

201033049B

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～22 年度 総合研究報告書

研究代表者 吉岡 靖雄

平成 23 (2011) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	27
III. 研究成果の刊行物・別刷-----	28

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非晶質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）—免疫毒性の連関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た。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。平成 22 年度には当初の予定通り、①ナノシリカが食物アレルギーや炎症性腸疾患の発症・悪化に関与する可能性を検証するとともに、②安全性予測バイオマーカーの同定・妥当性評価、を推進した。本研究で得られた成果は、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

吉川 友章・大阪大学大学院薬学研究科・毒性学分野・助教

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。例えば、固結防止剤として非晶質ナノシリカ、抗酸化剤として白金ナノコロイド、光沢添加材としてナノ酸化チタンが用いられており、ナノ銀粒子は抗菌の

台所用品として応用されている。

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非晶質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いる。例えば、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。そのため、このままでは無闇な規制によっていざ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（非晶質シリカ）を素材とするナノマテリアルの物性—免疫毒性の連関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

非晶質シリカ

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、300、1000 nm；それぞれ nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000）を使用した。

シリカの粒子特性評価 (粒子径)

シリカ の粒子径測定は、milli 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 6.3×10^4 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 2.1×10^5 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 × 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、様々な濃度の nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000、H₂O₂ (陽性コントロール) を添加した。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。

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、シリカによる生体影響を評価した。

食物アレルギー誘導

蒸留水に懸濁したシリカ (25 mg/ml) と OVA (10 mg/ml) を 4 : 1 の割合で混合し、シリカと OVA

の混合溶液を調製した。この混合溶液を経口ゾンデにて 500 μl/mouse で BALB/c マウス (雌性、6 週齢) に 0、7、14、21 日目の計 4 回投与した。さらに 22 ならびに 23 日目に OVA 溶液を 50 mg/500 μl/mouse で再投与 (再チャレンジ) した。OVA の最終投与から 20 分後に心臓採血により全血を回収すると共に脾臓を回収し、以降の実験に供した。

OVA 特異的抗体価の測定

心臓採血により回収した血液を 15000 rpm で 15 分遠心分離し、上清を血清として回収した。この血清中に含まれる OVA 特異的 IgG や IgE の抗体力価は ELISA 法により測定した。

脾細胞を用いた OVA 特異的 IFN-γ 産生能の評価

シリカと OVA を共投与したマウスから脾細胞 (5 × 10⁶ cells/ml) を調製し、1 mg/ml の OVA を含む培養液で 5 日間培養した。培養上清中の IFN-γ 量を ELISA 法により測定した。

デキストラン硫酸ナトリウム塩 (DSS) 誘発大腸炎モデルマウスの作製

DSS (MW=40,000) を 2.5% (wt/vol) になるように蒸留水に溶解した。8 週齢 C57BL/6J マウスを使用し、2.5% (wt/vol) DSS 溶液を 7 日間経口自由摂取させることにより、DSS 誘発大腸炎モデルマウスを作製した。nSP30 および mSP1000 の影響を評価するため、DSS を経口自由摂取させるとともに、10 mg/マウス/日で nSP30 および mSP1000 を強制経口投与し、経口的にち十測定を実施した。体重変動率は DSS 投与開始日を Day0 とし、Day0 の値からの体重変化をパーセントで示した。

安全性バイオマーカーとしての急性期蛋白質

BALB/c マウスに、ナノシリカ分散液 (nSP30、nSP70) をそれぞれ 200 μl ずつ (5 mg/mouse) ゾンデで強制投与し、24 時間後に心臓採血により血液を回収した。いずれのサンプルも 12000 rpm、

15 分間遠心操作を行うことにより血漿を回収した。血漿中の haptoglobin、C Reactive Protein (CRP)、Serum Amyloid A (SAA) 量は、市販の ELISA kit (Life Diagnostics, Inc.; West Chester, PA, USA) を用い測定した。なお、操作は添付のプロトコールに準じて行った。

