

## 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：為広 紀正 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

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年度においては、粒子径  $6\text{nm}$ ・アナターゼ型、及び粒子径  $30\text{nm}$ ・アナターゼ型のナノ酸化チタンが経口追加免疫を有意に増強することを示した。令和3年度においては、粒子径  $15\text{nm}$ ・アナターゼ型のナノ酸化チタンについて、経口投与時の共存により経口追加免疫を増強する傾向が見られた。一方、これまでの検討では、粒子径  $30\text{-}50\text{nm}$ ・ルチル型、及び粒子径  $15\text{nm}$ ・ルチル型の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や増強傾向は見られていない。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る。

### 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、いずれも明確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するため、粒子径 15 nm・アナターゼ型、及び粒子径 15 nm・ルチル型のナノ酸化チタンに関して、抗原経口暴露時の共存効果について検討した。

## B. 研究方法

### 試料及び試薬

被験物質としては、

酸化チタン A

(粒子径 15 nm・ルチル型)

酸化チタン D

(粒子径 15 nm・アナターゼ型)

(両者とも表面未処理)

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。血清中の Mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) の定量は、MCPT-1 (mMCP-1) Mouse Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific 88-7503-88) 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。

### 酸化チタンナノ材料の懸濁液調製

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ポ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。

### 【実験 1】粒子径 15nm のナノ酸化チタンの影響に関する検討

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。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) 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>A または D 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、及び IgG2a 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。また惹起時は、60 分後に採血し、血清中の mMCP-1 濃度を測定した。

### 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】粒子径 15nm のナノ酸化チタンの影響に関する検討

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、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が示された。

令和3年度においては、被験物質として、酸化チタン A (粒子径 15 nm・ルチル型)、及び酸化チタン D (粒子径 15 nm・アナターゼ型) の2種を用い、抗原経口暴露時のナノ酸化チタンの共存効果についてさらに検討した。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、経口投与時に酸化チタン A あるいは D 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。経皮感作により IgE、IgG1 抗体の産生が見られ、その後の経口追加免疫によってさらに増加した。追加免疫時の酸化チタン A、D 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>A po 群、OVA-TiO<sub>2</sub>D po 群でも同様に V 群と比較して有意な低下が見られた。経口追加免疫 6 回目及び 7 回目において、OVA-TiO<sub>2</sub>D po 群では OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。また経口惹起時には、OVA-TiO<sub>2</sub>A po 群及び OVA-TiO<sub>2</sub>D po 群で OVA 群と比較して体温がより低下する傾向が見られた。下痢症状に関しては、OVA 群、OVA-TiO<sub>2</sub>A po 群、OVA-TiO<sub>2</sub>D po 群で、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 4 回目では、OVA 群と比較して OVA-TiO<sub>2</sub>D po 群の方がスコアが高い傾向が見られた。

Fig.5 には、経口惹起 60 分後の血清中の mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) の定量結果を示す。mMCP-1 はマウス小腸粘膜のマスト細胞のプロテアーゼであり、マスト細胞の活性化時に細胞外に放出される。Fig.5 に示すとおり、OVA 群、OVA-TiO<sub>2</sub>A po 群、OVA-TiO<sub>2</sub>D po 群では、経口惹起 60 分後の血清中の mMCP-1 濃度は、V 群の 6100-6600 倍ほどと非常に高く、V 群との間に有意差が見られた。OVA 群と OVA-TiO<sub>2</sub>A po 群あるいは OVA-TiO<sub>2</sub>D po 群との間では有意差は見られなかった。

なお、陰性対照群である酸化チタン A あるいは D のみを経口投与した群 (TiO<sub>2</sub>A only 群、TiO<sub>2</sub>D only 群) では、OVA 特異的抗体産生、OVA 経口投与時の体温低下、下痢症状、血清中 mMCP-1 濃度増大のいずれも見られなかった。

