

201101053A

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

腸内フローラ解析を基盤とした
食品ナノマテリアルの安全性評価

平成 23 年度 研究報告書

研究代表者 吉川友章

平成 24 (2012) 年 5 月

目次

I. 研究報告書	
1. 研究統括およびナノマテリアルが腸内フローラに与える影響の評価	1
大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野	研究代表者 吉川友章
2. 非晶質ナノシリカが腸内フローラに与える影響の評価	12
大阪大学臨床医工学融合研究教育センター	研究分担者 吉岡靖雄
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
III. 研究成果の刊行物・別冊	20

ナノマテリアルが腸内フローラに与える影響の評価

研究代表者 吉川 友章 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

当該申請課題の目的は、食品中ナノマテリアルが腸内環境や腸内細菌フローラに対するハザード（危害要因）になり得るか否かを科学的に解析する事である。昨今の食環境に対する安全への懸念や健康への関心の高まりも相俟って、ナノテクノロジーのような新技術によって産み出される食品には、安全・安心であることがこれまでに以上に強く求められている。しかし、例えば昨今注目されているナノマテリアルなどが、従来手法では把握・解明・探求できない未知のハザードになり得ることが想定され始めており、現状では十分にリスクを評価し得ない。また、最近、3大死因である癌・心疾患・脳血管疾患や生活習慣病の発症・悪化に腸内細菌フローラが関与している可能性が超一流科学誌に報告されている。これらの背景から、ナノマテリアルを含む新規物質に対して食品の安全性を確保するに当たっては、従来までの毒性評価法に囚われることなく、腸内細菌フローラをも対象として詳細な安全性評価が必要不可欠であると考えられる。

ナノマテリアルは吸湿性や組織浸透性の点で数 μm サイズの従来素材とは異なる機能を発揮することが知られており、既に各種食品中に利用されつつある。しかし、現状の規制は素材のサイズや形状などには言及しておらず、ナノマテリアルに特化した安全性評価も全くなされぬまま、従来素材と同じ規制で認可されている。このような現状の中、欧米各国やOECDによって、ナノマテリアルが固有の機能を反映して予想しにくい健康影響を誘発する可能性が指摘され、食品の安心・安全が世界的に脅かされている。しかしながら、安全性評価の現状は世界的に見ても既存の試験ガイドラインに沿って実施しているに過ぎず、腸内細菌フローラを含めて未知の生体影響には全く対応出来ていない。以上の観点から本申請課題では、食品中ナノマテリアルが腸内環境や腸内細菌フローラに与える影響を科学的に解析する。平成 23 年度は、1) 非晶質ナノシリカ（nSP）ならびにナノ・サブナノ銀を経口投与した際の生体影響を指標に投与量を設定した上で、2) 腸内細菌影響評価の実験系の確立、3) 短期間（28 日間）投与した際の糞便中成分・腸内細菌組成の解析を実施した。

研究要旨

A. 研究目的

本研究の目的は、腸内環境や腸内細菌フローラの観点から、食品ナノマテリアルのハザード同定を実施することである。ヒトの腸内環境は、常在する腸内細菌フローラなどの外的要因や

消化管機能などの内的要因が絶妙に相互作用して正常に維持されている。このバランスは、食生活や食品中の化学物質によって変動し、3大死因である癌・心疾患・脳血管疾患や生活習慣病の発症・悪化要因になる可能性が指摘されている。昨今の食環境に対する安全への懸念や

健康への関心の高まりも相俟って食品やその添加物には、安全であることが強く求められており、今後の食品安全の確保においては、従来手法のみに囚われることなく、消化管内環境や腸内細菌フローラの視点から安全性を科学的かつ包括的に評価する必要がある。例えば、新素材としてのナノマテリアルは、数 μm サイズの従来素材とは異なる機能を発揮することが知られており、既に各種食品中に利用されている。その一方で、ナノマテリアルが新素材であるが故に、固有の機能を反映した未知の健康影響を誘発する可能性が指摘されはじめている。これまでに申請者らは、経口投与したナノシリカが、①消化管を介して体内吸収される、②食物アレルギーを誘発する、③細菌に対して変異原性を誘導することなどを明らかとしており、これらの知見は、ナノマテリアルが消化管免疫系を介して間接的にあるいは腸内細菌フローラに対して直接的に作用して、疾患の発症を誘導する可能性を強く裏付けている。以上の観点から本申請課題では、ナノシリカやナノ銀、ナノ白金といった様々なナノマテリアルの腸内環境や腸内細菌フローラに与える影響を科学的に解析し、未知のハザードも含めて包括的なハザード同定を試みる。平成 23 年度は、1) ナノマテリアルを経口投与した際の生体影響を指標に投与量を設定した上で、2) 腸内細菌影響評価の実験系の確立、3) 糞便中成分・腸内細菌組成の解析を実施した。

食品ナノマテリアルは、米国 FDA の調査によると現在 60 品目程度の食品に含まれていることが報告されており、食品分野において人類の生活の質 (QOL) 向上に必須のものになっている。それにも関わらず食品ナノマテリアルの安全点検は全く手つかずであるため行政的な安全点検や規制が必要であることは自明であ

る。当該申請課題で得られる成果は、厚生労働行政として主導すべきナノマテリアルの安全点検実施や規制の策定に必須となる科学的知見を提供可能であるため、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心・安全で豊かな日本社会の構築や我が国のナノテク産業の世界的競争力強化に貢献できる。

B. 研究方法

1. ナノマテリアル

非晶質シリカは Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany)、より購入した。シリカは、一次粒子径が 100 nm (nSP100、濃度: 50 mg/ml)、70 nm (nSP70、濃度: 25 mg/ml)、30 nm (nSP30、濃度: 25 mg/ml) のものを使用した。さらに対照として、1000 nm (mSP1000、濃度: 50 mg/ml)、300 nm (nSP300、濃度: 50 mg/ml) のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。また、直径 1 nm の snAg、20 nm の nAg は polytech-net 社 (Germany) から購入した。以後の検討では、使用直前に粒子分散液を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 5 分間超音波処理し、更に 1 分間バルテックスミキサーで攪拌した。尚、以降の実験では、特記しない限り、蛍光色素等で標識されていない未標識のサンプルを実験に供した。

