

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5年度)

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 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長)

研究要旨

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する。

二酸化チタンの毒性影響については、我々はラットを用いたこれまでの研究で、結晶子径 6 nm の TiO_2 粒子の 90 日間反復経口投与による影響は認めないことを明らかにしている。そこで異なる結晶子径 (6、30、180 nm) の TiO_2 粒子の 90 日間反復経口投与による生体影響を調べたところ、結晶子径 180 nm の TiO_2 粒子の 90 日間反復経口投与により、肝臓チタン濃度の微量の増加が見られた。このことから反復経口投与した TiO_2 粒子が肝臓に到達しうることが示されたため、異なる結晶子径の TiO_2 粒子による DNA 鎖切断の誘発について $\gamma\text{-H2AX}$ の免疫染色像を指標として検討したところ、いずれの群でも $\gamma\text{-H2AX}$ の誘導は見られず DNA 鎖切断は誘発されていないことが示された。臓器重量、病理組織学的検査、および血液生化学において肝毒性の指標となる変化が見られなかったことと合わせて、これらのさまざまな結晶子径の TiO_2 粒子は肝臓への毒性影響を示さないことが示唆された。消化管吸収と二次粒子径の関連を調べるため、透過型電子顕微鏡による正確な粒度分布解析を実施したところ、二次粒子径は 6 nm < 180 nm < 30 nm の順であり、ナノ粒子の割合が最も高いのは 6 nm の TiO_2 粒子であった。したがって、180 nm 群で見られた肝臓へのチタンの蓄積は単に二次粒子径が小さいことによるものではなく、 TiO_2 粒子の消化管吸収に関わる要因についてはさらなる検討が必要と考えられた。 TiO_2 アグロメレート (凝集体) の沈着が見られた小腸パイエル板において、マクロファージによる粒子の貪食像が見られたことからマクロファージ関連サイトカインである IL-6 および TNF- α の発現を調べたところ、いずれの群でもこれらの発現に変化は見られなかった。引き続き、RNA シークエンスによるパイエル板の網羅的遺伝子発現解析を進めている。

また、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は、モデルマウスを用いた検討を実施している。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。

一方、食品関連分野で使用されるナノマテリアルは、欧州では新たな物質として認識されている。そのため、安全性評価のためのガイダンスや法律の整備が積極的に進められている。ナノマテリアルは、特有の物理化学的性質から、従来の物質とは異なる潜在的な有害性を持つ可能性があるという懸念が提起されている。特に、食品及び食品用容器包装用途に使用され、特に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は、我が国のナノ粒子のリスク評価においても、特性を踏まえた新たなリスク評価の必要性がある。従って、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が必要となることか

ら、本研究では、食品関連分野のナノマテリアル等の新規素材の毒性試験法に関する国際動向を調査することを目的とする。令和5年度は、初期評価的観点から遺伝毒性和酸化ストレスに焦点をあて、2021年7月にEFSAが発行した“Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health” (Nano-RAに関するガイダンス)の内容を中心に、欧州食品分野における遺伝毒性・酸化ストレスに関する試験法や評価手法について調査を実施した。

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

研究分担者：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：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 協力研究員

研究協力者：広瀬 明彦

一般財団法人化学物質評価研究機構

ナターゼ型二酸化チタン (TiO_2) 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 TiO_2 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 TiO_2 が消化管から生体内に取り込まれることが示唆されている。そこで本研究では結晶子径の異なる TiO_2 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5年度は、異なる結晶子径を持つ TiO_2 粒子の消化管を介した組織への沈着について、量的・質的検討を行うとともに、免疫染色および RNA シークエンシングによりパイエル板におけるナノ酸化チタン投与に関連するシグナルを検討する。

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する。

A1. 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

我々のこれまでの研究で、結晶子径 6 nm のア

A2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

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マテリアル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、初代培養細胞を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。

