

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700492

研究課題名（和文） 食品ナノマテリアルの胎児・乳幼児毒性予測法の開発

研究課題名（英文） Development of Safety forecasting system for Nanotox against infant and fetus

研究代表者

吉川 友章（YOSHIKAWA TOMOAKI）

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：60432449

研究成果の概要（和文）：

本研究では代表的な食品ナノマテリアルである非晶質ナノシリカを経鼻曝露した際の生体影響を幼若マウスを用いて評価した。直径 100 nm 以下のナノシリカを経口曝露した幼若マウスでのみ、一過性の体重減少や血液凝固系の活性化や肝障害が増強する傾向が認められた。以上の事実は、直径 100 nm 以下のナノシリカがサブミクロンサイズの従来素材とは異なる生体影響を誘発する可能性を裏付けている。

研究成果の概要（英文）：

The present study was designed to examine the intranasal or oral toxicological effects of the well-dispersed amorphous silica particles of diameters ranging from 70 nm to 1,000 nm on infant. Our results suggested that the “well-dispersed” amorphous nanosilica of particle size 70 nm (nSP70) induced toxic response *in vivo*. Thus, a strict monitoring process and further tests of new nanomaterials are not only highly warranted, but are also in line with the precautionary measures needed for managing risks.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノバイオ材料、ナノトキシコロジー、安全科学

1. 研究開始当初の背景

近年、素材の物性や構造をナノメートルサイズで制御することを目的としたナノテクノロジーが進展したことにより、新たな機能を持った新素材の開発や、マイクロメートルサイズの既存素材の機能向上が可能となった。こういったナノテクノロジーを応用して創製・改良したいわゆるナノマテリアルは組織浸透性・吸湿性・流動性等の点で、従来までのマイクロサイズ素材とは異なった画期的機能を発揮するため、ナノマテリアルは種々の産業にパラダイムシフトを起し、産業の活性化や世界的競争力の向上、それらを基盤とした雇用創出等、産業発展の切り札になり得るものと期待されている。新しいナノマテリアルとして、フラーレンやカーボンナノチューブといった素材が著名ではあるが、実際には、シリカや酸化チタン、酸化亜鉛等、古くから使用されている素材をサイズダウンしたナノマテリアルの実用化例が圧倒的に多い。特に我が国では、ナノシリカやナノ酸化チタン、ナノ白金コロイド等を賦形/固結防止剤、着色料、機能成分として配合した数多くの製菓・食品・健康食品が既に市場に出回っており、これらのナノマテリアルは我々の生活に必要な不可欠な素材となっている。

一方で近年、欧米各国を中心として、ナノマテリアル特有の物性に起因した革新的機能が、ナノマテリアルの体内吸収性や生体内動態に著しい影響を与え、これが原因となってナノマテリアルが予期せぬ部位で想定外の健康影響(NanoTox)を発現してしまうことが懸念されている。事実、Nature やその姉妹誌、Science 誌といった科学誌に NanoTox に関する研究が相次いで報告されており、例えば食品として摂取されたナノマテリアルは、100 nm 以下のサイズになると脳内蓄積性やオルガネラ蓄積性を発揮するようになり、これが原因となって最終的に人体の健康を脅かす可能性があることが危惧されている。例え、食品中に含まれるナノマテリアルが微量であったとしても、様々な健康状態の老若男女がナノマテリアル含有食品を長期間に渡って摂食するため、長期間曝露によって生じたアスベスト被害の二の舞とならぬよう、今こそ詳細な NanoTox 研究が必要であることは言うまでも無い。特にもと生体防御機構が未発達であり、化学物質に対する感受性が高い“胎児や乳幼児”に対するナノマテリアルの安全性確保は最も社会的ニーズの高い緊急の課題である。

2. 研究の目的

現状の NanoTox 研究は、単にリスクの有無を評価する検討のみに終始しており、ナノマテリアルの安全性を予想・確保するための具体的な対応策を目指した科学的知見の収

