

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
食品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

令和5年度 分担研究報告書

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

ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

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 第二室長

研究協力者 爲廣 紀正

国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 第三室長

研究要旨

現在、ナノマテリアルは食品及び食品用容器包装などの様々な用途に利用されているが、人に対する安全性への懸念が広がっている。そこで本研究では、ナノ酸化チタンの安全性評価に資するデータを蓄積することを目的とし、ナノ酸化チタンの経口摂取が食物アレルギーの症状発現に与える影響についてモデルマウスを用いた検討を実施する。本年度においては、ナノ酸化チタンに感受性が高い免疫担当細胞を絞り込むため、まず、免疫細胞でのナノ酸化チタンの影響について *in vitro* で解析した。その結果、LPS で刺激したマウス腹腔マクロファージにおいて、ナノ酸化チタンは IL-6 及び IL-10 の産生を抑制し、TNF- α 産生を亢進することが明らかとなった。また、食物アレルギーモデルの抗原の経皮感作において、所属リンパ節での樹状細胞やマクロファージが増加する傾向が認められた。今後、ナノ酸化チタンの経口ばく露が免疫系に与える影響について、モデルマウスにおける免疫応答を中心に、さらなる科学的知見の集積が必要と考えられる。

A. 研究目的

1 mm の 100 万分の 1 の長さを表すナノサイズの原料であるナノマテリアルは、大きさが 100nm 以下の小さな物質と定義される。ナノマテリアルは、分子の大きい同じ原料に比べ、機能性や特性の向上が期待できるため、消費者向け製品への応用が拡大しているが、近年、人の健康や環境に特有の影響を及ぼす可能性を示唆する研究結果が発表され、安全性に対する懸念が広がっている。欧州食品安全機関 (EFSA) では、ナノ酸化チタンについて「遺伝毒性の懸念を排除できない」と 2021 年に評価し、欧州連合 (EU) での食品添加物としての使用が昨年

禁止された。一方、EFSA の評価を踏まえ検討した欧州以外の国際組織等では、EFSA の見解を支持しないと結論づけている評価機関があり、国際的に統一した見解は得られていない。理由として、現在の知見では人の健康への影響を予測するための十分なデータが得られていないことが挙げられる。一方、現状のまま何の対策も講じなければ、今後健康被害の生じる懸念が残る。このため、安全性に関する研究を進展させ、毒性にかかわる科学的知見を収集することが望まれる。

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、いずれも明らかな毒性作用は認められていない。他方、研究分担者である安達らは、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での抗原摂取時に共存した場合、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材料等の新規素材に関する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、経皮・経口暴露による免疫系への影響について検討する。

令和5年度においては、初代培養細胞用いて結晶型や粒子径の異なるナノ酸化チタンの安全性を検証するとともに、食物アレルギーモデルマウスにナノ酸化チタンをばく露し、免疫毒性関連パラメータの変動を検討した。

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 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。

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。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。

【実験 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

マウス由来リンパ球は、国立国際医療研究センター研究所で飼育されている Ahr 欠損マウスおよび B6 マウスのリンパ組織から回収した。CD25^{hi}CD44^{low} の CD4 陽性ナイーブ T 細胞はセルソーター (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、TH17 細胞への分化について FACS により解析した。腹腔マクロファージは、マウス腹腔に PBS を加えた細胞を回収した後、3 時間 CO₂ インキュベーター内で培養し、接着した細胞を腹腔マクロファージとして使用した。1 群の匹数は 3 匹とした。

【実験 2】粒子径 6nm 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。投与スケジュールを図 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)。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 125ng/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 50mg 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。

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及び国立国際医療研究センター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】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

ヒト単核球細胞株 (THP-1 細胞) に、経口および経皮からのばく露の可能異性が高い食品・食品用容器包装用途のナノマテリアルとしてナノ酸化チタン A を処理した際、IL-1 β の活性化を介し、TNF- α 産生を増強することを先行研究により示している。そこで本研究では初代培

