

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試みた。

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、ナノ素材の動態特性とその後の安全性を運命付ける、ナノ素材の存在量・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-ハザードとの連関解析を

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、銀粒子分散液中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. ナノ白金粒子の腸管吸収性

雄性 BALB/c マウス (8 週齢) に、nPt5、nPt30、nPt70 (10 mg Pt/kg) を経口投与した。投与 0、0.5、1、2、4、8、24 時間後に血液を回収し、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. 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) を単回経口投与した。あるいは、雄性 BALB/c マウス (8 週齢) に、nPt5 (4、1、0.25 mg Pt/kg) を尾静脈内投与した。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。

4. 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。

5. 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、各粒子、または saline を投与し、最終投与 24 時間後に、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

各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、リンパ球数、単球数、顆粒球 (好中球、好酸球、好塩基球) 数を蛍光フローサイトメトリー法により測定した。

7. 血液生化学検査

各マウスから血漿を回収し、血漿中の Alanine aminotransferase (ALT : 肝障害マーカー)、Aspartate aminotransferase (AST : 肝障害マーカー)、Cholinesterase (CHE : 肝障害マーカー)、

Blood urea nitrogen (BUN：腎障害マーカー)、Amylase (AMYL：膵障害マーカー)、Leucine aminopeptidase (LAP：胆障害マーカー) を比色法にて測定した。生化学自動分析装置 FUJI DRI-CHEM 4000 を用いて測定した。

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

マウスより採取した血液に nAg50、nAg70、nAg100 を添加し、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 で混和した。また、マウスに投与した際の、ナノ銀粒子の存在様式を解析する目的で、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。

9. 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。

(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、まずは経口曝露後のナノ白金粒子の吸収性を評価した。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、投与 0、0.5、1、2、4、8、24 時間後に採血し、血中に含まれる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。その結果、単回経口曝露したナノ白金粒子が、いずれも腸管バリアを通過し、体

内に吸収され得ること、その移行量の増加は、投与後8時間がピークであることが明らかとなった (Figure 1)。また、ピーク時における、投与量に対する白金の血中への移行率を算出したところ、nPt5、nPt30、nPt70 でそれぞれ $2.0 \times 10^{-3}\%$ 、 $0.61 \times 10^{-3}\%$ 、 $0.23 \times 10^{-3}\%$ であった。従って、ナノ白金粒子の粒子径が小さいほど、血中移行率が上昇することが示された。さらに、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、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 2)。

そこで、血中移行後のナノ白金粒子の動態を明らかにするため、静脈内投与後の組織分布を評価した。なお、本検討では、経口曝露での検討で3つの粒子のうち、最も移行率の高かった nPt5 を用いて解析した。予め、マウス血清アルブミンでコーティングした nPt5 を、雄性 BALB/c マウスに 0.25、1、4 mg/kg で単回尾静脈内投与し、投与24時間後において、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、回収したいずれの臓器においても白金が検出され、その移行量は用量依存的に増加することが示された (Figure 3)。また、投与量に対する白金の臓器への移行率を算出したところ、肝臓への移行率が最も高く、ついで脾臓への移行率が高くなることが明らかとなった (Figure 4)。以上の結果は、他のナノ素材の体内動態に関する報告と同様、その多くが肝臓や脾臓に分布することを示す知見であると共に、体内吸収されたナノ白金粒子が、全身分布することを示唆するものである。従って、ナノ白金粒子の安全性評価においては、投与局所である消化管だけでなく全身組織をも対象としたハザード同定の必要性を示している。

そこで、ナノ白金粒子曝露によるハザード同定を目的に、雄性 BALB/c マウスに nPt5、nPt30、nPt70 を 10 mg/kg で単回経口投与し、24時間後において採血し、一般毒性学的観点から、血球検査、および血液生化学検査を実施した。なお、この時、各粒子を投与した前後でマウスの体重に有意な変化が認められないことを確認している (data not shown)。血球検査の結果、いずれの粒子投与群においても、対照群と比較し、各種血球細胞数 (白血球、赤血球、血小板、リンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球) に有意な変動は認められなかった (Figure 5)。また、血液生化学検査の結果、血中肝障害マーカー (ALT、AST、CHE)、腎障害マーカー (BUN)、膵障害マーカー (AMYL)、胆障害マーカー (LAP) 量に群間で有意な変動は認められなかった (Figure 6)。従って、本投与条件においては、ナノ白金粒子の経口曝露による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。

また、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、一般毒性学的観点から、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 7)、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 8)。従って、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、ナノ銀粒子を対象に、マウス血液への粒子への添加実験を試みることで、基礎情報の収集を図った。まず、生体試料中においてナノ素材の存在様式（粒子径、粒子濃度、イオン濃度）が解析できるかを検証する目的で、マウスより採取した血液に表面がクエン酸修飾された粒子径 50、70、100 nm のナノ銀粒子（それぞれ nAg50、nAg70、nAg100）を添加し、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（TMAH）と 1:1 で混和した後、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）にてそれぞれ測定した。得られたデータより、RIKILT の配布する single particle calculation tool シートを利用することで、マウス血液中におけるナノ銀粒子の粒子径、粒子濃度、イオン濃度をそれぞれ算出した。その結果、各粒子について、平均粒子径は 52.6 nm、73.7 nm、105.1 nm、粒子濃度は 60.4 pg/mL、61.5 pg/mL、51.8 pg/mL、イオン濃度はいずれも検出限界以下となることが示され、現在保有の機器の検出感度においては、ナノ銀粒子は粒子径 50 nm から 100 nm において粒度分布を得ることができ、平均粒子径と粒子濃度を同時に測定できることを示した（Figure 9）。また、TMAH 処置により、血中夾雑物の影響を受けず、量的には添加量相当、かつ質的には添加粒径にほぼ等しい銀ナノ粒子

を検出することができることが示された。これにより、更なる検討は必要であるものの、血中に存在するナノ銀粒子は短時間では凝集せず、投与された単粒子の形状で存在することが示唆された。

また、体液のみならず組織中での存在様式の解析を可能とするために、組織前処理法の最適化を図った。PBS にて 10% (w/w) にホモジネートしたマウス肝臓に対して、銀粒子を 200 ng/mL で添加した後、試料に水酸化ナトリウム、TMAH、硝酸、塩酸、proteinase K の各溶液をそれぞれ 1:1 の割合で混和し、夾雑物の分解を試みた。この際、proteinase K を除く 3 つの試薬については、37°C と 70°C にて、proteinase K については 37°C にて、それぞれ 3 時間作用させた。また、臓器の溶解の目安として、100 g の条件にて 10 分遠心して得られた沈殿を残渣として計量した。その結果、37°C の硝酸、塩酸で処理した群および 70°C の塩酸で処理した群において、試料が完全に溶解していないことが示唆された。その後、全ての試料の得られた上清について銀濃度が 100 pg/mL となるよう超純水にて希釈し、ICP-MS の時間分析モードにて測定した。その結果、硝酸、塩酸で前処置した試料において、粒子体の銀がほとんど検出されなかった。一方で、水酸化ナトリウム、TMAH で前処置した試料においては添加量相当の銀を粒子体として検出できており、次いで proteinase K で前処置した試料において、添加量の半分ほどの粒子を検出できることが明らかとなった。しかし、TMAH で前処置した試料では、血液での検討結果とは異なり、算出された粒度分布がブロードなものとなっていたことから、本条件においては粒子が凝集し得ることが示された（Figure 10）。従って、未だ溶液の濃度や作用時間等、条件の最適化のために検討すべき課題は多いものの、今回検討した条件の中では、水酸化ナトリウムによる組織の可溶化を実施することで、肝臓に存在するナノ銀粒子を存在様式に影響を与えずに解析し得ることを見出した。

