

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

**経口曝露後のナノリスク解析に資する
ナノマテリアルの内分泌代謝への影響解析**

令和5年度 総括研究報告書

研究代表者 東阪和馬

令和6(2024)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

経口曝露後のナノリスク解析に資する

ナノマテリアルの内分泌代謝への影響解析----- 1

東阪和馬

II. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 6

経口曝露後のナノリスク解析に資する ナノマテリアルの内分泌代謝への影響解析

研究代表者 東阪和馬 大阪大学高等共創研究院 准教授

研究要旨

ナノマテリアル（粒子径100 nm以下の人工微粒子）含有製品は、ナノ技術の進歩と共に増加している。そのため、ナノマテリアルの摂取量は、今後増加することが予想され、我々は、その意図的・非意図的な曝露をものは避けられない。このように、食品用途に使用されるナノマテリアルの曝露機会が増す中で、昨今の疫学研究により、PM2.5をはじめとする環境中の外因性微粒子への曝露と、糖代謝などの内分泌代謝機能への悪影響との連関が現象論として示唆されているものの、外因性微粒子がどのような機序で内分泌代謝機能に影響をおよぼすかは明らかとされていない。内分泌代謝機能の異常は、肥満や糖尿病といった生活習慣病の発症・悪化につながり得ること、また、近年における生活習慣病の増加は、様々な環境因子の変化に起因するところが大きいことを踏まえると、ナノマテリアルに関しても、リスク解析に必要な動態解析の推進、および、物性を加味した安全性の理解が重要な課題である。そこで本研究では、食品用途に使用される種々物性のナノマテリアルについて、その経口曝露後の動態情報を考慮しつつ、内分泌代謝機能に対するハザード解析と、そのハザード発現メカニズムの解明を試み、ナノマテリアルの物性-動態-ハザードの連関解明を図ることで、ナノマテリアルのリスク解析に資する安全性情報の集積を目指す。

昨年度までに、粒子径30 nmの非晶質ナノシリカ（nSP30）投与群において、対照群と比較して、経口ブドウ糖負荷試験後の血糖値の低下傾向を示す可能性が示唆された。一方で、nSP30の投与量依存性を評価することで、本結果について精査すると共に、膵臓からのインスリン分泌に対する負の影響を追究する必要性が考えられた。そこでまず、nSP30の投与量依存性について評価したところ、血糖値の時間推移や、試験中の血糖におけるArea Under the Curveに有意な差は認められなかった。さらに、nSP30の経口曝露によるインスリン抵抗性への影響を評価したが、対照群と比較して、インスリン感受性の差は認められなかった。従って、本投与条件下において、nSP30が内分泌代謝機能に影響をおよぼさないことが示された。今後は、粒径や表面電荷など、異なる物性を有する非晶質シリカによる影響や、長期間曝露時における影響を追究していくことで、リスク解析につながるハザードを呈する物性の同定と、ヒト健康に影響を及ぼし得る閾値の算出という基本的な考え方の提案を通じて、ヒト健康環境の確保と安全かつ有用に使用可能なナノマテリアルの開発指針の策定に貢献していく。

A. 研究目的

ナノマテリアル（粒子径 100 nm 以下の人工微粒子）含有製品は、ナノ技術の進歩と共に増加している。そのため、ナノマテリアルの摂取量は、今後増加することが予想され、我々は、ナノマテリアルの意図的・非意図的な曝露をものは避けられない。このように、食品用途に使用されるナノマテリアルの曝露機会が増す中で、昨今の疫学研究により、PM2.5をはじめとする環境中の外因性微粒子への曝露と、糖代謝などの内分泌代謝機能

への悪影響との連関が現象論として示唆されているものの、外因性微粒子がどのような機序で内分泌代謝機能に影響をおよぼすかは明らかとされていない。内分泌代謝機能の異常は、肥満や糖尿病といった生活習慣病の発症・悪化につながり得ること、また、近年における生活習慣病の増加は、衛生環境など、様々な環境因子の変化に起因するところが大きいことを踏まえると、ナノマテリアルに関しても、リスク解析に必要な動態解析の推進、および、物性を加味した安全性の理解が重要な課題である。即ち、ナノマテリアル

