

201234029B

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 23-24 年度 総合研究報告書

研究代表者 吉岡靖雄

平成 25 (2013) 年 5 月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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-----1  
大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野 研究代表者 吉岡靖雄

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----35

## 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

研究代表者 吉岡靖雄 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

### 研究要旨

ヒトの腸内環境は、常在する腸内細菌叢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・脳血管疾患や食物アレルギーの発症・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、従来手法のみにとらわれることなく、消化管内環境や腸内細菌叢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、食品添加物などとして期待される新素材である、粒子径 100nm 以下のナノマテリアルは、数 $\mu\text{m}$ 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ために、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ます。申請者らは、経口投与したナノマテリアルが、①消化管を介して体内吸収されること、②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、ナノマテリアルが腸内細菌叢や消化管免疫系を介して、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、非晶質ナノシリカやナノ銀といった様々なナノマテリアルのリスク解析を念頭に、腸内環境や腸内細菌叢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た。当初予定では、「平成 23 年度に非晶質ナノシリカの腸内環境/腸内細菌叢に与える影響を解析し、平成 24 年度には非晶質ナノシリカで得た知見をさらに発展させて、ナノ銀といった他の食品中ナノ素材を用いて同様の検討を行うと共に、ナノ素材と疾患の発症・悪化との関連を解析する」ことを達成目標とした。下記に詳細説明するように、当該課題においては、当初目標を達成できたものと考えている。特に、10nm 以下のサブナノマテリアルにも着眼しつつ、食品中ナノマテリアルに関して、①一般毒性試験により影響が認められなかったとしても、免疫毒性を呈する可能性があること、②腸内細菌叢の変動を誘発し得ること、③サブナノマテリアルに着眼した検討も必須であることを明らかとした。当然のことながら、本研究はまだまだ検討の余地が多く残されており、本研究成果を基盤として、より多くの基盤情報を積みあげること、ナノマテリアル含有食品のリスク解析、安全確保に繋がると期待している

### A. 研究目的

本研究の目的は、腸内環境や腸内細菌叢の観点から、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mm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ます。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叢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。以上の観点から本研究では、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。

当初予定では、「平成 23 年度に非晶質ナノシリカの腸内環境/腸内細菌叢に与える影響を解析し、平成 24 年度には非晶質ナノシリカで得た知見をさらに発展させて、ナノ銀といった他の食品中ナノ素材を用いて同様の検討を行うと共に、ナノ素材と疾患の発症・悪化との関連を解析する」ことを達成目標とした。下記に詳細説明するように、当該課題においては、当初の予定を遂行すると共に、10nm 以下のサブナノ素材に関する検討も併せて実施するなど、当初目標を達成できたものと考えている。

なお本課題は、平成 23 年度には、研究代表者：吉川友章、研究分担者：吉岡靖雄であったが、吉川が異動により当該研究の実施が困難となった

ため、平成 24 年度には研究代表者として吉岡が研究を推進した。このような変更があったものの、平成 23 年度に吉川と吉岡が密に情報交換していたこともあり、当初研究計画を問題無く達成できたものと考えている。

## **B. 研究方法**

### 実験動物

6 週齢の BALB/c マウス（雌性）は、日本エスエルシーより購入した。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。

### 非晶質シリカ

本検討では、Micromod 社（Micromod Partikeltechnologie GmbH, Germany）の非晶質シリカ分散液を用いた。一次粒子径が 30 nm（nSP30）のナノシリカを使用した。また、対照として、300 nm（nSP300）、1000 nm（mSP1000）のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。なお、以後の検討では、使用直前にシリカ分散液を 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。

### シリカの経口投与

BALB/c マウス（6 週齢）に超純水で 2.5 mg/mouse に調整したシリカ分散液（mSP1000、nSP300、nSP30）を 100  $\mu$ l/mouse でゾンデ（NIS 式フレキシブル経口ゾンデ（テフロン製））を用いて 28 日間連続経口投与した。

### 血液回収

最終投与から 24 時間後、ペントバルビタールによる麻酔下、心臓より採血を行った。500 U/ml のヘパリン溶液であらかじめ処理し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

して血球検査に供し、残りを 3000×g、15 分間、遠心分離して血漿を回収した。得られた血漿は血液生化学検査に供した。

#### 血液生化学試験

血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) を比色法にて測定した。ALT 活性は、基質である L-アラニンのアミノ転位反応によって生じたピルビン酸が、ピルビン酸オキシダーゼと反応することで生じる過酸化水素とジアリールイミダゾールロイコ色素の反応によって生成した青色色素を測定した。BUN は、ウレアーゼの作用によって生成したアンモニアとブロムクレゾールグリーンとの反応によって生じた緑色色素を測定した。測定には、生化学分析装置 FUJIDRICHEM 7000 (FUJIFILM) を用いた。

#### 血球検査

各シリカ投与マウスから採取した全血を多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 (Abaxis, Union City, CA) を用いて、総白血球数、リンパ球数、単球数、顆粒球数、血小板数を電気抵抗法により測定した。

#### 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ある。

#### サブナノ白金

本検討には、Polytech & Net GmbH (Schwalbach, Germany) から購入した二次粒子径が 1 nm の snPt1 および 8 nm の snPt8 を用いた。なお、粒子分散液の調製は、前節までの実験方法に準じた。

