

食品関連製品に含有されるナノ素材の経口動態・ハザード情報の集積と、新規物性・品質解析手法に関する研究

研究代表者 東阪和馬 大阪大学大学院医学系研究科 法医学教室

研究要旨

近年、食と健康に関する研究の進展により、健康の維持・増進や生活習慣病の予防に役立つ新たな素材や成分が次々と開発されている。一方で、健康への関心の高まりも相俟って、食品に使用される新素材・新成分について、その安全性の確保が喫緊の課題となっている。このような背景のもと、昨今、ナノ素材（粒子径 100 nm 以下）をはじめとした、21 世紀テクノロジーを活用した新素材の利用が食品業界においても急速に進行している。例えば、ナノ素材の代表例であるナノ銀・ナノ白金は、強い抗酸化作用や抗菌活性など、特有の性能を有し、食品関連製品（サプリメント・食品添加物・食品用容器包装等）に幅広く実用化されている。しかし、ナノ素材の安全性評価は未だ緒に付いたばかりであり、実際の曝露実態を加味した投与量・経路での体内動態を追求し、リスクを解明しようとする研究は少ないのが現状である。当然、食品関連製品に含有されるナノ素材においても、経口摂取時のハザード情報すら少ないうえ、その動態情報、とりわけ、蓄積性や排泄性に関しては殆ど理解されていないため、世界的に観ても、リスク解析の必要性を検証することすらできていない。さらに、ナノ素材の動態特性とその後の安全性を運命付ける、存在様式（粒子径・分散/凝集状態等）を分析・理解するための解析手法も確立されていない。そこで本研究では、種々物性の食品関連製品に含有されるナノ素材（ナノ銀・ナノ白金等）を用い、(1) 食品関連製品に含有されるナノ素材の経口動態・ハザード情報の収集を図ると共に、(2) これまでに研究代表者らが先行して実施してきた、既存のナノ素材の定量法を応用・改変することで、ナノ素材の経口曝露後の存在様式を解析するための手法開発を目指す。本観点から、平成 28 年度研究では、当初研究計画に沿って、①ナノ白金粒子が腸管バリアを通過し、体内に吸収され得ること、②単回経口曝露による一般毒性において、血球成分、および生化学マーカーに有意な変動は認められないことを示した。また、③ナノ銀粒子、ナノ白金粒子を対象に、血液中での各粒子の存在量と存在様式を同時に評価し得る基盤技術を構築するなど、当初予定通りの成果が得られている。そこで平成 29 年度研究では、当初研究計画に沿って、①ナノ白金粒子を経口曝露した際の動態解析を進め、特に、曝露後の組織分布について評価し、また、②反復投与による一般毒性に関するハザード同定を実施した。さらに、③前年度までに構築した、技術基盤を用いることで、ナノ銀粒子を曝露後の血液における存在量・存在様式について解析を試みた。本研究成果は将来的に、食品関連製品に含有されるナノ素材のリスク解析・評価の必要性に関する科学的根拠を提供し、安心して豊かな食生活環境の構築に貢献できると期待される。

A. 研究目的

近年、食と健康に関する研究の進展により、健康の維持・増進や生活習慣病の予防に役立つ新たな素材や成分が次々と開発されている。一方で、食品汚染による深刻な健康被害が問題視され、食の安全・安心に対する希求は増すばかりである。

従って、健康立国・技術立国である我が国から発信される食品関連製品については、高度に安全性が保障されたものでなければならない。このような背景のもと、ナノ素材（粒子径 100 nm 以下）をはじめとした、21 世紀テクノロジーを活用した新素材の利用（サプリメント・食品添加物・食品

用容器包装等)が食品業界においても急速に進行している。しかし、ナノ素材特有の機能が、二面性を呈し、予想外の部位で未知の生体影響を発現する可能性が指摘されつつあるものの、NMの安全性評価研究は、世界的にみても不十分かつ科学的根拠に乏しいのが現状である。即ち、ナノ素材は我々の生活の質を飛躍的に向上し得ることから、科学的根拠に基づいたナノ素材のリスク解析に資する安全性情報を幅広く収集し、これら情報を基盤として、ナノ素材の安全性の理解と確保が重要な課題であると考えられる。そこで本研究では、食品関連製品に含有される種々物性のナノ素材(ナノ銀・ナノ白金)を用い、リスク解析に必須の情報である、ナノ素材の経口動態(蓄積性や排泄性を含む)・ハザード情報の収集を推進すると共に、NMの動態特性とその後の安全性を運命付ける、NMの存在量・存在様式(粒子径・分散/凝集状態など)を分析するための解析手法の構築を試みることで、ナノ素材の経口曝露後の物性・品質-生体内動態-ハザードとの関連解析を図るものである。

