

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

分担課題 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

研究分担者 大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部 主任研究官

研究要旨

欧州において食品用途のナノマテリアルは新規物質と認識され、安全性評価に関する法整備が進められている。ナノマテリアルは、その特異な物理化学的性質に起因する、従来の物質とは異なる潜在的な有害性への懸念が指摘されており、特に経口または経皮暴露される食品および食品用容器包装用途の新規ナノ素材については、その特性を踏まえた新たなリスク評価手法の確立が求められる。

本研究は、食品関連分野におけ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を調査することを目的とする。この調査では、安全性評価方法、評価データ、並びに関連する国際的な動向に関する情報を集積し、適切な毒性評価法の提案、および特性に応じた試験上の考慮事項を整理する。令和6年度は、初期評価的観点から免疫毒性に焦点をあて、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免疫毒性に関する試験法や評価手法について調査を実施した。

A. 研究目的

テクノロジーが急速に進展する現代において、ナノマテリアルを活用した新規素材が産業界に浸透し、食品・飼料分野や物質材料分野での応用が期待される。なかでも健康影響やリスク管理が重要課題となっているが、毒性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、食品・飼料用ナノマテリアルのリスク評価に関し、申請における安全性と曝露に関する科学的知識向上のためのガイダンスを提供しており、2021年7月には食品・飼料チェー

ンにおけるナノマテリアルのリスク評価ガイダンスが発行された。

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、有害性評価に関する科学的考察に加え、特性評価や測定パラメータ、利用可能な技術、複雑なマトリックス中での決定法について詳述されている。さらに、曝露評価、有害性同定・特性評価、ナノマテリアル特異的な *in vitro/in vivo* 毒性試験、段階的な毒性試験フレームワークについて概説されている。

本研究は、食品関連分野で使用・混入の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6年度は初期評価的観点から遺伝毒性に焦点をあて整理した。

B. 研究方法

初期評価的観点から免疫毒性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免疫毒性に関する試験法や評価手法について調査を実施した。

（倫理面への配慮）特になし

C. 研究結果

C-1. 「Nano-RAに関するガイダンス」における免疫毒性評価

段階的リスク評価（STEP1～STEP4）：

「Nano-RAに関するガイダンス」では、段階的リスク評価のSTEP2において、消化管を再現するための *in vitro* モデルとしてヒト大腸上皮細胞（CaCo-2）と免疫細胞や粘液分泌細胞との組み合わせ（Gamboa and Leong, 2013）¹⁾などを例示している他、マクロファージ（例えば、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）のような免疫細胞を試験することも重要であると述べられていた。一方、市販の全血サイトカイン放出キットは、免疫刺激反応や免疫抑制反応を含む免疫毒性反応の特徴を明らかにするのに役立つが（Langezaal et al., 2001）^{2,3)}、これは腸管関連免疫反応の試験において、完全には適さないとしていた。

STEP3 において、免疫学的、増殖学的、神経毒性、生殖器官又は内分泌を介した潜

在的影響を同定するために、90日間の経口毒性試験（ナノマテリアルの評価用に適した OECD TG 408 試験）を実施することが推奨されており、STEP4 では、STEP3 でナノマテリアルの組織への蓄積が実証された場合に、追加の免疫毒性を検討することが推奨されていた。

Dekkers et al. (2016) ⁴⁾ は、トキシコキネティクスとヒトの有害性評価において、マテリアルのナノ特異的な特性によって最も影響を受ける可能性が高い側面として、分解／溶解、蓄積、遺伝毒性に加えて免疫毒性を、ハザード評価の中心となすべき項目として挙げてられていた。また、「Nano-RAに関するガイダンス」では、この点に関連して WHO の環境保健クライテリア Environmental Health Criteria 244 : EHC244 (2019) ⁵⁾ の参照を推奨していた。

STEP4 での生殖毒性に関する追加試験の中で、OECD テストガイドライン (TG) 443 (OECD, 2012b)が取り上げられており、TG443のパラメータには、特異的エンドポイントの一つとして発達免疫毒性がとりあげられていた。