#### 病理学的検査

最終投与から 24 時間後、マウスをペントバルビタール麻酔下で脱血死させ、脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、小腸、大腸、胃を摘出し、すぐに 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。その後、各組織のパラフィンブロックを作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色 (H.E.染色) を実施した。パラフィン切片をキシレンで脱パラフィン、エタノールで脱水処理し、水洗後、ヘマトキシリンに 15 分間浸漬し、再度水洗した。この切片をエオジンに 1 分間浸漬した後、再度エタノールで脱水、キシレンで透徹処理後、封入した。切片を光学顕微鏡下で観察し、4 段階のスコアにより評価した。スコアリングの基準は、Grade0:異常なし、Grade1:極軽度、Grade2:軽度、Grade3:中等度、Grade4:高度とした。

#### サブナノ銀

本検討では、Polytech & Net GmbH (Schwalbach, Germany) の銀粒子分散液を用いた。一次粒子径が 1 nm (snAg、15 mg/ml)、20 nm (nAg、10 mg/ml) のナノ銀、サブナノ銀を使用した。また、今回用いた銀粒子分散液に

は、銀イオンが入っている可能性が考えられるため、銀イオンの対照として、硝酸銀を用いた。なお、以後の検討では、使用直前に各銀粒子分散液を 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。

#### (倫理面への配慮)

本研究は動物実験を避け得なかったが、動物愛護の精神を遵守しつつ実施した。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文科省の指針）」に準拠し、大阪大学および大阪大学薬学研究科、(独) 医薬基盤研究所等の各所属機関の動物実験規程に則り実施した。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属機関の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受けた。さらに本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月、厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」（基発第 0207004 号）【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」（基発第 0331013 号）が通達】、2009 年 3 月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進した。

### C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

#### D. 考 察

##### 非晶質シリカの経口投与による生体影響評価

まず初めに、非晶質シリカの経口投与における一般毒性試験を実施した。本検討については、断片的にこれまで実施してきた経緯があるものの、

粒子径・表面電荷の異なるサンプルを用い、同時に解析する必要があると考え、実施した。本検討では、粒子径が 30nm、70nm のナノシリカである nSP30、nSP70 と共に、サブミクロンサイズである粒子径 300nm、1000nm の nSP300、mSP1000 を用いた。さらに、nSP30 の表面がカルボキシル基、アミノ基で修飾された nSP30-C、nSP30-N を用いた。なお、透過型電子顕微鏡を用いて形状を観察した結果、粒子径に関わらず、表面の滑らかな球状の素材であることが示された。また、いずれの粒子も、平均二次粒子径は全ての粒子で一次粒子径とほぼ同等であった。上記のように、本研究で供した各シリカは、分散性の高い素材であることを確認している。

各シリカを 28 日間連続でマウスに強制経口投与した。なお、本投与量は、125 mg/day/kg であり、ヒトにおけるシリカ摂取量は 12 mg/day/kg と報告されていることから (ACS NANO vol.6 no.3 2441-2451,2012)、想定される曝露量の約 10 倍と考えられる。まず、経口的なマウス体重を測定した。その結果、各シリカ投与群において、コントロール群と比較して有意な体重変化は認められなかった (図 1)。また、最終投与の 24 時間後に各マウスから血液、臓器を回収し、血球検査、臓器重量の測定を実施した。その結果、主要臓器において、各シリカ投与群間で有意な変化は観察されなかった (図 2. 代表例として脾臓の臓器重量を示した)。血球検査については、赤血球において、nSP30-C および nSP30-N 投与群で、コントロール群と比較して有意に上昇していたが、正常範囲内であった (図 3)。また、好酸球数が、nSP30-C 投与群で、コントロール群と比較して、有意に減少していた。その他の血球数については、いずれの群においても、変化は観察されなかった (図 3)。

次に、28 日間連続で各シリカを経口投与した後、シリカの投与を中断し、28 日間飼育した後血液検査を実施した。その結果、いくつかの項目において有意な差が観察された (図 4)。特に、

nSP30-C および nSP30-N 投与群において、白血球数、リンパ球数の有意な増加が観察された。本結果の詳細な理由は不明であるものの、非晶質ナノシリカ投与中に顕著な変化が観察されなかったとしても、その後、生体影響が誘発される可能性を示唆するものであり、今後、より詳細な検討が必要であると考えられる。

近年、ナノサイズの銀粒子をラットに 28 日間連続で経口投与した結果、体重、臓器重量や血液生化学検査において目立った生体影響が認められないことが報告されている。今回の検討では、この報告と同様にシリカの経口曝露に関しても、一般毒性学的な影響は認められなかった。しかし、ナノサイズのポリスチレンの経口曝露により、生体への鉄の取り込み量に変動することが報告されていることなど、ナノマテリアルならではの特殊な生体作用が発揮される可能性もある。従って今後は、腸管を介した生体影響に関しても、一般毒性学的観点のみならず、様々な特殊毒性（免疫毒性、遺伝毒性、生殖発生毒性等）の観点を含めて検討を行っていく必要があると考えている。また、食品中に含まれる物質には生涯にわたって曝露し続ける可能性があり、蓄積性などの観点にも十分な注意を払いつつ、より長期的な影響を評価していくことが重要である。

#### 非晶質シリカの経口投与による免疫毒性評価

次に、nSP30、nSP30-C、nSP30-N の経口投与が、全身免疫系に及ぼす影響を評価した。nSP30、nSP30-C、nSP30-N を、上記の同様の方法で、35 日間連続経口投与した。その投与期間中、14 日目、28 日目に、モデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン（OVA）を免疫活性化剤である水酸化アルミニウムゲルと共に、腹腔内に投与した。その後、シリカの経口投与が終了した 35 日目に、血清中の OVA 特異的抗体価を ELISA で測定した。その結果、nSP30、nSP30-C 投与群において、血清中 OVA 特異的 IgG、IgA がコントロール群と比較して有意に上昇することが判明した（図 5）。