B. 研究方法

1. ナノ素材

ナノ白金粒子、ナノ銀粒子は、nano Composix社より購入した。白金粒子は、表面をクエン酸修飾した、粒子径が5 nm (nPt5)、30 nm (nPt30)、70 nm (nPt70)のものを使用した。銀粒子は、表面をクエン酸修飾した、粒子径が100 nm (nAg100)のものを使用した。さらに、銀粒子分散液に含まれる銀イオンの影響を加味するため、銀イオンとして、硝酸銀を用いた。なお、以後の検討では、使用直前に粒子分散液を1分間ボルテックスミキサーで攪拌した。

2. ナノ白金粒子の経口投与後の体内分布

雄性 BALB/c マウス (8 週齢) に、nPt5、nPt30、nPt70 (10 mg Pt/kg) を単回経口投与し、投与 24 時間後に脱血した各種臓器(脳、肺、心臓、肝臓、

脾臓、腎臓、精巣)を回収した。各種臓器に4 mLの硝酸と4 mLの過酸化水素水と0.4 mLの塩酸を加え、その後、マイクロウェーブ分解(Milestone Ethos 1)によりサンプルを均一な溶液とした。これを純水にて40 mLに希釈し、約10%程度の希硝酸溶液とした。マイクロウェーブ処理した溶液中の白金量は、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)により血中Pt濃度を測定した。

3. ICP-MS による測定

白金、および銀量は ICP-MS 装置 (Agilent 7700 Series ICP-MS) を用いて測定した。分析条件は、RF パワー: 1500 W、キャリアガス: アルゴン 1.05 L/min、とし、測定質量数は 107Ag、195Pt、103Rh、205Tl とした。各検体には、内標準として 103Rh (107Ag に対する内標準)、205Tl (195Pt に対する内標準) を 2 ng/mL となるように添加し、ICP-MS による測定に供した。また、6~10 点の既知濃度の白金、あるいは銀溶液を作成し、検量線溶液として用いた。定量下限以下の値となった検体は濃度を 0 ng/mL とした。

4. ICP-MS に供す検体の調製

白金投与群の血液は希釈液 (70 mM アンモニア、1 μ M エチレンジアミン四酢酸、0.007% Triton X-100) にて 100 倍以上希釈し、検体とした。調製した各検体について、0.01 ng/mL を定量下限値として白金濃度を ICP-MS により定量した。

5. 血液の回収

雄性 BALB/c マウス (8 週齢) に、nPt5 (0.25, 1, 4 mg Pt/kg) を 39 日間、週 2 回尾静脈内投与した。最終投与 24 時間後、イソフルラン麻酔下で、ヘパリンを含ませたシリンジおよび 26 G の注射針を用い、心臓より採血を行った。ヘパリンは全て saline を用いて 500 U/mL に調製した。ヘパリンを用いて採血した血液を全血として血球検査に用い、残りを 3000 g で 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。

6. 血球検査

ナノ白金粒子 (nPt5)、または saline を尾静脈内投与したマウスから全血を回収し、多項目自動血球計測装置 XT-2000i を用いて、血中の白血球数、赤血球数、血小板数を蛍光フローサイトメトリー法により測定した。

7. ナノ素材として使用されている元素の ICP-MS における定量下限に関する検討

ナノ素材として使用されている構成元素である Al、Si、Ti、Ni、Cu、Zn、Ag、Ce、Pt、Au の 10 種類の元素種について、ICP-MS における定量下限を明らかにするため、ブランク試料を流した際に生じる信号強度を測定した。それぞれの m/z 値に対するブランク cps の値は ICP-MS 装置 (Agilent 7700 Series ICP-MS) を用いて測定した。また、分析条件は、RF パワー：1500 W、キャリアガス：アルゴン 1.05 L/min とした。

8. ICP-MS によるナノ銀粒子の血液中での存在量・存在様式の解析

BALB/c マウス (リタイア) に、nAg100 (1.5 mg Ag/kg)、または saline を尾静脈内投与し、投与 24 時間後に、それぞれ血液を回収した。回収した血液に対し、生体試料の可溶化に利用されているテトラメチルアンモニウムと 1:1 で混和し、その後、試料中の銀濃度が 50 pg/mL となるよう超純水で希釈し、ICP-MS の時間分析モード (積分時間 10 ms, 分析時間 30 sec) にて、粒子径、粒子濃度、イオン濃度をそれぞれ測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を避け得ないが、動物愛護の精神を遵守しつつ行うものである。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等の各所属機関の動物実験規程に則り行う。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る (関連研究は既に承認を受けている)。なお、研究に係る利益相反に関して、所属機関の COI (利益相反) 委員会で審査を受けている。さらに本研究では、ナノ素材を活用するが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月に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、研究を推進するものである。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. ナノ白金粒子の経口動態、およびハザード情報の収集