遺伝毒性との関連性：

炎症性メディエーターの放出を通じて上皮組織に遺伝毒性を引き起こす、慢性的な免疫反応の結果としての DNA 損傷メカニズムについても触れられており、二次的な遺伝毒性メカニズムは、免疫細胞と上皮細胞の両方からなる共培養モデルを用いた場合にのみ、*in vitro* で検出することができるとして、Evans et al. (2019) ⁶⁾の文献を挙げて紹介されていた。

免疫毒性とアレルギー原性との関連性：

ナノ粒子は、潜在的な免疫原性または抗原性に加えて、他の免疫原／抗原を粒子表面

に結合させ、免疫細胞に運ぶことで「トロイの木馬」として機能することもある、と述べられており、評価ガイダンスとして EHC244 (WHO (2019) ⁵⁾ を紹介されていた。

「Nano-RA に関するガイダンス」では、現時点では、経口曝露後に感受性の高い個体にアレルギー反応を引き起こす可能性がある物質の評価を可能にする実験動物におけるデータまたは検証済みの研究は存在しない、と述べられていた。その上で、ナノマテリアルが潜在的なアレルゲン（例えばタンパク質やペプチド）である場合、あるいはタンパク質や他の既知の潜在的なアレルゲン分子の残基を含む場合、アレルゲン性成分の評価において、遺伝子組み換え作物のアレルゲン性に関する EFSA ガイダンスで議論された原則に従うべきであると説明されていた。アレルゲン性の決定に関するこれらの原則には、タンパク質またはペプチドの構造的側面の調査、*in silico*（またはバイオインフォマティクス）アプローチ、免疫グロブリン E (IgE) 結合および細胞ベースの方法、分析プロファイル技術および動物モデル (EFSA GMO Panel, 2010⁷⁾; EFSA NDA Panel, 2014⁸⁾) などが含まれる。アレルギー性およびアレルギー反応について単一の実験方法で決定的な証拠を得ることはできないため、様々な試験方法から得られたすべての情報を考慮した証拠の重み付け (weight-of-evidence) アプローチが推奨されると、同ガイダンスでは述べている。

1) OECD TG408 (げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験)

「Nano-RA に関するガイダンス」において、OECD TG408 には、免疫毒性または免疫調節効果を示す可能性のあるパラメータと

して、以下のような項目を挙げている。

- ✓ 毒性が明確ではない場合の脾臓および胸腺の相対重量の変化
- ✓ 免疫系の他の器官（例えば、骨髄、リンパ節、パイエル板）における病理組織学的変化、
- ✓ 血清総タンパク、A/G 比、試験動物の血液学的プロファイル（総白血球数、白血球分画など）の変化

このような変化は、OECD TG 452 (OECD, 2009e), 451 (OECD, 2009b) または 453 (OECD, 2009d) に従って実施される慢性毒性／発がん性試験でも確認されることがあると述べられていた。

2) Dekkers et al. (2016)

本論文において、免疫毒性に関する記載は、細胞毒性関係の記載部分に含まれており、次のように記載されていた。

ナノマテリアルの毒性のもう一つの重要なメカニズムは、免疫反応の発現または誘発であり、例えば炎症、免疫刺激、免疫抑制などを引き起こす。炎症が慢性化すると、線維症、肝硬変、肺がん、心血管疾患、神経学的疾患など、さまざまな健康影響を引き起こす可能性について述べられていた。ナノ物質 (substance) が免疫反応を引き起こす経路はさまざまだが、すべての細胞性免疫反応が顕著な炎症につながるわけではない。細胞毒性、免疫毒性、遺伝毒性に関する *in vitro* アッセイに関連する細胞種は、ナノ物質 (substance) の吸収、分布、移動に関する限られた知識 (一般的に) と共に、関連する培地での溶解率や *in vitro* 吸収に関する情報に基づいて選択することができる。

in vitro でナノマテリアルの免疫毒性を研究する前に、エンドトキシン汚染について試験することが不可欠であると説明され

ていた。

3) Environmental Health Criteria 244 (EHC244)

