

食品衛生基準科学研究費補助金

(食品安全科学研究事業)

食品及び食品用容器包装に使用されるナノマテリアル等の

新規素材の安全性評価に関する研究

(23KA1011)

令和5-7年度 総合研究報告書

研究代表者 小川 久美子

令和8（2026）年 5月

目 次

I. 総合研究報告書

食品及び食品用容器包装に使用されるナノマテリアル等の新規素材の安全性評価に関する研究	----- 3
--	---------

小川 久美子

(資料)

表 1-1,

図 1-1~1-8, 2-1~2-13, 3-1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 53
--------------------	----------

食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）

令和 5-7 年度 総合研究報告書

食品及び食品用容器包装に使用されるナノマテリアル等の新規素材の
安全性評価に関する研究

研究代表者 小川久美子

星薬科大学 毒性学研究室 教授

研究要旨

二酸化チタン (TiO_2) は医薬品添加剤、食品や化粧品など多様な用途で用いられているが、ナノ粒子（少なくとも一次元が 100 nm 未満の粒子）を含む TiO_2 は EU において食品添加物としての使用が禁止されるなど、安全性が議論されている。そこで本研究では結晶子径の異なる TiO_2 を用いて、毒性影響および生体内動態について検討を行った。90 日間反復経口投与後に 8 週間の回復期間を置き、生体内に取り込まれた TiO_2 の排出性を検討した。その結果、90 日間の投与終了時および 8 週間休薬後のいずれの時点においても、全ての TiO_2 投与群で肝臓および全血中チタン量の増加は見られなかったことから、以前の実験で 180 nm 群に見られた肝臓中チタン濃度の増加は一貫して観察され得る頑健な所見ではなく、経口投与された TiO_2 の全身移行は結晶子径に関わらず極めて限定的であると考えられた。これに対して、パイエル板においては 8 週間投与休止後においても観察した全ての個体で TiO_2 粒子が観察された。一方で、粒子沈着部位における IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ および γ -H2AX 等の免疫染色像は対照群と同様であり、長期間の TiO_2 粒子沈着に伴う過剰な免疫活性化や炎症誘発性 DNA 損傷を示す所見は見られなかった。これらの結果から、 TiO_2 は投与休止後も生体反応をほとんど誘導せずパイエル板に残存する一方で、肝臓および全身循環への移行は限定的であることが示され、パイエル板は TiO_2 を隔離する生物学的障壁として機能すると考えられた。

また、ナノ酸化チタンの安全性評価に資する科学的データを蓄積することを目的として、経皮及び経口ばく露が食物アレルギーに与える影響をマウスモデルを用いて系統的に検討した。初年度の検討において、ナノ酸化チタンを経皮的にばく露したマウスでは、所属リンパ節に局在する抗原提示細胞のサブポピュレーションに変化が生じる傾向を確認した。そこで、抗原を経口摂取した際に誘導される免疫寛容について、同時にナノ酸化チタンを経口ばく露した際の影響を検討したが、食物アレルギー症状を緩和する効果に有意な変化は認められなかった。また、ナノ酸化チタンの経口摂取が食物アレルギー症状を有為に増悪または抑制するものでなく、脾臓や所属リンパ節に局在するバルクの免疫細胞集団に対して顕著な影響を与えないことを確認した。これらの結果から、ナノ酸化チタンを経口摂取した際食物アレルギーに対する効果としては、現時点では食品安全上の懸念を示すレベルでないと考えられた。一方で、検討の際、一部のアナフィラキシー応答を抑制する傾向を認め、軽微ながら注目すべき所見も得られた。ナノ酸化チタンは経皮ばく露によりアジュバント作用を示すことから、免疫系に及ぼす影響については、引き続きモデルマウス等を用いて詳細な科学的知見の集積が不可欠であると考えられた。

さらに本研究では、食品関連分野における NMs 等の新規素材の毒性試験法に関する国際動向を調査し、適切な評価法の提案や試験上の考慮事項を整理することを目的とした。3 年間

の計画を通して、初期評価的観点から欧州食品安全機関（EFSA）の「Nano-RAに関するガイダンス（2021年）」を中心に調査を進め、令和5年度は遺伝毒性と酸化ストレス、令和6年度は免疫毒性に焦点を当て、各領域の試験法や評価手法の現状を精査した。最終年度である令和7年度は、同ガイダンスに基づく全身毒性（ADME、反復投与毒性、生殖発生毒性等）の評価手法について整理を行うとともに、2025年6月開催のEFSAワークショップやOECDナノマテリアル作業部会（WPMN）における最新の議論を調査した。

研究分担者

赤木純一・国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター病理部 主任研究官

爲廣紀正・国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長

安達玲子・国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長

大野彰子・国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センターゲノム安全科学部 主任研究官

研究協力者

田口 千恵・国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官

A. 研究目的

ナノマテリアル等の新規素材は、様々な用途での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。また、我々の実験動物を用いたナノ銀の先行研究でもサイズによって暴露後の生体反応が異なることが明らかとなった (Cho et al, J Toxicol Pathol. 2018)。近年、欧州食品安全機関の意見書に基づき、欧州委員会は酸化チタン(E171)の食品への添加を禁止した。しかし、酸化チタンは食品添加物のみならず様々な用途で用いられており、一律の禁止措置によって混乱が生じている。

本研究では、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、安全性評価方法及び評価データ、並びに関連する国際動向情報を蓄積し、適切な毒性

評価法の提案及び特性に応じた試験上の考慮事項等の整理を目的とした。

我々のこれまでの研究で、結晶子径 6 nm のアナターゼ型二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子（二次粒子のメジアン径約 200 nm）をラットに 90 日間反復経口投与試験したところ、投与に伴う有害影響は見られなかった一方で、凝集した TiO₂ 粒子の沈着が小腸パイエル板に認められたことから、経口摂取された TiO₂ が消化管から生体内に取り込まれることが示唆された (Akagi et al, Part Fibre Toxicol. 2023)。そこで本研究では結晶子径の異なる TiO₂ 粒子の生体内への取り込みと毒性影響を検討し、粒子径による生体影響の違いを明らかにすることを目的とする。令和7年度は、異なる結晶子径を持つ TiO₂ 粒子の消化管を介した組織への沈着について、13 週間の投与直後と、8 週間の投与休止後の TiO₂ 粒子の残存について量的・質的検討を行うとともに、免疫染色により免疫系の活性化シグナルの変動の有無について検討した。

また、酸化チタンは着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・食品用容器包装に使用されているほか、多くの日焼け止め製品に配合されており、ばく露経路は経口に加え、経皮からの頻度も高い。ナノ酸化チタン経皮ばく露の影響に関しては、皮膚透過性試験や皮膚感作性試験等が行われているが、いずれも明確な毒性作用は認められていない。他方、本課題の先行研究では、ナノ酸化チタンが食物アレルギーの経皮感作時に与える影響について検討し、粒子径 6 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタン

がモデル動物における抗原感作を増強すること、また、食物アレルギーモデルにおいて抗原摂食時にナノ酸化チタンが共存した場合、アレルギー症状が増強される可能性があること等を示している。

そこで、本分担課題では、安全性評価に資するデータの蓄積を目的とし、ナノ酸化チタン等が、経皮・経口ばく露による免疫系への影響を系統的に検討した。まず令和5年は、結晶型や粒子径の異なるナノ酸化チタンの安全性について初代培養細胞を用いて検証するとともに、食物アレルギーモデルマウスにナノ酸化チタンを経皮ばく露し、免疫毒性関連パラメータの変動を検討した。続いて令和6年度は、ナノ酸化チタンをOVA抗原と共に経口ばく露し、免疫寛容に与える影響を検討した。そして令和7年度には、ナノ酸化チタンを食物アレルギーモデルマウスに経口ばく露し、抗原惹起後のアレルギー症状に与える影響を検討した。

さらに、近年のテクノロジーの急速な進展に伴い、ナノマテリアル（以下、NMs）を活用した新規素材が食品・飼料分野や物質材料分野で広く受け入れられ新たな応用が期待されている。一方で、その健康影響やリスク管理に関する懸念が増大しているものの、毒性学的評価などの科学的知見は依然として不足している。欧州食品安全機関（EFSA）は科学的知識向上のためのリスク評価ガイダンス（2021年）を提供しており、本ガイダンスでは物理化学的特性や測定技術、複雑なマトリックス中での決定法に加え、段階的な毒性試験フレームワークが詳述されている。本研究は、食品関連分野で使用・混入の可能性があるNMs等の新規素材に関し、安全性評価の国際動向調査および試験法の体系化を目的とした。3年間の取り組みとして、令和5年度は初期評価的観点から遺伝毒性と酸化ストレ

スに焦点を当てて整理し、令和6年度は遺伝毒性を中心にさらなる情報収集を行った。最終の令和7年度は「全身毒性」へと対象を拡張し、EFSA等に基づく国際的な安全基準や *in vitro* / *in vivo* 試験法に関する動向を調査・整理することで、国内の評価基盤構築に資する知見を収集した。

B. 研究方法

B1. ナノ酸化チタン等ナノマテリアルの経口反復投与毒性と体内動態解析

B1-1. 電子顕微鏡による二次粒径解析

透過電子顕微鏡（TEM）によるTiO₂粒子の粒度分析は日本電子株式会社（東京）に委託して実施した。測定試料は投与液と同一の条件（それぞれのTiO₂粉末3gに分散剤として0.2%炭酸水素二ナトリウム29.5mLを添加後10秒間ボルテックスで攪拌）で調製した溶液を、フォルムバル膜を展開したTEMグリッドに分散して作成した。TEM観察はJEM-2100F（日本電子）を用いて加速電圧200kVで実施し、円相当径 = $2 \times \sqrt{\text{測定面積} / \text{円周率}}$ として粒径を算出した。

B1-2. 生体内に取り込まれたTiO₂の排出性検討のための反復経口投与

5週齢のF344/DuCrjラット雄40匹をジャクソン・ラボラトリー・ジャパンより購入し、基礎飼料（CRF-1；オリエンタル酵母工業、東京）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℃、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、東京）を敷いたポリカーボネート製箱型ケージに2または3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各群の平均体重の標準偏差が最小になるように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。

被験物質として、結晶子径6、30、180 nmのTiO₂を1000 mg/kg 体重/日の用量で13週間強制経口投与した。投与は、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：2.4 mm、フチガミ器械、向日）を用いて0.2%リン酸水素二ナトリウムに懸濁したTiO₂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。投与90日目に各群5匹を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。残りの5匹は8週間の投与休止を行った後、同様に剖検した。

B1-3. 透過型電子顕微鏡（TEM）によるパリエル板中TiO₂粒子の観察

0.2%炭酸水素二ナトリウム（DSP）に懸濁した6、30、180 nmのTiO₂を90日間反復経口投与したラット小腸（パリエル板を含む）のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）ブロックから3 μm厚の未染色標本を薄切し、脱パラフィン後に2%四酸化オスmium水溶液で後固定した。エタノール脱水後、EPON812を用いて熱重合によりエポキシ樹脂に包埋し、ウルトラミクロトームにより80~90 nm厚に超薄切し、酢酸ウラニル／鉛染色液により電子染色を行った。作成した超薄切片をグリッドに載せ、HITACHI H-7600 透過型電子顕微鏡を用い

て加速電圧100 kV 電圧で透過電子顕微鏡観察を行った。

B1-4. レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析法（LA-ICP-MS）によるパリエル板のチタン量イメージング

パリエル板を含む小腸FFPEブロックから10 μm厚の切片を薄切し、ESL213 レーザーアブレーション装置（ESI）を用いてチタン元素のイメージング質量分析を行った。波長213 nm（Nd-YAG レーザー）、レーザー出力8%（1.2 J/cm²）、キャリアガスAr、繰り返し周波数10 Hz、XY ステージ速度25 μm/sec、スポットサイズ25 μmのライン測定で1000 μm 角程度の範囲を測定した。ICP 質量分析は7900 四重極 ICP-MS（Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States）を使用し、⁴²Ti（存在率7.44%）の質量数を測定した。検量線はLA-ICP-MS 用標準物質 Solid scale（富士フイルム和光純薬、大阪）を使用して10、50、100、300 ppmの検量線を作成した。

B1-5. 免疫染色

肝臓および小腸の免疫染色では、pH 6.8のクエン酸ナトリウム緩衝液（Daco）中でオートクレーブ（121°C、15分）により抗原の賦活化を行なった。その後3%過酸化水素水を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させ、10%ヤギ血清（γ-H2AX、TNF-α、およびIFN-γ）または10%ウサギ血清（IL-1β）を用いて室温で30分間ブロッキングした。一次抗体としてγ-H2AX（Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA）：1000倍希釈、IL-1β（Abcam, Cambridge, UK）：500倍希釈、IL-18（R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）：500倍希釈、TNFα（Abcam）：200倍希釈、IFN-γ（R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）：

200 倍希釈を 4°C で一晩反応させ、適切な動物種のアナライジングプライマーを二次抗体として用い、3,3'-diaminobenzidine 化学発色により検出した。

B1-6. レーザーマイクロダイセクションによるパイエル板の RNA シーケンス解析

各群 3 匹のパイエル板を含む小腸 FFPE ブロックから 10 μ m 厚で 5 枚の連続切片を薄切し、PEN-メンブランスライド (Leica, Wetzlar, Germany) に貼り付けて 37°C で一晩乾燥させた。レーザーによる RNA の損失を最小限に抑えるため、LMD6 (Leica) によりパイエル板の全周をレーザーでマーキングした後、26 ゲージ注射針 (テルモ、東京) を用いて実体顕微鏡下でパイエル板部位を摘出した。Deparaffinization Solution (Qiagen, Venlo, the Netherlands) で脱パラフィン化した後、RNeasy FFPE kit (Qiagen) で RNA を抽出した。RNA の品質は Agilent TapeStation を用いて評価した。得られた Total RNA を材料とし、SMART-Seq Stranded Kit および SMARTer RNA Unique Dual Index Kit (タカラバイオ) を用いて以下の通りライブラリー作成を行った。ランダムプライマーを用いて cDNA を合成し、SMART (Switching Mechanism At 5' End of RNA Template) 法により 1st strand cDNA の末端に特定の配列を付与した。続いて、その特定配列に対応する検体ごとに異なるタグ配列を有する Index 付きのプライマーを用いて PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物を、AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, United States) を用いた磁気ビーズ法にて精製し、scZapR と scR-Probe によりリボソーム cDNA の切断を行なった。最後に、アダプターを認識するプライマーを使用して未切断 cDNA を PCR 増幅し、シ

ーケンスライブラリーを構築した。ライブラリーの品質評価を Agilent TapeStation を用いて実施したところ、30 nm 群の 1 検体においてライブラリー濃度が 1.3 nmol/L と低く、シーケンス解析に不適格と判断し、除外した。残る 11 検体について NovaSeq 6000 を用いて 150 塩基長のペアエンドリードによるシーケンス解析を実施した。RNA シーケンスのリードマッピングには、参照ゲノム配列として *Rattus norvegicus* (ラット) の mRatBN7.2 アセンブリに基づく配列 (mRatBN7.2.dna.toplevel.fa) および対応する遺伝子定義ファイル (mRatBN7.2.107.gtf.gz) を使用し、DRAGEN Bio-IT Platform を用いて遺伝子発現量解析を行った。

B1-7. 肝臓中のチタン濃度測定

肝臓、および全血中の 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た Ultra WAVE 電子レンジ (マイルストーンゼネラル、川崎) 消化を行った。チタンの汚染リスクを低下させるため分解液を PFA 製ビーカーに移し替えて濃縮を行い、その後 PP 製定容容器に移し替えを行なった。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 (0.1 mL/min) + He (10 mL/min)、内部標準: ¹⁰³Rh、ICP-MS 分析の対象元素は ⁴⁷Ti¹⁶O⁺であった。

B1-8. 統計学的処理

肝臓および全血中チタン濃度については Dunnett 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

より統計的有意差を判定した。統計解析には GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, United States) 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放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。

B2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

B2-1. ナノ酸化チタンのマウス初代培養細胞に与える影響に関する検討

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 B (粒子径 35 nm・ルチル型)、酸化チタン C (粒子径 6 nm・アナターゼ型) [A-C ともに表面未処理] を使用した。酸化チタンは、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 25 G 注射針付きのシリンジを用いて攪拌し均一化した。

B6 マウスの脾臓細胞から CD25^{hi}CD44^{low} の CD4 陽性ナイーブ T 細胞をセルソーター (SONY SH800) を用いて分離した。ソーティングにより得られたナイーブ T 細胞は、IL-6 及び TGF- β 共存下において抗 CD3 抗体ならびに抗 CD28 抗体を処理し、3 日間培養後、T_H17 細胞への分化について FACS により解析した。1 群の匹数は 3 匹とした。

B2-2. ナノ酸化チタン C (粒子径 6nm) の経皮ばく露による免疫細胞への影響に関する検討

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 TNF- α 、IL-6、IL-10 の定量は、Mouse Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。その他の試薬は特級グレードのものをを用いた

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)。この時、ナノ酸化チタン投与群では、125 μ g / 50 μ L あるいは 125 ng / 50 μ L となるよう添加・懸濁させて投与した。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。Day 1, 25 には部分採血し、Day 27 に OVA 50 mg を経口投与してアレルギー反応を惹起した。惹起 60 分間後にマウスの脾臓ならびにリンパ節を回収し、リンパ組織での免疫担当細胞の量的変動について FACS を用いて解析した。

B2-3. ナノ酸化チタンの免疫寛容に与える影響に関する検討

7 週齢の雌性 BALB/c マウスを用い、1 群の匹数は 5 匹とした。投与スケジュールを

図 2-4 に示す。8 週齢時にゾンデを用いて OVA 抗原溶液の経口投与を開始(Day -7)した。9 週齢マウスの背面片側を剃毛し(Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (4 $\mu\text{g}/50\text{ }\mu\text{L}$) 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」を用い、パッド部に 50 μL の抗原液を浸潤させて貼付した。不織布製のジャケットを装着してパッチを保護し、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。Day-7 に部分採血し、Day 29 に OVA 50 mg を経口投与してアレルギー反応を惹起した。惹起 30 分間後にマウスの脾臓ならびにリンパ節を回収し、リンパ組織に局在する免疫細胞について FACS を用いて解析した。

B2-4. ナノ酸化チタンの食物アレルギーに及ぼす影響に関する検討

7 週齢の雌性 BALB/c マウスを用い、1 群の匹数は 6 匹とした。投与スケジュールを図 2-8 に示す。8 週齢時にゾンデを用いてナノ酸化チタンの経口投与を開始(Day -7)した。9 週齢マウスの背面片側を剃毛し(Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (2-4 $\mu\text{g}/50\text{ }\mu\text{L}$) 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」を用い、パッド部に 50 μL の抗原液を浸潤させて貼付した。不織布製のジャケットを装着してパッチを保護し、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。Day-7 に部分採血し、Day 29 に OVA 50 mg を経口投与してアレルギー反応を惹起した。惹起 30 分間後にマウスの脾臓ならびにリンパ節を回収し、リンパ組織に局在する免疫細胞について FACS を用いて解析

した。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計した。コントロール群 (V 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。