2. 実験動物

BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性)、は、日本 SLC より購入した。また、本研究における動物実験の飼育および実験は医薬基盤研究所の実験動物施設において行い、医薬基盤研究所・大阪大学動物実験規定に準じた。

3. 経口投与および解剖

BALB/c マウスへの経口投与は、非麻酔条件下で、個々の粒子を 2.5 mg/mouse で投与した。最終投与から 24 時間後にマウスを糞便を回収あるいは解剖した。また、ヘパリンで湿らせたシリンジを用いて、心臓採血により全血を採取した。適宜、体重推移ならびに組織重量を評価することにより、生体影響を評価した。

4. 血液生化学・血球検査

各種ナノマテリアルの最終投与から 24 時間後に、マウスをペントバルビタール（ソムノペンチル；Schering-plough Animal Health）で麻酔し、心臓より採血を行った。採血は、1/9 容量の 3.8% のクエン酸ナトリウム溶液であらかじめ湿らせたシリンジおよび注射針を用いて行った。この溶液を全血として血球検査に用い、残りを 1750 x g、15 分間、遠心分離して上清を血漿として回収した。得られた血漿は以下の血液生化学検査に供した。すなわち、血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、血中尿素窒素 (BUN)、アルブミン (ALB) を生化学分析装置 FUJI DRICHEM 7000 (FujiFilm Medical Co. Ltd.) を用いて測定した。また、血球検査は以下の方法で行った。各シリカ投与マウスから採取した全血を 0.1 mM EDTA 入りの PBS で 5 倍希釈し、多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 (Abaxis) を用いて、総白血球数、リンパ球数、単球数、血小板数を測定した。血球検査は、電気抵抗法を用いて実施した。

5. T-RFLP 解析

BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 (2.5 mg/day/body)、あるいは nAg ならびに snAg (2.5 mg/day/body) を強制経口投与 (28 日間) し、最終投与 24 時間後に糞便を回収した。16S rRNA 遺伝子ライブラリー法は大腸内菌叢を構成している菌種 (グルー

プ) のレベルで解析が可能であるが、時間・労力・多額の費用がかかり、さらに多検体解析にはあまり適していない。T-RFLP は、末端を蛍光標識したプライマーセットを用いて腸内細菌ゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により 16S rRNA 遺伝子の増幅を行った。増幅後、PCR 産物を制限酵素により消化し、DNA シークエンスサーを用いて 蛍光標識された末端 DNA 断片 (terminal restriction fragment : T-RF) の検出を行う。菌種 (グループ) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の違いより制限酵素の認識する位置が異なるので、菌種 (グループ) により異なった T-RF を得ることが出来る。得られた T-RF は GenBank などのデータベースや 16S rRNA 遺伝子ライブラリーより得られた配列を基に T-RF がどの菌種 (グループ) 由来であるか推定することが可能である。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考 察

まず、snAg の投与量設定を念頭に、各粒子を経口投与した際の生存率、体重推移、血球・血液生化学検査を実施した。その結果、100、50 µg/body で snAg を投与したマウスにおいて、致死毒性が認められた。この結果から、25 µg/body 以下の投与濃度で実験を実施する必要があるものと考えられた。実際、これ以下の濃度 (12.5、4.2、1.4 µg) の snAg を投与したマウスでは致死毒性は認められず、体重推移にもほとんど影響が認められなかった。そこで以降の検討では、12.5 µg snAg/body 以下の投与量で腸内フローラの解析を実施することとした。尚、非晶質ナノシリカに関しては、これまでの検討で、生体影響の認められない濃度を既に決定している (2.5 mg/body)。

次に、腸内フローラ解析の為の実験系構築を行った。一般に、抗生物質を強制経口投与することによって、マウス腸内細菌は死滅する事が知られている。例えば、バンコマイシン・メトロニダゾール・ネオマイシン・アンピシリン・ゲンタマイシン（バンコマイシンは 50 mg/kg, それ以外は 100 mg/kg）を 14 日間連続強制経口投与投与したマウスでは、パイエル板数の減少や、盲腸の肥大、脾臓重量の減少が認められる。これは、腸内細菌による免疫系の刺激の消失や腸内細菌による多糖分解活性の消失が原因であると考えられている。すなわち、ナノマテリアルの腸内フローラ影響を評価する上で、こういった評価系の構築が重要になってくる。そこで、こういった減少の再現を試みた。その結果、抗生物質カクテルを投与したマウスでは、図 1 を見ると一目瞭然ではあるが、盲腸が 5 倍以上、肥大しており、パイエル板数や脾臓重量の減少も認められた。以上、腸内フローラ影響を組織学的に評価する実験系を、ラボ内で再構築出来た。今後これらの評価系を用いて、ナノ銀やナノシリカの腸内細菌影響を組織学的に解析していく予定である。

次に今年度は、ナノ銀やナノシリカを投与したマウスの腸内細菌影響を、T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を用いて解析した。T-RFLP 法は、細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたフィンガープリント法である。16S rRNA 遺伝子は進化速度が遅く、種ごとに高い相同性を示すため、この配列の有無や量を定量することで種・属を判別することが出来る。

はじめに、T-RFLP 解析を用いて、nSP を投与したマウスの腸内フローラを解析した(表 1)。8 種類の属の個体中の存在比率を解析した結果、種々の属の細菌の割合が大きく変動していた

(図 2)。その内、特徴的なものについて取り上げると、例えば、Lactobacillales (OTU657) は投与したシリカのサイズや表面性状に関わらず、割合が増加した。また、Clostridium subcluster XIVa (OTU505) は表面をアミノ基で修飾した nSP70-N を投与した場合にのみ有意に増加した。加えて、Bacteroides (OTU366) は nSP70-N ならびに nSP70-C を経口投与したマウスにおいてのみ増加した。さらに、Prevotella (OTU137) は、nSP70-C を投与したマウスにおいてのみ、割合が増加していた。以上の結果は、直径 100 nm 以下のナノシリカを投与する事によって、腸内フローラのバランスが変化することを裏付けている。

