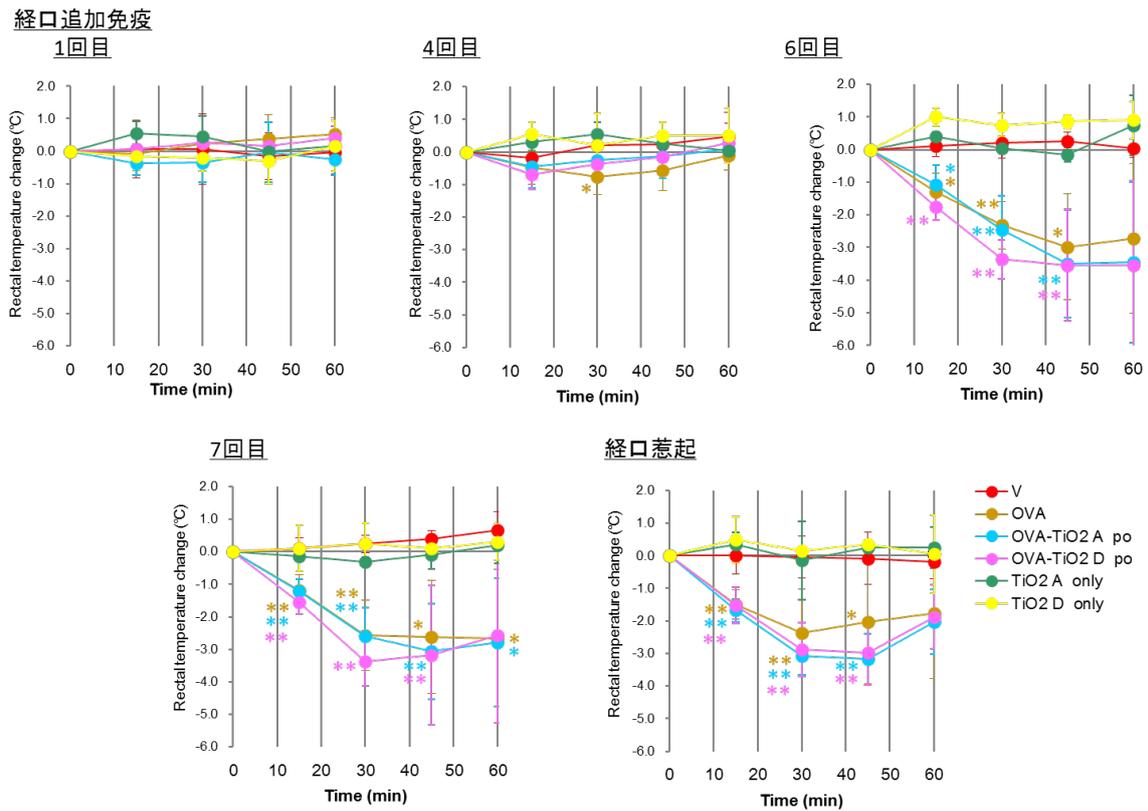


Figure 3 抗原経口投与後の体温低下
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.