これらの結果から、経皮感作・経口追加免疫・経口惹起実験系において、粒子径 15 nm の2種のナノ酸化チタンのうち、アナターゼ型の酸化チタン D では、経口投与時に共存させることにより、経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が示された。一方ルチル型の酸化チタン A では経口惹起でのみ増強する傾向が見られた。

### 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、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、酸化チタンC(粒子径6nm・アナターゼ型)及び酸化チタンE(粒子径30nm・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30-50nm・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、粒子径及び結晶型の影響についてさらに検討するため、酸化チタンA(粒子径15nm・ルチル型)、及び酸化チタンD(粒子径15nm・アナターゼ型)の2種に関して、抗原経口暴露時の共存効果について検討した。筆者らのこれまでの検討では、酸化チタンA及びDは、OVA経皮感作、及びOVA腹腔内感作において増強効果を示している。本研究の検討においては、酸化チタンDは、経口投与時に共存させることにより、経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が示された。一方ルチル型の酸化チタンAでは経口惹起でのみ増強する傾向が見られた。これらの結果から、経口投与時の共存効果に関して、粒子径6-30nm・アナターゼ型の酸化チタンは、抗原経口追加免疫を増強する、または増強する傾向がみられることが示された。今後、アナターゼ型でより粒子径が大きいナノ酸化チタンや、表面修飾等の影響についても検討を進める必要があると考えられる。

また、本年度は、経口惹起後の血清中の

mMCP-1濃度について検討を行った。mMCP-1はマウス小腸粘膜のマスト細胞の顆粒に含有されているプロテアーゼであり、小腸粘膜マスト細胞の活性化に伴う脱顆粒により細胞外に放出されることが知られている。そのため、マウスを用いた食物アレルギーモデル実験等において血中濃度の増大がアレルギー反応の指標として利用されている。本研究では、体温低下や下痢等のアナフィラキシー症状が見られたOVA群、OVA-TiO<sub>2</sub>A po群、OVA-TiO<sub>2</sub>D po群において、経口惹起60分後の血清中のmMCP-1濃度はV群と比較して非常に高く、V群との間に有意差が認められた。また濃度も65µg/mL程度であり、過去の報告例(Clin Exp Allergy. 2017;47:1204-1213)とも合致していることから、本研究で使用しているマウスモデル系の妥当性が示されたものと考えられる。今後、本モデル実験系を用いて、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も検討が必要であろう。

## 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。OVA2µg×4回の経皮感作、OVA30mg×7回の経口投与による追加免疫、その後のOVA50mg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ところ、酸化チタンD(粒子径15nm・アナターゼ型)では、経口投与時に共存させることにより、経口追加免疫及び経口惹起を増強する傾向が示された。一方、酸化チタンA(粒子径15

nm・ルチル型)では経口惹起でのみ増強する傾向が見られた。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

- 1) Akiyama H, Adachi R. Japanese food allergy-labeling system and comparison with the international experience; detection and thresholds. Food Safety 2021; 9(4) 101-116.

### 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

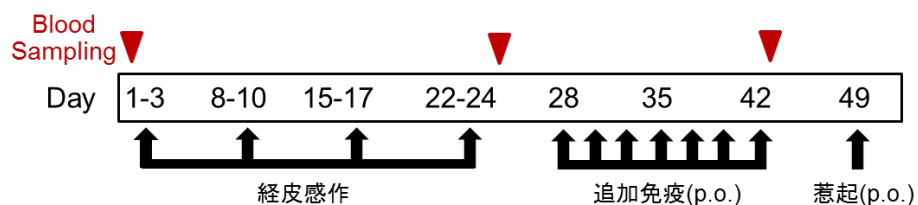
### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

