

200939056A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

トキシコキネティクス/トキシコプロテオミクス解析による  
食品ナノマテリアルの免疫毒性リスク予測・回避法の開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉岡 靖雄

平成 22 (2010) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

トキシコキネティクス/トキシコプロテオミクス解析による食品ナノマテリアルの免疫毒性 リスク予測・回避法の開発-----	1
吉岡 靖雄	

### II. 分担研究報告

1. ナノマテリアルが消化管細胞に与える影響の評価-----	16
吉川 友章	
2. ナノマテリアルの体内動態解析、ナノマテリアルの免疫毒性評価-----	20
阿部 康弘	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	26
--------------------------	----

## トキシコキネティクス/トキシコプロテオミクス解析による 食品ナノマテリアルの免疫毒性リスク予測・回避法の開発

研究代表者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師 (常勤)

### 研究要旨

本研究は、食品ナノマテリアルの有用性を最大限に確保し、OECD 主導で実施されているナノマテリアル安全性ガイドラインの策定に必須の安全性情報の提供を目的に、ナノマテリアル特有の物理化学的性状に起因する免疫毒性や口腔/消化管粘膜面における動態の関連情報の収集・把握を試みるものである。熱・電気伝導性や組織浸透性等についてこれまでの素材にはない機能を持つナノマテリアルは、食品産業においても革命を起こす新素材として期待され、機能性食品・栄養成分送達システム・着色剤・香料として利用されつつある。一方で、近年、微粒子状異物排除の根幹を担う生体免疫系がナノマテリアルを異物として認識した際に機能不全を起こす可能性が報告されるなど、ナノマテリアルの革新的機能が人体に対して未知の免疫攪乱作用を呈する危険性が指摘されている。そこで本研究では、食品添加物として認可されているシリカ粒子を用いて、ナノマテリアルの物性（粒子径・表面被覆など）-口腔/消化管粘膜面動態-免疫毒性の関連解析とプロテオミクスによる安全性予測バイオマーカーの探索を試みる。平成 21 年度には当初の予定通り、①ナノシリカの物性評価、②ナノシリカの免疫毒性評価、を推進した。本研究で得られる成果は、OECD 主導で実施されている科学的根拠に基づくナノマテリアルの規制作り等の厚生労働行政に必須の知見を提供可能であると期待される。

### 分担研究者

1. 吉川 友章・大阪大学大学院薬学研究科・毒理学分野・助教
2. 阿部 康弘・独立行政法人医薬基盤研究所・創薬プロテオミクスプロジェクト・研究員

### A. 研究目的

熱・電気伝導性や組織浸透性等についてこれまでの素材にはない機能を持つナノマテリアルは、食品産業においても革命を起こす新素材として期待され、機能性食品・栄養成分送達システム・着色剤・香料として利用されつつある。一方でナノ

マテリアルの未知機能は裏を返せば人体に対して未知の有害性を発揮する危険性を孕んでいる。事実、カーボンナノチューブの免疫攪乱を主要因とした中皮腫誘発毒性が報告され、我々も代表的な食品ナノマテリアルであるシリカの免疫攪乱性を認めている。こういった有害性の発症は、元来、微粒子状異物排除の根幹を担う生体免疫系がこれまでに遭遇したことのないような革新的機能に由来するものと考えている。このように従来までに無い革新的機能に起因した有用性と有害性の二面性を併せ持つナノマテリアルの有用性を最大限に享受するためのリスクマネジメント

が国際的に進められており、OECD 主導の下で今後数年以内に規制の策定に必要な安全性情報の収集を完了すべく、スポンサーシッププログラムが展開されている。本邦は、本プログラムにおいて国内産業で主要な位置を占めるナノマテリアルについて可能な限り多くの安全性情報を提示しなければならないにも関わらず、食品ナノマテリアルの有害性研究には全く手を付けていないため、このままでは無闇な規制によっていずれナノ食品産業を中心とした日本の産業競争力を喪失してしまいかねない。本観点からナノマテリアルの健康影響評価に関する情報収集やそれを基盤としたリスク予測・回避手法を開発して適切な行政規制を実施することが、わが国のナノ産業競争力強化とそれを活用した豊かな食社会の構築に向けた喫緊の国際的最重要課題である。本観点から本研究では、食品添加物として認可されている二酸化ケイ素（シリカ）を素材とするナノマテリアルの物性-口腔/消化管粘膜動態-免疫毒性の関連解析とプロテオミクスによる安全性予測バイオマーカー探索を実施した。

## B. 研究方法

### ナノマテリアル

本研究では、Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany) より購入した表面未修飾シリカ（直径 30、70、300、1000 nm; それぞれ nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000）を使用した。

### SPの粒子特性評価（粒子径、蛍光強度）

シリカの粒子径測定は、mili Q 水で 300 µg/mL に調製し、十分にソニケーションを行った後、Zetasizer 3000HS を用いて行った。

### 粒子径の異なるシリカのin vivo炎症誘導能評価

BALB/c マウス（8 週齢、雌性）に対して、PBS で 5 mg/mL に調製した各シリカ（nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000）を 1 mg/200 µL/mouse で腹腔内投与した。24 時間後、4 mL の氷冷した PBS を腹腔内へと投与し、腹腔洗浄液を回収した。そ

の後、NucleoCounter を用いて生細胞数を測定した。続いて回収した腹腔洗浄液を 300 g で 10 分間遠心し、上清中に含まれるサイトカイン濃度を Bio-Plex Suspension Array System にて評価した。

### 腹腔内常在性マクロファージのサイトカイン産生評価

BALB/c マウス（9 週齢、雌性）の腹腔内細胞を氷冷 PBS 10 mL で回収し、210 g、4°C で 5 分間遠心した。その後、上清を捨て、再度氷冷 PBS 10 mL で細胞を懸濁し、遠心操作を行った。上清を捨て 10% FBS-RPMI 1640 で  $6.3 \times 10^4$  cells/mL に調製し、24 穴プレートに 1 mL で播種後、37°C で 15 分間培養した。続いてプレートをバイブレーターで振動させ、上清を除くことで接着細胞を分取した。同様の操作を 5 回繰り返した後、10% FBS-RPMI 1640 を 700 µL 加えて 37°C で 12 時間培養を行い、nSP70-COOH (300 µg/mL) を 350 µL 加えた。2 時間後、nSP70-COOH (100 µg/mL)、または nSP70-COOH と LPS (5 µg/mL) を 350 µL 作用させた。24 時間後、培養上清中の TNFα 及び IL-6 濃度を ELISA にて測定した。