B3. ナノマテリアルを含む新規素材の毒性試験法に関する国際動向調査

初期評価的観点から欧州食品分野における NMs の試験法や評価手法に関する情報収集を進めるため、EFSA が 2021 年 7 月に発行した「Nano-RA に関するガイダンス」の記載内容を中心に調査・整理を実施した。各年度の対象として、令和 5 年度は「遺伝毒性」および「酸化ストレス」、令和 6 年度は「免疫毒性」、令和 7 年度は ADME、反復投与毒性、生殖発生毒性等を含む「全身毒性」の評価手法を網羅的に追跡した。さらに令和 7 年度には、国際的な最新動向を正確に把握するため、2025 年 6 月開催の EFSA ワークショップでの議論や、同月の OECD ナノマテリアル作業部会における情報収集を併せて実施した。

(倫理面への配慮) 特になし

C. 研究結果

C1. ナノ酸化チタン等ナノマテリアルの経

口反復投与毒性と体内動態解析

C1-1. 電子顕微鏡による二次粒径解析

正確な粒径分布を得るため、透過型電子顕微鏡による粒度分布解析を実施した。検出された最小の粒子サイズは6 nmと30 nmでは25.3 nm、180 nmでは50.5 nmであり、動的光散乱法（DLS）による粒径解析で検出されたよりも小さいサイズの粒子の存在が確認された（図 1-1）。二次粒子のメジアン径は6 nm < 180 nm < 30 nmの順で、それぞれ178.4 nm、252.3 nm、および362.1 nmであり、ナノ粒子（> 100 nm）の割合はそれぞれ23.4%、10.1%、および9.82%であった。

C1-2. 異なる結晶子径の酸化チタンの90日間反復経口投与後の8週間投与休止による生体内に取り込まれた酸化チタンの排出性の検討

90日間の強制経口投与期間、およびその後の8週間の投与休止期間において、体重及び摂餌量の変動は見られなかった（図 1-2）。90日間強制経口投与直後、および8週間の投与休止後の小腸パイエル板におけるTiO₂粒子の沈着を光学顕微鏡下で検討したところ、8週間投与休止後においても、パイエル板にTiO₂粒子が観察され、その程度は90日間投与直後と同程度であった（図 1-3）。

C1-3. TEMによるパイエル板中TiO₂粒子の観察

ラットに投与した6、30、180 nmのTiO₂の二次粒子のメジアン径はそれぞれ178、362、252 nmであり、大半の粒子が光学顕微鏡で観察不可能な数百 nm以下の粒子径であったことから（図 1-1）、ナノサイズのTiO₂粒子の局在を観察するため、パラフィン包埋小腸組織標本の戻し電顕法により

パイエル板をTEM観察した。その結果、パイエル板において細胞内にTiO₂粒子の存在が確認できた（図 1-4）。

C1-4. LA-ICP-MSによるパイエル板のチタン量イメージング

パイエル板のチタン量をイメージング質量分析したところ、対照群においても局所的にチタンが検出されたが、投与群においてはHE染色した連続切片でTiO₂粒子が光学顕微鏡下で見られない領域であってもパイエル板領域全体にわたってチタンのシグナルの分布が見られた（図 1-5）。

C1-5. パイエル板における活性化マクロファージの指標としてのサイトカインの免疫染色

パイエル板に沈着したTiO₂アグロメレートの一部ではマクロファージに貪食された像が見られたことから（図 1-2）、マクロファージマーカーとしてCD68、マクロファージ関連サイトカインとしてIL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ の発現を免疫染色により検討した。その結果、粒子の局在とCD68免疫染色像の共局在が見られたが、いずれの群においてもこれらのサイトカインの亢進は見られなかった。また、DNA鎖切断マーカーである γ -H2AXの誘導も見られなかった（図 1-6）。

C1-6. パイエル板の網羅的遺伝子発現解析

レーザーマイクロダイセクションによりパイエル板領域のみを切り出し、RNAを抽出してRNAシーケンスにより遺伝子発現を解析した（図 1-7A）。各群3匹の検体について解析したところ、30 nm群の1検体はライブラリの品質チェックを通らなかったため結果から除外した。クラスタリング解析の結果、いずれの群でもクラス

ター形成は見られなかった (図 1-7B, C)。発現変動遺伝子解析では、6 nm 群と 30 nm 群で少数の遺伝子の発現変動が見られたが、180 nm 群では全く見られなかった (図 1-7D)。6 nm 群では一部のケモカイン (*Ccl6*, *Ccl20*) の発現増加が見られ、Gene Ontology 解析でケモカイン関連の変動が示唆されたが、それらの経路に関わる因子 (*Il-13*, *Il-17* など) の発現変動は見られなかった (図 1-7E)。TiO₂ 投与群に共通する発現変動遺伝子を調べたところ、6 nm 群と 30 nm 群で共通して変動が見られた遺伝子は 2 遺伝子の発現増加のみであった。また、TiO₂ 投与群全体で発現変動が見られた遺伝子は 1 遺伝子の低下のみであった。

C1-7. 投与休止前後における肝臓および全血中のチタン濃度定量による全身循環移行の検討

生体内に取り込まれた TiO₂ の全身循環への移行を検討するため、肝臓及び全血のチタン濃度を測定した。その結果、90 日間投与直後、および 8 週間投与休止後のいずれにおいても投与に伴うチタン量の増加は見られなかった (図 1-8)。

C2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

C2-1. ナノ酸化チタンのマウス初代培養細胞に与える影響に関する検討

CD4⁺T 細胞は獲得免疫に関する生体防御機構において中心的な役割を担っている。そこでナノ酸化チタンの CD4⁺T 細胞の分化に対する影響について検討した。被験物質として、酸化チタン A (粒子径 15 nm・ルチル型)、酸化チタン B (粒子径 35 nm・ルチル型) 及び酸化チタン C (粒子径 6 nm・アナターゼ型) の 3 種を用い、T_H17 細胞への分化について検討したところ、いずれの

形状のナノ酸化チタンも影響は認められなかった。(図 2-1) また、T_H1、T_H2、制御性 T 細胞 (Treg) への分化についてもナノ酸化チタン C による影響は認められなかった。(データ未記載)

C2-2. ナノ酸化チタン C (粒子径 6nm) の経皮ばく露による免疫細胞への影響に関する検討

抗原経皮感作系を用いた、アレルゲン感作時におけるナノ酸化チタンの影響に関する先行研究において、粒子径 6 nm・アナターゼ型及び粒子径 15 nm・アナターゼ型並びに粒子径 15 nm・ルチル型のナノ酸化チタンが感作を増強すること、粒子径 30 nm 以上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ている。そこで、抗原経皮感作時に最も低濃度でアジュバント活性が認められた酸化チタン C (粒子径 6 nm・アナターゼ型) を被験物質として、抗原感作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。実験全体のスケジュールは図 2-2 に示す。1 群 5 匹とし、経口投与時に酸化チタン C を共存させる群を 125 µg と 125 ng の二群に設定した。図 2-3 に所属リンパ節における免疫細胞への影響に関する解析結果を示す。リンパ節を構成している主要細胞である B 細胞や T 細胞については特に影響は認められず、好中球や好塩基球及びマスト細胞については、ナノ酸化チタンによるアジュバント活性と用量相関を示す影響は認められなかった。一方、CD11b^{low} 樹状細胞やマクロファージは 125 ng のナノ酸化チタン C 処理により増加する傾向が認められた。これらの結果から、粒子径 6 nm のナノ酸化チタン C が経皮を介して体内に侵入し、抗原感作を増強させるアジュバント活性を示す際、所属リンパ節において樹状細胞やマクロフ

アージが増加している可能性が示唆された。

C2-3. ナノ酸化チタンの免疫寛容に与える影響に関する検討

ナノ酸化チタン C を経口から摂取した際の免疫系へ与える影響として、免疫寛容について検討した。実験全体のスケジュールを図 2-4 に示す。1 群 5 匹とし、コントロール群 (V 群)、OVA を経皮感作した OVA 群、ナノ酸化チタン C を経口投与し OVA を経皮感作した C 群、経口免疫寛容を誘導し OVA を経皮感作した OT 群、そして経口免疫寛容誘導時にナノ酸化チタン C を共存させ OVA を経皮感作した OT+C 群の 5 群を設定した。4 週間に渡って OVA の経皮感作を続け、その後、抗原の i.p.によりアナフィラキシー (能動的全身性アナフィラキシー) 反応の惹起を行った。惹起後 30 分間、アナフィラキシー症状のスコアリング及び直腸内体温の測定を行った。結果を図 2-5 から図 2-7 に示す。図 2-5 は、惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果を示す。OVA 群は V 群と比較してスコアが大きく増加した。このスコアの変動は、C 群でも同等レベルであった。また、OT 群においても、スコアの変動に影響は認められなかった。図 2-6 は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。A は経時的な体温変化を、B は変化の最大をグラフにしている。抗原惹起 30 分後、OVA 群では V 群と比較して直腸温が平均 4℃低下していた。C 群では、OVA 群と比較して体温低下が抑制される傾向が認められた。また、OT 群でも体温低下の抑制が確認された。一方で、OT+C 群においては、OT 群との間に変化が認められなかった。これらの結果から、ナノ酸化チタン C の経口摂取によって経口免疫寛容による食物アレルギー症状の抑制には変化が認められないことが明らかとなっ

た。

図 2-7 に脾臓 (SPL) や腸間膜リンパ節 (mLN) に局在する免疫細胞への影響に関する解析結果を示す。CD11b や CD11c 陽性の単球やマクロファージ、B 細胞、マスト細胞については群間で有意に増減した細胞集団は認められなかった。さらに、Treg 等の CD4T 細胞サブポピュレーションについても変動は認められなかったが、抗原刺激により IL-4 や IL-17 を産生する CD4⁺T 細胞がナノ酸化チタン C の処理によって影響を受ける可能性が確認された。(データ未記載)

C2-4. ナノ酸化チタンの食物アレルギーに及ぼす影響に関する検討

ナノ酸化チタン C を対象として、経口から摂取した際食物アレルギー症状に与える影響について検討した。実験全体のスケジュールを図 2-8 に示す。

各群は 1 群 6 匹とし、コントロール群 (V 群)、OVA を経皮感作した OVA 群、そしてナノ酸化チタン C を段階的な濃度で経口投与し OVA を経皮感作した C 群 (1-3 濃度: 3 試験) の 3-5 群を設定した。4 週間に渡って OVA の経皮感作を継続した後、OVA 抗原を腹腔投与 (i.p.) してアナフィラキシー (能動的全身性アナフィラキシー) 反応を惹起した。惹起後 30 分にわたり、アナフィラキシー症状のスコアリング及び直腸内体温の測定を行った。なお、感作の確認を目的として、血中抗体価を測定した。実施した 3 試験のうち、ナノ酸化チタンの投与濃度を 2 群に設定した典型例の結果を図 2-9 から図 2-13 に示す。OVA の経皮感作を施したマウスでは、血中の総 IgE 値の上昇とともに、OVA 特異的 IgE や OVA 特異的 IgG1 の値が V 群と比較して有為に増加した (図 2-9)。また、C 群では、OVA 群よりもさらに OVA 特異的 IgE が増加する傾向が示された。ア

ナフィラキシー症状のスコアリングの結果（図 2-10）、OVA 群は V 群と比較してアナフィラキシースコアが高く、OVA アレルギー症状を呈していることを確認した。C 群でも OVA 群と同等レベルのスコアの変動が認められ、酸化チタンの経口ばく露の有無による影響は確認されなかった。図 2-11 は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化として、A は経時的な体温変化、B は変化の最大値を示している。抗原惹起 30 分後、OVA 群は V 群と比較して直腸温が平均 3.4 °C 低下していた。C_{20mg} 群では、V 群と比較して直腸温が平均 2.5 °C 低下しており、OVA 群に比べ体温の低下が 0.9 °C 程度抑制される傾向を認めた。また、C_{6.7mg} 群でも、V 群比で平均 3.0 °C の直腸温の低下を示し、OVA 群の体温低下が 0.4 °C 程度抑制される傾向を認めた。異なる実験においても同様の効果が再現よく確認されており、ナノ酸化チタン C には濃度依存的に食物アレルギー症状を緩和する傾向があると示唆された。以上の結果から、ナノ酸化チタン C の経口摂取によって、軽微ながら食物アレルギー症状を抑制する可能性が示唆された。

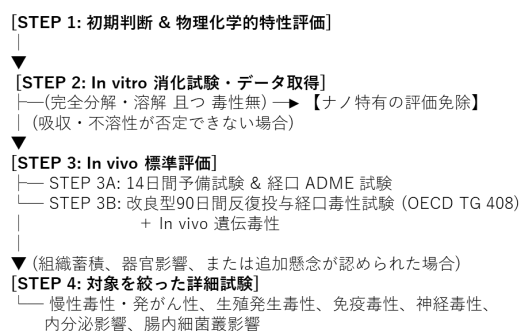
図 2-12 と図 2-13 に脾臓（SPL）や腸間膜リンパ節（mLN）に局在する免疫細胞への影響に関する解析結果を示す。脾細胞については、CD11b および CD11c 陽性の単球（図 2-12A）、マクロファージ、B 細胞、マスト細胞等（図 2-12B）のいずれの細胞においても、群間で有意な増減を示す細胞集団は認められなかった。また、図 2-13 に示すように、mLN における B 細胞集団や T 細胞集団にも有意な変動は認められず、IgE 産生 B 細胞や抗原刺激により IL-4 を産生する CD4⁺T 細胞においても、ナノ酸化チタン C 投与による影響は観察されなかった。一方、IL-17 を産生する CD4⁺T 細胞については、C 群において有為に増加する

ことが確認された。これらの結果から、粒子径 6 nm のナノ酸化チタン C を消化管経路でばく露した場合において、免疫細胞集団全体に対する有意な影響は確認できないが、一部の特定細胞集団に対し影響を与える可能性が示唆された。

C3. ナノマテリアルを含む新規素材の毒性試験法に関する国際動向調査

C3-1. EFSA ナノガイダンスにおける段階的リスク評価（段階的評価）スキームの全体像

欧州食品安全機関（EFSA）のナノガイダンスにおける健康影響評価の基本的なフレームワークは、NMs の物理化学的性状をすべての基盤とし、粒子の大きさや消化管内での動的な挙動（溶解・分解性）を科学的に解析し、消化管からの吸収性を完全に否定できない場合は、例外なく全身影響を評価することを基本とする。評価フローは、以下に示す 4 つのステップ（STEP 1 から STEP 4）に厳格に分かれており、各ステップの評価結果（トリガー）に従って順次、次段階へと進む体系的な意思決定スキームが敷かれていた（図 3-1）。



C3-1.1. 各ステップの定義と機能

STEP 1：ナノ特有の評価を必要とする材料の同定と物理化学配置評価

初期判断として、被験物質の化学組成、粒子径、形状、比表面積、表面改質、および分散安定性等の物理化学的特性を徹底的に精査し、次ステップ以降の NMs 特有の評価スキームに進むべきか否かを科学的に判断するステップであった。

STEP 2 : *In vitro* 消化試験 (STEP 2A: 既存情報のレビュー、STEP 2B: *in vitro* データの新規取得)

既存の特性・毒性データをレビューし、必要に応じてリソソーム環境や消化管シミュレーション下での *in vitro* 試験データを新規取得した上で、STEP 3 (*in vivo* 試験) の実施要否を判断するステップであった。大半のケースで STEP 3 への移行が必要と予想されるが、「*in vitro* 試験で毒性影響が認められない」かつ「*in vitro* 分解・溶解速度が非常に速く、完全に分子またはイオン化する」という極めて限定的な条件を満たす場合は、例外的に *in vivo* 試験が免除される場合がある（ただし、EFSA による個別の科学的・客観的判断に基づく）。

STEP 3 : *In vivo* 標準評価 (STEP 3A: *in vivo* 予備試験・経口 ADME 試験、STEP 3B: *in vivo* 試験)

14 日間の予備試験および TK 評価 (STEP 3A) を実施した後、主要なハザード特定のために、ADME サテライト群を組み込んだ改良型 90 日間反復投与経口毒性試験

(OECD TG 408) を課し、必要に応じて *in vivo* 遺伝毒性試験を追加するステップであった (STEP 3B)。ADME、反復投与毒性、生殖発生毒性等を含む広義の「全身毒性」評価の出発点は、この STEP 3 以降に厳格に位置づけられていた。

STEP 4 : 対象を絞った詳細試験

STEP 3 までの試験結果（組織への顕著な蓄積、特定の臓器における毒性学的変化、またはクリアランスの遅延など）から、さらに詳細な検証必要と判断された場合の最上位ステップであった。TK 試験（ヒト試験を含む）、生殖発生毒性（発達免疫毒性・発達神経毒性を含む）、詳細な免疫毒性、神経毒性、変異原性、発がん性、内分泌攪乱作用、および腸内細菌叢（マイクロバイオーム）への影響など、個別ターゲットを絞った詳細な高次毒性試験へと移行する。

2. 遺伝毒性試験の評価手法 (*in vitro* および *in vivo*)

「Nano-RA に関するガイダンス」において、遺伝毒性評価はハザード特定における最重要項目の 1 つとして位置づけられていた。適切な *in vitro* 遺伝毒性試験のバッテリー（一連の試験やテストのセット）を選択する際は、3 つの重要な遺伝毒性エンドポイント、すなわち「遺伝子変異」、「構造的染色体異常」、および「数的染色体異常」を完全にカバーする必要がある、各々についてナノ特異的な推奨事項および留意点が説明されていた。

C3-2.1. *In vitro* 遺伝毒性試験

C3-2.1.1. 遺伝子変異の検出法における哺乳類細胞モデルへの転換

従来の化学物質評価で第一選択とされる「Ames 試験 [OECD TG 471]」について、専門家会議の結論に基づき、NMs の遺伝毒性を調べる方法としては「推奨されない」と結論づけられていた。これは、細菌細胞が哺乳類細胞と異なり、物質を細胞内に取り込む「内在化能力（エンドサイトーシス等）」を持たず、ナノ粒子が細菌の強固な細胞壁を透過できない可能性が高いた

めであった。この観点から、細胞内への取り込みを模倣できる哺乳類細胞モデルの使用がより適しているものと結論づけられていた。

従って、NMsの内在化能力の観点から、以下の2つの哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験が適切かつ推奨されると明記されていた。

- ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (Hprt) およびキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (xprt) を用いる哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験 [OECD TG 476]
- チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験 [OECD TG 490]

また、欧州の REACH 附属書 VIII の規定 (8.4.1 項) においても、ナノフォームに対して細菌を用いる試験が適切でない場合は実施する必要はないと述べられており、その代替として、哺乳類細胞における1つ以上の *in vitro* 変異原性試験を含む試験パッケージの提示が求められていた。

C3-2.1.2. 構造および数値的染色体異常に関する試験法 (*in vitro* 小核試験 [OECD TG 487])

染色体異常のエンドポイントに対しては、「哺乳類細胞を用いる *in vitro* 小核試験 [OECD TG 487]」が挙げられていた。本試験法を NMs に適用する際の重要な技術的留意点は以下の通りであった。

処理時間の延長： ナノ粒子の細胞核への浸透効率が低い可能性を考慮し、有糸分裂時の核膜溶解後に NMs が剥き出しの DNA と直接接触しやすくするため、少なくとも