ナノ白金粒子は、食品・化粧品に適用されているにも関わらず、安全に利用するための情報が不足しており、その知見収集が喫緊の課題となっている。そこで本研究では、表面がクエン酸修飾された粒子径 5、30、70 nm のナノ白金粒子 (それぞれ nPt5、nPt30、nPt70) を用い、経口曝露後のナノ白金粒子の生体内分布を評価した。平成 28 年度研究において、本検討に用いたナノ白金粒子が、経口投与後、体内に吸収されることを既に明らかにしている。そこで、雄性 BALB/c マウス (8 週齢) に nPt5、nPt30、nPt70 を 10 mg/kg で単回経口投与し、24 時間後に脱血した各種臓器 (脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣) を回収し、

含有される白金量を ICP-MS により定量解析した。その結果、本投与条件下では、脳、脾臓、精巣では白金は検出されなかった。一方で、心臓、肺、肝臓、腎臓から白金が検出され、とりわけ肝臓、腎臓においては、粒子径が小さいほど、移行しやすい傾向を示すことを明らかとした (Figure 1)。

また、前年度の経口投与後の吸収性に関する検討で、3 つの粒子のうち、最も移行率の高かった nPt5 を用い、尾静脈内投与による連日投与後のハザード同定を実施した。雄性 BALB/c マウス (8 週齢) に、予め、マウス血清アルブミンでコーティングした nPt5 を 0.25, 1, 4 mg/kg で 39 日間、週 2 回尾静脈内投与し、最終投与から 24 時間後において臓器および血液を回収し、一般毒性的観点から、臓器重量測定および血球検査を実施した。この時、血中に含まれる白金量を ICP-MS により定量解析したところ、血中から白金が検出され、投与濃度依存的に血中白金量が多くなることを確認している。また、saline 投与群と比較し、nPt5 投与群で体重の減少傾向が認められたが、投与量依存性は認められず、顕著な変化ではないと考えている (data not shown)。臓器重量測定の結果、各種臓器において有意な変化は確認されず (Figure 2)、また、血球検査に関しても、対照群と比較し、いずれの粒子投与群においても各種血球細胞数 (白血球、赤血球、血小板) に有意な変動は認められなかった (Figure 3)。従って、今後より詳細な解析は必要であるものの、本投与条件においては、ナノ白金粒子の静脈内投与による臓器重量、血液成分への影響は殆ど認められないことが示唆された。

従って、ナノ白金粒子は、単回経口曝露により腸管吸収された後、肝臓、腎臓といった主要組織に分布することが明らかとなり、今後、反復経口曝露後の移行性や蓄積性を含めた、より詳細な曝露実態情報の収集と共に、各臓器に焦点をあてたハザード情報を収集していくことが不可欠である。

2. ナノ素材の存在様式を解析するための手法開発に関する基礎的検討

血液・臓器中での各粒子の存在量と存在様式を同時に評価し得る基盤技術 (ICP-MS の時間分析モードによる単一粒子 ICP-MS 法) の構築に向けて、汎用されているナノ素材の構成元素である Al、Si、Ti、Ni、Cu、Zn、Ag、Ce、Pt、Au の 10 種類の元素種について、ICP-MS における定量下限を明らかにするため、ブランク試料を流した際に生じる信号強度を測定した。なお、この際、生体試料の前処理の際に用いた水酸化ナトリウム、TMAH (アルカリ)、硝酸、塩酸 (酸) の各試薬と混合した試料においても測定を実施することで、信号強度の変動を確認した。なお、青色のプロットがブランクの平均 cps を示し、赤色のプロットが定量下限の cps を示している。また、定量下限の設定は、ブランク試料を 10 回繰り返し測定した際の標準偏差の $14.1(10\sqrt{2})$ 倍の cps を参照した (JIS K0133)。その結果、今回検討を行ったいずれの元素においても、アルカリより酸の方が定量下限値を低く設定することができた (Figure 4)。そこで今後は、信号強度ではなく濃度基準での定量下限の設定を試みると共に、血中夾雑物の影響の検討を行い、より精細な定量下限の設定を進める予定である。

また、実際に生体内に投与されたナノ素材の測定において、本基盤技術が利用可能であるかを評価した。BALB/c マウスに nAg100 を 1.5 mg/kg にて静脈内に投与し、24 時間後において採血した後、血中における銀の存在量と存在様式を解析した。その結果、nAg100 投与群では血中銀濃度が 354 ng/mL を示した。仮に、350ng/mL の銀が全て粒子として存在していると仮定した場合、今回の sp-ICP-MS による分析と同条件で測定したとしても、およそ 110 粒子が検出される計算となるが、実際に検出されたのは、およそ 5 粒子であり、nAg100 の投与 24 時間におけるマウス血中での銀粒子の割合は、重量ベースでは 1 パーセントに満たない程度であることが示された (Figure 5)。