A3. 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

近年のテクノロジーの進歩により、ナノマテリ

アルを活用した新規素材が産業界で広く受け入れられ、食品および飼料製品や物質材料分野での新たな応用が期待されている。一方で、ナノマテリアルの安全性についての懸念が増大しており、健康への影響やリスク管理が重要な課題となっているが、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。

欧州食品安全機関 (EFSA) においては、食品および飼料製品に使用されるナノマテリアルのリスク評価に関する、食品や飼料製品の申請におけるナノマテリアルの安全性と曝露に関する科学的な知識を向上させるためのガイダンスを提供している。2021 年 7 月に EFSA が発行した「Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health」は、食品および飼料チェーン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である。

本ガイダンスでは、ナノマテリアルの物理化学的特性、曝露評価、および有害性特性の評価に関する科学的な洞察について考慮されている。また、ナノマテリアルの物理化学的特性の評価や測定すべき主要なパラメータ、ナノマテリアルの特性決定に使用できる方法と技術、複雑なマトリックス中でのその決定について具体的に詳述している。さらに、曝露評価と有害性の同定と特性評価や、ナノ特異的な考慮事項に関連する *in vitro* / *in vivo* 毒性学的研究について議論されており、各種エンドポイントとなる毒性学的試験の段階的なフレームワークについて概説されている。

本研究では、食品関連分野で使用あるいは混入する可能性のあるナノマテリアル等の新規素材の毒性試験法に関する国際動向調査を実施する。令和5年度は初期評価の観点から遺伝毒性と酸化ストレスに焦点をあて整理した。

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. 肝臓中のチタン濃度再測定

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。前回測定ではブランクにチタンが検出されたため器具を新規購入し洗浄を行なって十分に低いブランク結果が得られることを確認してから実施した。またコリジョンガスを酸素から酸素+ヘリウムに変更した。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。

B1-2. 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、フォー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 200 kV 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。

B1-3. 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 および TNF- α) または 10%ウサギ血清 (IL-18) を用いて室温で 30 分間ブロッキングした。一次抗体 (γ -H2AX (Cell Signaling

Technology, Danvers, MA, USA) : 1000 倍希釈、IL-18 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) : 500 倍希釈、TNF α (Abcam, Cambridge, UK) : 1000 倍希釈) を 4°C で一晩反応させ、適切な動物種のヒストファインシンプルステインラット MAX-PO を二次抗体として用い、3,3'-diaminobenzidine 化学発色により検出した。

B1-4. レーザーマイクロダイセクション (LMD) によるパイエル板の RNA シークエンス解析

パイエル板を含む小腸ホルマリン固定パラフィン包埋 (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 ゲージの注射針 (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, NLD) で脱パラフィン化した後、RNeasy FFPE kit (Qiagen) で RNA を抽出した。RNA 品質検定、ライブラリー作製、および RNA シークエンス解析はタカラバイオ株式会社 (東京) に委託して実施した。

B1-5. 統計学的処理

臓器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。

B2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

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。

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 回繰り返す、最後に 25G 注射針付きのシリンジを用いて攪拌し均一化した。

【実験 2-1】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 2-2】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。

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

初期評価の観点から遺伝毒性と酸化ストレスについての評価書事例に関する情報収集を実施するため、2021 年 7 月に EFSA が発行した“Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health”（以下、「Nano-RA に関するガイダンス」）の記載内容を中心に、欧州食品分野における遺伝毒性・酸化ストレスに関する試験法や評価手法について調査を実施した。

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. 肝臓中のチタン濃度の再解析

これまでの研究で 180 nm 群の肝臓でチタン濃度のわずかな増加が見られたが、バックグラウンド値（ブランク）と肝臓検体のチタン濃度の差が小さく、検出下限（3 σ ）を満たしていなかったため、肝臓中のチタン濃度について予備サンプルを用いて再測定を実施した。委託先との綿密な議論による測定条件再検討の結果、複数回測定したブランクのチタン濃度がいずれも不検出となる条件での測定を実施することができた。その結果、より低い p 値（ $p < 0.01$ ）で 180 nm 群の肝臓でチタン量の有意な増加を検出することができ測定結果の信頼性が向上した。ただし、対象群と比較したチタンの濃度の差は 75.9 ng Ti/g 肝臓と微量であり、肝臓毒性を示唆する所見はいずれの群でも認められなかった。また、DNA 鎖切断マーカーである γ -H2AX の誘導はいずれの群でも見られなかった。

