

食品衛生基準科学研究費補助金（食品安全科学研究事業）
令和7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/経口ばく露による免疫毒性

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。初年度の検討において、ナノ酸化チタンを抗原と同時に経皮的にばく露したマウスでは、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た。この結果を踏まえ、ナノ酸化チタンを抗原と同時に経口摂取した際の影響について検討を行ったが、抗原を経口摂取した際に誘導される免疫寛容には有意な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摂取により一部の免疫細胞が影響を受ける懸念が示された。そこで今年度は、ナノ酸化チタンの経口摂取が食物アレルギーに及ぼす効果と、免疫細胞に与える影響について解析を実施した。その結果、ナノ酸化チタンの経口ばく露は、主要なバルクの免疫細胞集団に対して有意な影響を与えず、食物アレルギー症状についても顕著な増悪効果を示さないことが示唆された。しかし、抗原惹起による体温低下をわずかに抑制する傾向を認め、また、一部の免疫細胞ではサイトカインの産生が変動する可能性が示されたことから、ナノ酸化チタンが免疫系に及ぼす影響については、今後も詳細な科学的知見の集積が必要であると考えられた。

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取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、ナノ酸化チタン等が、経皮・経口ばく露による免疫系への影響を検討する。令和7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、抗原惹起によるアレルギー症状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。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。

ナノ酸化チタンの食物アレルギーに及ぼす影響に関する検討

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 6 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ナノ酸化チタンの経口投与を開始 (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 (2.4 µg / 50 µL) 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 µL 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 50 mg 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、昨年度までの解析において、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、所属リンパ節に局在する細胞の割合が変化する傾向が認められており、経口ばく露により少しでもナノ酸化チタンが体内に取り込まれた場合、T 細胞からのサイトカイン量産生が変動するなど、免疫応答に何らかの影響を及ぼす可能性があると考えられた。

令和 7 年度においては、抗原経皮感作時に最も高いアジュバント活性が認められた酸化チタン C を対象として、経口から摂取した際食物アレルギー症状に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。各群は 1 群 6 匹とし、コントロール群 (V 群)、OVA を経皮感作した OVA 群、そしてナノ酸化チタン C を段階的な濃度で経口投与し OVA を経皮感作した C 群 (1・3 濃度: 3 試験) の 3・5 群を設定した。4 週間に渡って OVA の経皮感作を継続した後、OVA 抗原を腹腔投与 (i.p.) してアナフィラキシー (能動的全身性アナフィラキシー) 反応を惹起した。惹起後 30 分にわたり、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。なお、感作の確認を目的として、血中抗体価を測定した。実施した 3 試験のうち、ナノ酸化チタンの投与濃度を 2 群に設定した典型例の結果を図 2 から図 6

に示す。OVA の経皮感作を施したマウスでは、血中の総 IgE 値の上昇とともに OVA 特異的 IgE や OVA 特異的 IgG1 の値が V 群と比較して有為に増加した (図 2)。また、C 群では、OVA 群よりもさらに OVA 特異的 IgE が増加する傾向が示された。アナフィラキシー症状のスコアリングの結果 (図 3)、OVA 群は V 群と比較してアナフィラキシースコアが高く、OVA アレルギー症状を呈していることを確認した。C 群でも OVA 群と同等レベルのスコアの変動が認められ、酸化チタンの経口ばく露の有無による影響は確認されなかった。図 4 は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化として、A は経時的な体温変化、B は変化の最大値を示している。抗原惹起 30 分後、OVA 群は V 群と比較して直腸温が平均 3.4 °C 低下していた。C_{20mg} 群では、V 群と比較して直腸温が平均 2.5 °C 低下しており、OVA 群に比べ体温の低下が 0.9 °C 程度抑制される傾向を認めた。また、C_{6.7mg} 群でも、V 群比で平均 3.0 °C の直腸温の低下を示し、OVA 群の体温低下が 0.4 °C 程度抑制される傾向を認めた。異なる実験においても同様の効果が再現よく確認されており、ナノ酸化チタン C には濃度依存的に食物アレルギー症状を緩和する傾向があると示唆された。以上の結果から、ナノ酸化チタン C の経口摂取によって、軽微ながら食物アレルギー症状を抑制する可能性が示唆された。

図 4 と図 5 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。脾細胞については、CD11b および CD11c 陽性の単球 (図 5 A)、マクロファージ、B 細胞、マスト細胞等 (図 5 B) のいずれの細胞においても、群間で有意な増減を示す細胞集団は認められなかった。また、図 6 に示すように、mLN における B 細胞集団や T 細胞集団にも有意な変動は認められず、IgE 産生 B 細胞や抗原刺激により IL-4 を産生する CD4⁺T 細胞においても、ナノ酸化チタン C 投与による影響は観察されなかった。一方、IL-17 を産生す