従って、今後より詳細に解析を進めていく必要はあるが、nAg100 は投与 24 時間後のマウス血中では、粒子としてではなく、イオンとして殆どのもので存在していることが示唆された。本技術基盤を適用することで、経口曝露後の NM の曝露実態（生体内での存在量と存在様式）を踏まえた、曝露後のハザード発現に対する理解、評価が、NM のリスク解析に資する重要な知見につながるものと期待する。

E. 結論

近年、食品汚染による深刻な健康被害が問題視され、国民の「食の安全・安心」に対する希求は増すばかりである。従って、健康立国・技術立国である我が国から発信される食品関連製品については、高度に安全性が保障されたものでなければならない。しかし現状では、食品関連製品に含有される NM について、品質を評価・管理し、安全に製造・使用していくための規制は整備されていない。この点で、本研究で得られる、NM の経口動態・ハザード情報は、今後のリスク解析の是非を議論するうえで重要な知見となり得るものである。さらに、NM の動態特性とその後の安全性を運命付ける、NM の粒子径・分散/凝集状態等といった、物性・品質の解析を可能にする評価基盤の構築は、安全性を高度に担保可能な物性・品質を見出すことにつながると共に、食品関連製品に含有される NM の品質評価・確保、安全性評価手法などに関するレギュレーション策定に資する情報を提供し得るものと考えている。即ち、本研究成果は将来的に、食品全般に含有される NM の社会受容や恩恵享受を促進し、新技術を活用した安全で豊かな食社会の構築に貢献するものである。さらに、市民講座などでのリスクコミュニケーションにより、行政機関や食品事業者は勿論のこと、一般社会を対象とした、NM の安全・安心の確保、納得にもつながることが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

1. Nishijima N., Hirai T., Misato K., Aoyama M., Kuroda E., Ishii K., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Human scavenger receptor A1-mediated inflammatory response to silica particle exposure is size-specific., *Front. Immunol.*, 8: 379, 2017.
2. Aoyama M., Yoshioka Y., Arai Y., Hirai H., Ishimoto R., Nagano K., Higashisaka K., Nagai T., Tsutsumi Y. : Intracellular trafficking of particles inside endosomal vesicles is regulated by particle size., *J. Controlled Release.*, 260: 183-93, 2017.
3. Nagano T., Nagano K., Nabeshi H., Yoshida T., Kamada H., Tsunoda S., Gao JQ., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Modifying the surface of silica nanoparticles with amino or carboxyl groups decreases their cytotoxicity to parenchymal hepatocytes., *Biol. Pharm. Bull.*, 40(5): 726-8, 2017.
4. Kuwagata M., Kumagai F., Saito Y., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Permeability of skin to silver nanoparticles after epidermal skin barrier disruption in rats., *Fund. Toxicol. Sci.*, 4(3): 109-19, 2017.

【総説・その他】

1. 東阪和馬、長野一也、堤 康央 : DOHaD 仮説に基づいたナノマテリアルの生殖発生毒性。産科と婦人科。84(10): 71-6, 2017.
2. 衛藤舜一、東阪和馬、長野一也、堤 康央 : 皮膚細胞を用いた化粧品中ナノマテリアルの安全性評価。Fragrance Journal. 45(7):

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 1 件】

1. 東阪和馬、長野一也、松本博志、堤 康央：
食品関連製品に含まれるナノ素材の安全性
評価～ナノ安全科学研究からナノ最適デザ
イン研究へ～.，第 34 回日本毒性病理学会.，
那覇（沖縄），2018 年 1 月。（シンポジウム：
ナノ化学物質の安全性評価と展望）