EHC244 では、ナノマテリアルが免疫細胞や免疫系組織と相互作用することで、細胞毒性、酸化ストレス、炎症反応、補体活性化関連擬似アレルギー反応 (CARPA)、遺伝毒性、代謝変化、そして免疫・炎症細胞の増殖といった影響を引き起こす可能性が示唆されていた。また、一般的な化学物質の免疫毒性評価に用いられており、ナノマテリアル試験への適用が期待される複数の試験法についても概説されていた。

ナノマテリアルの免疫毒性として事象と関連する可能性について、次のように記載されていた。

- (a) 免疫抑制-感染因子に対する宿主の抵抗力の低下
- (b) 免疫の活性化-自己免疫疾患の発症リスクの増加
- (c) アレルギー疾患 (アトピー、食物アレルギー、喘息) の発症リスクの増加
- (d) 化学物質に対する過敏症-繰り返し曝露される
- (e) 異常な炎症反応や未解決の炎症-組織や臓器の損傷や機能不全
- (f) 異常な炎症反応や適応免疫反応の変化-疾患

C-2.EFSA 評価事例

1) 酸化鉄類及び水酸化鉄類(E 172)

EFSA 評価書には、酸化鉄類及び水酸化鉄類(E 172)の免疫毒性に関する記載は認められなかった。

2) 二酸化ケイ素 (E551)

【*in vitro* 試験による評価事例】

2)-1. Winter et al. (2011)⁹⁾ は、樹状細胞に対するアモルファスヒュームドシリカナノ粒子 (Sigma Aldrich 製、BET 200 m²/g 平均一次径 20~80 nm、培養液に懸濁し超音波破碎機で 30 分間処理) と微結晶シリカの *in vitro* 効果を比較した。アモルファスシリカナノ粒子も結晶性シリカと同様に、樹状細胞上の MHC-II、CD80、CD86 の制御を上昇させた。さらに、これらの粒子はインフラマソームを活性化し、カスパーゼ-1 欠損マウスや NLRP3 欠損マウスではなく、野生型

(WT) から単離された樹状細胞によるインターロイキン (IL) -1b の有意な分泌をもたらした。非晶質シリカナノ粒子と結晶性シリカの両方がアポトーシスを誘導した。

2)-2. Kusaka et al. (2014)¹⁰⁾ は、シリカ (Micromod Partikeltechnologie GmbH 製; 30、1,000、3,000、10,000 nm) の粒子径と、*in vitro* のマウス骨髄由来マクロファージ細胞における食食、インフラマソーム活性化、IL-1b 分泌、細胞死との関係を調べた。直径の大小にかかわらず、シリカ粒子はアクチン細胞骨格に依存した経路で効率よく細胞内に取り込まれ、カスパーゼ-1 の活性化を誘導したが、カスパーゼ-11 の活性化は誘導しなかった。直径 30~1,000 nm のシリカ粒子は、3,000~10,000 nm のシリカ粒子よりも顕著に高いレベルで、リソソームの不安定化、細胞死、IL-1b の分泌を誘導した。

2)-3 Di Cristo et al. (2016)¹¹⁾ は、2 つのマウスマクロファージ細胞株 (MH-S 細胞および RAW264.7 細胞) に対して、完全増殖培地中で、大きさ、比表面積、表面電荷、流体力学的半径が同程度のヒュームドシ

リカナノ粒子 (NM-203 ; JRC、2013、付録 B) および沈殿シリカナノ粒子 (NM-200 ; JRC、2013、Appendix B) の 2 種類の調製物の効果を研究した。タンパク質を多く含む液中でインキュベートした場合、NM-203 は NM-200 よりも多くのタンパク質を表面に吸着し、マクロファージとインキュベートすると、Hmox1 の誘導と活性酸素産生から評価される酸化ストレスがより大きくなった」と報告した。ヒュームドシリカナノ粒子 (NM203) は、沈殿した NM-200 よりもマクロファージと強く相互作用し、一酸化窒素合成酵素 2 の誘導、NO 産生、腫瘍壊死因子 (TNF) - α 、IL-6、IL-1 β の分泌によって評価されるように、より明白な炎症反応を引き起こした。著者らは沈殿シリカナノ粒子と比較すると、ヒュームドシリカナノ粒子は血清タンパク質や細胞膜との相互作用を高め、マクロファージにおいてより大きな酸化ストレスとより強い炎症促進作用を引き起こすと結論づけた。パネルは、この研究で使用されたヒュームドナノ粒子と沈殿ナノ粒子では、生物学的反応が異なることを指摘されていた。