以上の結果は、ナノシリカの経口投与が、全身免疫系に影響を及ぼすことを示唆しており、食物アレルギーを初めとする免疫疾患の発症・悪化との関連をより精査する必要性を示すものである。

#### ナノシリカの経口投与による腸内細菌変動解析

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 6 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。次に、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（図 7、8）。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 7、8）。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、Clostridiumsubcluster 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。

#### サブナノ白金の経口投与による生体影響評価

近年、ナノマテリアル（粒子径 10~100 nm）のみならず、サブナノマテリアル（粒子径 10 nm 以下）も食品に使用されつつある。サブナノマテリアルは、抗体やアルブミンなどの生体内高分子と同程度の大きさであり、ナノマテリアルや分子とも異なる特殊な体内動態や、未知の生体影響を示すことが予想される。リスクが未知である新規素材の安全性評価に関しては、まず、体内に吸収されるかどうか、そして、吸収されるのであれば、ハザードを有するかどうかを調べる必要がある。さらに、腸粘膜の上皮組織から吸収される分子の大きさは 500 ダルトン（約 1~2 nm）であることや、人体において最も強固な皮膚バリアが 1~2 nm であることを鑑みると、粒子径 10 nm 以下のサブナノマテリアルは体内吸収性の観点において、サブミクロンサイズ以上の物質やナノマテリアルとも劇的に異なる挙動を示す可能性がある。

白金コロイドは、触媒作用や抗酸化作用を有する金属粒子であり、近年では、10nm 以下までサイズを微小化したいわゆる白金ナノコロイド（= サブナノ白金）として実用化されている。例えば、健康補助食品、ヨーグルト、ミネラルウォーターなどに適用されているように、サブナノ白金含有製品は既に市場に出回っている。サブナノ白金の

曝露機会が増大する一方で、安全面の観点では、サイズの微小化により、従来の白金とは異なる体内動態や生理作用に起因した、予期せぬ生体影響を示す可能性が考えられる。しかし、前述の通り、サブナノマテリアルは未知の新素材であるため、サブナノ白金の体内吸収性や生体影響など、安全性評価に重要な情報がほとんどないのが現状である。

我々はこれまでに、粒子径 1nm のサブナノ白金 (snPt1) および 8nm の snPt8 を経口曝露した際の体内吸収性および体内分布を調べた結果、snPt8 は体内にほとんど吸収されないのに対し、snPt1 は経口曝露後に全身に分布し、肝臓、腎臓へ特に多く分布することが明らかとしている。さらに、体内吸収された snPt1 は数か月に渡り体内に残留すること、連日経口曝露した際には、血中・肝臓中・腎臓中など、体内に蓄積していくことを明らかとしている。リスクは曝露とハザードの積算で表され、曝露が無い（体内吸収されない）際にはリスクはゼロであるが、上記の事実は、snPt1 のリスクはゼロではないこと、即ち、ハザードの定性・定量解析が必須であることを示している。そこで、snPt1 を経口曝露した際のハザード情報収集を目的とし、snPt1 を 7 日間経口投与した際のハザードを、一般毒性学的観点、および組織傷害の観点から評価した。

snPt1 の経口曝露による生体影響を評価するため、BALB/c マウスに、snPt1 を 900 µg/body で 7 日間経口投与した。なお、今回はハザード同定を目的に、7 日間経口投与して致死毒性を示さない最大用量を投与した。その結果、snPt1 投与群において、PBS を投与したコントロール群と比較して、一過性の有意な体重減少が認められた（図 9）。次に、各マウスから回収した血漿を用いて、肝障害マーカーである ALT、AST、腎障害マーカーである BUN、CRE を測定した（図 10）。その結果、コントロール群と比較して群間に顕著な差は認められなかった。また、血球細胞数を測定した結果、単球数、顆粒球数、赤血球数、血小



板数については、群間に有意な差は認められなかった。一方で、統計学的に有意な差ではないものの、白血球数、リンパ球数といった免疫細胞がコントロール群と比較して snPt1 投与群で減少傾向にあり、その値は正常値を逸脱していた(図 11)。次に、胃、小腸、大腸といった消化管について、HE 染色により病理組織学的に解析した結果、小腸および大腸では、異常は認められなかった。一方で、胃に関しては、snPt1 を投与した全てのマウスにおいて、軽度ではあるものの炎症性細胞の浸潤が認められた(図 12、13)。さらに、脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓について同様に解析した結果、脳、肺、肝臓、脾臓については、顕著な病理異常は認められなかった(図 12)。一方で、腎臓においては、snPt1 投与群で中程度の尿細管の委縮が認められた。尿細管の委縮は、腎障害が起きた後の修復時に生じることが知られていることから、体内吸収された snPt1 が早期の段階で一過性の腎障害を誘発する可能性が考えられた(図 13)。以上により、snPt1 を経口曝露することで、一過性の体重減少および胃と腎臓における病理学的異常が引き起こされる可能性が示された。これは、白金製剤であるシスプラチンが腎臓の尿細管において障害を引き起こすことと関係がある可能性が考えられる。シスプラチンは腎尿細管上皮の有機カチオントランスポーター(OCT-2)によって取り込まれ、尿細管に障害を与えることが報告されているため、snPt1 も同様に、OCT-2 によって腎尿細管に取り込まれ、障害を引き起こした可能性が考えられる。今後、snPt1 の尿細管への取り込みに OCT-2 が関わっているか、より詳細に検討する必要がある。また、尿細管の委縮が認められたことから、より早期に腎臓障害が誘発されている可能性を考え、今後は、投与開始時から経時的な病理組織学的解析を実施することで、腎障害誘発性について詳細を解析していく予定である。今回、1週間という短い期間の曝露でさえも、このようなハザードが認められたことから、snPt1 の長期間の曝露により、組織に snPt1 が蓄

