

ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析

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

研究要旨

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

A. 研究目的

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては、更なる応用が期待されている一方で、健康影響についてはまだ十分な安全性情報がないとされており、今日も引き続き議論がなされている。酸化チタンは食品・食品用容器包装用途に使用されている一方で、多くの日焼け止め製品に配合されており、経皮及び経口暴露の頻度が高い。ナノ酸化チタン経皮曝露の影響に関しては、これまでに皮膚透過性試験や皮膚感作性試験等が行われているが、いずれも明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ギー経皮感作に与える影響についてマウスモデル実験系を用いて検討し、小粒子径（直径 6 nm）のナノ酸化チタンは、経皮感作時の共存により感作の増強すること、また、経皮感作後の経口追加免疫時の共存によりアレルギー症状を増強する可能性があること等を示してきた。

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

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

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

B. 研究方法

試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン C

(アナターゼ型、粒子径 6 nm)

酸化チタン E

(アナターゼ型、粒子径 30 nm)

酸化チタン F

(ルチル型、粒子径 30-50 nm)

(全て表面未処理)

を使用した。

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

酸化チタンナノ材料の懸濁液調製

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

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

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー (株) より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業 (株)) を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 1 に示す。8 週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間、OVA の PBS 溶液 (1 or 2µg/50µL) を剃毛部に貼付して

経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50µL の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1 クールとし、4 クールの経皮感作を行った。その後、Day 28、30、32、35、37、39、42 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回/週、計 7 回)、追加免疫を行った。この時、ナノ酸化チタン投与群では、OVA 30mg と TiO₂C 1.88mg (OVA:ナノ酸化チタン重量比=16:1) を懸濁させて経口投与した。Day 1、25、43 には部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。Day 49 に OVA 50mg を経口投与し、アレルギー反応を惹起した。追加免疫及び惹起時の経口投与後 1 時間は、マウスの直腸温測定、及び下痢症状の観察を行い、下痢症状については Table 1 の基準に従ってスコアリングした。

【実験 2】より大きいナノ酸化チタンの影響に関する検討

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

統計解析

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

酸化チタン投与群との有意差検定を行い、 $p<0.05$ を有意とした。

(倫理面への配慮)

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

C.研究結果

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

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

本研究課題の初年度である今年度は、上記結果について 1 群 5 匹として再現性を検討した。また、これまでの経皮感作に関する検討の際と同様に、経皮感作時の OVA 用量を $1\mu\text{g}$ 及び $2\mu\text{g}$ の 2 段階に設定し、実験系の精緻化を目指した。ナノ酸化チタン C を共存させる群では、OVA: ナノ酸化チタン重量比は、経皮感作においてナノ酸化チタンによる増強効果が見られた 16:1 とした。

Fig. 2 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ、その後の経口追加免疫によってさらに増加した。追加免疫時の酸化チタン C 共存による顕著な影響は見られなかった。

次に、経口追加免疫、及び経口惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果を、Fig.3 及び Fig.4 に示す。体温に関して、OVA2 群では、経

口追加免疫時及び経口惹起時に、V 群と比較して有意な低下が見られた。OVA2-TiO₂C po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られ、また、経口追加免疫 5 回目では、OVA2 群との比較においても有意な体温低下が見られた。一方、OVA1 群、OVA1-TiO₂C po 群では、V 群と比較して有意な体温低下は見られなかった。下痢症状に関しては、OVA2 群及び OVA2-TiO₂C po 群では、V 群と比較して有意に高いスコアとなった。経口追加免疫 5 回目、7 回目では、OVA2 群と比較して OVA2-TiO₂C po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。一方、OVA1 群、OVA1-TiO₂C po 群では、V 群と比較してやや高いスコアであったが、有意差は見られなかった。これらの結果から、本検討での実験系に関して、経皮感作時に $2\mu\text{g}$ の OVA を用いることにより経口追加免疫・経口惹起が適切に検出可能であること、また、経口投与時の酸化チタン C の共存により経口追加免疫が増強されることが示された。