2)-4. Winkler et al. (2017)¹²⁾ は、未熟でプライミングされていない樹状細胞 (マウス骨髄由来の DC) とヒュームドシリカ (AEROSIL 380F および AEROSIL 200F; 付録 A) の相互作用を検討した。超音波処理後、培養液に懸濁させると、2 つの SAS マテリアルは平均直径 147nm と 127nm の凝結体を形成した。DC による粒子の内在化は、細胞毒性、IL-1 α や TNF- α の放出を惹起しなかった。しかし、SAS 粒子は未熟な DC を活性化し、これらの定常状態の DC に SAS 粒子がエンドサイトーシス的に取り込まれると、プロ IL-1 β 前駆体が誘導された。

著者らによると、これらの結果から、食品グレードの SAS 粒子は、定常状態の DC においてエンドソーム MyD88 依存性の病原体パターン認識とシグナル伝達経路を開始できることが示された。同じ著者らは以前、SAS のような食品由来の粒子が腸粘膜の第一線のセンチネルとして機能する樹状細胞の機能をどのように変化させる可能性があるかについての研究を発表していた。

2)-5 Breznan et al. (2017)¹³⁾ は、様々なアモルファスシリカナノ粒子 (10~20nm、5~15nm、12nm、Sigma Aldrich 製) の毒性に対する物理化学的および生物学的因子の影響を調べた。特に、ヒト上皮細胞 A549、ヒト THP-1、マウス J774A.1 マクロファージ細胞という異なる細胞タイプによるサイトカイン放出を検討した。一次粒子径が類似しているにもかかわらず、試験したシリカナノ粒子はそれぞれ異なる細胞毒性プロファイルを示した。異なる細胞株におけるシリカナノ粒子の炎症誘発能は様々であり、毒性結果における特定の細胞タイプの役割が強調された。シリカナノ粒子 (12nm) が最も強力であり、粒子表面の酸性度が細胞株全体の細胞毒性および炎症誘発力と関連していることが確認された。著者らは、乾燥状態の凝集体サイズや遷移金属成分を含む他の SiNPs 特性との関連について、様々な物理化学的特性間の相互関係を再理解する必要性を強調した。しかし、ナノ粒子の物理化学的特性や生物学的マトリックスにおける相互作用は不均質であるため、すべての粒子をケースバイケースで試験し、*in vivo* の動物曝露試験を通じて的を絞った検証を行う必要があると述べられていた。

【*in vivo* 試験による評価事例】

2)-6. Yoshida et al. (2011)¹⁴⁾ の研究では、雌の BALB/c マウスにオボアルブミン (OVA) と様々な大きさのシリカ粒子 (30nm または 70nm のナノ粒子、および直径 300nm または 1,000nm の従来のマイクロサイズの粒子) を経鼻曝露し、OVA 特異的抗体の血漿中濃度を測定した。OVA とより小さなナノシリカ粒子への経鼻曝露は、OVA とより大きなシリカ粒子への曝露よりも、OVA 特異的免疫グロブリン IgE、IgG および IgG1 抗体の高レベルを誘導する傾向があった。OVA と nSP30 に曝露されたマウスの脾細胞は、OVA 単独に曝露されたマウスよりも高レベルの Th2 型サイトカインを分泌した。これらの結果を総合すると、ナノシリカ粒子は *in vivo* でアレルゲン特異的 Th2 型アレルギー免疫応答を誘導できることが示された。パネルは、シリカ粒子のみを投与した対照群がないことに注目した。パネルはまた、OVA がナノ粒子に固定されることにより、OVA の免疫原性が増加し、樹状細胞による OVA の吸着と捕捉が促進され、抗体応答が増加する可能性があることを指摘していた。