【国内学会発表：合計 9 件】

1. 東阪和馬，真木彩花，青山道彦，桑形麻樹
子，齋藤 滋，吉岡靖雄，長野一也，堤
康央：銀ナノ粒子曝露が DNA メチル化へおよ
ぼす影響解析.，第 44 回日本毒性学会学術年
会.，横浜（神奈川），2017 年 7 月.
2. 石坂拓也，長野一也，田崎一慶，陶 紅，
泉 雅大，岡田桃子，飛島 匠，原田和生，
平田收正，浜崎 景，稲寺秀邦，齋藤 滋，
東阪和馬，堤 康央：単一粒子 ICP-MS 法に
よる血中銀ナノ粒子の存在量・様式の同時解
析の最適化.，日本薬学会第 138 年会.，金沢
（石川），2018 年 3 月.
3. 泉 雅大，長野一也，飛島 匠，岡田桃子，
石坂拓也，原田和生，平田收正，浜崎 景，
稲寺秀邦，齋藤 滋，東阪和馬，堤 康
央：粒子径の異なるナノ白金曝露による生殖
組織への移行性と局在の評価.，日本薬学会
第 138 年会.，金沢（石川），2018 年 3 月.
4. 衛藤舜一，東阪和馬，佐藤建太，越田 葵，
長野一也，堤 康央：非晶質ナノシリカの事
前投与による肝障害の増悪に関わる因子の
同定に向けた検討.，日本薬学会第 138 年会.，
金沢（石川），2018 年 3 月.
5. 笠原淳平，東阪和馬，大須賀絵理，豊田麻
人，長野一也，堤 康央：ナノ銀粒子曝露に
よる神経細胞でのアミロイドβ発現増加と
その誘導機序解明.，日本薬学会第 138 年会.，

金沢（石川），2018 年 3 月.

6. 岡田桃子，長野一也，泉 雅大，飛島 匠，
石坂拓也，田崎一慶，原田和生，平田收正，
浜崎 景，稲寺秀邦，齋藤 滋，東阪和馬，
堤 康央：ナノ白金曝露によるテストステロ
ン産生量に与える影響評価.，日本薬学会第
138 年会.，金沢（石川），2018 年 3 月.
7. 越田 葵，東阪和馬，衛藤舜一，佐藤建太，
長野一也，堤 康央：複数回の経口曝露に着
目した非晶質ナノシリカの経口免疫寛容へ
の影響評価.，日本薬学会第 138 年会.，金沢
（石川），2018 年 3 月.
8. 田崎一慶，長野一也，石坂拓也，泉 雅大，
岡田桃子，飛島 匠，原田和生，平田收正，
浜崎 景，稲寺秀邦，齋藤 滋，東阪和馬，
堤 康央：生体内に吸収された血中ナノマテ
リアルの存在量と様式の解析.，日本薬学会
第 138 年会.，金沢（石川），2018 年 3 月.
9. 飛島 匠，長野一也，泉 雅大，岡田桃子，
石坂拓也，田崎一慶，原田和生，平田收正，
浜崎 景，稲寺秀邦，齋藤 滋，東阪和馬，
堤 康央：ナノ白金粒子の細胞外への排出に
おけるエキソソームの関与.，日本薬学会第
138 年会.，金沢（石川），2018 年 3 月.

【国際学会発表：合計 1 件】

1. Nagano K., Izumi M., Higashisaka K.,
Tsutsumi Y. : Bioabsorption and
biodistribution analysis of platinum
nanoparticles with various sizes.,
Shimadzu Global Innovation Summit 2017,
Kyoto (Japan), 4-5 July, 2017.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当無し

② 実用新案登録

該当無し

その他

該当無し

研究協力者

大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野（職員1名・大学院生/学部生5名）：橋野修代、清水雄貴、石坂拓也、泉 雅大、衛藤舜一、笠原淳平、岡田桃子、田崎一慶

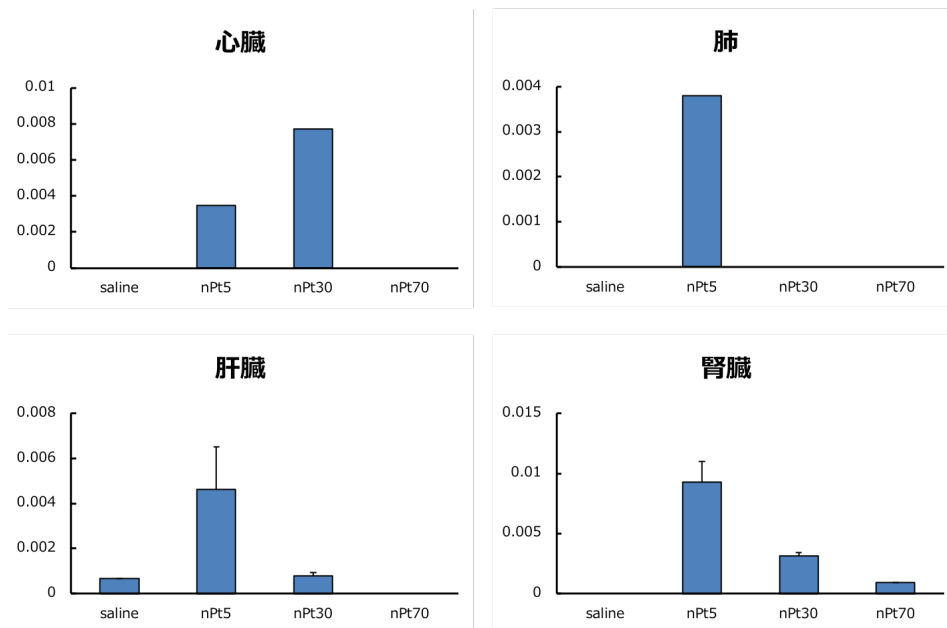


Figure 1 ナノ白金粒子の生体内分布. 経口曝露後のナノ白金粒子の体内分布を評価する目的で、マウスにnPt5、nPt30、nPt70を10 mg/kgで単回経口投与した。投与後、24時間における臓器中白金量を誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により定量解析した (解析結果 : ng/mL)。