積し、腎疾患や消化管疾患につながる能性も考えられる。例えば、白金と同じ重金属であるカドミウムは、経口摂取することで腎臓に蓄積し、長期間にわたって摂取すると、近位尿細管機能障害という腎疾患を引き起こすことが知られている。また、白金製剤であるシスプラチンは、腎臓に蓄積し、重大な腎障害を引き起こすことが報告されている。従って今後、濃度依存性・経時変化・長期の曝露を考慮したハザード同定を実施し、体内吸収性、代謝、蓄積性、排泄機構、いわゆる ADME の定量解析を同時に進行することで、snPt1 のハザード発現と曝露実態の関係性を明らかとしていく予定である。

#### サブナノ銀の経口投与による生体影響評価

銀粒子は、優れた抗菌作用を示すことから、既に食品に適用されており、サイズの微小化に伴い抗菌作用が向上するため、10 nm~100 nm のナノサイズのナノ銀のみならず、近年では 10 nm 以下のサブナノサイズのサブナノ銀の使用が急激に拡大している。そこで次に、ナノ銀、サブナノ銀の経口投与における生体影響を評価した。本検討では、粒子径 20 nm のナノ銀(nAg)、1 nm 以下のサブナノ銀(snAg)を用いた。また、今回用いた銀粒子分散液には、銀イオンが含まれる可能性が考えられるため、コントロールとして、硝酸銀を用いた。まず初めに、投与可能な最大量である 25 mg/kg を経口投与し、急性毒性を評価した。その結果、ナノ銀、銀イオン投与群では、生存率に影響は認められなかった一方で、サブナノ銀投与群においては、24 時間以内に全マウスが死亡した(図 14)。そこで、サブナノ銀に関して、投与量を変化させることで、LD50 を算出したところ、約 14 mg/kg であることが判明した(図 15)。そこで、急性毒性の認められない投与量において、28日間連続投与による影響を評価した。その結果、ナノ銀、サブナノ銀、銀イオン投与群いずれにおいても、体重変化、肝障害マーカー、腎傷害マーカー、血球成分に変動は認められなか

った(図 16-20)。以上の結果は、食品中のサブナノ銀の安全性を評価するうえで、貴重な情報になるものと期待される。

#### サブナノ銀の経口投与による腸内細菌変動

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<sup>+</sup>) 投与群を設定した(図21、22)。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

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。当該研究で得られる成果は、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。

また今後、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

該当無し

論文投稿が遅れているが、現在、上述した①ナノシリカの経口投与による一般毒性及び腸内細菌叢への影響評価、②サブナノ銀の経口投与による一般毒性及び腸内細菌叢への影響評価、の2報を投稿準備中であり、今年度中に投稿できるものと考えている。

### ② 学会発表

#### 【シンポジウム等：合計2件】

1. 吉岡靖雄, 堤 康央：ナノ安全科学研究の最前線：ナノマテリアルの安全性解析と安全なナノマテリアルの開発支援に向けて., 技術情報協会セミナー（ナノマテリアル規制の最新動向と今後の方向性）., 東京（東京）, 2012年4月.
2. 吉岡靖雄：ナノマテリアルの持続的な安全使用に向けたナノ安全科学研究., 日本薬学会第133年会., 横浜（神奈川）, 2013年3月.

#### 【国内学会発表：合計18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：安全なナノ化粧品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.
10. 吉岡靖雄, 宇治美由紀, 吉田徳幸, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 食品中サブナノマテリアルの安全性評価: 経口投与したサブナノ白金の体内動態及び生体影響に関する基礎検討., 日本食品衛生学会第 103 回学術講演会., 東京 (東京), 2012 年 5 月.
11. 宇治美由紀, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 三里一貴, 宇高麻子, 森 宣瑛, 平井敏郎, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの腸管吸収性に関する基礎情報の収集., 第 39 回日本毒性学会学術年会., 仙台 (宮城), 2012 年 7 月.
12. 三里一貴, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 宇高麻子, 森 宣瑛, 平井敏郎, 赤瀬貴憲, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: ナノ・サブナノマテリアルの口腔毒性に関する基礎情報の収集., 第 39 回日本毒性学会学術年会., 仙台 (宮城), 2012 年 7 月.
13. 森 宣瑛, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 宇高麻子, 平井敏郎, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 腸内細菌叢に着目した食品ナノマテリアルの安全性評価., 第 39 回日本毒性学会学術年会., 仙台 (宮城), 2012 年 7 月.
14. 吉岡靖雄, 森 宣瑛, 吉田徳幸, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 食品中サブナノマテリアルの安全性評価: 経口投与したサブナノ銀の生体影響に関する基礎検討., 第 104 回日本食品衛生学会学術講演会., 岡山 (岡山), 2012 年 9 月.
15. 森 宣瑛, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 宇高麻子, 山口真奈美, 角田慎一,

鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 食品中ナノマテリアル/サブナノ素材の経口曝露における一般毒性および腸内細菌叢に及ぼす影響解析., 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 西宮 (兵庫), 2012 年 10 月.