2)-7. Toda and Yoshino (2016)¹⁵⁾ は、粒径 30 nm の非晶質シリカ ナノ粒子 (Micromod Partikeltechnologie GmbH から購入 (粒子径の測定方法についての詳細は不明) ; 5 分間超音波破碎機で処理後、0.1、1 または 10mg/マウスを 4 日間毎日経口投与前にボルテックス処理) が、5 匹の BALB/c 雄マウス群に経口 OVA で誘導された免疫学的無反応に及ぼす影響を評価した。OVA 特異的抗体の産生、OVA 応答脾細胞の増殖、および T-ヘルパー (Th)-1、Th2、および Th17 応答 (サイトカインおよび IgG/IgE サブクラスの発現) に対す

る影響を評価した。1 日あたり 1 および 10 mg/マウスの用量で、シリカナノ粒子は OVA 耐性マウスの OVA 特異的 IgG レベルを増加させ、OVA に応答して OVA 免疫脾細胞の増殖を誘導した (用量依存性)。nSP30 は、OVA 特異的 IgG1、IgE、および IgG2a の発現も増加させ、Th1 および Th2 応答刺激も示した。インターフェロン IFN- γ 、IL-4、IL-5 (Th2)、および IL-17 (Th17) の発現も、*ex vivo* で OVA で刺激された脾細胞内のシリカ ナノ粒子によって刺激された (用量依存性)。OVA による耐性の誘導、抗 OVA IgG 抗体の産生、および OVA 応答脾細胞の増殖は、OVA と併用したシリカナノ粒子によって阻害され、用量依存性が認められた。シリカナノ粒子は、経口寛容の誘導を妨げる可能性がある Th1 および Th2 応答を強化した。著者らによると、1 日あたり 10mg/マウスのシリカナノ粒子は、OVA 摂取によって誘導される経口耐性を有意に阻害した。この用量は、70kg の基準成人の場合、1 日あたり 30g のシリカナノ粒子に相当する。パネルは、この用量は本意見書で推定された成人集団の曝露量 (それぞれ平均および 95 パーセントイルの曝露量の 20 倍から 200 倍) よりもはるかに高いことを指摘していた。

パネルはまた、シリカナノ粒子がアジュバントとワクチン送達媒体の両方として使用される可能性が現在調査中であることにも言及した。

全体として、*in vitro* と *in vivo* の両方で、シリカのいくつかのナノ粒子は、アジュバント効果やキャリア効果を含むいくつかの免疫調節効果を有するようであった。特に、より小さな粒子は、オボアルブミンと同時に (鼻腔内に) 投与した場合、脾細胞による 2 型サイトカインの産生と特異的抗体の血漿中濃度を増加させた。パネルは、

食品添加物としての二酸化ケイ素のリスクアセスメントに対するこれらの研究の関連性は低いと指摘していた。これは、入手可能な *in vivo* 試験のほとんどが気管内または腹腔内投与で実施されており (Morishige et al.)¹⁶⁾、食品添加物のリスク評価には関連しない投与経路であること、さらに粒子の大きさが食品添加物を代表するものでないこと、最後に、投与用量が通常非常に高く、食品添加物として使用される二酸化ケイ素の摂取によりヒトが受ける可能性のある曝露量をはるかに超えているためであると述べられていた。

3) EDTA 第二鉄 Na¹⁷⁾

EFSA 評価書には、EDTA 第二鉄 Na の免疫毒性に関する記載は認められなかった。

4) 二酸化チタン (E171)¹⁸⁾

【*in vitro* 試験による評価事例】

4)-1. 新たに実施された E 171 の EOGRT 試験について、パネルは、全般的な毒性は認められず、甲状腺や性ホルモンのレベルにも影響はなく、雄ラットでも雌ラットでも生殖機能や生殖能力にも影響はないと結論づけた。さらに、出生前後の発育にも影響は見られなかった。F1 子孫の神経機能エンドポイントへの影響も観察されなかった。免疫毒性に関しては、F1 コホート 3 の雄動物のみに抗原誘発 IgM レベルのわずかな減少 (9%) が認められたが、統計的に有意であり、明らかな用量反応関係は認められなかった。しかし、EFSA パネルは、EOGRT 試験のこの部分のデザインに方法論的な欠点があることを指摘した。従って、パネルは免疫毒性について結論づけることはできなかった。同試験のサテライト群では、E171 を最高用量 1,000 mg/kg/day まで投与しても、結腸に ACF は誘発されな

