

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、保存吸湿剤/着色料としてのナノマテリアルを含有しない加工食品はない。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はや避けられない。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、（1）内分泌代謝機能に対するハザード解析と共に、（2）エネルギー代謝制御に着目した、生体応答メカニズムの解明を試みる。そのうえで、（3）ナノマテリアルの物性-動態-ハザードの連関解明・閾値追究を図り、統合的に評価することで、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。

2021年度研究では、（1）ナノマテリアルの経口曝露後の内分泌代謝機能への影響に関して、①通常食を摂取させたマウスに対し、各種粒子径の非晶質ナノシリカを28日間連日経口投与した際には、食後血中グルコース濃度、ならびに、血中トリグリセリド濃度に有意な変化は認められないことを示した。また、（2）エネルギー代謝制御に着目した、生体応答メカニズムの解明に関しては、マクロファージに焦点をあて、非晶質ナノシリカがエンドサイトーシス経路の機能とマクロファージの活性化におよぼす影響を評価し、非晶質ナノシリカが、その物性によっては、②蛋白質との複合体を形成させることで、ヒト単球細胞株であるTHP-1を活性化させること、③初期エンドソームマーカーであるEEA1の発現増加とリソソーム内pHの上昇を引き起こし、初期エンドソームの蓄積など、エンドサイトーシス経路の輸送能に影響をおよぼし得ることを明らかとした。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。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。

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、保存吸湿剤/着色料としてのナノマテリアルを含有しない加工食品はない。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はや避けられない。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。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-生体応答の体系的な連関追究を図り、その生体応答解析、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、(1) 内分泌代謝機能に対するハザード解析と共に、(2) エネルギー代謝制御に着目した、生体応答メカニズムの解明を試みる。そのうえで、(3) ナノマテリアルの物性-動態-ハザードの連関解明・閾値追究を図り、統合的に評価することで、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 10 nm、30 nm、50 nm、100 nm の非晶質ナノシリカ (nSP10、nSP30、nSP50、nSP100)、粒子径 1000 nm の非晶質シリカ (SP1000) 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

BALB/c マウス (6-8 週齢、雄性) は、日本 SLC 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。

生化学検査による各血中検査値の測定

BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性) に対し、PBS 溶液で 12.5 mg/mL に調製した nSP30、nSP100、SP1000 をマウスに強制経口投与し (2.5 mg/200 μ L/mouse/day)、28 日連日経口投与した。対照群には PBS 溶液を投与した。これらマウスにおける 28 日間の体重及び食餌量の推移を測定した。最終投与の 24 時間後に血液を採取し、4 $^{\circ}$ C、3000g で 15 分遠心処理することで、血漿を回収した。得られた血漿を用いて、血中グルコース、トリグリセリド、クレアチニン、BUN の濃度を DRI-CHEM (FUJIFILM) により測定した。

培養細胞

ヒト単球細胞株 (THP-1 細胞株) は、American Type Culture Collection より購入した。維持培養には、56 $^{\circ}$ C、30 分間の非働化処理を施した 10% ウシ胎児血清、Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Suspension、0.1% 2-mercapoethanol を含む RPMI 培地で 37 $^{\circ}$ C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で培養した。

エンドソーム関連蛋白質の発現変動

THP-1 細胞株は PMA 0.5 μ M 入りの培地を用いて 2.0×10^5 cells/mL にそれぞれ調製後、6 well plate に 2 mL/well で播種し、37 $^{\circ}$ C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で 24 時間培養した。その後、非晶質ナノシリカを終濃度 25 μ g/mL で添加した後、HALT Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific) 含有の RIPA buffer を用いて細胞内蛋白質を回収し、ウエスタンブロッティングに供した。

マクロファージの活性評価

THP-1 細胞を 1.0×10^6 cells/well で播種し、各濃度に調製した被験物質を添加し、37 $^{\circ}$ C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で培養した。被験物質の添加濃度は、細胞生存率が 75% になる濃度 (CV75) を事前に求め、公比 1.2 で CV75 の上 1 点、下 3 点の計 5 点の濃度点で添加した。24 時間後に細胞を回収し、 0.3×10^6 cells ずつ 96 well round bottom に移した。得られたサンプルを

