

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、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、リスク解析に必要不可欠な動態解析の推進、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。

2022年度研究では、既に数多くの食品等に実用化されている非晶質ナノシリカを用い、粒子径の違いを考慮しつつ、非晶質ナノシリカ曝露による内分泌代謝機能におよぼす影響を評価した。具体的には、雌性6週齢のICRマウスに粒子径30 nmの非晶質ナノシリカ（nSP30）、および、粒子径100 nmの非晶質ナノシリカ（nSP100）を7日間連日経口投与した。最終投与後に経口ブドウ糖負荷試験による耐糖能および同時採血によるグルコース応答性インスリン分泌能を評価した。その結果、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、また、血中インスリン濃度の減少傾向を示す可能性が示唆された。一方で、本結果は統計学的な有意な差は認められず、今後、n数を増やした検討を実施する必要があるだけでなく、非晶質ナノシリカの投与量依存性についても精査していくことが不可欠と考えている。以上、ナノマテリアル曝露と内分泌代謝機能に関する科学的根拠の収集と分子メカニズムの解明につながる点で、当初予定通り研究計画を実施しており、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ものである。本研究の成果ならびに関連する研究の成果については、国内外の論文や学会・シンポジウムで発表するなど、成果公開や情報発信を積極的に進めており、他の研究者との意見交換を図っている。

A. 研究目的

ナノマテリアル（NM：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、NMの摂取量は、今後増加することが予想され、我々は、NM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NM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、NM 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、NM 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、NM 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 NM 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、NM の物性-動態-ハザードの連関解明を図ることで、NM 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行い、大阪大学動物実験規定に準じた。

非晶質ナノシリカの投与

ICR マウスに対し、nSP30、nSP100 (2.5 mg/100 μ L/mouse/day) を、7 日間連続経口投与した。対照群には PBS 溶液を投与した。これらマウスにおける 7 日間の体重及び食餌量の推移を測定した。最終投与の 24 時間後に血液、臓器 (肝

臓、腎臓、脾臓) を採取した。血液は、4 $^{\circ}$ C、3000g で 15 分遠心処理することで、血漿を回収した。

経口ブドウ糖負荷試験

各非晶質ナノシリカを連日経口投与したマウスに対し、16 時間の絶食後、ブドウ糖水溶液 (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。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 \cdot min) として算出し、各群の比較を行った。

血中インスリン濃度の定量

各非晶質ナノシリカを連日経口投与したマウスに対し、16 時間の絶食後、ブドウ糖水溶液 (扶桑薬品工業株式会社) を強制経口投与した。投与前 (0 分) および投与後 15 分の血漿中におけるインスリン濃度を超高感度マウスインスリン測定キット (モリナガ) により定量した。

(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及ぼす影響を評価した。まず、nSP30、および、nSP100 を 7 日間連続経口投与し、一般毒性学的観点から観察したところ、各非晶質ナノシリカ投与群において、PBS 投与群と比較し、投与開始から 1 週間での体重の推移 (図 1A)、マウス 1 匹あたりの平均 1 日摂餌量 (図 1B)、最終投与 24 時間後の臓器 (肝臓、腎臓、脾臓) 重量 (図 1C) のいずれについても有意な変化は認められなかった。

次に、各非晶質ナノシリカを投与したマウスに対し、経口ブドウ糖負荷試験を実施したところ、nSP100 投与群では対照群と比較して有意な変動は認められなかったものの、nSP30 投与群において、摂取 15 分後の血糖値が減少することが明らかとなった (図 1D)。また、各測定値をグラフにプロットして直線をつなぎ、各曲線下面積の総和を AUC として算出し、各群を比較したところ、nSP30 投与群において、対照群と比較して、有意な変動は認められなかったものの小さくなる傾向にあることが示された (図 1E)。一方で、ブドウ糖負荷時の血中インスリン濃度を比較したところ、nSP30 投与群において、対照群と比較して、有意な変動は認められなかったものの低い傾向を示した (図 1F)。今後、非晶質ナノシリカの投与量依存性と他の粒子サイズのものを実験に供することで、本結果について精査すると共に、インスリン負荷試験などにより非晶質ナノシリカがインスリン抵抗性におよぼす影響の解析、また、インスリン分泌に関わる膵臓や投与局所における組織学的評価を実施することで、本結果のメカニズム解明を進める。さらには、前年度研究成果を踏まえ、非晶質ナノシリカによるマクロファージの活性化の観点からのメカニズム解明を試みる予定である。

