

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）  
「食品及び食品用容器包装に使用される新規素材の安全性評価に関する研究」

令和4年度 分担研究報告書

## ナノ酸化チタン等の経皮/経口暴露による免疫毒性の解析

研究分担者：安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長  
研究協力者：爲廣 紀正 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 協力研究員

### 研究要旨

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ため、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、アレルギー経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討した。OVA  $2\mu\text{g}$  × 4回の経皮感作、OVA  $30\text{mg}$  × 7回の経口投与による追加免疫、その後のOVA  $50\text{mg}$  の経口投与によりアレルギー症状を惹起する抗原経皮感作-経口惹起実験系を用いて抗原経口投与時のナノ酸化チタンの共存による影響について検討した。令和2、3年度においては、粒子径  $6\text{nm}$ 、 $15\text{nm}$  及び  $30\text{nm}$  のアナターゼ型ナノ酸化チタンが経口投与時の共存により経口追加免疫を有意に増強することを示した。一方、粒子径  $15\text{nm}$  及び  $30\text{-}50\text{nm}$  のルチル型ナノ酸化チタンでは、このような経口追加免疫の増強効果は見られなかった。令和4年度においては、粒子径  $6\text{nm}$  ・アナターゼ型のナノ酸化チタンを経皮感作時及び経口追加免疫時の両過程においてOVAと共存させ、その影響を検討した。その結果、これまでの検討と同様にOVA経皮感作及び経口追加免疫を増強したが、経皮感作時の共存による経口追加免疫増強効果に対する影響は見られなかった。今後、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要と考えられた。

### A. 研究目的

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては、更なる応用が期待されている一方で、健康影響についてはまだ十分な安全性情報がないとされており、今日も引き続き議論がなされている。酸化チタンは食品・食品用容器包装用途に使用されている一方で、多くの日焼け止め製品に配合されており、経皮及び経口暴露の頻度が高い。ナノ酸化チタン経皮曝露の影響に関しては、これまでに皮膚透過性試験や皮膚感作性試験等が行われているが、いずれも明らかな作用は認められていない。一方で、最近、タンパク質が皮膚から取り込まれ抗原となる経皮感作経路が食物アレルギー発症の重要な要因として注目されている。そこで、研究分担者である安達らはこれまでにナ

ノ酸化チタンがアレルギー経皮感作に与える影響についてマウスモデル実験系を用いて検討し、粒子径  $6\text{nm}$  ・アナターゼ型のナノ酸化チタンが経皮感作時の共存により感作を増強すること、また、経皮感作後の経口追加免疫時の共存によりアレルギー症状を増強す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ついての、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、アレルギー経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与

える影響について検討する。

令和2年度においては、検討を続けていた抗原経皮感作-経口追加免疫-経口惹起実験系を精緻化して、アレルギーの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討し、粒子径 6 nm・アナターゼ型及び粒子径 30 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンが経口追加免疫を増強すること、粒子径 30-50 nm・ルチル型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を示した。令和3年度においては、粒子径及び結晶型の影響についてさらに検討し、粒子径 15 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンでは経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が見られ、一方、粒子径 15 nm・ルチル型のナノ酸化チタンでは経口惹起のみ増強する傾向が見られることを示した。令和4年度においては、粒子径 6 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンを経皮感作時及び経口追加免疫時の両過程において OVA と共存させ、その影響を検討した。

## B. 研究方法

### 試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン C

(粒子径 6 nm・アナターゼ型)

(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、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ト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。

### 【実験 1】経皮感作時及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響

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。各実験群の設定および投与スケジュールを Fig. 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  $\mu$ g/50  $\mu$ L)、あるいは OVA と酸化チタンの混合懸濁液 (OVA:ナノ酸化チタン重量比=16:1) 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  $\mu$ 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。その後、Day 28、30、32、35、37、39、42 に OVA 30 mg を経口投与 (p.o.) し (3 回/週、計 7 回)、追加免疫を行った。この時、ナノ酸化チタン投与群では、OVA 30mg と TiO<sub>2</sub>C 1.88mg (OVA:ナノ酸化チタン重量比=16:1) を懸濁させて経口投与した。Day 1、25、43 には部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 抗体を ELISA 法により測定した。Day 49 に OVA 50mg を経口投与し、アレルギー反応を惹起した。追加免疫及び惹起時の経口投与後 60 分間は、マウスの直腸温測定、及び下痢症状の観察を行い、下痢症状については Table 1 の基準に従ってスコアリングした。

### 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

### 【実験 1】経皮感作時及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響

抗原経皮感作・経口追加免疫・経口惹起実験系を用いた、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響に関する令和 2、3 年度における検討では、粒子径 6 nm・アナターゼ型及び粒子径 30 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンが経口追加免疫を増強すること、また粒子径 15 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンでは経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が見られることを示した。一方、粒子径 15 nm・ルチル型のナノ酸化チタンでは経口惹起のみ増強する傾向が見られ、粒子径 30-50 nm・ルチル型のナノ酸化チタンではこのような増強効果は見られなかった。

令和 4 年度においては、被験物質として、酸化チタン C (粒子径 6 nm・アナターゼ型) を用い、経皮感作時及び経口追加免疫時の両過程における共存効果について検討した。各群の実験条件、及び実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。1 群 5 匹とし、経口投与時、あるいは経皮感作時及び経口投与時の両過程において酸化チタン C を共存させる群を設定した。OVA:ナノ酸化チタン重量比は、これまでと同様に、経皮感作及び経口追加免疫においてナノ酸化チタンによる増強効果が見られた 16:1 とした。

Fig. 2 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。OVA 経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ (Day 25)、その後の経口追加免疫によってさらに増加した (Day 43)。経皮感作においては、これまでの検討と同様に、酸化チタン C の共存により抗体産生が増強される傾向が見られた (Day 25)。一方、追加免疫時の抗体産生に対する酸化チタン C の共存による影響は見られなかった。

次に、経口追加免疫、及び経口惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果を、Fig.3 及び Fig.4

に示す。体温に関して、OVA 群では、経口追加免疫時及び経口惹起時に、V 群と比較して有意な低下が見られた。OVA-TiO<sub>2</sub>C po 群、OVA-TiO<sub>2</sub>C pc+po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られた。また経口追加免疫 6 回目において、OVA-TiO<sub>2</sub>C po 群では OVA 群と比較して体温が優位に低下し、OVA-TiO<sub>2</sub>C pc+po 群でも OVA 群と比較してより低下する傾向が見られた。一方、OVA-TiO<sub>2</sub>C po 群と OVA-TiO<sub>2</sub>C pc+po 群との間では差は見られなかった。下痢症状に関しては、OVA 群、OVA-TiO<sub>2</sub>C po 群、OVA-TiO<sub>2</sub>C pc+po 群とも、V 群と比較して有意に高いスコアとなった。また、経口追加免疫 5 回目及び 6 回目では、OVA-TiO<sub>2</sub>C po 群及び OVA-TiO<sub>2</sub>C pc+po 群で、OVA 群と比較して優位に高いスコアとなった。一方、OVA-TiO<sub>2</sub>C po 群と OVA-TiO<sub>2</sub>C pc+po 群との間では差は見られなかった。

## 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等が、アレルゲン経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討する。

令和 2 年度においては、マウスを用いた抗原経皮感作・経口追加免疫・経口惹起実験系を使用して、アレルゲンの経口投与に対するナノ酸化チタンの影響について検討し、酸化チタン C (粒子径 6 nm・アナターゼ型) 及び酸化チタン E (粒子径 30 nm・アナターゼ型) が経口追加免疫を有意に増強すること、酸化チタン F (粒子径 30-50 nm・ルチル型) ではこのような増強効果は見られないことを示した。令和 3 年度においては、粒子径 15 nm・アナターゼ型の酸化チタン D では経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が見られること、一方、粒子径 15 nm・ルチル型の酸化チタン A では

経口惹起のみ増強する傾向が見られることを示した。

令和4年度においては、粒子径 6 nm・アナターゼ型の酸化チタン C を経皮感作時及び経口追加免疫時の両過程において OVA と共存させ、その影響を検討した。用量は、これまでの検討において増強効果が見られた OVA:酸化チタン C 重量比=16:1 に基づき、経皮感作時は OVA 2 μg+TiO<sub>2</sub>C 125ng、経口追加免疫時は OVA 30mg+TiO<sub>2</sub>C 1.88mg とした。検討の結果、酸化チタン C はこれまでの検討と同様に、OVA 経皮感作及び経口追加免疫を増強したが、経皮感作時の共存による経口追加免疫増強効果に対する影響は見られなかった。これらの結果から、ナノ酸化チタンは、経皮感作及び経口追加免疫を増強するが、経皮感作時の共存により経口追加免疫増強を促進する効果は無いことが示唆された。

先行研究においては、ナノマテリアルの経皮感作増強効果は結晶型とは関係なく粒子径により異なり、粒子径が小さいナノマテリアルの方が経皮感作増強効果が大きいことが示唆されている。一方本研究ではこれまでに、粒子径 6-30 nm・アナターゼ型のナノ酸化チタンは、同程度の粒子径のルチル型のナノ酸化チタンと比較して、抗原経口追加免疫を増強する程度が大きいことが示されている。今後、本モデル実験系を用いて、経皮感作時及び経口追加免疫時のナノ酸化チタンの増強効果の作用機序について検討し、ナノマテリアルが免疫系に影響を与えるメカニズム等の解析を進めることが必要と考えられる。

## E. 結論

食品及び食品用容器包装用途に使用され、経口及び経皮等で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ため、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、アレルゲン経皮感作後の経口暴露によるアレルギー症状発現に与える影響について検討した。OVA 2 μg×4

回の経皮感作、OVA 30 mg×7 回の経口投与による追加免疫、その後の OVA 50 mg の経口投与によりアレルギー症状を惹起する抗原経皮感作-経口追加免疫・経口惹起実験系を用い、令和4年度は、経皮感作時のナノ酸化チタンの共存がナノ酸化チタンによる経口追加免疫増強作用に与える影響について検討した。その結果、酸化チタン C では、これまでの検討と同様に OVA 経皮感作及び経口追加免疫に対する増強効果が見られたが、経皮感作時の共存による経口追加免疫増強作用は見られなかった。今後、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について、さらなる科学的知見を集積することが必要である。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
なし

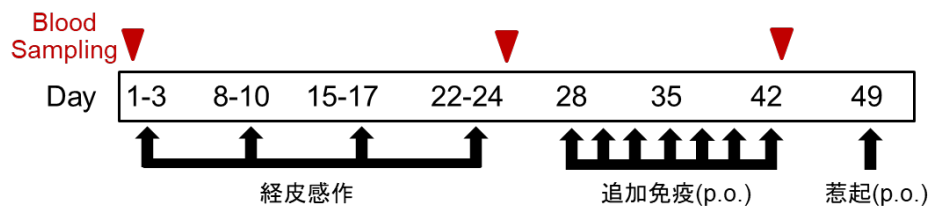
## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

投与スケジュール



経皮感作時及び経口投与時の小粒子径ナノ酸化チタンの影響(1群5匹 x 5群)

群名	経皮感作	追加免疫(p.o.)	惹起(p.o.)
Vehicle (V)	PBS	Saline	OVA 50mg
OVA	OVA 2 $\mu$ g	OVA 30mg	OVA 50mg
OVA-TiO <sub>2</sub> C po	OVA 2 $\mu$ g	OVA 30mg+TiO <sub>2</sub> C 1.88mg	OVA 50mg
OVA-TiO <sub>2</sub> C pc+po	OVA 2 $\mu$ g+TiO <sub>2</sub> C 125ng	OVA 30mg+TiO <sub>2</sub> C 1.88mg	OVA 50mg
TiO <sub>2</sub> C only	TiO <sub>2</sub> C 125ng	TiO <sub>2</sub> C 1.88mg	OVA 50mg