次に、ナノ銀・サブナノ銀を投与したマウスの T-RFLP 解析を実施した。尚、対照群として、硝酸銀水溶液 (Ag^+) 投与群を設定した(表 2、図 3)。その結果、Prevotella (OTU137) は粒子サイズに関わらず、全ての群で消失していた。また、Lactobacillales (OTU332) は snAg 投与群で増加傾向にあり、Clostridium cluster XI は snAg 投与群で消失した。さらに、Clostridium subcluster XIVa (OTU940) は snAg 投与群においてのみ増加した。以上の結果は、銀が粒子状・イオン状に関わらず腸内フローラのバランスを変動させ得ること、特に snAg 投与によって大きく変動する可能性が示された。

以上、ナノシリカや銀を投与する事によって腸内フローラが変動する可能性が示された。これらの事実は、ナノマテリアル適用群においてのみ認められたのではなく、今回適用した全ての群においてある程度の変動が認められた。今後は、こういった腸内フローラの変動と健康影響との因果関係を追求していく必要がある。例えば、Bifidobacterium 属は酢酸の産生を介

して、病原菌の感染防御に働くことが知られている (Fukuda, S. et al. Nature. 2011,469)。nSP70 や nSP70-C の投与によってこの属のバランスが減少したということは、易感染性を招く可能性がある。一方で、nSP70-N を投与する事によってこの属は増加しており、ウイルスや細菌に対する抵抗性を高める可能性も考えられる。一方で、Clostridium は、腸管常在性の制御性 T 細胞の誘導に必須である (Atarashi, K. et al. Science. 2011,331)。シリカの投与によって、大きく増減した。このことは、ナノ・サブミクロンを問わず、微粒子物質への曝露が腸内フローラバランスの変動を誘導し、最終的に自己免疫疾患や易感染性といった健康影響の誘発に繋がる可能性を示唆している。従って、今後は、腸内フローラ変動とそれに伴う健康影響をエンドポイントとした新たな安全性評価が求められる。

E. 結論

以上、H23 年度の本研究では、ナノシリカや銀を投与する事によって腸内フローラが変動する可能性を先駆けて明らかとした。食品ナノマテリアルは、米国 FDA の調査によると現在 60 品目程度の食品に含まれていることが報告されており、食品分野において人類の生活の質 (QOL) 向上に必須のものになっている。それに関わらず食品ナノマテリアルの安全点検は全く手つかずであるため行政的な安全点検や規制が必要であることは自明である。当該申請課題で得られる成果は、厚生労働行政として主導すべきナノマテリアルの安全点検実施や規制の策定に必須となる科学的知見を提供可能であるため、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心・安全で豊かな日本社会の構築や

我が国のナノテク産業の世界的競争力強化に貢献できる。また、本事業においてナノマテリアルの長期摂取と腸内環境の破綻との関係を科学的に実証することが出来れば、ナノマテリアルの使用規制に立脚した 3 大疾患 (癌・心疾患・脳血管疾患) や生活習慣病 (動脈硬化・高血圧・自己免疫病) の発症・悪化に対する新しい予防法の確立にも貢献できるものと考えられる。以上、本申請課題の成果は、ナノマテリアル含有食品の安心・安全確保施策に科学的根拠を提供出来るのみならず、3 大疾患や生活習慣病に対する新しい予防施策の策定に資する有益な情報を提供できるものと期待している。従って、本研究のアウトプットとして得られる新たな方法論・基盤技術・医療体系は、我が国の知的財産の確保に資するだけでなく、「健康立国」としての我が国の国際的地位の向上にも繋がり、国内外を通じて数多くの人類の健康と福祉に貢献可能と考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

該当なし

【総説・その他】

該当なし

② 学会発表

【国内学会発表：合計 9 件】

1. 吉田徳幸, 東阪和馬, 平井敏郎, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 吉岡靖雄, 吉川友章, 角田慎一, 堤 康央：安全なナノ香粧品の開発に向け

たナノマテリアルの安全性評価., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月. (シンポジウム: 化粧品科学・皮膚科学への薬学からの挑戦 ~若手の視点からの提言~)

2. 東阪和馬, 吉岡靖雄, 永野貴士, 國枝章義, 畑 勝友, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けた非晶質ナノシリカの表面物性と起炎性の連関解明., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.
3. 宇治美由紀, 吉川友章, 吉田徳幸, 三里一貴, 宇高麻子, 森 宣瑛, 平井敏郎, 市橋宏一, 高橋秀樹, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 堤 康央: 経口投与したサブナノ白金の腎障害誘発性に関する基礎検討., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.
4. 平 茉由, 吉岡靖雄, 山下浩平, 潘 慧燕, 小椋健正, 青山道彦, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 抗炎症機能を有する水酸化フラーレンの開発とその薬物治療の最適化への展開., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.
5. 永野貴士, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 國枝章義, 畑 勝友, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: ナノ安全科学における microRNA の安全性バイオマーカーとしての有用性評価に向けた基礎検討., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.
6. 三里一貴, 吉川友章, 吉田徳幸, 平井敏郎, 宇治美由紀, 市橋宏一, 高橋秀樹, 宇高麻子,

森 宣瑛, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: ナノ・サブナノ素材の口腔毒性に関する基礎情報の収集., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.

7. 青山道彦, 吉岡靖雄, 山下浩平, 潘 慧燕, 小椋健正, 平 茉由, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 新規ナノ薬物送達担体の開発を目指した細胞内ナノ動態に関する基礎的検討., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.
8. 野尻奈央, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 佐藤宏祐, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: ナノ白金の授乳期投与が母体に及ぼす影響評価., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.
9. 森 宣瑛, 吉川友章, 吉田徳幸, 平井敏郎, 宇治美由紀, 市橋宏一, 高橋秀樹, 宇高麻子, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: マウスモデルにおけるサブナノ銀粒子の経口ハザード同定., 日本薬学会第 132 年会., 札幌 (北海道), 2012 年 3 月.

【国際学会発表: 合計 4 件】

1. Higashisaka K., Yoshioka Y., Nagano T., Kunieda A., Nagano K., Abe Y., Hamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.: Hemopexin as biomarkers for analyzing the biological responses associated with exposure to silica nanoparticles., SOT2012, San Francisco (USA), 11-15 March, 2012.

2. Hirai T., Yoshikawa T., Yoshida T., Tochigi S., Uji M., Ichihashi K., Itoh N., Nabeshi H., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Size-dependent aggravating-effect of amorphous silica nanoparticles on atopic dermatitis., SOT2012, San Francisco (USA), 11-15 March, 2012.
3. Morishita Y., Yoshioka Y., Takao K., Sato H., Nojiri N., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Itoh N., Yoshikawa T., Miyakawa T., Tsutsumi Y. : The effect of in utero exposure to amorphous nanosilica particles on neonatal immune function and neurological function., SOT2012, San Francisco (USA), 11-15 March, 2012.
4. Nagano T., Yoshioka Y., Higashisaka K., Kunieda A., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Itoh N., Yoshikawa T., Miyakawa T., Tsutsumi Y. : MicroRNA as a biomarker for the safety analysis of nanomaterials ., SOT2012, San Francisco (USA), 11-15 March, 2012.

②実用新案登録

該当無し

その他

該当無し

研究協力者

大阪大学薬学研究科毒性学分野（職員 4 名・大学院生/学生 14 名）：伊藤徳夫、吉川友章、橋野修代、鍋師裕美、赤瀬貴憲、山下琢矢、山下浩平、吉田徳幸、金崎聡一郎、平井敏郎、古屋剛、森下裕貴、潘 慧燕、宇治美由紀、小椋健正、前田祐香、市橋宏一、三浦直樹

独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト（職員 8 名）：角田慎一、鎌田春彦、今澤孝喜、阿部康弘、長野一也、森功美子、井上雅己

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

該当無し

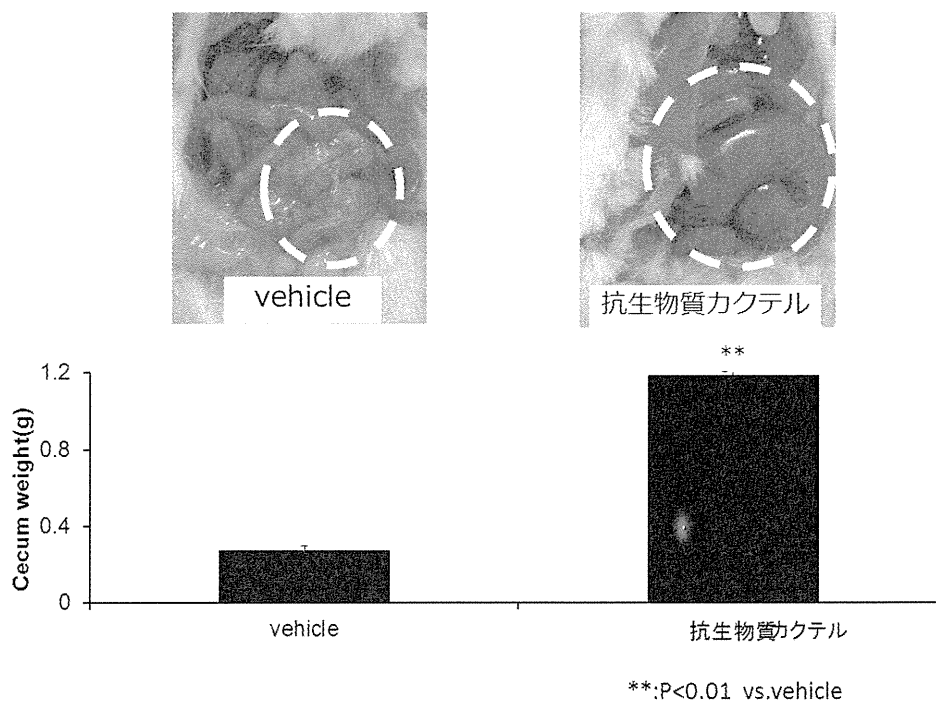


図1. 抗生物質カクテル投与による腸内細菌除去効果の検証.

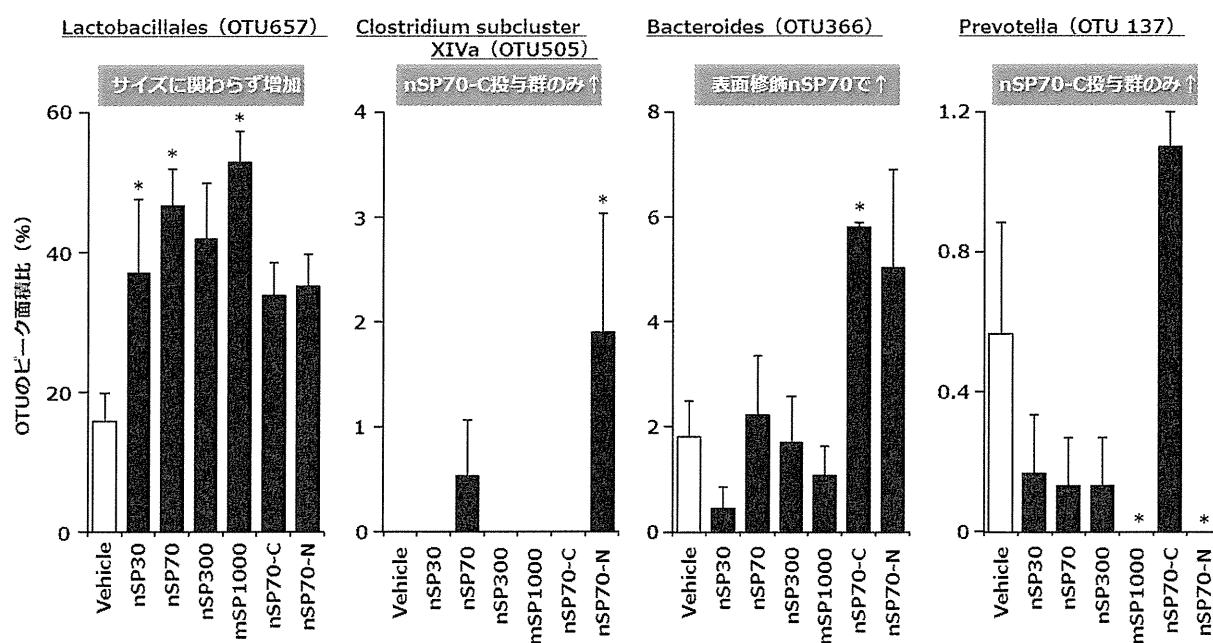


図2. ナノシリカの経口投与が腸内フローラに与える影響.

推定される菌群	Bacteroides	Prevotella	Bifidobacterium	Lactobacillales	Clostridium cluster IV	Clostridium subcluster XIVa	Clostridium cluster XI	Clostridium cluster XVIII	others
vehicle	20.2±4.1	19.5±6.8	6.6±1.9	17.0±4.2	0.3±0.3	11.5±3.6	2.4±1.0	1.6±0.3	20.9±5.8
nSP30	18.2±2.5	4.5±2.7	4.3±0.7	39.1±10.0	0±0	11.0±2.0	2.0±0.8	0±0	20.9±4.4
nSP70	16.6±2.5	1.1±0.7	0.9±0.4	47.1±4.9	0.8±0	14.6±1.1	2.2±0.6	0.7±0.4	5.4±3.1
nSP300	6.6±1.3	22.7±8.1	5.5±0.7	42.4±7.9	2.2±1.3	3.2±0.6	0.5±0.5	0.8±0.4	4.1±2.4
nSP70-C	15.4±2.4	2.0±0.5	1.0±0.7	36.3±4.2	1.2±0.7	26.2±2.3	0.6±0.4	0.8±0.5	3.4±2.0
nSP70-N	11.1±4.7	15.1±5.8	10.5±1.9	38.0±4.7	0±0	9.3±3.1	0.6±0.4	0.5±0.3	3.9±2.3

表1. ナノシリカの経口投与が腸内フローラに与える影響②.

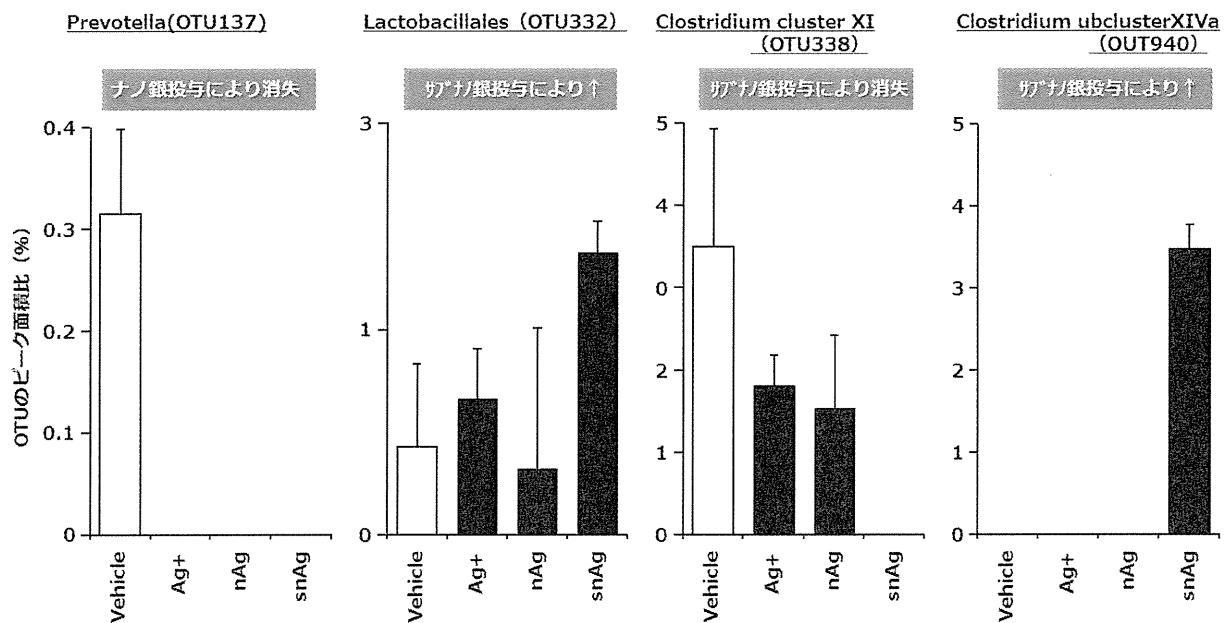


図3. ナノ銀・サブナノ銀の経口投与が腸内フローラに与える影響.

推定される菌群	Bacteroides	Prevotella	Bifidobacterium	Lactobacillales	Clostridium cluster IV	Clostridium subcluster XIVa	Clostridium cluster XI	Clostridium cluster XVIII	others
vehicle	19.8±2.1	1.4±0.8	4.6±1.2	55.7±8.6	0±0	5.1±0.6	3.5±1.4	0.3±0.3	9.6±2.7
Ag+	28.9±15.8	2.6±0.4	6.5±3.0	45.7±16.9	0.4±0.4	4.8±1.0	1.8±0.3	0±0	9.2±2.7
nAg	14.5±3.3	1.8±1.0	4.0±2.3	55.7±5.7	0±0	4.4±0.7	1.5±0.8	0±0	9.7±3.3
snAg	11.9±1.5	2.0±0.2	2.6±1.5	63.0±3.3	0±0	5.3±0.1	0±0	0.5±0.3	6.8±0.7

表2. ナノ銀・サブナノ銀の経口投与が腸内フローラに与える影響②.

