

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670309

研究課題名(和文)加工食品に添加されるナノ粒子状物質の全身性免疫変容作用についての研究

研究課題名(英文) Immunomodulating effects on nano size particles which used as food additives.

研究代表者

吉田 貴彦 (Yoshida, Takahiko)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90200998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：食品添加物として一般的に用いられている、ナノ粒子サイズの酸化チタン(20nmおよび200nm)を添加した動物実験固形飼料を、B6C3F1雌マウスに50日間にわたって自由摂取させた。安楽死後、脾臓を摘出し単離浮遊脾細胞を調整し、基礎的な免疫応答を評価した。LPS刺激リンパ球幼若化応答において、優位差が認められなかったものの濃度依存的な抑制が認められた。ナノ粒子酸化チタンが食品添加物や薬剤カプセルなどに一般に持ちいられていることから、食の安全の観点からも消化管免疫などの局所免疫応答についてのさらなる検証が必要と考える。

研究成果の概要(英文)：We prepared the animal pellet food contained nano size particles (20nm and 200nm) of titanium oxide and gave to experimental mice for 50 days. After the exposure period, we obtained the spleen and prepared single cell suspension and used for the basic test of immune responses. We detected the immune depressive effect among 20nm titanium oxide particle exposed group in dose-dependently although it was not significant. At the standing point of view of food safety, we have better to evaluate the effects on local immune system/response such as gastrointestinal immunity of nano size titanium oxide particles.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学公衆衛生学

キーワード：ナノ粒子 酸化チタン 食品添加物 免疫応答 免疫抑制

1. 研究開始当初の背景

生体外からの化学物質の吸収経路は、消化管、呼吸気道、皮膚が主であり、生体に必須物質として吸収されるのは消化管からの栄養素と水分、呼吸気道からの酸素のみである。生体外からの有害物質の吸収は、当該物質の物理特性としての水への溶解度（皮膚においては脂溶性も関与する）が大きく影響する。この水溶解度は化学物質の特性に左右される。また、同じ化学物質の場合には、その物理特性が関与し、単位重量当たりの溶解度は粒径に依存し、小さく表面積が広い場合は溶解しやすいがために吸収が早く生体内濃度が高濃度となりやすく毒性が現れやすい。一方、難溶性物質は粒径にかかわらず吸収されないと考えられていた。すなわち、従来の毒性学的な発想では、生体内への侵入を規定するのは、主に化学物質の化学特性によって規定されており、水溶性物質（皮膚においては脂溶性物質も）が比較的容易に取り込まれる一方、難溶性物質の場合、肺泡に到達したミクロン・サイズの粒子が肺マクロファージに貪食されて移動することで肺間質に入る以外には体内侵入は起こらないとされてきた。

しかし、ナノ粒子の概念が導入されて状況が一変し、ナノ粒子はそのままの形態を保って生体内に侵入しうることが分かってきた。その発端は大気汚染物質でもあるディーゼル排気に含まれるナノ粒子が肺胞上皮細胞および肺毛細血管内皮を通過し、全身血流を介して運搬され血管内皮に取り込まれ動脈硬化を促進するとの報告である。そのため、ナノ粒子の安全性評価は局所障害のみならず全身への影響（全身障害）を考慮しなければならず、新たな生体影響対象物としての安全性評価が必要となった。

ナノ粒子の経気道吸収は職業性曝露の観点から研究され、また、経皮吸収については日焼け止めなどの化粧品にナノ粒子が用いられ始めたことから皮膚透過性について検討され化粧品安全の観点から研究が進んでいる一方、経消化管吸収については治療薬の吸収効率を高めるための高分子ナノカプセルを応用した薬物デリバリーに関する研究が多くなされている反面、有害性ナノ粒子についての研究報告は殆んど見られない。それにも拘わらず、酸化チタン・ナノ粒子が酸化チタンそのものの化学・物理学的特性における安定性の高いことを理由に、生体影響はなく安全と考えられ食品添加物として用いられている現実がある。