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 NF κ B 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 のリガンドであり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 α 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 κ B は TNF α 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 κ 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 α 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 α 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 α 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 α 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 κ 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 κ 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 NFκB 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 NFκB 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 NFκB 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 IκBα の活性化を介して、NFκB が核内へ移行し、標的遺伝子に結合することで TNFα 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 IκBα 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、IκBα 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、IκBα 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 IκBα 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 NFκB 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 NFκB を検出した (図 6)。その結果、未処理群、nSP70-COOH 単独作用群で NFκB の核内移行は全く認められず、LPS 単独作用群では核内に NFκB 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 NFκB 量に変化が認められなかったことから、NFκB 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 IκBα のシグナル伝達、及び NFκB の核内移行を抑制しないことから、現在は nSP70-COOH が NFκB 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_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ついた安全性評価を行う必要があることを示している。

食物アレルギーの発症・悪化に及ぼす影響

近年、本邦において、食物アレルギーや炎症性腸疾患の罹患率が増加している。食生活の変化や人工的に作り出した化学物質への曝露が食物アレルギー症状を発症あるいは悪化させる要因ではないかと危惧されている。これまでに我々は、ナノシリカをマクロファージ細胞株 (RAW264.7) 等に曝露することによって、TNF- α をはじめとする炎症性サイトカインの産生を誘導することを明らかとしている。これらの結果を考え合わせる

と、ナノシリカが食物アレルギーの発症・悪化に関与する可能性を否定することはできない。そこで、食物アレルギーの中でも最も患者数の多い卵アレルギーのアレルゲンとして知られる鶏卵白アルブミン (OVA) と共に、粒子サイズの異なるシリカを強制経口投与したマウスを用いて、食物アレルギーの主要原因とされている抗原特異的な IgE 産生量を評価した（図 11）。その結果、OVA を単独で投与したマウスでは OVA 特異的 IgG や IgE は誘導されなかった。それに対して、nSP300 や mSP1000 を OVA と共投与することで、OVA 特異的 IgG や IgE の産生上昇が観察された。特に、nSP30 投与群では、ポジティブコントロールとして用いた、現存する最強の免疫誘導物質であるコレラトキシンに匹敵するほどの強い OVA 特異的 IgG、IgE 誘導が認められた。また、興味深い事に nSP70 投与群では抗原特異的な IgG や IgE の産生が全く認められなかった。さらに、マウスから回収した脾細胞を回収し、サイトカイン産生を評価した結果、nSP30 投与群においてのみ、免疫活性化サイトカインであるインターフェロン- γ の産生が認められた（図 12）。以上の結果は、直径が 30 nm 程度の微小なシリカを利用するに当たっては、食物アレルギーの誘導等をはじめとした免疫学的な安全性評価が必須となる可能性を示唆している。現在、抗原特異的 IgG ならびに IgE 産生誘導に対する nSP30 の作用メカニズムや nSP70 によってこれらの応答が回避されるメカニズムの解析を進めている。

炎症性腸疾患の発症・悪化に及ぼす影響

近年、炎症性腸疾患の患者数は増加傾向にあり、既に患者数が十万人以上にもおよぶと言われている。とりわけ潰瘍性大腸炎やクローン病は、再燃と緩解を繰り返す難治性炎症性腸疾患であり、厚生労働省により特定疾患に指定されている。炎症性腸疾患は、リンパ球の浸潤に伴う大腸組織の破綻を特徴とし、その形成には、免疫学的生体防御機構の破綻、遺伝的素因、食生活の変化などが考えられているが、未だ特定の原因は不明である。