C1-2. 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。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。

C1-3. パイエル板マクロファージ活性化の検討

パイエル板に沈着した TiO₂ アグロメレートの一部はマクロファージに貪食された像が見られたことから、マクロファージ関連サイトカインとして IL-18 および TNF- α の発現を免疫染色により検討した。その結果、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。

C1-4. パイエル板の RNA シークエンス解析

パイエル板は空腸と回腸にそれぞれ存在するが、TiO₂ アグロメレートの沈着が多く見られる傾向があった空腸のパイエル板を優先的に解析に供することとした。ただし、FFPE 検体の RNA は分解が進んでいることが予想され、トータル RNA 量が多いほどライブラリー作製に成功する確率が上昇するため予備検体として回腸パイエル板からも抽出を実施した。抽出した RNA の品質チェックの結果、いずれの試料も高度に分解が進んでいたものの、おおむねライブラリー作製可能性のある RNA サンプルが得られた。ただし、30 nm 群では DV200 (200 塩基長以上の RNA の割合) が 30%以上のサンプルが得られず、この群のデータが 1 個体も得られないことが懸念されたため、No. 21 については空腸と回腸のパイエル板由来の RNA を両方用いてライブラリー作製を実施した。その結果、No. 23 のみライブラリー品質検定で不適合となったがそれ以外のサンプルでは品質基準を満たすライブラリーが作製できた。また No. 23 についてもシークエンス解析が成功する可能性があったため、すべてのサンプルについて RNA-シークエンスを実施したところ、すべてのサンプルについてシークエンスデータを取得することができた。ただし、ラットリファレンスへのマッピング率が全体として

7 割前後と、通常の RNA シーケンスと比較して低い結果であった。

C2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性

【実験 2-1】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-1b の活性化を介し、TNF-a 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-a 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 2-2】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。

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 125µg 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。

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

■ 「Nano-RA に関するガイダンス」における 遺伝毒性試験に関する概要

➤ *in vitro* 遺伝毒性試験

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（遺伝子変異、構造的および数的染色体異常）を考慮すべきであり、各々について評価事例と試験法の必要性について推奨されていた。

i) 遺伝子変異の検出は、ナノマテリアル内在化能力の観点から、Hprt と xpirt 遺伝子を用いる哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験 [OECD TG 476 (OECD, 2016b)] および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 (OECD, 2016e)] が推奨されていた。

- 遺伝子変異を誘発する試験法：

遺伝子変異の検出には、通常、Ames 試験を推奨しているが、ナノマテリアルは細菌の細胞壁を透過できない可能性を有する。一方、細菌細胞は哺乳類細胞と異なり、内在化能力を持たないことから (Doak et al., 2012)、OECD の工業ナノ材料作業部会 (WPMN) での遺伝毒性に関する専門家会議では、Ames 試験 [OECD TG 471 (OECD, 1997)] はナノマテリアルの遺伝毒性を調べる方法として推奨されないと結論づけられた (OECD, 2014a)。この観点から、哺乳類細胞モデルの使用がより適しているものと考えられた。従って、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 (Hprt) とキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ (xpirt) 遺伝子を用いる哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験 [OECD TG 476(OECD, 2016b)]、および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(OECD, 2016e)]がいずれも適切であると説明されていた。