4℃, 250 g の条件下で 5 分間遠心し、上清を除いた後、FITC 標識 IgG1 抗体、FITC 標識 CD54 抗体、FITC 標識抗 CD86 抗体を加え、冷暗所で 30 分インキュベーションした。測定前に 20 μL の Propidium Iodide solution を加え、BD FACSAria (BD Biosciences) を用いて PI 蛍光を測定した。感作の有無の判定は、得られた蛍光強度から、溶媒添加群を Reference とした相対蛍光強度を算出し、CD86 の RFI が 150 以上、CD54 の RFI が 200 以上の判定基準をどちらかが超えたものを陽性と判定した。

(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

近年、高齢者だけでなく若年層においても、肥満や糖尿病などに代表される代謝性疾患の患者数は増加の一途を辿っている。これら疾患のリスクにつながる内分泌代謝機能の攪乱に関わる要因として、現代における環境的要因の急激な変化

が注目されている。環境的要因としては、食の欧米化をはじめとした生活習慣の変化や環境中の化学物質への曝露などが挙げられ、さらに昨今の疫学研究では、PM2.5 などの生体外微粒子への曝露が糖尿病の発症リスクを上昇させるなど、微粒子曝露に起因した内分泌代謝機能への影響が注目されている。近年では、ナノテクノロジーの進展に伴い、ナノマテリアルが利用拡大されており、我々はナノマテリアルの日常的な曝露を避け得ず、その安全性評価研究の推進が急務である。しかし、内分泌代謝機能への影響に関する知見は乏しく、安全性確保の観点からもリスク解析に資するハザード同定が求められる。

そこで本研究では、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粒子として用いて、非晶質ナノシリカが内分泌代謝機能に及ぼす影響評価を試みた。通常食を摂取させたマウスに対し、各種粒子径（30 nm、100 nm、1000 nm）の非晶質シリカ（それぞれ、nSP30、nSP100、SP1000 と表記）を 28 日間連日経口投与した際には、食後血中グルコース濃度（図 1A）、血中トリグリセリド濃度（図 1B）、血中 BUN 濃度（図 1D）に有意な変化は認められなかった。また、血中クレアチニン濃度については、各非晶質シリカ投与群において、対照群と比較し、有意に減少することが示された（図 1C）。血清クレアチニンの低値は 2 型糖尿病の発症リスク因子になりうることが報告されているものの、今回の結果だけでは議論の余地がある。従って今後は、生化学的な解析のみならず、これらマウスに対する耐糖能やインスリン抵抗性について評価すると共に、高脂肪食を負荷させて代謝機能異常を引き起こした状態のマウスを供することで、ナノマテリアル曝露による代謝機能への影響について精査していく。

非晶質ナノシリカがマクロファージにおけるエンドサイトーシス経路の機能におよぼす影響

一般に、エンドサイトーシス経路は、ナノマテリアルをはじめとする外来の生体異物の取り込み・分解経路として知られていると共に、細胞内のシグナル伝達にも利用されることから、エンドサイトーシス経路の機能破綻は、疾患の発症・進展への関与が示唆されている。また、マクロファージは、肥満による炎症の誘導と遷延化、それに伴うインスリン抵抗性の病態形成において重要な役割を果たすことが知られている。そこで、非晶質ナノシリカがエンドサイトーシス経路の機

能におよぼす影響について、粒子径 10 nm、50 nm、100 nm の非晶質ナノシリカ (nSP10、nSP50、nSP100) をヒト単球細胞株である THP-1 に 72 時間曝露し、初期エンドソームマーカー (EEA1)、後期エンドソームマーカー (Rab7)、リソソームマーカー (LAMP1)、リサイクリングエンドソームマーカー (Rab11) の発現変動をウエスタンブロットティングにより解析することで、エンドソームやリソソームの数や大きさへの影響を評価した。解析の結果、初期エンドソームマーカーである EEA1 が発現増加しうることが示された (図 2A)。また、エンドサイトーシス経路の主要な機能である分解能について、各非晶質ナノシリカを 24 時間曝露し、pH 感受性の蛍光物質である Acridine Orange によりリソソームの pH に及ぼす影響を評価したところ、nSP50 を処置した群において、リソソーム内 pH の上昇傾向が示された (図 2B)。従って、非晶質ナノシリカは、その物性によっては、初期エンドソームの蓄積など、エンドサイトーシス経路の輸送能に影響をおよぼし得ること、また、nSP50 曝露により、リソソーム内腔の pH 上昇に伴う分解能の低下が示唆された。