る $CD4^+T$ 細胞については、C 群において有意に増加することが確認された。これらの結果から、粒子径 6 nm のナノ酸化チタン C を消化管経路でばく露した場合において、免疫細胞集団全体に対する有意な影響は確認できないが、一部の特定細胞集団に対し影響を与える可能性が示唆された。

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、粒子径 6 nm のナノ酸化チタン C を経口投与した際の食物アレルギー症状の影響を OVA 経皮感作モデルを用いて検討した。その結果、総 IgE や IgG1 の血中濃度はいずれも、OVA 経皮感作により有意に上昇していた。C 群では OVA 群より OVA 特異的 IgE が高値傾向であり、この結果は、ナノ酸化チタン C の経口ばく露が、 T_H2 依存的な液性免疫応答に作用する可能性を示唆している。ただし、アナフィラキシー応答に対して C 群で顕著な増悪効果を示さないことを確認しており、この程度の特異的 IgE の増加が食物アレルギーなどの病態に対し実質的な影響を与えるかについては不確実性が残る。また、腸管では樹状細胞から産生される $TGF-\beta$ により制御性 T 細胞が誘導され、食物抗原への免疫寛容が維持されるが、ナノ酸化チタン E171 による腸管での $TGF-\beta$ の抑制効果 (Bruno L et al., Food Chem. Toxicol. 2023) とは異なり、少なくともナノ酸化チタン C の経口ばく露ではこの作用への直接的な介入はないものと考えられた。さらにこの結果は、昨年度の検討における、ナノ酸化チ

タン C の経口ばく露が経口免疫寛容に影響しないという結論を支持するものと考えられる。

SPL 及び mLN における免疫細胞の解析では、CD11b/CD11c 陽性単球、マクロファージ、B 細胞等のいずれの細胞においても、群間で有意な変動は認められなかった。加えて、IgE 産生 B 細胞や IL-4 産生 $CD4^+T$ 細胞といったサブポピュレーションについても有意な影響は確認されなかった。経口投与されたナノ酸化チタン粒子は消化管からの吸収が限られており、肝臓や腸間膜リンパ節においてもごくわずかに検出されるに過ぎないことが報告 (Jun-ichi A et al., Part Fibre Toxicol. 2023, Liesbeth G et al., Part Fibre Toxicol. 2014) されており、本試験結果もそれらの結果と大筋で整合するものと考えられる。但し、今年度の検討において IL-17 産生 $CD4^+T$ 細胞のような一部の細胞集団が C 群で有意に増加することを確認しており、わずかな生体内への取り込みによっても影響を受ける細胞が存在する可能性が示唆された。

他方、既報の報告において、食品添加物グレードのナノ酸化チタンが $TGF-\beta$ や IL-10 の産生を抑制し、OVA の免疫寛容を阻害することや、DSS 誘発性大腸炎では、ナノ酸化チタンの長期経口ばく露が mLN の $CD4^+T$ 細胞、制御性 T 細胞、マクロファージを減少させ、腸管免疫バランスを乱す可能性が報告 (Wei M et al., J Agric. Food Chem. 2019) されている。これらの試験と本試験の相違は、生物種を含む評価モデルの違いや酸化チタンの種類に依存した粒子の物理化学特性の違い、そしてばく露期間の違いに起因する可能性があり、今後も引き続き生体内での影響について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。粒子径 6nm のナノ酸化チタン C の経口摂取は、免疫細胞集団全体に対して有意な影響を与えず、食物アレルギー症状に対しても顕著な増悪効果を示さないことが示唆された。検討した項目の中には、軽微なアレルギー症状の改善傾向が観察されたものの、その効果は限定的であり、現時点では食品衛生上のリスクとして評価すべき明確な根拠は得られなかった。今後は、より長期なばく露や、免疫抑制作用に対する詳細な解析することで、食品添加物や化粧品としての安全性評価の精度を高める科学的知見の集積が必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