経口追加免疫

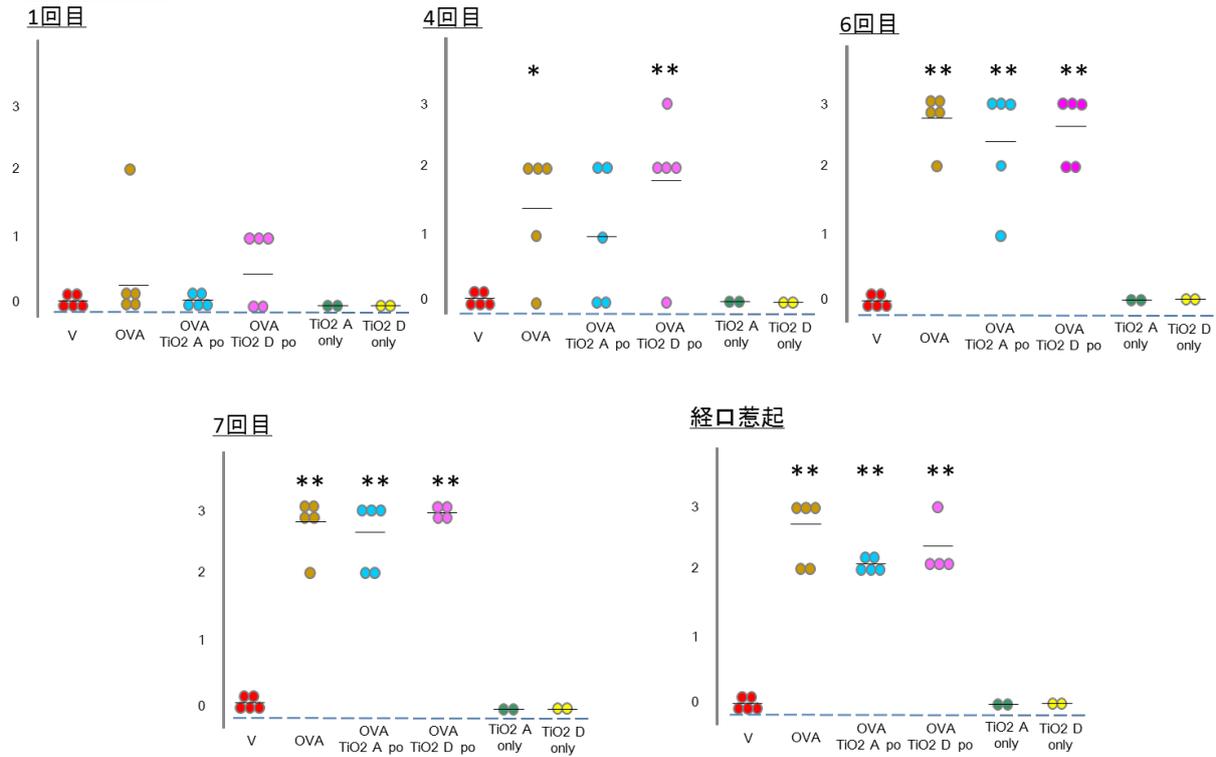


Figure 4 抗原経口投与後60分間の下病症状スコアリング
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.

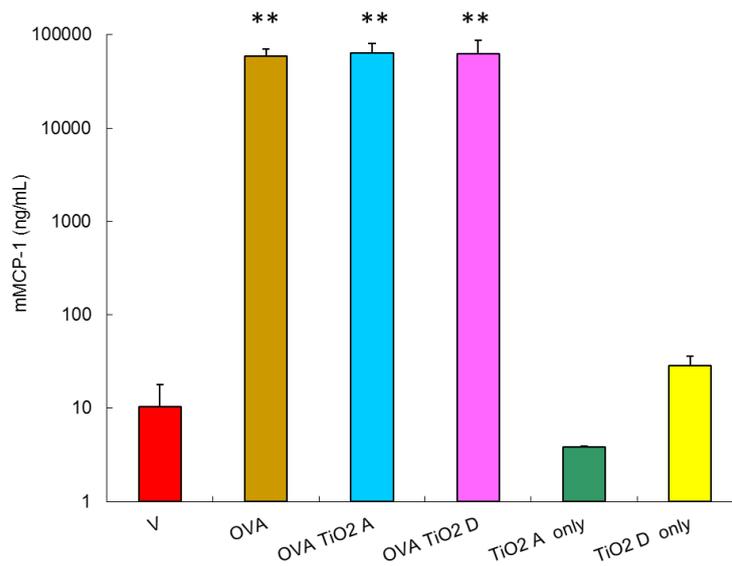


Figure 5 経口惹起60分後の血清中mMCP-1濃度
** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.