### Western Blot

12 穴プレートに  $2.1 \times 10^5$  cells/1.4 mL/well で RAW264.7 細胞を播種し、37°C で 12 時間培養を行った。nSP70-COOH (300 µg/mL) を 700 µL 加え、2 時間後に nSP70-COOH と LPS (5 µg/mL) を 700 µL 添加した。各時間培養後に氷冷 PBS で細胞を洗浄し、Halt™ Protease Inhibitor Cocktail Kit 及びホスファターゼ阻害剤カクテルを添加した Lysis Buffer で細胞を破碎した。IRAK-1、IκBα、β-actin の検出には Mammalian Protein Extraction Reagent を用いて細胞全画を、NFκB p65 及び Lamin A/C の検出には Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent を用いて核画分を定法に準じて回収した。総蛋白質量 1 - 5 µg の各サンプルを 5 - 20% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS 電気泳動した後、蛋白質を PVDF メンブレンへ転写した。メンブレンは 0.1% Tween20 トリス緩

衝液に溶解した 4% ECL Advance® Blocking Agent によって 2 時間、室温でブロッッキングを行った。次に 5% Bovine Serum Albumin-TBST で希釈した各 1 次抗体を 4°C、オーバーナイトで反応させた。その後メンブレンは TBST で洗浄し、5% BSA TBST で希釈した HRP 標識 2 次抗体を室温で 1 時間反応させた。再度 TBST で洗浄した後、Super Signal® West Femto Maximum sensitivity Substrate によってシグナルの検出を行った。

#### 細胞内活性酸素種の検出 (DCFH-DA法)

細胞内活性酸素種 (ROS) 量は蛍光プローブである 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) を用いて測定した。DCFH-DA は、細胞内において、ROS と反応し DCFH となり、蛍光を発する。3 × 10<sup>4</sup> cells となるように 96 穴プレートに予め播種しておいた消化管由来 IEC6 細胞に対して、様々な濃度の nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (陽性コントロール) を添加した。ナノシリカを添加して 3 時間後、phenol red free の D-MEM で 3 回 wash し、DCFH-DA (10 μM) を含有した phenol red free の D-MEM を添加し、37°C で 30 分培養した。30 分培養後、蛍光プレートリーダー(蛍光フィルター: Ex/Em=485 nm/530 nm を使用)を用いて蛍光量を測定した。

#### ナノシリカの経口投与

BALB/c マウス (6 週齢、雌性、Japan SLC) を使用した。生理食塩水で 125 mg/kg に調製した nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ、マウスに連日経口投与し、経口的に体重変化・臓器 (胃、脾臓、肝臓、腎臓、小腸、大腸) 重量を測定するとともに、投与後 28 日後に心臓採血により血球成分数を測定することで、ナノシリカによる生体影響を評価した。

### C. 研究結果

#### シリカの起炎性評価

各粒子径のシリカを用い、ゼータサイザーによる 2 次粒子径を測定したところ、各々カタログ値

と同様の粒子径を有し、かつ分散性に優れていることが判明した (図 1)。そこで、*in vivo* におけるシリカの粒子径と起炎性との連関を評価した (図 2)。各粒子径のシリカをマウス腹腔内へと投与し、24 時間後における腹腔内の総細胞数を評価した (図 2A)。その結果、マイクロメートルサイズである nSP300、mSP1000 投与群では細胞数の増大はほとんど観察されなかったのに対して、nSP30、nSP70 投与群においては、有意な細胞浸潤数の増大が認められるなど、ナノメートルサイズのシリカは強い起炎性を有している可能性が示された。さらに、各シリカ投与 2 時間後における腹腔内のサイトカイン産生パターンを、アレイ (20 種) により解析した (図 2B)。その結果、nSP30、nSP70 投与群では、炎症性サイトカインである IL-5 (好酸球の増殖、活性化)、IL-6 (T 細胞の活性化など)、IL-12 (NK 細胞の活性化)、及びケモカインである KC (好中球の遊走)、MCP-1 (好中球の遊走) の産生が認められ、そのいずれもがマイクロメートルサイズの nSP300、mSP1000 投与群と比較して高い値を示していた。すなわち、近年開発の進められているナノメートルサイズのナノシリカが、マイクロメートルサイズのシリカと比較して強い起炎性を有する可能性が示された。

マクロファージによる病原体の認識とその後の免疫反応には、Toll-like receptor (TLR) と呼ばれる一群の受容体が必須であることが知られている。哺乳類では種によって 10-15 種類の TLR ファミリーが報告されており、各 TLR はそれぞれ病原体に特有の構造 (TLR リガンド) を認識して活性化する。TLR から細胞内にシグナルが伝達されると、代表的な転写因子として知られる NFκB などの活性化によって炎症応答や獲得免疫が誘導され、病原体の除去が行われる。近年、マクロファージがナノマテリアルに曝露された場合、細菌やウイルスなどの外来異物に対する自然免疫応答が変動する可能性が報告されている。我々もこれまでに、nSP70 の表面をカルボキシル基で修飾した nSP70-COOH が、TLR4 のリガンドであ

リグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分である Lipopolysaccharide (LPS) により誘導される TNF $\alpha$ の産生を増大させる一方で、逆に IL-6 については産生を抑制するなど、自然免疫応答を正(促進)・負(抑制)に攪乱すること示してきた。また、NF $\kappa$ B は TNF $\alpha$ と IL-6 の代表的な転写因子として知られているが、LPS 刺激による NF $\kappa$ B の活性化が nSP70-COOH 共作用時には抑制されることを明らかとしている。本結果は、nSP70-COOH によって TNF $\alpha$ の産生が上昇したこととは相反する結果であるものの、IL-6 の産生が減少した要因の一つであると考えられる。そこで本研究では、nSP70-COOH による自然免疫攪乱作用をより詳細に解析した。まず、nSP70-COOH が生体内のマクロファージに対しても免疫攪乱作用を示すか検討した。マウス腹腔内より回収した常在性マクロファージ細胞を用いて、LPS 単独で誘導される TNF $\alpha$  及び IL-6 の産生パターンに nSP70-COOH が与える影響を評価した(図 3)。その結果、nSP70-COOH 単独作用群の TNF $\alpha$ 及び IL-6 産生量は未処理群と同程度であった。また、LPS と nSP70-COOH 共作用群は、LPS 単独作用群と比較して、TNF $\alpha$  の産生が上昇する一方で、IL-6 の産生は抑制された。本結果より、生体内のマクロファージによる自然免疫応答を nSP70-COOH が変動させる可能性が示された。

nSP70-COOH が TLR4 を介した NF $\kappa$ B の活性化を抑制することは先述の通りであるが、その他の TLR を介した NF $\kappa$ B 活性化に対しても nSP70-COOH が影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで、RNA ウィルス等に由来する一本鎖 RNA を認識する TLR7 を介した NF $\kappa$ B の活性化に nSP70-COOH が与える影響を検討した(図 4)。その結果、TLR7 のアゴニストである imiquimod を単独で作用させた場合と比較して、nSP70-COOH と imiquimod 共作用群では NF $\kappa$ B の活性が有意に抑制された。このことより、nSP70-COOH は様々な病原体による TLR を介した NF $\kappa$ B の活性化を抑制する可能性が示された。