1 細胞周期をカバーする長時間の処理が望ましいとされていた。

● サイトカラシン B の添加タイミング：

cytokinesis-block 法で用いられるサイトカラシン B は、エンドサイトーシスを阻害して NMs の細胞内取り込みを著しく減少させる能力がある。そのため、必ず NMs 処理を一定時間行った後の細胞培養物に対して、添加を遅らせる（後添加する）プロトコルを採用しなければならないと述べられていた。

- バックグラウンドレベルの管理：適切な感度を維持するため、使用する哺乳類細胞株の小核のバックグラウンドレベル（自然発生頻度）が2%と同等かそれ以下であることを事前に確認することが極めて重要であるとされていた。

● **ハイスループット検出法の導入と干渉問題：** 小核の目視観察は多大な時間を要するため、自動イメージングシステムやフローサイトメトリーを用いたハイスループット小核検出法の開発・適用が進んでいると述べられていた。ただし、光学的に活性な（蛍光や乱反射を持つ）NMs や、ナノ粒子の凝集体は、フローサイトメトリー解析において微小核と誤認されてフロースコアに干渉 (artifact) を引き起こすリスクがある。この点において、「ハイスループットイメージングシステム」を用いた画像解析法は、細胞の形態情報を保持したままスコアリングできるため、フローサイトメトリー特有の干渉問題を克服できる有効なアプローチであると考えられていた。

C3-2.1.3. 新しいアプローチや方法論

(NAMs) および代謝活性化システム (S9-mix) の取り扱い

機構解明 (MOA) を目的とした追加の *in vitro* 試験では、Pig-a テスト、トキシコ

ゲノミクス、組み換え細胞モデル、 γ H2AX (DNA 二本鎖切断マーカー)、高含有量分析 (High-Content Analysis) などの新しいアプローチや方法論 (NAMs) の使用が、証拠の重み付け (Weight-of-Evidence: WoE) アプローチにおいて考慮される場合があるとされていた。

一方、外因性代謝活性化システム (S9-mix) の使用については、ケースバイケースで慎重に評価する必要性が述べられていた。ほとんどの難溶性・不溶性無機 NMs は生体内で代謝変換を受けない。そのため、過剰な S9 タンパク質がナノ粒子表面に吸着してプロテインコロナを形成し、アッセイを物理的に妨害することで、NMs のバイオアベイラビリティ (細胞内取り込み効率) を不当に低下させる可能性が示唆されていた。ただし、有機 NMs や、有機官能基で表面コーティングされた一部の無機 NMs においては、代謝活性化システムの存在下で初めて遺伝毒性作用を発揮するケースがあるため、物質の性質に応じた判断が必要とされていた。

C3-2.2. *In vivo* 遺伝毒性試験

本ガイダンスでは、*in vitro* 試験の少なくとも 1 つの試験で遺伝毒性活性 (陽性または疑わしい結果) を示す場合、あるいは物理化学的特性から *in vitro* 試験の適用が適切でないと判断される場合には、*in vivo* 遺伝毒性試験の実施が必須とされていた。

in vivo 試験は、EFSA 遺伝毒性試験戦略に概説されているように、*in vitro* の結果や TK データ (標的組織への到達性) に応じて、段階的アプローチ (tiered approach) で実施されるべきであり、推奨される具体的な試験法として以下の 3 つが規定されていた。

1. *in vivo* 哺乳類赤血球小核試験 [OECD TG 474]
2. *in vivo* 哺乳類アルカリコメットアッセイ [OECD TG 489]
3. トランスジェニックげっ歯類の体細胞および生殖細胞を用いた遺伝子突然変異試験 [OECD TG 488]

in vivo 試験の実施に際しては、被験物質が「標的組織 (骨髄や肝臓など)」へ実際に曝露 (到達) していることを、TK や組織内分析によって実証することが必要不可欠とされていた。

コメットアッセイに関する特記事項

in vitro コメットアッセイは、現時点で完全には検証 (バリデーション) されていないものの、補完的な情報を提供するスクリーニング系として、NMs の遺伝毒性メカニズム (直接作用か間接作用か) の理解に貢献する可能性が述べられていた。特に、多くの NMs は細胞内で酸化ストレスや活性酸素 (ROS) の産生を惹起することが知られているため、酸化特異的な DNA 損傷 (8-oxodG 等) を感度よく検出できるよう、病変特異的リペア酵素 (Fpg や OGG1 など) を処理する「改良コメットアッセイ」の適用が強く推奨されていた。

一方、*in vivo* コメットアッセイ [OECD TG 489] を反復投与試験に組み込む際の重要な制限事項として、一般的な全身毒性試験の通常の解剖手順 (最終投与から 24 時間後など) スケジュールでは、NMs の血中・組織中濃度が最高値に達する時間 T_{max} での適切なサンプリングが不可能な場合が多い。そのため、適切なサンプリングタイムポイントを確保できない限り、サテライト群 (専用の別群) を使用しない通常の反復投与毒性試験の本群と安易に組み合わせて

はならない（サテライト群の設置が必要である）と述べられていた。

C3-3. 酸化ストレス評価の手法および国際指針

C3-3.1. 酸化ストレス評価の段階的アプローチ（段階的手法）

NMs は、そのバルク材料と比較して表面对体積比（比表面積）が極めて大きく、かつ表面に反応性の高い特異的な官能基や欠陥を有することが多いため、非ナノ材料に比べて化学的・生物学的反応性が高まる傾向にある。この高い反応性によって細胞内で活性酸素（ROS）の過剰生成が引き起こされ、生体組織における「酸化ストレス」の誘発、ひいては促進性のある炎症反応や二次的な細胞・遺伝子損傷へ繋がることが示唆されていた。

EFSA ナノガイダンス（STEP 2 および STEP 3 の移行判断段階）では、細胞毒性／細胞生存率、酸化ストレスの誘発、促進性のある炎症、および消化管バリア性障害を、初期の *in vitro* 試験エンドポイントに含めるべきであると定義していた。これらを体系的に評価するための戦略として、以下の3段階の段階的アプローチ（段階的評価例）が提案されていた。

- 第一段階（初期迅速アッセイ）：電子スピン共鳴法（ESR）や FRAS（Ferric Reducing Ability of Serum）アッセイ。細胞を用いない非細胞系（acellular）または迅速なファーストライン手法。ナノ粒子自体の固有の ROS 生成能や抗酸化能への影響をハイスループットに測定する。
- 第二段階（細胞ベースのスクリーニング）：蛍光性ジクロロフルオレセイン（DCF）アッセイ、および ELISA 法によ

るタンパク質のカルボニル化評価。DCF は適合性の高い細胞株を用いた一般的な ROS 検出系であるが、ナノ粒子自体の蛍光や吸着特性による干渉の限界に留意が必要。ELISA は酸化ストレスの感度の高い間接的な読み出しであり、定量的な結果が必要な場合に極めて有用。

- 第三段階（高次オミクス・高度分析）：質量分析（MS）等を用いたプロテオミクス、メタボロミクス。酸化修飾されたタンパク質の同定、細胞内反応経路（シグナルカスケード）、および経路パターンの包括的な特定。高精度なメカニズム解明が可能だが、時間とコストを要する。

C3-3.2. 酸化ストレス介在性毒性の一般原則

EFSA によるリスク再評価において、特定の難溶性無機ナノ粒子（例：酸化チタン等）が示す中枢神経系影響、海馬の神経新生抑制、樹状突起の伸長阻害、あるいはオートファジーの亢進やミトコンドリア機能の低下といった広範な有害作用の多くが、この酸化ストレスに起因する可能性が指摘されていた。

in vitro において活性酸素に由来する代表的な DNA 酸化損傷マーカー（8-oxodG 等）の有意な誘発が多く材料で観察されるが、細胞種（Caco-2 や肺細胞など）による応答の多様性が存在し、直接的な DNA 二本鎖切断の増加と必ずしも単純相関しない事例も報告されていた。*in vivo* の動物研究においては、組織局所における酸化ストレスの発生と、そこから派生する全身性有害影響（行動学的異常など）との間の詳細なシグナルカスケードの解明が、リスク評価における不確実性を減少させる鍵として議論されていた。

C3-4. 免疫毒性試験の評価手法

C3-4.1. 段階的リスク評価（STEP 1～STEP 4）における免疫毒性の位置づけ

NMs が免疫系に及ぼす影響は、バルク体とは異なる独特の作用機序（トロイの木馬効果など）を持つことから、ハザード評価の中心軸とすべき項目として定義されていた。EFSA ナノガイダンスにおける、免疫毒性評価の段階的な展開は以下の通り規定されていた。

- STEP 2 (*in vitro* スクリーニング) : 経口摂取を想定した初期の消化管モデルとして、単一のヒト大腸上皮細胞 (Caco-2) のみならず、免疫細胞 (マクロファージや樹状細胞) や粘液分泌細胞を組み合わせた「共培養モデル」の活用が例示されていた。特に、初代ヒト単球由来マクロファージやヒト単球系細胞株 (THP-1 など) を用いて、初期の炎症性応答を試験することの重要性が記述されていた。なお、市販の「全血サイトカイン放出キット」は、一般的な免疫刺激・免疫抑制反応を簡便にスクリーニングする目的には役立つものの、腸管組織に特異的な局所免疫反応 (腸管関連リンパ組織 : GALT) を再現する系としては、バリア機能を介さないため完全には適さないと評価されていた。
- STEP 3 (*in vivo* 標準評価) : 全身的な免疫調節作用、免疫組織への潜在的悪影響、および免疫細胞の増殖学的異常を包括的に同定・検知するため、90 日間の反復経口投与毒性試験 (NMs の評価用に各パラメータを適応・拡張した改訂型 OECD TG 408) を実施することが必須とされていた。
- STEP 4 (対象を絞った詳細試験) : STEP 3 までの TK や組織分布評価におい

て、NMs の免疫系組織 (脾臓、胸腺、リンパ節等) への蓄積が実証された場合、あるいは TG 408 で免疫関連パラメータに変調が認められた場合に、特殊な機能的・機構的免疫毒性試験を追加実施することが推奨されていた。この段階では、生殖発生毒性試験の枠組みである「拡張一世代生殖毒性試験 [OECD TG 443]」を適用することが可能であり、そのオプションパラメータには、次世代における影響を捉える「発達免疫毒性 (DIT)」の専門的エンドポイントが包含されていた。

また、ハザード評価の包括的な指針として、世界保健機関 (WHO) および国際化学物質安全性計画 (IPCS) が発刊した「環境保健クライテリア 244 (EHC 244)」の原則を参照し、証拠の重み付けアプローチを構築することが強く推奨されていた。

C3-4.2. 免疫毒性と遺伝毒性・アレルギー原性との相互関連性

C3-4.2.1. 遺伝毒性との関連性 (二次的遺伝毒性)

NMs が引き起こす遺伝損傷には、粒子が直接 DNA に接触して生じる一次的遺伝毒性のほかに、マクロファージや好中球などの免疫細胞が NMs を貪食した際に活性化し、過剰な炎症性メディエーター (サイトカイン、ケモカイン、ROS) を放出することに起因する「二次的な遺伝毒性 (炎症介在性 DNA 損傷)」メカニズムが存在する。本ガイダンスでは、この二次的遺伝毒性メカニズムは、単一の細胞系では検出不能であり、免疫細胞と上皮細胞の両方から構成される「共培養モデル」を用いた場合にのみ、*in vitro* において正確に検出・評価できることが紹介されていた。

C3-4.2.2. アレルギー原性との関連性 （「トロイの木馬」効果と評価原則）

ナノ粒子はその高い表面吸着能により、潜在的な免疫原性や抗原性を有する外部物質（タンパク質、ペプチド、環境化学物質など）を粒子表面に強固に結合（コロナ形成）させ、それらを破壊されることなく生体内の免疫細胞へと効率的に運び込む「トロイの木馬（Trojan horse）」として機能し、アレルギー反応を増幅・修飾する可能性が指摘されていた。

現時点において、経口曝露後に感受性の高い個体にアレルギー反応や感作を引き起こすリスクを単一の系で完全に予知・評価できる、検証済みの標準的な動物実験モデルは存在しないと説明されていた。そのため、NMs 自体が潜在的アレルゲンである場合、あるいは製造工程に由来する潜在のアレルゲン分子の残基を含む場合は、遺伝子組み換え作物（GMO）のアレルゲン性評価に関する EFSA ガイダンスの原則に準拠すべきであると提示されていた。アレルギー原性の決定に関する具体的アプローチとして、以下の多角的なアプローチを組み合わせ、最終的に証拠の重み付け（weight-of-evidence）アプローチによって決定的な証拠を導き出すことが強く推奨されていた。

- タンパク質またはペプチドの構造的側面の調査（一次配列・高次構造解析）
- *In silico*（バイオインフォマティクス）による既知アレルゲンとのホモロジー検索
- 免疫グロブリン E（IgE）結合能試験および細胞ベースのアッセイ（マスト細胞活性化試験など）
- 分析プロファイル技術（プロテオミクス等）および適切な動物モデルの適用

C3-4.3. OECD TG 408（90 日間反復投与毒性試験）における免疫毒性パラメータ

EFSA ナノガイダンスにおいて、改訂型 OECD TG 408 は、追加の機能試験へ進むべきか否かをスクリーニングするための極めて重要な位置づけに拠っていた。本試験において、免疫毒性または免疫調節効果を関知・予測するための必須パラメータとして、以下の項目が明記されていた。

- 明確な全身毒性（体重減少等）が認められない状況における、脾臓および胸腺の相対重量の有意な変化
- 免疫系の他の重要器官・組織（骨髄、各部リンパ節、小腸パイエル板など）における詳細な病理組織学的変化
- 臨床検査における血清総タンパク、アルブミン/グロブリン（A/G）比の変化
- 試験動物の血液学的プロファイル（総白血球数の増減、および白血球分画（好中球、リンパ球、単球など）の比率変化）これらのパラメータにおけるいかなる変動も、免疫系への潜在的影響のシグナルとして捉える必要があり、慢性毒性試験（OECD TG 452）や発がん性試験（OECD TG 451/453）へと拡張された場合にも、同様の厳格さで確認されるべき内容とされていた。

C3-4.4. 免疫毒性評価における一般的・科学的知見（EHC 244 等の包括指針）

NMs の毒性発現の主軸として「免疫反応の発現または誘発（炎症、免疫刺激、免疫抑制）」が強調されている。特に、NMs 曝露による局所の炎症反応が消失せず慢性化（慢性炎症）した場合、最終的に組織の線維化、あるいは各遠隔臓器の重篤な全身性健康障害へ至るカスケードが警告されていた。*in vitro* アッセイにおける細胞種の選

択に際しては、NMs の体内吸収、組織分布、移動性に関する既存の知見に基づき、かつ関連する生物学的培地中での「溶解率（dissolution rate）」や *in vitro* 吸収データを考慮して選択すべきであると述べられていた。さらに、*in vitro* で NMs の免疫毒性や炎症誘導性を正しく研究・評価する前の絶対的な必須条件として、製造や操作の過程で混入する可能性が高い「エンドトキシン（LPS）汚染」の有無を試験し、汚染がないことを証明することが不可欠であると説明されていた（エンドトキシン汚染は偽陽性の最大の原因となるため）。

EHC 244 等の国際指針では、NMs が免疫細胞や免疫系組織と物理的・生物学的に相互作用することにより、細胞毒性、酸化ストレス、炎症反応のほか、「補体活性化関連擬似アレルギー反応（CARPA）」、遺伝毒性、細胞代謝変化、および免疫細胞の異常増殖が惹起される可能性が包括的に提示されていた。ナノ材料曝露と関連する具体的な免疫毒性事象として、以下の主要カテゴリが定義されていた。

- 免疫抑制：免疫機能の低下に伴う、感染因子（病原体）に対する宿主の抵抗力の低下。
- 免疫の活性化：免疫系の過剰な感作に伴う、自己免疫疾患の発症リスクの増加。
- アレルギー疾患・化学物質過敏症：アトピー、食物アレルギー、および喘息の発症・増悪リスクの増加。
- 異常・未解決の炎症反応：慢性化した炎症による、標的組織や臓器の持続的損傷、機能不全、および全身疾患への進展。

C3-4.5. 規制評価における免疫毒性解釈の科学的原則

EFSA パネル等の規制審査において、特定の材料（例：ナノ銀など）は、一般的な肝・腎毒性が顕在化するよりもはるかに低い超低用量域において、脾臓 NK 細胞活性のほぼ完全な抑制や、胸腺重量の大幅な減少を来することが定量的（臨界効果用量：CED アプローチなど）に確認されており、免疫系が潜在的有害反応に対して極めて敏感な「最重要標的」になり得ることが実証されていた。一方で、他の無定形シリカや特定の粒子形態に関する *in vitro/in vivo* の膨大なデータ解釈において、規制当局は以下の厳格な判定原則を敷いていた。すなわち、例え *in vitro* でインフラマソームの活性化、リソソームの不安定化、あるいは各種サイトカイン（IL-1 β 等）の大量分泌がみられ、*in vivo* で経鼻等によりアジュバント効果や経口寛容の阻害が報告されていても、「実際の食品添加物としての摂取経路（経口）と全く異なる曝露データである場合」、「粒子のサイズや仕様が実際の市販品を代表していない場合」、あるいは「投与用量が消費者の現実的摂取量を何十～何百倍も超える極端な高用量である場合」には、食品添加物のリスク評価に対するそれらの研究の関連性は極めて低いと結論づけられていた。ハザードの有無のみに惑わされず、実際の曝露シナリオと科学的に厳格に突き合わせる「目利き」の重要性が、実務上の基本原則として徹底されていた。

C3-5.1. *in vivo* 試験における試験溶液の調製および投与の管理（ガイダンス 7.3.2 項）

NMs の *in vivo* 毒性試験においては、投与媒体中における粒子の物理化学的挙動の制御が再現性と科学的妥当性を担保する最大の関門として位置づけられていた。規定

されていた重要事項および管理要件は以下の4点である。

- **均一・安定な分散プロトコルの策定：**
液体分散後の迅速な二次凝集や沈降を防止するため、超音波破碎の出力・時間や分散剤の選定など、検証済みのプロトコルを確立することが求められていた。これは、消化管内での吸収を最大化させ、最悪の曝露シナリオにおける再現性を確保するために、高濃度の非凝集粒子を含む安定な分散液を調製することを目的としていた。
- **実際の曝露状況（現実的凝集レベル）との整合性：** 安全性評価は実際の消費者の曝露実態に即した条件下で実施する必要がある。したがって、飼料にNMsを混入する際の凝集レベルは、実際の食品中の凝集度と同等に制御することが求められていた。粉末を飼料へ直接混合することは過剰な凝集を招き、実際の曝露条件に適合しないため禁止され、一度液体懸濁液を調製した後に均一混合するプロセスが推奨されていた。
- **調製後の速やかな使用と器具への付着リスク：** 投与媒体中におけるNMsの安定性および粒子径分布は経時的に変化するため、分散液は調製後速やかに使用しなければならないと規定されていた。さらに、ナノ粒子は高い表面エネルギーにより投与容器や器具へ付着しやすく、実際の曝露量を低下させるリスクがあるため、実際の投与量を厳密に把握・校正することが重要とされていた。