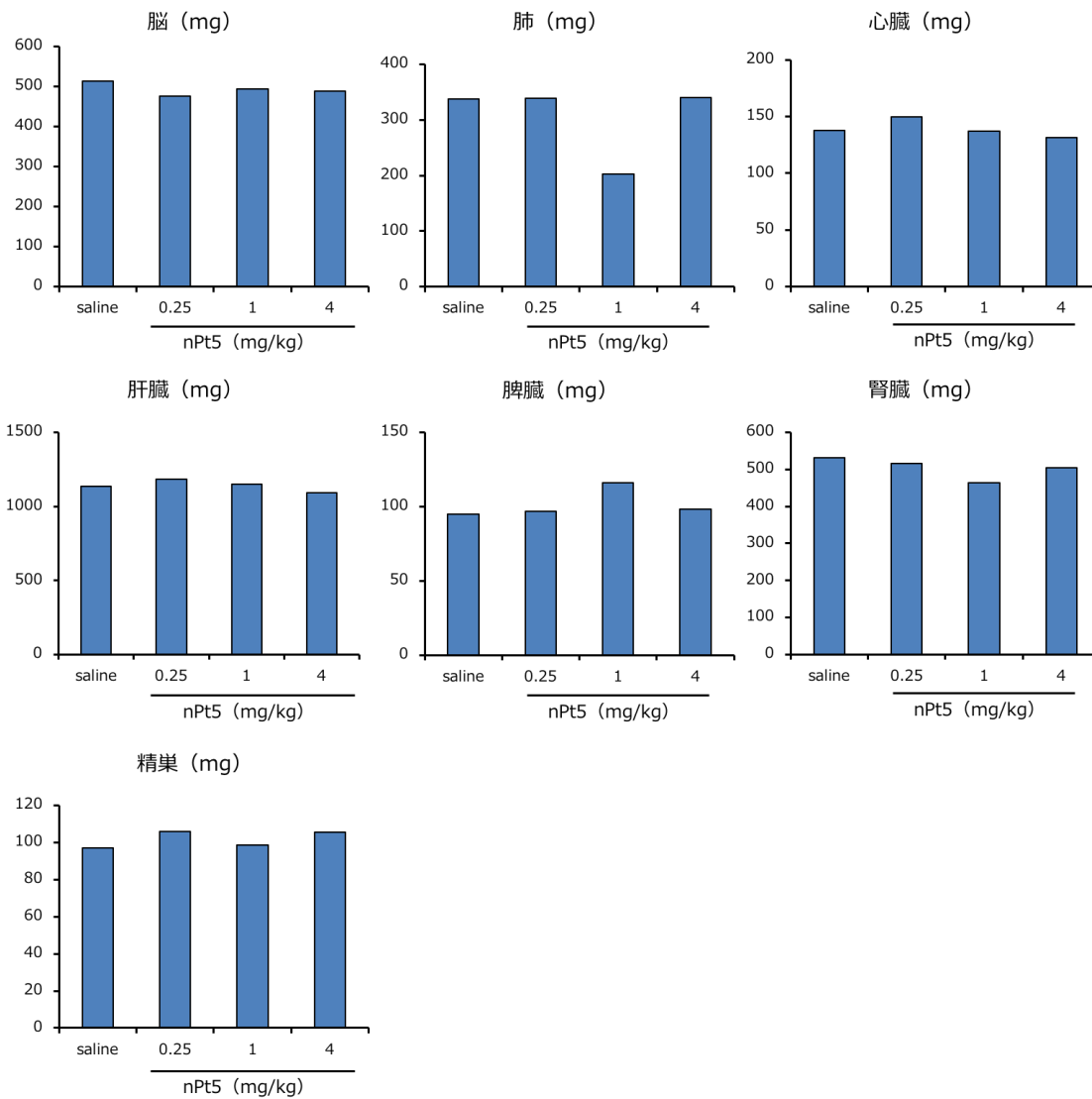


Figure 2 ナノ白金粒子の複数回尾静脈投与による臓器重量への影響. マウスに、nPt5 (0.25、1、4 mg Pt/kg) を39日間、週2回尾静脈内投与し、最終投与24時間後に、脱血した各種臓器 (脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣) を回収した。