令和3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
研究協力者：大畑 秀雄 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 研究員
研究協力者：最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 客員研究員

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。R3年度は、欧州食品安全機関（EFSA）の科学ネットワーク主催による「食品と飼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。ネットワークでは、二つのEFSAガイダンス文章（粒子に関するガイダンス、ナノに関するリスクアセスメントガイダンス）について議論された。さらに、最近、欧州委員会の要請を受けてEFSA FAFパネル（EFSA食品添加物・香料に関するパネル）が再評価した食品添加物としての二酸化チタン（E171）の安全性評価に関する科学的意見を新たに発表した内容や、RIVM社（オランダ）の合成アモルファスシリカ（SAS）ナノ粒子の経口曝露のリスク評価に関する取り組みや、PAROLSの腸管 *in vitro* モデルについての紹介があった。

一方、OECD ナノマテリアル作業グループの先端的ナノ材料についての Ad-Hoc Working Group に関する調査では、従来のナノ材料だけでなく、ナノマテリアルを含めた先端的材料やこれらを複合的に組み合わせた新規物質の製品開発・商品化の状況を見据えて、先端的材料（アドバンスドマテリアル：AdMa）と呼ぶ革新的な材料について、現行の化学物質の法規制やリスク評価ツールが、規制への備えを強化するなどの潜在的リスクに適切に対処しているかを評価する必要性についての議論が行われた。

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

B. 研究方法

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11回食品と飼料のナノテクノロジーに関するネットワーク会議(2021年10月29日、Web会議)に関する調査を実施した。また、

OECD ナノマテリアル作業グループの先端的ナノ材料についての Ad-Hoc Working Group に関して2月に開催されたワークショップ(2022年2月9-10日、Web開催)に参加し、先端的ナノ材料について調査を実施した。

C. 研究結果

■ EFSA テクニカルガイダンスに関するネットワーク会議

2021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、新しく発行された「粒子に関するガイダンス-技術的要求事項(TR)」と「ナノに関するガイダンス-リスクアセスメント(RA)」の背景とその対象範囲について説明した。2つのナノガイダンスは、ドラフトの段階でEFSAが各分野のパネルやユニット、ナノネットワークのメンバーやオブザーバー、関連するステークホルダーと複数回の協議を行い、国際的な動向を考慮されていた。

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の食品および飼料製品申請のための技術要件に関するガイダンス(粒子に関するガイダンス-TR)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評価するために作成された。本ガイダンスは、評価対象の材料が「ナノに関するガイダンス-RA」の適用への必要性(すなわち、ナノ特異的なリスクアセスメントの必要性の有無について)を判断するための情報要件と評価ルートを提供するものであった。

食料および飼料製品に適用されるナノマテリアルのリスク評価に関するガイダン

ス：ヒトと動物の健康」(Guidance on Nano-RA)は、2018年に初版が発行され、その後、更新版が発行された。本ガイダンスの更新は、新たな科学的知見、「粒子に関するガイダンス-TR」で得られた新たな成果との調和や本ガイダンスを利用したステークホルダーからのフィードバックによって実施された。また、更新版では、材料がナノ特異的なリスク評価を必要とする場合に従うべき段階的アプローチが図示されていた。

ナノガイドラインは相互に補完的なものであり、申請者及びリスク評価者は、製品の最終用途に依存し、安全性評価のメインフレームであり続ける特定の部門別リスク評価の枠組みに統合されることを考慮する必要があると述べていた。

この紹介の後、ナノネットワークは、ナノテクノロジーの横断的ワーキンググループ(WG)のメンバーによって、ガイドラインの実施例と共に提示された。このプレゼンテーションでは、食品添加物、食品接触材料及び新規食品の分野におけるリスク評価書に関して、EFSAや他のパネル及びユニットからWGに寄せられた要望が取り上げられた。実施事例は、新たに公表されたナノガイダンス文書の最終化と、それらの実用性の改善にも役立つものであった。さらに得られた経験と教訓についての公開討論が実施された。

➤ 二酸化チタン (E171) 意見書

ナノネットワークは、Ana Rincon氏 (EFSA 食品成分・包装 (FIP) ユニット) と Jose Tarazona氏 (EFSA 科学委員会・新興リスク (SCER) ユニット) らにより、欧州委員会の要請を受けて EFSA FAF

パネル (EFSA 食品添加物・香料に関するパネル) で最近再評価された食品添加物としての二酸化チタン (E171) の安全性評価に関する科学意見が新たに公表されたことを紹介していた

(<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2021.6585>)。

再評価の意見書では、TiO₂ ナノ粒子 (NP) で得られたデータおよび拡張一世代生殖毒性 (EOGRT) 試験研究からのデータを含みパネルが信頼できると考えた新たな関連する科学的証拠に基づくものであり、食品添加物二酸化チタン (E 171) の最新の安全性評価を扱っている。E 171 の構成粒子のうち、最小外形寸法が 100 nm 未満のものは 50%未満であり、30 nm 未満の構成粒子は、粒子数の 1% 未満であることに留意するものであった。したがって、当委員会は、30 nm 未満の TiO₂NP を用いた研究は、E 171 の安全性評価との関連性は限定的であるとみなしていた。さらに当委員会は、TiO₂ 粒子の消化管吸収は低い、体内に蓄積する可能性がある」と結論付けていた。

一般毒性および臓器毒性に関する試験では、E171 では 1,000 mg/kg 体重/日まで、TiO₂ NP (>30 nm) では試験した最高用量の 100 mg/kg 体重/日まで有害影響を示さなかった。生殖および発生毒性に対する影響は、EOGRT 試験で実施された最高用量である 1,000 mg E 171/kg 体重/日まで観察されなかった。しかし、E171 による免疫毒性と炎症の可能性、及び TiO₂ NP による神経毒性の可能性の観察は、E171 による異常腺窩巢の誘導の可能性と共に、有害事象の可能性を示唆するものであった。

遺伝毒性に関する試験では、当委員会は、

TiO₂ 粒子は DNA 鎖切断および染色体損傷を誘発する可能性があるが、遺伝子突然変異を誘発する可能性はないと結論づけた。TiO₂ 粒子の物理化学的性質と *in vitro* または *in vivo* 遺伝毒性試験の結果の間には明確な相関関係は観察されなかったが、E 171 に存在する可能性のある TiO₂ 粒子の遺伝毒性に対する懸念は否定できなかった。遺伝毒性に対する複数の作用様式が並行して作用する可能性があり、TiO₂ 粒子により誘発される異なる分子メカニズムの相対的な寄与は不明であった。また、閾値作用様式が想定できるかどうかについても不明であった。加えて、遺伝毒性に関する TiO₂ 粒子サイズのカットオフ値は同定できなかった。TiO₂ NP (ナノ粒子) の潜在的な発がん作用を検討するために、適切にデザインされた研究はなく、入手可能なすべての証拠に基づいて、遺伝毒性の懸念は否定できず、多くの不確実性を考慮すると、当委員会は E 171 を食品添加物として使用した場合、もはや安全とは考えられないと結論づけていた。

また、ANS 委員会は、TiO₂ の吸収は限定的であると推測されることを考慮し、ラットの発がん性試験で確認された 2,250 mg/kg 体重/日の無毒性量 (NOAEL) から算出された安全域 (MoS) と、報告された使用量と分析データに基づいて算出された暴露量に基づき、E 171 は懸念されないと結論づけていた。

この評価には、E171 に関する FAF パネルの専門作業部会 (WG) が参加し、EFSA 科学委員会のナノテクノロジーと遺伝毒性に関する横断的 (cc) WG が支援するものであった。本ネットワークは、評価に使用された背景、

データ、方法論について紹介された。さらに、12000 件近い文献が内部文献レビューで選別され、*in vivo* と *in vitro* の実験研究を含む 500 件の文献が最終的に選択された。*in vivo* 毒性試験の評価では、関連性、信頼性、およびナノ材料試験特有の考慮事項について検討された。また、*in vivo* 毒性試験の評価では、関連性、信頼性、およびナノマテリアルを試験するための特別な考慮事項が検討され、さらに、遺伝毒性試験の評価では、結果の信頼性と妥当性についても検討されていた。結果の関連性が十分なレベルにある出版物のみがリスク評価の対象として考慮された。本ネットワークでは、E 171 の FAF パネル WG への研究設計と結果の関連性に関するナノに特化した考慮事項についての助言の基礎として、ナノテクノロジーに関する ccWG が考慮した要素を提示した。意見書の結果が示された後、将来の結果と影響について議論が行われた。

➤ 新たな展開に対する加盟国からのフィードバック

RIVM (オランダ国立公衆衛生環境研究所) の SAS (synthetic amorphous silica : 合成非晶質シリカ) に関する取り組みが紹介された。ナノネットワークでは、アニエス・オーメン氏 (オランダ、ccWG ナノテクノロジーメンバー) により、SAS ナノ粒子の経口曝露のリスク評価から得た経験について述べていた (<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390.2021.1931724>)。

合成非晶質シリカ (SAS) は、食品添加物 E551 として食品に適用されており、凝集体や凝集塊を形成する非晶質二酸化ケイ素

(SiO₂) ナノ粒子で構成されているものであった。アニエス・オーメン氏は、SAS を用いた最近の経口毒性試験をレビューし、そのいくつかはケイ素 (Si) の組織内濃度を報告しているものであった。本ネットワークは、背景と評価に利用できる実験データの概要が紹介された後に、作業の結論と残された不確実性を提示し、このテーマに関する更なる情報と研究の必要性に関する提言が議論された。

➤ PATROLS プロジェクトの腸管 in vitro モデル

本ネットワークでは、Angela K・mpfer 氏 (IUF - ライプニッツ環境医学研究所) により、PATROLS で開発・応用されている先進的な腸管 in vitro モデルの概要が発表された。PATROLS は、組織のコンソーシアムによる現実的なナノ材料のハザード評価のための生理学的に定着したツールの開発と実施に焦点を当てた欧州プロジェクトである。主な目的は、一連の革新的な次世代ハザード評価ツールを確立し標準化することで、ヒトおよび環境システムにおける長期的かつ低用量の人工ナノ材料の曝露によって生じる悪影響をより適切に予測し、規制上のリスクの決定を支援することである。開発されたモデルが発表され、その実用化と規制当局への導入について短い議論が行われた。

➤ The GRACIOUS フレームワーク: ナノ材料のリスク評価を支援するためのグルーピングとリードアクロスへの応用

本ネットワークでは、最近終了した

GRACIOUS (Grouping, Read-Across, Characterisation and classification framework for regulatory risk assessment of manufactured nanomaterials and Safer design of nano-enabled products) プロジェクトの活動について、Vicki Stone 氏 (GRACIOUS Project Coordinator, Heriot-Watt University) によって紹介された。GRACIOUS は、ナノ材料とナノフォームのリードアクロスやクラス分類につながるグループ化の実用化を可能にすることで、非常に革新的な科学に基づくフレームワークを生成することを目的とした Horizon 2020 プロジェクトである。また、ナノ材料のグループ化とリード・アクロスリードアクロスフレームワークと試験・評価への統合アプローチ (IATA)、および SiO₂ ナノフォームの経口曝露への適用例が紹介された。その後、規制リスク評価へのこのアプローチの導入の可能性について議論が行われた。

その他、食品中のナノ粒子のスクリーニングと同定に関する欧州委員会 (EC) の共同研究センター (JRC : The Joint Research Centre) 主催のトレーニングに関心のある研究室についても情報提供が求められていた。また、ネットワークでは、RiskGONE (Science-based Risk Governance of Nano-Technology) というリスク管理の実践、およびすべての利害関係者に対するリスクの認識に関する明確な理解に基づき、ナノテクノロジーに関するリスク・ガバナンスの枠組みおよび科学に基づく確固たる学際的リスク管理手順を促進することを目的とした H2020 プロジェクトについての最近の活動についても報告された。このプロジェクト

の進行中の活動やワークプランについての紹介や、ナノテクノロジーのリスク・ガバナンス協議会の設立、およびナノテクノロジー対応材料の Safety by Design のコンセプトの推進が含まれていた。

■ OECD 先端的材料 Ad-Hoc Working Group のワークショップ (2022年2月9-10日、Web開催)

ナノマテリアル曝露により懸念されるヒト健康影響へのリスク評価の必要性の国際的な高まりを受けて、15年以上にわたり、これまでの化学物質のリスク評価・管理の枠組みを拡張する方向で様々な評価法の開発が進められている。経済協力開発機構 (OECD) の工業ナノ材料作業部会 (WPMN) では、従来のナノ材料だけでなく、ナノマテリアルを含めた先端的材料やそれらを複合的に組み合わせた新規物質の製品開発・商品化の状況を見据えて、先端的材料 (アドバンスドマテリアル: AdMa) と呼ぶ革新的な材料について、2021年より WPMN 活動の対象とすることが正式にされ、新たな化学物質管理について議論の加速化を決定していた。また、これまでの工業用材料の登録や評価を対象とした活動範囲から、食品や医薬品も含めた先端的分野で使用される材料一般も対象として拡大してきている。さらに国際標準化機構 (ISO) においても、TC229 (ナノテクノロジー) において、AdMa について検討が始まっている。本会議では、予測的なリスク・ガバナンスアプローチを開発することで、先端的ナノ材料の潜在的な予想外のリスクの発生を積極的に回避することが最も重要であると述べており、イノベーション・チェーンの初期段階で安全性

と持続可能性の問題に取り組むことで、後の段階での問題を防ぎ、イノベーションを支援することができることが示された。この目標に向けた先端的ナノ材料の新たな課題を系統的に同定するためのシステム (EWARN システム) を利用して議論が行われた。また、ナノスケール(すなわち、ナノ材料を含むか、ナノ構造を特徴づける)に関して製造された材料である AdMa に焦点を当て、そのライフサイクル全体を考慮した安全性、持続可能性、規制問題に関連する可能性が示された。さらに AdMa は、知識のギャップと行動の勧告を特定する戦略的アプローチの中で、安全性、持続可能性、および規制の適用範囲の改善について評価することを目指しており、AdMa に関する知識と、安全性、持続可能性、規制上の問題との関連性が高まった場合には、作業記述は後に改訂される可能性があるとされた。

D. 考察

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、ネットワークメンバーは、ナノマテリアルのリスク評価に関する専門知識や EFSA との将来的な協力関係についてフィードバックを求められていた。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ることから、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が奨励されている。

アドバンスドマテリアル (AdMa) に関しては、再生可能エネルギー、電子移動、デジタル化、医療、資源の効率的な利用もしくは節約など、さまざまな分野で大きな可能性を秘めている。また、AdMa の中には、リサイクルや廃棄物処理など、ライフサイクル全体の持続可能性に関する課題を提起するものも含まれる。AdMa と革新的な製造プロセスは、イノベーション研究の焦点となっており、経済、社会、環境に対して将来的にも期待されるものである。AdMa のいくつかについては、従来の化学物質安全性の枠組みの中で、ナノマテリアルについて特定されたものと同様な課題や追加的な課題が生じることが予想される。AdMa の潜在的リスクは、化学組成以外の物理的性質な要素によって決定されると述べている。従って、従来のリスク評価が全ての AdMa の安全な適用と使用に対して常に保証できるかどうかという問題が生じてくる。従って、現行の化学物質の法規制やリスク評価ツールが、AdMa の潜在的リスクに適切に対処しているかについて評価する必要があると考えられる。

E. 結論

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。R3 年度は、欧州食品安全機関 (EFSA) の科学ネットワーク主催による「食品と飼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、二つの EFSA ガイダンス

ス文章 (粒子に関するガイダンス : Guidance on Particle - TR、ナノに関するガイダンス - リスクアセスメント : Guidance on Nano - RA) について議論された。さらに、最近、欧州委員会の要請を受けて EFSA FAF パネル (EFSA 食品添加物・香料に関するパネル) が再評価した食品添加物としての二酸化チタン (E171) の安全性評価に関する科学的意見を新たに発表した内容や、RIVM 社 (オランダ) の合成アモルファスシリカ (SAS) ナノ粒子の経口曝露のリスク評価に関する取り組みや、PAROLS の腸管 in vitro モデルについての紹介があった。

一方、OECD ナノマテリアル作業グループの先端的ナノ材料についての Ad-Hoc Working Group に関する調査では、従来のナノ材料だけでなく、ナノマテリアルを含めた先端的材料やこれらを複合的に組み合わせた新規物質の製品開発・商品化の状況を見据えて、先端的材料 (アドバンスドマテリアル:AdMa) と呼ぶ革新的な材料について、現行の化学物質の法規制やリスク評価ツールが、規制への備えを強化するなどの潜在的リスクに適切に対処しているかを評価する必要性についての議論が行われた。

F. 研究発表

(論文発表)

Ohno A., Okiyama Y., Hirose A., Fukuhara K.,
The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2022, 441, 115974

Maeno A, Sakamoto Y, Hojo M, Tada Y, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A.,
Kemuriyama N, Miyajima K, Nakae D. A case of spontaneous Zymbal's gland carcinoma with lung metastasis in an aged Fischer 344 rat. *J Toxicol Pathol.* 2021 Oct;34(4):353-358.

Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T. Statins repress needle-like carbon nanotube- or cholesterol crystal-stimulated IL-1 β production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2021 Jun;188: 114580.

Hoyo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198.

(学会発表)

Akiko OHNO, Masatoshi WATANABE, Akihiko HIROSE : ナノマテリアルの物理化学的性状に基づく毒性評価手法への応用, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (Hybrid 開催(2021.7.7-9) (神戸)

前野愛、北條幹、坂本義光、湯澤勝廣、長谷川悠子、長澤明道、生嶋清美、平松恭子、海鉾藤文、山本行男、安藤弘、田中和良、鈴木仁、猪又明子、守安貴子、高橋祐次、横田理、小林憲弘、広瀬明彦、中江大. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の 2 年間ラット気管内反復投与試験における投与器具の違いによる毒性の比較 : 1 年経過時点での報告. 第 48 回日本毒性学会学術年会. (Hybrid 開催(2021.7.7-9) (神戸)

Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : Docking study on the position of nitro groups affecting the mutagenicity of nitroarenes, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催) , Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA)

Akiko Ohno, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : The position of nitro group affecting the mutagenicity of nitrated benzo[a]pyrenes、第 80 回日本癌学会学術総会 (Hybrid 開催) (2021.9.30-10.2) (横浜)

Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara : In silico analysis of mutagenicity of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons, 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会 (Hybrid 開催) (2021.11.1-2) (横須賀)

大野彰子、西田明日香、飯島一智、高橋祐次、広瀬明彦、足利太可雄. in silico による TiO₂NPs の物性と THP-1 細胞への活性化の関連性解析、日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (Hybrid 開催) (2021.11.13, 沖縄)

Ohno A, Watanabe M, Hirose A. Application to toxicity evaluation of silicone dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, The international chemical congress of PACIFIC BASIN SOCIETIES 2021 (2021.12.16-21, On line)

広瀬明彦、大野彰子、ナノマテリアルの有害性評価と今後の課題 : ナノマテリアル曝露に対するリスク評価法における国際動向、日本薬学会第 142 年会シンポジウム (オンライン開催) (2022. 3. 26)

Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J. Preliminary report of the two-year, every 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled

carbon nanotube in male mice, the 61st Annual Meeting of the Society of Toxicology, (Virtual, March 27-31, 2022)

Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Two-Year study for the Assessment of the carcinogenic and toxic effect of double walled carbon nanotubes in the rat lung after

intratracheal instillation. the 61st Annual Meeting of the Society of Toxicology, (Virtual, March 27-31, 2022)

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

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
Akiyama H, Adachi R.	Japanese food allergy-labeling system and comparison with the international experience; detection and thresholds	Food Safety	9(4)	101-116	2021
Ohno A., Okiyama Y., Hirose A., Fukuhara K.	The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes	Toxicol. Appl. Pharmacol.	441	115974	2022
Maeno A, Sakamoto Y, Hojo M, Tada Y, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Kemuriyama N, Miyajima K, Nakae D.	A case of spontaneous Zymbal's gland carcinoma with lung metastasis in an aged Fischer 344 rat	J Toxicol Pathol.	34(4)	353-358	2021

Cui H, Soga K, Tamehiro N, Adachi R, Hachisuka A, Hirose A, Kondo K, Nishimaki-Mogami T.	Statins repress needle- like carbon nanotube- or cholesterol crystal- stimulated IL-1 β production by inhibiting the uptake of crystals by macrophages	Biochem Pharmacol.	188	114580	2021
Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D.	Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins	Cancer Sci.	112(6)	2185-2198	2021

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3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 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・部長
(氏名・フリガナ) 小川 久美子 ・ オガワ クミコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和3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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。