C3-5.2. STEP 3A : *in vivo* ADME 試験および *in vivo* 予備試験（ガイダンス 7.6.2 項）

C3-5.2.1. *in vivo* ADME 試験の方法論と生体マトリックス中の測定課題

食品・飼料用途のリスク評価において、NMsの経路間外挿についての科学的知見はほとんど存在せず、曝露経路が異なることで組織分布パターンやバリア透過性が全く異なる可能性がある。そのため、原則として「経口投与による試験の実施」が絶対条件として規定されていた。新規NMsについては、TKパラメータを特徴付けるためのADME試験の実施が必須であり、標準的な「OECD TG 417（ADME試験）」をベースとしつつ、ナノ特有の修正（セクション7.3）をケースバイケースで加えることとされていた。

NMsのADME試験における核心的な要件は、体液、組織、排泄物中の「NMsの存在量を定量化すること」、および「どのような形態（固体粒子のままか、イオン化しているか）で体内に存在するか」を特定することであった。しかし、生体組織や食品などの複雑な生体マトリックスの中には、天然由来のナノスケール類似構造が大量に存在すること、および組織内への実際の移行量が極めて低濃度であるため、その分離・検出・同定には著しい技術的困難が伴うことが指摘されていた。バックグラウンドが極めて低い特定の元素を含む無機NMsにおいては、質量分析（ICP-MS）等の手法により元素総量としての検出・定量が可能であったが、これらの従来手法は「ナノサイズとして存在する物質」と「溶解して生じたイオン」を区別できない課題があった。そのため、マトリックスの特徴に応じて、単一粒子ICP-MS（spICP-MS）によるサイズ分画測定や、サンプルの適切な希釈・マトリックス影響の排除など、高感度かつ形態を維持した定量化に向けた工夫の必要性が示されていた。また、蛍光色素等を用いた直接・間接標識（ラベリング）技術が挙げられていたが、ラベリング

自体が NMs 本来の物性を変化させ、動態へ人為的な影響を及ぼすリスクに留意する必要性が指摘されていた。

C3-5.2.2. *in vivo* 予備試験（約 14 日間）の目的と直接 STEP 3B への移行条件

STEP 3A における *in vivo* 予備試験（約 14 日間）の主目的は、深刻な標的ハザードの早期同定、長期試験において不適切な高用量を回避するための「投与量範囲（dose range-finding）」の決定、ならびに初期の TK 評価を行うことにあった。

しかしながら、わずか 14 日間の短期間投与では、クリアランスの遅い NMs の組織内蓄積挙動や、遅発性の吸収動態を正確に把握することが極めて困難な場合がある。その際、予備試験を省略、またはそこでの結論を待たずに直接 *in vivo* 試験（STEP 3B：90 日間試験）へ移行することが可能、かつ合理的とされていた。直接移行が考慮される具体的なケースとしては、以下の 2 点が明記されていた。

1. 溶解速度が極めて限定的（不溶性・難溶性）であるため、材料が遊離粒子状のまま組織内に長期間残留することが確実であり、最終投与後の排出速度（クリアランス半減期）の正確な把握に長期観察を要する場合。
2. 細胞内環境において、粒子の緩慢な溶解・分解に伴い、潜在的毒性を有するイオンや有害分子の局所的な持続放出が予想され、短期間ではハザードの本質が顕在化しないと予測される場合。

また、ナノスケールの遊離粒子は、低曝露レベルでは分散性が高く個々の粒子数濃度が極めて多くなる一方、高用量域では自己凝集に伴い単位重量あたりの総粒子数が実質的に減少するという、固有の物理化学的

特性（非線形性）を持つ。このように粒子の凝集挙動が投与量に比例しない内部曝露を引き起こすリスクがあるため、予備試験段階における TK 評価は「実際の投与量と組織濃度との動的な関係性」に基づいて厳密に実施する必要があるとされていた。さらに、正確な総吸収量を推定する際には、マスバランス（物質収支）試験の実施が強く推奨されていた。

C3-5.3. STEP 3B：改良型 90 日反復投与経口毒性試験（ガイダンス 7.7 項）

STEP 3B は、前述の遺伝毒性評価および TK 評価を、局所毒性および全身毒性の双方の観点から補完・集約する、リスク評価の主戦場領域であった。標準的な 90 日間動物試験（OECD TG 408）に対し、NMs の安全性評価では以下の一連の特別な対応が厳格に規定されていた。

- ADME サテライト群の義務的組み込み：
in vivo 毒性試験の最小要件として、主要な毒性評価を行う本群とは別に、ADME（組織分布・蓄積・排泄）評価専用のサテライト群を同一試験内に同時に組み込んだ「改訂 90 日間毒性試験」の実施が規定されていた。
- 単核食細胞系（MPS）および GALT への特段の配慮： 全身循環に移行した NMs の大部分は、生体防御システムである単核食細胞系（MPS）の組織・細胞に特異的に捕捉・移行する可能性が極めて高い。そのため、造血系パラメータ、炎症反応関連パラメータ、および MPS 関与部位・臓器（肝臓、脾臓、リンパ節など）への特段の病理学的配慮が求められる一方で、初期の侵入経路である消化管、および遠隔臓器における局所的・全身的影響

響の双方に細心の注意を払う必要があった。

- 病理組織学的検査と粒子検出技術の融合：これに伴う病理組織学的検査は、単なる通常の HE 染色観察にとどまらず、組織内における NM_s の実際の存在や（細胞内）微細分布を直接検出できる適切な技法（例：偏光顕微鏡、暗視野顕微鏡、電子顕微鏡（TEM/SEM）、あるいは STEM-EDX など）と可能な限り組み合わせるべきであるとされていた。理想的には粒子の存在に関する定量的または半定量的な情報の取得が強く求められ、提供できない場合は報告書内への正当な理由の記載が義務付けられていた。
- 全身移行否定時の局所影響検討の必須性：先行する STEP 3A の TK 試験において「全身への移行性が検出限界未満であり、否定された」とみなされる場合であっても、長期にわたり毎日ナノ粒子に直接曝露され続ける消化管粘膜の上皮組織に関しては、病理組織学的検査による局所的な影響の検討は完全に必須とされていた。なお、ADME 試験で明確な吸収・蓄積が確認され、他に追加試験の必要性がなく、各分野別ガイダンスの追加要求もない場合には、リスク評価の基準点（POD）として NOAEL（無毒性量）や BMDL（ベンチマーク線量信頼上限値）の適用が可能とされていた。

サテライト群における ADME 評価の具体的スケジュール

サテライト群の測定スケジュールは、「2 週間の短期投与終了時（初期蓄積の測定）」、「90 日間の長期投与終了時（長期最高蓄積濃度の測定）」、および望ましくは「投与終了後に 4 週間の投与休止（排

泄）期間を設けた動物群（組織からのクリアランス速度・半減期の測定）」を設定することが規定されていた。

血中濃度情報の価値は限定的となる場合があるものの、半減期（T_{1/2}）、AUC、バイオアベイラビリティ、C_{max}、T_{max} といった TK 血漿パラメータの概算値を測定しておくことが強く推奨されていた。また、腸壁内、特に小腸パイエル板の上皮細胞や、免疫担当 M 細胞における粒子の特異的な保持・局所集積を識別することが重要な決定要因とされていた。したがって消化管においては、腸管関連リンパ組織

（GALT）、とりわけパイエル板と腸間膜リンパ節が、潜在的な NM_s の持続的蓄積やそれに伴う免疫反応に関与する最も重要な標的部位として位置づけられていた。

C3-5.4. STEP 4：より高次の局所的及び全身的毒性試験（ガイダンス 7.8 項）

STEP 3 における「マテリアルの吸収に関する明確な証拠」および「90 日間反復投与毒性試験の結果」は、最上位の評価段階である STEP 4 へ移行するための明確なトリガーとして位置づけられていた。

本ステップの主目的は、「作用機序

（MOA）および毒性発現経路（AOP）の網羅的な検討」に拠っていた。これにより、実験動物で観察された毒性変化が実際のヒトへの関連性（Human Relevance）を持つか否かを科学的に判断・分析する。本ステップにおいて動物の主要組織から得られる NM_s 組織濃度は、実際の内部曝露量（Internal Exposure）に関する情報としてリスク判定に直接供されることとされていた。

各個別エンドポイントにおける詳細試験の方法論

- ターゲットを絞った詳細な ADME 試験 (7.6.3 項) : 反復投与による長期的な影響、およびそれが NM_s の体内定常状態や生涯にわたる持続的蓄積へと至るかを評価するため、追加の TK 試験の必要性が示されていた。年齢 (幼若期・高齢期)、生理状態 (妊娠・授乳期)、疾病状態などが、NM_s の TK 挙動や組織透過性に及ぼす影響を標的とした追加試験が必要とされるケースがあることが明記されていた。
- 慢性毒性及び発がん性 (7.8.1 項) : 慢性毒性試験 [OECD TG 452]、発がん性試験 [OECD TG 451]、あるいは慢性／発がん性併合試験 [OECD TG 453]の実施が可能とされていた。第二の動物種における発がん性試験の追加実施については、第一選択動物種で得られた結果が不明確である場合や、種特異的な感受性の違い、特異的な作用機序を検証する目的に限って要請される可能性が示されていた。
- 生殖発生毒性 (7.8.2 項) : 生殖発生毒性試験の実施要否については、既存情報や STEP 3 の TK 情報に基づき検討する必要性が示されていた。特定の NM_s は生体内の強固な防御バリアである「血液-精巣関門」や「胎盤関門」を通過する可能性が報告されている。STEP 4 において同試験の実施が必要となる具体的なケースとしては、①全身分布の可能性が疑われる場合、②全身的な移行性が極めて低くても 90 日試験で生殖器官等への影響が示された場合、③吸収が極めて低くても生殖器官へ微量であっても到達・保持されていることが示された場合、が挙げられていた。利用可能な標準試験法としては「出生前発生毒性試験 [OECD TG 414]」や「拡張一世代生殖毒性試験 (EOGRTS) [OECD TG 443]」が規定されており、発達神経毒性 (コホート 2) や発達免疫毒性 (コホート 3) の追加コホートは、ナノ評価においては定常的に組み込むべき (必須オプション) とされていた。
- 神経毒性 (7.8.4 項) : 潜在的な神経毒性作用の初期指標は、STEP 3B の改訂 90 日間毒性試験における臨床徴候、機能観察バッテリー (FOB)、運動活性の変化、脳重量、および脳各部位の病理組織学的変化などから得ることができる。ここで神経毒性の可能性を示唆するシグナルが認められた場合には、さらなる高度な専門的神経毒性試験 ([OECD TG 424]や[OECD TG 426]など) の実施を検討すべきであると言及されていた。
- 内分泌系への影響 (7.8.5 項) : 一部のナノ粒子が内分泌系に悪影響を及ぼす証拠は存在するものの、その作用機序は未解明な部分が多く、さらなる調査が必要とされていた。評価にあたっては ECHA/EFSA の ED ガイダンス (2018) や OECD のガイダンス文書 (2018b) の基準を考慮し、内分泌関連組織の詳細な剖検・病理組織評価や、発情周期の連続評価といった追加パラメータの導入が重要であると解説されていた。
- 腸内細菌叢に及ぼす影響 (7.8.6 項) : ナノ粒子が腸内細菌叢に直接的な影響を与える可能性が示されているものの、ヒトの健康への具体的な影響には依然として多くの不明な点やデータギャップが多い。特に、抗菌作用や特異な表面物理活性を有する「不溶性または難溶性の金属および金属酸化物」の

NMs については、例えば体内に吸収されない場合であっても、消化管腔内において微生物叢、粘液層、および局所の粘膜免疫システムとダイレクトに相互作用し、恒常性を攪乱するリスクを考慮する必要性が指摘されていた。評価アプローチとしては、*in vitro* 連続培養腸管モデルから通常の動物モデル、さらには無菌動物（Germ-free）モデルへと進む段階的手法が提示されていた。ヒト由来の微生物叢を定着させたげっ歯類モデル（ヒトフローラ移植マウスなど）は、誘発された腸内細菌叢の特徴と実際の関連全身疾患との間の「因果関係」を解明するための有用なツールとして位置づけられていた。

C3-6.1. EFSA ワークショップにおける討論と次期統合ガイダンス計画

2025 年 6 月に開催された EFSA 主催の国際ワークショップにおいて、2021 年公表のリスク評価ガイダンスと「粒子技術要件に関するガイダンス（Particle-TR ガイダンス）」を完全に単一の文書へと統合・一元化する次期更新計画が提示され、最新の科学的知見を反映させるための議論が行われた。提示された統合ガイダンスの更新計画は、以下の 3 段階のフェーズから構成されていた。

- **第 1 段階：** 既存の 2 つの独立したガイダンスを単一文書へ統合し、NAMs の具体的な使用要件に関する明文化を行う。
- **第 2 段階：** 環境リスク評価（ERA）への適応拡張、および先端材料（Advanced Materials）等の次世代ナノ構造に対する科学的な更新を行う。

- **第 3 段階：** 欧州の各種プロジェクトから得られた最新の NAMs に関する実践的な実施知見・データを直接反映させる。

C3-6.1.1. ワークショップにおける主要なハザード評価論点

毒性評価の実務における最大の論点として、単なる外部投与量のみならず、体内に実際に取り込まれた粒子量である「内部被ばく（内部曝露量）の定量化」の重要性が強調された。特に遺伝毒性試験においては、細胞内への粒子の実際の取り込み確認の欠落が、多くの「偽陰性」を生み出し信頼性を損なっている現状が指摘された。

しかしながら、組織・臓器中の極微量なナノ粒子を正確に測定することには依然として高い技術的限界が存在する。単粒子 ICP-MS（spICP-MS）や電子顕微鏡分析

（STEM/SEM-EDX）を用いても、前処理プロセスの過程で人工的な変形や凝集が生じること、および有機系ナノ粒子の場合は生体組織自体とのコントラストの差が低いため画像化や定量化が著しく困難である点が共通課題として挙げられた。また、分析化学的な検出限界未満（LOD 未満）という結果と、生物学的な「吸収ゼロ」との間にある解釈のギャップをどのように意思決定基準（Decision-making criteria）へ落とし込むかなど、標準化の必要性が議論された。

C3-6.1.2. 組織内局所蓄積の解釈とディシジョンツリーアプローチ

特定の材料をモデルとした議論では、ナノ粒子が小腸のパイエル板や M 細胞へ局所的に集積・保持される一方で、全身の循環血液からはほぼ一切検出されないという「局所的な高濃度集積」と「全身的には極

微量」という二面性（パラドックス）が、毒性解釈を難しくしている現状が示された。さらに、個体が感染症や炎症性腸疾患などの罹患状態にある時には、健康時とは全く異なる複雑な体内移行経路をたどるなど、静的な単純吸収モデルでは説明できない複雑さも指摘された。

これに対し、細胞単位での正確な粒子位置と個々の細胞の DNA 損傷指標を三次元的に重ね合わせる高度な画像解析法が紹介されたものの、組織全体の平均値測定に対する科学的批判や有機系粒子への無機分析手法の不適用といった課題から、粒子の性質（材質、不溶性度など）に応じて分岐する「ディシジョンツリー型（分岐型）アプローチ」の導入の必要性が強く提起された。さらに、国際的な主要規制機関（FDA、SCCS、EFSA など）間における要求データの相違を解消する国際的な規制調和の重要性が叫ばれ、利害関係者との連携強化案が提示された。

C3-6.2. NAMs の統合：NAMs4NANO プロジェクト

リスク評価戦略における NAMs の統合に関しては、3R 原則を遵守しつつ、既存の標準的な動物試験ガイドラインが利用できないナノ材料の特殊評価をいかに補完・代替するかという有効性の検証が焦点となった。

現在、OECD 試験ガイドラインの枠組みに完全に組み込まれたナノ特異的 NAMs は限定的であるが、科学的に妥当性・信頼性が立証されているのであれば、非ガイドライン手法（Non-guideline 手法）であっても積極的に活用可能とされている。この導入を推進するため、EFSA は欧州委員会合同研究センター（JRC）等と連携した探索的プ

ロジェクト「NAMs4NANO」を開始しており、専門家パネルによる合意意見を基盤として、特定の非ガイドライン NAM について事前に公式に定義・認定することで個別の再評価を不要とし、規制実施を促進する「NAM の適格性評価システム

（Qualification system）」の開発・実装を進めていることが報告された。プロジェクトは以下の 3 つのロット（Lot）構成によるケーススタディを展開していた。

- 第 1 ロット：ドイツ連邦リスク評価研究所（BfR）が統括。分解・溶解性、遺伝毒性、細胞毒性、酸化ストレス、炎症反応、バリア保全性を評価する現在の規制関連 NAMs の網羅的なレビュー（Usmani et al., 2024）、および「適格性評価システム」の具体的な運用プロトコルの提案（Haase et al., 2024）を発表した。
- 第 2 ロット：同じく BfR の主動のもと、データギャップの解消を目的に、実際の産業利用が多い代表的な 5 大ナノ材料（酸化亜鉛、二酸化ケイ素、酸化鉄、ナノシルバー、酸化銅）を具体的な対象としたリスク評価ケーススタディを実施し、NAMs の技術的検証と規制上の成熟度（Regulatory readiness）の評価を進めた。
- 第 3 ロット：イタリア国立衛生研究所（ISS）の統括のもと、農薬活性物質を担持したナノキャリア（CS1）、ナノファイバー（CS2）、消化管内における長期間の経時的変化（エージング）の模倣方法論（CS3）、脆弱な集団を代表した腸管バリアの疾患モデル（CS4）、および全身の各遠隔臓器の高度な *in vitro* 複合モデル（CS5）に関する 5 つの方法論的ケーススタディを展開した。また、オランダ公衆衛生研究所（RIVM）も中核メンバーとして深く参画し、代替生物モデル

を扱う統合的アプローチ（IATA）の開発を主導している。

C3-6.2.1. NAMs 導入の実務的障壁に関する討論

会合では、非ガイドライン NAMs を実際の規制評価に統合する際の障壁について議論され、解決策として「前処理や解析手順までを含めたデータの完全開示と共有」、「sp-ICP-MS や画像解析への AI・機械学習の融合による客観性の向上」、「科学的妥当性と規制対応可能性を評価する資格認定システム（Credentialing system）の構築」が提案された。

一方で、これらの最先端 NAMs を、法的な強制力を持つ「GLP（優良試験所基準）環境下」で実際に実施することの現実可能性や、民間企業側が負担すべき関連コストといった実務面の莫大な負担とのバランスをどのように折り合わせるかが現実的な課題として認識された。このため、科学的に妥当性が証明された NAMs を、GLP の枠組みにとらわれず迅速かつ柔軟に規制受容するための資格認定システムへの強力な支持と期待が強調された。

C3-6.3. OECD ナノマテリアル作業グループ（WPMN）における試験法関係の議題

2025 年 6 月に開催された OECD の WPMN（ナノ材料作業部会）の対面会合では、世界各国の活動状況やプロジェクトの進捗に関する協議が実施された。

C3-6.3.1. 経口摂取ナノ材料腸管 *in vitro* 試験ガイダンスの策定状況（2026 年 4 月承認予定）

食品安全に関連する最重要の国際イニシアチブとして、イタリアがプロジェクトを主導し、欧州各国が連携して策定を進めている「経口摂取されたナノ材料の腸管 *in*

vitro 試験に関するガイダンス文書」の最新ドラフトの全容が示され、2026 年 4 月の最終承認に向けて策定作業が進められていることが報告された。同ガイダンス文書は、経口摂取された NAMs が胃および腸の環境を通過する際に生じる生体変換プロセスを実験室で一貫して再現・評価するための構造化された枠組み（Structured framework）を提供するものである。その骨子は以下の通りであった。

第 2 章（*in vitro* 消化モデルの選択推奨）：リスク評価の目的や前処理条件に基づき、最適な *in vitro* 消化モデルを選択するための意思決定フローが提示されていた。ここでは、ヒトの生理学的条件（pH や消化酵素等）を模倣し、国際的に検証された「模擬液」を厳格に使用することの重要性が強調されていた。

第 3 章（*in vitro* 腸管バリアモデルの使用）：NAMs の取り込みや体内移行を評価する高度なモデルとして、ヒト大腸上皮細胞（Caco-2）、粘液分泌細胞、および M 細胞の 3 種を共培養した「三層培養モデル」の採用が規定されていた。あわせて、ラボ間におけるデータの再現性を確保するための標準化の必要性が指摘されていた。

C3-6.3.2. SGTA および WPHA における技術文書の最終公開

WPMN の専門サブグループである SGTA（試験及び評価の運営グループ）の成果として、「サンプル調製と測定に関するガイダンス文書（GSPD）」の最終ドラフトが各加盟国の合意に基づき正式に承認され、2025 年 8 月 4 日に公開に至った。本 GSPD の完成により、世界中の試験機関において、NAMs の毒性試験を実施する際のサンプル調製のばらつきを最小限に抑える基盤が確立された。併せて、ハザード評価作業

グループ（WPHA）が関与する「化学物質のグループ評価に関する OECD ガイダンス（第3版）」の改定進捗が報告された。本改定においては、AOP、オミクス、HTS、およびナノ特異的(Q)SAR 等の最新の分子メカニズム情報を活用した高度なグループ化手法が盛り込まれ、ナノ材料への対応力が拡張された。最終調整の場においては、科学的厳格性を担保するため、「バルク化学品（Bulk chemicals）」という定義の曖昧な表現の使用をガイダンス内で完全に回避すること、および本改定内容が現時点における最高水準の科学的知見をまとめた「現状の技術水準（State-of-the-art）のレビュー文書」である旨をナノ材料セクション内の冒頭に明記すること、の修正合意が行われ、2025 年 10 月 30 日に公式に公開に至った。

D. 考察

D1. ナノ酸化チタン等ナノマテリアルの経口反復投与毒性と体内動態解析

結晶子径の異なる TiO₂（6、30、180 nm; いずれも NPs を含む）の正確な粒径分布を得るため、透過型電子顕微鏡による粒度分布解析を実施した。その結果、二次粒子径は 6 nm < 180 nm < 30 nm の順で、ナノ粒子の割合が最も高いのは 6 nm の TiO₂ 粒子であった。これらを 1000 mg/kg bw/day の用量で雄ラットに 90 日間強制経口投与し、8 週間の投与休止ののちに剖検を行ったところ、いずれの結晶子径の TiO₂ においても 90 日間強制経口投与後、及び 8 週間の投与休止期間のいずれもパイエル板に同程度の TiO₂ 凝集体の沈着が認められた。一方で、それらの粒子沈着部位の周辺において炎症などの生体反応は見られず、炎症性サイトカインの活性化も見られなかった。また、免疫誘発 DNA 損傷も見られなかった。以

上より、パイエル板に長期間残存した TiO₂ は炎症や免疫反応を誘導しないと考えられた。

昨年度までに実施した 90 日間の反復投与によるチタン量定量では、結晶子径 180 nm の TiO₂ 投与群で肝臓チタン濃度の有意な増加が見られたが、本年度実施した回復実験に伴う肝臓及び全血のチタン量測定では、90 日間投与直後、および 8 週間投与休止後のいずれにおいても同様の結果は再現されなかった。これらの結果から、当該所見は一貫して観察される頑健な影響ではなく、経口投与された TiO₂ の全身移行は極めて限定的であると考えられた。

D2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

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ばく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。そこで本分担研究では、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が、免疫細胞に与える影響について検討した。まず、マウスの脾臓から採取した T 細胞の分化におけるナノ酸化チタン影響については、被験物質とした 3 種のナノ酸化チタンとも顕著な作用は観察されず、影響があるとしても限定的であると示唆された。他方、食物アレルギーマウスモデルの抗原感作時におけるナノ酸化チタンの影響に関する先行研究では、粒子径 6 nm・アナターゼ型(C)及び粒子径 15 nm・アナターゼ型並びに粒子径 15 nm・ルチル型のナノ酸化チタンが感作を増強すること、粒子径 30 nm 以上のナノ酸化チタンではそのような増強効果は見られないことが示されている。本検討においては、

経皮感作時にナノ酸化チタン C (粒子径 6 nm・アナターゼ型) が共存すると、所属リンパ節において一部の樹状細胞やマクロファージが OVA 単独処置群より増加する傾向が観察されており、ナノ酸化チタンの経皮感作時のアジュバント効果については樹状細胞やマクロファージが関与している可能性が高いと考えられた。このため、少しでもナノ酸化チタンが体内に取り込まれると、免疫応答に何らかの影響を及ぼす可能性があると考えられる。

次に、抗原の経口摂取時にナノ酸化チタン C が共存した際の効果として、抗原の経口ばく露によって誘導される免疫寛容について影響を検討したところ、ナノ酸化チタンが共存しても経口免疫寛容の獲得には変化が認められなかった。また、経皮感作時に変動傾向が確認された樹状細胞やマクロファージの頻度についても影響はなかった。食物抗原に対する免疫寛容が維持には、樹状細胞が産生する TGF- β で誘導される腸管 Treg が関与することが知られている。フランスの研究グループは、ナノ酸化チタン E171 が腸管での TGF- β 産生を抑制すると報告しているが (Bruno L et al., Food Chem. Toxicol. 2023)、本検討において Treg の頻度についても影響は認められておらず、少なくともナノ酸化チタン C の経口ばく露ではこの作用への直接的な介入はないものと考えられた。

OVA 経皮感作モデルにおいて、ナノ酸化チタンを単独で経口ばく露した際、非投与群に比べて OVA 特異的 IgE が高値となる傾向を観察しており、この結果は、ナノ酸化チタン C の経口ばく露が、Th2 依存的な液性免疫応答に作用する可能性を示唆している。既報においても、接触性皮膚炎モデルではナノ酸化チタンが低分子抗原による感作を増強し、Th2 応答を促進することが示さ

れており (Smulders SG et al., Br J Dermatol 2015)、喘息モデルマウスでは、ナノ酸化チタンの吸入により気道性炎症が悪化すること (Harfoush et al. respir res 2020)、さらに、ナノ酸化チタンを OVA と共に腹腔投与したマウスモデルでは、IgE や IgG の産生が増加し、好中球の浸潤が亢進すること (Soren TL et al., Basic Clin Pharmacol Toxicol 2010) などが報告がされており、ナノ酸化チタンによる炎症応答の活性化に関する複数の研究成果を支持する応答と考えられる。ただし、アナフィラキシー応答に対してナノ酸化チタン C 投与群が顕著な増悪効果を示さなかったことから、この程度の特異的 IgE の増加が食物アレルギーなどの病態に対し実質的な影響を与えるかについては不確実性が残る。また、病態マウスのリンパ節に局在する免疫細胞の解析では、上述した樹状細胞やマクロファージの他、B 細胞や T 細胞、そしてマスト細胞等のいずれの細胞においても、群間で有意な変動は認められなかった。加えて、IgE 産生 B 細胞や IL-4 産生 CD4⁺T 細胞等のサブポピュレーションについても有意な影響は確認されなかった。経口投与されたナノ酸化チタン粒子は消化管からの吸収が限られており、肝臓や腸間膜リンパ節においてもごくわずかに検出されるに過ぎないことが報告 (Jun-ichi A et al., Part Fibre Toxicol. 2023, Liesbeth G et al., Part Fibre Toxicol. 2014) されており、本試験結果もそれらの結果と大筋で整合するものと考えられる。一方で、脾臓での IFN γ や IL17 の産生がナノ酸化チタンにより促進されるといった報告 (Bettini, S. et al. Scientific Reports 2017)と同様に、腸間膜リンパ節に局在する IL-17 産生 CD4⁺T 細胞のような一部の細胞集団がナノ酸化チタン C 投与群で有意に増加することを確認しており、わ

ずかな生体内への取り込みによっても影響を受ける細胞が存在する可能性が示唆された。

他方、Bruno らは食品添加物グレードのナノ酸化チタンが TGF- β や IL-10 の産生を抑制し、OVA の免疫寛容を阻害すること報告しており、また、DSS 誘発性大腸炎において、ナノ酸化チタンの長期経口ばく露が mLN の CD4⁺T 細胞、制御性 T 細胞、マクロファージを減少させ、腸管免疫バランスを乱す可能性が発表されている (Wei M et al., J Agric. Food Chem. 2019)。これらの試験と本試験の相違は、生物種を含む評価モデルの違いや酸化チタンの種類に依存した粒子の物理化学特性の違い、そしてばく露期間の違いに起因する可能性があり、今後も引き続き生体内での影響について詳細な検討を進めるべきと考えられる。

D3. ナノマテリアルを含む新規素材の毒性試験法に関する国際動向調査

NMs の安全性評価手法は、従来のバルク化学物質の画一的な毒性試験アプローチから、粒子の物理化学的特性の動的な変化を完全に内包した、高度に階層化された「段階的リスク評価スキーム」へと完全に移行していることが明確に実証された。

EFSA が提示する最先端の評価フレームワークは、初期の特性評価および生理学的 *in vitro* 消化試験から得られる科学的証拠を厳格な判断基準 (トリガー) とし、不溶性や移行性が否定できない材料に対してのみ、ADME サテライト群を完全融合させた改良型 90 日間反復経口投与毒性試験 (STEP 3) を課す極めて合理的かつ堅牢な体系を敷いている。さらに、ここで組織蓄積や微変調が検知された場合には、生殖発生毒性 (EOGRTS)、慢性毒性・発がん性、詳細な免疫毒性、神経毒性、内分泌攪乱、およ

び最先端の腸内細菌叢影響評価を含む、極めて標的を絞った詳細な高次試験 (STEP 4) へとシームレスに展開する構造を確立していた。

ハザード特定技術においては、Ames 試験のナノ評価への不適用と、それに代わる哺乳類細胞システム (Hprt/xprt 試験、*in vitro* 小核試験) の最適化 (サイトカラシン B の後添加、処理時間の延長など) が必須要件として定着し、フローサイトメトリーにおける粒子の光学干渉を回避するためのハイスループット画像解析の有用性が確立された。また、NMs 毒性の根幹をなす酸化ストレスについては、非細胞系アッセイからオミクス解析に至る 3 段階の戦略的アプローチが整備され、細胞内の ROS 産生や 8-oxodG 誘発などの初期変化と、高次の全身有害影響との間の因果関係を解明する基盤となっている。

免疫毒性分野においては、特定の材料評価において顕著に実証されたように、一般的な肝・腎毒性が顕在化するよりもはるかに低い超低用量域において、機能的免疫パラメータの抑制 (NK 細胞活性の低下など) や免疫組織の重量激減を来すことが定量的 (CED アプローチなど) に確認されており、免疫系が最重要標的の 1 つであることが示された。また、二次的遺伝毒性を検知するための共培養モデルの必要性や、アレルギー反応を増幅する「トロイの木馬効果」への警鐘、および偽陽性を徹底排除するためのエンドトキシン汚染確認の絶対的必須化が示された。ただし、規制審査においては、非生理的な曝露データや、実際のヒト曝露量を何百倍も超える過剰用量データについては、ハザードの有無にかかわらず「リスク評価に対する科学的関連性は低い」と判定されるなど、実際の曝露シナ

リオと科学的に突き合わせる厳格な原則が敷かれていた。

2025 年 6 月の最新国際動向は、これらの評価技術が「次なる大転換期」を迎えていることを示している。EFSA によるリスク評価と粒子要件ガイダンスの完全一元化計画、および動物福祉（3R 原則）を具現化するための、非ガイドライン NAMs を包括的に国家規制へ受け入れる「適格性評価システム（NAMs4NANO プロジェクト）」の稼働は、今後の世界の規制科学の潮流を決定づけるものである。さらに、OECD の WPMN において、2026 年 4 月の承認に向け完全に秒読み段階に入った「経口摂取ナノ材料の腸管 *in vitro* 試験に関するガイダンス文書」は、模擬消化液を用いた生体変換評価や、三層共培養バリアモデルの標準化を世界に提示するものであり、GSPD の公開やグループ評価ガイダンスの改定と相まって、国際的な規制調和（標準化）の決定的な基盤となる。

E. 結論

E1. ナノ酸化チタン等ナノマテリアルの経口反復投与毒性と体内動態解析

TiO₂ は反復経口投与によりパイエル板に取り込まれ、投与休止後もパイエル板に残存するが、それによる炎症や免疫反応の誘導は認められず、毒性影響は誘発しないと考えられた。さらに、経口摂取した TiO₂ は肝臓および全身循環にはほとんど移行が見られなかった。以上の結果から、パイエル板は TiO₂ を隔離する防壁として機能すると考えられた。

E2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

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に関する安全性評価に資するデータを蓄積するため、ナノ酸化チタンの免疫細胞に与える影響について検討した。粒子径 6nm のナノ酸化チタン C の経口摂取は、免疫細胞集団全体に対して有意な影響を与えず、食物アレルギー症状に対しても顕著な増悪効果を示さないことが示唆された。検討した項目の中には、軽微なアレルギー症状の改善傾向が観察されたものの、その効果は限定的であり、現時点では食品衛生上のリスクとして評価すべき明確な根拠は得られなかった。今後は、より長期なばく露や、免疫抑制作用に対する詳細な解析することで、食品添加物や化粧品としての安全性評価の精度を高める科学的知見の集積が必要であると考えられる。

E3. ナノマテリアルを含む新規素材の毒性試験法に関する国際動向調査

本調査研究において、NMs および新規素材の安全性評価は、従来の網羅的なハザード同定から、物理化学的特性や生体内動態に基づいた段階的かつ個別具体的なアプローチへと完全に移行していると結論づけられる。

ハザード評価においてすべての試験法が特定の被験物質に適用できるわけではなく、NMs の免疫毒性やアレルギー原性をはじめ、食品経路のハザードに対する万能なリスク評価の枠組みや画一的な指針は国際的にも存在しない。ハザードアセスメントの目的にはヒトデータが最も適切であるものの、その入手は困難であり、適切な曝露評価を伴わないことが多い。また、動物データは一定の有用性を示すものの、ヒトへの単純な外挿は常に可能とは限らない上、動物実験削減（3R 原則）の国際的潮流も考慮する必要がある。加えて、*in vitro* 試験は生体シス

テムの複雑性を十分に反映できない場合が多いのが現状である。したがって、ハザード評価に用いるべき試験法や採用すべきリスク評価の枠組みに関する画一的な指針は存在せず、最終的な決定は、試験物質の特性とリスクアセスメントの具体的な目的に照らして個別に行われるべきであると結論づける。

今後の欧米における食品関連物質の NMs 評価動向は、初期評価的観点から行われた遺伝毒性や酸化ストレスのハザード同定から、動的な分散・凝集特性を制御した高精度な *in vitro* および *in vivo* 試験デザインの構築や、最新の生体変換プロセスを反映した次世代腸管バリアモデルの標準化へと移行していくものと考えられる。さらに、国際機関における規制調和の進展に伴い、NAMs を統合的試験・評価アプローチ (IATA) へ実装するための適格性評価システムの運用や、AOP を活用した効率的なグループ化およびリードアクロスの具現化に関する議論が中心となっていくことが見込まれる。したがって、我が国における新規素材の安全性評価基盤の整備に向けては、これら国際的な技術水準の更新や標準化プロトコルの動向を迅速に捉え、国内の審査・評価体系へと調和・導入していくための技術的検証を加速させることが極めて重要であると考えられる。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Jun-ichi Akagi, Yasuko Mizuta, Hirotoshi Akane, Takeshi Toyoda, Kumiko Ogawa, Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. *Particle and Fibre Toxicology*, 20(1), 2023.