16. 宇治美由紀, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 三里一貴, 宇高麻子, 森 宣瑛, 山口真奈美, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの腸管吸収性に関する基礎情報の収集., 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 西宮 (兵庫), 2012 年 10 月.
17. 三里一貴, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 宇高麻子, 森 宣瑛, 山口真奈美, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 東阪和馬, 堤 康央: 食品ナノ安全科学研究 ~食品中サブナノ素材の安全性評価に向けた腸管吸収性・体内分布の解析~, 日本薬学会第 133 年会., 横浜 (神奈川), 2013 年 3 月.
18. 森 宣瑛, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 宇高麻子, 山口真奈美, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 東阪和馬, 堤 康央: 腸内細菌叢に着目した食品中ナノマテリアルの安全性評価., 日本薬学会第 133 年会., 横浜 (神奈川), 2013 年 3 月.

#### 【国際学会発表: 合計 8 件】

1. Higashisaka K., Yoshioka Y., Nagano T., Kunieda A., Nagano K., Abe Y., Kamada 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.
  5. Uji M., Yoshioka Y., Yoshida T., Misato K., Udaka A., Mori T., Akase T., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Biological effect of sub-nano platinum following oral administration, The 6<sup>th</sup> International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012), Beijing (China), 4-7 September, 2012.
  6. Misato K., Yoshioka Y., Yoshida T., Uji M., Udaka A., Mori T., Akase T., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Safety evaluation of sublingually administered nanomaterials and sub-nanomaterials, The 6<sup>th</sup> International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012), Beijing (China), 4-7 September, 2012.
  7. Mori T., Yoshioka Y., Yoshida T., Uji M., Misato K., Udaka A., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Hazard identification of sub-nano silver particle following oral administration, The 6<sup>th</sup> International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012), Beijing (China), 4-7 September, 2012.
  8. Takahashi H., Yoshioka Y., Hirai T., Ichihashi K., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Size-dependent immune-modulating effect of amorphous nanosilica particles, The 6<sup>th</sup> International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012), Beijing (China), 4-7 September, 2012.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### ①特許取得（出願）

該当無し

##### ② 実用新案登録

該当無し

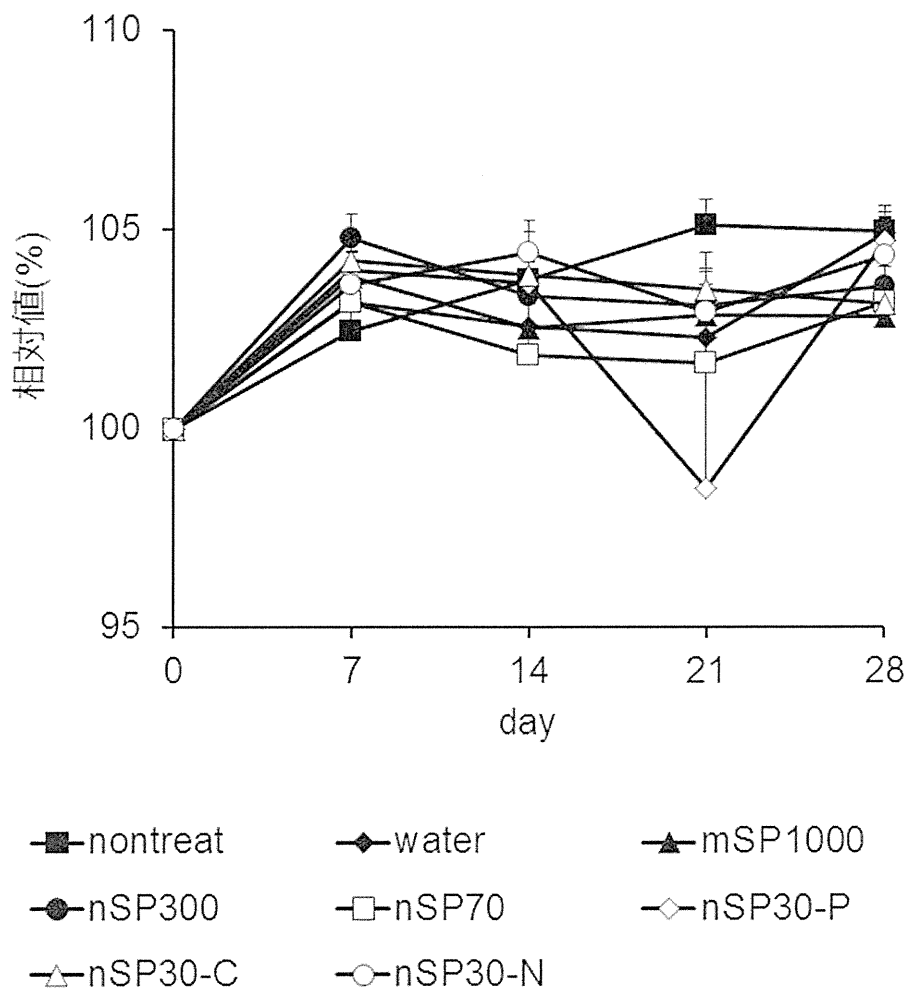


図 1. 各シリカを 28 日間経口投与中の体重変動. BALB/c マウスに超純水で 2.5 mg/mouse に調整したシリカ分散液を 100  $\mu$ l/mouse で 28 日間連続経口投与した。その間、体重を測定した。

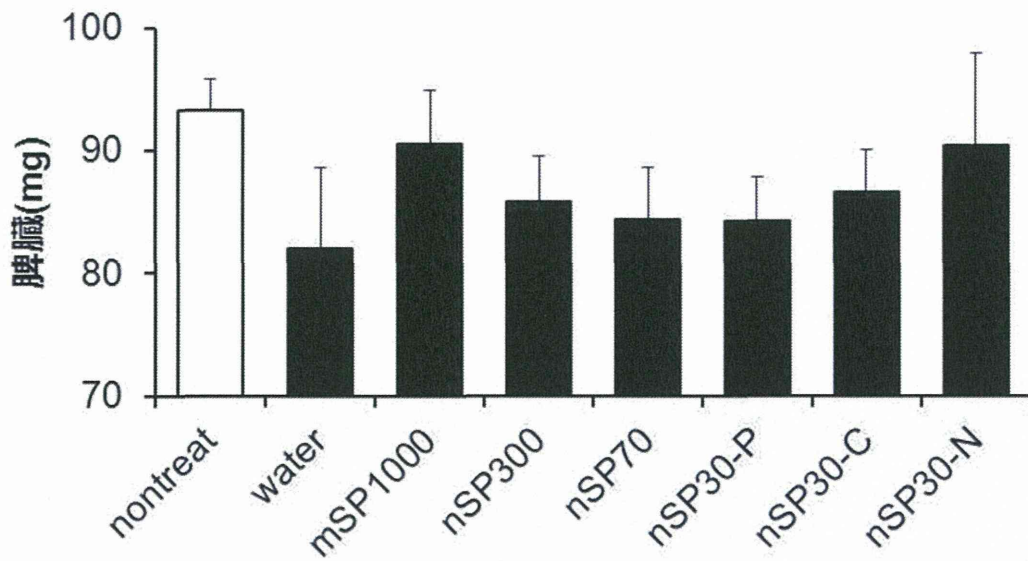


図 2. 各シリカを 28 日間経口投与後の臓器重量. BALB/c マウスに超純水で 2.5 mg/mouse に調整したシリカ分散液を 100  $\mu$ l/mouse で 28 日間連続経口投与した。その後、臓器重量を測定した。ここには、脾臓重量のみを記載した。



	non treat	mSP1000	nSP300	nSP70	nSP30-P	nSP30-C	nSP30-N
白血球 ( $10^2/\mu\text{L}$ )	15.9±2.2	14.5±2.0	19.6±1.9	20.6±1.6	13.8±1.4	20.0±4.4	17.5±4.1
リンパ球 ( $10^2/\mu\text{L}$ )	7.9±1.4	6.2±0.7	11.8±1.4	13.5±1.4	8.7±0.8	13.9±3.2	11.4±3.0
赤血球 ( $10^4/\mu\text{L}$ )	799±31	850±16	881±32	870±15	883±32	967±18 <sup>**</sup>	948±18 <sup>**</sup>
好酸球 ( $10^2/\mu\text{L}$ )	0.76±0.19	0.48±0.09	0.45±0.1	0.6±0.10	0.48±0.07	0.32±0.11	0.38±0.11
好中球 ( $10^2/\mu\text{L}$ )	5.4±0.9	6.5±1.9	5.3±0.4	4.5±0.5	3.3±0.3	3.7±01.7	4.0±0.6
単球 ( $10^2/\mu\text{L}$ )	1.8±0.4	1.3±0.2	2.0±0.4	2.0±0.1	1.3±0.3	2.0±0.5	1.7±0.4
血小板( $10^4/\mu\text{L}$ )	150±5.6	162±5.9	150±16.2	170±6.1	146±9.7	139±4	139±4.4
好中球(%)	34.6±4.6	42.6±5.8	27.8±1.9	22.0±2.0	24.3±1.0	20.3±2.8	26.9±4.7
好酸球(%)	4.7±0.9	3.5±0.6	2.3±0.4	2.9±0.4	3.5±0.5	1.7±0.5 <sup>*</sup>	2.8±1.0
リンパ球(%)	49.9±4.6	44.5±5.0	59.8±2.1	65.2±2.1	55.0±7.4	63.0±7.9	61.6±4.2
単球(%)	10.8±1.1	9.4±0.7	10.1±1.1	9.9±1.2	9.2±1.7	9.9±0.7	8.6±1.7

\* $P<0.05$  vs water

\*\* $P<0.01$  vs water

図 3. 各シリカを 28 日間経口投与後の血球変動. BALB/c マウスに超純水で 2.5 mg/mouse に調整したシリカ分散液を 100  $\mu\text{L}$ /mouse で 28 日間連続経口投与した。その後、血球検査を実施した。

