

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560066

研究課題名(和文) ナノ粒子が引き起こす腸内細菌叢の生態系変化と生体恒常性に与える影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the changes in the intestinal flora and the effects on the homeostasis caused by food additive nanoparticles

研究代表者

徳本 勇人 (Tokumoto, Hayato)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70405348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ粒子の製造技術の進歩に伴い、食品添加物ナノ粒子が多数市販されるようになった反面、そのリスクも懸念され始めている。そこで、公称径0.5 $\mu\text{m}$ のアナターゼ型TiO<sub>2</sub> NPsと公称径0.8 $\mu\text{m}$ のSiO<sub>2</sub> NPs、および公称径0.3 $\mu\text{m}$ のFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPsの3種類のNPsをマウスに経口投与し、排出された糞を腸内細菌叢として解析を行った。その結果、食品添加物ナノ粒子は、可溶性で粒径の小さなものほど、過剰摂取によって腸内細菌叢の構造が大きく変化し、下痢の原因菌であるClostridiaceaeを優勢化することで、消化器官に関連する疾病に繋がる恐れのあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Development of nanoparticle (NP) production have resulted in the appearance of numerous food additive NPs in the market. However, there are concerns about the risks of consuming these NPs. In this research, to study the effects of these NPs on the intestinal flora, three types of NPs, namely, anatase TiO<sub>2</sub> NPs with a nominal particle size of 0.5 $\mu\text{m}$ , SiO<sub>2</sub> NPs with a nominal particle size of 0.8 $\mu\text{m}$ , and Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs with a nominal particle size of 0.3 $\mu\text{m}$  were orally administered to mice, and the feces excreted were analyzed for intestinal flora. From the result indicate that, excessive consumption of soluble food additive NPs with a small particle size cause great changes in the composition of the intestinal flora, and there is a risk that these could lead to digestive tract disorders because of the increasing predominance of Clostridiaceae species.

研究分野：生物工学

キーワード：腸内細菌 菌叢解析 嫌気発酵

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ粒子 ( NPs ) は広く市販され、食品添加物 NPs としてもその利用用途が広がっている。一方で、NPs が消化管壁に付着して起こる炎症や NPs による腸内細菌の変化等、そのリスクも取り上げられている。腸内細菌叢は生体活性に密接に関わっており、菌叢が変化すると下痢や腸炎を引き起こす。そのため、食品添加物 NPs の市販化と同時に、腸内細菌叢に及ぼす影響の解析は急務である。よって、本研究では、食品添加物 NPs が腸内細菌叢に与える影響の網羅的解析を行う。

## 2. 研究の目的

本来、食品添加物の摂取量については、安全基準が設けられている。しかし、粒子径がナノサイズ化すると、同一質量に対して、粒子の個数は増大し、総表面積 ( 界面積 ) も増大する。そのため、摂取量だけでは推し量れない影響が、生体に対して生じることが懸念される。そこで本研究では、腸内細菌叢を取り上げ、ナノ粒子がその菌叢構造を変化させるのかどうか、粒子径、摂取量の違いを比較して、評価解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) TiO<sub>2</sub>、SiO<sub>2</sub>、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs の経口投与実験

公称径 0.5 μm のアナターゼ型 TiO<sub>2</sub> NPs と公称径 0.8 μm の SiO<sub>2</sub> NPs、および公称径 0.3 μm と 1.0 μm の Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs の 3 種類の NPs について検討を行った。マウスの粉末飼料に、TiO<sub>2</sub> NPs は 0.05, 0.15, 1.0 %、SiO<sub>2</sub> NPs は 0.05, 0.15, 1.0 %、粒径 0.3 μm の Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs は 0.014, 0.14%、粒径 1.0 μm の Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs は 0.007, 0.07% の含有率で混練し、飼料を調製した。この飼料をマウスに給餌し、排出された糞便に含まれる腸内細菌叢の発酵挙動と構成菌種の変動を解析した。マウスの健康状態は、体重変化と糞便の含水率を指標にした。

### (2) 腸内細菌叢の構造変化

腸内細菌の DNA は MORA-EXTRACT kit を用いて抽出した。抽出した DNA を鋳型として PCR

を行い、16S rRNA 遺伝子の可変領域である V3-V4 領域、約 460 bp の DNA 断片を増幅した。その後、次世代シーケンサーを用いて、PCR 産物の塩基配列を読み取り、腸内細菌叢内の構成微生物種の同定や存在比率を決定した。