※TiO<sub>2</sub>C: 粒子径6nm, アナターゼ型

Figure 1 各実験群の設定および投与スケジュール

Table 1 下痢症状スコアリングの基準

Score 0	solid state
1	funicular form
2	slurry
3	watery state

※Allergy 67, 201-9 (2012). スコア2以上を下痢とする。

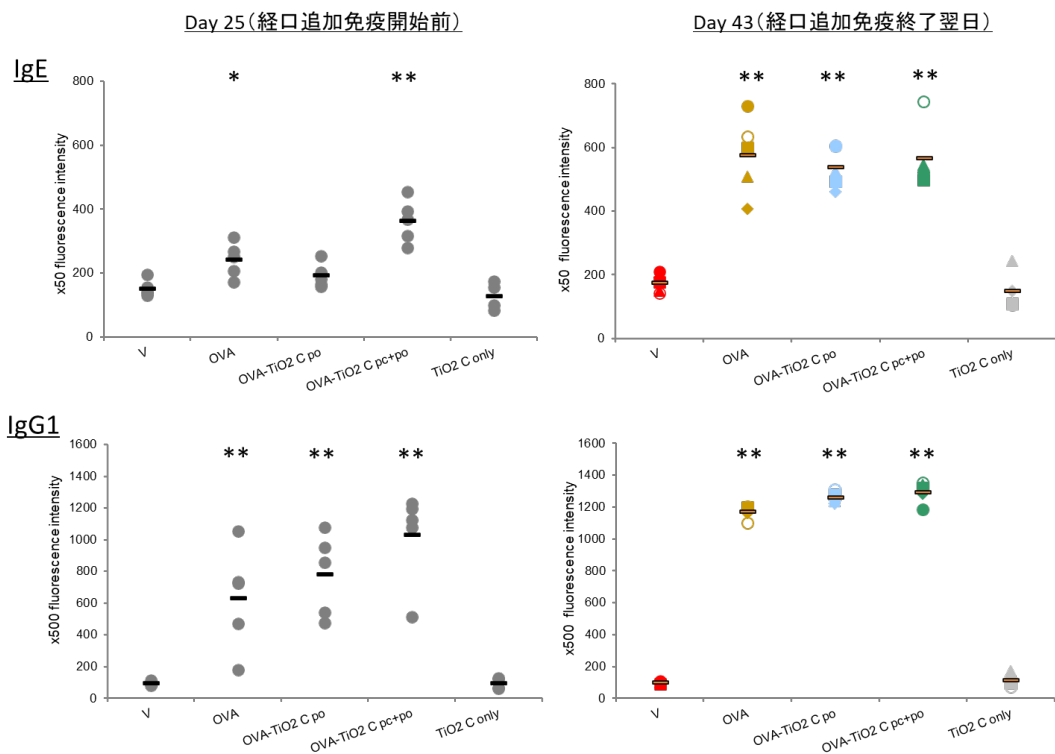


Figure 2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生  
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs V group by Dunnett's test.