投与スケジュール



粒子径15nmのナノ酸化チタンの影響に関する検討(1群5匹 x 4群、1群2匹 x 2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> A po	OVA 2 $\mu$ g	OVA 30mg +TiO <sub>2</sub> A 1.88mg	OVA 50mg
OVA-TiO <sub>2</sub> D po	OVA 2 $\mu$ g	OVA 30mg+TiO <sub>2</sub> D 1.88mg	OVA 50mg
TiO <sub>2</sub> A only (2匹)	PBS	TiO <sub>2</sub> A 1.88mg	OVA 50mg
TiO <sub>2</sub> D only (2匹)	PBS	TiO <sub>2</sub> D 1.88mg	OVA 50mg

※ TiO<sub>2</sub>A: 粒子径15nm、ルチル型、TiO<sub>2</sub>D: 粒子径15nm、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。

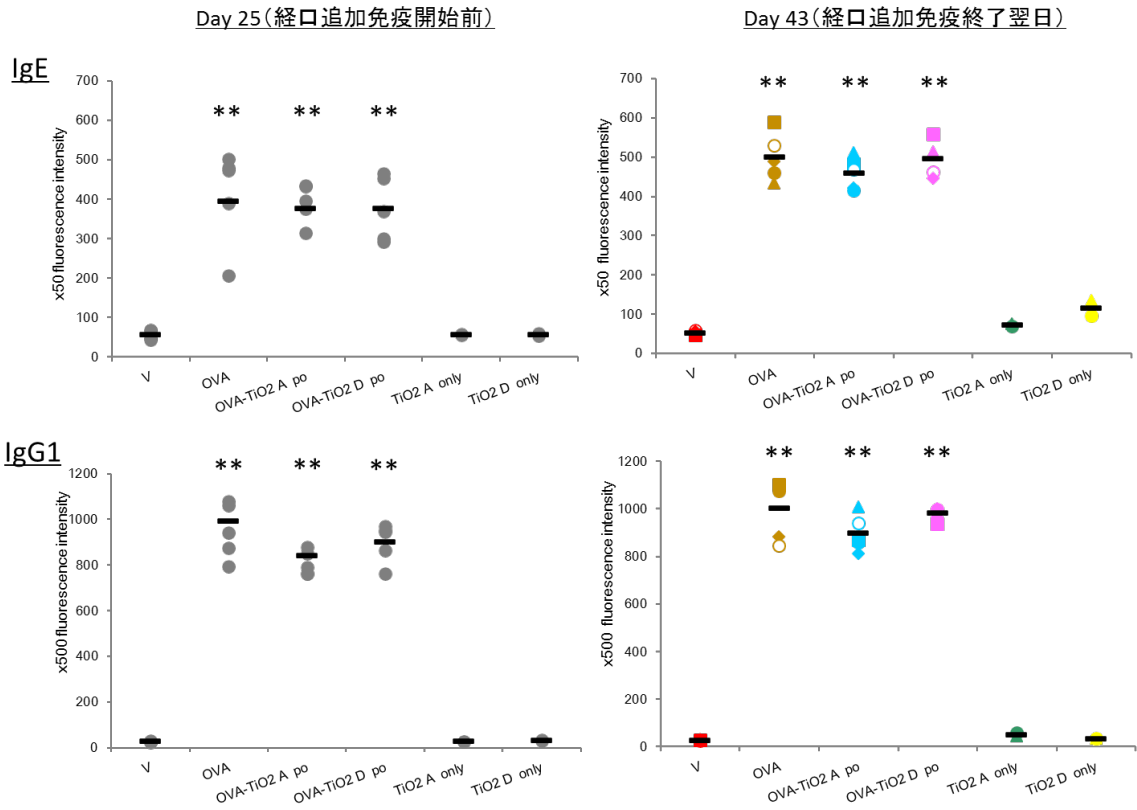


Figure 2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生  
 ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。\*\* $p < 0.01$  vs V group by Dunnett's test.