非晶質ナノシリカがマクロファージの活性化におよぼす影響

非晶質ナノシリカがマクロファージの活性化におよぼす影響について、nSP50 を THP-1 に 24 時間曝露し、細胞表面マーカーである CD86、CD54 の発現量をフローサイトメトリーにより解析した。さらに、ナノマテリアルは生体内で蛋白質と結合し、プロテインコロナを形成することが報告されており、これらプロテインコロナの形成は、ナノマテリアルの生体内での動態や生体応答を規定し得ることを踏まえ、粒子そのものによる影響のみならず、粒子と結合する蛋白質がマクロファージの活性化に及ぼす影響をも考慮する必要があると考えた。そこで、nSP50 を予めヒトプール血清と混合したうえで THP-1 に曝露する群を設定した (protein corona of nSP50-core)。その結果、nSP50 単独処置時には細胞表面マーカーの活性は認められなかったものの (図 2C)、蛋白質との複合体を形成させることで、設定した 5 点の濃度点全てにおいて CD86、CD54 の RFI が基準値を超え、THP-1 を活性化させることを明らかとした (図 2D)。従って、nSP50 がマクロファージの活性化を引き起こすこと、加えて、

nSP50 そのものではなく、粒子に結合した蛋白質に起因し得ることが示唆された。

そこで現在、非晶質ナノシリカの曝露が、マクロファージの活性化を介した、肥満による炎症応答の誘導やインスリン抵抗性の形成に関与する可能性を視野に、ナノマテリアルの内分泌代謝機能に対する影響評価について進めている。

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. Eto S., Koshida A., Tsujino H., Nagano K., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Silica particles with human protein corona shows sensitization potential in the human cell line activation test., BPB Reports, 5(1): 1-4, 2022.
2. Eto S., Higashisaka K., Koshida A., Sato K., Ogura M., Sakurai M., Tsujino H., Nagano K., Tsutsumi Y. : Amorphous silica nanoparticles exacerbate hepatic damage through the activation of acquired cell-mediated immunity., Nano Express, 3(1): 015002, 2022.

【総説・その他】

1. 東阪和馬, 芳賀優弥, 辻野博文, 堤 康央: 微粒子曝露と脆弱な世代への健康影響～胎盤毒性/動態解析を例に～., BIO Clinica., 37 (1), 59-63, 2022.

2. 学会発表

【シンポジウム等】

1. 東阪和馬, 芳賀優弥, 辻野博文, 長野一也, 堤 康央: 非晶質ナノシリカによる胎盤毒性とその誘導機序解明., オンライン, フォーラム 2021., 2021年9月.
2. 東阪和馬: 物性-動態-毒性の連関解析に基づく、脆弱な世代へのナノ粒子の健康影響評価と安全性確保., 日本薬学会第142年会., 名古屋(愛知), 2022年3月.
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., 日本薬学会第142年会, 名古屋(愛知), 2022年3月. (シンポジウム: 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～)

【国内学会発表】

1. 坂橋優治, 東阪和馬, 泉谷里奈, 井阪 亮, 山口慎太郎, 清本琴淑, 北原 剛, 小林純大, 芳賀優弥, 辻野博文, 長野一也, 堤 康央: BeWo細胞合胞体化モデルを活用した胎盤形成過程に対するナノマテリアルの安全性評価., 第46回日本香粧品学会., オンライン, 2021年6月.
2. 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: ナノマテリアルの胎盤毒性解析に向けて-銀ナノ粒子が誘導する胎盤細胞の合胞体化抑制における活性酸素種の関与., 日本薬学会第142年会., 名古屋(愛知), 2022年3月.
3. 奥村 萌, 芳賀優弥, 小西弘登, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央: 神経細胞における非晶質ナノシリカの動態評価., 日本薬学会第142年会., 名古屋(愛知), 2022年3月.
4. 山本怜奈, 東阪和馬, 北原 剛, 小林純大, 仲本有里菜, 坂橋優治, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: ナノマテリアルの胎盤毒性解析に向けて-非晶質

ナノシリカ曝露による胎盤ホルモン産生への影響., 日本薬学会第142年会., 名古屋(愛知), 2022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