かった。パネルは、試験された用量の範囲において、(E 71 に含まれる) TiO₂ ナノ粒子への内部曝露の程度に不確実性があると考えた。

4)-2. Han et al. (2020a)¹⁹⁾ の試験 (NSC スコア 2) では、ラットに E 171 を 10、100 または 1,000 mg/kg/day で 90 日間曝露したところ、最高用量で顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の血漿中濃度が約 40% 低下し、統計的に有意な減少が観察された。このような中間的なエンドポイントから副作用を予測するのは難しいが、GM-CSF は造血に関与しており、免疫グロブリン (Ig) M 値の控えめだが統計的に有意な減少 (～10%) を説明できるかもしれない。

4)-3. Bettini et al. (2017)²⁰⁾ の試験 (NSC スコア 1) では、E 171 の 1 用量 (10 mg/kg/day) のみが試験され、炎症パラメータの増加が観察された。これらの結果は、別の試験 (Blevins et al., 2019; NSC スコア 3) では、試験された最高用量である 267 mg/kg/day まで影響が認められなかった。しかし、パネルは、Blevins et al. (2019) の研究が NSC スコア 3 であることに留意した。

パネルは、報告された E 171 の免疫系への影響はばらつきがあると指摘した。E171 を用いたある試験では影響が認められなかったが (Blevins et al., 2019; Riedle et al., 2020)、一方で影響が認められた試験もあり、特に炎症プロセスを示すパラメータに変動が認められた (Urrutia-Ortega et al., 2016; Talamini et al., 2019)。

5) 銀ナノ粒子⁵⁾

【*in vitro* 試験による評価事例】

5)-1. *in vitro* では、様々な大きさの Ag-NP

が線維芽細胞とマクロファージ細胞株の両方に対して細胞毒性を示し、20 nm の小さい Ag-NP ほど毒性が強かった。L929 線維芽細胞と RAW 264.7 マクロファージに対して、代謝細胞活性を 20% 低下させる有効濃度 (EC20) は、それぞれ 2.7 µg/mL と 7 µg/mL であった。RAW 264.7 マクロファージでは、20 nm Ag-NP の EC20 値はイオン銀のそれと同様であったが、線維芽細胞では、イオン銀 (EC20=7.1 µg/mL) よりも 20 nm Ag-NP (EC20=2.8 µg/mL) の方が代謝活性に影響を与えた。マクロファージは、LDH 放出の欠如によって示されるように、膜損傷に対する感受性が低かったが、線維芽細胞では明らかな膜損傷が認められた。80 nm と 113 nm の大きな Ag-NPs は、イオン銀と比較すると代謝活性を低下させる効果は低かった。20 nm の Ag-NP は RAW 264.7 マクロファージに活性酸素を誘導した。RAW 264.7 マクロファージを試験したすべてのサイズ (20 nm、80 nm、113 nm) の Ag-NP に曝露した結果、さまざまな炎症マーカーが放出されたが、その反応は IL-1β と IL-10 の低増加 (5 倍未満) から顆粒球コロニー刺激因子の高増加 (500 倍超) までさまざまであった。両細胞株への影響を比較すると、マクロファージは Ag-NP 毒性に最も敏感な細胞タイプではない可能性が示された。別の研究では、Pratsinis et al. (2013) ²¹⁾ が、より小さな Ag-NP が RAW 264.7 マクロファージでより高い細胞毒性を示すことを示した。Ag-NPs から放出されたイオンと比較すると、小さい Ag-NPs (10 nm 超) ではイオンが細胞毒性を支配したが、大きい Ag-NPs ではナノ粒子と細胞の相互作用が細胞毒性を支配することがわかった。