のリスク解析に資する物性-動態-ハザードの連関解析が、本課題の克服に叶うのみならず、国民の健康確保など、食品科学の観点からも、社会的ニーズや産業界の要請に応えるものである。

その点、これまでに研究代表者は、微粒子の物性-動態-ハザードの体系的な連関追究を図り、そのハザード解析、および曝露実態の解明に取り組んでおり、ナノマテリアルがその物性によっては、腸管バリアを突破し、高い腸管吸収性を示すことを見出すなど、生体内に取り込まれた後のハザード追究とリスク解析の必要性を認めてきた。そこで本研究では、食品用途に使用される種々物性のナノマテリアルについて、その経口曝露後の動態情報を考慮しつつ、内分泌代謝機能に対するハザード解析と、そのハザード発現メカニズムの解明を試み、ナノマテリアルの物性-動態-ハザードの連関解明を図ることで、ナノマテリアルのリスク解析に資する安全性情報の集積を目指す。

B. 研究方法

非晶質ナノシリカ

粒子径 30 nm の非晶質ナノシリカ (nSP30)、粒子径 100 nm の非晶質ナノシリカ (nSP100) は、micromod Partikeltechnologie より購入した。使用直前に ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY で 400 W で 20 分間超音波処理し、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後、必要な濃度の粒子分散液を調製した。

実験動物

ICR マウス (6 週齢、雌性) は、清水実験材料より購入した。本研究における動物実験の飼育および実験は大阪大学薬学研究科の実験動物施設において実施し、大阪大学動物実験規定に準じた。

病理解析

雌性 ICR マウスに、nSP30、nSP100 を 2.5 mg/mouse/day で 7 日間連日経口投与した。対照群には PBS 溶液を投与した。最終投与の 24 時間後に小腸、大腸、膵臓を採取し、病理解析に供した。切片の作成およびヘマトキシリン&エオジン染色、所見の作成をアプライドメディカルリサーチに依頼した。

経口ブドウ糖負荷試験

雌性 ICR マウスに、nSP30 を 0.1、0.5、2.5 mg/mouse/day で 7 日間連日経口投与した。最

終投与後に、16 時間の絶食下においてブドウ糖溶液 (扶桑薬品工業株式会社) を強制経口投与した。投与前 (0 分)、投与後 15 分、45 分、120 分に採血し、ラボアッセイグルコース (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いて、それぞれの時間における血糖値を測定した。血液は、4℃、3000g で 15 分遠心処理することで、血漿を回収した。また、各測定値について、縦軸を測定した血糖値 (mg/dl)、横軸を測定した時間 (min) としてグラフにプロットして直線でつなぎ、0 mM 縦軸の底として台形の面積の算出法を用いて 0 分~120 分までの各曲線下面積の総和を Area Under the Curve (AUC ; mg/dL・min) として算出し、各群の比較を行った。

インスリン抵抗性試験

雌性 ICR マウスに、nSP30、nSP100 を 2.5 mg/mouse/day で 7 日間連日経口投与した。最終投与後に、2 時間の絶食下においてインスリンを腹腔内投与し、投与前 (0 分)、投与後 15 分、30 分、60 分、90 分に採血後、ラボアッセイグルコース (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いて、それぞれの時間における血糖値を測定した。血液は、4℃、3000g で 15 分遠心処理することで、血漿を回収した。

(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ている。

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、研究を推進した。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

マウスへの非晶質ナノシリカ曝露が内分泌代謝に与える影響評価

食品分野における利用が多い非晶質ナノシリカをモデルナノマテリアルとして供し、非晶質ナノシリカが内分泌代謝機能におよぼす影響を評価した。昨年度までに、nSP30 投与群において、対照群と比較して、経口ブドウ糖負荷試験後の血糖値の低下傾向を示す可能性が示唆された。一方で、nSP30 の投与量依存性を評価することで、本結果について精査する必要があると共に、膵臓からのインスリン分泌に対する負の影響を追究する必要性が考えられた。そこで、nSP30 の投与量依存性について評価するため、nSP30 (0.1、0.5、2.5 mg/mouse) の最終投与後に、16 時間の絶食下においてブドウ糖溶液を経口投与し、投与前 (0 分)、投与後 15 分、45 分、120 分における血糖値を測定した。その結果、nSP30 投与群における血糖値の時間推移や (図 1A)、試験中の血糖における Area Under the Curve に有意な差は認められなかった (図 1B)。

また、非晶質ナノシリカの経口曝露によるインスリン抵抗性への影響を評価するため、nSP30、および、nSP100 を 7 日間連日経口投与し (2.5 mg/mouse)、最終投与後にインスリン負荷試験を実施した。その結果、いずれの非晶質ナノシリカを投与した際にも、対照群と比較して、血糖の絶対値の推移 (図 2A)、ならびに、インスリン負荷前の血糖を 100%として算出した相対的な変化に有意な差はなく (図 2B)、インスリン感受性の差は認められなかった。この時、一般毒性学的観点から、曝露局所である小腸と大腸、ならびに、インスリン分泌に働く膵臓での病理解析を実施した。解析の結果、nSP30、あるいは、nSP100 投与により、小腸、大腸、膵臓において特筆すべき組織学的変化は認められなかった (data not shown)。従って、本投与条件下において、非晶質ナノシリカが内分泌代謝機能に影響をおよぼさないことが示された。

今後は、粒径や表面電荷など、異なる物性を有する非晶質シリカによる影響や、長期間曝露時に

おける影響を追究していくことで、リスク評価につながるハザードを呈する物性の同定と、ヒト健康に影響を及ぼし得る閾値の算出という基本的な考え方の提案を通じて、ヒト健康環境の確保と安全かつ有用に使用可能なナノマテリアルの開発指針の策定に貢献していく。

E. 結論

国民の「食の安全・安心」に対する希求の高まりも相俟って、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。食品用途へのナノマテリアルの利用の歴史は浅いものの、近年急速に研究開発が進展しており、食品用途に使用されるナノマテリアルの摂取量は今後増加の一途を辿ることは容易に予想できる。しかし、食品用途に使用されるナノマテリアルについて、現状では、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。従って、安全かつ有用なナノマテリアルの開発支援に向けては、科学的根拠に基づいたリスク評価・管理が必要不可欠である。この点で、本研究の成果は、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、ハザード情報の集積、およびその理解に直結することから、ナノマテリアルのリスク管理に係る新たな政策形成に資する知見の提供に大きく貢献し得る。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Martin, Watanabe R., Hashimoto K., Higashisaka K., Haga Y., Tsutsumi Y., Mizuguchi K. : Evidence-based prediction of cellular toxicity for amorphous silica nanoparticles., ACS Nano, 17(11): 9987-99, 2023.

【総説・その他】

1. 東阪和馬, 芳賀優弥, 堤 康央 : 化粧品ナノマテリアルの安全性評価—獲得免疫系を介したハザード解析とその機序解明. Fragrance Journal. 51(7): 25-9, 2023.

2. 学会発表

【シンポジウム等】

1. 東阪和馬：ナノマテリアルの社会受容に向けた安全性研究の現状と今後. ナノインク懇話会, 大阪 (大阪), 2023年6月.
2. 東阪和馬：脆弱な世代に対する金属ナノ粒子の健康影響評価と安全性確保に向けて., メタルバイオサイエンス研究会 2023, 岐阜 (岐阜), 2023年10月. (シンポジウム：微小金属粒子のバイオサイエンス：測定から生体応答まで)
3. 東阪和馬：ヒトと微粒子との環境共生に向けたナノマテリアルの物性とハザード発現との関連解析., 日本薬学会第144年会, 横浜 (神奈川), 2024年3月. (シンポジウム：微粒子との環境共生研究 up-to-date 2024)

【国内学会発表】

1. 東阪和馬, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央：食品関連製品に含まれるナノマテリアルの神経細胞分化への影響解析., 日本食品化学学会第29回総会・学術大会., 富山 (富山), 2023年6月.
2. 泉谷里奈, 東阪和馬, 坂橋優治, Seo Jiwon, 宮地一輝, 芳賀優弥, 辻野博文, 堤 康央：ナノマテリアル曝露が妊娠準備から着床期に及ぼす影響評価., 日本食品化学学会第29回総会・学術大会., 富山 (富山), 2023年6月.
3. 山本怜奈, 東阪和馬, 北原 剛, 仲本有里菜, 坂橋優治, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央：非晶質ナノシリカ曝露による胎盤炎症応答の解析., 日本食品化学学会第29回総会・学術大会., 富山 (富山), 2023年6月.
4. 奥村 萌, 芳賀優弥, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央：非晶質ナノシリカ粒子の細胞内取り込みと経鼻投与後の動態評価., 第50回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈川), 2023年6月.
5. Seo Jiwon, 東阪和馬, 坂橋優治, 泉谷里奈, 宮地一輝, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央：ナノマテリアル曝露による合胞体化抑制のエピジェネティックな観点からのメカニズム解析., 第50回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈川), 2023年6月.
6. 東阪和馬, 坂橋優治, 辻野博文, 芳賀優弥, 中島彰俊, 堤 康央：ナノマテリアルの安全

性確保に向けた胎盤細胞合胞体化への影響解析., 第48回日本香粧品学会., 東京 (東京), 2023年6月.

7. 小林純大, 東阪和馬, 謝 燕坤, 奥野和香子, 村中瑞希, 芳賀優弥, 堤 康央：非晶質ナノシリカ粒子の胎盤透過性及び胎盤細胞取り込み評価., 第73回日本薬学会関西支部総会・大会., 神戸 (兵庫), 2023年10月.
8. 東阪和馬, 坂橋優治, 芳賀優弥, 中島彰俊, 堤 康央：胎盤細胞の合胞体化に着目したナノ粒子の安全性評価研究., 第31回日本胎盤学会学術集会., 福岡 (福岡), 2023年11月.
9. 佐伯悠真, 東阪和馬, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 宮地一輝, 芳賀優弥, 堤 康央：銀ナノ粒子の雄親曝露が妊娠転帰に及ぼす影響の評価., 日本薬学会第144年会., 札幌 (北海道), 2024年3月.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

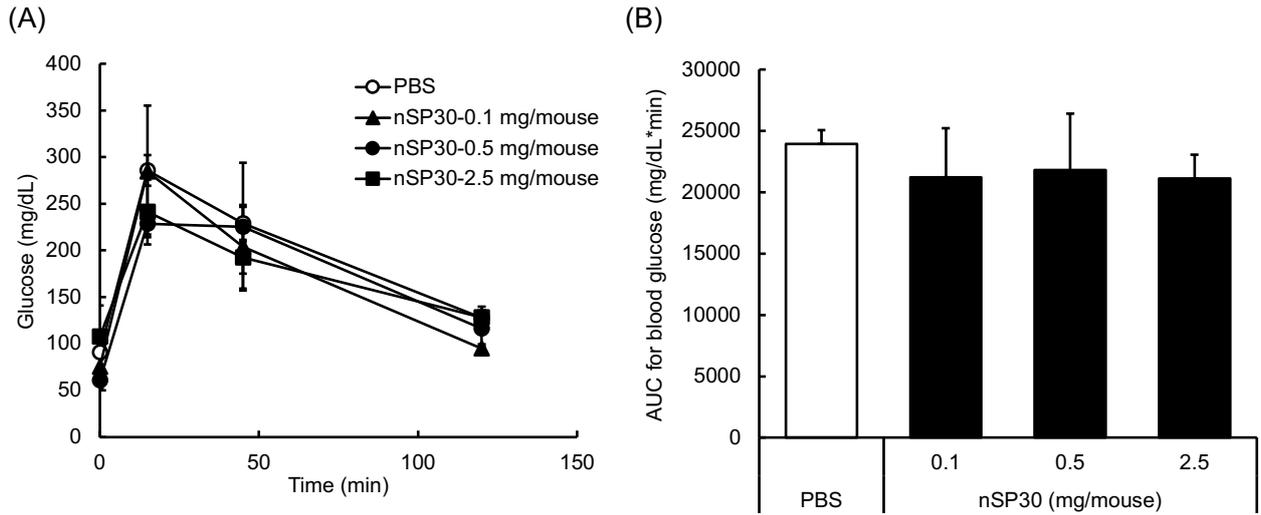


図1：非晶質ナノシリカの経口曝露による耐糖能への影響評価

雌性ICRマウスに、nSP30を0.1、0.5、2.5 mg/mouse/dayで7日間連日経口投与した。最終投与後に、16時間の絶食下においてブドウ糖溶液を経口投与し、投与前(0分)、投与後15分、45分、120分に採血し、(A) 血糖値を測定すると共に、(B) 試験中の血糖におけるArea Under the Curveを算出した。