### (3) 腸内細菌の発酵挙動

容積 20.6 mL のバイアル瓶に、マウスより採取した糞便 300 mg と 5 g/L スキムミルク水溶液を全液量 10 mL で封入し、気相を窒素で置換した。嫌気条件下、37 °C で静置培養を行い、発酵産物である気相のバイオガスを GC で、液相の有機酸濃度を HPLC で測定した。

## 4. 研究成果

### (1) TiO<sub>2</sub> NPs の経口投与実験

TiO<sub>2</sub> NPs を経口投与しても、摂取量、飲水量、糞便の含水率に異常はなかった。このとき、腸内細菌叢を調べると、TiO<sub>2</sub> NPs の含有率が高くなるにつれて、*Lactobacillaceae* 科と *Bifidobacteriaceae* 科が減少する反面、*Clostridiales* 目が増加し、TiO<sub>2</sub> NPs の経口投与により腸内細菌叢が変化したことがわかった。

*Lactobacillaceae* 科と *Bifidobacteriaceae* 科の菌には、腸内有用菌として、腸内腐敗菌の増殖を抑制し、腸内環境を整える働きがあると報告されている<sup>(1)</sup>。一方、*Clostridiales* 目には酸を生成する腸内腐敗菌が含まれることから<sup>(2)</sup>、TiO<sub>2</sub> NPs により有用菌の増殖が抑制され、*Clostridiales* 目の増加に繋がったと考えられる。

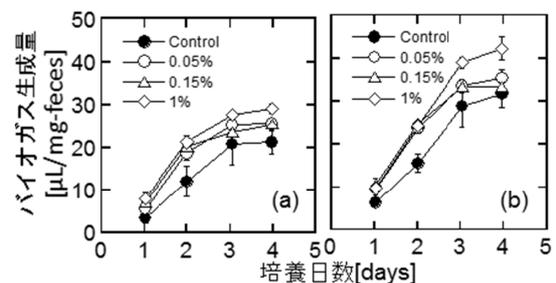


Fig. 1 TiO<sub>2</sub> NPs 経口投与 21 日目に排出された腸内細菌を培養した時の (a) H<sub>2</sub> (b) CO<sub>2</sub> 生成量の経時変化 (エラーバーは独立した 3 サンプルの標準誤差を示す。)

次に、TiO<sub>2</sub> NPs 経口投与 21 日目に採取した、腸内細菌叢を 4 日間培養し、糞便 1 mg

あたりのバイオガス生成量を発酵挙動として解析した (Fig. 1) すると、培養4日目の H<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub> 生成量は Control でそれぞれ 21.3, 31.8 μL/mg-feces である一方、TiO<sub>2</sub> NPs 含有率 1% の条件で 29.1, 42.4 μL/mg-feces となり、TiO<sub>2</sub> NPs 含有率が高い条件ではバイオガス生成量が顕著に増加することが分かった。

嫌気発酵の中間段階である酸生成過程において、嫌気性微生物は酢酸や H<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> を生成する。Clostridiales 目はこの酸生成過程に関与しており H<sub>2</sub> や CO<sub>2</sub> を生成することから<sup>(3)</sup>、Clostridiales 目が菌叢中で優勢化したことで、H<sub>2</sub> と CO<sub>2</sub> 生成量が増加したと考えられ、構成菌種の変化と発酵産物量の変化は一致した。

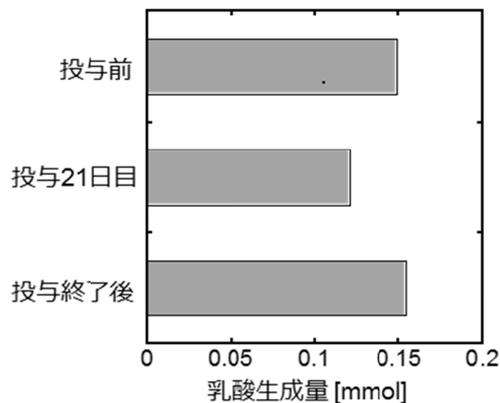


Fig. 2 培養1日目に生成した乳酸生成量

次に、発酵挙動が変化した TiO<sub>2</sub> NPs 含有率 1% の条件の腸内細菌を、1 日間培養した時の乳酸生成量を Fig. 2 に示す。経口投与 21 日目の腸内細菌を培養した時の乳酸生成量は 0.12 mmol で、経口投与前、経口投与終了後の条件と比較して、乳酸生成量が 20% 以上減少した。Lactobacillaceae 科や Bifidobacteriaceae 科は、腸内で乳酸を生成して Clostridiales 目などの腸内腐敗菌の増殖を抑制すると言われていることから、腸内に流入した TiO<sub>2</sub> NPs によって Lactobacillaceae 科と Bifidobacterium 科の生育が阻害されたと考えられる。