次に nSP70-COOH の作用点の同定を試みた。

TLR4 に LPS が結合すると、シグナル分子 IRAK-1 と I $\kappa$ B $\alpha$ の活性化を介して、NF $\kappa$ B が核内へ移行し、標的遺伝子に結合することで TNF $\alpha$ や IL-6 を含む炎症性サイトカインの転写を促進することが知られている。そこでまず、nSP70-COOH が IRAK-1 と I $\kappa$ B $\alpha$ のシグナル伝達に与える影響を解析した。RAW264.7 細胞に LPS 単独または LPS と nSP70-COOH を共作用させた際の IRAK-1、I $\kappa$ B $\alpha$ の活性化レベルを Western Blot 法により評価した(図 5)。LPS 単独で作用させた場合、IRAK-1 にシグナルが伝達されると、そのバンドは時間経過に伴って消失する。また、I $\kappa$ B $\alpha$  のバンドは一旦消失した後に再び現れることが知られている。一方で、LPS と nSP70-COOH を共作用させた際の両分子の活性化レベルは、LPS 単独作用群と比較して変化が認められなかった。従って、IRAK-1 及び I $\kappa$ B $\alpha$ におけるシグナル伝達に nSP70-COOH は影響を与えないことが示された。

さらに、nSP70-COOH が NF $\kappa$ B の核内移行に与える影響を検討した。LPS 単独または LPS と nSP70-COOH を共作用させた RAW264.7 細胞より核画分を抽出し、ウェスタンブロットにより NF $\kappa$ B を検出した(図 6)。その結果、未処理群、nSP70-COOH 単独作用群で NF $\kappa$ B の核内移行は全く認められず、LPS 単独作用群では核内に NF $\kappa$ B が移行していた。一方で LPS と nSP70-COOH 共作用群は、LPS 単独作用群と比較して、核内の NF $\kappa$ B 量に変化が認められなかったことから、NF $\kappa$ B の核内移行に nSP70-COOH は影響を与えないことが示された。以上の結果より、nSP70-COOH は IRAK-1 と I $\kappa$ B $\alpha$  のシグナル伝達、及び NF $\kappa$ B の核内移行を抑制しないことから、現在は nSP70-COOH が NF $\kappa$ B の遺伝子結合段階に与える影響について検討を進めている。

#### シリカの ROS 誘導能評価

ROS は生体内のエネルギー代謝や感染防御過程において発生する一連の活性分子種(O $^2$ 、H $_2$ O $_2$  など)であり、これまでは酸素毒性の要因となる有害物質として取り扱われてきた。実際、ROS

は感染、老化、炎症、動脈硬化、発癌などの生活習慣病や代謝性疾患、アルツハイマー病などの神経変性疾患などの様々な疾患の発症・悪化、アポトーシスや DNA 損傷など多くの細胞内ストレス応答に関与することが報告されている。特に、反応性の高い ROS として知られているヒドロキシルラジカルや次亜塩素酸イオンは、DNA と反応して塩基修飾、DNA 鎖切断を生じることが知られている。既に、多くの研究者によってカーボンナノチューブやラテックスビーズ等のナノメートルサイズの素材が ROS 産生を誘導することが明らかにされており、これらのことからナノシリカの経口摂取によっても ROS 産生が誘発される可能性が考えられる。ROS は、炎症反応の惹起にも関与するシグナル伝達分子としても機能していることから、ナノシリカの ROS 産生誘導能の解析は免疫毒性予測法の開発に繋がる有用な知見を与えるものと期待される。そこで、粒子サイズの異なる各種シリカ粒子を腸管由来細胞株 IEC6 細胞に作用させた際の ROS 産生量を評価した (図 7)。その結果、シリカを作用させることで、粒子径に関わらず若干の酸化ストレス誘導が生じること、ならびに粒子サイズが小さくなるにつれてその効果が高まる傾向があることを見いだした。以上の結果は、今後、続々と開発されるであろう様々なナノマテリアルの有害性予測/回避法を確立して安全性を確保するにあたっては、ナノマテリアルの消化管細胞に与える影響の評価が極めて重要であることを示している。

#### シリカの経口投与による生体影響評価

各粒子サイズのシリカ (nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000) を連日経口投与し、体重変化を経日的に評価した (図 8)。その結果、nSP30、nSP300、mSP1000 投与群では目立った体重変化が認められなかったのに対して、粒子径が 70 nm の nSP70 投与群において、7、14、21 日目の体重減少が認められた。このことから、nSP70 の経口投与によってマウスの生体へ何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

また、同時にナノシリカの経口投与に伴う臓器 (胃、脾臓、肝臓、腎臓、小腸、大腸) 重量の変化を測定した (図 9)。いずれの粒子投与群においても、肝臓や腎臓、小腸、大腸に大きな重量変化は無かったのに対して、経口投与 28 日目の nSP70 投与群では、脾臓の重量が有意に増加しており、免疫系に異常が起きていることが示唆された。また、28 日目の nSP30 投与群の胃において、若干ではあるが重量減少が認められた。続いて、各粒子サイズのシリカを 28 日間連日経口投与したマウスの血球成分数を測定した (図 10)。その結果、nSP70 添加群において、リンパ球や血小板が減少している傾向が認められたことから、血液機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。以上の結果は、ナノシリカは粒子サイズの違いによって異なる免疫影響を引き起こすことが明らかとなり、その特徴的な物性に基づいた安全性評価を行う必要があることを示している。

#### **D. 考 察**

*in vivo* において、ナノメートルサイズのナノシリカはマイクロメートルサイズのシリカと比較して細胞浸潤、サイトカイン・ケモカイン産生の両面から強い起炎性を有していることが明らかとなった。近年、ナノマテリアルは、マイクロメートルサイズのマテリアルとは異なり、スカベンジャーレセプターと呼ばれる異物認識レセプター依存的に、細胞内へと取り込まれることが明らかとなってきた。中でも、scavenger receptor class A (SR-A) により認識、取り込まれた場合、mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーに属する p38 の活性化を誘導することで、細胞傷害性やサイトカイン産生を誘導することが明らかとされている。従って、粒子サイズにより異なる機序で起炎性を示した要因は、ナノメートルサイズにまで微細化されたマテリアルが、従来のマイクロメートルサイズのマテリアルに見られるエンドサイトーシスではなく、SR-A などによるレセプター依存的な認識・取り込み経路を惹起したためである可能性が考えられる。

また、シリカが、マクロファージの細菌・ウイルスに対する自然免疫応答に及ぼす影響を解析した。その結果、nSP70-COOH は、TLR 刺激により惹起される自然免疫応答を正 (炎症増悪) あるいは負 (免疫抑制) の方向へと大きく攪乱することが明らかとなった。さらにそのメカニズム解明を図ったところ、負の攪乱作用は、nSP70-COOH が TLR 刺激により惹起される NF $\kappa$ B の活性化に対して抑制的に作用することに起因することが示唆された。近年、Lucarelli らは、ナノマテリアルへと曝露されたマクロファージにおいて TLR の発現パターンが変動すること、またその発現変動パターンはナノマテリアルの物性によって大きく異なることを見出している。しかし、本検討においては、nSP70-COOH は IRAK-1 や I $\kappa$ B $\alpha$  といった上流シグナル伝達には影響を及ぼしていなかったことから、TLR4 の発現量には影響は与えていないものと考えられる。さらに、nSP70-COOH は NF $\kappa$ B の核内移行量に影響を与えていないことも明らかとした。従って、nSP70-COOH が NF $\kappa$ B の DNA 結合過程に影響を与えた可能性が考えられ、現在検討を進めている。しかしながら本結果は、nSP70-COOH が、LPS 刺激に由来する TNF $\alpha$  の産生量を増大したという現象に対しては矛盾するものである。この点に関して、TNF $\alpha$  の産生は NF $\kappa$ B のみならず、activator protein-1 (AP-1) や MAPK といった複数のシグナル分子によって制御されていることが知られている。従って、nSP70-COOH が、LPS 共存下においてはこれら特定のシグナル分子を増強させた可能性が考えられ、併せて検討を進めている。NF $\kappa$ B は数多くの炎症性サイトカイン産生を制御するため、生体の免疫応答において極めて重要な役割を担っていると考えられている。そのため、世界的に汎用されるシリカが TLR 刺激により惹起される NF $\kappa$ B に対して抑制的に作用するという本結果は、従来までのマテリアル単独での起炎性評価のみならず、自然免疫攪乱作用という、新たな観点からの安全性確保の必要性を示しており、今後のナノマテリアル創製における安全性

評価に一石を投じるものであると考えている。

また、シリカの経口投与による生体影響を評価したところ、体重減少や臓器重量の変化など何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。経口投与後の体内動態については、条件検討に手間取り、今年度の成果としては報告できないが、来年度に向けたプレリミナリーな結果を得ていることから、より詳細に体内動態と生体影響の関連性を評価可能と考えられる。また、炎症性腸疾患や食物アレルギーなど疾患誘発に及ぼす影響についても、より詳細な検討を来年度遂行する予定である。

## E. 結論

本研究では、粒子サイズの異なる非晶質シリカが、異なる起炎性を有し、経口投与によっても生体影響を及ぼすことを明らかとした。今後、より詳細にナノシリカの免疫毒性を評価するため、食物アレルギーモデルへの適用や消化管に及ぼす影響評価を推進する予定である。将来的には、本事業で収集した物性とハザード情報、暴露実態との連関情報を基盤として、科学的根拠に基づいたリスク管理やナノマテリアルの社会受容の促進に貢献できるものと期待している。

## F. 健康危険情報

該当事項無し

## G. 研究発表

### ①論文発表

該当事項無し

### ②学会発表

国外

**Yoshioka Y.**, Morishige T., Tanabe A., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Nanosilicas with different sizes and surface charges induce different profiles of cytokine production on macrophages., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September,



2009.

国内

1. 吉岡靖雄、森重智弘、稲倉裕、田辺綾、堤康央、角田慎一、河合裕一、眞弓忠範、向洋平、岡田直貴、中川晋作：非晶質シリカの粒子特性と起炎性の連関評価、日本免疫毒性学会第16回学術大会、旭川（北海道）、2009年8月。
2. 吉川友章、鍋師裕美、仲里泰太郎、松山恵吾、栃木彩恵子、近藤小百合、平井敏郎、伊藤徳夫、堤康央：薬学領域におけるナノマテリアルの安全性確保研究 ～ナノマテリアルの体内相互作用解析と安全性との連関追求～、第59回日本薬学会近畿支部総会・大会、東大阪（大阪）、2009年10月。
3. 吉川友章：ナノマテリアルの相互作用解析と急性毒性・肝毒性機構の追求、日本薬学会第130

年会、岡山、2010年3月。

4. 阿部康弘：ナノマテリアルの細胞内動態と遺伝毒性、日本薬学会第130年会、岡山、2010年3月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

該当事項無し

②実用新案登録

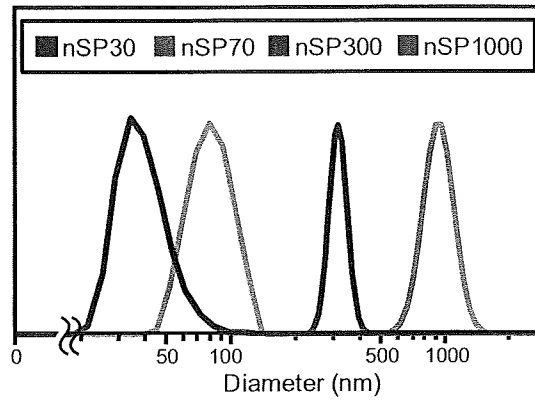
該当事項無し

③その他

該当事項無し

I. 研究協力者

該当事項無し

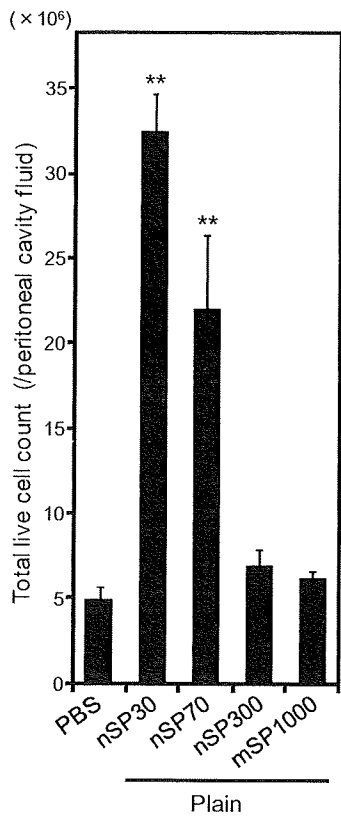


Silica particles	Diameter (nm)
nSP30-Plain	32.7
nSP70-Plain	78.0
nSP300-Plain	299.9
mSP1000-Plain	944.8

図 1. 各粒子径のシリカの特性評価

ゼータサイザーを用い、各シリカの 2 次粒子径を評価した。

(A)