経口追加免疫

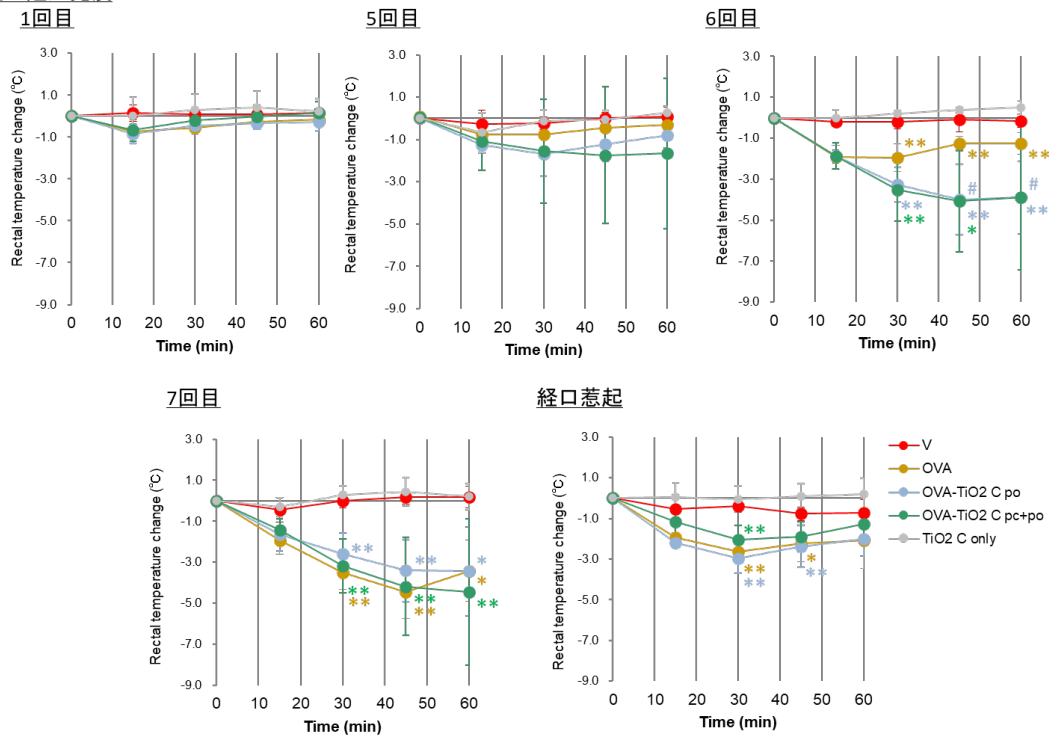
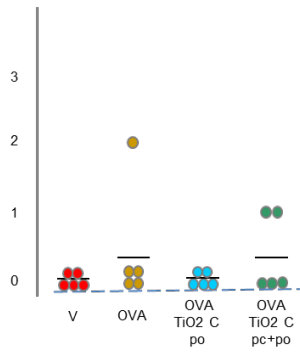


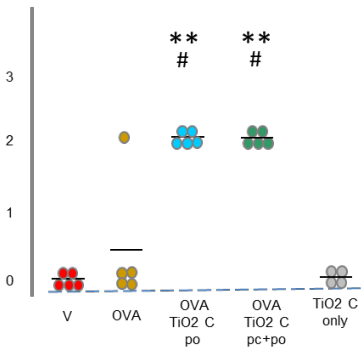
Figure 3 抗原経口投与後の体温低下  
\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs V group by Dunnett's test. #p<0.05 vs OVA group by Student's t-test.

経口追加免疫

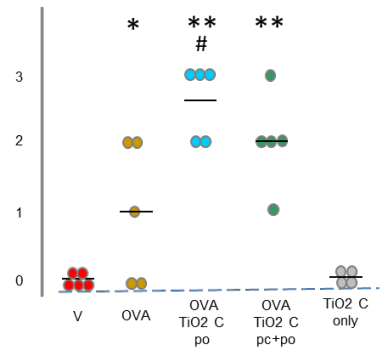
1回目



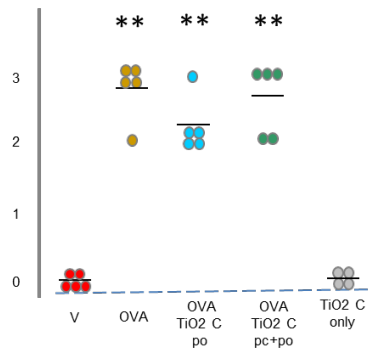
5回目



6回目



7回目



経口惹起

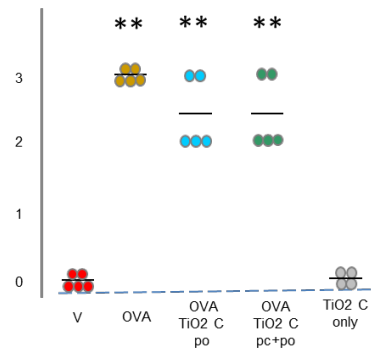


Figure 4 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング

ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs V group by Dunnett's test. # $p < 0.05$  vs OVA group by Student's t-test.