## (2) SiO<sub>2</sub> NPs の経口投与実験

SiO<sub>2</sub> NPs の経口投与期間中、マウスの摂餌量、飲水量、糞便の含水率共に、異常は観察されなかった。そこで、SiO<sub>2</sub> NPs を 1% 含有した飼料

を経口投与し、腸内細菌叢の構成変化を調べた。

その結果、SiO<sub>2</sub> NPs 投与前は腸内有用菌である Lactobacillaceae 科の存在割合は 34% であったが、投与 28 日目では、Lactobacillaceae 科が 9% まで減少した。そこで、SiO<sub>2</sub> NPs 含有飼料の投与を中止したところ、Lactobacillaceae 科の存在割合は 58% まで回復した。この結果から、SiO<sub>2</sub> NPs の投与により、腸内細菌叢中の Lactobacillaceae 科が顕著に減少することが示された。一方、腸内腐敗菌である Clostridiales 目の存在比率の変化は見られなかった。

SiO<sub>2</sub> NPs 含有率 1% の飼料を経口投与した条件の、投与前、投与 28 日目、投与中止 17 日目に採取した糞便を 4 日間培養した後の、バイオガス生成量の経時変化を Fig. 3 に示す。培養 4 日目で H<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub> 生成量は、投与前の腸内細菌叢でそれぞれ 10.8, 25.6 μL/mg-feces、投与 28 日目のもので 9.2, 26.4 μL/mg-feces、投与中止 17 日目では 9.6, 24.8 μL/mg-feces となり、大きく変化しなかった。

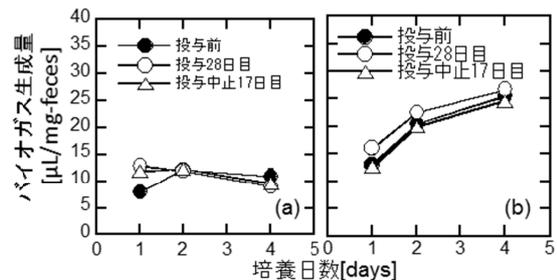


Fig. 3 SiO<sub>2</sub> NPs 投与マウスから採取した腸内細菌叢を培養した時の (a) H<sub>2</sub> (b) CO<sub>2</sub> 生成量の経時変化 (エラーバーは独立した3サンプルの標準誤差を示す。)

これは、TiO<sub>2</sub> NPs 含有飼料を投与した場合とは異なり、酸生成過程に関与して H<sub>2</sub> や CO<sub>2</sub> を生成する酸生成菌が腸内で増減せず、一定量で存在していたことを示唆しており、Clostridiales 目の存在比率に変化が見られなかったことと、結果が良く一致している。

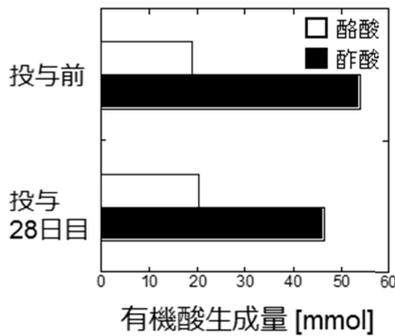


Fig. 4 培養6日目に生成した有機酸生成量

次に、SiO<sub>2</sub> NPs 含有率 1%の飼料を経口投与した条件での、投与前、投与 28 日目に採取した腸内細菌叢を 6 日間培養した時の有機酸生成量を Fig. 4 に示す。図より、酪酸生成量は変化が見られなかったが、酢酸生成量は SiO<sub>2</sub> NPs 経口投与期間中に僅かに減少することが分かった。これは、*Lactobacillaceae* 科は代謝時に一部、酢酸を生成することから、SiO<sub>2</sub> NPs の投与により、腸内細菌叢中の *Lactobacillaceae* 科が顕著に減少したことが原因であると考えられる。