更に、REACH 附属書 VIII では、「8.4.1. 細菌を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験」が収載されており、本試験ではナノフォームが適切でない場合は、実施する必要はないと述べられていた。この場合、哺乳類細胞における 1 つ以上の *in vitro* 変異原性試験 (附属書 VIII、8.4.2 項および 8.4.3 項または国際的に認められた他の *in vitro* 方法) を含む他の試験を提供すべきであると述べられていた。

ii) 構造および数的染色体異常に関する試験法：

哺乳類細胞を用いる *in vitro* 小核試験[OECD TG 487(OECD, 2016c)]について挙げられていた。本試験法についての留意点としては、小核のバックグラウンドレベルが 2% と同等かそれ以下であることや、被験物質の内在化の確認の重要性について述べられていた。具体的な内容について以下に示す。

- 構造および数的染色体異常に関する試験、すなわち哺乳類細胞を用いる *in vitro* 小核試験 [OECD TG 487 (OECD, 2016c)]：

細胞核への粒子の浸透が低い可能性を考慮し、有糸分裂時の核膜溶解後にナノマテリアルが DNA と接触しやすくするために、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していた (Elespuru et al., 2018)。また、試験でサイトカラシン B を使用する場合は、エンドサイトーシスを阻害してナノマテリアルの細胞取り込みを減少させる能力があるために、ナノマテリアル処理後の細胞培養物への添加を遅らせなければならないことや (Gonzalez et al., 2011 ; Doak et al., 2012 ; Magdolenova et al., 2012 ; Pfuhler et al., 2013)、小核の目視観察は時間がかかるため、自動イメージングシステムやフローサイトメトリーなどのハイスループット小核検出法の開発が進んでいると述べられていた (Bryce et al., 2007 ; Shibai- Ogata et al., 2011 ; Seager et al., 2014)。

光学的に活性なナノマテリアルはフロースコア解析に干渉する可能性があるため、フローサイ

トメトリーによる小核検出を適用する際には注意が必要であり (Li et al., 2017 ; Nelson et al., 2016)、ナノ粒子の凝集体は、誤って微小核として測定される可能性があるとのことであった。また、分析を目的としたハイスループットイメージングシステム (例えば、MetaSystems の Metafer Scanning and Imaging Platform) の使用では、微小核のためのフローサイトメトリースコアリングに関連するナノマテリアルの干渉問題を克服できると考えられた (Li et al., 2017; Manshian et al., 2015)。

これまで、いくつかの哺乳類細胞モデルが、同等または差のある感度を示すナノマテリアル遺伝毒性評価に使用されていると述べられていた (European Commission Joint Action, 2008-2013 、 Nanogenotox ; 欧州連合第 7 次枠組み計画、2007-2013、NANoREG ; Cowie et al., 2015)。

また、消化管または予想される標的組織を代表する細胞株が第一選択として考慮されるべきであるが、哺乳類細胞を用いる *in vitro* 小核試験で適切に使用するためには、小核のバックグラウンドレベルが 2% と同等かそれ以下であることを確認することが重要であるとのことであった。*in vitro* 遺伝毒性同定に最も適した哺乳類系を選択する際、ナノマテリアルの内在化はその挙動と毒性を理解する上で重要な STEP であるために、取込み能については重要な特徴として考慮すべきであると述べられていた (Magdolenova et al., 2014 ; Dekkers et al., 2016)。

New Approach Methodologies (NAM) の使用と同様に、機構解明を目的とした追加の *in vitro* 試験では、例えば 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、高含有量分析など、証拠の重み付けに考慮される場合があった。ただし、試験における細胞外代謝活性化システム (S9-mix) の使用は、ケースバイケースで評価する必要性が述べられていた。これは、ほとんどの難溶性ナノマテリアルは代謝されないため、S9-mix がアッセイを妨害することで、ナノマテリアルのバイオアベイラビリティを低

下させる可能性を示唆するものであった。また、有機ナノマテリアルや有機官能基でコーティングされた一部の無機ナノマテリアルは、代謝活性化システムの存在下で遺伝毒性作用を発揮する可能性があることがあると述べられていた (Sharifi et al., 2012)。

➤ *in vivo* 遺伝毒性試験

本ガイダンスでは、ナノマテリアルの *in vitro* 試験の少なくとも 1 つの試験で遺伝毒性活性を示す場合、もしくは *in vitro* に関する試験が適切でない場合には、*in vivo* 遺伝毒性試験の実施が必要とされていた (Eastmond et al., 2009 ; EFSA Scientific Committee, 2011b, 2017d)。*in vivo* 遺伝毒性試験として推奨される試験法には以下の 3 試験法が挙げられ、試験選定あるいは試験の段階的な実施に際しては、専門家の判断が必要とされるとの事であった。また、EFSA 遺伝毒性試験戦略 (EFSA Scientific Committee, 2011a, 2017d) に概説されているように、*in vivo* 遺伝毒性試験は *in vitro* 試験の結果に応じて段階的アプローチで実施されるべき内容については、下記 *in vivo* 試験が適しているとのことであった。

- *in vivo* 哺乳類赤血球小核試験 [OECD TG 474 (OECD, 2016a)]。本試験では EFSA Scientific Committee (2017d) に示されるような考察に従い、標的組織への曝露の実証が必要である。
- *in vivo* 哺乳類アルカリコメットアッセイ [OECD TG 489 (OECD, 2016d)]。
- 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 (OECD, 2013)]。

in vitro コメットアッセイに関しては、まだ検証されていないが、補完的な情報を提供することから、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムの理解に貢献する可能性があるとして述べられていた。また、多くのナノマテリアルは酸化ストレスまたは活性酸素、抗酸化物質を誘発することが示されてい

ることから、酸化 DNA 塩基を検出するための病変特異的酵素を用いた改良コメットアッセイの推奨がなされていた。一方、*in vivo* コメットアッセイは、一般的な毒性試験の解剖手順では不可能な Tmax でのサンプリングが必要なため、サテライト群を使用しない経口反復投与試験と組み合わせる必要はないと述べられていた。

■ ナノマテリアル遺伝毒性評価に関連する哺乳類細胞モデル

Cowie et al. (2015) は、欧州 Nano TEST project の中で実施された、公称サイズ 20 nm の二酸化チタン (TiO₂) NP、非被覆 (U-Fe₃O₄) およびオレイン酸被覆 (OC-Fe₃O₄) の酸化鉄 (8 nm)、ローダミン標識アモルファスシリカ 25 (FI-25 SiO₂) および 50 nm (FI-50 SiO₂)、ポリ乳酸グリコール酸ポリエチレンオキシドポリマーナノ粒子を用いた遺伝毒性の検討において、次の細胞を用いて細胞株間での差異は認められなかったと報告されていた。

- 血液(ヒトリンパ球およびリンパ芽球 TK6 細胞)
- 血管／中枢神経系 (ヒト脳内皮細胞)
- 肝臓 (ラット肝細胞および Kupffer 細胞)
- 腎臓 (サル Cos-1 およびヒト HEK293 細胞)
- 肺 (ヒト気管支 16HBE14o 細胞)
- 胎盤 (ヒト BeWo b30 細胞)

上記細胞の中でも、TK6 細胞、ヒトリンパ球、BeWo b30、腎臓細胞は、用量反応を検出するのに最も信頼性が高いようだと言われている。

■ 「Nano-RA に関するガイダンス」における酸化ストレス評価に関する概要

「Nano-RA に関するガイダンス」は、STEP3 の検討要否を判断するためには、細胞毒性／細胞生存率、酸化ストレスの誘発、促進性のある炎症及び消化管バリア性障害などにおいて、STEP2 の *in vitro* 試験のエンドポイントに含めるべきである

と定義している。

Dekkers et al. (2016) らは、比較的大きな表面对体積比と特異的な官能基を有するナノマテリアルは、非ナノマテリアルに比べて反応性が高まる可能性があると言われている。また、高い反応性を持つナノマテリアルは、活性酸素 (ROS) の生成を引き起こす可能性があり、これは生体組織における酸化ストレスを引き起こし、その結果として炎症反応を誘発する可能性を示唆するものであった。