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. Yamaguchi S., Isaka R., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles suppress retinoic acid-induced neuronal differentiation in human-derived neuroblastoma SH-SY5Y cells., ACS Appl. Nano Mater., 5: 19025-34, 2022.
2. Sakahashi Y., Yamamoto R., Kitahara G., Izutani R., Tsujino H., Haga Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Amorphous silica nanoparticles decrease human chorionic gonadotropin β expression during syncytialization of BeWo cell., BPB Reports, 5(6): 154-8, 2022.
3. Sakahashi Y., Higashisaka K., Isaka R., Izutani R., Seo J., Furuta A., Yamaki-Ushijima A., Tsujino H., Haga Y., Nakashima A., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles suppressed forskolin-induced syncytialization in BeWo cells., Nanotoxicology, 16(9-10):

883-94, 2022.

【総説・その他】

1. Higashisaka K. : Health effects and safety assurance of nanoparticles in vulnerable generations., Biol. Pharm. Bull, 45(7): 806-12, 2022.
2. 東阪和馬, 山下琢矢 : 化学物質のヒト健康影響評価とリスク解析の今後～若手研究者目線で～. Yakugaku Zasshi. 143(2): 119-20, 2023.
3. 東阪和馬 : ヒトの健康へのリスク解析に資するナノマテリアルの神経細胞分化におよぼす影響とその機序解明. Yakugaku Zasshi. 143(2): 133-8, 2023.

4. 学会発表

【シンポジウム等】

1. 東阪和馬 : 食品中ナノマテリアルの安全性評価 : 安全なナノマテリアルの創製に向けた脳神経機能への影響評価., 第 49 回日本毒性学会, 札幌 (北海道), 2022 年 7 月. (シンポジウム : 食品安全に資する食品・食品添加物の健康影響評価と品質評価法の基盤開発)
2. 東阪和馬, 堤 康央 : ナノマテリアルの安全性評価について. 第 24 回医薬品品質フォーラムシンポジウム, 東京 (東京), 2023 年 2 月. (シンポジウム : 欧州での食品添加物としての二酸化チタンの使用停止と医薬品規制への波及)
3. 東阪和馬 : ナノ粒子による胎盤毒性と次世代への影響., 日本薬学会第 143 年会, 札幌 (北海道), 2023 年 3 月. (シンポジウム : 微粒子疾患の発症に関わる生体機構の解明と制御法開発)

【国内学会発表】

1. 東阪和馬, 小椋万生, 衛藤舜一, 櫻井美由紀, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : 非晶質ナノシリカの鼻腔を介した吸入曝露が免疫系におよぼす影響の評価., 日本薬剤学会第 37 年会., オンライン, 2022 年 5 月.
2. 東阪和馬, 衛藤舜一, 小椋万生, 櫻井美由紀, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : 化粧品中ナ

ノマテリアルの安全性評価 : 獲得免疫系を介した非晶質ナノシリカのハザード解析とその発現機序解明., 第 47 回日本化粧品学会., 東京 (東京), 2022 年 6 月.

3. 坂橋優治, 東阪和馬, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 北原 剛, 小林純大, 仲本有里菜, 山本怜奈, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : 活性酸素種の誘導を介した銀ナノ粒子による胎盤合胞体化の抑制., 第 49 回日本毒性学会, 札幌 (北海道), 2022 年 6 月.
4. 東阪和馬, 坂橋優治, 北原 剛, 泉谷里奈, 小林純大, 仲本有里菜, Seo Jiwon, 山本怜奈, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : ナノ粒子が胎盤細胞の合胞体化におよぼす影響評価., フォーラム 2022., 熊本 (熊本), 2022 年 8 月.
5. 坂橋優治, 東阪和馬, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 北原 剛, 小林純大, 仲本有里菜, 山本怜奈, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : 胎盤形成段階の細胞合胞体化に着目したナノマテリアルの影響評価., 第 21 回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフォーラム 2022., 名古屋 (愛知), 2022 年 9 月.
6. 奥村 萌, 芳賀優弥, 小西弘登, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央 : 非晶質ナノシリカの細胞内取り込みと経鼻投与後の動態評価., 日本薬学会第 143 年会., 札幌 (北海道), 2023 年 3 月.
7. 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 : 非晶質ナノシリカによる妊娠転帰への影響と炎症応答との関連追究., 日本薬学会第 143 年会., 札幌 (北海道), 2023 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