非晶質ナノシリカが腸内フローラに与える影響の評価

研究分担者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター

本分担研究では、食品中ナノマテリアルの代表例で、抗菌活性を持つことが知られているサブナノ銀の経口投与が腸内細菌に対して影響を与えるか否か、ひいては宿主であるヒトの健康のハザードになりうるか否かを検証することである。ヒトの腸内環境は、常在する腸内細菌フローラなどの外的要因や消化管機能などの内的要因が絶妙に相互作用して正常に維持されている。このバランスは、食生活や食品中の化学物質によって変動し、3大死因である癌・心疾患・脳血管疾患や生活習慣病の発症・悪化要因になる可能性が指摘されている。昨今の食環境に対する安全への懸念や健康への関心の高まりも相俟って食品やその添加物には、安全であることが強く求められており、今後の食品安全の確保においては、従来手法のみに囚われることなく、消化管内環境や腸内細菌フローラの視点から安全性を科学的かつ包括的に評価する必要がある。例えば、新素材としてのナノマテリアルは、数・nmサイズの従来素材とは異なる機能を発揮することが知られており、既に各種食品中に利用されている。その一方で、ナノマテリアルが新素材であるが故に、固有の機能を反映した未知の健康影響を誘発する可能性が指摘されはじめている。申請者らは、経口投与したナノシリカが、①消化管を介して体内吸収される、②食物アレルギーを誘発する、③細菌に対して変異原性を誘導することなどを明らかとしており、これらの知見は、ナノマテリアルが消化管免疫系を介して間接的にあるいは腸内細菌フローラに対して直接的に作用して、疾患の発症を誘導する可能性を強く裏付けている。しかし、本邦を含めて世界的に見ても、現状の規制は素材のサイズや形状などには言及しておらず、ナノマテリアルに特化した安全性評価も全くなされぬまま、従来素材と同じ規制で認可されている。以上の観点から本申請課題では、食品中ナノマテリアルが腸内環境や腸内細菌フローラに与える影響を科学的に解析する。平成23年度は、ナノ・サブナノ銀を経口投与した際の生体影響を指標に投与量を設定した上で、2) 腸内細菌影響評価の実験系の確立、3) 短期間（28日間）投与した際の糞便中成分・腸内細菌組成の解析を実施した。

研究要旨

A. 研究目的

食品ナノマテリアルは、米国FDAの調査によると現在60品目程度の食品に含まれていることが報告されており、食品分野において人類の生活の質（QOL）向上に必須のものになって

いる。それにも関わらず食品ナノマテリアルの安全点検は全く手つかずであるため行政的な安全点検や規制が必要であることは自明である。一方で、昨今の食環境に対する安全への懸念や健康への関心の高まりも相俟って、ナノテクノロジーのような新技術によって産み出さ

れる食品には、安全・安心であることがこれまでに以上に強く求められている。しかし、例えば昨今注目されているナノマテリアル等が、従来手法では把握・解明・探求できない未知のハザードになり得ることが想定され始めており、現状では十分にリスクを評価し得ない。また、最近、3大死因である癌・心疾患・脳血管疾患や生活習慣病の発症・悪化に腸内細菌フローラが関与している可能性が超一流科学誌に報告されている。これらの背景から、ナノマテリアルを含む新規物質に対して食品の安全性を確保するに当たっては、従来までの毒性評価法に囚われることなく、腸内細菌フローラをも対象として詳細な安全性評価が必要不可欠であると考えられる。

当該申請課題で得られる成果は、厚生労働行政として主導すべきナノマテリアルの安全点検実施や規制の策定に必須となる科学的知見を提供可能であるため、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心・安全で豊かな日本社会の構築や我が国のナノテク産業の世界的競争力強化に貢献できる。また、本事業においてナノマテリアルの長期摂取と腸内環境の破綻との関係を科学的に実証することが出来れば、ナノマテリアルの使用規制に立脚した3大疾患（癌・心疾患・脳血管疾患）や生活習慣病（動脈硬化・高血圧・自己免疫病）の発症・悪化に対する新しい予防法の確立にも貢献できるものと考えられる。以上、本申請課題の成果は、ナノマテリアル含有食品の安心・安全確保施策に科学的根拠を提供出来るのみならず、3大疾患や生活習慣病に対する新しい予防施策の策定に資する有益な情報を提供できるものと期待している。

B. 研究方法

1. ナノマテリアル

非晶質シリカは Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany)、より購入した。シリカは、一次粒子径が 100 nm (nSP100、濃度: 50 mg/ml)、70 nm (nSP70、濃度: 25 mg/ml)、30 nm (nSP30、濃度: 25 mg/ml) のものを使用した。さらに対照として、1000 nm (mSP1000、濃度: 50 mg/ml)、300 nm (nSP300、濃度: 50 mg/ml) のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。また、直径 1 nm の snAg、20 nm の nAg は polytech-net 社 (Germany) から購入した。以後の検討では、使用直前に粒子分散液を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 5 分間超音波処理し、更に 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。尚、以降の実験では、特記しない限り、蛍光色素等で標識されていない未標識のサンプルを実験に供した。

2. 実験動物

BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性)、は、日本 SLC より購入した。また、本研究における動物実験の飼育および実験は医薬基盤研究所の実験動物施設において行い、医薬基盤研究所・大阪大学動物実験規定に準じた。

3. 経口投与および解剖

BALB/c マウスへの経口投与は、非麻酔条件下で、個々の粒子を 2.5 mg/body (投与可能な最大量) で、28 日間連続で投与した。最終投与から 24 時間後にマウスを糞便を回収した。また、ヘパリンで湿らせたシリンジを用いて、心臓採血により全血を採取した。適宜、体重推移ならびに組織重量を評価することにより、生体影響を評価した。

4. 血液生化学・血球検査

各種ナノマテリアルの最終投与から 24 時間後に、マウスをペントバルビタール（ソムノペンチル；Schering-plough Animal Health）で麻酔し、心臓より採血を行った。採血は、1/9 容量の 3.8% のクエン酸ナトリウム溶液であらかじめ湿らせたシリンジおよび注射針を用いて行った。この溶液を全血として血球検査に用い、残りを 1750 x g、15 分間、遠心分離して上清を血漿として回収した。得られた血漿は以下の血液生化学検査に供した。すなわち、血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、血中尿素窒素 (BUN)、アルブミン (ALB) を生化学分析装置 FUJI DRICHEM 7000 (FujiFilm Medical Co. Ltd.) を用いて測定した。また、血球検査は以下の方法で行った。各シリカ投与マウスから採取した全血を 0.1 mM EDTA 入りの PBS で 5 倍希釈し、多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 (Abaxis) を用いて、総白血球数、リンパ球数、単球数、血小板数を測定した。血球検査は、電気抵抗法を用いて実施した。