### (3) Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs の経口投与実験

粒径 0.3 μm の Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs を 0.14%飼料に含有させ投与すると、経口投与 11-15 日目にかけて、マウスの体重が激減し、全てのマウスが下痢を発症した。この原因が Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs による腸内細菌叢の変化にあるのではないかと考え、マウスが下痢を発症する前、発症した際、下痢から回復した後の糞便を採取し、腸内細菌叢の構造変化を調べた。その結果、下痢を発症する前と治癒した後の腸内菌叢における、*Clostridiaceae* 科の存在比は数%であったが、下痢を発症した際の腸内菌叢では *Clostridiaceae* 科の存在比が約 40%まで増加していた。*Clostridiaceae* 科には、*C. difficile* や *C. perfringens* など下痢の原因菌が多く分類されることが知られており、これらの菌が腸内細菌叢中で優勢化すると下痢の症状を発症する<sup>(4)</sup>。そのため、粒子径が比較的小さい Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs を過剰に摂取したことで、*Clostridiaceae* 科が腸内細菌叢中で優勢化し、下痢が誘発されたと推察される。

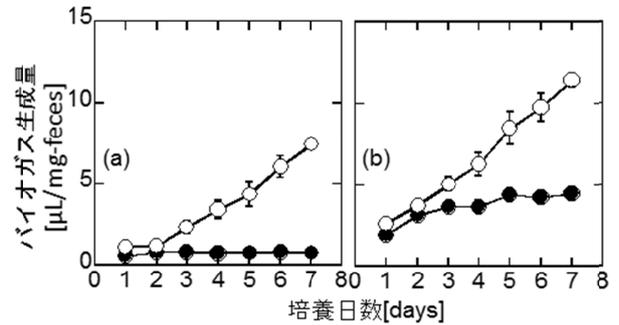


Fig. 5 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs経口投与15日目に排出された腸内細菌を培養した時の (a) 水素 (b) 二酸化炭素生成量 (エラーバーは独立した3サンプルの標準誤差を示す。)

次に、腸内細菌叢の発酵挙動から、菌叢構造の変化を確認することを目的として、経口投与 15 日目に排出された糞便を培養し、バイオガス生成量の経時変化を観察した (Fig. 5)。培養 7 日目における糞便 1 mg あたりの H<sub>2</sub> および CO<sub>2</sub> 生成量は、Control ではそれぞれ 2.5、14.9 μL/mg-feces であるのに対し、粒径 0.3 μm の Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs を 0.14%含有した飼料を投与した条件では、24.9、38.1 μL/mg-feces と大幅に増加し *Clostridiaceae* 科による H<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> 生成量の増加を確認できた。

次に、下痢を発症した時と、発症する前後の腸内細菌叢を *in vitro* で培養し、培養 1 日目に生成された有機酸の生成量を Fig. 6 に示す。

図より、下痢を発症した時の乳酸生成量は、下痢を発症する前の菌叢を培養した時と比較して増加した。これは、*Clostridiaceae* 科が優勢化している腸内細菌叢内では、*Lactobacillaceae* 科の乳酸生成が促進されたためであると考えられる。また、下痢を発症する前と比較して、治癒した後の菌叢を培養した時の酢酸生成量は、約 60%減少した。これは、*Lactobacillaceae* 科が優勢化した菌叢では、*Clostridiaceae* 科などの酢酸生成菌の代謝が抑制されたのではないかと考えられる。

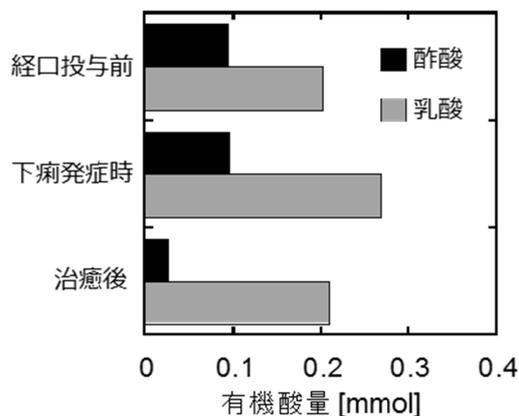


Fig. 6 培養1日目に生成した有機酸量

しかしながら、粒径 1.0  $\mu\text{m}$  の  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  NPs を 0.007, 0.07%の含有率で飼料に含有させ経口投与し、このときの糞便を採取して培養したところ、バイオガス生成量は対照に比べて、約3倍に増加したものの、下痢は発症しなかった。

