

食品衛生基準科学研究費補助金

令和6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 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

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皮/経口ばく露が食物アレルギーに与える影響を検討する。令和5年度には、経皮的にナノ酸化チタンにばく露されたマウスにおいて、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ことが確認され、ナノ酸化チタンが体内に取り込まれた際に免疫応答へ影響を及ぼす可能性が示された。この結果を受け、令和6年度は、ナノ酸化チタンを食品として経口から摂取した場合に免疫系へ与える影響について、抗原の経口摂取によって誘導される免疫寛容に着目し、食物アレルギーモデルマウスを用いた解析を実施した。その結果、免疫寛容による食物アレルギー症状の緩和効果に、ナノ酸化チタンを経口ばく露の有無による有意な変化は認められなかった。一方、ナノ酸化チタンの経口摂取により、T細胞からのIL-4やIL-17産生が抑制される可能性が示された。これらの結果を踏まえ、今後もナノ酸化チタンの経口ばく露が免疫系に及ぼす影響について、モデルマウスを用いた免疫応答を中心としたさらなる科学的知見の集積が必要であると考えられる。

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 2022 年に全面的に禁止された。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。その理由として、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

に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、健康影響に関す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、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、ナノ酸化チタン等の経皮・経口ばく露による免疫系への影響を検討する。令和 6 年度は、食物アレルギーモデルマウスにナノ酸化チタンを経口ばく露し、免疫寛容に与える影響を検討した。

B. 研究方法

試料及び試薬

被験物質としては、

表面未処理の酸化チタン C

(粒子径 6 nm・アナターゼ型)

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。血清中のヒスタミンの定量は、SPIbio histamine Enzyme Immunoassay kit (Bertin Pharma) 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、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。

ナノ酸化チタンの免疫寛容に与える影響に関する検討

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 μ g/50 μ L) を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し (Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1 クールとし、4 クールの経皮感作を行った。Day-7 に部分採血し、Day 29 に OVA 50mg 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。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。

C. 研究結果

食物アレルギーマウスモデルの抗原感作時のナノ酸化チタンによる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。また、昨年度の解析においては、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、所属リンパ節では樹状細胞やマクロファージが増加する傾向が示された。このため、経皮感作時のナノ酸化チタンのアジュバント作用は、抗原提示細胞で認められた影響と関連している可能性が高いと考えられる。

令和 6 年度においては、抗原経皮感作時に最も低い濃度でアジュバント活性が認められた酸化チタン C について、経口から摂取した際の免疫系へ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 1 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。また、惹起 30 分後の血清中のヒスタミン濃度を測定した。結果を図 2 から図 4 に示す。図 2 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 3 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。図 4 に惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。OVA 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度が有意に上昇した。C 群では、OVA 群と比較してヒスタミン濃度の増加が抑制された。また、OT 群においてもヒスタミンの増加が抑えられていた。なお OT 群と OT + C 群の間で血中ヒスタミンレベルに差は認められなかった。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 5 と図 6 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 (図 5 A) やマクロファージ、B 細胞、マスト細胞 (図 5 B) 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。また、図 6 に示すように、Treg 等の CD4 陽性 T 細胞サブポピュレーションに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 CD 4 陽性 T 細胞がナノ酸化チタン C の処理によって減少する傾向が認められた。

これらの結果から、消化管を介した粒子径 6 nm のナノ酸化チタン C によるばく露は、リンパ節に局在する一部の細胞集団に影響を与える可能性があることが示された。

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。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。

今年度は、ナノ酸化チタンの経口ばく露が免疫系に与える影響として、食物アレルギーモデルマウスの免疫寛容について検討した。その結果、ナノ酸化チタンの経口ばく露の有無によって、経口免疫寛容の獲得に変化は認められなかった。一方、ナノ酸化チタン単独での経口ばく露において、食物アレルギー症状や血中の遊離ヒスタミン値が低下する傾向を認めており、ナノ酸化チタンが炎症応答を抑制する可能性が示された。本事業の先行研究においては、抗原の経皮感作時にナノ酸化チタンが共存すると、アジュバントとしての活性を示すことを明らかにしている。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いる (Smulders SG et al., *Br J Dermatol* 2015)。加えて、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が公表されている。このため、経口ばく露は他の経路によるばく露とは異なるナノ酸化チタンの影響が存在するのではないかと予想される。実際、ナノ酸化チタンの経口摂取が腸内細菌叢を変化させる可能性が示されており (Pinget, G. et al. *Frontiers in Nutrition* 2019)、パイエルパッチにおける IFN- γ の産生を抑制するなど、腸の免疫系や炎症応答にも影響を与えることが報告されている (Bettini, S. et al. *Scientific Reports* 2017)。一方、Bettini らは、脾臓での IFN- γ や IL-17 の産生はナノ酸化チタンにより促進されると報告しており、生物種や酸化チタンの種類、評価モデルや抗原刺激などの違いによる影響を精査する必要がある。そのため、今後は、T 細胞によ