5. T-RFLP 解析

BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 (2.5 mg/day/body) を強制経口投与 (28 日間) し、最終投与 24 時間後に糞便を回収した。16S rRNA 遺伝子ライブラリー法は大腸内菌叢を構成している菌種 (グループ) のレベルで解析が可能であるが、時間・労力・多額の費用がかかり、さらに多検体解析にはあまり適していない。T-RFLP は、末端を蛍光標識したプライマーセットを用いて腸内細菌ゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により 16S rRNA 遺伝子の増幅を行った。増幅後、PCR 産物を制限酵素により消化し、DNA シークエンスサーを用いて蛍光標識された末端 DNA 断片 (terminal restriction fragment : T-RF)

の検出を行う。菌種 (グループ) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の違いより制限酵素の認識する位置が異なるので、菌種 (グループ) により異なった T-RF を得ることが出来る。得られた T-RF は GenBank などのデータベースや 16S rRNA 遺伝子ライブラリーより得られた配列を基に T-RF がどの菌種 (グループ) 由来であるか推定することが可能ある。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

まず、snAg の投与量設定を念頭に、各粒子を経口投与した際の生存率、体重推移、血球・血液生化学検査を実施した。その結果、100、50 µg/body で snAg を投与したマウスにおいて、致死毒性が認められた。この結果から、25 µg/body 以下の投与濃度で実験を実施する必要があるものと考えられた。実際、これ以下の濃度 (12.5、4.2、1.4 µg) の snAg を投与したマウスでは致死毒性は認められず、体重推移にもほとんど影響が認められなかった。そこで以降の検討では、12.5 µg snAg/body 以下の投与量で腸内フローラの解析を実施することとした。尚、非晶質ナノシリカに関しては、これまでの検討で、生体影響の認められない濃度を既に決定している (2.5 mg/body)。

次に、腸内フローラ解析の為の実験系構築を行った。一般に、抗生物質を強制経口投与することによって、マウス腸内細菌は死滅する事が知られている。例えば、バンコマイシン・メトロニダゾール・ネオマイシン・アンピシリン・ゲンタマイシン (バンコマイシンは 50 mg/kg, それ以外は 100 mg/kg) を 14 日間連続強制経口投与投与したマウスでは、パイエル板数の減少や、盲腸の肥大、脾臓重量の減少が認められる。これは、腸内細菌による免疫系の刺激の

消失や腸内細菌による多糖分解活性の消失が原因であると考えられている。すなわち、ナノマテリアルの腸内フローラ影響を評価する上で、こういった評価系の構築が重要になってくる。そこで、こういった減少の再現を試みた。その結果、抗生物質カクテルを投与したマウスでは、図 1 を見ると一目瞭然ではあるが、盲腸が 5 倍以上、肥大しており、パイエル板数や脾臓重量の減少も認められた。以上、腸内フローラ影響を組織学的に評価する実験系を、ラボ内で再構築出来た。今後これらの評価系を用いて、ナノ銀やナノシリカの腸内細菌影響を組織学的に解析していく予定である。

次に今年度は、ナノシリカを投与したマウスの腸内細菌影響を、T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を用いて解析した。T-RFLP 法は、細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたフィンガープリント法である。16S rRNA 遺伝子は進化速度が遅く、種ごとに高い相同性を示すため、この配列の有無や量を定量することで種・属を判別することが出来る。

はじめに、T-RFLP 解析を用いて、nSP を投与したマウスの腸内フローラを解析した(表 1)。8 種類の属の個体中の存在比率を解析した結果、種々の属の細菌の割合が大きく変動していた(図 2)。その内、特徴的なものについて取り上げると、例えば、Lactobacillales (OTU657) は投与したシリカのサイズや表面性状に関わらず、割合が増加した。また、Clostridium subcluster XIVa (OTU505) は表面をアミノ基で修飾した nSP70-N を投与した場合にのみ有意に増加した。加えて、Bacteroides (OTU366) は nSP70-N ならびに nSP70-C を経口投与したマウスにおいてのみ増加した。さらに、Prevotella (OTU137) は、nSP70-C

を投与したマウスにおいてのみ、割合が増加していた。以上の結果は、直径 100 nm 以下のナノシリカを投与する事によって、腸内フローラのバランスが変化することを裏付けている。

E. 結論

以上、ナノシリカや銀を投与する事によって腸内フローラが変動する可能性が示された。これらの事実は、ナノマテリアル適用群においてのみ認められたのではなく、今回適用した全ての群においてある程度の変動が認められた。今後は、こういった腸内フローラの変動と健康影響との因果関係を追求していく必要がある。例えば、Bifidobacterium 属は酢酸の産生を介して、病原菌の感染防御に働くことが知られている (Fukuda, S. et al. Nature. 2011,469)。nSP70 や nSP70-C の投与によってこの属のバランスが減少したということは、易感染性を招く可能性がある。一方で、nSP70-N を投与する事によってこの属は増加しており、ウイルスや細菌に対する抵抗性を高める可能性も考えられる。一方で、Clostridium は、腸管常在性の制御性 T 細胞の誘導に必須である (Atarashi, K. et al. Science. 2011,331)。シリカの投与によって、大きく増減した。このことは、ナノ・サブミクロンを問わず、微粒子物質への曝露が腸内フローラバランスの変動を誘導し、最終的に自己免疫疾患や易感染性といった健康影響の誘発に繋がる可能性を示唆している。従って、今後は、腸内フローラ変動とそれに伴う健康影響をエンドポイントとした新たな安全性評価が求められる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

該当無し

② 学会発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当なし

② 実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

研究協力者

大阪大学薬学研究科毒性学分野（職員 4 名・大

学院生/学生 14 名）：伊藤徳夫、吉川友章、橋野修代、鍋師裕美、赤瀬貴憲、山下琢矢、山下浩平、吉田徳幸、金崎聡一郎、平井敏郎、古屋剛、森下裕貴、潘 慧燕、宇治美由紀、小椋健正、前田祐香、市橋宏一、三浦直樹