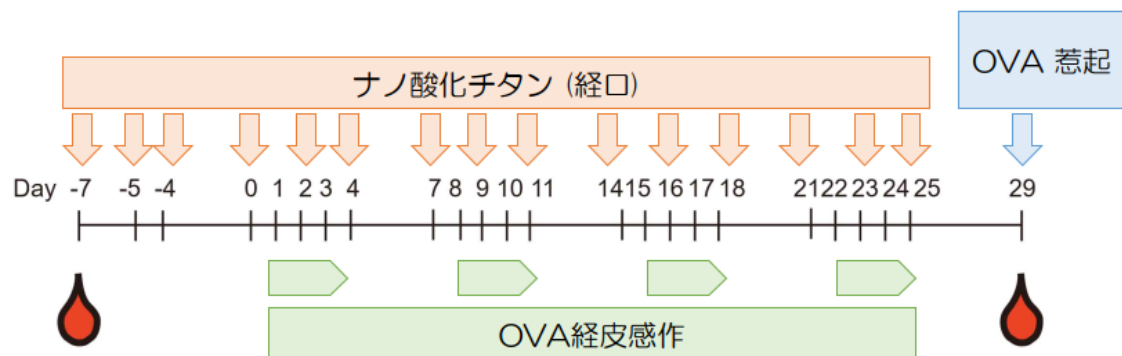


図1 OVA食物アレルギーモデルでのナノ酸化チタンの影響に関する検討スケジュール

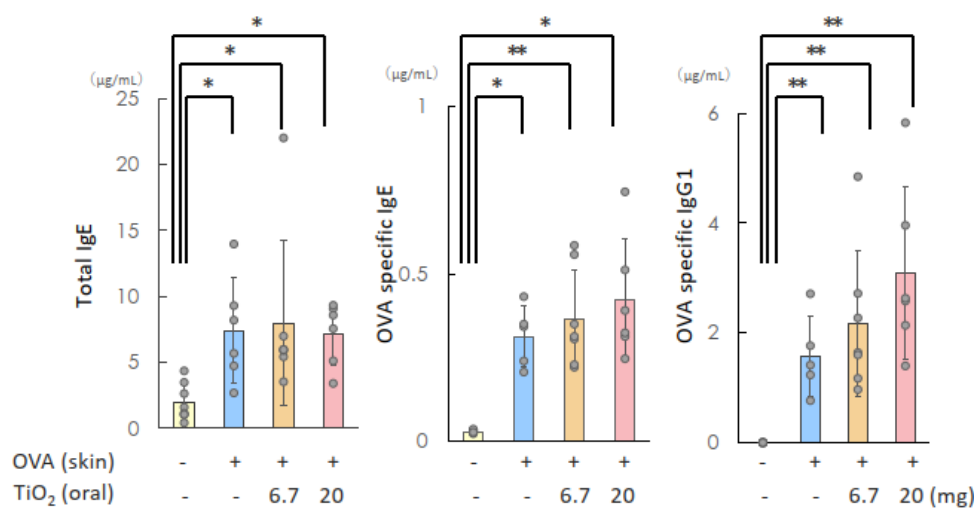


図2 抗原惹起時の血中抗体価

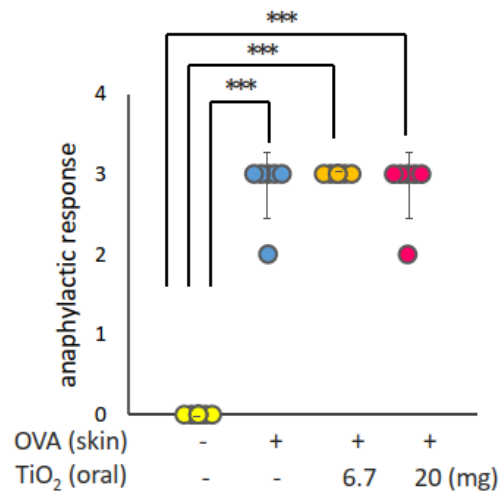