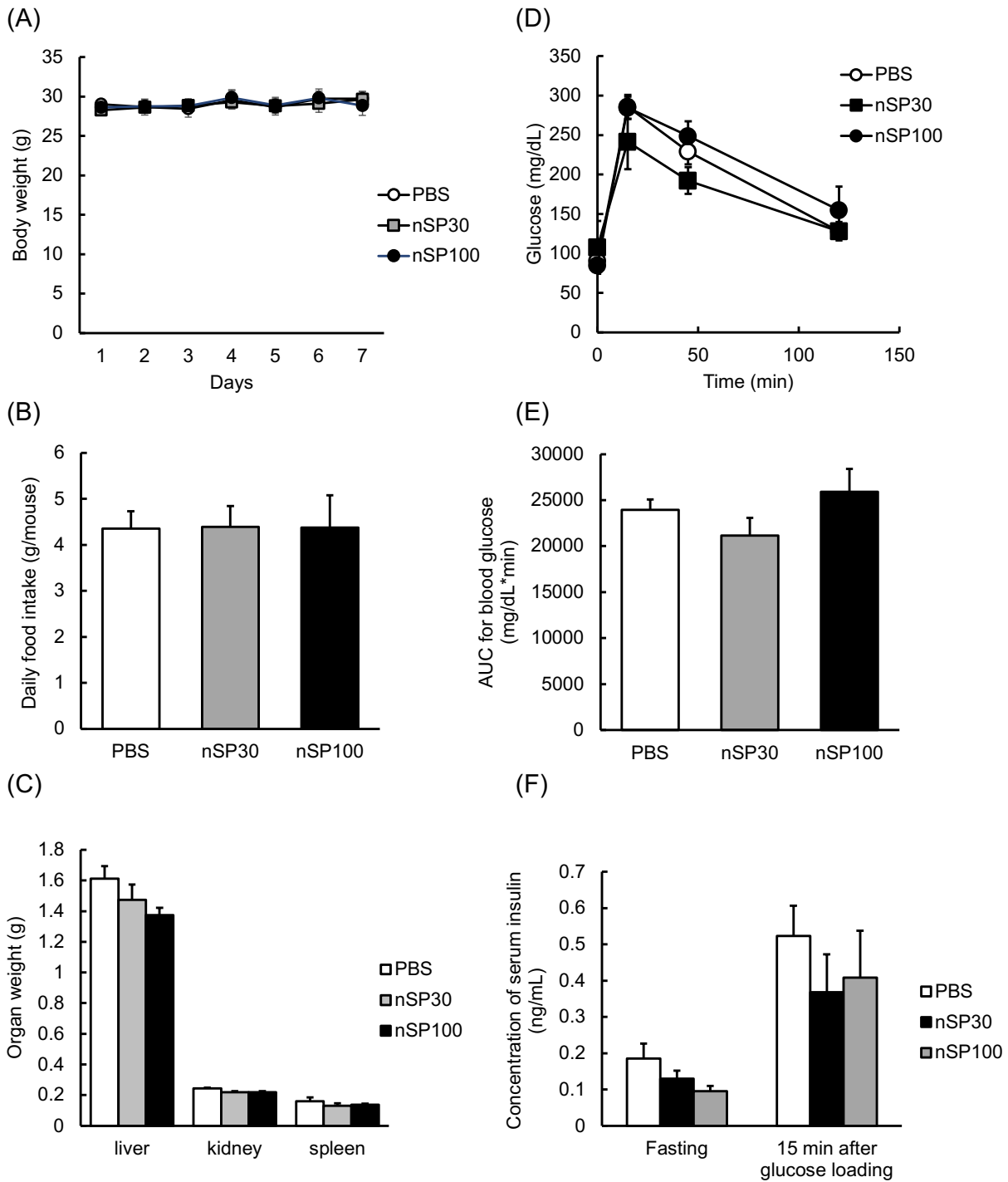


図1：非晶質ナノシリカの経口曝露による耐糖能およびグルコース応答性インスリン分泌能への影響評価

雌性ICRマウス (n = 4-6) に、nSP30、nSP100を2.5 mg/mouse/dayで7日間連日経口投与した。(A) 投与開始から1週間での体重の推移、(B) マウス1匹あたりの平均1日摂餌量、(C) 最終投与24時間後の肝臓、腎臓、脾臓重量を測定した。(D) 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、血糖値を測定すると共に、(E) 試験中の血糖におけるArea Under the Curveを算出した。また、(F) ブドウ糖溶液の経口投与前、および、投与15分後の血中インスリン濃度を定量解析した。