独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロ

ジェクト（職員 8 名）：角田慎一、鎌田春彦、

今澤孝喜、阿部康弘、長野一也、森功美子、井

上雅己

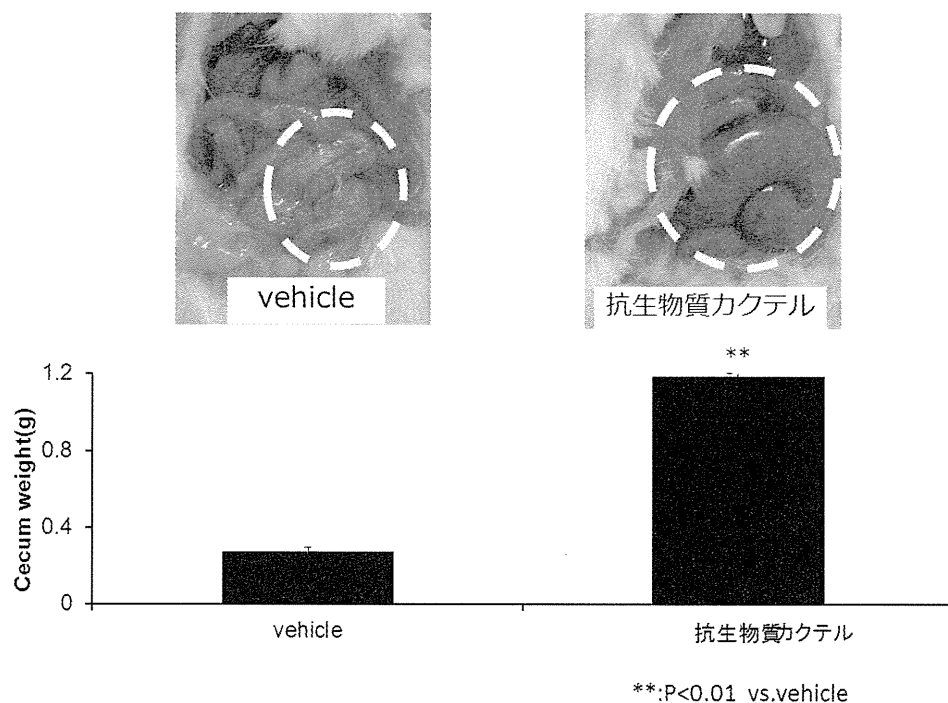


図1. 抗生物質カクテル投与による腸内細菌除去効果の検証.

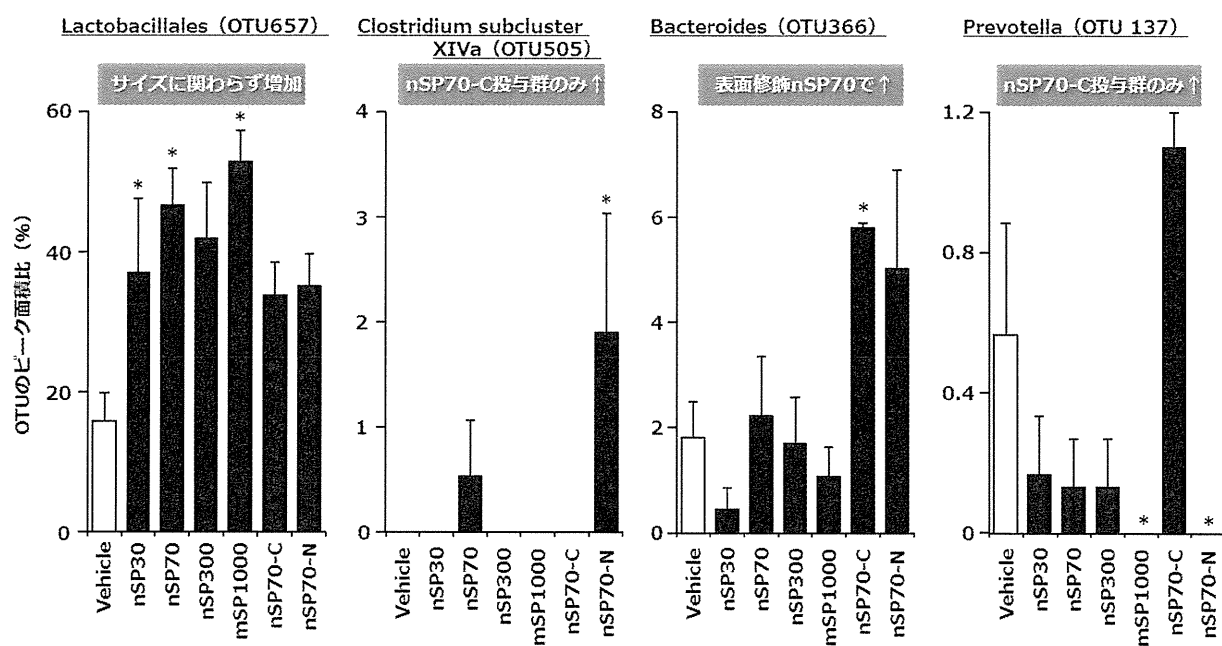


図2. ナノシリカの経口投与が腸内フローラに与える影響.

推定される菌群	Bacteroides	Prevotella	Bifidobacterium	Lactobacillales	Clostridium cluster IV	Clostridium subcluster XIVa	Clostridium cluster XI	Clostridium cluster XVIII	others
vehicle	20.2±4.1	19.5±6.8	6.6±1.9	17.0±4.2	0.3±0.3	11.5±3.6	2.4±1.0	1.6±0.3	20.9±5.8
nSP30	18.2±2.5	4.5±2.7	4.3±0.7	39.1±10.0	0±0	11.0±2.0	2.0±0.8	0±0	20.9±4.4
nSP70	16.6±2.5	1.1±0.7	0.9±0.4	47.1±4.9	0.8±0	14.6±1.1	2.2±0.6	0.7±0.4	5.4±3.1
nSP300	6.6±1.3	22.7±8.1	5.5±0.7	42.4±7.9	2.2±1.3	3.2±0.6	0.5±0.5	0.8±0.4	4.1±2.4
nSP70-C	15.4±2.4	2.0±0.5	1.0±0.7	36.3±4.2	1.2±0.7	26.2±2.3	0.6±0.4	0.8±0.5	3.4±2.0
nSP70-N	11.1±4.7	15.1±5.8	10.5±1.9	38.0±4.7	0±0	9.3±3.1	0.6±0.4	0.5±0.3	3.9±2.3

表1. ナノシリカの経口投与が腸内フローラに与える影響②.