【実験 2】より大きいナノ酸化チタンの影響に関する検討

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

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

Fの共存による顕著な影響は見られなかった。

次に、経口追加免疫、及び経口惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果を、Fig.6 及び Fig.7 に示す。体温に関して、OVA 群では、経口追加免疫時及び経口惹起時に、V 群と比較して有意な低下が見られた。OVA-TiO₂E po 群、OVA-TiO₂F po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られた。また、経口追加免疫 7 回目において、OVA-TiO₂E po 群では OVA 群との比較においても有意な体温低下が見られ、経口投与時の共存により追加免疫が増強されることが示された。また経口追加免疫 4 回目においても OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。一方 OVA-TiO₂F po 群では、OVA 群の体温低下との間に有意な差は見られなかった。下痢症状に関しては、OVA 群、OVA-TiO₂E po 群、OVA-TiO₂F 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-TiO₂E po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。

なお、陰性対照群である酸化チタン E あるいは F のみを経口投与した群 (TiO₂E only 群、TiO₂F only 群) では、OVA 特異的抗体産生、OVA 経口投与時の体温低下、下痢症状とも見られなかった。

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

D. 考察

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

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

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

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

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

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

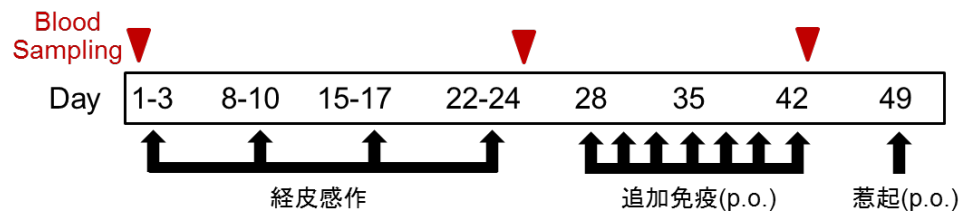
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

投与スケジュール



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

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

※ TiO₂C: 粒子径6nm, アナターゼ型

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

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

※ TiO₂E: 粒子径30nm, アナターゼ型. TiO₂F: 粒子径35-50nm, ルチル型.

Figure 1 各実験群の設定および投与スケジュール

Table 1 下痢症状スコアリングの基準

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

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

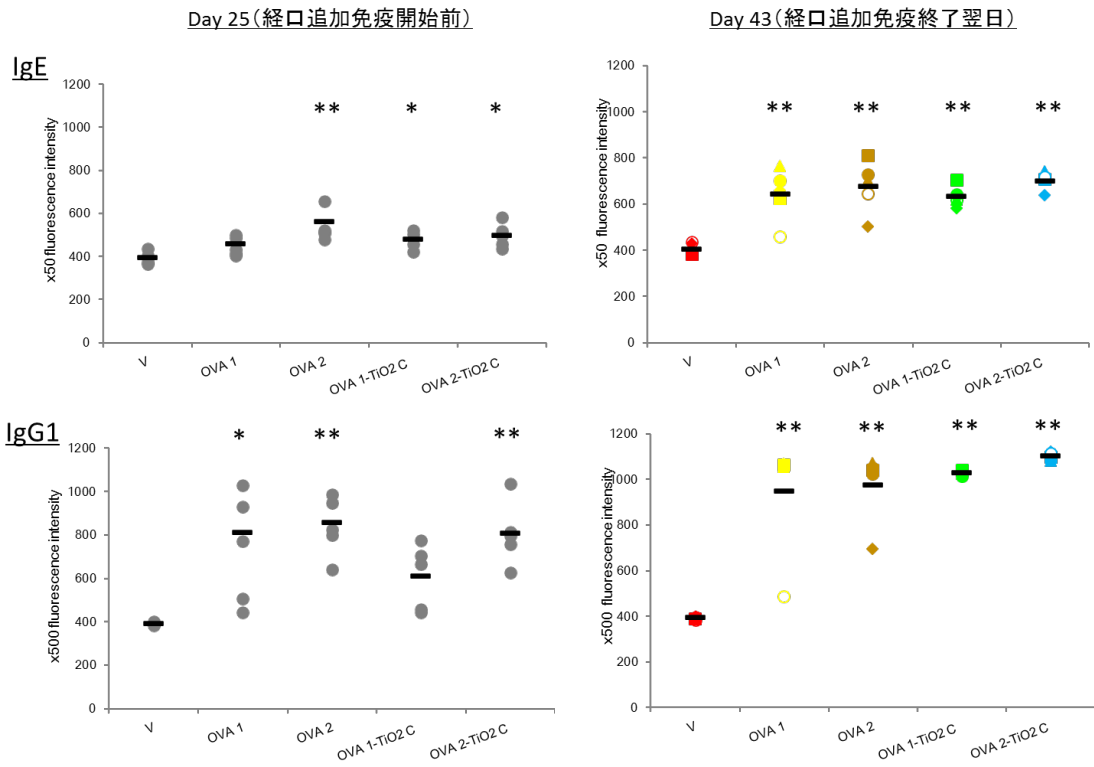
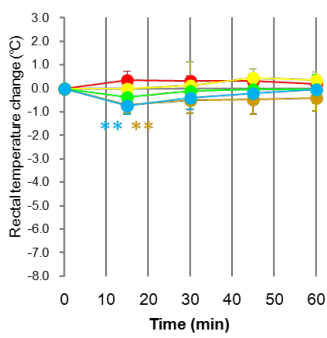
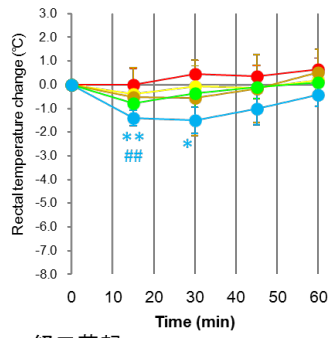


Figure 2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生(【実験1】)
 ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.

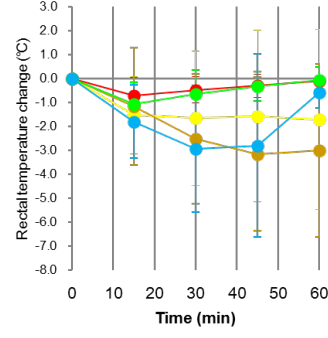
経口追加免疫
 1回目



5回目



7回目



経口惹起

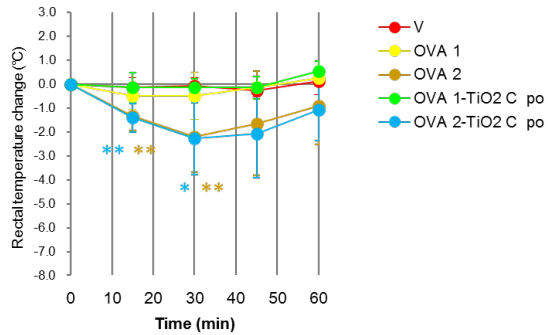


Figure 3 抗原経口投与後の体温低下(【実験1】)
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.
 ## $p < 0.01$ vs OVA2 group by Student's t-test.

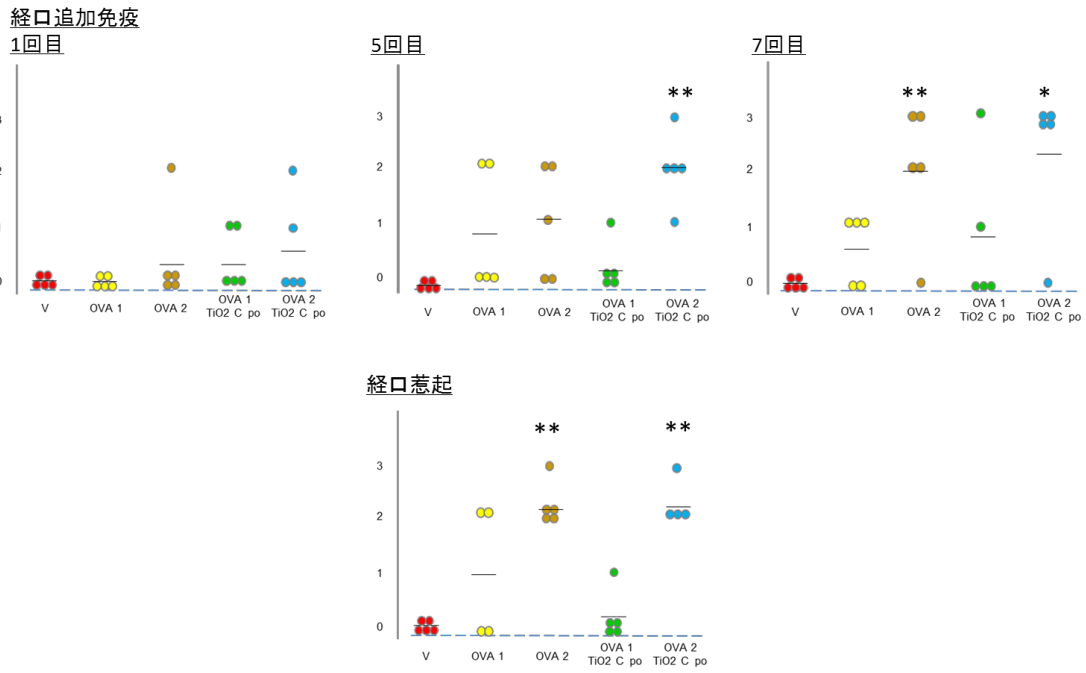


Figure 4 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング(【実験1】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.

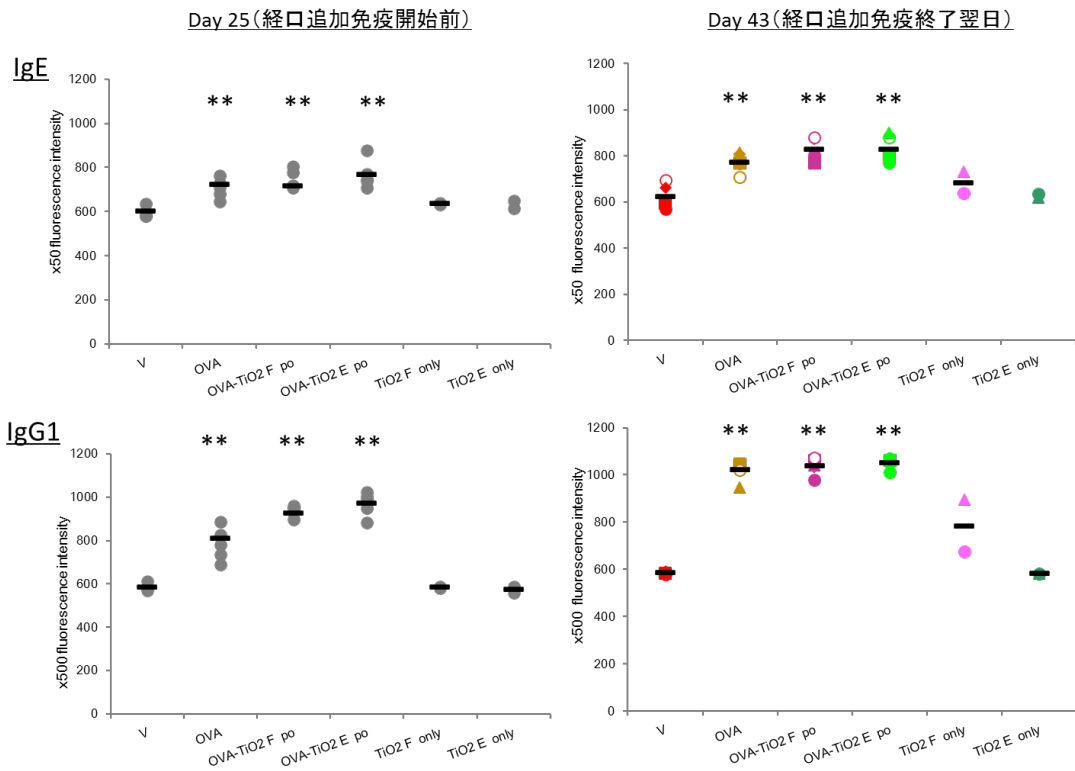
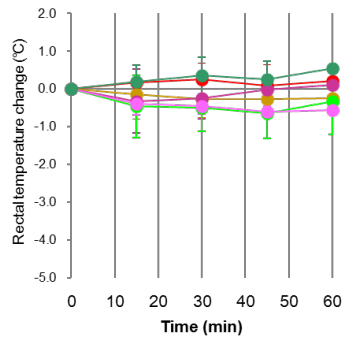
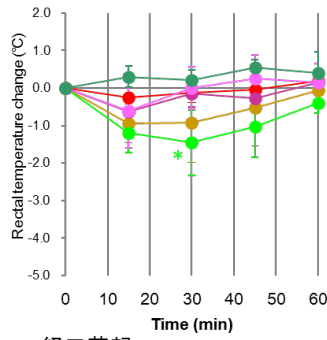


Figure 5 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生(【実験2】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.

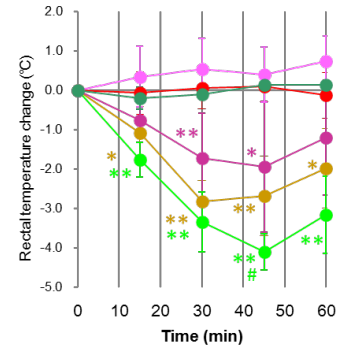
経口追加免疫
1回目



4回目



7回目



経口惹起

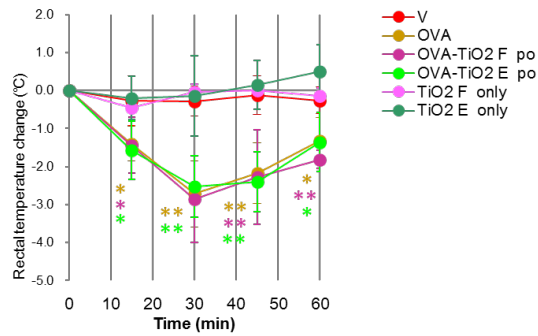
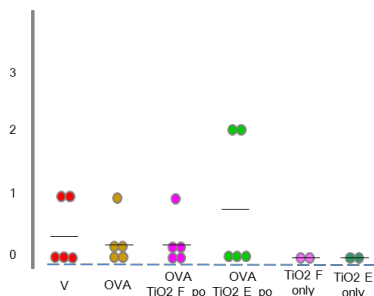
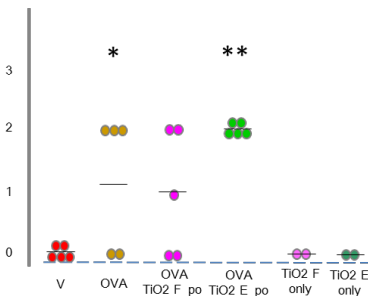


Figure 6 抗原経口投与後の体温低下(【実験1】)
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.
$p < 0.05$ vs OVA group by Student's t-test.

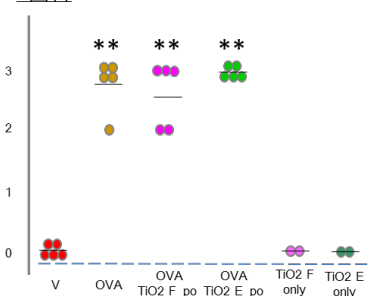
経口追加免疫
1回目



4回目



7回目



経口惹起

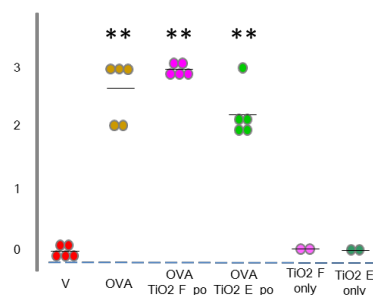


Figure 7 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング(【実験2】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs V group by Dunnett's test.