養細胞に対するナノ酸化チタンの影響を検証することを目的とし、マウス腹腔から採取したマクロファージについてナノ酸化チタンが与える影響を検討した。ダイオキシンレセプターとして知られている芳香族炭化水素受容体 (Ahr : Aryl hydrocarbon receptor) はマクロファージにおける自然免疫応答において重要な役割を果たすことが知られている。ナノ酸化チタンは、多環芳香族炭化水素 (PAHs) であるベンゾピレンの Ahr への結合を拮抗的に阻害する可能性があるため、Ahr ノックアウトマウスを用いて解析を実施した。図 2 に LPS で刺激した腹腔マクロファージが産生したサイトカインの測定結果を示す。ナノ酸化チタンを処理したマクロファージでは、コントロールの無処理のマクロファージに比べ LPS 刺激による IL-6 や IL-10 産生は低値を示したが、TNF- α 産生が促進された。なお、ナノ酸化チタン処理による炎症性サイトカイン産生量の変化については、Ahr との明確な関連性は認められなかった。

CD4T 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 CD4T 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、TH17 細胞への分化について検討したところ、いずれ形状のナノ酸化チタンも影響は認められず、Ahr 欠損 CD4T 細胞の TH17 細胞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。(図 3、4) また、TH1、TH2、制御性 T 細胞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。(data not shown)

【実験 2】粒子径 6nm のナノ酸化チタンの影響に関する検討

抗原経皮感作系を用いた、アレルギー感作時

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。

令和 5 年度においては、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。各群の実験条件、及び実験全体のスケジュールを図 1 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 μ g と 125ng の二群に設定した。図 5 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 125ng 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ァージが増加する傾向が示された。

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が、免疫細胞に与える影響について検討した。

マクロファージに対する影響について検討す

るためナノ酸化チタン C (粒子径 6 nm・アナターゼ型) に関して、マウスの腹腔から採取したマクロファージに対する効果について検討した。筆者らによるこれまでの検討では、酸化チタン A が THP-1 細胞の IL-1 β や TNF- α の産生を増強することを示している。本検討においても、ナノ酸化チタン C により LPS 刺激を受けた腹腔マクロファージでの TNF- α 産生を増強することが示され、正常細胞に対しても同様の効果を持つことを確認した。また、炎症抑制性のサイトカイン IL-10 の産生については抑制的に働いており、生体でより炎症応答をより増強する可能性が示された。なお、T 細胞分化におけるナノ酸化チタンの影響については、被験物質のナノ酸化チタン 3 種とも特に観察されず、影響があったとしても限定的であると示唆される。

ナノ酸化チタンの生体での免疫細胞への影響について検討するため、酸化チタン C (粒子径 6 nm・アナターゼ型) に関して、抗原ばく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 C は、OVA 経皮感作時に共存させることにより、経口惹起を増強することを示している。本研究の検討においては、経皮感作時にナノ酸化チタン C が共存すると、所属リンパ節において樹状細胞やマクロファージが増加する傾向が示された。したがって、ナノ酸化チタンの経皮感作時のアジュバント効果に関して、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ことが示された。今後、粒子径が異なるナノ酸化チタンの生体内での影響について検討を進める必要があると考えられる。

E. 結論

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。マウスから採取した初代培養細胞においては、LPS で刺激したマウス腹腔マクロファージにおいて、ナノ酸化チタンは IL-6 及び IL-10 の産生を抑制し、TNF- α 産生を亢進することが明らかとなった。また、食物アレルギーモデルの抗原の経皮感作において、所属リンパ節での樹状細胞やマクロファージが増加する傾向が認められた。今後、ナノ酸化チタンの経口ばく露が免疫系に与える影響について、モデルマウスにおける免疫応答を中心に、さらなる科学的知見の集積が必要と考えられる

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 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