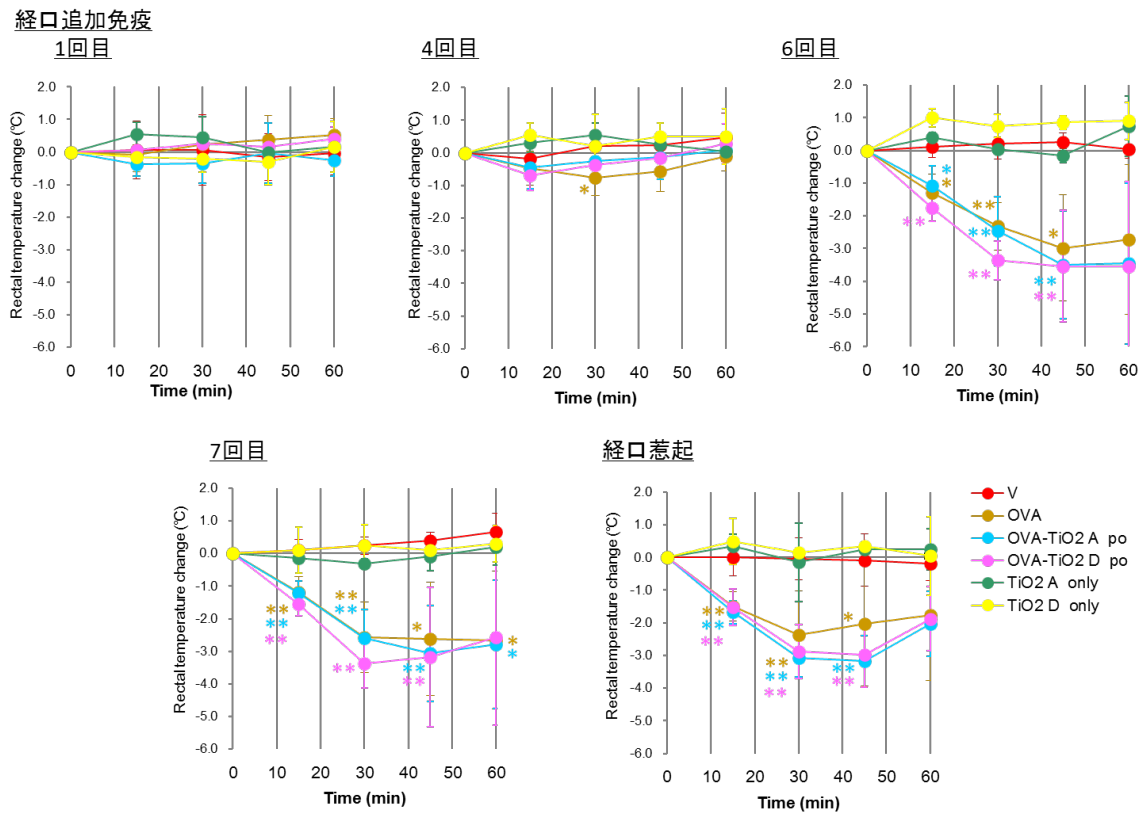


Figure 3 抗原経口投与後の体温低下  
 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs V group by Dunnett's test.