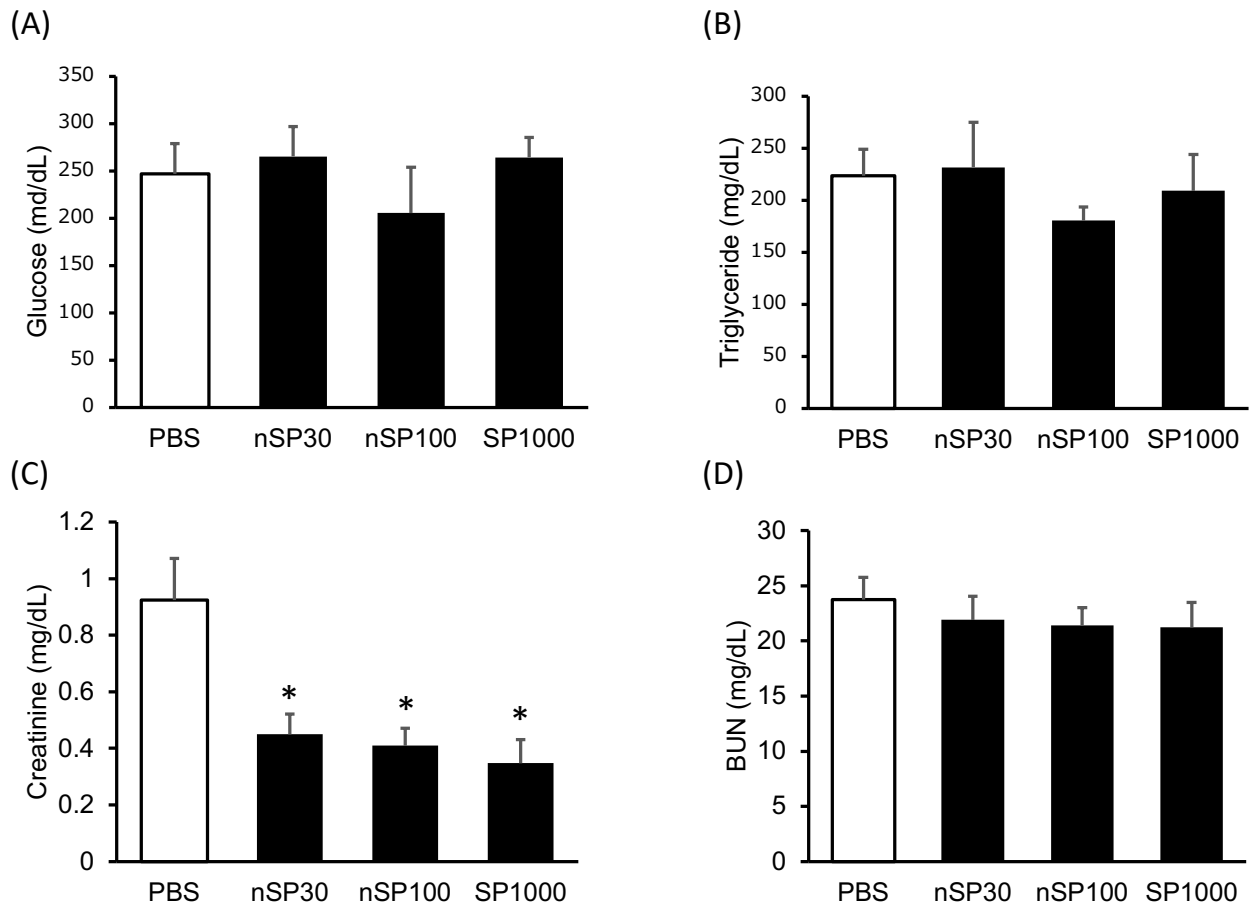


図1：非晶質シリカの経口曝露による内分泌代謝機能への影響評価

BALB/cマウス（雄、 $n = 5$ ）に、nSP30、nSP100、SP1000を2.5 mg/mouse/dayで28日間連日経口投与した。最終投与の24時間後に血液を採取し、（A）グルコース、（B）トリグリセリド、（C）クレアチニン、（D）BUNの血中濃度をDRI-CHEMにより測定した。* $P < 0.05$ vs PBS by Dunnett's method