次に、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（アルカリ）、TMAH（アルカリ）、硝酸（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 11）。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。

そこで、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 12）。従って、今後より詳細に解析を進めていく必要があるが、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. Aoyama M., Hata K., Higashisaka K., Nagano K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Clusterin in the protein corona plays a key role in the stealth effect of nanoparticles against

- phagocytes., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 480: 690-5, 2016.
2. Uemura E., Yoshioka Y., Hirai T., Handa T., Nagano K., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Relationship between size and surface modification of silica particles and enhancement and suppression of inflammatory cytokine production by lipopolysaccharide or peptidoglycan stimulated RAW264.7 macrophages., *J. Nanopart. Res.*, 18: 165, 2016.
 3. Hirai T., Yoshioka Y., Udaka A., Uemura E., Ohe T., Aoshima H., Gao JQ., Kokubo K., Oshima T., Nagano K., Higashisaka K., Mashino T., Tsutsumi Y. : Potential suppressive effects of two C60 fullerene derivatives on acquired immunity., *Nanoscale. Res. Lett.*, 11: 449, 2016.
 4. Hirai T., Yoshioka Y., Izumi N., Ichihashi K., Handa T., Nishijima N., Uemura E., Sagami K., Takahashi H., Yamaguchi M., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Ishii K., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Metal nanoparticles in the presence of lipopolysaccharides trigger the onset of metal allergy in mice., *Nat. Nanotechnol.*, 11: 808-16, 2016.
 5. Morishita Y., Yoshioka Y., Takimura Y., Shimizu Y., Namba Y., Nojiri N., Ishizaka T., Takao K., Yamashita F., Takuma K., Ago Y., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Saito S., Matsuda T., Hashida M., Miyakawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Distribution of silver nanoparticles to breast milk and their biological effects on breast-fed offspring mice., *ACS Nano.*, 10: 8180-91, 2016.
 6. Handa T., Hirai T., Izumi N., Eto S., Tsunoda S., Nagano K., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Identifying a size specific hazard of silica nanoparticles after intravenous administration and its relationship to the other hazards that have negative correlations with the particle size in mice., *Nanotechnology.*, 28(13): 135101, 2017.
 7. Imai S., Morishita Y., Hata T., Kondoh M., Yagi K., Gao JQ., Nagano K., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Cellular internalization, transcellular transport, and cellular effects of silver nanoparticles in polarized Caco-2 cells following apical or basolateral exposure., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 484(3): 543-9, 2017.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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、吉岡靖雄、堤 康央：ナノ粒子の安全科学研究. *ぶんせき*. 10: 404-8, 2016.
2. 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.
3. 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): 55-60, 2017.
4. Higashisaka K., Nagano K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Safety science research of nanoparticles: Association of nanoparticles-induced biological effects, the physical properties, and kinetics., *Biol Pharm Bull*, 40(3): 243-8, 2017.

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 2 件】

1. 東阪和馬：ナノマテリアルの医薬品への応用とリスク解析に資するナノ安全科学研究., 日本農芸化学会中部支部第178回例会. 静岡(静岡), 2016年11月. (シンポジウム：生物学的および化学的食品安全リスク因子とその制御法)
2. 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 22 件】

1. 東阪和馬、岩原有希、中島彰俊、長野一也、齋藤 滋、吉岡靖雄、堤 康央：好中球が非晶質ナノシリカ誘発性の胎盤障害におよぼ

す影響解析., 第43回日本毒性学会学術年会., 名古屋(愛知), 2016年6月.

2. 青山道彦、石本里緒、平井はるな、長野一也、齋藤 滋、東阪和馬、吉岡靖雄、堤 康央：オートファジーの阻害がナノマテリアルの細胞内移行に与える影響評価., 第43回日本毒性学会学術年会., 名古屋(愛知), 2016年6月.
3. 和泉夏実、吉岡靖雄、平井敏郎、半田貴之、衛藤舜一、青山道彦、長野一也、東阪和馬、堤 康央：アジュバントに着目した金属ナノ粒子投与による金属アレルギー様症状の発症機序解析., 第43回日本毒性学会学術年会., 名古屋(愛知), 2016年6月.
4. 清水雄貴、東阪和馬、青山道彦、難波佑貴、泉 雅大、長野一也、吉岡靖雄、堤 康央：細胞間隙に着目した、ナノマテリアルの胎盤関門透過性へ与える影響の評価., 第43回日本毒性学会学術年会., 名古屋(愛知), 2016年6月.
5. 真木彩花、東阪和馬、青山道彦、西川雄樹、石坂拓也、笠原淳平、長野一也、吉岡靖雄、堤 康央：ナノ銀粒子曝露によるDNAメチル化酵素への影響., 第43回日本毒性学会学術年会., 名古屋(愛知), 2016年6月.
6. 石坂拓也、東阪和馬、青山道彦、西川雄樹、真木彩花、笠原淳平、長野一也、吉岡靖雄、堤 康央：単一粒子 ICP-MS 法による金属ナノ粒子の分析に向けた評価系の構築., 第43回日本毒性学会学術年会., 名古屋(愛知), 2016年6月.
7. 平井はるな、東阪和馬、青山道彦、新井由之、石本里緒、長野一也、永井健治、吉岡靖雄、堤 康央：細胞内におけるナノ粒子の運動性解析., 第43回日本毒性学会学術年会., 名古屋(愛知), 2016年6月.
8. 東阪和馬、真木彩花、青山道彦、桑形麻樹子、齋藤 滋、長野一也、堤 康央：ナノ銀粒子曝露によるDNAメチル化酵素への影響., 日本薬学会第137年会., 仙台(宮城), 2017