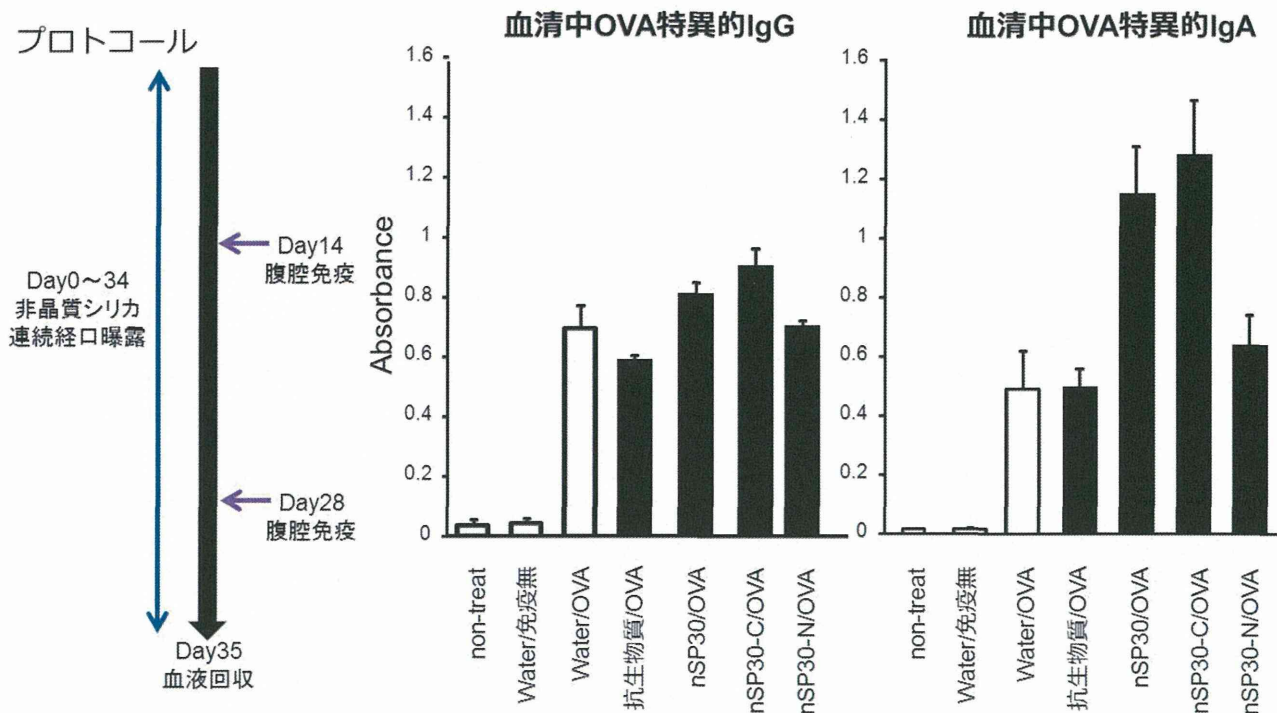


	non treat	water	mSP1000	nSP300	nSP70	nSP30-P	nSP30-C	nSP30-N
白血球 ( $10^2/\mu\text{L}$ )	19.3±1.8	25.8±1.3	17.9±1.4*	18.6±1.2	17.2±1.1*	24.8±1.2	39.1±2.7**	32.7±3.6
リンパ球 ( $10^2/\mu\text{L}$ )	14.7±0.9	9.8±1.1	9.6±0.8	9.5±0.6	8.8±0.7	11.4±0.8	23.4±1.7**	19.0±2.4**
赤血球 ( $10^4/\mu\text{L}$ )	880±19.0	877±22.4	887±15.0	889±15.7	877±13.8	897±12.7	887±15.9	951±29.4
好酸球 ( $10^2/\mu\text{L}$ )	1.2±0.3	0.8±0.2	0.9±0.1	1.2±0.2	1.1±0.1	1.6±0.3	1.2±0.1	1.3±0.2
好中球 ( $10^2/\mu\text{L}$ )	6.4±0.5	5.8±0.4	4.8±0.4	5.3±0.6	5.1±0.5	8.4±0.7*	9.3±0.6**	8.2±0.6*
単球 ( $10^2/\mu\text{L}$ )	2.9±0.3	3.5±0.3	2.5±0.3	2.3±0.2	2.3±0.2	3.5±0.3	5.2±0.5**	4.1±0.5
血小板 ( $10^4/\mu\text{L}$ )	117±7.2	111±9.2	126±3.0	104±9.2	121±7.6	132±6.1	127±4.9	121±10.3
好中球(%)	25.0±1.7	30.5±1.2	27.3±1.3	28.6±1.5	28.9±1.6	33.4±2.3	24.0±1.0*	26.2±1.4
好酸球(%)	4.7±1.2	4.1±0.9	5.4±0.6	6.8±1.3	6.6±0.6	6.5±1.7	3.2±0.4	3.9±0.4
リンパ球(%)	56.9±1.9*	50.0±1.8	53.6±0.9	52.2±1.7	50.9±1.8	45.9±1.9	59.6±0.9**	56.9±1.4*
単球(%)	13.3±1.0	15.8±0.9	13.7±0.7	12.4±0.5	13.5±1.1	14.0±0.7	13.2±0.7	13.0±0.8

\* $P < 0.05$  vs water

\*\* $P < 0.01$  vs water

図 4. 各シリカを 28 日間経口投与した後、28 日後の血球変動。BALB/c マウスに超純水で 2.5 mg/mouse に調整したシリカ分散液を 100  $\mu\text{L}/\text{mouse}$  で 28 日間連続経口投与した。シリカの投与を中断し、28 日間飼育した後血液検査を実施した。



**図 5. 各シリカの免疫機能に与える影響.** 各シリカを 35 日間連続経口投与した。その投与期間中、14 日目、28 日目に、モデル抗原であるニワトリ卵白アルブミン (OVA) を免疫活性化剤である水酸化アルミニウムゲルと共に、腹腔内に投与した。その後、シリカの経口投与が終了した 35 日目に、血清中の OVA 特異的抗体価を ELISA で測定した。