【in vivo 試験による評価事例】

5)-2. 2 つの in vivo 28 日間反復用量毒性試験では、免疫毒性が最も感受性の高いパラメータとして示された。2 種類の異なるサイズの Ag-NP (20 nm と 100 nm) を、Wistar 系ラット (雄雌) に静脈内投与した。20 nm の Ag-NPs で、投与用量は 0.0082 mg/kg/day から 6 mg/kg/day までであった。100 nm の Ag-NP については、最高用量の 6 mg/kg/day のみが投与された。一般毒性および免疫毒性は、最終投与から 1 日後に評価した。投与最高用量 6 mg/kg/day は、動物によく耐容された。しかしながら、20 nm および 100 nm の Ag-NPs のいずれにおいても、投与中に成長遅延が観察された。体重と胸腺の重量が減少し、肝臓と脾臓の重量が増加した。胸腺と脾臓の影響はいずれも免疫毒性の可能性を示唆するものである。この脾臓重量の増加は、T 細胞数と B 細胞数の絶対的な増加によるもので、相対的な細胞数は一定であった。Ag-NP の蓄積を示す褐色および黒色の色素が、肝臓、脾臓、リンパ節で病理組織学的に観察された。臨床化学検査では肝障害 (アルカリホスファターゼ、アラニントランスアミナーゼ、アスパラギン酸トランスアミナーゼの増加) が認められたが、病理組織検査では確認できなかった。血液学では、いくつかの赤血球パラメータの低下がみられた。最も顕著な毒性効果は、20 nm と 100 nm の Ag-NP の両方で、高用量で脾臓の NK 細胞活性がほぼ完全に抑制されたことであった。マイトジェン刺激した脾細胞に 20 nm の Ag-NP を処理したところ、コンカナバリン A 刺激後の IFN-γ と IL-10 産生の減少が認められたが、LPS 刺激後には IL-6 と IL-10 レベルの低下と TNF-α 産生が認められ、IL-1β 産生も増加した。100 nm Ag-NP 処理後は、IL-10 産生のみが減少した。さらに、血清 IgM 抗体と IgE 抗体の増加、血中好中性顆粒球

の増加が観察された。脾重量については、0.37 mg/kg の臨界効果用量 (CED) を設定することができた。胸腺重量 (CED05 0.01mg/kg) と機能的免疫パラメータ、すなわち NK 細胞活性の低下 (CED05 0.06mg/kg) と脾細胞の LPS 刺激 (CED05 0.04mg/kg 体重) については、対照動物と比較して 5% の変化に対する最低 CED が観察された。これらの結果から、ナノ銀の免疫系への影響については、潜在的な有害反応に最も敏感なパラメータがあることが示唆された。

D. 考察

「Nano-RA に関するガイダンス」は、現時点では経口曝露後の高感受性個体におけるアレルギー反応誘発能を評価するための、実験動物を用いた信頼性の高いデータや検証済みの研究が存在しない点を指摘していた。しかしながら、ナノマテリアル自体が潜在的なアレルゲン (タンパク質、ペプチドなど) であった場合、あるいは既知のアレルゲン分子の残基を含んでいた場合には、アレルゲン性評価において遺伝子組み換え作物の評価に関する EFSA ガイダンスで示された原則を適用すべきであると提言していた。

さらに、当該ガイダンスは世界保健機関 (WHO) 刊行の Environmental Health Criteria 244 (EHC244) にも引用されていた。EHC244 においては、免疫毒性を示すパラメータは、少なくとも OECD の健康影響に関する試験ガイドラインやその他の標準化された試験ガイドラインに既に包含されている観察項目を評価することによって、ナノマテリアルのハザード評価に含めるべきであるという、免疫毒性評価に関する一般的な合意が示されていた。