集が圧倒的に不足している。そのため、OECD (経済協力開発機構) は、この数年以内にナノマテリアルの安全性情報を集積し、数年後を目処にナノマテリアルの安全性確保に関するガイドラインを作成してナノマテリアルの開発・実用化等を国際的に規制しようとしている。この点において申請者らの研究グループでは 100 nm 以下のサイズのナノシリカが、従来までのサブミクロンサイズ以上のシリカとは全く異なり、①経皮・経粘膜吸収され全身循環血中に移行すること、②肝臓や脾臓、肺のみならず細胞核内にまで移行して予想外の健康影響を及ぼし得ること、③胎盤、さらには脳や胎児にまで移行して、胎児発育障害や流産の惹起活性を有する等、従来素材では認められなかったリスクを唯一明らかとしている。しかし、昨年度の国際 NanoTox 会議(チューリッヒ)や本年の SOT (米国毒性学会:ボルチモア)、日本トキシコロジー学会、EuroTox (欧州毒性学会:ドレスデン)でも明らかのように、国内外を問わず、NanoTox 研究は途についたばかりであり、現象論が報告されているに過ぎない。従って、このまま科学的根拠に乏しいリスク評価のみが実施・公表されれば、社会的・産業的不安をあおることに繋がり、最終的にはナノマテリアルの社会拒絶を引き起こしてしまいかねない。従って、ナノマテリアルの社会受容を確保しつつ、食品ナノマテリアルを有効に活用した便利で豊かな社会を確立するためには、NanoTox を誘発しない安全な食品ナノマテリアルを設計するための具体的な指針や NanoTox を予想するための方法を提示する必要がある。

3. 研究の方法

実験動物

3-5 週齢の BALB/c マウス(雌性)は、日本エスエルシーより購入した。また、本研究における動物実験の飼育および実験は医薬基盤研究所の実験動物施設において行い、医薬基盤研究所・大阪大学動物実験規定に準じた。

非晶質シリカ

本検討では、Micromod 社(Micromod Partikeltechnologie GmbH, Germany)の非晶質シリカ分散液を用いた。一次粒子径が 100 nm (nSP100, 25 mg/ml)、70 nm (nSP70, 25 mg/ml)、50 nm (nSP50, 25 mg/ml)、30 nm (nSP30, 25 mg/ml)のナノシリカを使用した。また、対照として、1000 nm (mSP1000, 50 mg/ml)、300 nm (nSP300, 50 mg/ml)のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。なお、以後の検討では、使用直前にシリカ分散液を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 5 分間超音波処理し、更に 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。**シリカの経口・経鼻投与**

幼若マウスに対する経口影響評価は、3-5週齢の BALB/c マウスに対して、超純水で調製したシリカ分散液 (mSP1000、nSP300、nSP100、nSP70、nSP50) を 3.75 mg/150 μ l で連続 5 日間投与する事により行った。

また、幼若マウスに対する経鼻影響評価は、3 週齢の BALB/c マウスに対して、超純水で 25 mg/ml に調整したシリカ分散液 (mSP1000、nSP300、nSP100、nSP70、nSP50) を 20 μ l/mouse (片鼻 10 μ l) で 7 日間、もしくは 28 日間連続経鼻投与することによって行った。

血液回収

最終投与から 24 時間後、マウスに 64.8 mg/ml のペントバルビタール (ソムノペンチル ; Schering-plough Animal Health, Netherlands) を 50 μ l 腹腔内投与することにより麻酔をした後、心臓より採血を行った。採血は、1/9 容量の 3.8% のクエン酸ナトリウム溶液であらかじめ湿らせたシリンジおよび注射針を用いて行った。この溶液を全血として血球検査に用い、残りを 1750 \cdot g、15 分間、遠心分離して血漿を回収した。得られた血漿は血液生化学検査および血液凝固試験に供した。

血液生化学試験

血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、血中尿素窒素 (BUN)、アルブミン (ALB) を比色法にて測定した。ALT 活性は、基質である L-アラニンのアミノ転位反応によって生じたピルビン酸が、ピルビン酸オキシダーゼと反応することで生じる過酸化水素とジアリアルイミダゾールロイコ色素の反応によって生成した青色色素を測定した。BUN は、ウレアーゼの作用によって生成したアンモニアとブロムクレゾールグリーンとの反応によって生じた緑色色素を測定した。ALB は、ブロムクレゾールグリーンとの反応により生じた青色色素を測定した。測定には、生化学分析装置 FUJI DRICHEM 7000 (FUJIFILM) を用いた。

血球検査

各シリカ投与マウスから採取した全血を 0.1 mM EDTA 入りの PBS で 5 倍希釈し、多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 (Abaxis, Union City, CA) を用いて、総白血球数、リンパ球数、単球数、血小板数を電気抵抗法により測定した。

4. 研究成果

(1) 幼若マウスにおける非晶質ナノシリカの経口ハザード同定

代表的な食品ナノマテリアルである非晶質ナノシリカを幼若マウスに経口曝露した際の生体影響評価の一環として、非晶質ナノシリカを 5 日間連続で経口投与した際の体重変化を評価した (Fig. 1)。その結果、直径

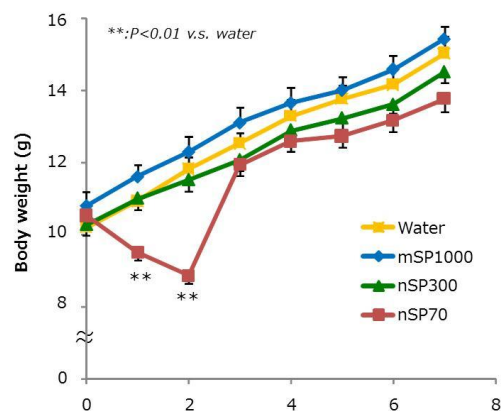


Figure 1. The influence of oral exposure of nanosilica on body weight. Silica particles (mSP1000, nSP300, 100, 70 and 50; 100 mg/kg/day) or water (control) were orally administered into BALB/c mouse for 5 days (3 wks ;n=5-6). Body weight was evaluated everyday. *Represents significant difference from the control.

70 nm のナノシリカ (nSP70) を経口曝露した幼若マウスでは、一過性の体重減少が認められた。一方で、その他のマウスでは、体重の明らかな変動は認められなかった。

(2) 幼若マウスにおける非晶質ナノシリカの経鼻ハザード同定

晶質ナノシリカを幼若マウスに経鼻曝露した際の生体影響評価の一環として、非晶質ナノシリカを 7 あるいは 28 日間連続で経鼻投与した際の血液凝固検査ならびに血液生化学検査を実施した (Fig. 2, 3)。その結果、7 日間連続投与マウスでは、nSP70 ならびに nSP50 を投与したマウスで、血小板数の有意な減少が認められた (図 2a)。一方で、28 日間投与を続けることで、この効果は消失した (図 2b) 詳細な機構は不明であるが、何らかの修復機構が働いた結果、ナノシリカ依存的な血液凝固系の活性化が阻止されたものと考えられる。

続いて、血液生化学検査を実施した。その結果、nSP100 ならびに nSP70 を 7 日間投与したマウスにおいて、肝障害マーカー (ALT) の上昇が認められた。また、nSP70 を 7 日間投与した群で、BUN 値の低下が認められていることから、肝障害が生じている可能性が高いと言える。一方で、28 日間投与マウスでは、ALT 値の上昇がより顕著であり、この効果は粒子径の減少に比例して増大した。また、nSP70 ならびに nSP50 を投与したマウスでは、血中アルブミン量の著しい低下が認められたことから、肝障害が生じている可能性が高く裏付けられた。

以上の結果から、幼若マウスに対して、直径 100 nm 以下のナノシリカが何らかの生体影響を及ぼす可能性が示唆された。特に、経鼻投与マウスを用いた解析から、ナノシリカを継続的に投与する事で、肝障害が生じるこ

とが明らかとなった。今後は、血液凝固促進効果と肝障害との関連を迫り、生体影響を誘発しない安全なナノシリカの創出を目指した基礎検討を実施する予定である。将来的には、上述した種々の検討を基盤として、ナノシリカのリスク解析に資する基礎情報の提供を試みると共に、ナノシリカの安全性予測法や安全設計法の確立を目指してハザード発現機構の解析を進める予定である。これらの検討が、ナノマテリアルの恩恵を最大限に享受した豊かな社会の実現に貢献出来るものと期待している。

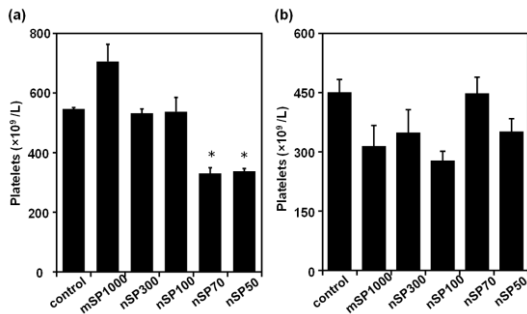


Figure 2. Changes of platelets in blood of mice intranasally instilled silica particles for 7 or 28 days. Blood samples were collected from BALB/c mice (3 weeks) intranasally instilled 0.5 mg/head silica particles (mSP1000, nSP300, 100, 70 and 50) or water (control) at 24 h after nasal exposure for (a) 7 days or (b) 28 days. Hematology analysis was performed using VetScan. Results are expressed as mean ± S.E. (n=5-6). *Represents significant difference from the control by Dunnett ($p < 0.05$).

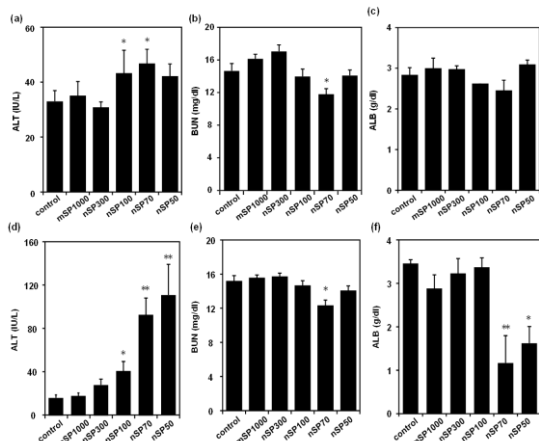


Figure 3. Biochemical parameters in the serum of mice induced by silica particles. Blood samples were collected from BALB/c mice (3 weeks) intranasally instilled 0.5 mg/head silica particles (mSP1000, nSP300, 100, 70 and 50) or water (control) at 24 h after nasal exposure for 7 (a)-(c) or 28 (d)-(f) days. Plasma was recovered by centrifuging blood at 1750 μ g for 15 min. Biochemical parameters were analyzed using FUJI DRI-CHEM 7000 (ALT (a, d), BUN (b, e), ALB (c, f)). Results are expressed as mean ± S.E. (n=5-6). Represents significant difference from the control by Dunnett (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

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 2 件)

- Hirai T., Yoshikawa T., Nabeshi H., Yoshida T., Tochigi S., Uji M., Ichihashi K., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y. : Dermal absorption of amorphous nanosilica particles after topical exposure for three days., *Pharmazie.*, in press.
- Yoshida T., Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Ichihashi K., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Itoh N., Tsutsumi Y. : Amorphous nanosilica particles induce ROS generation in Langerhans cells., *Pharmazie.*, in press.

〔学会発表〕 (計 23 件)

- 小椋健正, 吉岡靖雄, 山下浩平, 潘 慧燕, 平 茉由, 青山道彦, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 田代克久, 川端健二, 水口裕之, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの表面性状と発生毒性の連関解析に向けた基礎検討., 日本薬学会第 132 年会., 札幌(北海道), 2012 年 3 月 28 日.
- 山下浩平: Overview ~香粧品科学・皮膚科学への薬学からの挑戦~, 日本薬学会第 132 年会., 札幌(北海道), 2012 年 3 月 28 日. (シンポジウム: 香粧品科学・皮膚科学への薬学からの挑戦 ~若手の視点からの提言~)
- 森下裕貴, 吉岡靖雄, 佐藤宏祐, 野尻奈央, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: サブナノ白金の妊娠期投与による次世代影響に関する基礎的検討., 日本薬学会第 132 年会., 札幌(北海道), 2012 年 3 月 28 日.
- 永野貴士, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 國枝章義, 畑 勝友, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: ナノ安全科学における microRNA の安全性バイオマーカーとしての有用性評価に向けた基礎検討., 日本薬学会第 132 年会., 札幌(北海道), 2012 年 3 月 28 日.
- 佐藤宏祐, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 野尻奈央, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: ナノ安全科学的視点からのサブナノ白金の妊娠期曝露による胎仔影響の基礎

- 解析, 日本薬学会第 132 年会., 札幌(北海道), 2012 年 3 月 28 日.
6. 市橋宏一, 吉川友章, 平井敏郎, 高橋秀樹, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 宇高麻子, 森 宣瑛, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: サブナノ素材の安全性評価に向けた基礎的検討~サブナノ白金の経鼻曝露における生体影響評価~, 日本薬学会第 132 年会., 札幌(北海道), 2012 年 3 月 28 日.
 7. 國枝章義, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 永野貴士, 畑 勝友, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: ナノマテリアルの慢性影響に対する安全性評価マーカーの探索—非晶質ナノシリカの連日曝露による生体影響評価—, 日本薬学会第 132 年会., 札幌(北海道), 2012 年 3 月 28 日.
 8. Hirai T., **Yoshikawa T.**, Nabeshi H., Yoshida T., Uji M., Takahashi H., Misato K., Ichihashi K., Udaka A., Mori T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi T. : The intradermal injections of amorphous nanosilica particles size-dependently aggravate the atopic dermatitis., 第 40 回日本免疫学会., 千葉(千葉), 2011 年 11 月 27 日.
 9. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Morishita Y., Huiyan P., Ogura T., Taira M., Aoyama M., Nabeshi H., Itoh N., Yanagihara I., Saito S., **Yoshikawa T.**, Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Safety analysis of silica particle for development of nanomedicine ~Developmental toxicity on placenta~, 第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム., 名古屋(愛知), 2011 年 11 月 26 日.
 10. Yoshida T., Yoshikawa T., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Ichihashi K., Akase T., Nabeshi H., Itoh N., Yoshioka Y., **Yoshikawa T.**, Tsutsumi Y. : Safety evaluation of amorphous silica nanoparticles following intranasal exposure: Potential applications for nanoparticle-based intranasal drug delivery., 第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム., 名古屋(愛知), 2011 年 11 月 26 日.
 11. Higashisaka K., Yoshioka Y., Nagano T., Kunieda A., Nabeshi H., **Yoshikawa T.**, Tsutsumi Y. : Development of biomarkers of nanomaterials toward newly strategies ensuring safety and efficacy of nanomedicine., 第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム., 名古屋(愛知), 2011 年 11 月 26 日.
 12. 宇治美由紀, **吉川友章**, 吉田徳幸, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 市橋宏一, 赤瀬貴憲, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: サブナノ白金の消化管吸収性—snPt の体内吸収性評価—, 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月 22 日.
 13. 吉田徳幸, **吉川友章**, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 市橋宏一, 赤瀬貴憲, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: 食餌成分との食べ合わせを考慮した非晶質ナノシリカの安全性評価., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月 22 日.
 14. 山下浩平, 吉岡靖雄, 鍋師裕美, 柳原格, 齋藤滋, 伊藤徳夫, **吉川友章**, 堤 康央: 安全なナノマテリアルの開発に資する非晶質ナノシリカの生殖発生毒性評価., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月 22 日.
 15. 市橋宏一, **吉川友章**, 吉田徳幸, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 赤瀬貴憲, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: サブナノ新素材の生体影響に関する基礎的検討—経鼻曝露時の安全性について—, 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月 22 日.
 16. 小椋健正, 吉岡靖雄, 山下浩平, 潘 慧燕, 平 茉由, 青山道彦, 田代克久, 川端健二, 水口裕之, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, **吉川友章**, 堤 康央: ES 細胞を用いた非晶質ナノシリカの発生影響に関する基礎的検討., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月 22 日.
 17. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 高雄啓三, 佐藤宏祐, 野尻奈央, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, **吉川友章**, 宮川 剛, 堤 康央: 胎仔期の非晶質ナノシリカ曝露が新生仔に及ぼす影響の評価—新生仔の免疫機能、神経機能の基礎的検討—, 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月 22 日.
 18. 東阪和馬, 吉岡靖雄, 永野貴士, 國枝章義, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, **吉川友章**, 堤 康央: 安全なナノマテリアルの開発に向けた非晶質ナノシリカの免疫系への影響評価—好中球数の増加と起炎性との連関解析に向けて—, 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月 22 日.
 19. 平井敏郎, **吉川友章**, 吉田徳幸, 栃木彩

- 恵子, 宇治美由紀, 市橋宏一, 赤瀬貴憲, 鍋師裕美, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: 非晶質ナノシリカによるアトピー性皮膚炎の悪化., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月 22 日.
20. 潘 慧燕, 吉岡靖雄, 山下浩平, 小椋健正, 平 菜由, 青山道彦, 青島央江, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, **吉川友章**, 堤 康央:C60 フラーレンの経口ナノ医薬品としての開発に向けた安全性評価., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月 22 日.
21. 潘 慧燕, 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 青島央江, 北口順治, 鍋師裕美, **吉川友章**, 伊藤徳夫, 堤 康央: 有効かつ安全な経口ナノ医薬の開発に向けた C60 フラーレンの安全性評価., 第 27 回日本 DDS 学会学術集会., 東京(東京), 2011 年 6 月 9 日.
22. **Yoshikawa T.**, Tsutsumi Y.; The importance of systemic nanotoxicological and toxicokinetic analysis for ensuring the safety of well-dispersed amorphous nanosilicas, 3rd International Congress on Ceramics (ICC3), 2010 年 11 月 14 日.
23. **吉川友章**, 鍋師裕美, 吉田徳幸, 柊木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 伊藤徳夫, 吉岡靖雄, 堤 康央: ヒトの健康確保を目指したナノ安全科学研究とリスク解析への展開., 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪(大阪), 2010 年 10 月 30 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 友章 (YOSHIKAWA TOMOAKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 60432449