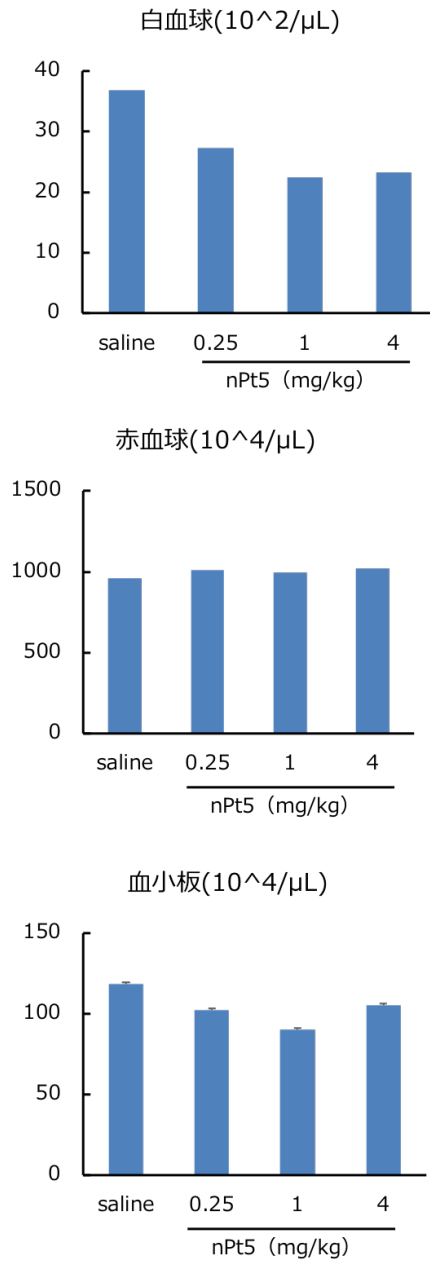


Figure 3 ナノ白金粒子の複数回尾静脈投与による血球細胞数への影響. マウスに、nPt5 (0.25、1、4 mg Pt/kg) を39日間、週2回尾静脈内投与し、最終投与24時間後に全血を回収し、白血球数、赤血球数、血小板数を測定した。