るサイトカイン産生などナノ酸化チタンの生体内での影響についてさらに詳細な検討を進めるべきと考えられる。

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。食物アレルギーモデルに対する経口免疫寛容において、ナノ酸化チタンの経口ばく露による変化は認められなかった。しかし一方で、ナノ酸化チタンの経口ばく露により一部の免疫応答が抑制される可能性が認められた。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、さらに科学的知見を集積する必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 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

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

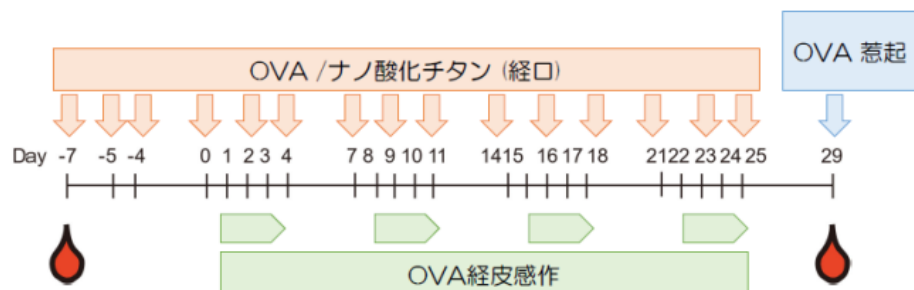


図1 OVA抗原の経口免疫寛容モデルの作成

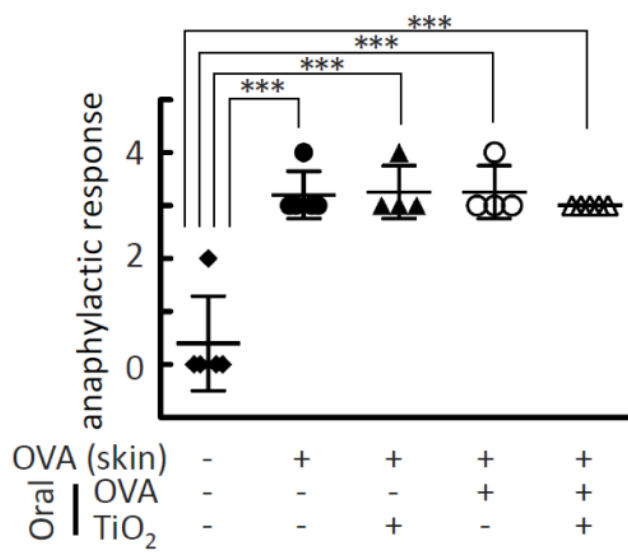


図2 ナノ酸化チタンのアナフィラキシーへの影響

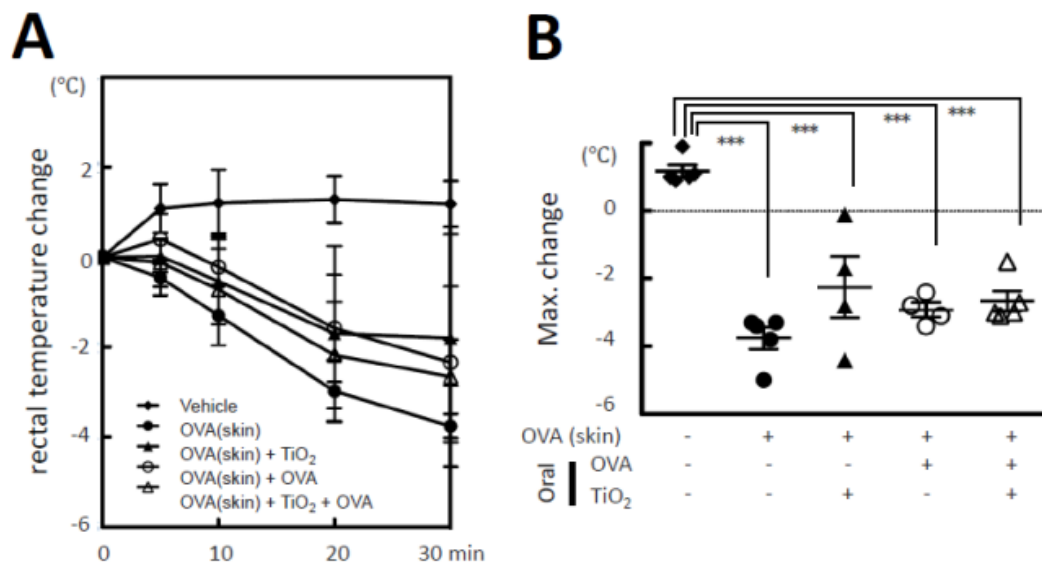


図3 抗原投与による体温変化

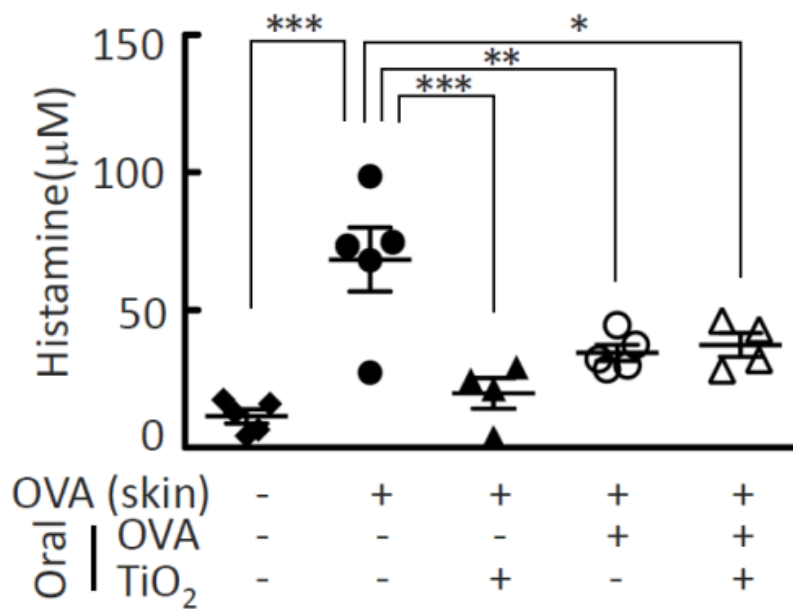


図4 抗原投与による血中ヒスタミン濃度の変化

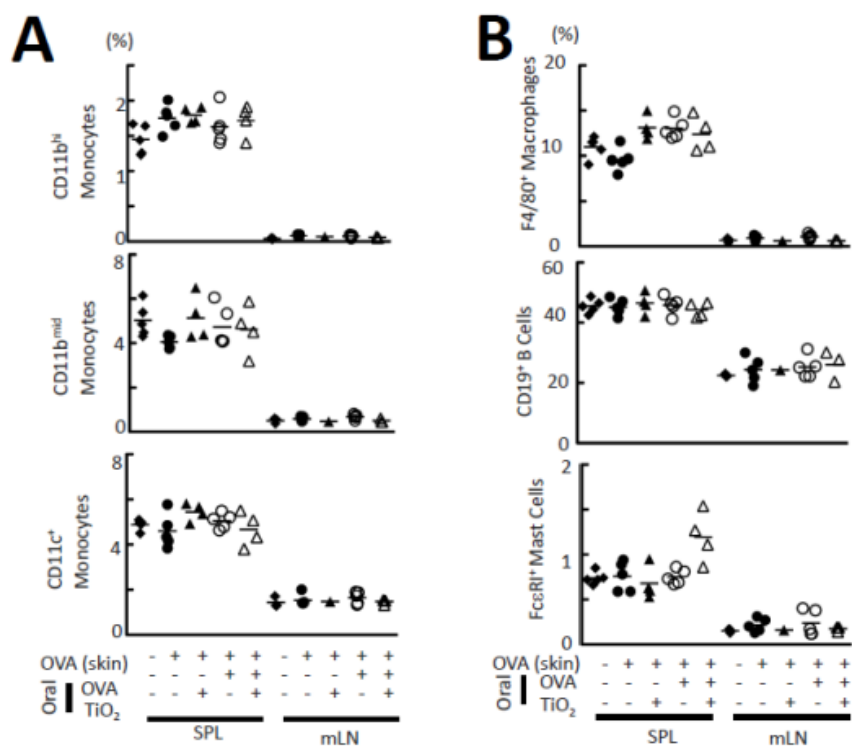


図5 脾臓および腸間膜リンパ節に局在する免疫細胞

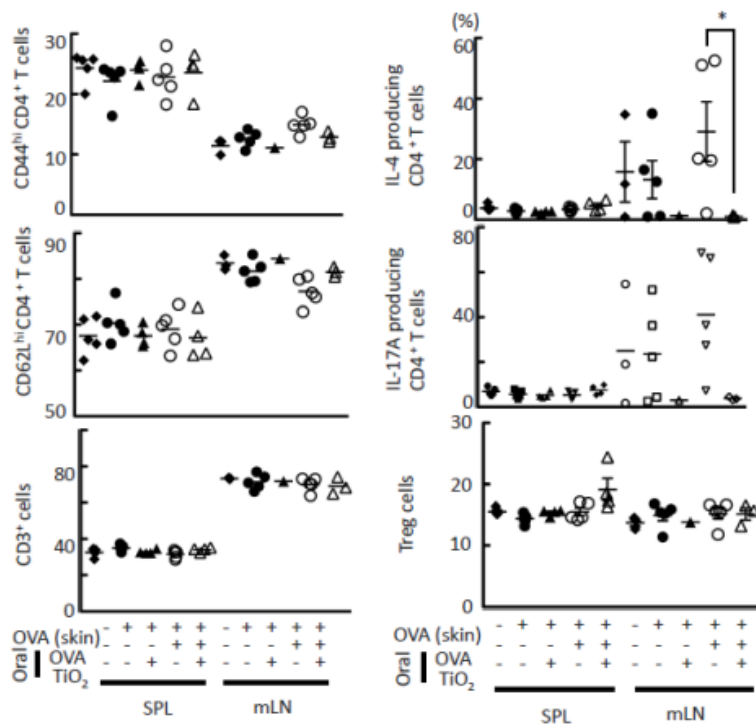


図6 脾臓および腸間膜リンパ節に局在するT細胞