E. 結論

「Nano-RA に関するガイダンス」では、段階的リスク評価の特定のステップに免疫毒性評価を固定するのではなく、STEP2 から STEP4 の各段階で明らかになったナノマテリアルの特性に応じて、追加の検討を行う柔軟なアプローチが提案されていた。ナノマテリアルの免疫毒性では、ナノマテリアルが経口曝露後にアレルギー反応を引き起こす可能性について評価を行うための実験データや検証済みの研究が不足しており、リスク評価については段階的に進めるべきとしている。

EHC244 は食物経由の免疫反応だけでなく、呼吸器感作性、皮膚感作性等の幅広い免疫反応に関する評価を取り扱っており、食物経由の免疫毒性について特定の評価手法を取り上げておらず、ナノマテリアルによる免疫毒性に関する有効なリスク評価の枠組みは存在しないと結論付けていた。

安全性試験においては、言及されたすべての試験が特定の被験物質に適用可能とは限らない点は明確である。探索的試験が多数を占める現状において、リスクアセスメントの目的にはヒトデータが最も適切であるが、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。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、動物実験削減の趨勢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。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。

<References>

1. Gamboa & Leong, 2013, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65, 800–810.
2. Langezaal et al., 2001, *Toxicol. In Vitro*, 15, 313–318.
3. Langezaal et al., 2002, *Altern. Lab. Anim.*, 30, 581–595.
4. Dekkers et al., 2016, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 80, 46–59.
5. WHO, 2020, *Environ. Health Criteria* 244.
6. Evans et al., 2019, *Part. Fibre Toxicol.*, 16, 8.
7. EFSA GMO Panel, 2010, *EFSA J.*, 8(7), 1700.
8. EFSA NDA Panel, 2014, *EFSA J.*, 12(11), 3894.
9. Winter et al., 2011, *Nanotoxicology*, 5, 326–340.
10. Kusaka et al., 2014, *PLoS ONE*, 9, e92634.
11. Di Cristo et al., 2016, *Toxicol. Sci.*, 150, 40–53.
12. Winkler et al., 2017, *Part. Fibre Toxicol.*, 14, 21.
13. Breznan et al., 2017, *Nanotoxicology*, 11, 223–235.
14. Yoshida et al., 2011.
15. Toda & Yoshino, 2016, *J. Immunotoxicol.*, 13, 723–728.
16. Morishige et al., 2012, *Arch. Toxicol.*, 86, 1297–1307.
17. EFSA, 2010, *EFSA J.*, 8(1), 1414.
18. EFSA, 2021, *EFSA J.*, 19(5), 6585.
19. Han et al., 2020a, *J. Appl. Toxicol.*
20. Bettini et al., 2017, *Sci. Rep.*, 7, 40373.
21. Pratsinis et al., 2013, *Small*, 15, 2576–2584.

F. 研究発表

F.1. 論文発表

2. 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>.

F.2 学会発表

1. 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)
2. 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)
3. 前田洋祐, 佐藤亜紗子, 武吉正博, 立花滋博, 成田和人, 小林諒太, 島田真理子, Priyanka M, Rahul D, Abhay D, Namhee K, Miriam J, 福山朋季, 松本一彦, 赤堀有美, 足利太可雄, 大野彰子, 小島肇, 小野敦: 皮膚感作性試験代替法α-Sens®のValidation 研究 (Phase I), 日本動物実験代替法学会 第37回大会 (2024.11.30, 栃木)
4. 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)
5. 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)
6. 荒井りおん, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: ナノマテリアル吸入毒性試験法の開発に向けた、各種シリカナノ粒子曝露によるTHP-1細胞活性化のメカニズム解析と新規評価指標候補遺伝子の発現解析, 日本動物実験代替法学会 第37回大会 (2024.11.30, 栃木)
 7. 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)
 8. 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ド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)
 9. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Maki Yamashiro, Kazutoshi Iijima, Akihiko Hirose, Takao Ashikaga, Usefulness of Evaluation System for Activation Potential of Various Nanoparticles Using Monocytic Cell Line THP-1 and Prediction of Toxicity, SOT 64th Annual Meeting (2025.3.18)
 10. 大野彰子, 動物実験代替法に向けた化学物質の安全性評価手法の開発と国際動向, 日本薬学会第145年会 (2025.3.28)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし