

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 6 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 主任研究官）

**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、我々はこれまでの研究で、結晶子径 6 nm の  $\text{TiO}_2$  粒子の 90 日間反復経口投与による毒性影響は認められなかったことを明らかにした (Akagi et al, Part Fibre Toxicol. 2023)。本研究では、異なる結晶子径 (6、30、180 nm) の  $\text{TiO}_2$  粒子の 90 日間反復経口投与による生体影響を調べており、今年度は小腸パイエル板で見られた  $\text{TiO}_2$  粒子の取り込みについて生理的意義を検討するとともに、その排出性について検討するためのラットを用いた反復強制経口投与実験を実施した。病理組織学的検査において観察された  $\text{TiO}_2$  粒子は数百 nm 以上の非ナノ粒子であり、ナノサイズ粒子は光学顕微鏡では観察できないため、パイエル板におけるナノサイズ  $\text{TiO}_2$  粒子の局在を電子顕微鏡により観察した。その結果、100~200 nm 程度のチタンがパイエル板のリンパ細胞内に認められた。さらに、レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析法によりパイエル板中のチタン元素分布のイメージング解析を行ったところ、投与群ではパイエル板全体にチタン元素の分布が検出された。 $\text{TiO}_2$  の取り込みによる生体影響を検討するため、レーザーマイクロダイセクションによりパイエル板の RNA シークエンス解析を行ったところ、少数の遺伝子の発現変動が見られたものの、 $\text{TiO}_2$  投与群に共通して変化する遺伝子はほとんどなく、免疫毒性などの有害影響を示唆する遺伝子発現変化はいずれの群でも見られなかったと結論した。

また、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、ナノ酸化チタンを経口ばく露の有無によって、免疫寛容による食物アレルギー症状の緩和効果に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 IL4 や IL17 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。

一方、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、初期評価の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。

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

研究分担者：赤木純一

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 主任研究官

研究分担者：爲廣 紀正

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 ゲノム安全科学部  
主任研究官

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

## 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 のアナターゼ型二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> が消化管から生体内に取り込まれることが示唆された (Akagi et al, Part Fibre Toxicol. 2023)。そこで本研究では結晶子径の異なる TiO<sub>2</sub> 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6年度は、異なる結晶子径を持つ TiO<sub>2</sub> 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した。

### 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 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。

### **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**

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免疫毒性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. 透過型電子顕微鏡（TEM）によるパイエル板中 TiO<sub>2</sub> 粒子の観察**

0.2%炭酸水素二ナトリウム（DSP）に懸濁した 6、30、180 nm の TiO<sub>2</sub> を 90 日間反復経口投与したラット小腸（パイエル板を含む）のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）ブロックから 3 μm 厚の未染色標本を薄切し、脱パラフィン後に 2%四酸化オスミウム水溶液で後固定した。エタノール脱水後、EPON812 を用いて熱重合によりエポキシ樹脂に包埋し、ウルトラミクロトームにより 80~90 nm 厚に超薄切し、酢酸ウラニル／鉛染色液により電子染色を行った。作成した超薄切片をグリッドに載せ、HITACHI H-7600 透過型電子顕微鏡を用いて加速電圧 100 kV 電圧で透過電子顕微鏡観察を行った。

#### **B1-2. レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析法（LA-ICP-MS）によるパイエル板のチタン量イメージング**

パイエル板を含む小腸 FFPE ブロックから 10  $\mu\text{m}$  厚の切片を薄切し、ESL213 レーザーアブレーション装置 (ESI) を用いてチタン元素のイメージング質量分析を行った。波長 213 nm (Nd-YAG レーザー)、レーザー出力 8% (1.2 J/cm<sup>2</sup>)、キャリアガス Ar、繰り返し周波数 10 Hz、XY ステージ速度 25  $\mu\text{m}/\text{sec}$ 、スポットサイズ 25  $\mu\text{m}$  のライン測定で 1000  $\mu\text{m}$  角程度の範囲を測定した。ICP 質量分析は 7900 四重極 ICP-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) を使用し、<sup>42</sup>Ti (存在率 7.44%) の質量数を測定した。検量線は LA-ICP-MS 用標準物質 Solid scale (富士フイルム和光純薬, 大阪) を使用して 10、50、100、300 ppm の検量線を作成した。

### B1-3. レーザーマイクロダイセクションによるパイエル板の RNA シークエンス解析

各群 3 匹のパイエル板を含む小腸 FFPE ブロックから 10  $\mu\text{m}$  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, the Netherlands) で脱パラフィン化した後、RNeasy FFPE kit (Qiagen) で RNA を抽出した。RNA の品質は Agilent TapeStation を用いて評価した。得られた Total RNA を材料とし、SMART-Seq Stranded Kit および SMARTer RNA Unique Dual Index Kit (タカラバイオ, 草津) を用いて以下の通りライブラリー作成を行った。ランダムプライマーを用いて cDNA を合成し、SMART (Switching Mechanism At 5' End of RNA Template) 法により 1st strand cDNA の末端に特定の配列を付与した。続いて、その特定配列に対応する検体ごとに異なるタグ配列を有する Index 付きのプライマーを用いて PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物を、AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, United States) を用いた磁気ビーズ法にて精製し、scZapR と scR-Probe により

リボソーム cDNA の切断を行なった。最後に、アダプターを認識するプライマーを使用して未切断 cDNA を PCR 増幅し、シーケンスライブラリーを構築した。ライブラリーの品質評価を Agilent TapeStation を用いて実施したところ、30 nm 群の 1 検体においてライブラリー濃度が 1.3 nmol/L と低く、シーケンス解析に不適格と判断し、除外した。残る 11 検体について NovaSeq 6000 を用いて 150 塩基長のペアエンドリードによるシーケンス解析を実施した。RNA シーケンスのリードマッピングには、参照ゲノム配列として *Rattus norvegicus* (ラット) の mRatBN7.2 アセンブリに基づく配列 (mRatBN7.2.dna.toplevel.fa) および対応する遺伝子定義ファイル (mRatBN7.2.107.gtf.gz) を使用し、DRAGEN Bio-IT Platform を用いて遺伝子発現量解析を行った。

### B1-4. 生体内に取り込まれた TiO<sub>2</sub> の排出性検討のための反復経口投与

5 週齢の F344/DuCrj ラット雄 40 匹をジャクソン・ラボラトリー・ジャパンより購入し、基礎飼料 (CRF-1 ; オリエンタル酵母工業, 東京) および水道水にて 1 週間馴化飼育後、6 週齢で実験に供した。動物は温度 23 $\pm$ 1°C、湿度 50 $\pm$ 5%、換気回数 20 回/時、12 時間の明暗サイクルに制御されたバリアーシステムの飼育室で飼育した。床敷としてソフトチップ (三協ラボサービス, 東京) を敷いたポリカーボネート製箱型ケージに 2 または 3 匹ずつ収容し、ケージおよび床敷を週 2 回の頻度で交換した。動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て、同所の定める「動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守して行った。動物は投与開始日の各群の平均体重の標準偏差が最小になるように 1 群 10 匹からなる 4 群に分け、試験期間中は基礎飼料および水道水を自由摂取させた。

被験物質の投与は、ポリテトラフルオロエチレン製フレキシブルチューブ (長さ: 85mm、外径: 1.46mm、頭部: 2.4 mm、フチガミ器械, 向日) を用いて 0.2% DSP に懸濁した TiO<sub>2</sub> を毎日 1 回投与した。実験期間中、一般状態および死亡動物の有無を毎日観察し、体重および摂餌量を

週 1 回測定した。投与 90 日目に各群 5 匹を一晩絶食させ、イソフルラン吸入麻酔下で開腹し、腹部大動脈より採血を行った後、放血により安楽死させた。

## B1-5. 統計学的処理

LA-ICP-MS によるパイエル板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, United States) 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放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、

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。投与スケジュールは、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 (4µg/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。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。

### **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**

### **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. TEMによるパイエル板中TiO<sub>2</sub>粒子の観察**

ラットに投与した6、30、180 nmのTiO<sub>2</sub>の二次粒子メジアン径はそれぞれ178、362、252 nmであり、大半の粒子が光学顕微鏡で観察不可能な数百 nm以下の粒子径であったことから、ナノサイズのTiO<sub>2</sub>粒子の局在を観察するため、パラフィン包埋小腸組織標本の戻し電顕法によりパイエル板をTEM観察した。その結果、パイエル板において細胞内にTiO<sub>2</sub>粒子の存在が確認できた。また、6 nm群と180 nm群では小腸粘膜上皮細胞においてもTiO<sub>2</sub>粒子の取り込みが見られた。

#### **C1-2. LA-ICP-MSによるパイエル板のチタン量イメージング**

パイエル板のチタン量をイメージング質量分析したところ、対照群においても局所的にチタンが検出されたが、投与群においてはHE染色した連続切片でTiO<sub>2</sub>粒子が光学顕微鏡下で見られない領域であってもパイエル板領域全体にわたってチタンのシグナルの分布が見られた。

#### **C1-3. パイエル板の網羅的遺伝子発現解析**

レーザーマイクロダイセクションによりパイエル板領域のみを切り出し、RNAを抽出して

RNAシーケンスにより遺伝子発現を解析した（図4A）。各群3匹の検体について解析したところ、30 nm群の1検体はライブラリの品質チェックを通らなかったため結果から除外した。クラスタリング解析の結果、いずれの群でもクラスター形成は見られなかった。発現変動遺伝子解析では、6 nm群と30 nm群で少数の遺伝子の発現変動が見られたが、180 nm群では全く見られなかった。6 nm群では一部のケモカイン（*Ccl6*, *Ccl20*）の発現増加が見られ、Gene Ontology解析でケモカイン関連の変動が示唆されたが、それらの経路に関わる因子（*Il-13*, *Il-17* など）の発現変動は見られなかった。TiO<sub>2</sub>投与群に共通する発現変動遺伝子を調べたところ、6 nm群と30 nm群で共通して変動が見られた遺伝子は2遺伝子の発現増加のみであった。また、TiO<sub>2</sub>投与群全体で発現変動が見られた遺伝子は1遺伝子の低下のみであった。

#### **C1-4. 生体内に取り込まれたTiO<sub>2</sub>の排出性検討**

生体内（パイエル板等）に取り込まれたTiO<sub>2</sub>が排出されるか検討するため、90日間反復経口投与後8週間回復を実施している。現在13週における解剖群（各群5匹）の剖検を終了し、休薬期間中である。投与に伴う体重および摂餌量の変動は見られていない。

### **C2. ナノマテリアルの経皮/経口暴露による免疫毒性**

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は、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。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について、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。惹起後30分間の直腸内体温の変化について、経時的な体温変化及び変化の最大をグラフにした。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。惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度について、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。

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について、CD11bやCD11c陽性の単球やマクロファージ、B細胞、マスト細胞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、Treg等のCD4陽性T細胞サブpopulation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CD4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6nm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。

### 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

#### C3-1.「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)<sup>1)</sup>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)<sup>2,3)</sup>、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応した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)<sup>4)</sup> 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)<sup>5)</sup> 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)<sup>6)</sup> 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)<sup>5)</sup> 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ギー (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ギー分子の残基を含む場合、アレルギー成分の評価において、遺伝子組み換え作物のアレルギー性に関する 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。アレルギー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, 2010<sup>7)</sup> ; EFSA NDA Panel, 2014<sup>8)</sup>) 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

## **C3-2.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)<sup>9)</sup> 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 m<sup>2</sup>/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)<sup>10)</sup> 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貪食、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)<sup>11)</sup> 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) - $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  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)<sup>12)</sup> 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 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  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 $\beta$  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)<sup>13)</sup> 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)<sup>14)</sup> 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)<sup>15)</sup> 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 分間超音波破砕機で処理後、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- $\gamma$ 、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 パーセンタイルの曝露量の 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.)<sup>16)</sup>、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 Na<sup>17)</sup>

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)<sup>18)</sup>

#### 【*in vitro* 試験による評価事例】

4)-1. 新たに実施された E171 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) TiO<sub>2</sub> 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)<sup>19)</sup>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)<sup>20)</sup>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<sup>5)</sup>

### 【*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。80nm と 113nm 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。20nm 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)<sup>21)</sup>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 (10nm 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 20nm の Ag-NP を処理したところ、コンカナバリン A 刺激後の IFN- $\gamma$  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- $\alpha$  産生が認められ、IL-1 $\beta$  産生も増加した。100nmAg-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

### 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

これまでの研究では光学顕微鏡下で TiO<sub>2</sub> の取り込みを観察しており、ナノサイズ粒子の挙動

が明らかになっていなかった。本年度の研究では、TEM 観察によりナノサイズの TiO<sub>2</sub> 粒子がパリエル板の細胞内に存在することが観察された。さらに、6 nm および 180 nm では消化管粘膜上皮細胞にも TiO<sub>2</sub> 粒子が見られ、経口摂取した TiO<sub>2</sub> が消化管粘膜を介して取り込まれることが示唆された。LA-ICP-MS では、パリエル板全体にわたってチタンのシグナルが検出され、排出実験における定量的評価の手法を確立できた。

パリエル板の RNA シークエンス解析では少数の遺伝子発現変動が見られたものの TiO<sub>2</sub> 投与に共通する変化はほとんど見られず、TiO<sub>2</sub> がパリエル板の遺伝子発現に与える影響は乏しいと考えられた。6 nm 群で見られた一部のケモカイン (*Ccl6*, *Ccl20*) の発現増加は、その上流因子等の変動が見られなかったこと、および炎症反応が惹起されなかったことから偶発的な変動と考えられた。

以上の結果から、経口投与されたナノサイズ TiO<sub>2</sub> はパリエル板に取り込まれ、一部は光学顕微鏡で確認できる非ナノサイズ粒子として存在するが、免疫毒性影響は示さないと考えられた。引き続き、TiO<sub>2</sub> の排出を検討するための回復実験を実施して経口摂取した TiO<sub>2</sub> の動態および生体影響について検討する。

### 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 $\gamma$  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- $\gamma$  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。

### **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**

「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

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**

### **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 TiO<sub>2</sub> 粒子の 90 日間反復経口投与によるパイエル板へのナノサイズ TiO<sub>2</sub> 粒子の取り込みを電子顕微鏡観察およびイメージング質量分析により明らかにした。パイエル板の RNA シークエンス解析では免疫系の異常を示唆する変動は認められず、マクロファージの活性化や炎症反応、組織障害などの変化も見られなかったことから TiO<sub>2</sub> 粒子の取り込みによるパイエル板への免疫毒性影響は見られなかったと考えられた。引き続き、反復経口投与後の排出性について検討する。

### **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。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

### **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**

「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。

## **F. 研究発表**

### **F.1. 論文発表**

1. 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. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. さまざまな結晶子径の二酸化チタン粒子のラットへの90日間反復経口投与による生体影響と蓄積性の検討. 第37回発癌病理研究会 2024年8月22日 米子
2. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. ラットを用いた二酸化チタンナノ粒子の反復経口曝露による生体影響の検討. 第47回日本分子生物学会年会 2024年11月29日, 福岡
3. 赤木純一, 水田保子, 畝山瑞穂, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. F344ラットへの反復経口投与によりパイエル板に沈着した二酸化チタン粒子による生体影響の検討. 第41回日本毒性病理学会 2025年1月30日, 三島
4. Jun-ichi Akagi, Yasuko Mizuta, Mizuho Uneyama, Hirotoshi Akane, Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Kumiko Ogawa. Study of the biological effects of titanium dioxide with varying crystallite sizes following repeated oral administration in F344 rats. The 64th Annual Meeting of Society of Toxicology. 2025年3月19日, Orlando, FL, USA
5. 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
6. 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)
  7. 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)
  8. 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 $\alpha$ -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)
  9. 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)
  10. 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)
  11. 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)
  12. 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)
  13. 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)
  14. 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)
  15. 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**
1. 特許取得: なし
  2. 実用新案登録: なし
  3. その他: なし