(B) Peritoneal cavity lavage fluid

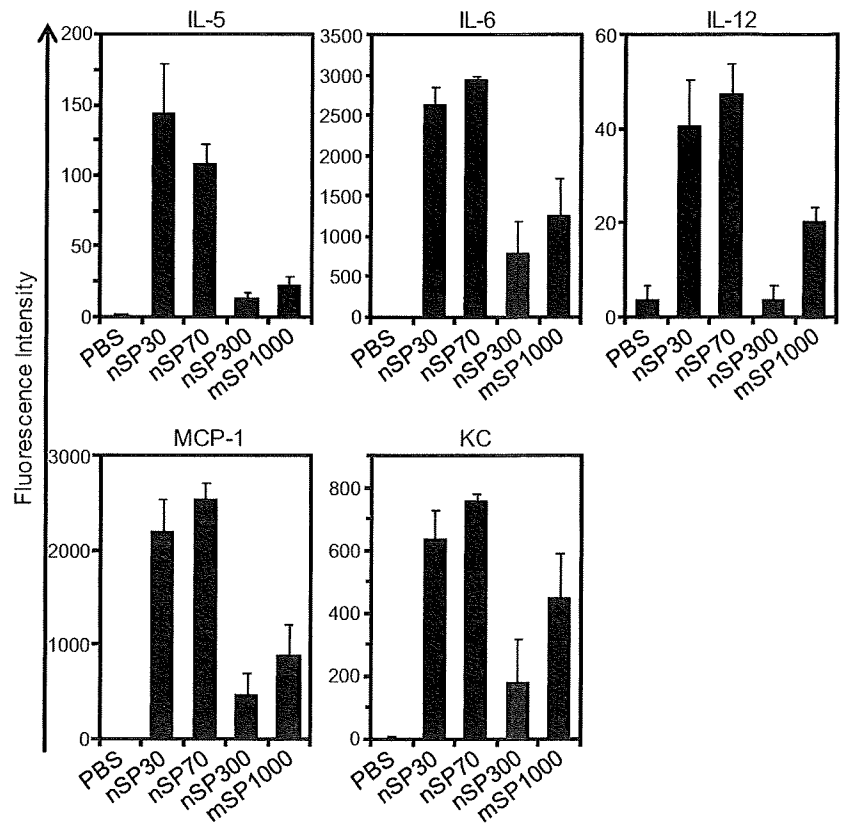


図 2. *in vivo* における起炎性評価

BALB/c マウスに各シリカを 1 mg 腹腔内投与した。(A) 投与 24 時間後に腹腔内洗浄液を回収し、総細胞数を測定した。(B) 投与 2 時間後の腹腔内洗浄液を回収し、Bio-Plex Suspension Array System にてサイトカインの産生量を評価した。

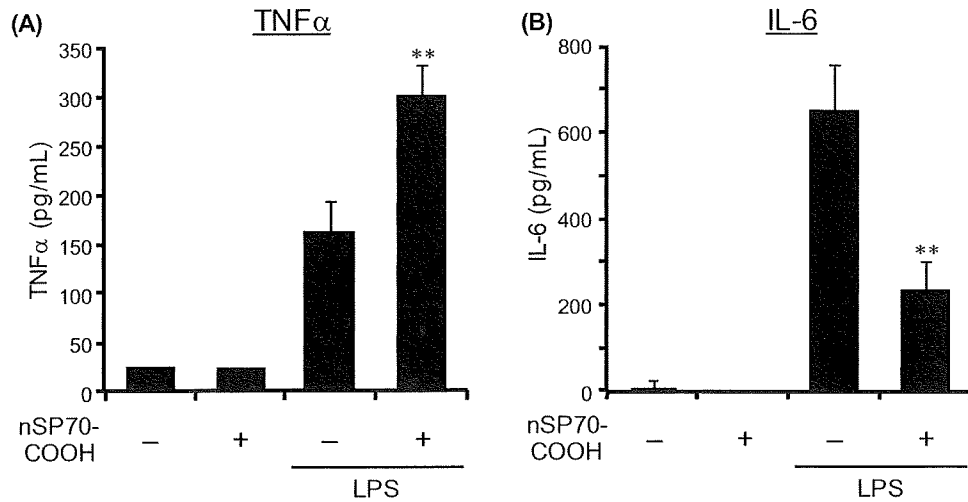


図 3. nSP70-COOH の免疫抑制効果. マクロファージを nSP70-COOH と LPS との共存下で培養した。その後、培養上清中の (A) TNF $\alpha$ 、(B) IL-6 の濃度を ELISA 法により測定した。

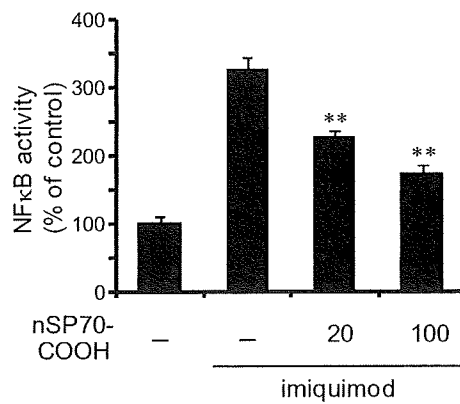


図 4. nSP70-COOH の免疫抑制効果. RAW264.7-ELAM 細胞を、nSP70-COOH と imiquimod との共存下で培養した。その後、レポーター遺伝子ルシフェラーゼの発現を指標に、NF $\kappa$ B の活性化を評価した。

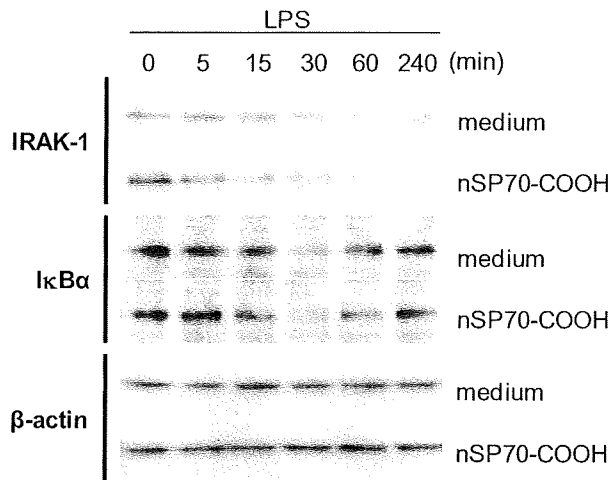


図 5. nSP70-COOH の LPS シグナル伝達に及ぼす影響

RAW264.7 細胞を、nSP70-COOH と LPS で共培養し、経時的に細胞を回収した後、IRAK-1 および IκB の western blotting を行った。