➤ 酸化ストレス評価の段階的アプローチ例：

Riebeling et al. (2016) は、ナノマテリアルの酸化ストレス評価の戦略として次のような段階的アプローチを提案していた。

- ・ 第一段階：細胞アッセイ (電子スピン共鳴法 (ESR) や FRAS など、迅速な第一選択法)
- ・ 第二段階：適合性の高い細胞を用いた *in vitro* スクリーニング
 - 蛍光性のジクロロフルオロセイン (DCF) の光還元評価：ナノマテリアルの干渉による評価法の限界をも考慮する。
 - ELISA 法によるタンパク質のカルボニル化評価：酸化ストレスの感度の高い間接的な読み出法であり定量的な結果が必要な場合に有用であるが、更なる改良が必要である。
- ・ 第三段階：質量分析等による修飾タンパク質・反応経路・経路パターンを同定する (時間とコストを有する)。

➤ 酸化ストレス評価事例：二酸化チタン (E171)

- (i) Kandeil et al. (2019)は、成熟雄ラット (n=20/群) に TiO₂ NP (90nm、範囲 40~140nm) を 0 または 500mg/kg/day で 14 日間経口投与した。酸化ストレスに関連すると思われる中枢神経系への悪影響は、500 mg/kg/day で観察された。パネルは、これらのデータより、胎生期および生後早期のラットに TiO₂ NP を経口

投与した場合、100 mg/kg/day で海馬の神経新生が抑制され、成熟ラットに経口投与した場合には、1 日あたり 500 mg/kg/day で酸化ストレスが引き起こされたと考えられる影響が脳に生じたと結論づけていた。

- (ii) Zhou et al. (2017) は、TiO₂ NPs (6~7nm) を強制経口投与 (0、1、2 または 3 mg/kg/day、GD 7~PND 21) した、出生前および周産期の CD-1 マウス (n=6/群) の全用量群の児動物において、海馬の樹状突起の伸長が阻害され、オートファジーと酸化ストレスが増加し、ミトコンドリア機能が低下したと報告されていた。
- (iii) EFSA パネルは、30 nm 未満の TiO₂ NPs の経口投与によるマウスとラットの成体および発育中の脳における影響の多くは、酸化ストレスに関連している可能性があるとして述べられていた。例えば、Rahnama et al. (2020)によって、マウスに TiO₂ NPs (21 nm)を投与した場合、海馬歯状回の多形細胞層の体積減少、歯状回顆粒ニューロンの密度と数の減少が挙げられた。この現象については Zhang et al. (2020) が TiO₂ NPs (21 nm)で報告した行動学的影響、すなわちオープンフィールド試験で認められた不安様行動の増加と一致していると報告されていた。その論拠としては、海馬歯状回が不安様行動との関連性 (Eagle et al., 2016; Anacker et al., 2018) について述べられていた。

EFSA パネルは、血液、消化管、肝臓、肺、その他の臓器や組織を用いた様々な実験モデルの *in vitro* 研究に関して、TiO₂ による DNA 鎖切断/染色体損傷と、活性酸素レベルの上昇および/または抗酸化物質レベルの低下として測定される酸化ストレスとの関連性を示唆する内容について報告されていた(Turkez and Geyikoglu, 2007; Shukla et al., 2011, 2013; Prasad et al., 2013; Srivastava et al., 2013; Proquin et al., 2017; Stocco et al., 2017; Liao et al., 2019)。さらに、*in vitro* 研究による TiO₂ NPs 曝露では、活性酸素と関連する 8-oxodG が誘発さ