図1 食物アレルギー経皮感作モデル

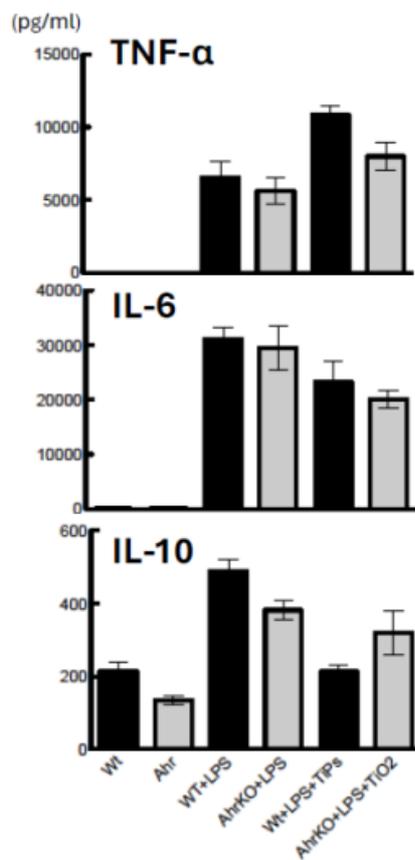


図2 LPS刺激を受けた腹腔マクロファージにおけるサイトカイン産生

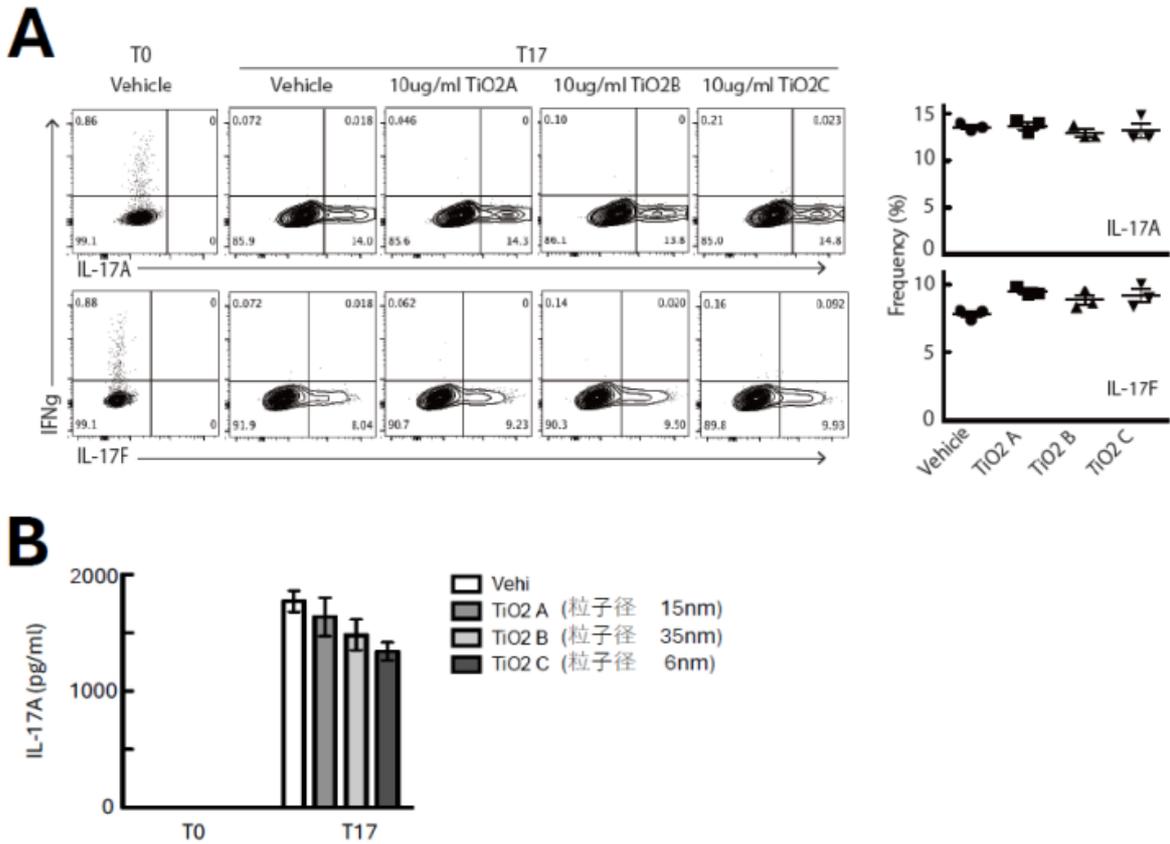


図3 TH17細胞分化におけるナノ酸化チタンの影響 A) 分化誘導後の細胞内染色 B) 培地中に分泌されたIL17A量

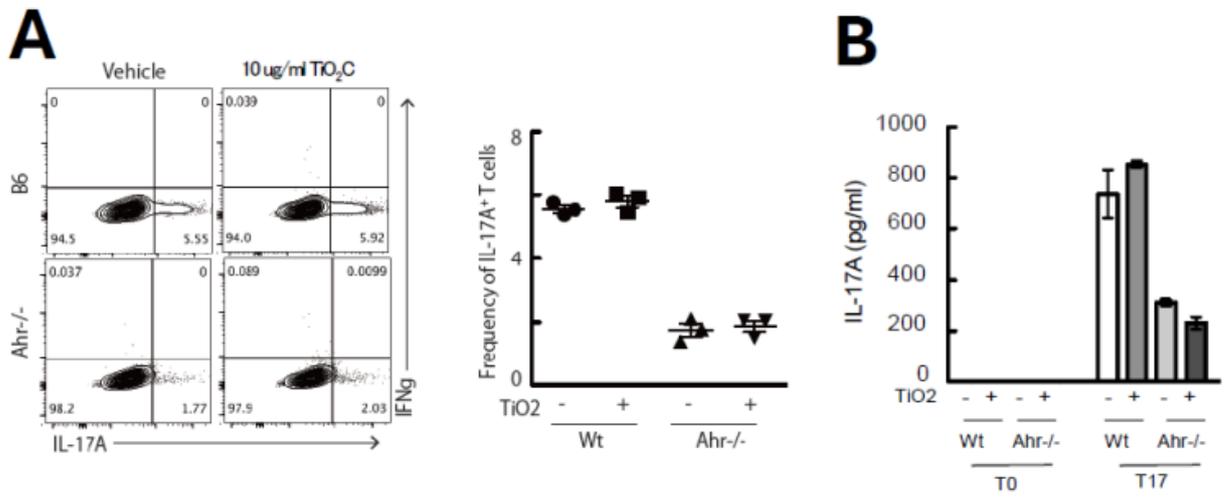


図4 TH17細胞分化におけるナノ酸化チタンCの影響 A) 分化誘導後の細胞内染色 B) 培地中に分泌されたIL17A量

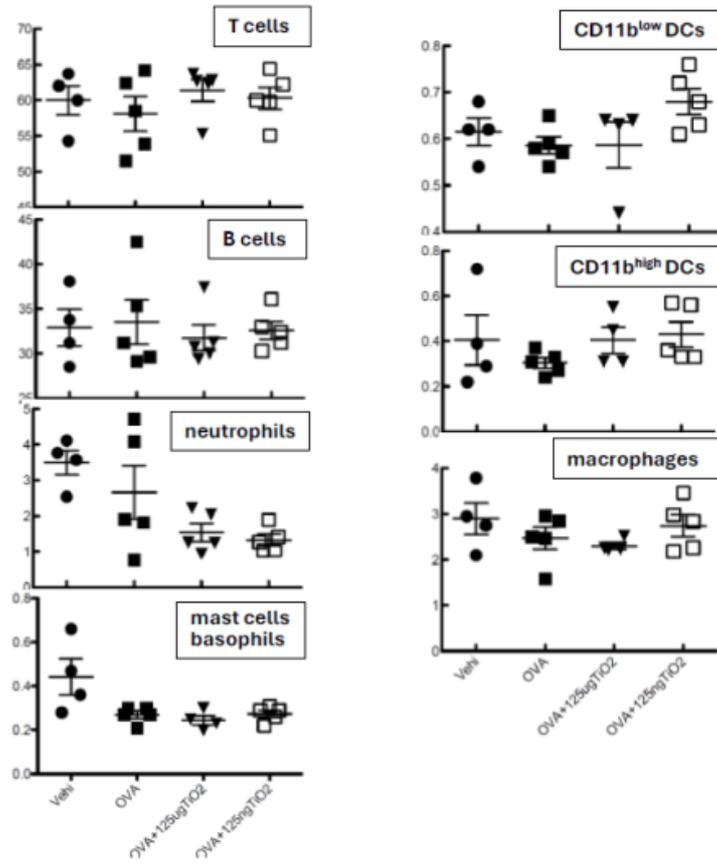


図5 ナノ酸化チタンCのOVA経皮感作マウスモデルにおけるリンパ節への影響