上述したように、ナノマテリアルは、強い免疫活性化性能を有していることから、炎症性腸疾患の発症・悪化に何らかの影響を及ぼす可能性も否定できない。そこで次に、炎症性腸疾患モデルマウスとして汎用される DSS 誘発大腸炎モデルを用い、ナノシリカが炎症性腸疾患の病態発症・悪化に関与するかを検討した。本モデルマウスでは、DSS 投与開始数日後に血便・下痢を伴う症状を示し、およそ 7-10 日目に多くの個体が死亡することが知られている。本検討では、nSP70 と mSP1000 を用い、DSS を自由飲水させはじめた日から、nSP70 もしくは mSP1000 を 1 日 1 回強制経口投与した。その結果、DSS により大腸炎を誘導したコントロール群において、血便・下痢を伴う激しい衰弱と共に著しい体重減少を示した (図 13)。mSP1000 を投与した群では、コントロール群と比較して、体重推移に大きな変化は認められなかった (図 13)。一方で、nSP70 投与群においては、コントロール群や mSP1000 投与群と比較して、有意な差は認められないものの、体重減少が亢進している傾向が観察された (図 13)。また、nSP70 投与群では、コントロール群や mSP1000 投与群と比較して、大腸の長さも短い傾向にあった (図 14)。以上の結果から、今後、群数を増やすなど詳細な検討が必要であるものの、nSP70 の経口投与が、炎症性腸疾患の発症・悪化に関与している可能性が示された。

安全性バイオマーカーの探索・同定

上記のように、ナノシリカは起炎性を有し、経口投与によっても種々炎症性免疫疾患の発症・悪化原因となり得ることが明らかとなりつつある。従って、安全なナノマテリアルを開発していくためには、ナノマテリアルの開発段階から簡便に安全性を予測し得る方法論の開発が必須となってくる。そのためには、ナノマテリアルの経口投与により、血中で発現変動する蛋白質を同定し、その蛋白質変動を指標とした安全性評価が有用と考えられている。我々はこれまでに、ナノシリカなどのナノマテリアルをマウスに静脈内投与し

た場合、haptoglobin、CRP、SAA などの急性期蛋白質の血清中濃度が上昇し、これら急性期蛋白質がナノマテリアル曝露の安全性バイオマーカーになり得る可能性を明らかとしている。そこで、これら急性期蛋白質が、ナノシリカの経口曝露による安全性バイオマーカーになり得るかに関して検討した。BALB/c マウスに nSP30、nSP70 をそれぞれ 5 mg/mouse で経口投与し、投与後 24 時間における血中 haptoglobin (図 15A)、CRP (図 15B)、SAA (図 15C) 量を ELISA により測定した。その結果、haptoglobin、CRP に関しては nSP30、nSP70 いずれの群も saline 投与群と比較し有意な差は認められなかった。一方で SAA に関しては、nSP30 投与群において saline 投与群と比較し増加傾向にあることが明らかとなった。これらの結果から、急性期蛋白質がナノシリカの経口曝露により誘発される生体影響をも予測し得ることが示唆された。

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 κ 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 κ B α 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 κ 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 κ 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 α 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 α の産生は NF κ 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 κ 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 κ 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、nSP70 の経口投与により、リンパ球数の減少や脾臓重量の増加が観察され、体重減少が認められたことから、何らかの免疫異常が誘発されている可能性が考えられる。経口投与された nSP70 は、腸管のパイエル板などを介して体内に侵入し、血中に移行した後に、免疫細胞に影響を与えたと考えており、今後、詳細な体内動態評価を実施することが必要だと考えている。

次に、食物アレルギー誘導能を評価した結果、nSP30 投与群で抗原特異的な食物アレルギー応答が観察された。おそらく、nSP30 などのナノシリカはマイクロサイズのシリカと比較して表面積が増大していることから、抗原蛋白質を多く吸着可能と考えられる。そのため、パイエル板などの腸管の免疫組織に多くの抗原を送達したために、免疫応答が強く誘導されたと考えられる。さらに、ナノシリカの方が、炎症惹起能が強いことを考え合わせると、nSP30 がアジュバントとして機能し、免疫応答を強めた可能性も考えられる。一方で、予想に反して nSP70 では抗体価の上昇は認められなかった。詳細な理由は不明であり、このメカニズムを解明することで、免疫応答を誘導しない安全なナノマテリアルの開発に繋がると考えている。