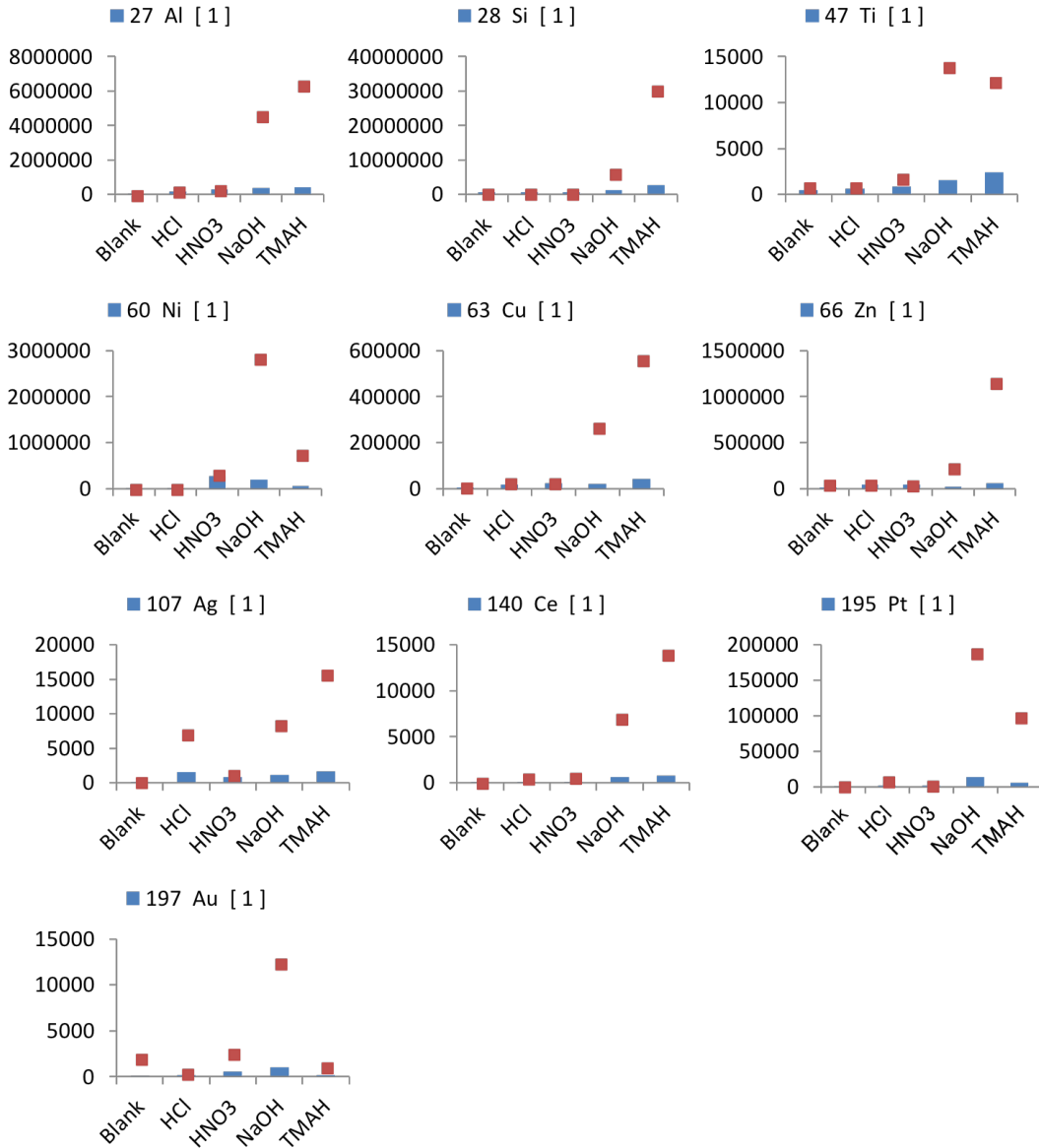


Figure 4 各種元素のICP-MSにおける定量下限に関する検討. 汎用されているナノ素材の構成元素であるAl、Si、Ti、Ni、Cu、Zn、Ag、Ce、Pt、Au の10種類の元素種について、ICP-MSにおける定量下限を明らかにするため、ブランク試料を流した際に生じる信号強度を測定した。

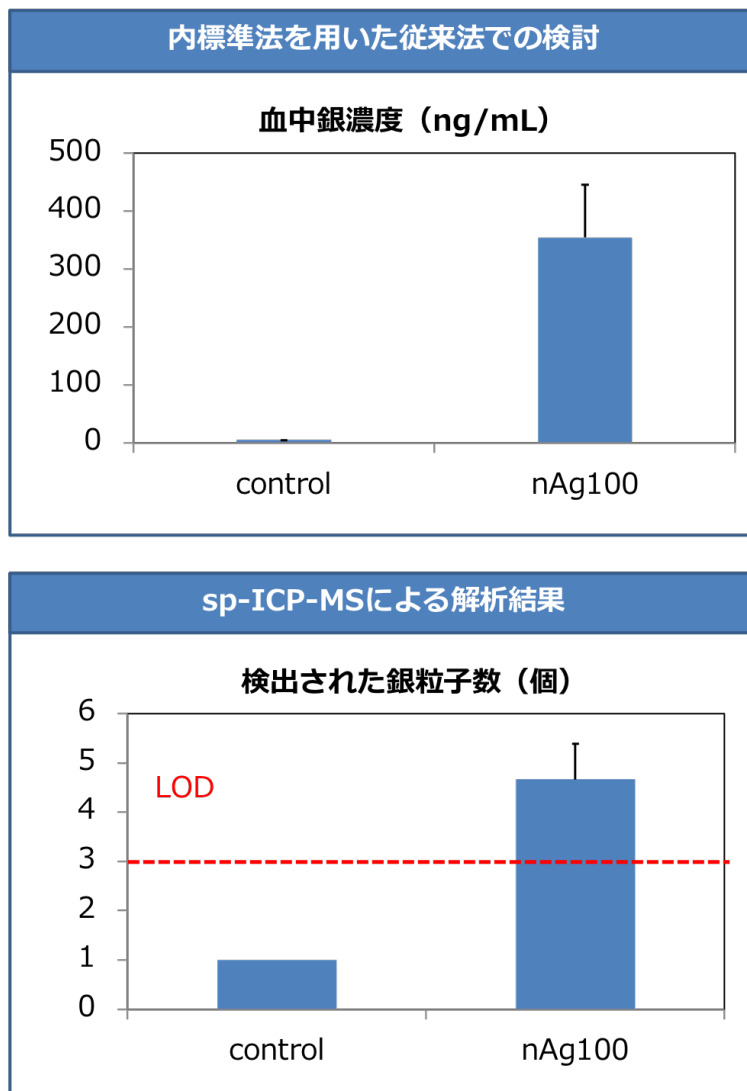


Figure 5 ナノ銀粒子の血中における存在様式の解析. 静脈内投与後の血中における、ナノ銀粒子の存在様式（粒子/イオン）を評価する目的で、マウスにnAg100を1.5 mg/kgで単回静脈内投与した。投与24時間後における血中銀量、および銀粒子数を解析した。