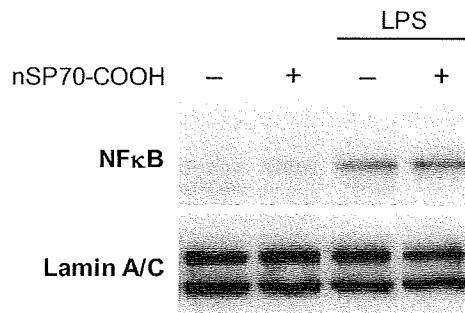


図 6. nSP70-COOH の LPS シグナル伝達に及ぼす影響

RAW264.7 細胞を、nSP70-COOH と LPS で共培養し細胞核画分を回収した後、NFκB の western blotting を行った。

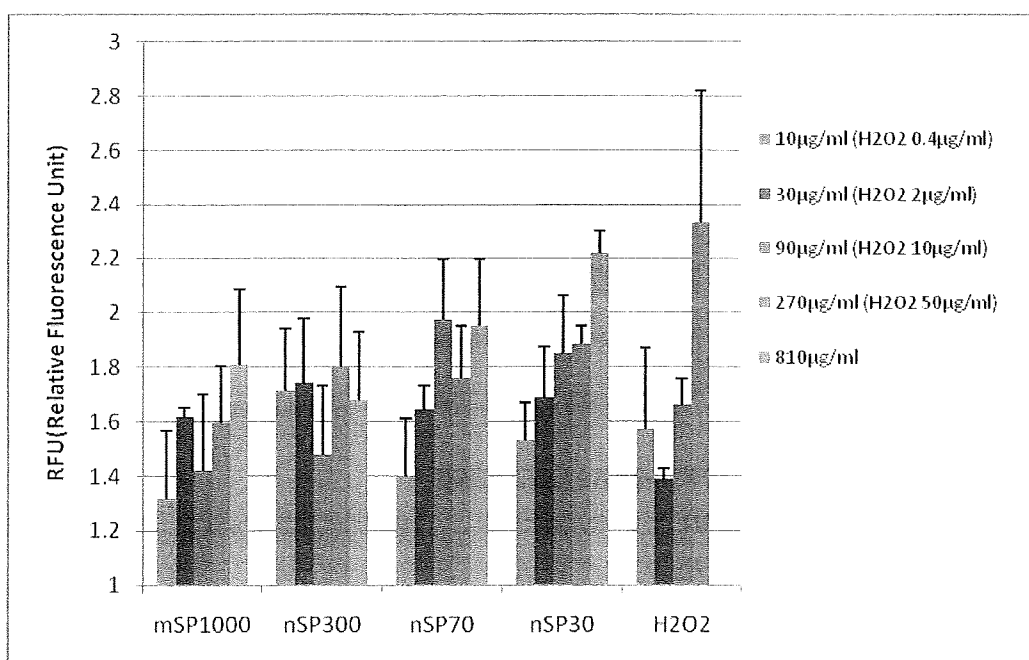


図 7. ナノシリカの ROS 産生誘導能の評価

消化管由来 IEC6 細胞に対して、様々な濃度の nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加した。その後、DCFH-DA を用いて蛍光量を測定することで ROS 産生を評価した。

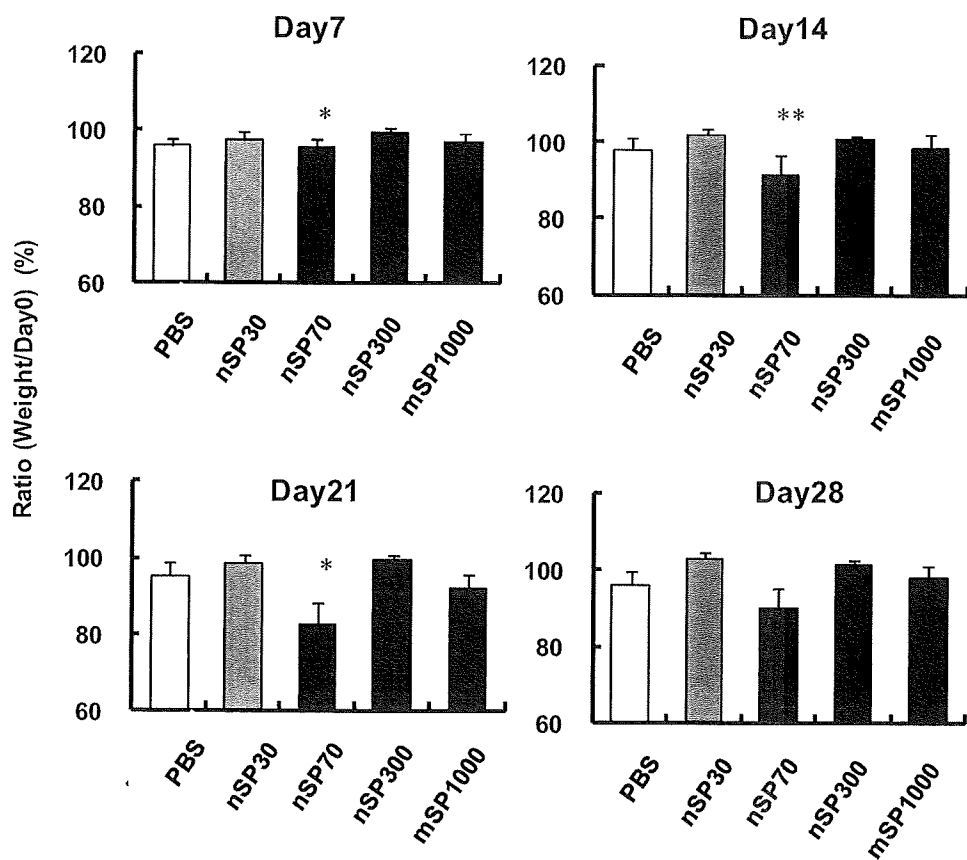


図 8. ナノシリカの経口投与による体重変化の評価

各粒子サイズの非晶質シリカを BALB/C (6 週齢、雌性) に連日経口投与し、経日的に体重を測定した。(\*:p<0.05, \*\*:p<0.01 vs. PBS)

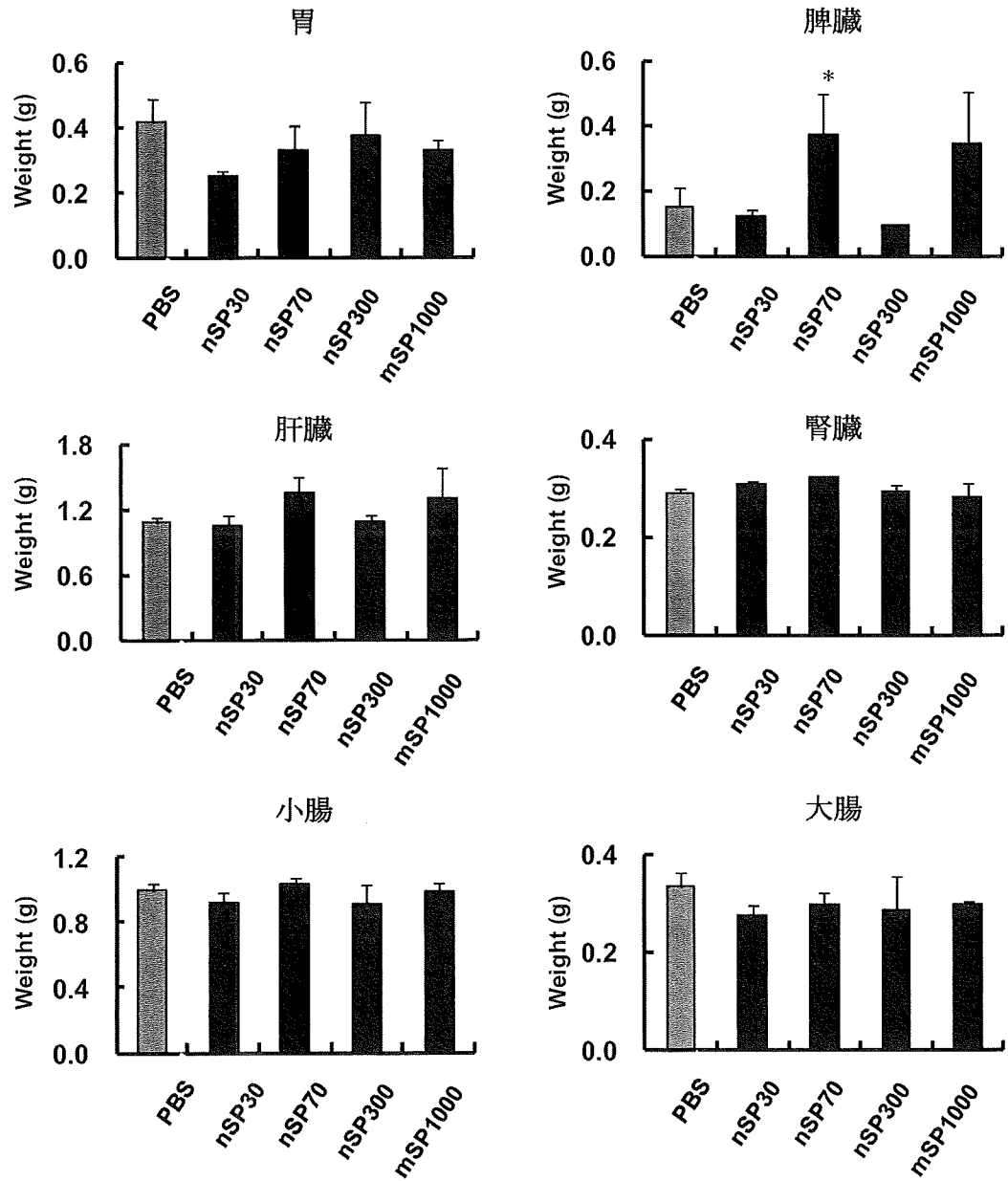


図 9. ナノシリカの経口投与による臓器重量の変化

各粒子サイズの非晶質シリカを BALB/C (6 週齢、雌性) に連日経口投与し、28 日目に臓器を回収し、重量を測定した。(\*:p<0.05 vs PBS)



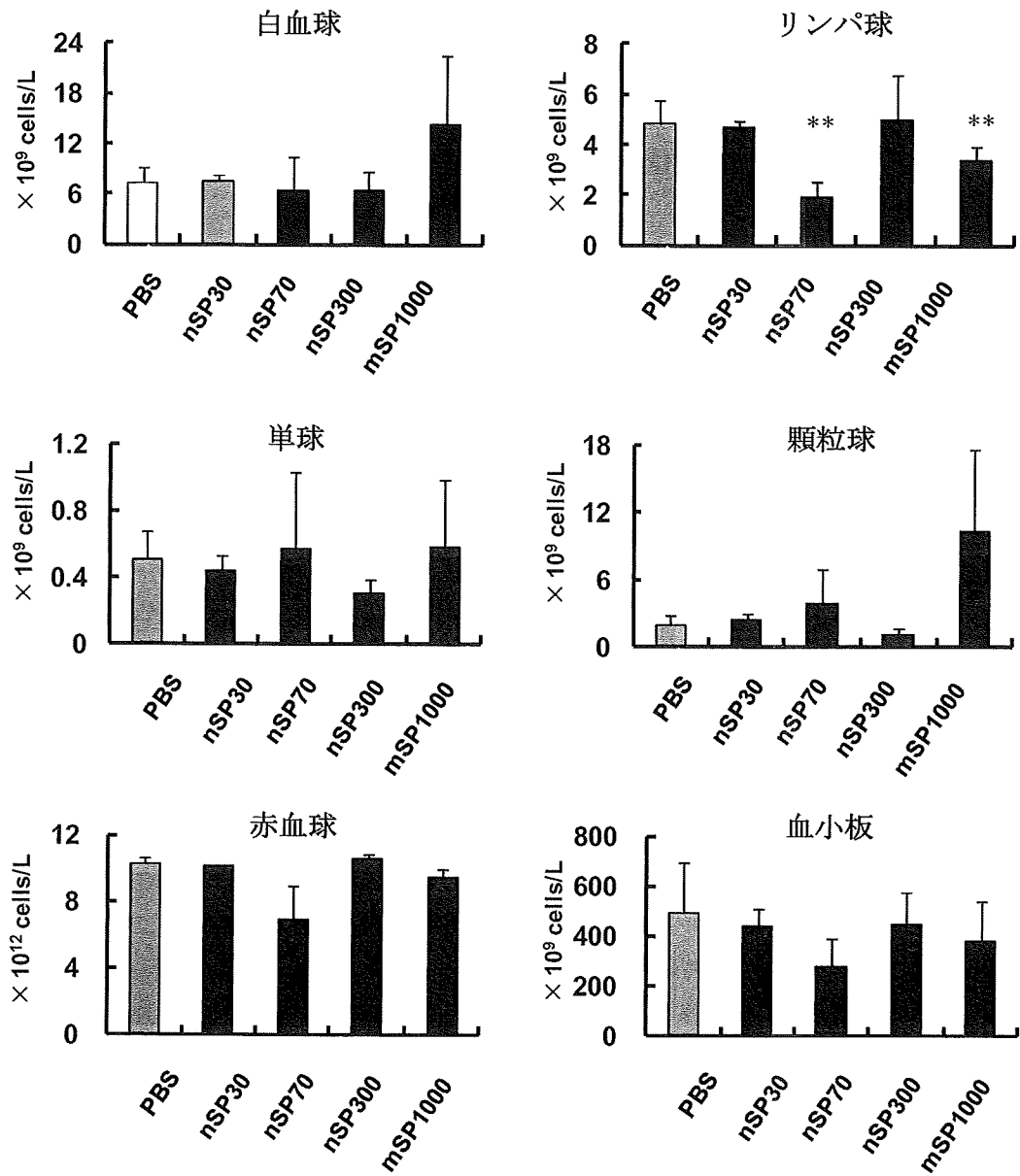


図 10. ナノシリカの経口投与による血球数の変化

各粒子サイズの非晶質シリカを BALB/C (6 週齢、雌性) に連日経口投与し、28 日目に心臓採血により血球数を測定した。(\*\*:p<0.01 vs PBS)

## ナノマテリアルが消化管細胞に与える影響の評価

研究分担者 吉川友章 大阪大学大学院薬学研究科・毒性学分野・助教

### 研究要旨

本邦のナノマテリアル研究は開発・実用化の点で世界をリードしており、ナノシリカや酸化チタンが食品添加物や着色剤として上市されている。一方で、ナノマテリアルのヒト健康への影響など予測できない負の側面 (NanoTox) が懸念され始めている。即ちナノマテリアルに曝露された後の生体内挙動や蓄積性といった動態特性に基づいた毒性発現は殆ど理解されていないにも関わらず、実用化ばかり先行している現状が危惧され始めている。このような情勢を受けて我が国の NanoTox 研究には、一層の推進が求められているものの、未だ十分とは言い難いのが現状である。このままでは、不十分な安全性情報に基づいた闇雲なナノマテリアル規制が施行されてしまい、将来的にナノテクノロジーに立脚した我が国の産業競争力を喪失させかねない。従って、ナノマテリアルの社会受容の促進や国民の健康確保の観点からも、食品ナノマテリアルのヒト健康への影響を評価・予測できる新たな試験法の開発に加えて、数多くの実サンプルに関して安全性情報を可能な限り集積することが喫緊の最重要課題である。そこで本研究では、特に実用化が進んでいるナノシリカを標準ナノマテリアルとして用いて、物性と動態や毒性との連関評価を通してナノマテリアルの体内動態と免疫毒性の解析を進めている。本年度は、ナノシリカを消化管由来細胞に作用させた際の酸化ストレス誘導能を解析した。その結果、シリカを作用させることで、粒子径に関わらず若干の酸化ストレス誘導が生じること、ならびに粒子サイズが小さくなるにつれてその効果が高まる傾向があることを見いだした。以上の結果は、今後、続々と開発されるであろう様々なナノマテリアルの有害性予測/回避法を確立して安全性を確保するにあたって、ナノマテリアルの消化管細胞に与える影響の評価が極めて重要であることを示している。

### A. 研究目的

本邦のナノマテリアル研究は、開発・実用化の点で世界をリードしており、ナノシリカや酸化チタンが食品添加物や着色剤として上市されている。しかし、欧米各国ではナノマテリアルの革新的機能を反映した毒性 (NanoTox) が懸念され、ナノ製品の使用が規制されようとしている。OECD 等でも、ナノマテリアルのヒトにおける動態解析や毒性、安全性評価、社会的・倫理的な管理策の確立など、NanoTox のリスクマネジメント

に向けた国際基準づくりを開始した。

経口摂取されたナノマテリアルの安全性を考えてみた場合、“250nm 以上のマテリアル”は消化管の細胞間を通過できないため、従来までのマテリアルは基本的に、消化管の表面で無害に留まっていた。しかし昨今、ナノマテリアル化することで、消化管上皮細胞の細胞間をすり抜け、細胞内にまで浸透させることが可能となったため、ナノマテリアルの機能を活用した様々な有用素材の開発が進展し、製品化されるに至っている。こ

の反面、ナノマテリアルは免疫細胞に効率よく取り込まれる、あるいは免疫細胞機能に影響を与えることが示唆され始めている。これら消化管局所や全身組織に分布したナノマテリアルは、米国 NTP program の研究から、ナノマテリアルの発する遠赤外線や放電、光反応性・熱反応性による遺伝子・蛋白質変性などにより、アレルギーなどの未知毒性が誘発され得ることが指摘されている。従って、厚生労働行政においては、ナノマテリアルの社会受容の促進や国民の健康と福祉の向上の観点から、経口曝露されたナノマテリアルの健康への影響を評価出来る新たな試験法の開発やその有害性発現メカニズムの解明が緊急課題となっている。

このような状況をふまえ、本研究では、食品ナノマテリアルのリスクマネジメント手法の開発を目的に、食塩やベーキングパウダー、プロセスチーズなどの食品添加物や化粧品基材等に既に実用化されているシリカを消化管由来細胞に作用させた際の酸化ストレス誘導能を解析した。

## B. 研究方法

### ナノシリカ

本研究では、Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany) より購入した表面未修飾ナノシリカ (直径 30、70、100、300、1000 nm ; それぞれ nSP30、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000) を使用した。

### 細胞内活性酸素種の検出 (DCFH-DA法)

細胞内活性酸素種 (ROS) 量は蛍光プローブである 2'7'-dichlorofluorescein (DCFH) を用いて測定した。DCFH-DA は、細胞内において、ROS と反応し DCFH となり、蛍光を発する。 $3 \times 10^4$  cells となるように 96 穴プレートに予め播種しておいた消化管由来 IEC6 細胞に対して、様々な濃度の nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000、 $H_2O_2$  (陽性コントロール) を添加した。ナノシリカを添加して 3 時間後、phenol red free の D-MEM で 3 回 wash し、DCFH-DA (10  $\mu$ M) を含有した phenol

red free の D-MEM を添加し、37°C で 30 分培養した。30 分培養後、蛍光プレートリーダー(蛍光フィルター: Ex/Em=485 nm/530 nm を使用)を用いて蛍光量を測定した。

## C. 研究結果および D. 考察

ROS は生体内のエネルギー代謝や感染防御過程において発生する一連の活性分子種 ( $O^{\cdot -}$ 、 $H_2O_2$  など) であり、これまでは酸素毒性の要因となる有害物質として取り扱われてきた。実際、ROS は感染、老化、炎症、動脈硬化、発癌などの生活習慣病や代謝性疾患、アルツハイマー病などの神経変性疾患などの様々な疾患の発症・悪化、アポトーシスや DNA 損傷など多くの細胞内ストレス応答に関与することが報告されている。特に、反応性の高い ROS として知られているヒドロキシルラジカルや次亜塩素酸イオンは、DNA と反応して塩基修飾、DNA 鎖切断を生じることが知られている。既に、多くの研究者によってカーボンナノチューブやラテックスビーズ等のナノメートルサイズの素材が ROS 産生を誘導することが明らかにされており、これらのことからナノシリカの経口摂取によっても ROS 産生が産生される可能性が考えられる。ROS は、炎症反応の惹起にも関与するシグナル伝達分子としても機能していることから、ナノシリカの ROS 産生誘導能の解析は免疫毒性予測法の開発に繋がる有用な知見を与えるものと期待される。そこで、本研究では粒子サイズの異なる各種シリカ粒子を腸管由来細胞株 IEC6 細胞に作用させた際の ROS 産生量を評価した (図 1)。その結果、シリカを作用させることで、粒子径に関わらず若干の酸化ストレス誘導が生じること、ならびに粒子サイズが小さくなるにつれてその効果が高まる傾向があることを見いだした。以上の結果は、今後、続々と開発されるであろう様々なナノマテリアルの有害性予測/回避法を確立して安全性を確保するにあたっては、ナノマテリアルの消化管細胞に与える影響の評価が極めて重要であることを示している。

## E. 結論

本年度は種々サイズのシリカの ROS 産生誘導能を評価し、粒子サイズに関わらず若干の ROS 産生が誘導されること、並びに粒子サイズの減少に伴ってその産生量が増加する傾向があることを見いだした。現在、これらの情報・手法を基盤として、ナノシリカの起炎性と ROS 産生との関係を精査している。

## G. 研究発表

### ①論文発表

該当事項無し

### ②学会発表

国内

1. 吉川友章、鍋師裕美、仲里泰太郎、松山恵吾、栃木彩恵子、近藤小百合、平井敏郎、伊藤徳夫、堤 康央：薬学領域におけるナノマテリアルの安全性確保研究 ～ナノマテリアルの体内相

相互作用解析と安全性との連関追求～、第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会、東大阪(大阪)、2009 年 10 月。

2. 吉川友章：ナノマテリアルの相互作用解析と急性毒性・肝毒性機構の追求、日本薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3 月。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### ①特許取得

該当事項無し

### ②実用新案登録

該当事項無し

### ③その他

該当事項無し

## I. 研究協力者

該当無し