急性期反応とは、感染や炎症に伴い誘起される局所性及び、全身性の炎症反応を表し、その反応に伴い産生される蛋白質は一般的に急性期蛋白質と総称される。したがって、haptoglobin をはじめとする急性期蛋白質は、ナノシリカ曝露により誘発される負の生体影響の中でも、特に起炎性に関する安全性評価マーカーになると考えられる。今後、より詳細な検討は必要であるが、急性期蛋白質を安全性評価マーカーとして用いることで、ナノマテリアルの安全性を開発段階において、早期に、かつ簡便に評価する方法の確立に繋がり、安全なナノマテリアルの開発・使用に貢献できるものと確信している。さらに、急性期蛋白質が、感染やがんをはじめとした疾患の進行に対するモニタリング方法の一つとして、既に臨床で適用

されていることから、将来的には、ナノマテリアル曝露により誘起されるヒト健康への影響を、これら安全性評価マーカーを用いた評価系で診断する方法の確立に繋がりたいと考えている。また、今後、様々なナノマテリアル曝露に対する急性期蛋白質の発現変動に関して詳細に検討し、急性期蛋白質の安全性評価マーカーとしての可能性について精査していくことが必要であると考えている。

E. 結論

本研究では、粒子サイズの異なるシリカが、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。また、ナノシリカが、食物アレルギーや炎症性腸疾患の発症・悪化に寄与する可能性を示した。さらに、安全な食品中ナノマテリアルの開発に向けて、安全性バイオマーカーの探索を試み、急性期蛋白質がナノマテリアルの経口投与による安全性評価マーカーになり得る可能性を示した。

当該申請課題で得られた研究成果は、厚生労働行政として主導すべき食品ナノマテリアルの安全点検実施や科学的根拠に基づく規制作りには必須の科学的知見を提供するものであり、将来的には食品ナノマテリアルの社会受容や恩恵享受を促進して、新技術を活用した安全・安心で豊かな食社会の構築や我が国の食品業界における世界的産業競争力強化に貢献すると期待している。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

①論文発表

1. Morishige T, **Yoshioka Y**, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Titanium dioxide induces different levels of IL-1 β production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive

oxygen species and cathepsin B. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;392(2):160-5.

2. Morishige T, **Yoshioka Y**, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Narimatsu S, Monobe Y, Imazawa T, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1 β production, ROS production and endosomal rupture. *Biomaterials*. 2010;31(26):6833-6842.
3. Morishige T, **Yoshioka Y**, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties. *Pharmazie*. 2010;65(8):596-9.
4. **Yoshioka Y**, **Yoshikawa T**, Tsutsumi Y. Nano-safety science for assuring the safety of nanomaterials. *Nippon Eiseigaku Zasshi*. 2010;65(4):487-92.
5. Higashisaka K, **Yoshioka Y**, Yamashita K, Morishita Y, Fujimura M, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, **Yoshikawa T**, Itoh N, Tsutsumi Y. Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. *Biomaterials*. 2011;32(1):3-9.
6. Nabeshi H, **Yoshikawa T**, Arimori A, Yoshida T, Tochigi S, Kondoh S, Hirai T, Akase T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, **Yoshioka Y**, Tsutsumi Y. Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Res Lett*. in press.

②学会発表

国外

1. **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.

2. **Yoshioka Y**, Morishige T, Tsunoda S, Mukai Y, Okada N, Tsutsumi Y, Nakagawa N. Safety assessment of nanomaterials: inflammatory responses of nanosilica with different sizes and surface properties. The XII International Congress of Toxicology. Barcelona (Spain), 19-23 July, 2010.

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 (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 (岡山), 2010 年 3 月.
5. **吉川友章**, **吉岡靖雄**, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: ナノ含有食品の安全性確保および安全なナノ含有食品の開発に向けて-1: ナノマテリアルの粒子サイズと血液凝固系への影響. 日本食品衛生学会第 99 回学術講演会, 東京 (東京), 2010 年 5 月.
6. **吉岡靖雄**, **吉川友章**, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: ナノ含有食品の安全性確保および安全なナノ含有食品の開発に向けて-2: ナノマテリアルの表面電荷と免疫系への影響. 日本食品衛生学会第 99 回学術講演会, 東京 (東京), 2010 年 5 月.
7. **吉岡靖雄**, 森重智弘, 角田慎一, 向 洋平, 岡田直貴, 堤 康央, 中川晋作: 非晶質ナノシリカの粒子特性と自然免疫応答の連関評価とそのメカニズム解析. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇 (沖縄), 2010 年 6 月.
8. **吉川友章**, 鍋師裕美, 赤瀬貴憲, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 近藤小百合, 長野一也, 阿部康弘, **吉岡靖雄**, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 非晶質ナノシリカの細胞内局在と安全性の連関に関する基礎情報の集積. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇 (沖縄), 2010 年 6 月.
9. **吉岡靖雄**, 森重智弘, 吉川友章, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 堤 康央: ナノ含有食品の安全性確保および安全なナノ含有食品の開発に向けて: ナノ酸化チタンの形状と免疫系への影響. 第 100 回日本食品衛生学会学術講演会, 熊本 (熊本), 2010 年 9 月.
10. 吉田徳幸, **吉川友章**, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経口曝露における免疫攪乱作用の解析. 第 9 回次世代を担う若手ファーマ・フォーラム 2010, 京都 (京都), 2010 年 10 月.
11. 吉田徳幸, **吉川友章**, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, **吉岡靖雄**, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経口影響に関する基礎情報の収集. 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪 (大阪), 2010 年 10 月.
12. 吉田徳幸, **吉川友章**, 鍋師裕美, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経口曝露における安全性評価. 日本薬学会 第 131 年会, 静岡 (静岡), 2011 年 3 月.

13. 宇治美由紀, 吉川友章, 吉田徳幸, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 市橋宏一, 赤瀬貴憲, 鍋師裕美, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの消化管吸収性と生体影響との基礎的解析. 日本薬学会 第 131 年会, 静岡 (静岡), 2011 年 3 月.

14. 吉岡靖雄, 東阪和馬, 山下浩平, 森下裕貴, 藤村真穂, 潘 慧燕, 小椋健正, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 鍋師裕美, 吉川友章, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性評価に資するバイオマーカーの探索. 日本薬学会 第 131 年会, 静岡 (静岡), 2011 年 3 月.

①特許取得

該当事項無し

②実用新案登録

該当事項無し

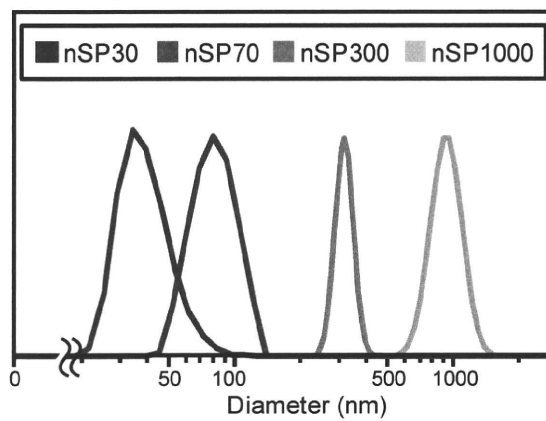
③その他

該当事項無し

I. 研究協力者

該当事項無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

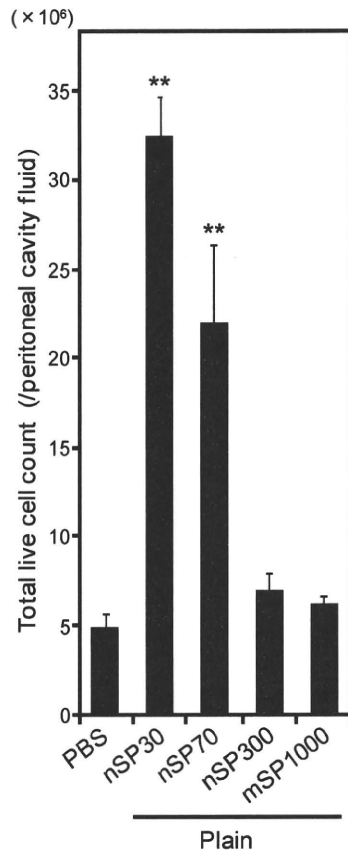


Silica particles	Diameter (nm)
nSP30-Plain	32.7
nSP70-Plain	78.0
nSP300-Plain	299.9
mSP1000-Plain	944.8