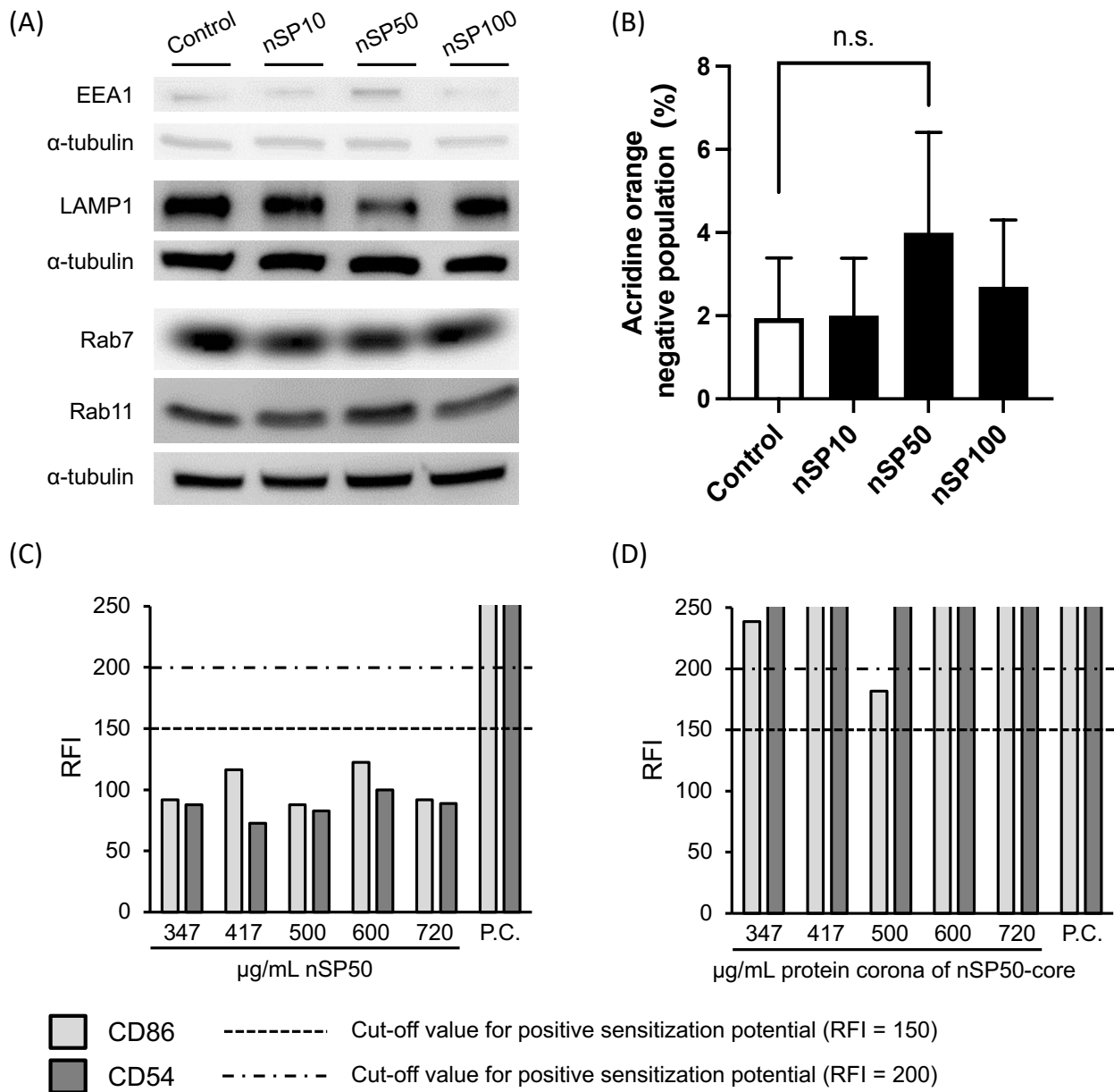


図2：非晶質ナノシリカがエンドサイトーシス経路の機能とマクロファージの活性化におよぼす影響

(A) THP-1に、nSP10、nSP50、nSP100を25 μ g/mLで72時間処置し、初期エンドソームマーカー (EEA1)、後期エンドソームマーカー (Rab7)、リソソームマーカー (LAMP1)、リサイクルエンドソームマーカー (Rab11) の発現変動をウエスタンブロットングにより解析した。(B) THP-1にnSP10、nSP50、nSP100を25 μ g/mLで24時間処置し、Acridine OrangeによりリソソームのpHに及ぼす影響を評価した。(C) nSP50あるいは(D) ヒトプール血清と予め混合したnSP50をTHP-1に24時間曝露し、細胞表面マーカーであるCD86、CD54の発現量をフローサイトメトリーにより解析した。各サンプルの相対蛍光強度 (RFI) は、溶媒処理グループを参照として使用して計算した (P.C.; ポジティブコントロール)。CD86 \geq 150のRFI (破線) またはCD54 \geq 200のRFI (一点鎖線) の3つ以上の濃度点を超えた場合、被験物質の活性は陽性とみなした。