2. 研究の目的

酸化チタン粉末は、顔料、触媒、研磨剤など様々な用途で用いられている。酸化チタンは化学的安定性から着色料（白色顔料）として食品添加物リストに収載されている。しか

し酸化チタン微粒子（ナノ粒子）を経口投与されたマウスの腸管組織に粒子が侵入し、腸管壁局所で Th 1 型アレルギーにかかわる液性因子発現の上昇と炎症性細胞群の増加が報告されている（CM. Nogueira, W. J. Gastroentol., 2012）。

一方、全身影響についての報告は、酸化チタン微粒子の経気道曝露では動脈硬化などへの関与（G. Oberdorstrer et al., INIS Monpg., 2004; WG. Kreyling, J. Aer. Med., 2005）が報告されているものの、経消化管曝露における検討報告は無い。

そこで、申請者が国内において先駆的に取組んできた免疫毒性的手法を用いて、外来異物排除にかかわる免疫応答、アレルギー応答、消化管由来エンドトキシンに対する肝クッパー細胞応答を指標として、酸化チタン・ナノ粒子の経消化管曝露による全身影響を動物実験（マウス）にて明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

1) 酸化チタン粒子の曝露

食品添加物として一般的に用いられている、ルチル型二酸化チタンの粒径の異なる2種のナノ粒子（20nm および 200nm）を、高濃度（5 mg/g）、低濃度（0.5mg/g）の2濃度で添加した動物実験固形飼料を、動物用飼料製造メーカーに委託して作成した。

日本クレア（株）から購入した SPF、B6C3F1 雌マウス、6 週令を 2 週間馴化飼育した後、各群 6 匹にランダムにわけ、同一ケージにて 50 日間にわたって酸化チタン含有動物実験固形飼料を自由摂取させ酸化チタン曝露を行った。対照群には二酸化チタンを含まない動物実験固形飼料を与えた。

全ての群に、滅菌蒸留水を与えた。

曝露期間、マウスの体重測定と外表等健康状態を観察した。

2) 酸化チタン粒子の分布の確認

二酸化チタン・ナノ粒子曝露後、マウスを二酸化炭素深麻酔下に安楽死させ、腸管壁、肝、脾を得て、ナノ粒子の存在について金属チタン含有量を原子吸光高度法ないし電子顕微鏡的に確認する。

3) 全身性免疫応答の変容の評価

i) 抗体産生応答

二酸化チタン・ナノ粒子曝露後、羊保存赤血球（SRBC）を生理食塩水にて 10%v/v に調整し 0.2ml をマウス腹腔内に投与し感作を行い、4 日目に安楽死させ脾臓を摘出した。

脾細胞浮遊液を調整し、Jerne 法に基づき抗原として用いた SRBC とともに精製寒天に封入後 4 時間 37 °C にて培養し、10%精製モルモット補体を加え 1 時間培養後に出現した溶血斑を肉眼にて計測した。

ii) リンパ球幼若化応答

二酸化チタン・ナノ粒子曝露後、安楽死させ無菌的に脾臓を摘出した。ペニシリン・ストレプトマイシン添加、液体培養液 RPMI1640 にて $1 \times 10^6/\text{ml}$ に脾細胞浮遊液を調整し、96 穴平底マイクロプレートに 0.1ml ずつ分注した。Mitogen として $50 \mu\text{g/ml}$ リポポリサッカライド (LPS)、または $50 \mu\text{g/ml}$ コンカナバリン A (ConA) のそれぞれ $10 \mu\text{l}$ を加えて、37、5%炭酸ガス雰囲気にて 48 時間培養した。培養終了後、 $100 \mu\text{M}$ の BrdU を $10 \mu\text{l}$ 加えさらに 2 時間培養した。

培養増殖細胞に thymidine アナログとして取込まれた BrdU を ELISA にて測定した。

iii) 脾細胞分画

二酸化チタン・ナノ粒子曝露後、マウスを安楽死させて脾臓を摘出した。脾細胞浮遊液を赤血球除去用トリス緩衝液にて処理後、 $1 \times 10^7/\text{ml}$ に調整し、適度の濃度にした蛍光色素標識抗体を反応させた。用いた抗体は、T 細胞マーカーとして Thy1.2、B 細胞マーカーとして、B220、ヘルパー T 細胞 (Th) および細胞傷害性 T 細胞 (Tc) 細胞に対して anti-mouse CD4+CD8, FITC/PE 抗体を用いた。標識抗体を反応させた後、フローサイトメータにて解析を行った。