- 年3月.
9. 石坂拓也, 長野一也, 清水雄貴, 泉 雅大, 岡田桃子, 桑形麻樹子, 齋藤 滋, 東阪和馬, 堤 康央: 単一粒子 ICP-MS 法を利用した母乳中ナノ銀粒子の存在様式に関する基礎的検討., 日本薬学会第 137 年会., 仙台(宮城), 2017 年 3 月.
 10. 衛藤舜一, 東阪和馬, 半田貴之, 和泉夏実, 桑形麻樹子, 齋藤 滋, 長野一也, 堤 康央: 非晶質ナノシリカは、獲得免疫系を介してその急性毒性を増悪する., 日本薬学会第 137 年会., 仙台(宮城), 2017 年 3 月.
 11. 笠原淳平, 東阪和馬, 真木彩花, 青山道彦, 桑形麻樹子, 齋藤 滋, 長野一也, 堤 康央: ナノ銀粒子曝露による嗅覚過敏の誘導機序解明に向けた *in vitro* での検討., 日本薬学会第 137 年会., 仙台(宮城), 2017 年 3 月.
 12. 泉 雅大, 長野一也, 岡田桃子, 石坂拓也, 清水雄貴, 桑形麻樹子, 齋藤 滋, 東阪和馬, 堤 康央: 粒子径の異なるナノ白金経口曝露時の吸収性解析., 日本薬学会第 137 年会., 仙台(宮城), 2017 年 3 月.
 13. 岡田桃子, 長野一也, 泉 雅大, 石坂拓也, 清水雄貴, 桑形麻樹子, 齋藤 滋, 東阪和馬, 堤 康央: ナノ白金の安全性情報の収集を目指した、生体内組織移行性の定量的評価., 日本薬学会第 137 年会., 仙台(宮城), 2017 年 3 月.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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 3 件】

1. Higashisaka K., Iwahara Y., Nakashima A., Nagano K., Saito S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Neutrophil plays suppressive roles in pregnancy complication induced by silica nanoparticles., The 8th International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2016), Boston (USA), 1-4 June, 2016.
2. Aoyama M., Ishimoto R., Hirai H., Nagano K., Saito S., Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Autophagy related gene regulates the uptake of silica nanoparticles., The 8th International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2016), Boston (USA), 1-4 June, 2016.
3. 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 11 名）：橋野修代、青山道彦、和泉夏実、清水雄貴、真木彩花、石坂拓也、平井はるな、泉 雅大、衛藤舜一、笠原淳平、岡田桃子、田崎一慶

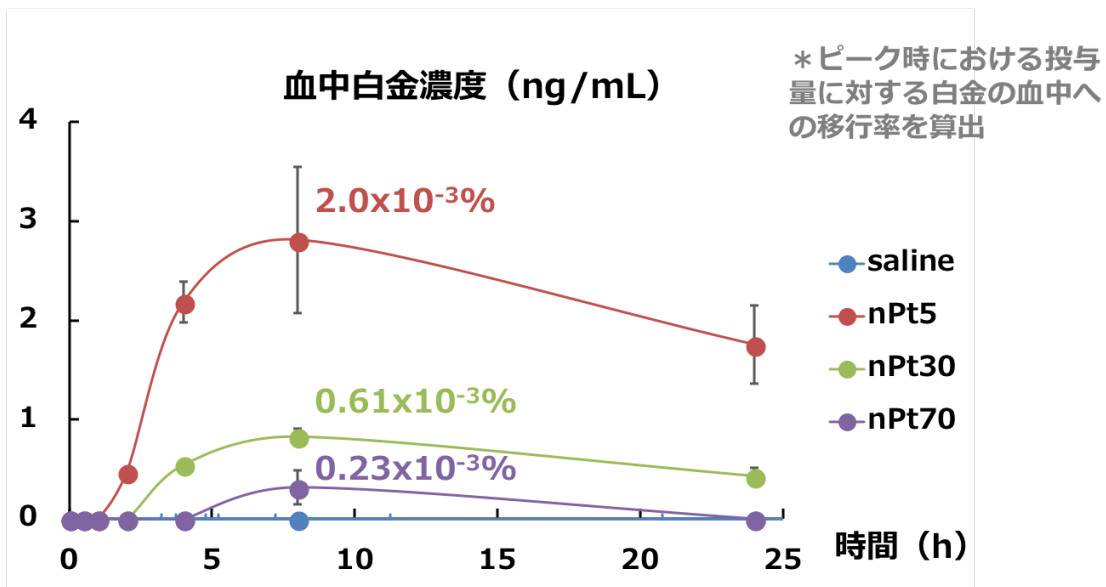


Figure 1 ナノ白金粒子の腸管吸収性. 雄性BALB/cマウス (8週齢) に、nPt5、nPt30、nPt70 (10 mg Pt/kg) を経口投与した。投与0、0.5、1、2、4、8、24時間後に血液を回収し、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により血中白金濃度を測定した。

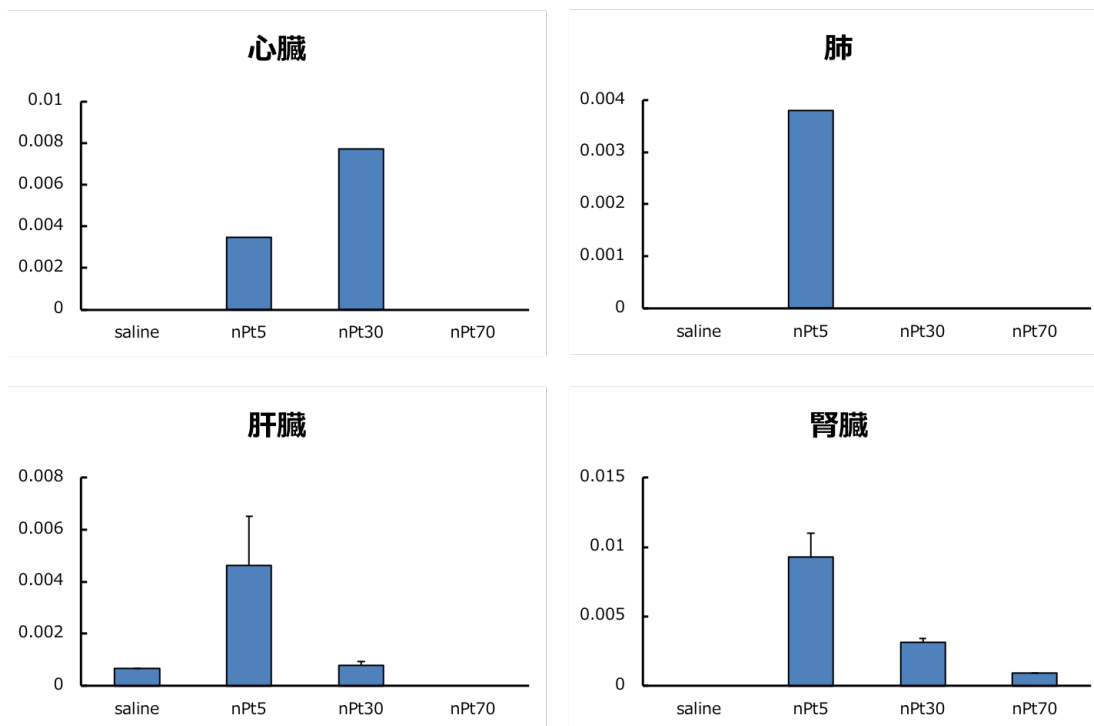


Figure 2 ナノ白金粒子の生体内分布. 経口曝露後のナノ白金粒子の体内分布を評価する目的で、マウスにnPt5、nPt30、nPt70を10 mg/kgで単回経口投与した。投与後、24時間における臓器中白金量を誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により定量解析した (解析結果: ng/mL)。