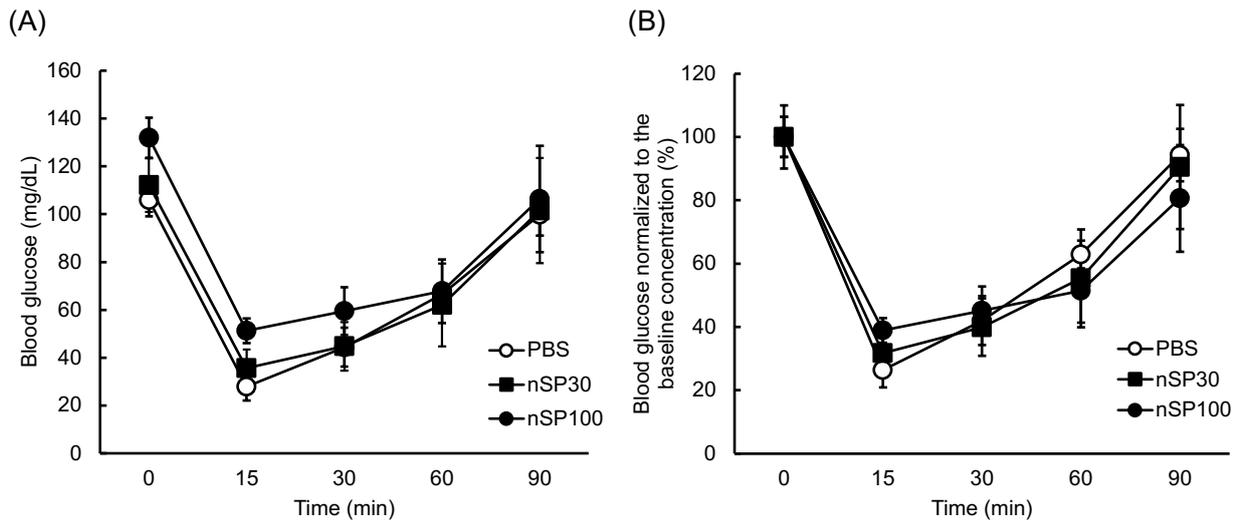


図2：非晶質ナノシリカの経口曝露によるインスリン抵抗性への影響評価

雌性ICRマウスに、nSP30、nSP100を2.5 mg/mouse/dayで7日間連日経口投与した。最終投与後に、2時間の絶食下においてインスリンを腹腔内投与し、投与前(0分)、投与後15分、30分、60分、90分に採血し、(A) 血糖の絶対値の推移、(B) インスリン負荷前の血糖を100%として算出した相対的な変化を評価した。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Martin, Watanabe R., Hashimoto K., Higashisaka K., Haga Y., Tsutsumi Y., Mizuguchi K.	Evidence-based prediction of cellular toxicity for amorphous silica nanoparticles.	ACS Nano	17	9987-99	2023
東阪和馬, 芳賀優弥, 堤康央	化粧品ナノマテリアルの安全性評価—獲得免疫系を介したハザード解析とその機序解明	Fragrance Journal	51	25-9	2023

令和 6 年 4 月 19 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人大阪大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 西尾 章治郎

次の職員の（令和）5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 経口曝露後のナノリスク解析に資するナノマテリアルの内分泌代謝への影響解析

3. 研究者名（所属部署・職名） 高等共創研究院・准教授

（氏名・フリガナ） 東阪 和馬・ヒガシサカ カズマ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること （指針の名称：動物の愛護及び管理に関する法律）	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	大阪大学	<input type="checkbox"/>

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。

（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合は委託先機関：）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> （無の場合はその理由：）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> （有の場合はその内容：）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。