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

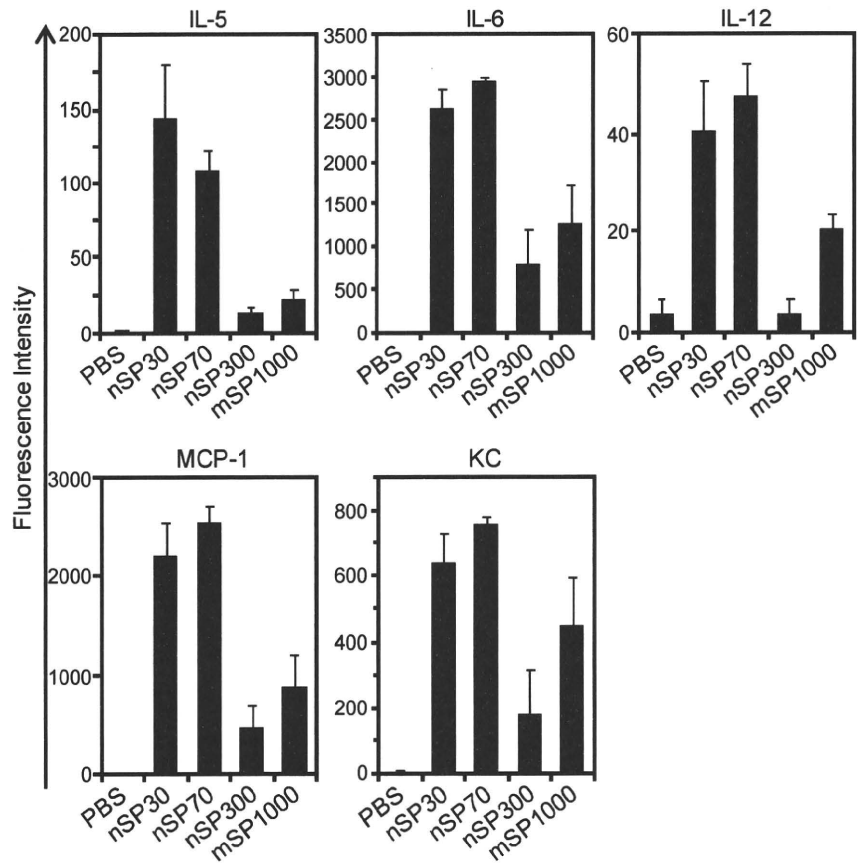


図 2. *in vivo* における起炎性評価

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。 ** $P < 0.01$ vs PBS

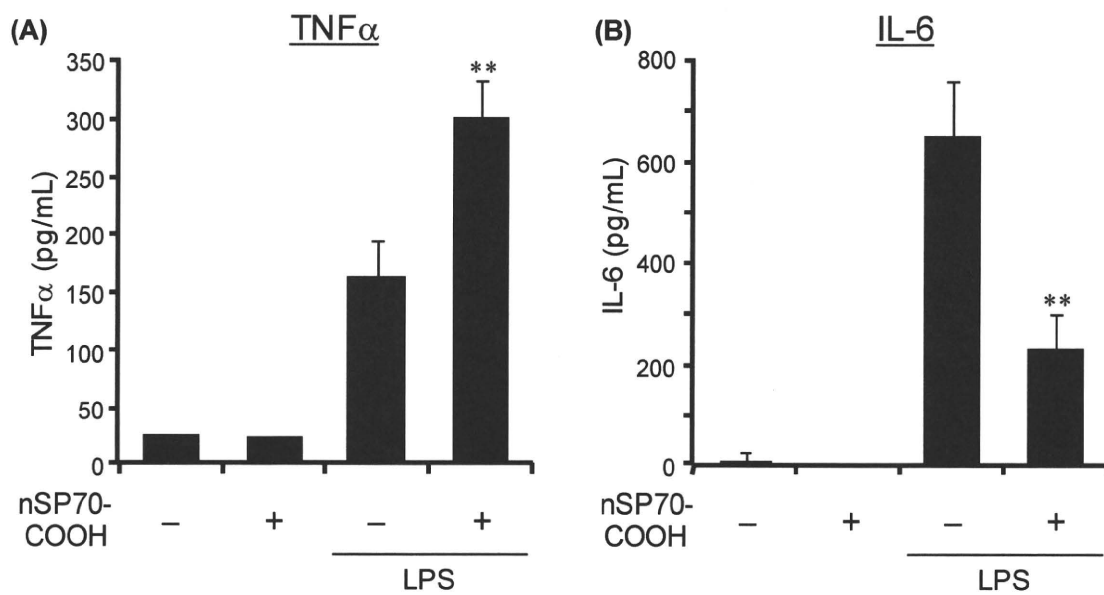


図 3. nSP70-COOH の免疫抑制効果