れると述べられていた (Shukla et al., 2011, 2013; Jugan et al., 2012; Demir et al., 2013; Stocco et al., 2016, 2017; Di Bucchianico et al., 2017; El Yamani et al., 2017; Schneider et al., 2017; Andreoli et al., 2018; Zijno et al., 2020)。一方で、Caco-2 細胞 (Zijno et al., 2015) やヒト肺細胞 (Bhattacharya et al., 2009) において 8-oxodG の増加は、DNA 鎖切断の増加とは関連していないと報告されていた。また、*in vivo* 研究 (Asare et al., 2016; Trouiller et al., 2009; Shukla et al., 2014) からは、明確な結論は得られなかったと述べられていた。

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

予備サンプルを用いた再測定でも 180 nm 群の肝臓でチタン量の有意な増加 ($p < 0.01$) が見られたことから、結晶子径 180 nm の TiO₂ の 90 日間反復経口投与により肝臓にチタンが蓄積することが確認できた。異なる結晶子径の TiO₂ 粒子の 90 日間反復経口投与実験に先立って実施した DLS による粒径分析では、結晶子径とは逆に 180 nm の二次粒子径が最も小さいという結果が得られており、180 nm 群のみで肝臓のチタン量増加が見られたことから、消化管粘膜上皮を介した TiO₂ 粒子の肝臓への移行は二次粒径の小さいことが寄与する可能性が示唆されていた。ただし、動的光散乱法で得られるのは散乱強度分布を理想球体の流体力学径として換算した粒度分布であり、散乱強度は粒径の 10⁶ に比例するため大きな粒子の影響がきわめて強くなるという特徴がある。そこで今回は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。したがって、180 nm 群で見られた肝臓へのチタンの蓄積は単に二次粒子径が小さいというわけではなく別の理由によるものと考えられた。一方で、180 nm 群を含めてすべての群で肝臓毒性を示唆する毒性学的所見は認められず、DNA 鎖切断マーカーである γ -H2AX の誘導も見られなかったことから、微量の

TiO₂ 粒子が肝臓に到達していても毒性影響はみられないと考えられた。また、TiO₂アグロメレートの沈着が見られた小腸パイエル板において免疫サイトカインの亢進は調べた限りにおいて見られなかったことから、経口暴露され消化管に取り込まれた TiO₂ 粒子がマクロファージを活性化する可能性は現時点では認められなかった。

RNA シークエンスのためのライブラリー調製では、FFPE 検体からの LMD による RNA サンプルという厳しい条件ながら各群 3 匹 (計 12 匹) のすべての個体でライブラリーを作製し、シークエンス解析を実施することができた。現在、データ解析を進めている。

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-1b や TNF-a 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-a 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。

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

遺伝毒性試験に関する概要において、*in vitro* 遺伝毒性試験に関しては、ナノ粒子の細胞内取り込み (可能であれば核内取り込み) が観察されないという点のみを根拠に、当該マテリアルが遺伝毒性を示さないとは言えないと述べられていた。さらにナノマテリアルは遺伝毒性の二次的なメカニズムを間接的に誘発する可能性を示唆していた。DNA 損傷のメカニズムは、炎症性メディエーターの放出を通じ、上皮組織で遺伝毒性を引き起こす慢性的な免疫応答の結果であることから、一般的に生体内で観察されると述べられていた。二次的な遺伝毒性のメカニズムでは、免疫細胞と上皮細胞の両方からなる共培養モデルを使用した場合にのみ、*in vitro* で検出することができると説明されていた。

in vitro の遺伝毒性メカニズムに関する情報については、遺伝毒性の可能性とナノマテリアルががんを引き起こす指標となるため、肯定的な結果に関しては、遺伝毒性エンドポイントを *in vivo* でも調査を検討すべきとの事であった。*in vivo* 試験を実施する前に、生殖細胞を含むどの