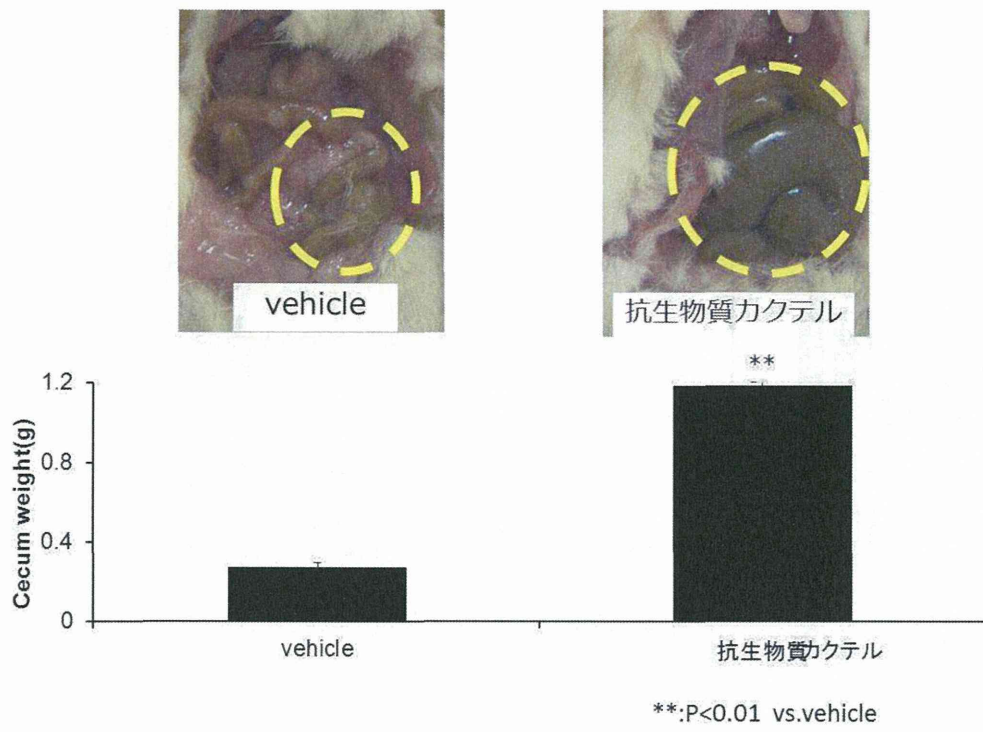


図 6. 抗生物質カクテル投与による腸内細菌除去効果の検証



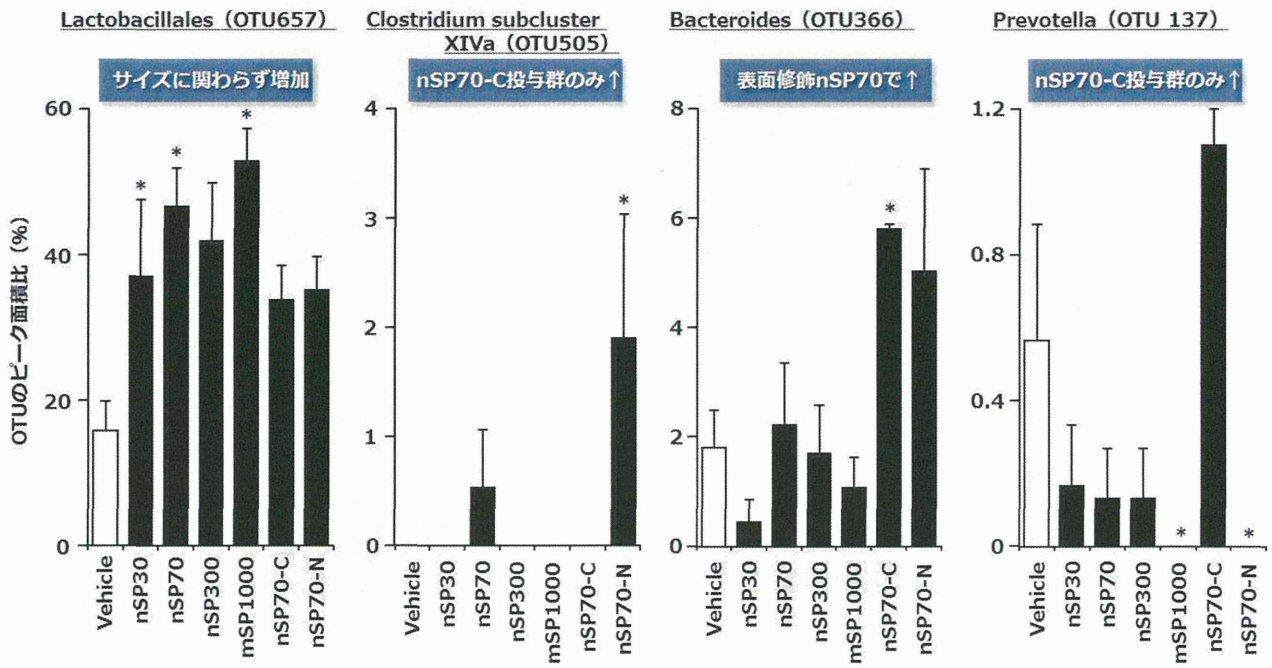


図7. シリカによる腸内細菌変動. Balb/c マウスに各シリカ粒子を28日間連続経口投与した後、糞を用いて、RFLP法により腸内細菌叢を評価した。