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 α 、(B) IL-6 の濃度を ELISA 法により測定した。** $P < 0.01$ vs LPS (-)

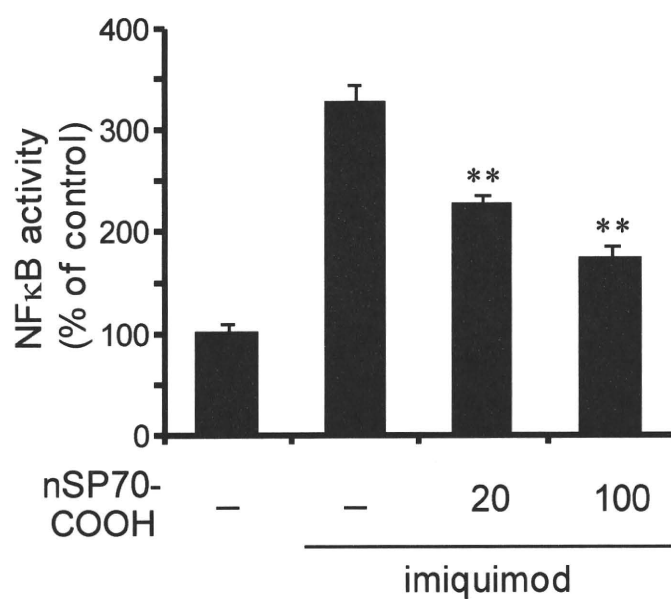


図 4. nSP70-COOH の免疫抑制効果

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、NFκB の活性化を評価した。** $P < 0.01$ vs imiquimod (-)