標的組織に到達する可能性があるかを評価するためには、速度論的な情報が必要であると説明されていた。ただし、十分な証拠の重みづけとして、最も関連性の高い試験方法、細胞タイプ、用量レベルが高い品質基準に従い試験されていることが条件となると述べられていた。将来、より多くの科学的知見が利用できるようになれば、*in silico* の方法を用いて、ナノ QSAR などにより、より強力な予測モデルを構築することで、証拠の重み付けをサポートすることも可能となると考えられた。

in vivo 遺伝毒性試験に関しては、専門家の判断に基づき、同じ動物個体に適用する試験の組み合わせが望ましいと説明されていた。試験自体、あるいは他のトキシコキネティクスまたは反復投与毒性試験から、標的組織（例えば *in vivo* 小核試験における骨髄）がナノマテリアルおよび/またはその代謝物に曝露されているという証拠が、陰性結果の解釈には不可欠とされており、現在、従来の材料の遺伝毒性試験をナノマテリアルに適用するために、調和、更新、再定義、最終的には妥当性を確認する多くの活動が進行中であると述べられていた。遺伝毒性試験に関するこのような進展および更新は、本ガイダンスの目的のために遺伝毒性試験に着手する前に考慮すべき要件であると考えられた。

酸化ストレスをエンドポイントとした評価としては現在のところ明確な試験法はないが、生体内曝露においては、炎症反応と関連する可能性を示唆するものであった。これは投与経路とはあまり関係なく起こりうるとされ、マクロファージと好中球の浸潤の増加、ケモカイン、サイトカインなどの炎症性メディエーターの放出や、活性酸素と酸化ストレスマーカーの産生の増加によって特徴づけられると考えられていた。

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

結晶子径の異なる TiO₂ 粒子を 90 日間反復経

口投与した結果、パイエル板へのアグロメレートの沈着に加えて、180 nm 群では肝臓チタン量の増加が見られた。しかし、肝臓への毒性影響は認められず、パイエル板におけるマクロファージの活性化やマクロファージ関連サイトカインの亢進などの免疫応答も見られなかった。引き続き、パイエル板の RNA シークエンス解析や反復経口投与後の排出について検討する。

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。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

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

本研究では、食品関連分野のナノマテリアル並びに新規素材の毒性試験法に関する国際動向を調査することを目的とする。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あて調査を実施した。本ガイダンスは、毒物動態、遺伝毒性、局所および全身毒性などの一般的な問題についても概説されており、食品関連分野に適用されるナノマテリアルのリスク評価における重要な参考資料となる。また新たな研究の実施に先立ち、これらのガイダンス文書を参照することが推奨されている。これにより、ナノマテリ

アルの適切な利用と、そのリスク管理が可能となる。これらの取り組みは、食品関連分野に適用されるナノマテリアルの安全性に対する理解を深め、その適切な利用を促進するものとなる。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. 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* 2023, 20(1), 23.
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

F.2 学会発表

1. Jun-ichi Akagi, Yasuko Mizuta, Hirotooshi 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. 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
4. 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リ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) .
5. 飯島一智, 西田明日香, 高橋遥, 中浜美月, 荒井りおん, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄: 気管支モデル/単球系細胞株共培養系を用いたナノマテリアル吸入毒性評価と細胞間相互作用の解析, 第 50 回日本毒性学会学

術年会 (2023.6.21, 横浜) .

6. 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) .
7. OHNO A, NISHIDA A, OKIYAMA Y, IJIMA 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).
8. 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) .
9. 荒井りおん, 西田明日香, 高橋遥, 中浜美月, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支上皮モデルと THP-1 細胞を組み合わせたナノマテリアルの吸入毒性評価法の開発に向けた気管支上皮分泌サイトカインの解析, 第 30 回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11, 川崎) .
10. 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) .
11. 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 63rd Annual Meeting (2024.3.12, Salt Lake City, USA).
12. 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) .

招待講演 (国内)

1. 大野彰子, ナノマテリアルの生体影響：国際的な安全性評価への取り組み, 日本薬学会ビジネスエコ創剤FGセミナー2023年度「未来医療と医薬エコシステム」招待講演, 2024.2.16, 国内, 口頭

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