図3 ナノ酸化チタンのアナフィラキシーへの影響

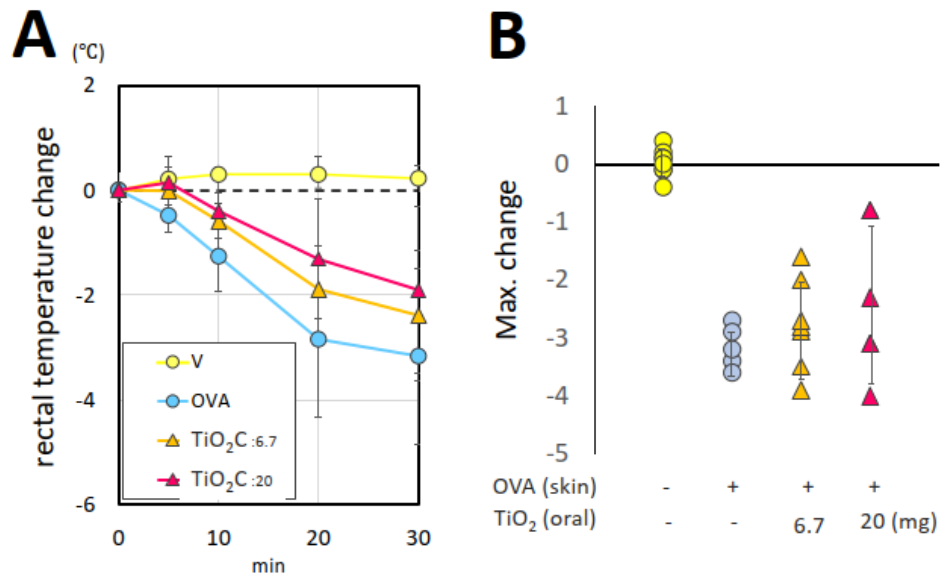


図4 抗原投与による体温変化

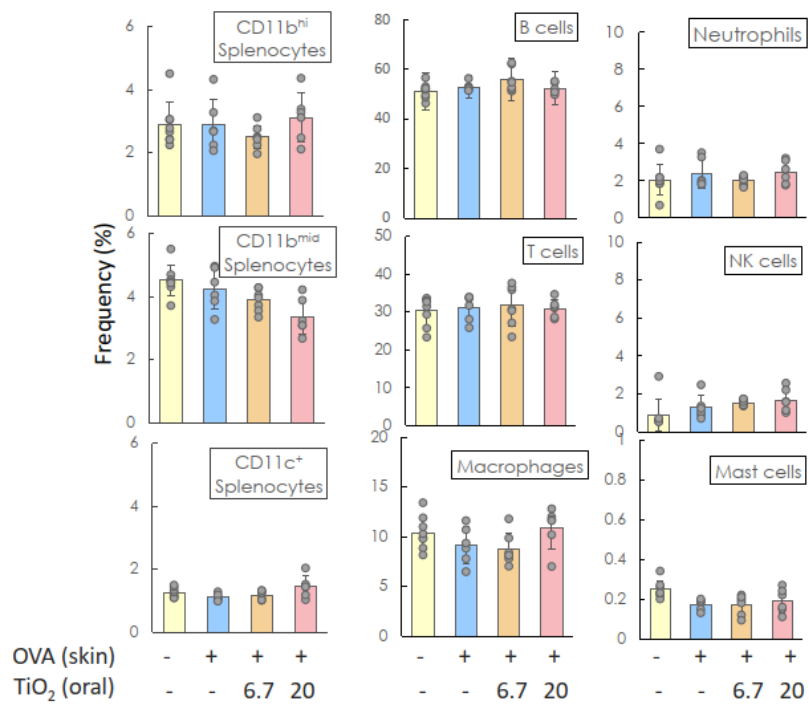


図5 脾臓に局在する免疫細胞

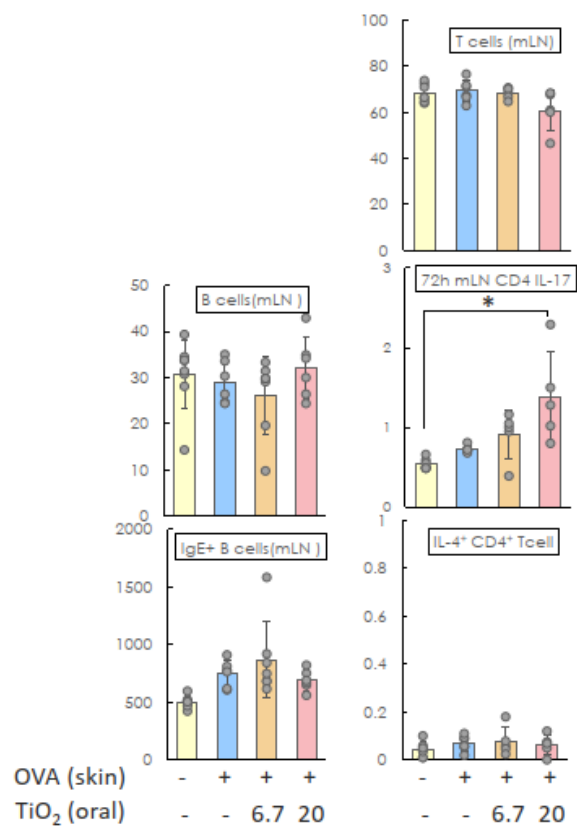


図6 腸間膜リンパ節に局在する免疫細胞