2. 大野彰子: ナノマテリアルの概要, *ファルマシア*, 2023;59(7):629-633.
doi:10.14894/faruawpsj.59.7_629
3. Nishida A, Sawada Y, Arai R, Ishibashi N, Suzuo M, Ohno A, Ashikaga T, Iijima K, Evaluation of the immunotoxicity potential of nanomaterials using THP-1 cells, *Front. Toxicol.*, 01 July 2024.
<https://doi.org/10.3389/ftox.2024.1293147>.
4. Ishigamori R, Ohno A, Fukuhara K, Hasegawa S, Totsuka Y, Genotoxicity assessment of mesoporous silica and graphene oxide in GDL1 cells. *Genes Environ.* 2026; 48:2.
<https://doi.org/10.1186/s41021-025-00350-y>

F.2 学会発表

国内学会発表

1. Jun-ichi Akagi, Yasuko Mizuta, Hirotoshi Akane, Mizuho Uneyama, Takeshi Toyoda, Kumiko Ogawa. 90-day repeated oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. 第50回日本毒性学会学術年会, 2023年6月20日 札幌
2. 赤木 純一、水田 保子、畝山 瑞穂、小川 久美子. 結晶子径が異なる二酸化チタン粒子のラットを用いた90日間反復経口投与による毒性影響とチタン蓄積の検討. 第40回日本毒性病理学会学術集会, 2024年1月23日 東京
3. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. 異なる結晶子径の二酸化チタン粒子の90日間反復経口投与によるラット小腸パイエル板における免疫毒性影響の検討 第52回日本毒性学会学術年会 2025年7月4日, 宜野湾 口頭発表
4. 2. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤

- 根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. 反復経口投与によりラット小腸パイエル板に取り込まれた二酸化チタンによる免疫毒性影響の検討. 第32回日本免疫毒性学会学術年会 2025年9月5日, 岐阜 口頭発表
5. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. ラットを用いたさまざまな結晶子径の二酸化チタンの反復経口投与と毒性の検討. 第8回医薬品毒性機序研究会 2025年12月11日, 札幌 口頭発表
 6. 赤木純一, 水田保子, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. F344ラットへの反復経口投与によりパイエル板に沈着した二酸化チタン粒子の投与休止後の動態の検討. 第42回日本毒性病理学会学術集会. 2026年1月22日, 名古屋 ポスター発表
 7. Tamehiro N, Adachi R, Taguchi C, Ogawa K, and Shibata N, Effects of oral exposure to titanium dioxide nanomaterials in a mouse model of food allergy, 第53回日本免疫学会学術集会(2024.12.3)長崎
 8. 荒井りおん, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: THP-1 細胞を用いたシリカナノ粒子とりポ多糖共暴露による抗原提示細胞活性化能の評価, 第 50 回日本毒性学会学術年 (2023.6.21, 横浜) .
 9. 大野彰子, 西田明日香, 沖山佳生, 飯島一智, 足利太可雄: Verification of usefulness as evaluation index for nanomaterials using the h-CLAT test method, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21, 横浜) .
 10. Ohno A, Nishida A, Okiyama Y, Iijima K, Ashikaga T: Verification of the effectiveness of EC 200 and EC 150 indicators of THP-1 cell activation on various nanomaterials, 266th ACS National Meeting & Exposition, (August 13-17, 2023, San Francisco).
 11. 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: THP-1 細胞を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価法の開発とその活性化メカニズムの解析, 第 30 回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11, 川崎) .
 12. 大野彰子: ナノマテリアルの安全性評価における国際動向, 第 36 回日本酸化ストレス学会関東支部会 (2023.12.3, 川崎) .
 13. Ashikaga T, Ohno A, Arai R, Iijima K: Activation of THP-1 cells by mixed exposure to silicon dioxide nanomaterial and skin sensitizer or febrile substance, SOT 63nd Annual Meeting (2024.3.12, Salt Lake City, USA).
 14. 大野彰子: 動物実験代替法としての生体模倣システム (MPS) と国際動向, 日本薬学会第 144 年会 シンポジウム講演, (2024. 3. 30, 横浜) .
 15. 飯島一智, 山城真輝, 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄: 種々の酸化亜鉛ナノ粒子を対象とした抗原提示細胞活性化能の評価と活性化機序の解析, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5, 福岡).
 16. 大野彰子: 食品分野に含まれるナノ粒子の健康影響, 科学的根拠に基づく健康寿命を伸ばす会 第 30 回講演会 (2024.10.9, 東京).
 17. 大野彰子, 沖山佳生, 山城真輝, 飯島一智, 足利太可雄: ナノマテリアルの免疫毒性評価系における *in vitro* h-CLAT 試験法の有用性, 日本動物実験

- 代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30, 栃木)
18. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支モデルとの共培養系を用いた各種シリカナノ粒子の THP-1 細胞活性化能の評価と活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30, 栃木).
 19. 坂本玲奈, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支モデル／THP-1 細胞共培養系を用いた酸化亜鉛ナノ粒子の免疫細胞活性化能の評価, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30, 栃木).
 20. 石ヶ守里加子, 今井正彦, 大野彰子, 戸塚ゆ加里: マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンストマテリアルの毒性評価, 日本環境変異原ゲノム学会 第 53 回大会 (2024.12.7, 岡山).
 21. 小林果, 平生祐一郎, 福原潔, 大野彰子, 森有利絵, 川西正祐, 村田真理子, 及川伸二: 天然ポリフェノール Salvianolic acid B による活性酸素生成および DNA 損傷, 第 78 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2025.5.23, 小田原)
 22. 大野彰子, 赤木純一, 爲廣紀正, 広瀬明彦, 小川久美子: 食品等に含まれるナノマテリアルに関する国際的な安全性評価への取り組み, 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.4, 沖縄)
 23. 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: イオン溶出および細胞内取り込みに着目した酸化亜鉛ナノ粒子による THP-1 細胞活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1, 横浜)
 24. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: シリカナノ粒子による THP-1 細胞活性化における酸化ストレスと吸着イオンの影響, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.2, 横浜)
 25. 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: イオン溶出および細胞内取り込みに着目した酸化亜鉛ナノ粒子による THP-1 細胞活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1, 横浜)
 26. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: シリカナノ粒子による THP-1 細胞活性化における酸化ストレスと吸着イオンの影響, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.2, 横浜)
 27. 石ヶ守里加子, 大野彰子, 戸塚ゆ加里, マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンストマテリアルの包括的毒性評価, 日本環境変異原ゲノム学会大 54 回大会 (2025.11.22, 静岡)
 28. 大野彰子, アドバンストマテリアルを利用した医薬品・医療機器等の安全性評価に資する研究, 第 10 回日本医療研究開発機構レギュラトリーサイエンス公開シンポジウム (2025.12.3, 東京)
 29. 福原潔, 大野彰子, 医療機器におけるナノマテリアル NETs 誘導を介した遺伝毒性への新たな視点, 日本薬学会第 146 年会 (2026.3.27, 大阪)
- <政策等への活用又は実用化に向けた取り組み>
1. 2023 年 2 月 FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) への情報提供。“Reports on physicochemical properties of titanium dioxide used as a food additive in Japan, including particle size and distribution,

specific surface area, and elemental analysis.”

2. OECD WPMN 専門家グループへの参画と国際調和への貢献 OECD WPMN（ナノ材料作業部会）の専門家グループに参画し、経口摂取されたナノ材料の腸管内挙動に関する試験法ガイダンス（*Guidance Document for in vitro testing of the intestinal fate of ingested nanomaterials*）の策定において、日本側からのドラフト作成に意見反映等の貢献を行った。本活動を通じて、国内外のリスク評価における科学的根拠の構築、および規制対応の信頼性向上に寄与した。

国際学会発表

1. Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Uneyama M, Akane H, Toyoda T. Titanium dioxide with crystallite diameters of 6, 30 and 180 nm induced no toxicological effects after oral administration to rats for 90 days. The 63th SOT Annual Meeting, 2024年3月10-14日 Salt Lake City, USA

2. Ohno A, Okiyama Y, Iijima K, Ashikaga T: Relationship analysis between the effects of MWCNTs on THP-1 cells and their physical properties, American Chemical Society (ACS) Fall 2025 (2025.8.19, Washington DC, USA)
3. Jun-ichi Akagi, Yasuko Mizuta, Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Kumiko Ogawa. Characterization of remaining titanium dioxide in Peyer's patches of rats after subchronic oral exposure. The Society of Toxicology 65th Annual Meeting. 2026年3月24日, San Diego, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

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

表 1-1. 実験デザイン

Group	No. of animals	Test material	Dose (mg/kg bw/day)	Duration (weeks)	Recovery (weeks)
Control	5	—	—	13	—
Control Recovery	5	—	—	13	8
6 nm	5	6 nm TiO ₂	1000	13	—
6 nm Recovery	5	6 nm TiO ₂	1000	13	8
30 nm	5	30 nm TiO ₂	1000	13	—
30 nm Recovery	5	30 nm TiO ₂	1000	13	8
180 nm	5	180 nm TiO ₂	1000	13	—
180 nm Recovery	5	180 nm TiO ₂	1000	13	8

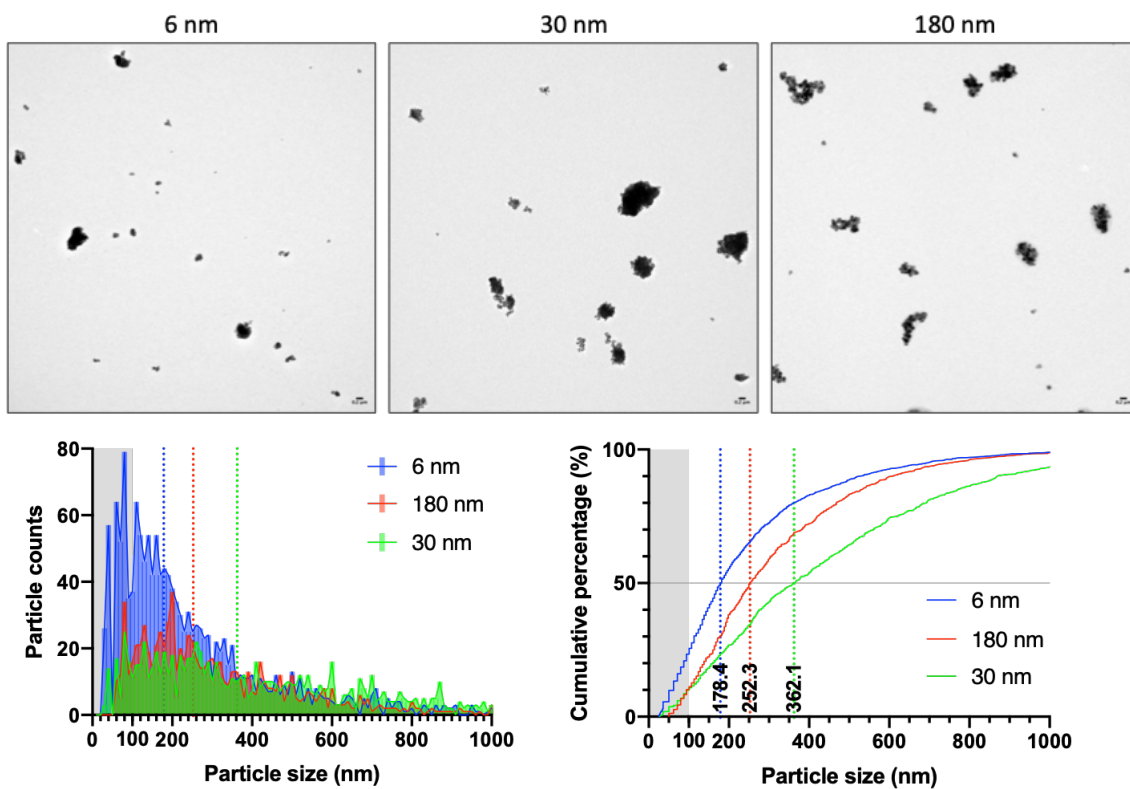


図 1-1. 異なる結晶子径を持つ TiO_2 粒子の透過電子顕微鏡観察による粒度分布分布解析。
破線はメジアン径を示す。ナノ粒子 (> 100 nm) の分布を灰色で示した。

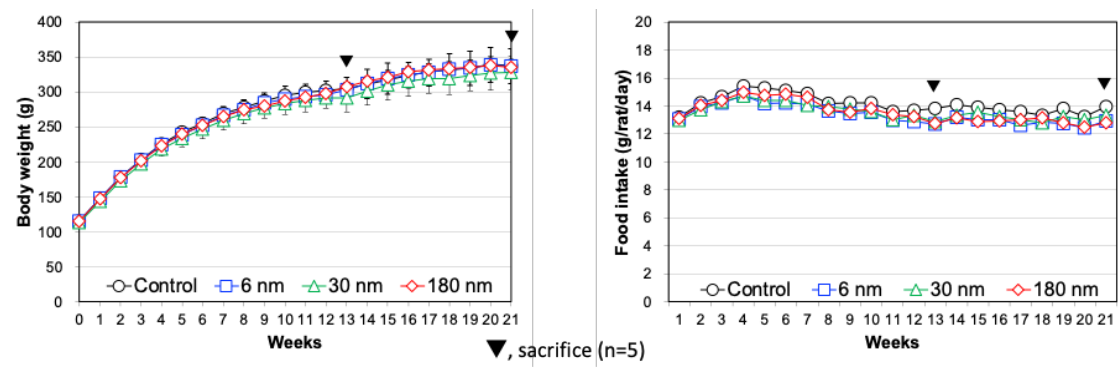


図 1-2. 体重及び摂餌量

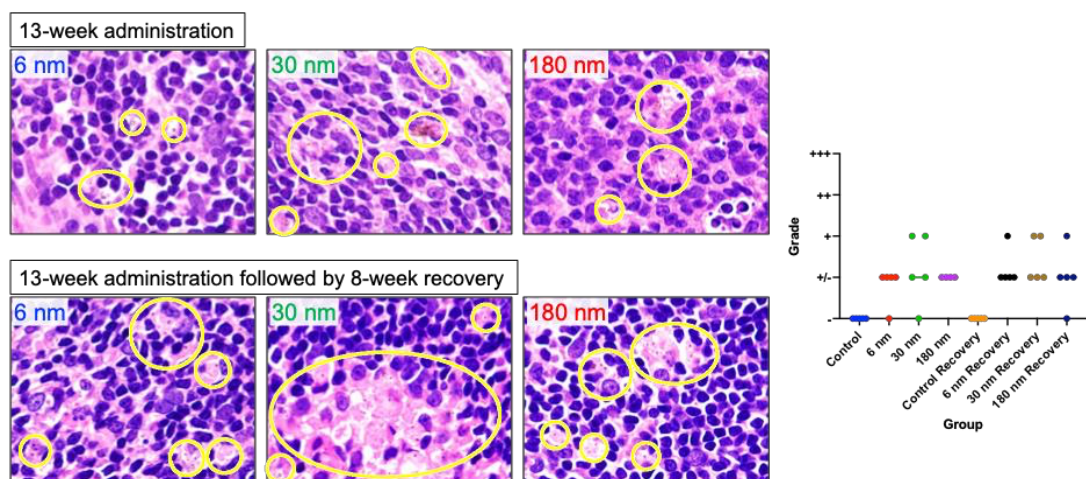


図 1-3. パイエル板に残存した TiO_2 凝集体

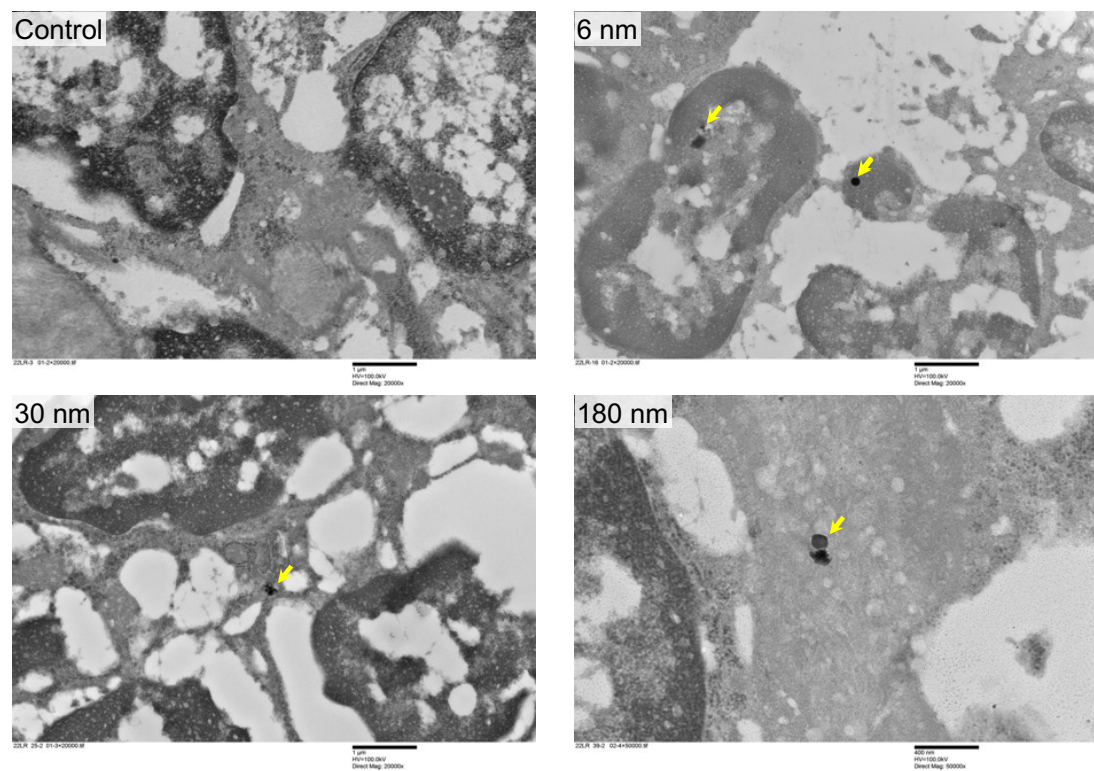


図 1-4. 電子顕微鏡により観察されたパイエル板細胞内の二酸化チタンナノ粒子。黄矢印は二酸化チタン粒子を示す。

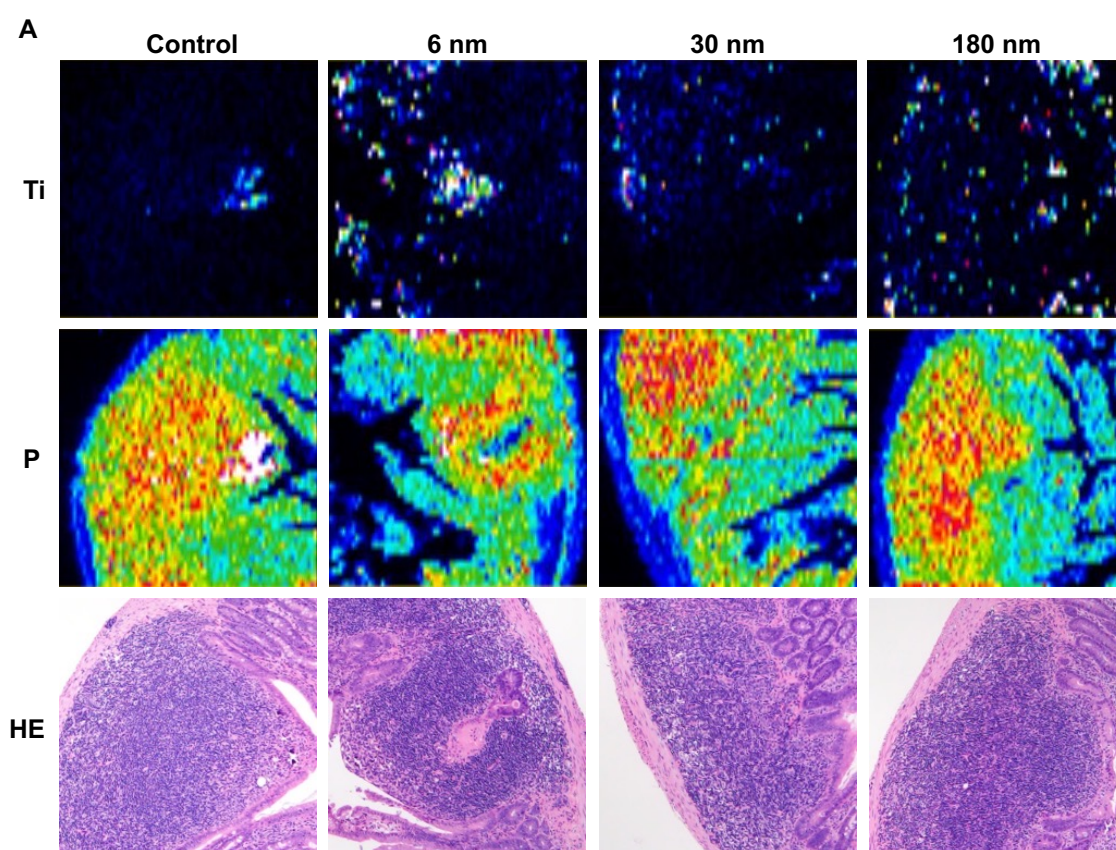
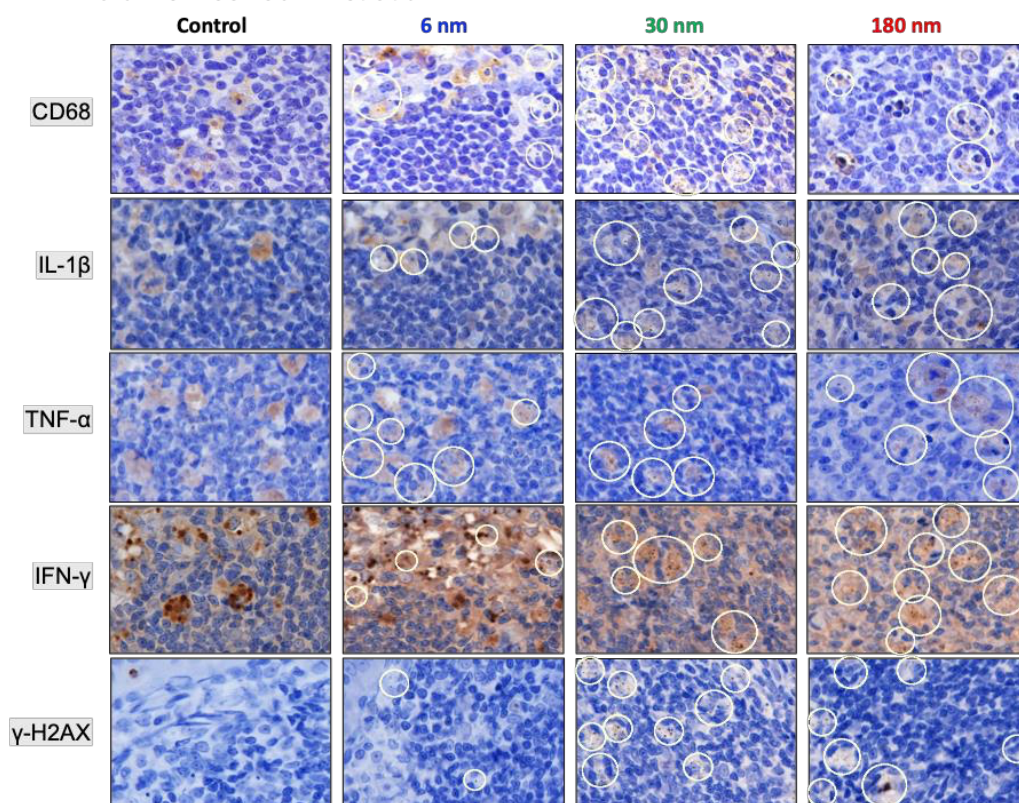


図 1-5. LA-ICP-MS によるパリエル板中チタン量のイメージング。

A. End of 13-week administration



B. After 8-week recovery

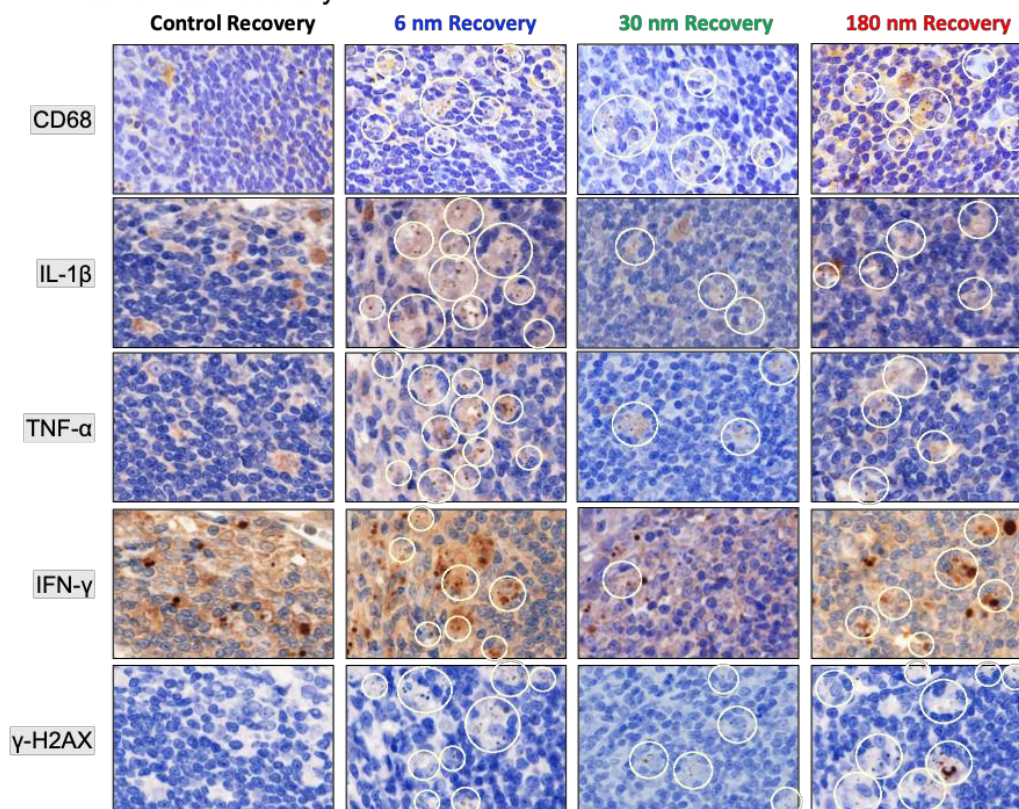
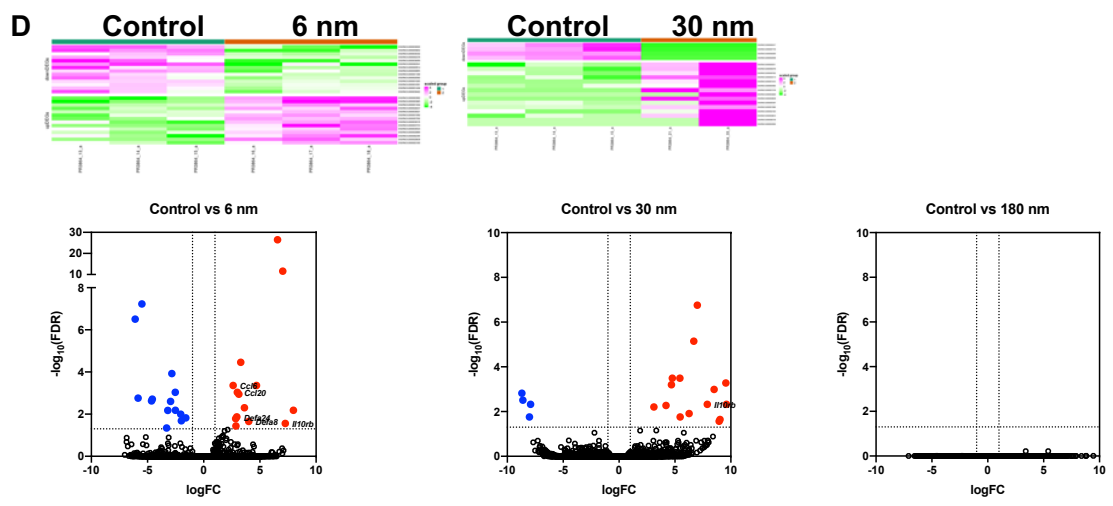
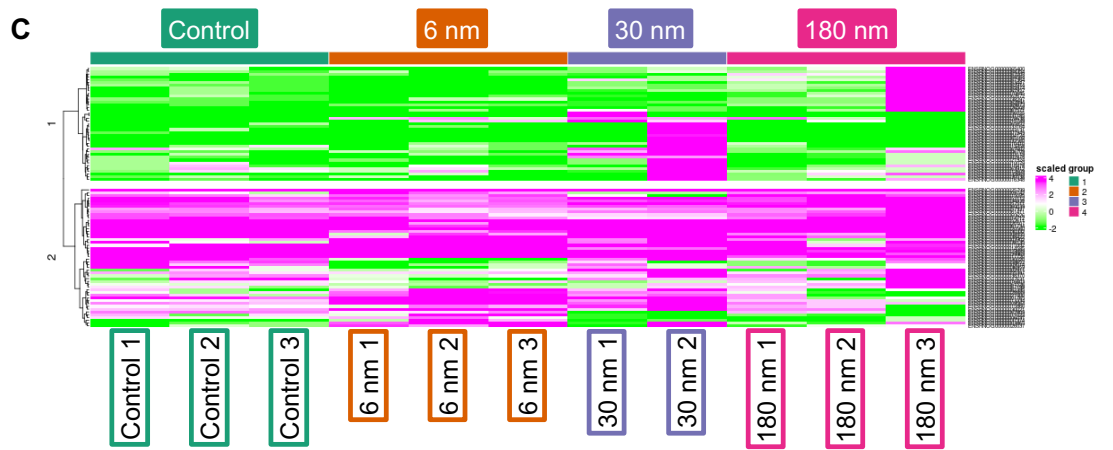
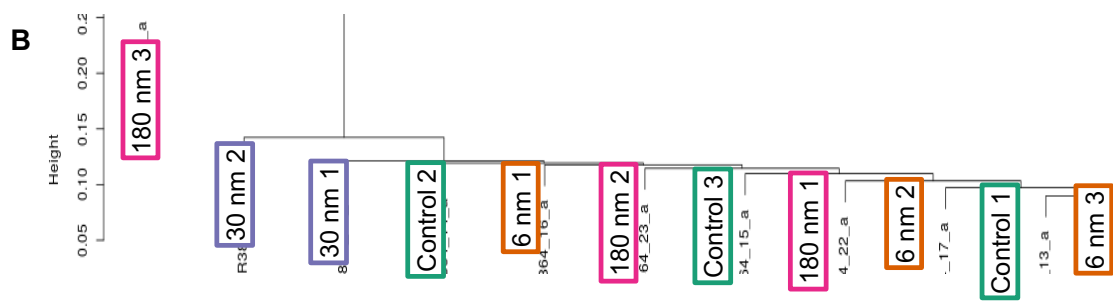
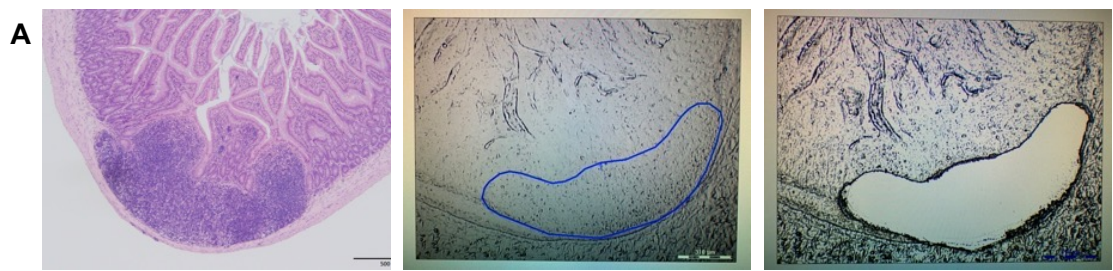


図 1-6. パイエル板に残存した TiO₂凝集体による免疫応答の検討



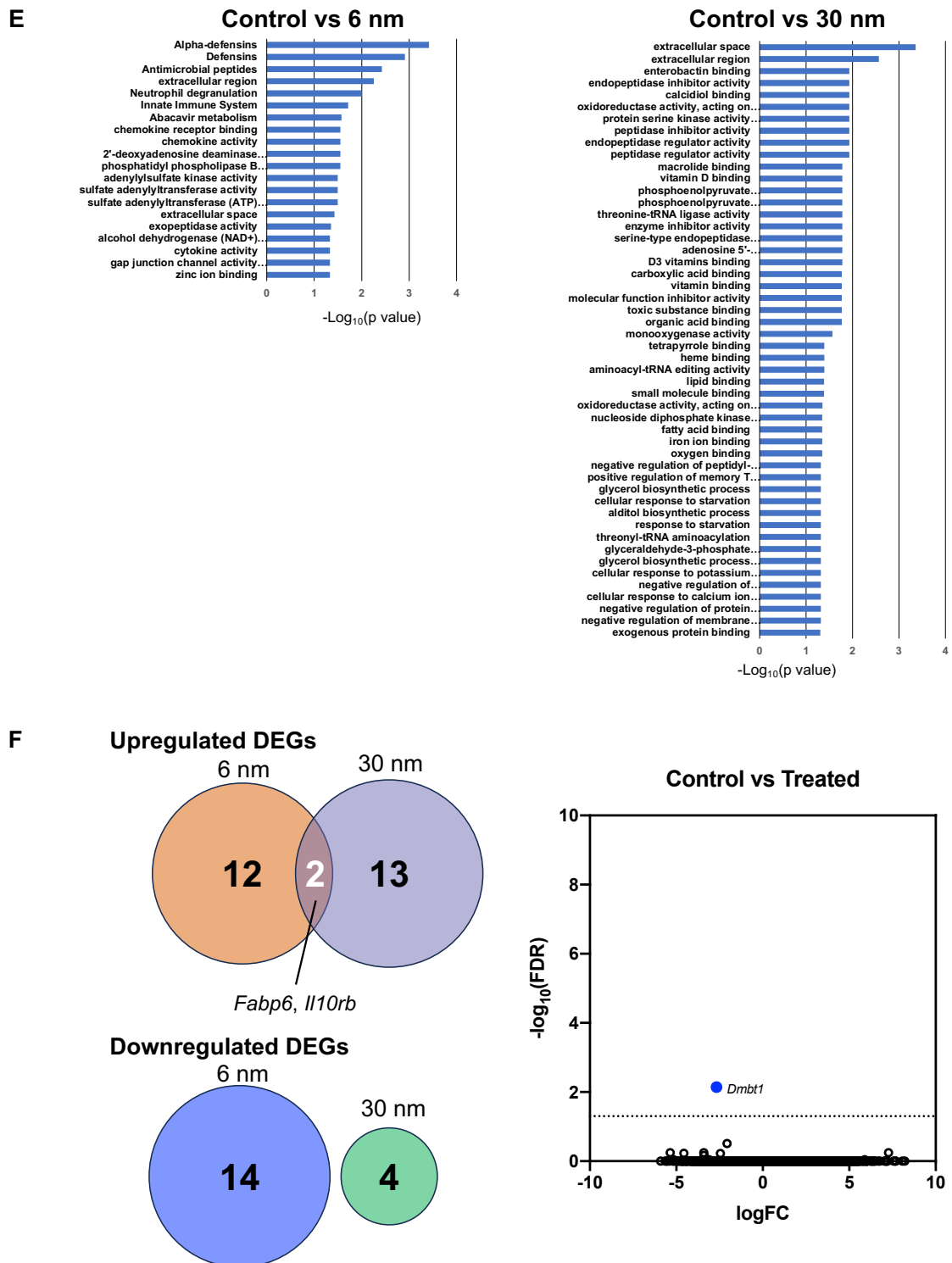


図 1-7. パイエル板の RNA シーケンス解析。(A) パイエル板のレーザーマイクロディセクション、(B) 階層的クラスター分析の樹状図、(C) ヒートマップ、(D) 発現変動遺伝子解析、(E) GO 解析、(F) 二酸化チタン投与群の共通発現変動遺伝子解析。

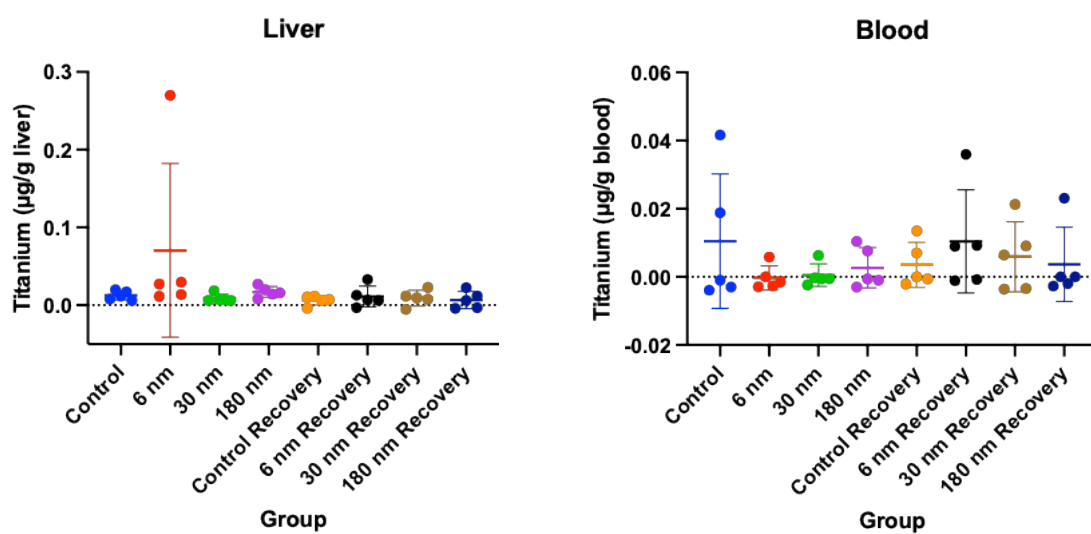


図 1-8. 反復投与直後と 8 週間投与休止後の肝臓および全血チタン濃度

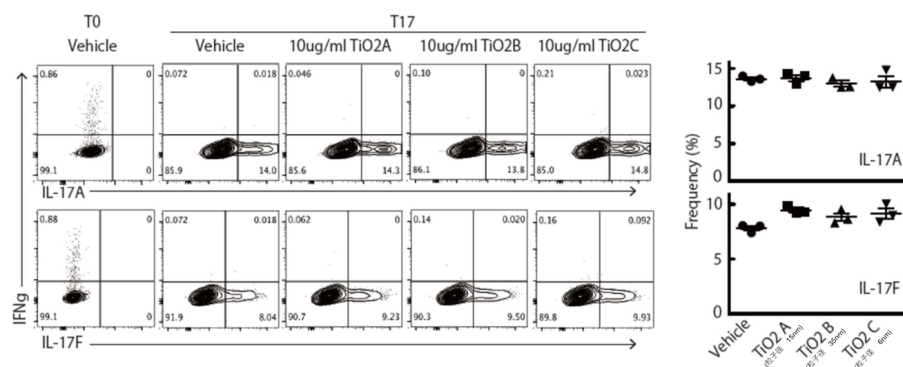


図2-1. TH17細胞分化におけるナノ酸化チタンの影響（細胞内染色）

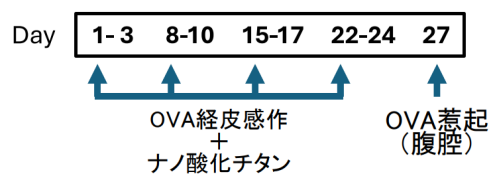


図2-2. 食物アレルギー経皮感作モデル

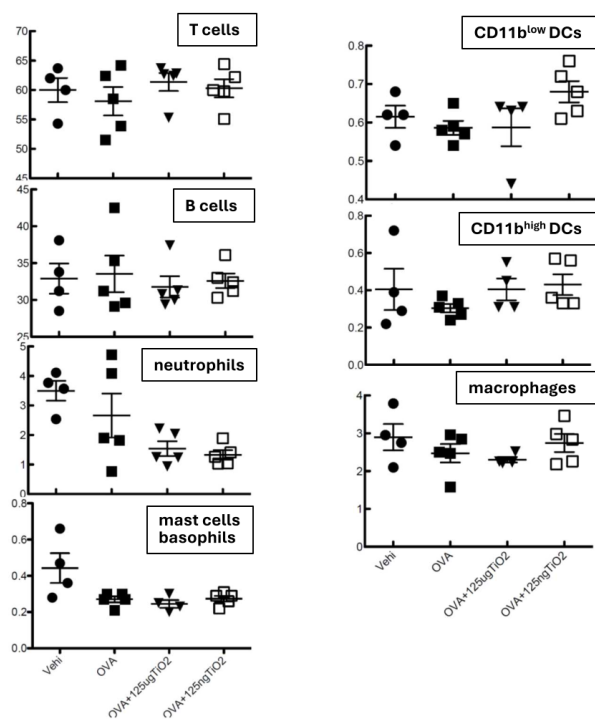


図2-3. ナノ酸化チタンCのOVA経皮感作マウスモデルにおけるリンパ節への影響

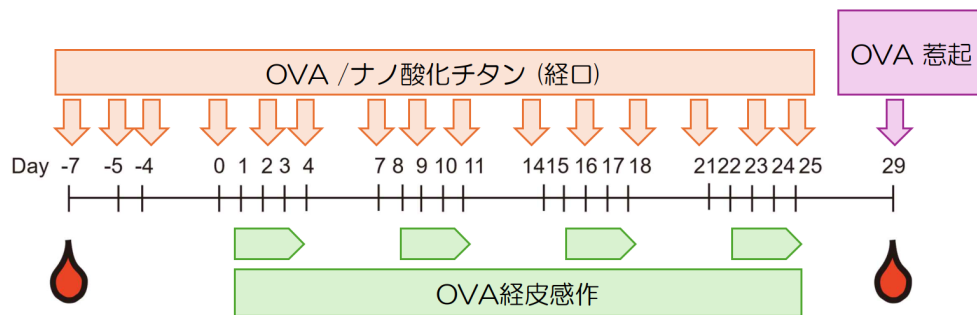


図2-4. OVA抗原の経口免疫寛容モデルの作成

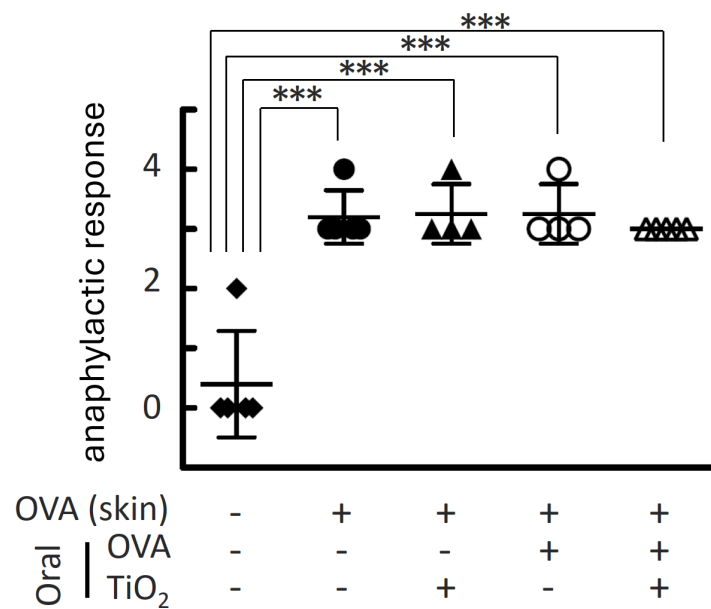


図2-5. ナノ酸化チタンのアナフィラキシーへの影響

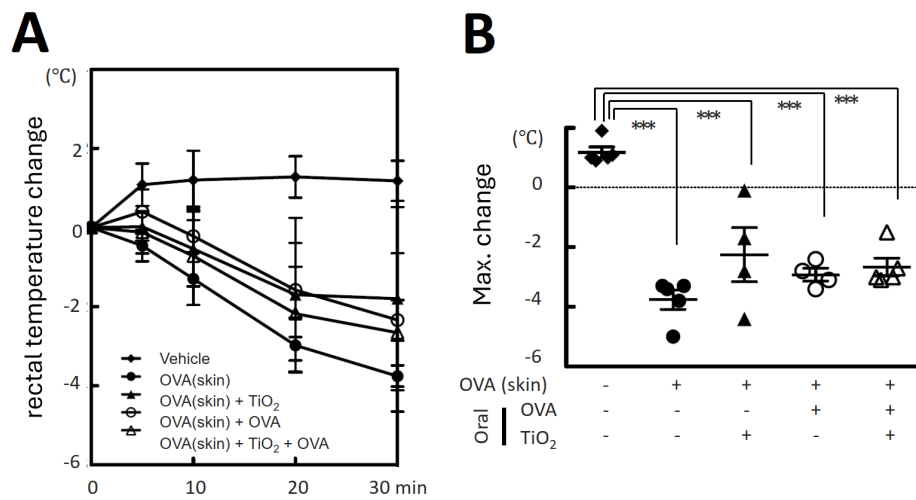


図2-6. 抗原投与による体温変化

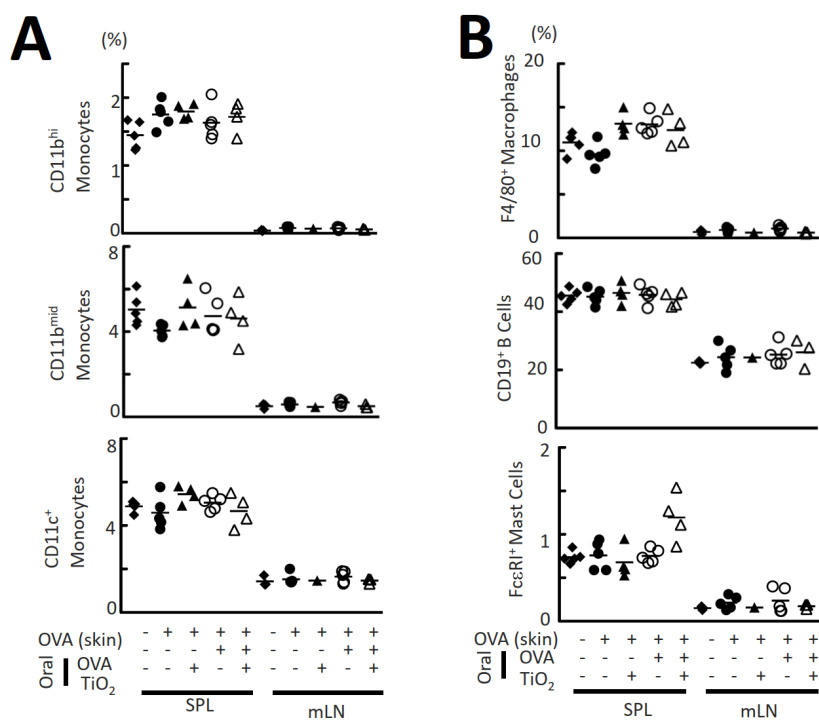


図2-7. 脾臓および腸間膜リンパ節に局在する免疫細胞

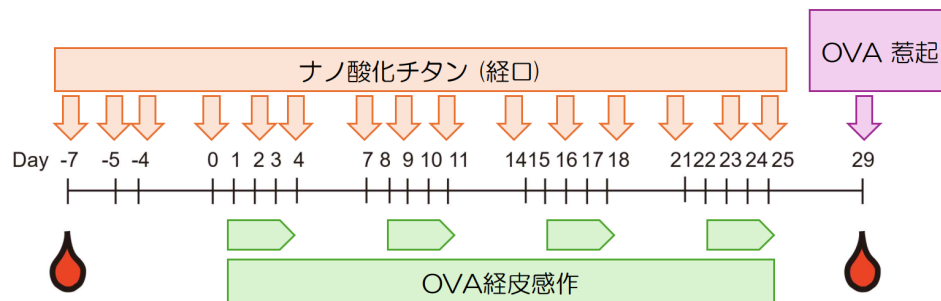


図2-8. OVA食物アレルギーモデルでのナノ酸化チタンの影響に関する検討スケジュール

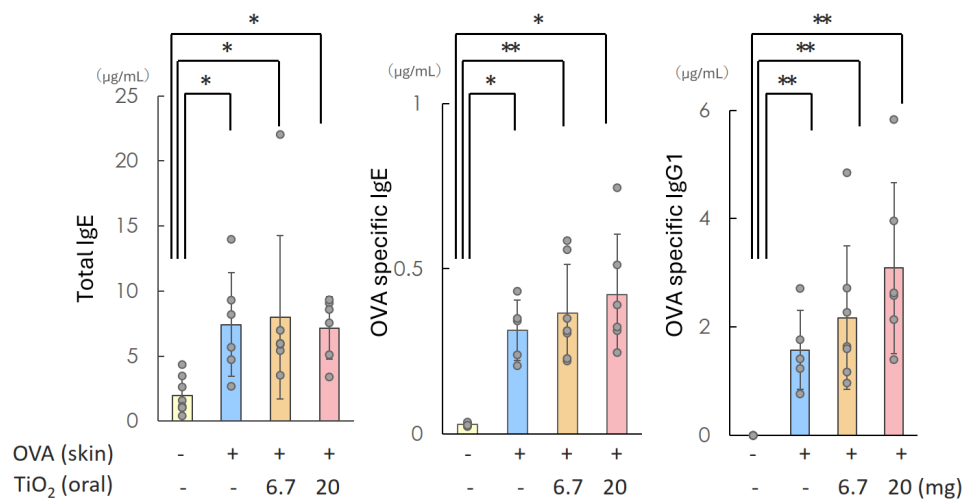


図2-9. 抗原惹起時の血中抗体価

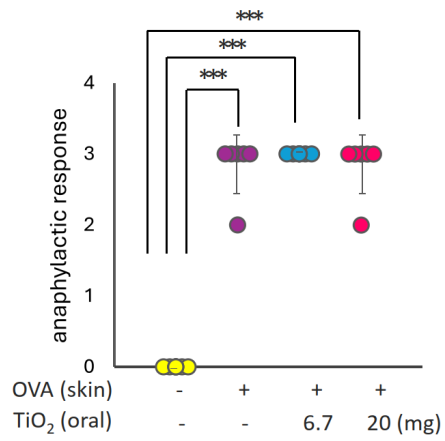


図2-10. ナノ酸化チタンのアナフィラキシーへの影響

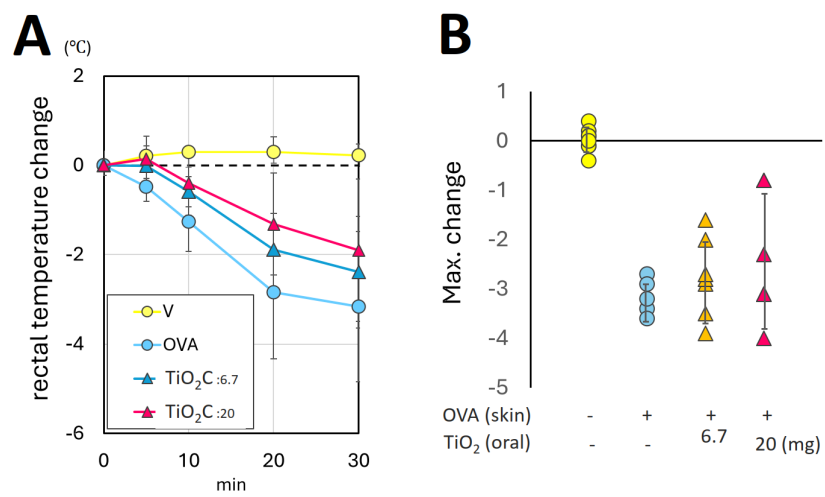


図2-11. 抗原投与による体温変化

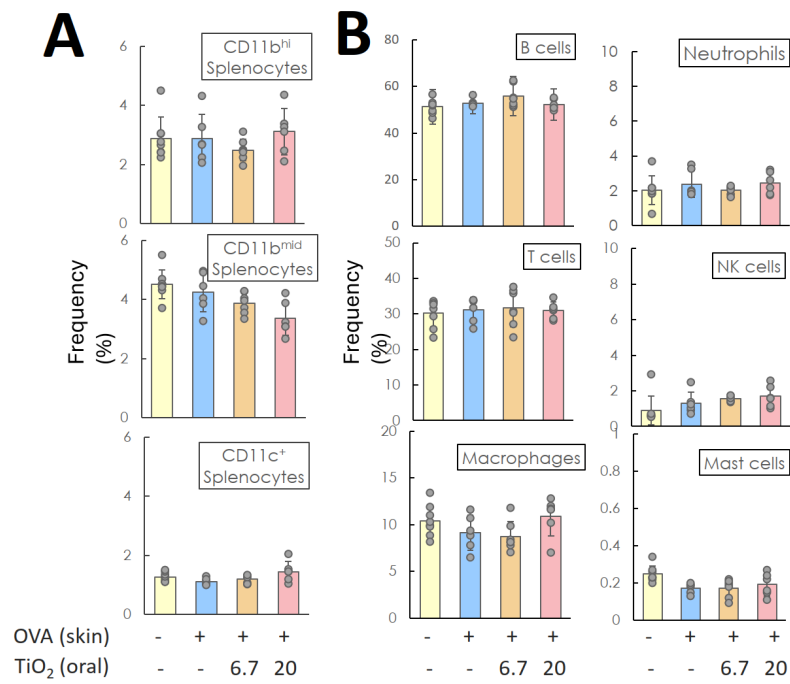


図2-12. 脾臓に局在する免疫細胞

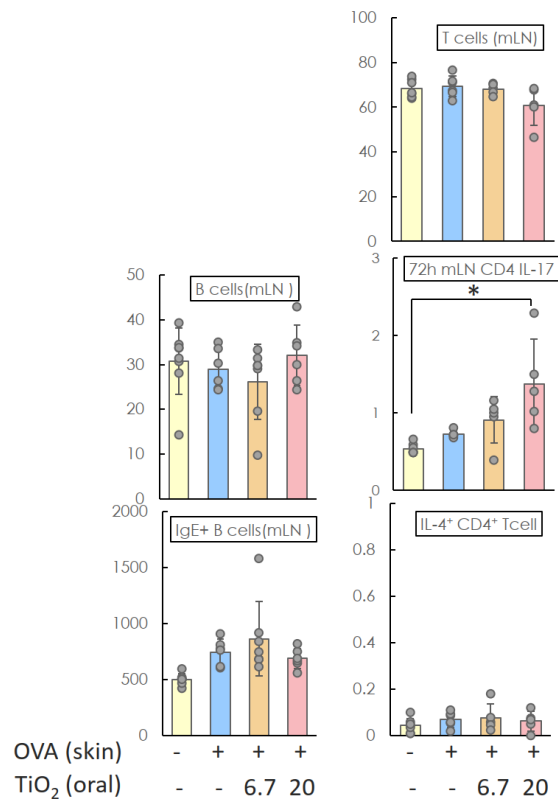


図2-13. 腸間膜リンパ節に局在する免疫細胞

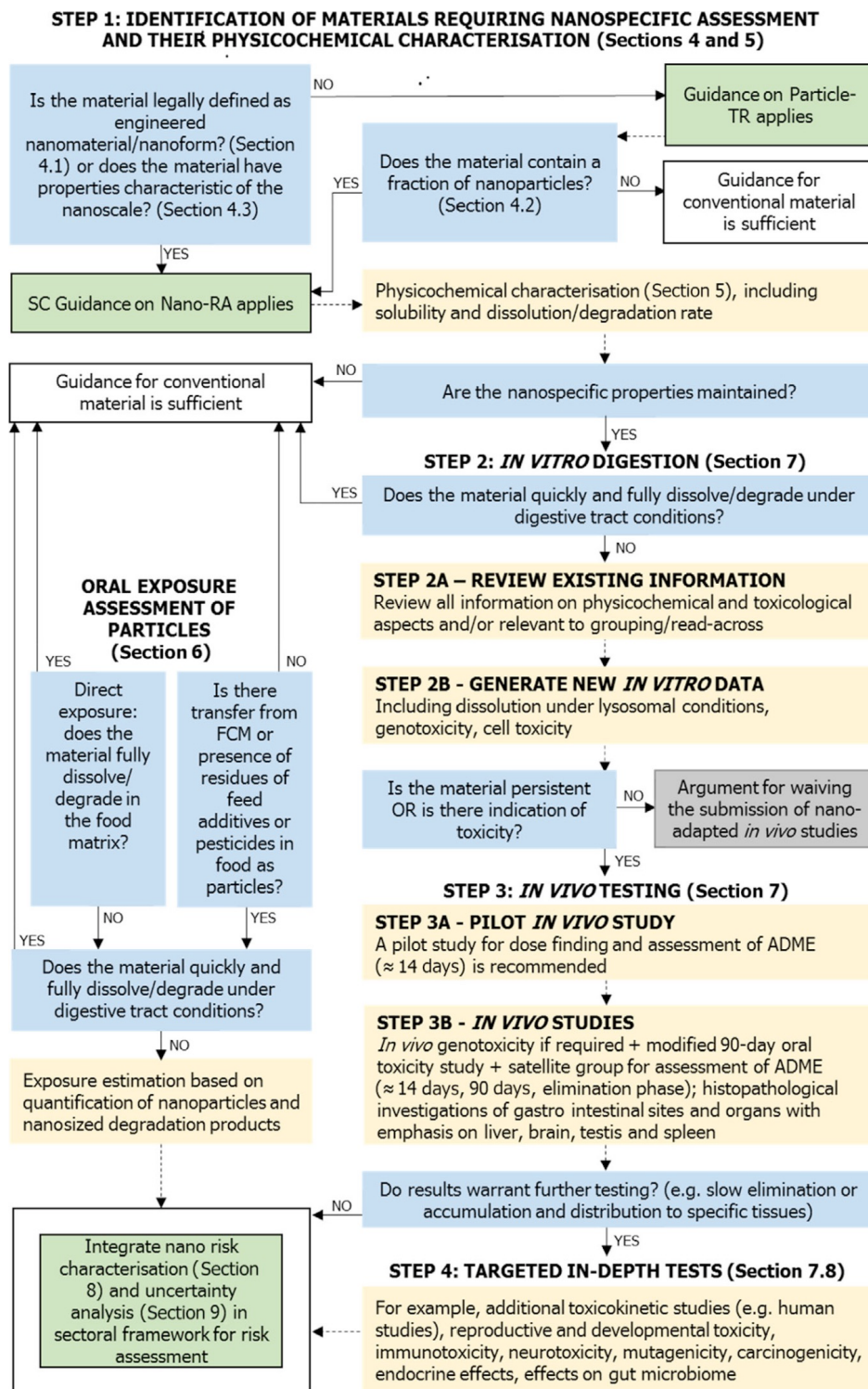


図 3-1. Schematic outline for the implementation of the SC Guidance on Nano-RA
(EFSA ナノガイダンスの Figure 2 より)

別紙 4

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
Jun-ichi Akagi, Yasuko Mizuta, Hirotooshi Akane, Takeshi Toyoda, Kumiko Ogawa	Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats	Particle and Fibre Toxicology	20(1)	23	2023
大野彰子	ナノマテリアルの概要	ファルマシア	-59(7)	629-633	2023
Nishida A, Sawada Y, Arai R, Ishibashi N, Suzuo M, Ohno A, Ashikaga T, Iijima K	Evaluation of the immunotoxicity potential of nanomaterials using THP-1 cells	<i>Front. Toxicol</i>	6(Volume)	-	2024
Ishigamori R, Ohno A, Fukuhara K, Hasegawa S, Totsuka Y	Genotoxicity assessment of mesoporous silica and graphene oxide in GDL1 cells.	<i>Genes and Environment</i>	48	2	2026