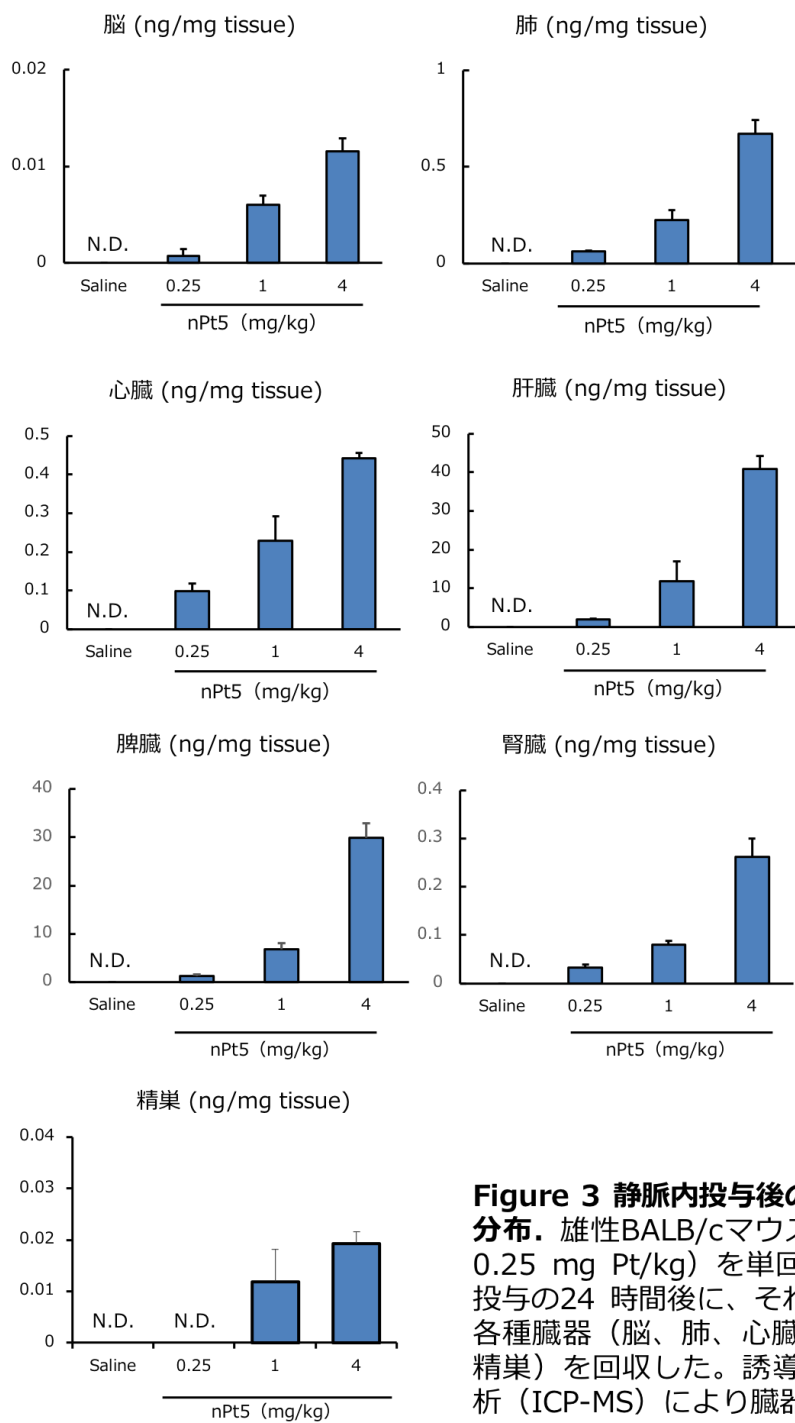


Figure 3 静脈内投与後のナノ白金粒子の組織分布. 雄性BALB/cマウスに、nPt5 (4、1、0.25 mg Pt/kg) を単回尾静脈内投与した。投与の24 時間後に、それぞれマウスを解剖し、各種臓器 (脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣) を回収した。誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により臓器中白金量を測定した。

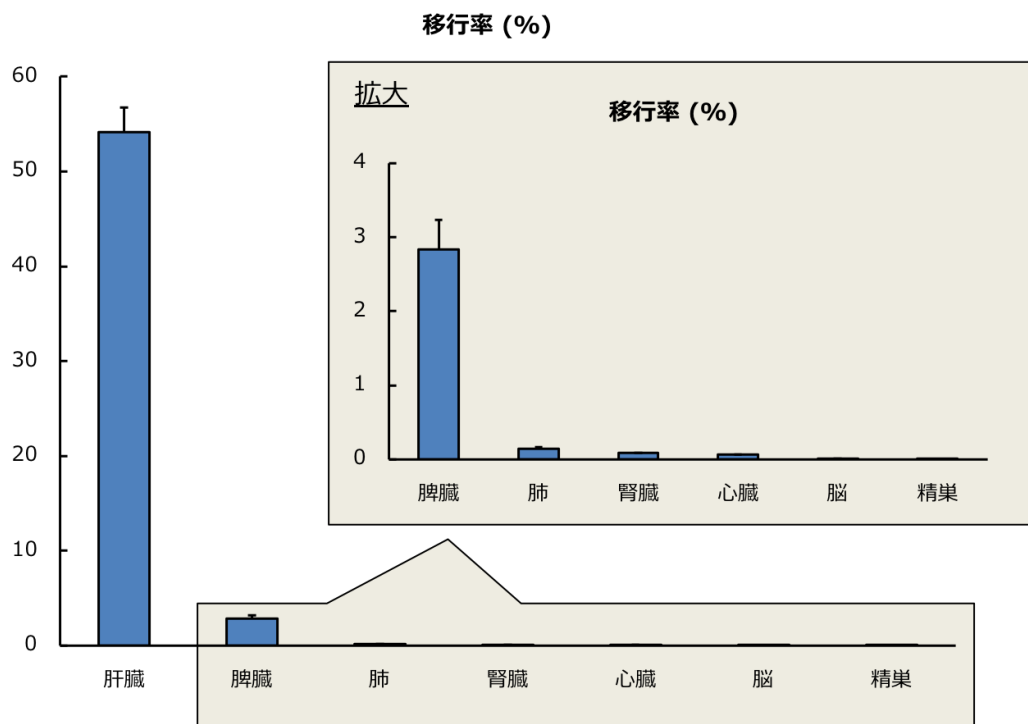


Figure 4 静脈内投与後のナノ白金粒子の組織分布. 雄性BALB/cマウスに、nPt5 (4、1、0.25 mg Pt/kg) を単回尾静脈内投与した。投与の24時間後に、それぞれマウスを解剖し、各種臓器 (脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣) を回収した。誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により臓器中白金量を測定し、投与量に対する白金の臓器への移行率を算出した。