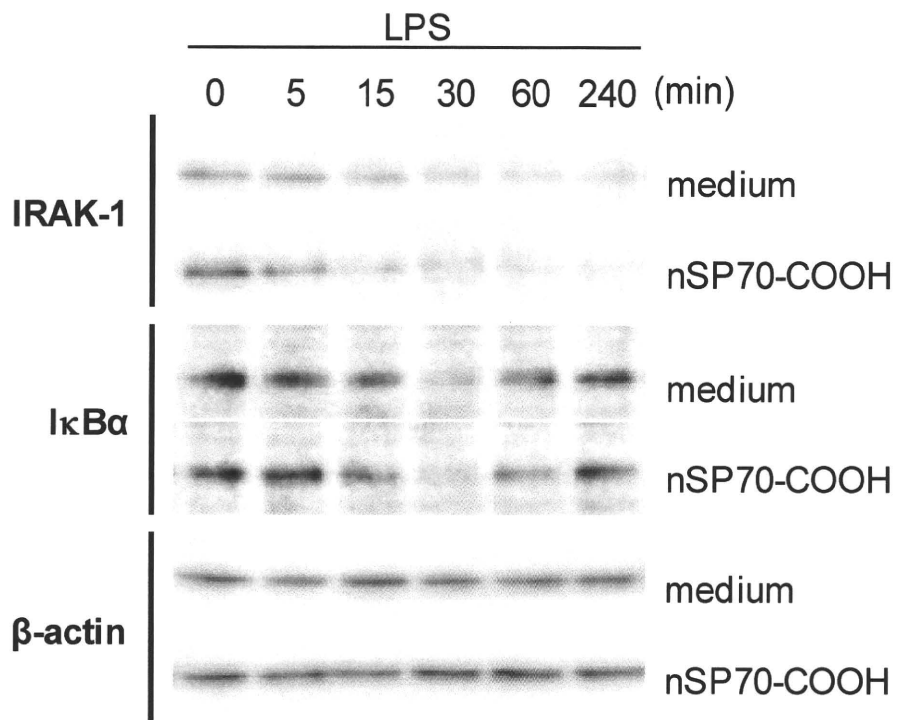


図 5. nSP70-COOH の LPS シグナル伝達に及ぼす影響

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。

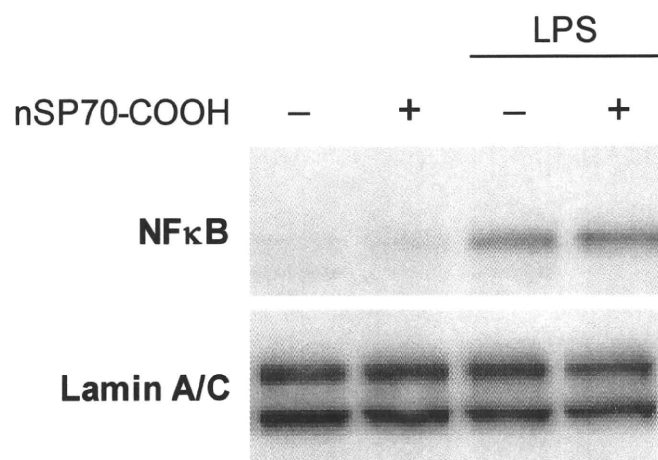


図 6. nSP70-COOH の LPS シグナル伝達に及ぼす影響

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、NF κ B の western blotting を行った。

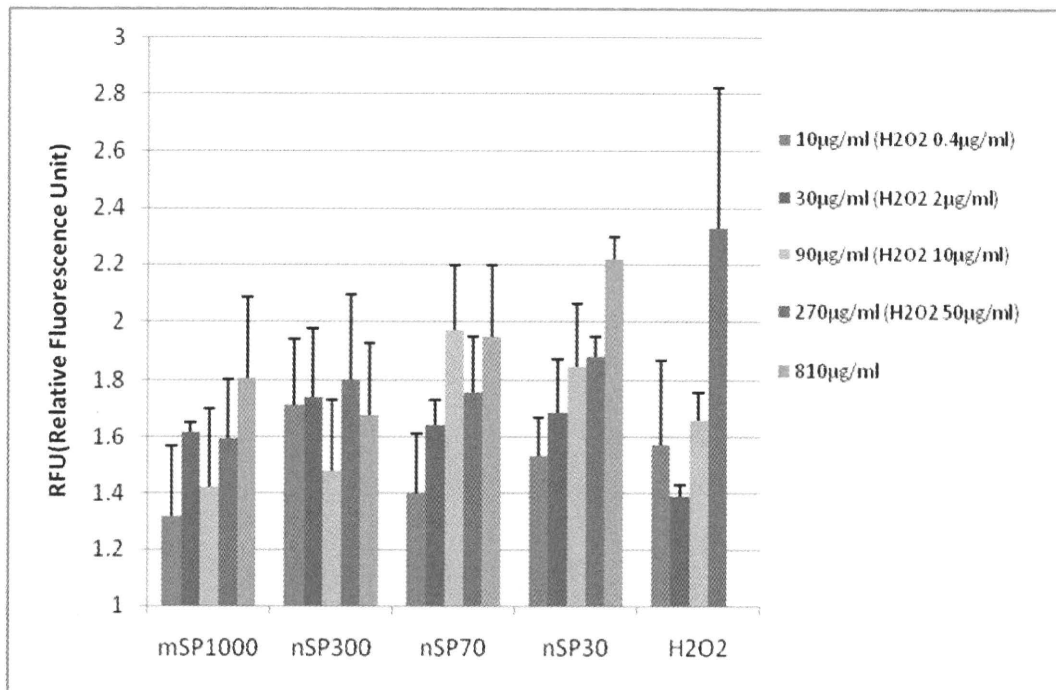


図 7. ナノシリカの ROS 産生誘導能の評価

消化管由来 IEC6 細胞に対して、様々な濃度の nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000、H₂O₂ 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。