また、菌叢の構成菌種を対照と比較しても、*Clostridiaceae* 科の優勢化は見られず、*Lactobacillaceae* 科が優勢化していた。

以上より、同じ粒子を投与しても、粒径が小さいと、腐敗菌が優勢化することがわかった。

## 結言

食品添加物ナノ粒子は、同一質量当たりの界面積が大きく、過剰摂取すると腸内細菌構造を崩し、疾病を引き起こす可能性がある。

### <引用文献>

- 1) H. Hove *et al.* (1999) *Eur. J. Clinical Nutrition*
- 2) K. Ueki 嫌気微生物学 (1993)
- 3) Y. Zhang *et al.* (2015) *Environ. Biotech.*
- 4) L. Marks *et al.* (2002) *J Vet Intern Med.*

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計2件)

K. Kurahashi, C. Kimura, Y. Fujimoto, H. Tokumoto, Value-adding conversion and volume reduction of sewage sludge by anaerobic co-digestion with crude glycerol, *Bioresource Technology*, 査読有, Vol. 232, 2017, pp. 119-125  
DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.012

徳本勇人, 野村俊之, 星英之, 新居靖崇, 大谷俊晴, 野本健太, 食品添加物粒子が腸内細菌

叢に与える影響, 粉体工学会誌, 査読有, Vol. 54, 2017, pp. 172-177  
<http://doi.org/10.4164/sptj.54.172>

#### [学会発表](計11件)

徳本勇人, 大阪府立大学におけるバイオマス利活用事例, 食品粉体技術分科会・湿式プロセス分科会合同分科会(招待講演), 2016年10月27日, あべのハルカス(大阪市)

木岡 真理奈, 新居靖崇, 武藤明德, 徳本勇人,  $\text{TiO}_2$  ナノ粒子が腸内細菌叢に与える影響の解析, 化学工学会第48回秋季大会, 2016年9月6-8日, 徳島大学(徳島市)

新居靖崇, 木岡 真理奈, 武藤明德, 徳本勇人,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  ナノ粒子が腸内細菌叢に与える影響の解析, 化学工学会第48回秋季大会, 2016年9月6-8日, 徳島大学(徳島市)

徳本勇人, 星英之, 新居靖崇, 大谷俊晴, 岡野凌一, 木岡 真理奈, 食品添加物ナノ粒子がマウスの腸内細菌叢に与える影響の解析, 2016年8月8-9日, ひょうご共済会館(神戸市)

徳本勇人, 食品ナノ粒子が腸内細菌に付着して起こる菌叢変化の解析, 粉体工学会2016年度春期研究発表会, 2016年5月17-18日, 京都市リサーチパーク(京都市)

岡野凌一, 新居靖崇, 倉橋健介, 徳本勇人, 石井 実, 平井規央, アサギマダラ幼虫の腸内細菌叢の解析, 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会, 2016年3月26-29日, 大阪府立大学(堺市)

徳本勇人, 地域と環境 - 新たなバイオエネルギー利活用法の探索の取り組みから -, 大阪府立大学授業公開講座(招待講演), 2016年1月28日, 大阪府立大学(堺市)

徳本勇人, バイオガス発電の可能性と府立大学でのバイオガス利用事例, 日報ビジネス2015秋の関西セミナーウィーク(招待講演), 2015年10月14日, 大阪産業創造館(大阪市)

野本健太, 村田森応, 星英之, 古田雅一, 徳本勇人, 放射性セシウム含有バイオマスの嫌気発酵処理技術の構築, 環境バイオテクノロジー学会2015年度大会, 2015年6月29-30日, 東京大学(東京都文京区)

徳本勇人, 星英之, 野本健太, 大谷俊晴, 新居靖崇, 食品添加物ナノ粒子がマウスの腸内細菌叢に与える影響の解析, 環境バイオテクノロジー学会2015年度大会, 2015年6月

29-30 日，東京大学（東京都文京区）

大谷俊晴，星 英之，木下卓也，武藤明德，徳本勇人，金属ナノ粒子が動物の腸内細菌に与える影響の解析，環境微生物系学会合同大会 2014，2014 年 10 月 21-24 日，アクトシティ浜松（静岡県浜松市）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：植物細胞培養用の液体培地および植物細胞の培養方法

発明者：徳本勇人、竹田恵美、吉原静恵、野村俊之、中島淑乃、山本花純

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-155754

出願年月日：平成 28 年 8 月 8 日

国内外の別：国内

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

徳本 勇人 (TOKUMOTO, Hayato)

大阪府立大学・工学研究科・講師

研究者番号：7 0 4 0 5 3 4 8

### (2)研究分担者

星 英之 (HOSHI, Hidenobu)

大阪府立大学・人間社会システム科学研究

科・准教授 研究者番号：3 0 3 0 1 1 8 8