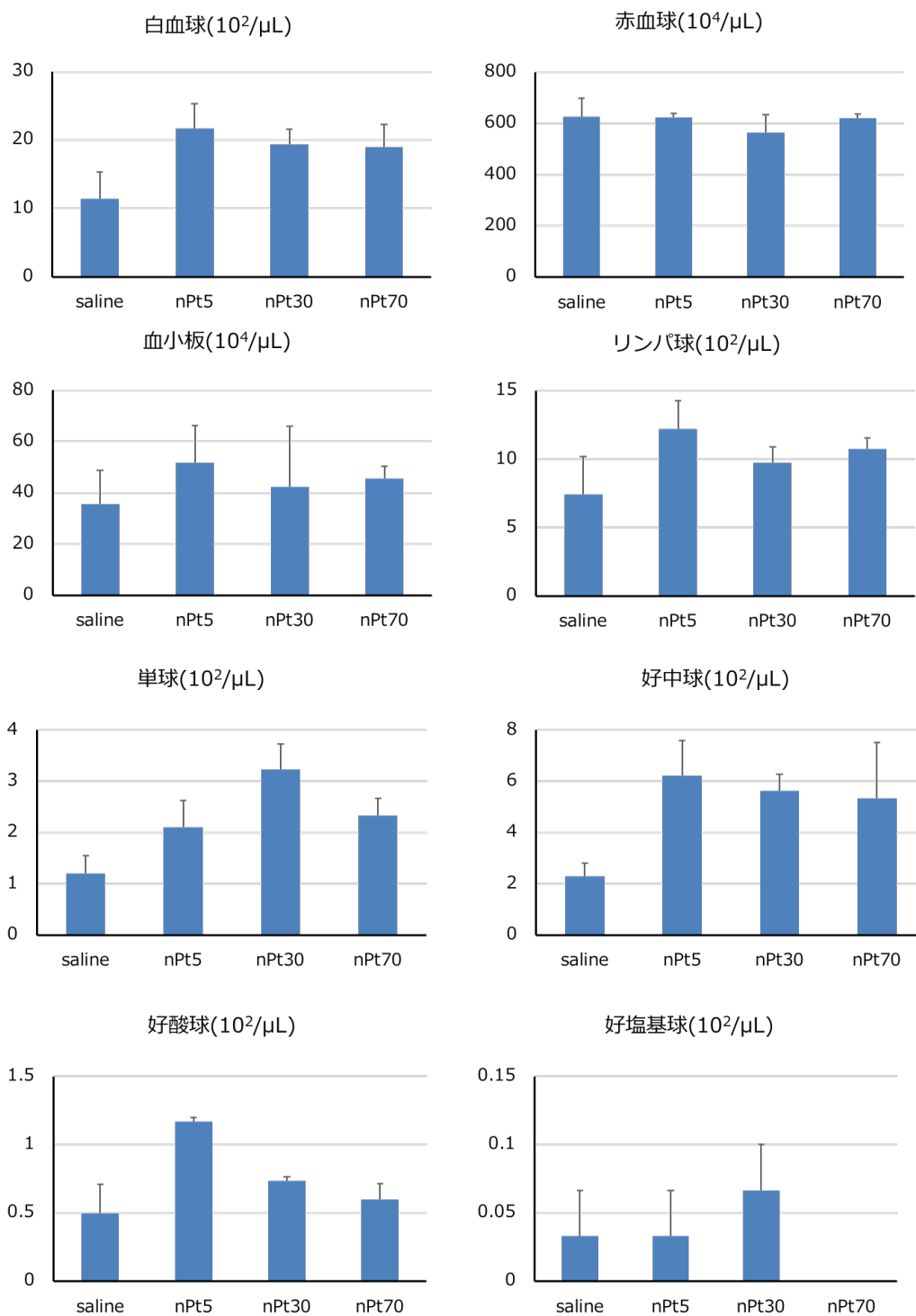


Figure 5 ナノ白金粒子曝露後の血球細胞数に対する影響評価。雄性BALB/cマウスに、nPt5、nPt30、nPt70 (10 mg Pt/kg) を経口投与した。投与24時間後に血液を回収し、多項目自動血球計測装置を用いて、白血球数、赤血球数、血小板数、リンパ球数、単球数、顆粒球 (好中球、好酸球、好塩基球) 数を測定した。

