

図 1. ナノシリカの ROS 産生誘導能の評価

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 × 10⁴ 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 nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000、H₂O₂ 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。

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」
分担研究報告書

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

研究分担者 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

研究要旨

近年、ナノマテリアル特有の物性に起因した革新的機能が、二面性を呈してしまい、予期しにくい毒性（ナノ毒性；NanoTox）を発現してしまうことが世界的に懸念されている。例えば食品として摂取されたナノマテリアルは、消化管粘膜面から吸収され、全身血流に移行し、脳や肝臓といった全身に分布してしまう危険性が懸念されている。今後もナノマテリアル市場の拡大が続き、様々な健康状態の老若男女が長期間に渡って曝露されることを考慮すると、早急に詳細な NanoTox 研究を実施することが必要である。しかし、NanoTox に関する研究は世界的にも開始されたばかりであり、曝露されたナノマテリアルがどの程度体内に吸収され、どこに分布・蓄積し、どのような毒性を発現するかなど、そのリスク評価研究は十分に行われていない。そこで、本研究では食品添加物として既に認可済の二酸化ケイ素を主成分とする非晶質シリカをモデルナノマテリアルとして用い、食品ナノマテリアルの免疫毒性リスク予測・回避法の開発を進めている。本年度は、非晶質シリカをマウスに連日経口投与した際の生体影響を評価した。その結果、粒子径が 70 nm のシリカを経口投与したマウス群において体重減少及び免疫機能の異常が認められた。以上の結果は、ナノマテリアルが粒子サイズの違いによって、異なる生体影響を引き起こす可能性を示唆するものであり、その物性に基づいた安全性評価が重要であることを示している。

A. 研究目的

近年、素材の物性や構造をナノメートルサイズで制御することを目的としたナノテクノロジーが進展したことにより、新しい機能を持った新素材の開発や、マイクロメートルサイズの既存素材の機能向上が可能となった。こういったナノテクノロジーを応用して創製・改良したいわゆる組織浸透性・吸湿性・流動性などの点で、従来までのマイクロサイズ素材とは異なった画期的機能を発揮するナノマテリアルは種々の産業にパラダイムシフトを起こし、産業の活性化や世界的競争力の向上、それらを基盤とした雇用創出等、産業発展の切り札になり得るものと期待されている。新しい素材として、フラーレンやカーボンナノチ

ューブといった素材が著名ではあるが、実際には、シリカや酸化チタン、酸化亜鉛など、古くから使用されている素材をサイズダウンしたナノマテリアルの実用化例が圧倒的に多い。特に我が国では、ナノシリカやナノ酸化チタン、ナノ白金コロイドなどを賦形/固結防止剤、着色料、機能成分として配合した数多くの製菓・インスタント食品・清涼飲料水・健康食品が既に市場に出回っている。

一方で近年、欧米各国を中心としてナノマテリアル特有の物性に起因した革新的機能が、二面性を呈してしまうこと、すなわちナノマテリアルが予想しにくい想定外の健康被害（NanoTox）を発現してしまうことが懸念されている。例えば食品として摂取されたナノマテリアルは、口腔粘膜面

や消化管粘膜面から吸収され、全身血流に移行し、口腔・消化管粘膜局所のみならず、脳や肝臓といった全身に分布してしまい、最終的に人体の健康を脅かす可能性があることが危惧されているがその詳細については未だ不明である。このような科学的根拠に基づいた情報に乏しい現状において、闇雲に全てのナノマテリアルを闇に葬り去ることは、ナノ産業界の発展を阻害しかねない。従って、今後ナノマテリアルの恩恵を最大限に享受した豊かな社会を実現するためには、ナノマテリアルの動態情報を基盤とした安全性評価研究が必要不可欠である。

以上の観点より、本研究では、食品ナノマテリアルの免疫毒性リスク予測・回避法の開発を目的に、既に食品添加物として実用化されている非晶質シリカをマウスに経口投与した際の生体影響を解析した。

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。

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、経日的に体重変化・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. 研究結果および D. 考察

食品添加物として汎用されるナノマテリアルである非晶質シリカを用い、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

1)。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 2)。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、脾臓の重量が優位に増加しており、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 3)。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いた安全性評価を行う必要があることを示している。

E. 結論

本年度は、粒子サイズの異なる非晶質シリカを経口投与したところ、その物性の違いによって、体重や免疫機能など異なる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、暴露実態との関連情報を基盤として、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。

G. 研究発表

①論文発表

該当事項無し

該当事項無し

②学会発表

②実用新案登録

該当事項無し

国内

1. 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.

③その他

該当事項無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

I. 研究協力者

該当無し

①特許取得

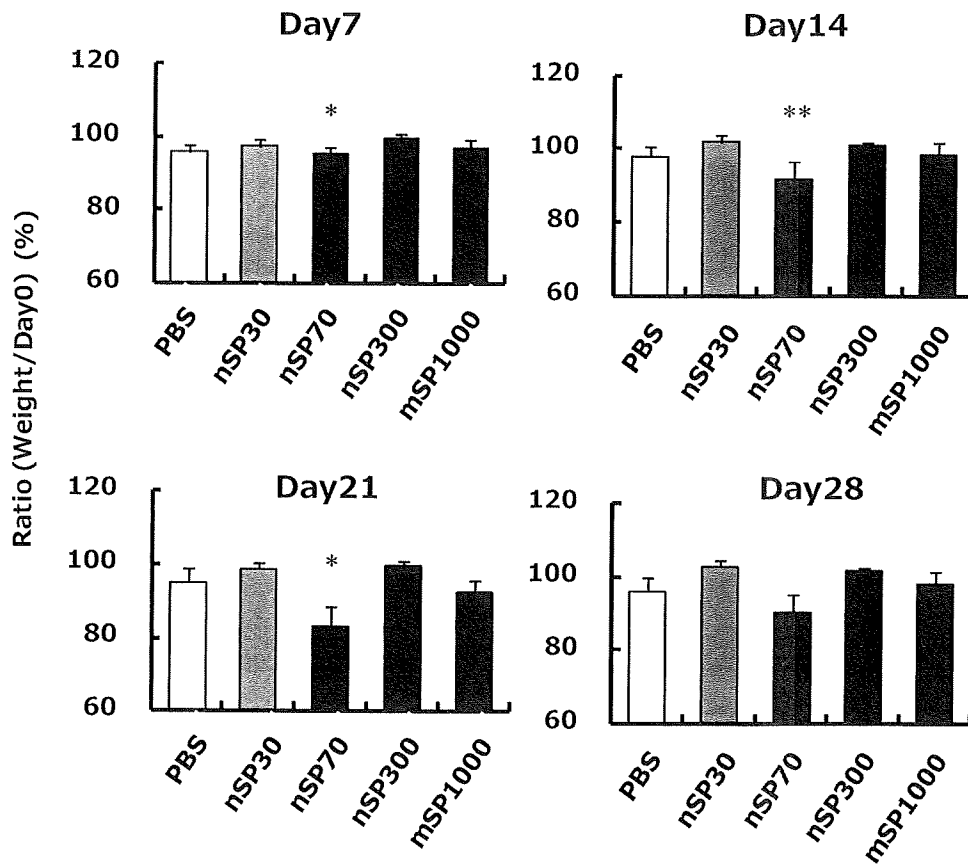


図1. ナノシリカの経口投与による体重変化の評価
 各粒子サイズの非晶質シリカを BALB/C (6 週齢、雌性) に連日経口投与し、
 経日的に体重を測定した。 (*:p<0.05, **:p<0.01 vs PBS)

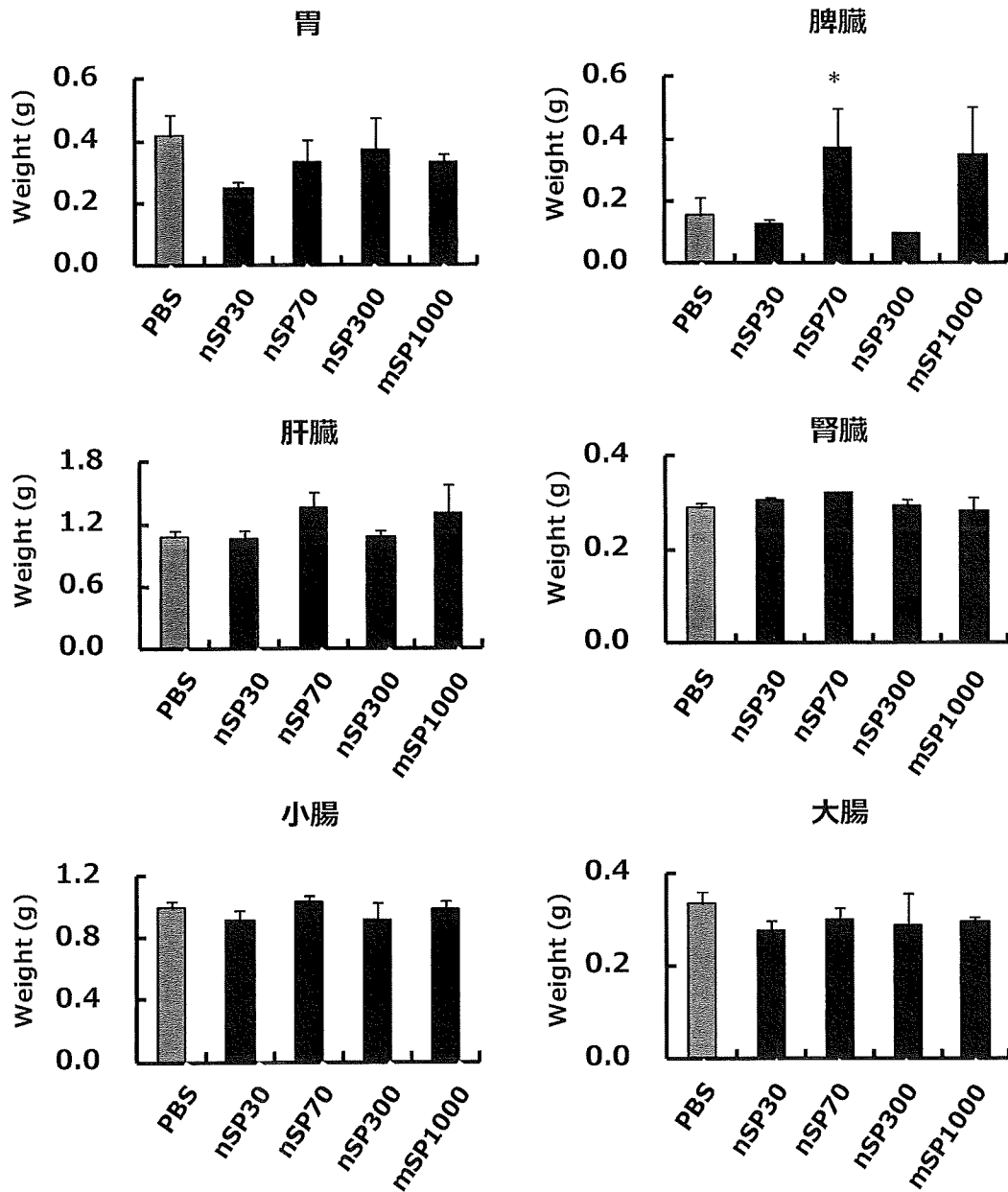


図 2. ナノシリカの経口投与による臓器重量の変化
 各粒子サイズの非晶質シリカを BALB/C (6 週齢、雌性) に連日経口投与し、
 28 日目に臓器を回収し、重量を測定した。 (*:p<0.05 vs PBS)

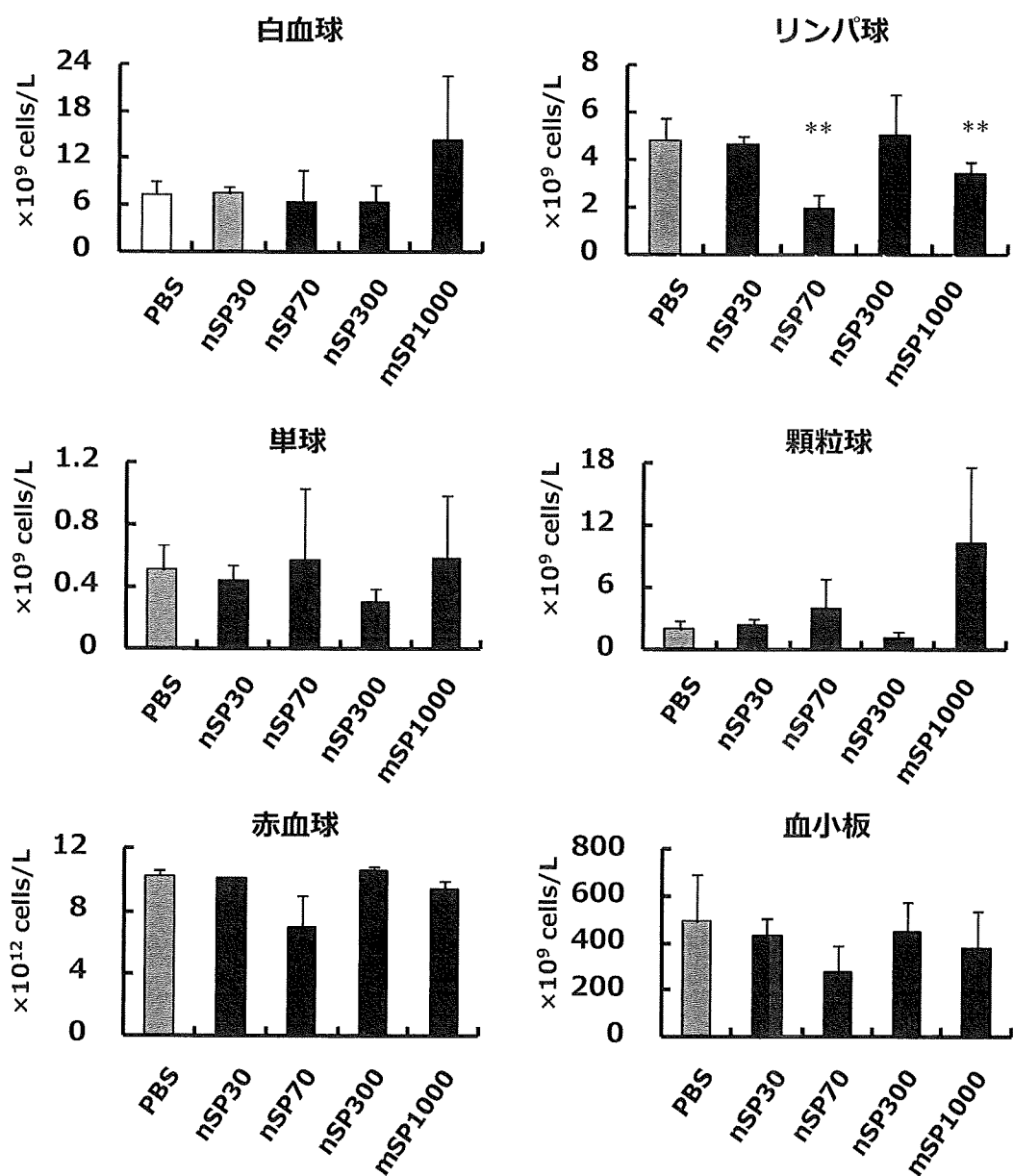


図 3. ナノシリカの経口投与による血球数の変化

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)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当無し							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
該当無し					