経口追加免疫

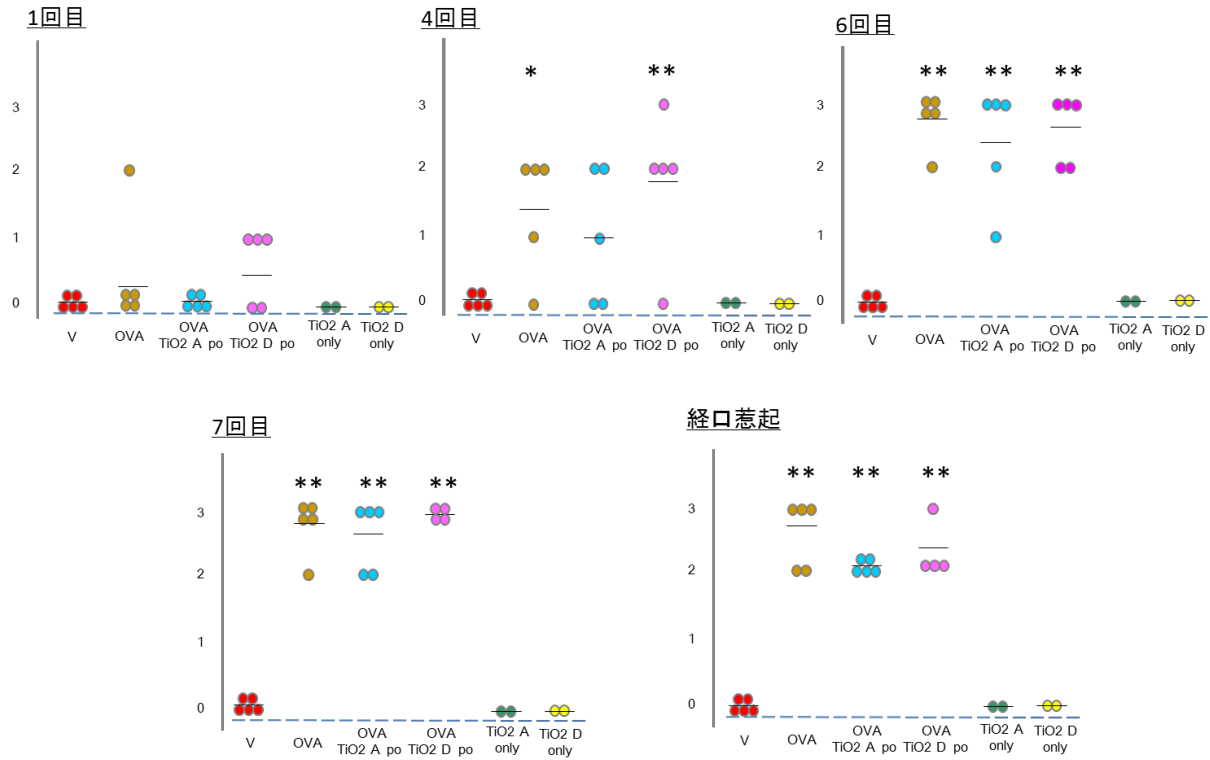


Figure 4 抗原経口投与後60分間の下病症状スコアリング  
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs V group by Dunnett's test.

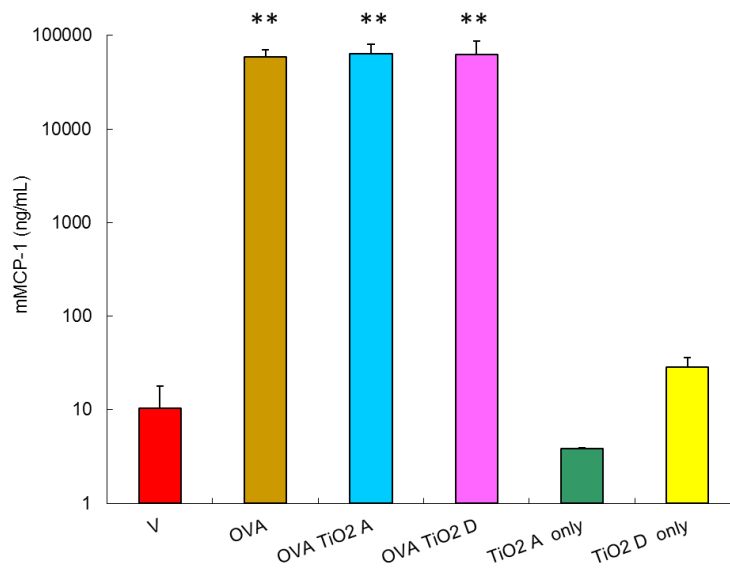


Figure 5 経口惹起60分後の血清中mMCP-1濃度  
\*\* $p < 0.01$  vs V group by Dunnett's test.