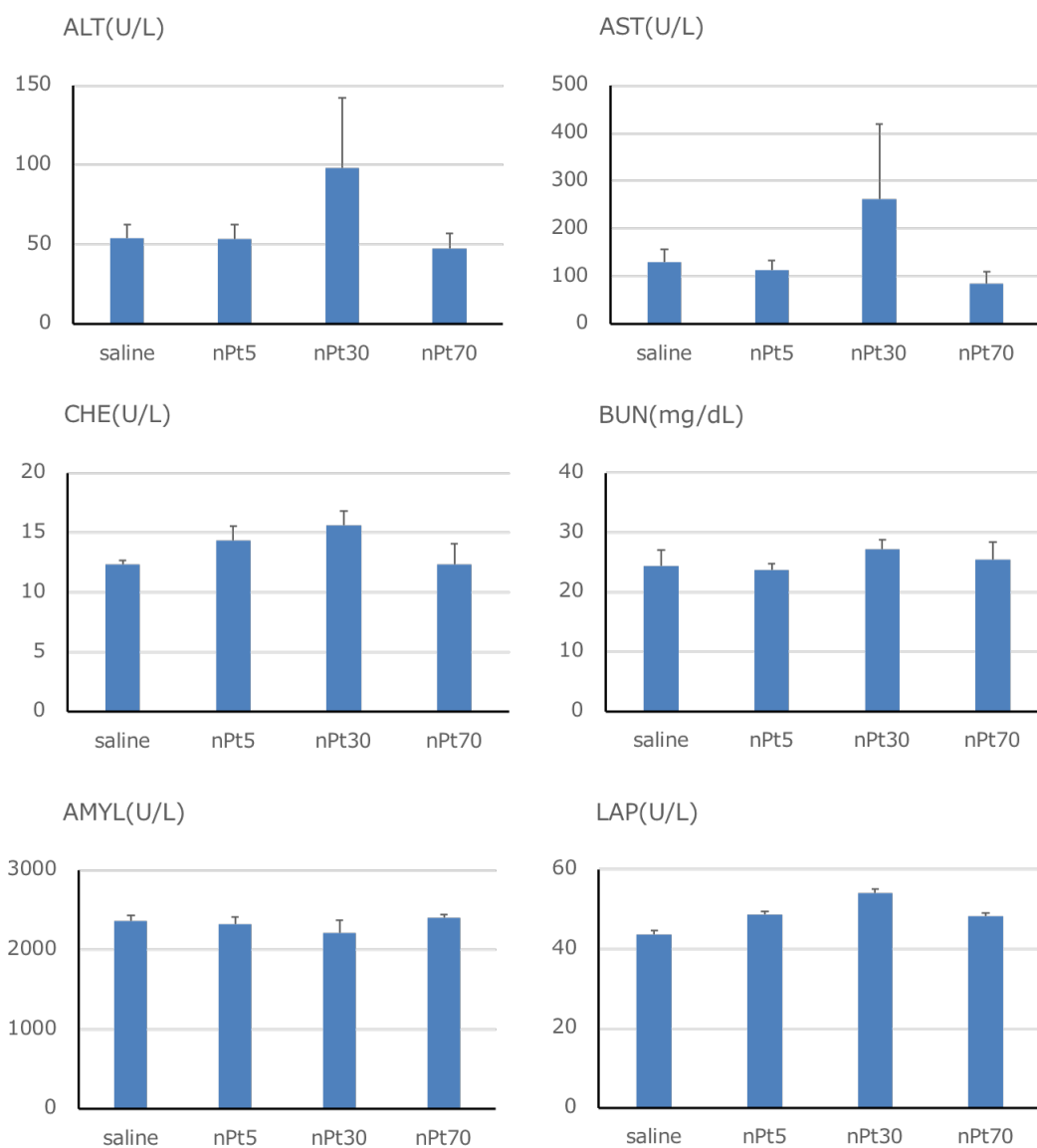


Figure 6 ナノ白金粒子曝露後の血液生化学に対する影響評価. 雄性BALB/cマウスに、nPt5、nPt30、nPt70 (10 mg Pt/kg) を経口投与した。投与24時間後に血液を回収し、血漿中のAlanine aminotransferase (ALT : 肝障害マーカー)、Aspartate aminotransferase (AST : 肝障害マーカー)、Cholinesterase (CHE : 肝障害マーカー)、Blood urea nitrogen (BUN : 腎障害マーカー)、Amylase (AMYL : 膵障害マーカー)、Leucine aminopeptidase (LAP : 胆障害マーカー) を比色法にて測定した。

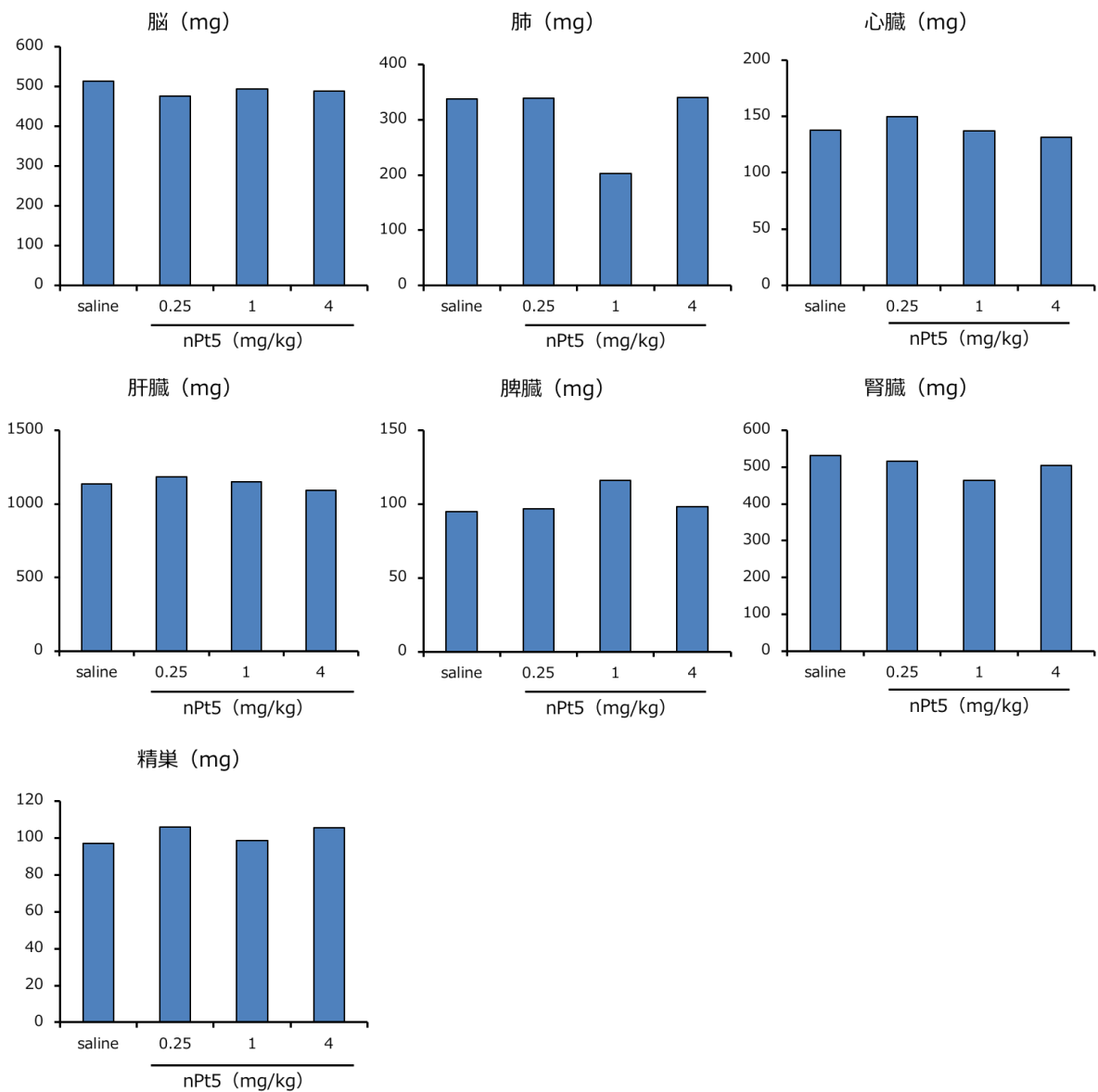


Figure 7 ナノ白金粒子の複数回尾静脈投与による臓器重量への影響. マウスに、nPt5 (0.25、1、4 mg Pt/kg) を39日間、週2回尾静脈内投与し、最終投与24時間後に、脱血した各種臓器 (脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、精巣) を回収した。

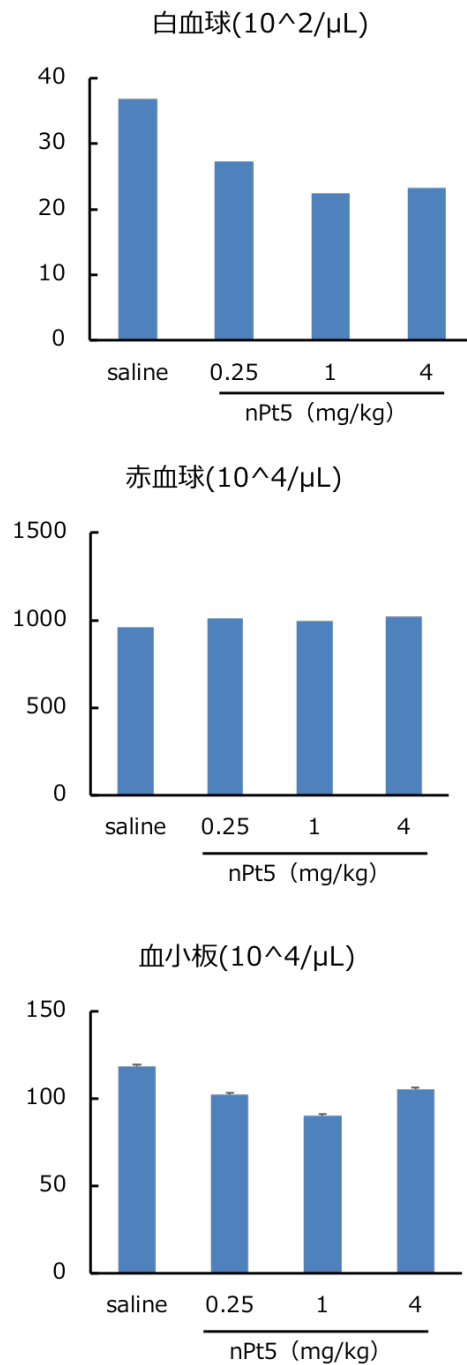


Figure 8 ナノ白金粒子の複数回尾静脈投与による血球細胞数への影響. マウスに、nPt5 (0.25、1、4 mg Pt/kg) を39日間、週2回尾静脈内投与し、最終投与24時間後に全血を回収し、白血球数、赤血球数、血小板数を測定した。

使用したナノ銀粒子

	平均粒子径 (nm)【DLS法】	添加銀濃度 (pg/ml)	添加銀粒子数 (個)【理論値】
nAg100	100.0	50	136
nAg70	68.5	50	325
nAg50	49.1	50	1090

検出したナノ銀粒子

	平均粒子径 (nm)	粒子濃度 (pg/ml)	イオン濃度 (pg/ml)	粒子数 (個)
nAg100	105.1	51.8	検出限界以下	131.3
nAg70	73.7	61.5	検出限界以下	337.3
nAg50	52.6	60.4	検出限界以下	1027.7

Figure 9 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. マウスより採取した血液にnAg50、nAg70、nAg100を添加し、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 (TMAH) と1:1で混和した。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。

■ : 本条件で完全に溶解していない群

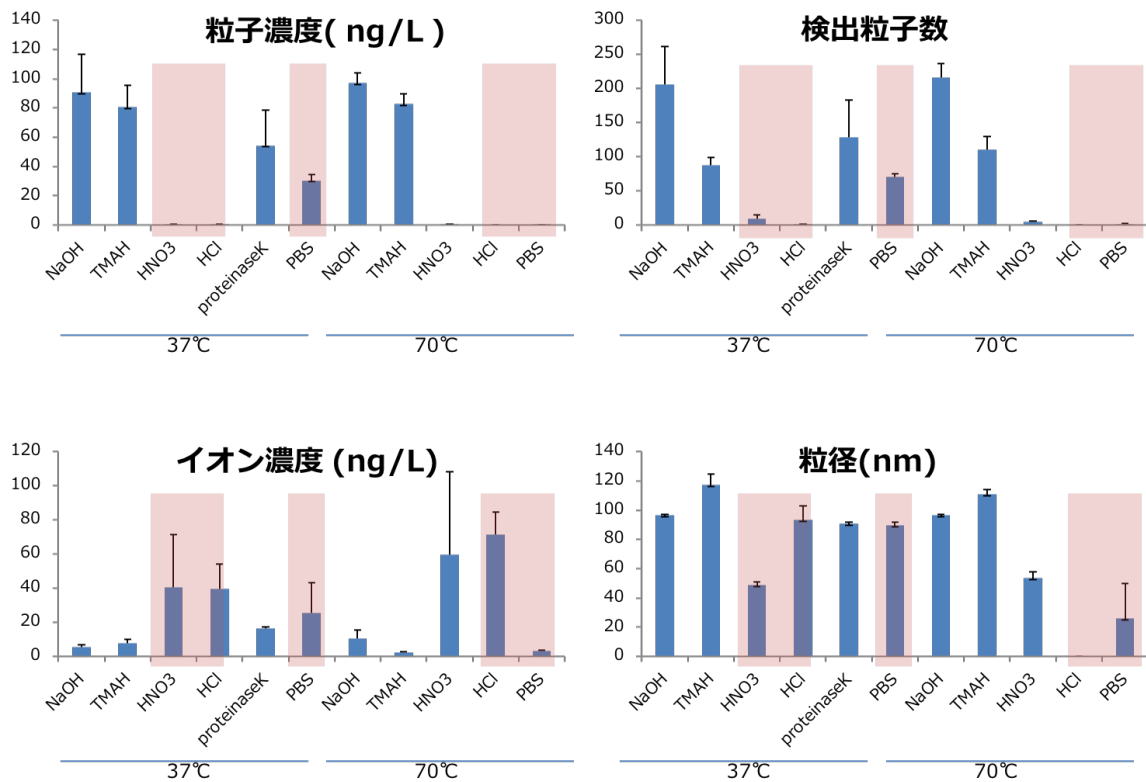


Figure 10 ICP-MSによるナノ銀粒子の臓器中での存在量・存在様式の解析. PBSにて10% (w/w) にホモジネートしたマウス肝臓に対して、銀粒子を200 ng/mLで添加した後、試料に水酸化ナトリウム、TMAH、硝酸、塩酸、proteinase Kの各溶液をそれぞれ1:1の割合で混和し、夾雑物の分解を試みた。この際、proteinase Kを除く3つの試薬については、37°Cと70°Cにて、proteinase Kについては37°Cにて、それぞれ3時間作用させた。各条件下のサンプルに対して、ICP-MSの時間分析モード（積分時間10 ms, 分析時間30 sec）にて、粒子径、粒子濃度、イオン濃度をそれぞれ測定した。

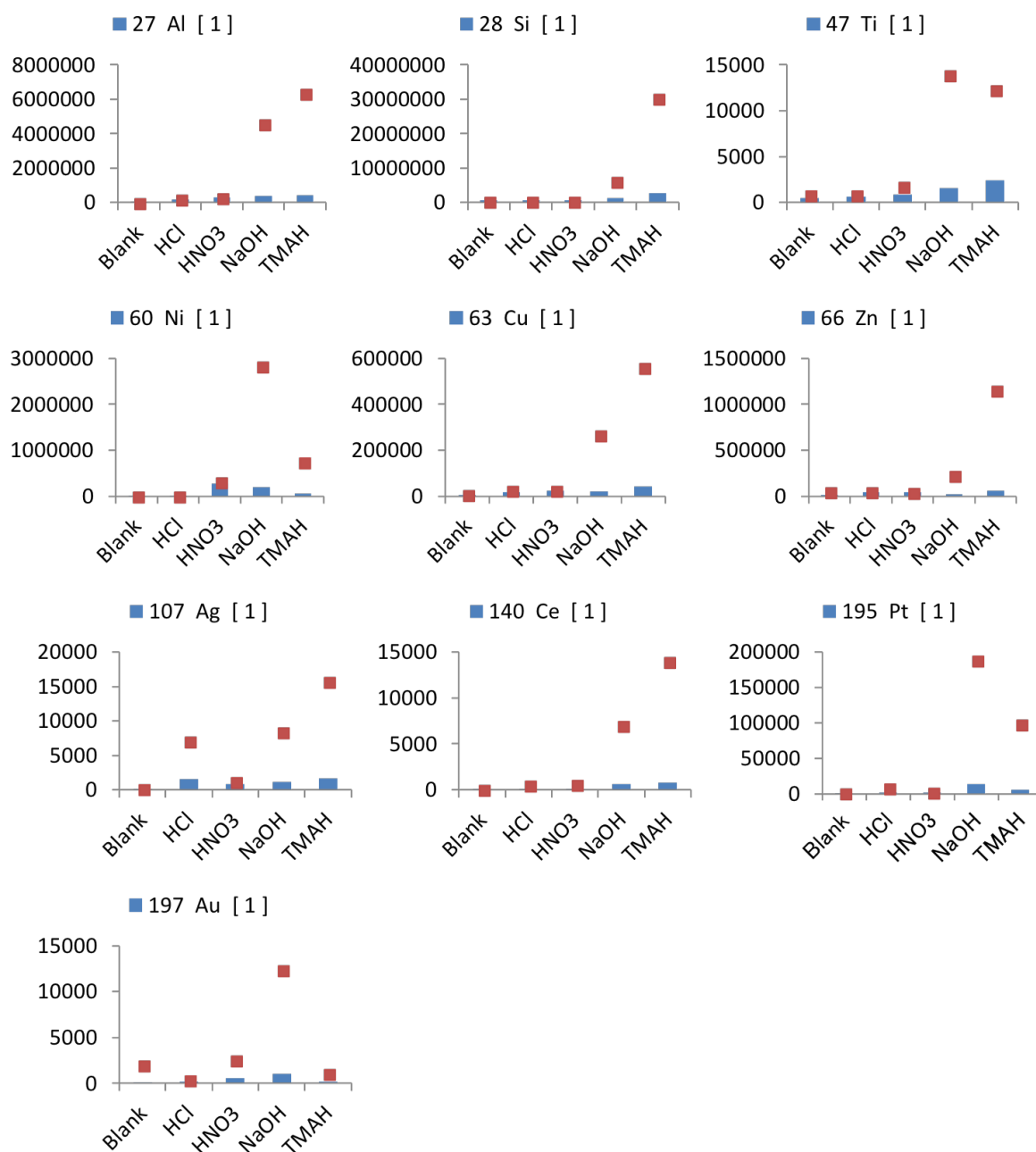


Figure 11 各種元素のICP-MSにおける定量下限に関する検討. 汎用されているナノ素材の構成元素であるAl、Si、Ti、Ni、Cu、Zn、Ag、Ce、Pt、Au の10種類の元素種について、ICP-MSにおける定量下限を明らかにするため、ブランク試料を流した際に生じる信号強度を測定した。

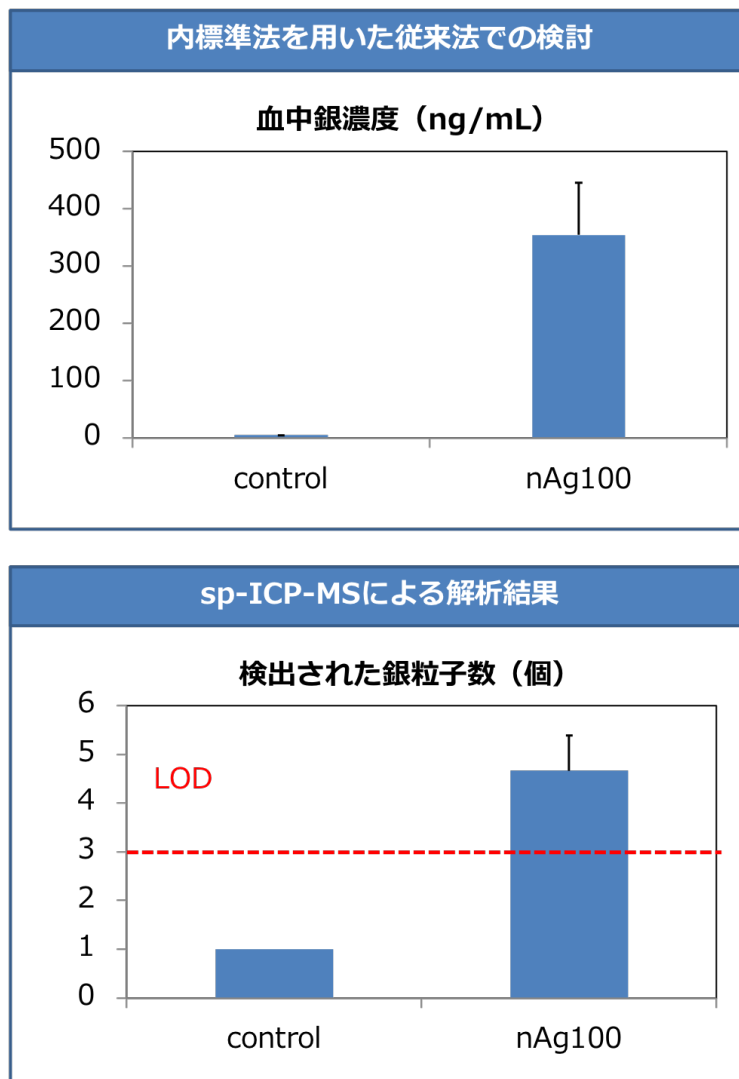


Figure 12 ナノ銀粒子の血中における存在様式の解析. 静脈内投与後の血中における、ナノ銀粒子の存在様式（粒子/イオン）を評価する目的で、マウスにnAg100を1.5 mg/kgで単回静脈内投与した。投与24時間後における血中銀量、および銀粒子数を解析した。