4. 研究成果

酸化チタン・ナノ粒子 200nm、20nm のそれぞれ 0.5 および 5mg/g の各群曝露マウスの消化管壁などの局所および各臓器・組織におけるナノ粒子の確認は、準備段階である。

抗ヒツジ赤血球 in vitro 抗体産生応答は、酸化チタン・ナノ粒子 200nm、20nm 曝露群のそれぞれ 0.5 および 5mg/g の各群において、対照群との間に有意な差は認められなかった。

経気道曝露によるナノ粒子の生体内への侵入が 100nm を境界として観察されるとの報告があることから、以下の実験では酸化チタン・ナノ粒子の径 20nm について検討を行うこととした。

脾細胞を用いたリンパ球幼若化応答において、LPS 刺激による各群の stimulation index (SI) に有意差は見られなかったものの曝露濃度依存的に低くなり、脾臓リンパ球のうち特に B 細胞の増殖活性の抑制が示唆された。一方、ConA 刺激による SI は各群で差が見られなかった。

また、脾細胞リンパ球亜分画解析において、免疫バランスの指標となる Th 細胞と Tc 細胞の比率を、CD4/CD8 陽性細胞比率を見たところ各群で差が見られなかった。

局所リンパ節アッセイ (LLNA) 法による、遅延型アレルギー起因代表化学物質としてのオキサゾロン、即時型アレルギー起因代表化学物質としてのトリメリト酸を用いた、感作成立段階への酸化チタン・ナノ粒子曝露変

容作用について、現在、検証中である。

肝薄切エンドトキシン応答については、実験準備段階にある。

今回、ナノ粒子が従来の化学物質としての生体影響と異なった動向を示し、その一部に健康にとって有害との報告がされるようになっているにも関わらず、酸化チタン・ナノ粒子が食品添加物や薬剤カプセルなど白色の色素として一般に用いられていることから、国民の食の安全確認の観点から萌芽的研究として基本的な免疫毒性学的な評価を試みた。また、初期段階の実験であり、例数も少ない中での検討であるが、免疫変容が起きている可能性は否定できなく、消化管免疫などの局所免疫応答についてのさらなる検証が必要と考える。

ナノ粒子の実験の難しさは粒子が凝集することで粒径が増し、生体内に取込まれにくくなるのが指摘されている。経気道曝露の場合には、空気中に浮遊する状態にある一方、経消化管曝露では、飲食物と共存することから、さらに凝集が起り易いと考えられる。今回、酸化チタン・ナノ粒子を動物用固形飼料に混入して曝露を行ったが、曝露マウスの消化管内でのナノ粒子の動向については検証していない。これらについても検証する必要がある。また、腸管壁の吸収局所から、門脈、リンパ系を介しての免疫担当細胞・組織へのナノ粒子の分布についても早急に検証する必要がある。それにより、酸化チタン・ナノ粒子の消化管壁局所での異物反応に基づく液性生物活性物質を介した免疫担当細胞・組織での免疫応答変容と、生体内侵入後にナノ粒子が免疫担当細胞・組織に到達しての直接作用に基づく免疫応答変容が区別しうると考えられる。

免疫応答は複雑な機序によって制御されることから外来有害因子の影響を受けやすく、免疫指標は感度の良い生体影響指標と考えられ、さらに免疫応答・免疫機構が生体維持の重要な機能を担うことから、消化管曝露の全身影響について免疫毒性の立場から検証することは意義深いものである。食の安全が求められる昨今、食品添加物について多面的に安全性を検証することは国民の公衆衛生上、意義が大きいと考えられる。今後も研究を継続することで「食の安全」の観点から、食品添加物の認可の基準について「粒子径」といった物的特性を盛り込むことを提言したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者：吉田貴彦 (YOSHIDA,
Takahiko)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：90200998

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし