

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	食品中ナノマテリアルの腸管吸収及び体内動態の特性を利用したリスク評価手法の開発（課題番号：1005）（研究期間：平成22年度～平成24年度）
主任研究者名	研究者名：堤 康央 所属機関：国立大学法人大阪大学大学院薬学研究科

近年、1次粒子径が100 nm以下のナノマテリアル（NM）や、10 nm以下のサブナノマテリアル（sNM）の開発が進み、既に機能性食品等に利用されているものの、リスク評価に必須である暴露実態情報は国内外を問わず皆無である。そこで本研究では、種々NM・sNMを用い、経口投与後の動態（暴露実態）を定性的・定量的に解析できる手法を確立したうえで、経口投与後の動態情報を収集した。その結果、NMは、100nm以上のサブミクロン素材（従来素材）とは異なり、腸管吸収性を示すこと、一方でその吸収量は、経口暴露実態を考慮すると、急性毒性が懸念されるほどには多くないことを見出した。他方、sNMは、NMあるいは分子状の同一素材に比べ、腸管吸収性や血中・組織移行性が高く、今後、リスク解析の必要性の是非を追求することが、食品健康影響評価における最重要課題と考えられた。以上、本研究は、食品中NM・sNMのリスク評価の必要性に関する科学的根拠を提供することで、科学的根拠に基づいた食の安全性確保に資するものである。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	食品中ナノマテリアルの腸管吸収及び体内動態の特性を利用したリスク評価手法の開発（研究期間：平成22年度～平成24年度）
主任研究者名	所属：国立大学法人大阪大学大学院薬学研究科 氏名：堤 康央（研究課題番号：1005）

I 研究の期間及び研究目標等

1 研究期間

平成22年度～24年度（3年間）

2 研究目的

近年、食と健康に関する研究の進展により、健康の維持・増進や生活習慣病の予防に役立つ新たな素材や成分が次々と開発され、特定保健用食品や栄養補助食品などに利用されている。一方で、残留農薬や放射線の例に見られるように、食品汚染による深刻な健康被害が問題視され、食品の安全・安心が求められている。従って、食品に使用される新素材・新成分についても同様に、安全性の確保が喫緊の課題となっている。

近年、微粒子素材の開発が飛躍的に進展し、食品分野においても汎用されている。ナノマテリアル（粒子径10~100 nm；ナノ素材；NM）やサブナノマテリアル（粒子径10 nm以下；サブナノ素材；sNM）といった新素材は、吸収効率の向上、反応性の増大、食感の改善などを目的として食品分野において実用化が進んでいる。例えば、固結防止剤として非晶質ナノシリカやナノアルミノケイ酸が、抗酸化剤として白金ナノコロイド（サブナノ白金）、抗菌剤としてサブナノ銀が既に利用され、これらが配合された製菓・インスタント食品・清涼飲料水・健康食品が既に上市されている。現在、食品ナノ産業の世界市場は60億ドル（約6000億円）にもなり、今後も世界的に市場拡大が進むと考えられている。即ち、NM・sNMは我々の食生活に必要な存在となっており、今後もその使用拡大やさらなる有効活用が期待されている。

しかし現状では、食品中NM・sNMの含有量など、その実態は十分に把握されていない。さらに、NM・sNM特有の物性に起因した革新的機能が、二面性を呈してしまい、予期しにくい毒性（ナノ毒性；NanoTox）を発現してしまうことが懸念されている。しかし、現在までに報告されているNanoTox情報は、NM・sNMを大量かつ非現実的な経路で投与した際のハザードを取りあげているのみに過ぎず、食品中NM・sNMの含有量やNM・sNM含有食品の摂取量などを考慮した現実的なNanoTox解析は世界的に見ても皆無である。特に、NM・sNMのリスク評価に必須となる暴露実態（動態）情報が全く理解されていないため、NM・sNMのリスク評価の必要性を検証することすら出来ていないのが世界的な現状である。即ち、経口投与後の食品NM・sNMの腸管吸収性やその後の細胞内・体内動態（代謝・蓄積・排泄を含む）に関しては国内外を問わず、全く解明されていない（本邦でも厚生労働省や環境省の研究事業により、NM・sNMの経皮・経肺投与後の動態研究がスタートしたところであるが、NM・sNMの経口暴露に関する検討は皆無である）。一方で、NM・sNM含有食品が市場に出回っており、我々の生活に密着している現状を考えた場合、我々は既に、食品中NM・sNMへの経口暴露はもはや避け得ない。従って、例え食品中に含まれるNM・sNMが微量であったとしても、様々な健康状態の老若男女・妊婦・乳幼児が、長期間に渡って食品中NM・sNMを摂食してしまうため、今こそ詳細にNM・sNMの体内/細胞内動態を解析し、NanoTox研究の必要性を科学的に検証する必要がある。

そこで本研究では、直径数nm~100 nmのサブナノサイズ、ナノサイズの食品中NM・sNMがその種類や物性により、生体内因子や食品/飲料品、医薬品などとの相互作用が変動し得ること、世代や健康状態によってもNMの動態や健康影響が変動し得ることをも考慮しつつ、種々物性の食品中NM・sNM（微粒二酸化ケイ素 [ナノシリカ] や、ナノ白金コロイド、ナノ銀など）の経口投与後動態を、動物実験および*in vitro*で定性的かつ定量的に評価できる手法を確立し、NM・sNMの物性と経口投与後動態との関連情報を集積する。さらに、分担研究者の松田との連携のもと、食品中NM・sNM（微粒二酸化ケイ素 [ナノシリカ]、白金ナノコロイド、ナノ銀など）の暴露実態評価技術の確立を目的として、『誘導結合プラズマ質量分析法などの微量元素分析装置を用いた食品中ナノマテリアルの暴露実態解析技術』の確立および得られた成果の妥当性を科学的に検証する（分析法のバリデーション）。従って本研究の成果は、食品NM・sNMのリスク評価の必要性を体内動態の観点から科学的に検証できることになる。また当該研究期間の終了後に、NM・sNMの消化管吸収性や腸管細菌への影響、食べ合わせや飲み合わせなどを検討することで、将来的にNM・sNM含有食品の安全性確保により国民が安心してNM・sNMの恩恵を最大限に享受できることに直結し、例えば「この物性のNM・sNMは、こういった経口投与後動態を示すため、安全である [あるいは使用を避ける] 」といった科学的根拠に基づいて、直径数nm~100 nmのサブナノサイズ、ナノサイズのNM・sNMの開発支援が可能となり、本邦の産業界にも貢献するものである。即ち本研究は、将来的に開発段階および実用化済みの食品中NM・sNMのリスク評価の必要性に関する科学的根拠を提供するのみならず、安全な食品中NM・sNMの開発支援にも貢献できることから、科学的根拠に基づいた食の安全性確保に資するものである。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
(1) 研究項目1 ：ナノマテリアルの腸管吸収性と経口投与後体内動態・細胞内動態の評価およびその手法の確立	①ナノマテリアルの定性・定量を実現出来る最適分析法の探索および確立	主任研究者：堤 康央
	②微粒二酸化ケイ素（ナノシリカ）の生体内/細胞内動態解析	
	③白金ナノコロイドの生体内/細胞内動態追跡	
	④ナノ銀の生体内/細胞内動態追跡	
(2) 研究項目2 ：食品中ナノマテリアルの腸管吸収および体内動態を初めとする暴露実態の分析法の確立に向けたバリデーション解析	①微粒二酸化ケイ素（ナノシリカ）分析法のバリデーション	分担研究者：松田りえ子
	②白金ナノコロイド分析法のバリデーション	
	③ナノ銀分析法のバリデーション	

4 倫理面への配慮について

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の動物実験規程ならびに国立医薬品食品衛生研究所の動物実験規程に則り行う。さらに本研究における動物実験は、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る。

II 研究内容及び成果等

1 研究内容及び方法

(1-1) 研究項目名：ナノマテリアルの腸管吸収性と経口投与後体内動態・細胞内動態の評価およびその手法の確立（研究担当者名：堤康央 所属機関名：大阪大学）

1) 個別課題名：ナノマテリアルの定性・定量を実現出来る最適分析法の探索および確立 研究内容・方法

NM・sNM は、従来のサブミクロンサイズ以上の素材では得られない革新的な機能を発揮する新素材である。特に食品分野においては、食品添加物や食品容器などに適用されており、我々の生活に必要な不可欠な素材となっている。中でも、非晶質ナノシリカは、用途・生産量・含有量の点で最も汎用されている NM・sNM のひとつである。食品分野においては、固結防止剤として食塩やインスタント食品に使用されており、食品中に最大 2% まで含有することが許可されている。厚生労働省の調べによると、ヒトの 1 日あたりの微粒シリカ ($15 \mu\text{m}$ 以下) の推定摂取量は約 $530 \mu\text{g}$ という報告があるように、我々は既に日常的に非晶質ナノシリカを経口摂取している。また、国外での調査によると、コーヒークリーマーに 5.1 g/kg 、スパイスミックスに 4.9 g/kg 、インスタントスープに 0.6 g/kg 、粉末ソースに 5.4 g/kg で含有される例が知られており、海外ではさらに暴露量が多いことが予想される。

一方で、近年になって NM・sNM の安全性が世界的に懸念され始めており、非晶質ナノシリカの安全性評価が急務となっている。非晶質ナノシリカの安全性確保に向けて、体内動態などの暴露実態情報が必要であるが、非晶質ナノシリカの体内動態解析手法が確立されていないため、情報収集が立ち遅れている。そこで、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) あるいは誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS)、光学的分析法 (光散乱法や蛍光法など) を用いることで組織中の非晶質ナノシリカの体内動態を定量的に解析可能な技術構築を試みた。さらに、本検討で検出可能であることを明らかにしたうえで、分担研究者松田との連携のもと、下記の「(1-2) 研究項目名：食品中ナノマテリアルの腸管吸収および体内動態を初めとする暴露実態の分析法の確立に向けたバリデーション解析」中の「1) 個別課題名：微粒二酸化ケイ素 (ナノシリカ) 分析法のバリデーション」に記載するように、当該分析法の特異性や感度、信頼性などのバリデーションを実施した。なお、白金ナノコロイドやナノ銀については、下記の別個別課題において記載している。

2) 個別課題名：微粒二酸化ケイ素 (ナノシリカ) の生体内/細胞内動態解析 研究内容

非晶質ナノシリカの生体内/細胞内動態を定性・定量的に解析可能な方法論の確立を図った。まず定性的な解析法として、透過型電子顕微鏡 (TEM) などを用いた顕微鏡解析によって、非晶質ナノシリカを撮像出来るか否かを検討した。また、エネルギー分散型 X 線検出器付き透過型電子顕微鏡 (EDX-TEM) を用いて元素分析を実施し、細胞内における非晶質ナノシリカの局在を、確認できる解析法の構築を図った。さらに、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージングによる解析も実施した。さらに、上述の「1) ナノマテリアルの定性・定量を実現出来る最適分析法の探索および確立」で確立した定量的解析法により、粒子サイズや表面物性の異なる非晶質ナノシリカ (ナノサイズ ($10 \text{ nm} \sim 100 \text{ nm}$) の非晶質ナノシリカおよびサブミクロンサイズ ($100 \text{ nm} \sim 10 \mu\text{m}$) の従来型非晶質シリカや、表面がアミノ基修飾、カルボキシル基修飾された非晶質ナノシリカ) を経口投与後の体内動態を定量的に解析し得るか検討した。また、緊

急性・重要性の観点から、当初計画を発展的に変更し、不可欠な腸管反転法を用いた非晶質ナノシリカの腸管吸収性予測法の開発を試みた（平成23年11月9日（水）の食品安全委員会の実地調査・指導時に報告済み）。

方法

非晶質シリカ：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1000 nm、300 nm、70 nm、30 nmのmSP1000、nSP300、nSP70、nSP30、nSP70の粒子表面をカルボキシル基およびアミノ基で修飾したnSP70-C、nSP70-N、およびnSP70、nSP70-C、nSP70-Nを蛍光標識したナノシリカ分散液を使用した。

TEMを用いた非晶質シリカの体内局在評価：BALB/cマウスに非晶質シリカを2.5 mg/mouseで7日間連続経口投与した。最終投与から24時間後に、各種組織を摘出した後、体内局在はTEMにより評価した。

ラット腸管反転法：一晚絶食させたWistar STラットの小腸を摘出し、小腸の内側をタイロッド液（NaCl 137 mM, KCl 5.4 mM, NaH₂PO₄ 0.16 mM, MgCl₂ 0.5 mM, CaCl₂ 1.8 mM, HEPES 5 mM, pH7.4）で洗浄した。小腸を反転した後、反転した腸管の内側、即ち漿膜側にタイロッド液を流し入れ、蛍光標識した12.5 mg/mLの各非晶質シリカ溶液2.5 mL中に浸けた。37°Cの恒温槽でインキュベートした後、反転した腸管の外側、即ち粘膜側から腸管の内側、即ち漿膜側に浸透した非晶質シリカ溶液の蛍光強度を測定することにより、腸管から吸収されたシリカの濃度を間接的に測定した。また、吸収率(%)=100×【漿膜側(内液)のシリカ濃度】/【腸管を浸ける前の粘膜側(外液)のシリカ濃度】として算出した。

3) 個別課題名：白金ナノコロイドの生体内/細胞内動態追跡動態追跡

研究内容

NMと分子の中間サイズであるsNMは、NMや分子とも異なる機能を示す画期的な新素材である。従って、生体に適用した際にも未知の体内動態、生体影響を示すことが予想される。現在、白金ナノコロイド（サブナノ白金）、サブナノ銀、非晶質ナノシリカなどのsNMが既に食品に実用化されており、老若男女を問わずsNMを摂取する可能性があることを鑑みると、sNMの安全性評価・未知の生体影響の同定は喫緊の課題と言える。例えば、白金ナノコロイドは、触媒作用や抗酸化作用を有する金属粒子であり、近年では、10 nm以下までサイズを微小化したいわゆるサブナノ白金として実用化されている。例えば、健康補助食品、ヨーグルト、ミネラルウォーターなどに適用されているように、サブナノ白金含有製品は既に市場に出回っている。しかし、sNMの体内動態に関する知見は未だ乏しく、特に経口暴露に着目した検討は殆ど手つかずの状態である。そこで、既に食品分野で使用されるサブナノ白金を用い、経口暴露後の体内動態（体内吸収性、体内分布など）に関する基礎情報を収集した。本検討では、TEMやEDX-TEMを用いた顕微鏡解析によって、サブナノ白金を撮像出来るか否かを検討した。次に、ICP-MSを用いることで組織中のサブナノ白金の体内動態を定量的に解析可能な技術構築を試みた。また、本検討で確立した方法については、分担研究者松田との連携のもと、下記の「(1-2) 研究項目名：食品中ナノマテリアルの腸管吸収および体内動態を初めとする暴露実態の分析法の確立に向けたバリデーション解析」中の「2) 個別課題名：白金ナノコロイド分析法のバリデーション」に記載するように、当該分析法の特異性や感度、信頼性などのバリデーションを実施した。そのうえで、サブナノ白金を経口投与後の体内吸収性・体内動態を定量的に解析した。

方法

サブナノ白金：本検討には、Polytech & Net GmbH (Schwalbach, Germany) から購入した二次粒子径が1 nmのsnPt1および8 nmのsnPt8を用いた。

ICP-MSを用いたサブナノ白金の体内分布評価：BALB/cマウスにサブナノ白金を20 mg/kgで単回経口投与した。投与24時間後に、各組織を回収し、マイクロウェーブ分解装置により分解した後、白金濃度をICP-MS装置 (Agilent 7500ce、アジレントテクノロジー社製) を用いて分析した。

サブナノ白金を単回経口投与後の蓄積性評価：BALB/cマウスにsnPt1およびsnPt8を20 mg/kgで単回経口投与した。投与から1、3、7、14、28、56日後、各臓器中の白金量を測定した。

サブナノ白金を複数回経口投与後の蓄積性評価：BALB/cマウスにsnPt1およびsnPt8を20 mg/kgで1、3、7、10、14日間連続経口投与した。最終投与から24時間後、各臓器中の白金量を測定した。

4) 個別課題名：ナノ銀の生体内/細胞内動態追跡

研究内容

本検討では、TEMやEDX-TEMを用いた顕微鏡解析によって、サブナノ銀を撮像出来るか否かを検討した。次に、ICP-MSを用いることで組織中のサブナノ銀の体内動態を定量的に解析可能な技術構築を試みた。また、本検討で確立した方法については、分担研究者松田との連携のもと、下記の「(1-2) 研究項目名：食品中ナノマテリアルの腸管吸収および体内動態を初めとする暴露実態の分析法の確立に向けたバリデーション解析」中の「3) 個別課題名：ナノ銀の分析法のバリデーション」に記載するように、当該分析法の特異性や感度、信頼性などのバリデーションを実施した。そのうえで、サブナノ銀を経口投与後の体内吸収性・体内動態を定量的に解析した。

方法

サブナノ銀：本検討には、Polytech & Net GmbH (Schwalbach, Germany) から購入した二次粒子径が1 nmのサブナノ銀 (snAg) および20 nmのナノ銀 (nAg) を用いた。

(1-2) 研究項目名：食品中ナノマテリアルの腸管吸収および体内動態を初めとする暴露実態の分析法の確立に向けたバリデーション解析（研究担当者名：松田りえ子 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）

1) 個別課題名：微粒二酸化ケイ素（ナノシリカ）分析法のバリデーション

研究内容・方法

堤班と連携・協力しつつ、ICP-MS、ICP-AESを用いた非晶質ナノシリカの分析技術の確立を図ると共に、分析法の妥当性を評価した。特に、ICP-AESを用いて、検出限界などの算出を試みた。参考までに、ICP-AESの原理を簡単に記載する。溶液試料をアルゴンプラズマ中に導入すると、溶液中に存在していた金属元素、半金属元素は、6000～7000℃の熱で原子化されると共に励起される。その後、基底状態に戻るときに各元素固有の波長の光を放出する。この発光線を検出することより、波長から定性分析を、発光強度から定量分析を行なうことができ、これを検出することによりケイ素を定量する。

2) 個別課題名：白金ナノコロイド分析法のバリデーション

研究内容

堤班と連携・協力しつつ、ICP-MSを用いたサブナノ白金分析法の妥当性を評価した。

方法

ICP-MSによるサブナノ白金の分析妥当性評価：マイクロウェーブ分解装置：マイルストーンゼネラル社製 MILESTONE ETHOS1、ICP-MS装置：アジレント・テクノロジー社製 Agilent 7500ceを用いた。分析対象組織として、体内で最大の組織であり、試料重量を多く採取可能な肝臓を対象とした。マウス肝臓をホモジェネートとし、その0.1 gをテフロン製分解容器に採取し、硝酸1 mL及び過酸化水素1 mLを加え、マイクロウェーブ分解装置により分解した。分解液を水で10 mLとし試料溶液とした。分解後の試料溶液に、内標準として0.2 µg/mLのタリウム溶液0.1 mLを加えた。ICP-MSの操作条件は以下のとおりである。

試料導入速度：1.0 mL/min

プラズマガス：アルゴン 15 L/min

キャリアーガス：アルゴン 0.75 L/min

メイクアップガス：アルゴン 0.3 L/min

リアクションガス：ヘリウム

測定質量数：195（白金）、205（タリウム）

検量線溶液：0-20 µg/L範囲の白金溶液10 mLに内標準として0.2 µg/mLのタリウム溶液0.1 mLを加え、検量線溶液とした。

検量線の直線性：ICP-MSでゼロを含む6点以上の段階的な濃度の銀標準溶液を測定し、濃度とイオンカウントの相関係数を求める。さらに、検量線の各濃度のカウント値を検量線で濃度に逆変換した値と、実際の濃度の差が15%以内になることを検証する（相関係数や γ -切片なども考慮に入れる）。

特異性：ブランク（血漿、尿など）を分析して、特異性（分析値を変化させる妨害がないこと）を確認する。この際、ブランクから得られる妨害信号（分析対象に重なる信号）の強度が定量限界濃度である分析対象から得られる信号強度の20%以下になるような分析法を妥当と判断する。

分析法の真度・精度・定量限界の評価：既知量の分析対象を含む試料を分析して、真度

・精度・定量限界を評価する。これらのパラメータの決定のために、統計解析を実施する。また、検量線の各濃度の面積値を検量線で濃度に変換した値と、実際の濃度の差が15%以内になる分析法であるか否かを検証する（相関係数やy-切片等も考慮に入れる）

。

3) 個別課題名：ナノ銀の分析法のバリデーション

研究内容

堤班と連携・協力しつつ、ICP-MSを用いたサブナノ銀分析法の妥当性を評価した。

方法

検量線の直線性：ICP-MSでゼロを含む6点以上の段階的な濃度の銀標準溶液を測定し、濃度とイオンカウントの相関係数を求める。さらに、検量線の各濃度のカウント値を検量線で濃度に逆変換した値と、実際の濃度の差が15%以内になることを検証する（相関係数やy-切片なども考慮に入れる）。

特異性：ブランク（血漿、尿など）を分析して、特異性（分析値を変化させる妨害がないこと）を確認する。この際、ブランクから得られる妨害信号（分析対象に重なる信号）の強度が定量限界濃度である分析対象から得られる信号強度の20%以下になるような分析法を妥当と判断する。

分析法の真度・精度・定量限界の評価：既知量の分析対象を含む試料を分析して、真度・精度・定量限界を評価する。これらのパラメータの決定のために、統計解析を実施する。また、検量線の各濃度の面積値を検量線で濃度に変換した値と、実際の濃度の差が15%以内になる分析法であるか否かを検証する（相関係数やy-切片等も考慮に入れる）

。

2 研究成果、考察、今後の課題

(1-1) 研究項目名：ナノマテリアルの腸管吸収性と経口投与後体内動態・細胞内動態の評価およびその手法の確立（研究担当者名：堤康央 所属機関名：大阪大学）

1) 個別課題名：ナノマテリアルの定性・定量を実現出来る最適分析法の探索および確立

非晶質ナノシリカの定量的解析法の確立を試みた。非晶質ナノシリカを定量するにあたっては、元素分析により組織中のケイ素含量を定量することによって非晶質ナノシリカの体内局在を定量する。一般に、微量ケイ素の定量は、吸光光度法の他に、誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES）などを用いることでppmレベルの定量が可能である。また、より高感度な元素分析装置として誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）の適用が考えられるが、ケイ素（ ^{28}Si ）が窒素（ $^{14}\text{N}_2$ ）の妨害を受けることから、ICP-MSを用いたケイ素の分析は困難である。そこで、原理的に質量数の影響を受けないICP-AESを用いてケイ素の検出下限の測定を試みた。まず、非晶質ナノシリカに関して、前処理の最適化を行うと共に、ICP-AESによる検出下限の測定を試みた。乾式灰化法を用いて前処理を行ったところ、揮散損失などによるばらつきが大きかったため、本検討ではマイクロウェーブ分解法を用いて前処理を行うこととした。なお、マイクロウェーブ分解法では、再現性よくケイ素を検出出来ることを確認している。試料を添加していないマウス肝臓に対して、前処理を10回行って試料溶液を作成し、これら10種の試料溶液の標準偏差から検出下限を算出した。その結果、マウス肝臓組織0.5 gを用いた場合のケイ素の検出下限は8.2 ppmであった。しかしながら、ICP-AESによる非晶質ナノシリカの定量法では、最低でも1 gの組織が必要なため、肝臓（1 g）以外の組織を分析するためには多数のマウスから組織を回収してプールしたものを分析に供する必要がある。また、ICP-AESは、ICP-MSと比較すると検出感度も1/100~1/1000程度である。従って、将来的には、分析の簡便性や精度の観点から、マウスを用いて微量の組織で定量できる手法の開発が必要であるものと考えられた。

2) 個別課題名：微粒二酸化ケイ素（ナノシリカ）の生体内/細胞内動態解析

我々は、本実験に供する非晶質シリカの物性に関する基礎的情報をこれまでに収集しており、透過型電子顕微鏡（TEM）や走査型電子顕微鏡を用いた形状の観察、およびゼータサイザーを用いて粒径分布と表面電荷を測定している。その結果、本実験に供した非晶質シリカは、①粒子サイズや表面性状に関わらず、表面の滑らかな球状の素材であること、②いずれの粒子も平均二次粒子径は一次粒子径とほぼ同等であり、分散性の高い素材であること、③nSP70と比較してnSP70-Cは負に、nSP70-Nは正に帯電していることを報告している。

非晶質ナノシリカの細胞内局在について、共焦点レーザー顕微鏡、透過型電子顕微鏡（TEM）による観察を試みた。マウスマクロファージ細胞株（RAW264.7）に緑色蛍光色素で標識した直径70 nmのナノシリカ（nSP70）を添加し、この試料を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、nSP70は細胞膜を通過し、その一部は核内にまで侵入した（図1）。また、粒子表面をアミノ基あるいはカルボキシル基で修飾した蛍光標識nSP70（それぞれnSP70-N、nSP70-C）についても同様に共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、nSP70-Nは細胞表面に、nSP70-Cは細胞質内のみに局在することが明らかとなった（図1）。以上の結果から、共焦点レーザー顕微鏡により、ナノシリカの表面性状が細胞内局在に著しく影響することを明らかとした。これらの成果は既に学術論文として受理されている（Nanoscale Research Letters 2011, 6:93）。次に、TEMを用いて、nSP70を添加したラット小腸由来株化細胞（IEC-6）を観察した。その結果、添加した

nSP70 は黒いドット状の粒子として観察できることを明らかとした。また、今回の TEM 観察の結果、nSP70 は核膜を通過して、核内にまで侵入することが明らかとなった（図 2）。この核内侵入現象は、100 nm 以上のシリカを添加した場合には認められなかったため、100 nm 以下のナノシリカに特有の現象である可能性が高く、上述した共焦点レーザー顕微鏡解析においても同様の結果を得ている。以上、共焦点レーザー顕微鏡や TEM を用いることで直径 100 nm 以下のナノシリカの局在を高精度にイメージングする技術を確立した。

非晶質ナノシリカの生体内局在について、TEM を用いて評価した。BALB/c マウスに直径が 30 nm の非晶質ナノシリカ（nSP30; 2.5 mg/day）を強制経口投与（7 日間）し、最終投与 24 時間後に各種臓器を回収した。これらの臓器を用いて、TEM による非晶質ナノシリカの局在を観察した。その結果、nSP30 は、胃・小腸・大腸の上皮細胞などに侵入していた。また、nSP30 は消化管細胞のみならず、脾臓細胞内にも到達していた（図 3）。また、エネルギー分散型 X 線分光法（EDX）-TEM を用いて、脾臓中の非晶質ナノシリカの同定を行ったところ、TEM で黒いドット状に観察された粒子は確かにケイ素からなる微粒子であることが明らかとなった（図 3）。これらの結果は、経口投与した nSP30 が消化管吸収されて血液循環する可能性を強く示唆している。以上の結果は、nSP30 が経口投与後に体内に吸収されて血液循環すること、ならびに到達した各種臓器を対象とした安全性評価が必須であることを示している。

次に、粒子径の異なる非晶質シリカの経口投与後体内局在を、TEM で定性解析した。その結果、直径が 1000、300、70、30 nm のいずれの非晶質シリカも、経口投与後に血中に移行し、肝臓や脾臓、腸管膜リンパ節などに移行することが明らかとなった（図 4）。一方で、1000 nm の非晶質シリカはパイエル板には移行していないこと、ならびに粒子径が小さくなるほどパイエル板に移行する粒子の数が増える傾向があることなどが明らかとなった。これらの結果は、非晶質シリカの粒子サイズが、腸管吸収性や吸収された後の体内局在に影響を及ぼす可能性を示している。即ち、非晶質ナノシリカのハザード解析や平均摂取量、そしてリスク解析が必要と考えられる。そこで次に、シリカの経口投与後体内局在の定量化を試みた。まずは、パイロット的に直径 30 nm のナノシリカ（nSP30）の局在を定量化した。その結果、いずれの組織においても、ケイ素由来と思われるシグナルが検出されたが、いずれも、検出下限以下であった（図 5）。これらの事から、シリカの経口投与後体内局在を定量するに当たっては、より高感度な別の技術の開発やシリカを標識する手法の開発が必要になると考えられた。

図5を通じて、ICP-AES解析では、ケイ素が生体中に存在することから、非晶質シリカの組織移行量の定量が困難であること、また、蛍光修飾したナノシリカを投与し、蛍光強度により組織移行量を解析した場合には、感度の問題から非晶質ナノシリカの組織移行量の解析が困難であることを確認している。従って、それらの手法に代わる、新たな体内吸収性評価手法の確立が求められる。そこで次に、緊急性・重要性の観点から、当初計画を発展的に変更し、不可欠な腸管反転法を用いた非晶質ナノシリカの腸管吸収性予測法の開発を試みた（平成23年11月9日（水）の食品安全委員会の実地調査・指導時に報告済み）。ラット腸管反転法とは、反転したラットの小腸を被験物質の溶液に浸け、腸管内に浸透した溶液の濃度を測定することで、腸管吸収量を予測する手法である。この手法は、生体内に近い条件下で腸管局所での吸収性を簡易に調べることができ、さらに吸収量が少量であったとしても、感度良く検出することが可能であるという利点を有しており、薬物の腸管吸収試験に広く用いられている。本検討ではマウス由来の小腸では内液量が制限されて十分な感度が得られない可能性が考えられたため、ラット由来の

小腸を用いることとした。Wistarラットの小腸を反転し、反転した腸管の内側（漿膜側）にタイロッド液を流し入れ（以降、反転してタイロッド液を入れた腸管を反転腸管と表記する）、蛍光標識した非晶質シリカ溶液中に浸けた。37°Cでインキュベートした後、反転した腸管の外側（粘膜側）から腸管の内側に浸透した非晶質ナノシリカ溶液の蛍光強度を測定することにより、腸管から吸収された非晶質ナノシリカの濃度を間接的に測定した。なお本検討において、非晶質ナノシリカを作用させた腸管と非晶質ナノシリカを作用させていない腸管において、グルコースの吸収性に変化がなかったことから、非晶質ナノシリカが腸管に傷害を及ぼしていないことを確認している。また、これまでの検討で、蛍光標識した非晶質ナノシリカを12000 rpmで20分間遠心しても蛍光物質が遊離しないことを実証しており、シリカと蛍光物質が強固に結合していることを確認している。

まず、粒子径の違いによる吸収性を比較するため、mSP1000およびnSP70の腸管吸収性を比較検討した。蛍光標識したmSP1000およびnSP70溶液に反転腸管を浸け、37°Cで45分間インキュベートした後、反転腸管の外側から内側に浸透したシリカ溶液の蛍光強度を測定した。その結果、mSP1000の吸収率が約0.4%であるのに対して、nSP70の吸収率は1.3%であり、mSP1000の約3倍に匹敵する量であった（図6）。このことから、粒子径の微小化により、非晶質ナノシリカの腸管吸収性は増大することが明らかとなった。本結果は、粒子の大きさがシリカの腸管吸収性を規定する一つの要因であることを示唆している。なお、グルコースの腸管吸収性は約7%であることが報告されており、食品成分の吸収性と比較すると、ナノシリカの腸管吸収性は低いものと推察される。

次に、mSP1000に比べ高い吸収性が認められたnSP70について、経時変化と濃度依存性の情報を収集した。蛍光標識したnSP70溶液に反転腸管を浸け、37°Cで10、20、30、45、60分間インキュベートした後、腸管から吸収されたnSP70の濃度を測定した。その結果、nSP70の腸管吸収性は、時間依存的に増大することが明らかとなった（図7）。さらに、nSP70の腸管吸収性の濃度依存性を確認した。蛍光標識した12.5 mg/ml、3.1 mg/ml、0.78 mg/mlのnSP70溶液に反転腸管を浸け、37°Cで45分間インキュベートした後、腸管から吸収されたnSP70の濃度を測定した。その結果、粘膜側の溶液の濃度依存的にnSP70の吸収量の増加が認められた（図8）。なお、プレリミナリーな検討ではあるが、4°Cおよび37°C条件下でnSP70の腸管吸収量を比較したところ、有意な差ではないものの、37°Cに比べて4°C条件下の方が、吸収量が低いという結果を得ている。4°C条件下では能動輸送に必須のATP産生ができないため、37°Cに比べて4°C条件下の方で吸収量が低いことは、能動輸送が阻害されたことに起因すると考えられる。つまり、nSP70は能動輸送で吸収されている可能性が考えられる。一般的に、消化管内の微粒子はパイエル板を介して吸収されることが知られている。しかし、NM・sNMは従来までの微粒子よりもさらに微小化が進んだ新素材であるため、吸収経路も従来素材とは異なる可能性が考えられる。今後、これらの吸収経路に着目し、ナノシリカの吸収機構の解明を進めていく必要がある。

さらに、他の研究グループの報告では、NMの表面電荷などの表面性状の違いにより、腸管における吸収性が異なることが報告されている。そこで、nSP70について、表面性状の違いによる腸管吸収性の影響を調べた。その結果、有意な差は無いものの、nSP70-CはnSP70と比較して腸管吸収率が低いことが示された。一方で、nSP70-Nの吸収率は、nSP70およびnSP70-Cの約2倍程度高いことが明らかとなった（図9）。これは、腸管上皮が弱負電荷に帯電しているため、nSP70と比較して正に帯電しているnSP70-Nは腸管上皮と相互作用しやすく、nSP70やnSP70-Cと比較して腸管吸収率が高くなったと推察される。以上の結果から、非晶質ナノシリカの腸管吸収性には、粒子サイズのみならず表面性状も重要な要素であることが示唆された。

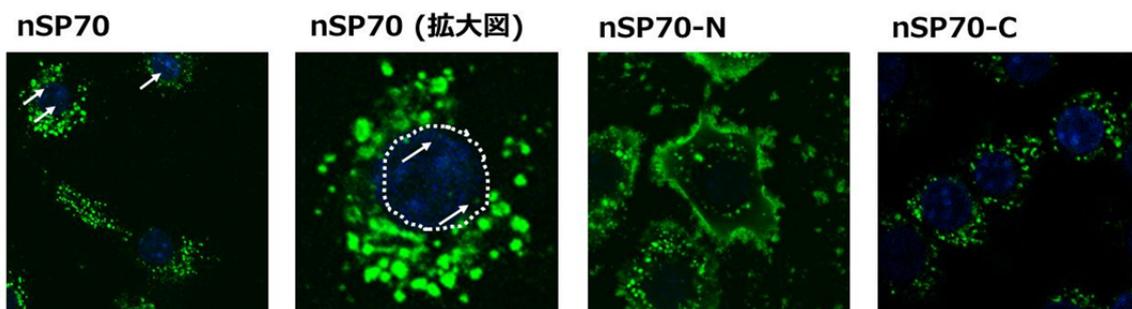


図 1. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた非晶質ナノシリカの細胞内局在観察
 直径が 70 nm で表面未修飾のナノシリカ (nSP70) と、粒子表面をアミノ基あるいはカルボキシル基で修飾した nSP70 (それぞれ nSP70-N、nSP70-C) を用いた。これらの粒子は緑色蛍光で標識されている。nSP70、nSP70-C、nSP70-N をマウスマクロファージ細胞株に添加し、3 時間培養した際の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

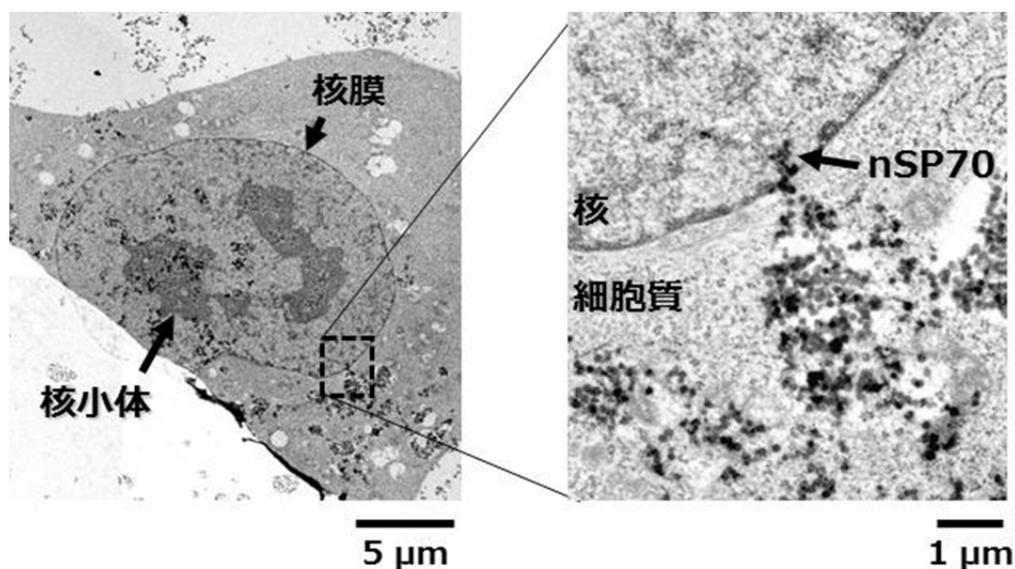


図 2. 透過型電子顕微鏡を用いた非晶質ナノシリカの細胞内局在観察
 蛍光標識されていない nSP70 をラット小腸上皮細胞株 (IEC-6) に添加し、24 時間培養した後の細胞内局在を透過型電子顕微鏡により観察した。

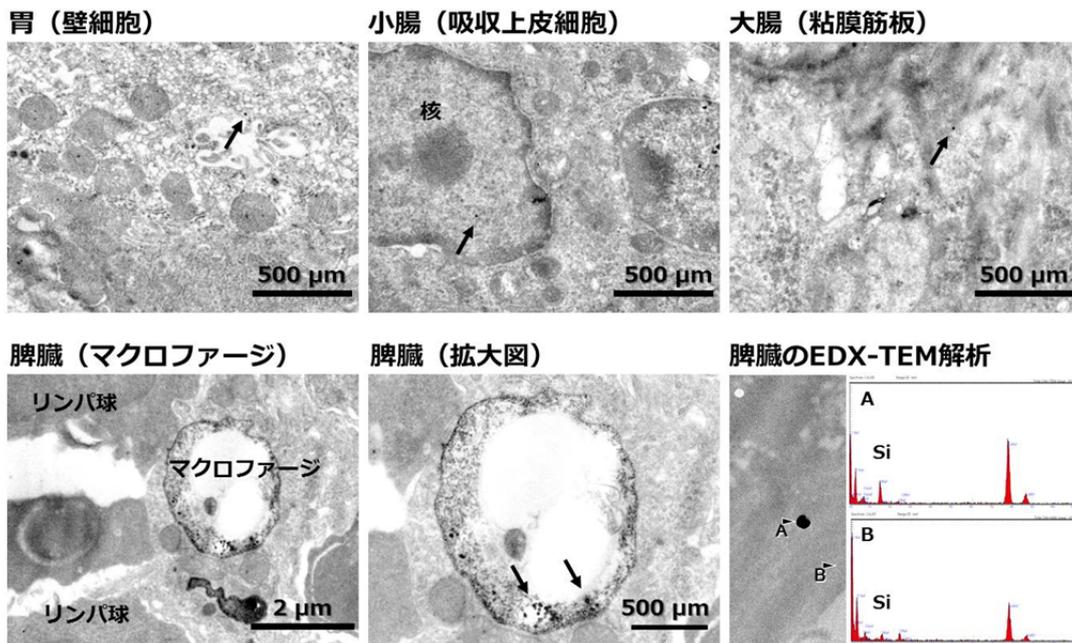


図 3. 透過型電子顕微鏡を用いた非晶質ナノシリカの消化管吸収性・生体内局在の解析

nSP30 をマウスに 2.5 mg/day/mouse で 7 日間経口投与した。最終投与から 24 時間後に胃・小腸・大腸・脾臓を回収し、生体内局在を透過型電子顕微鏡により観察した。

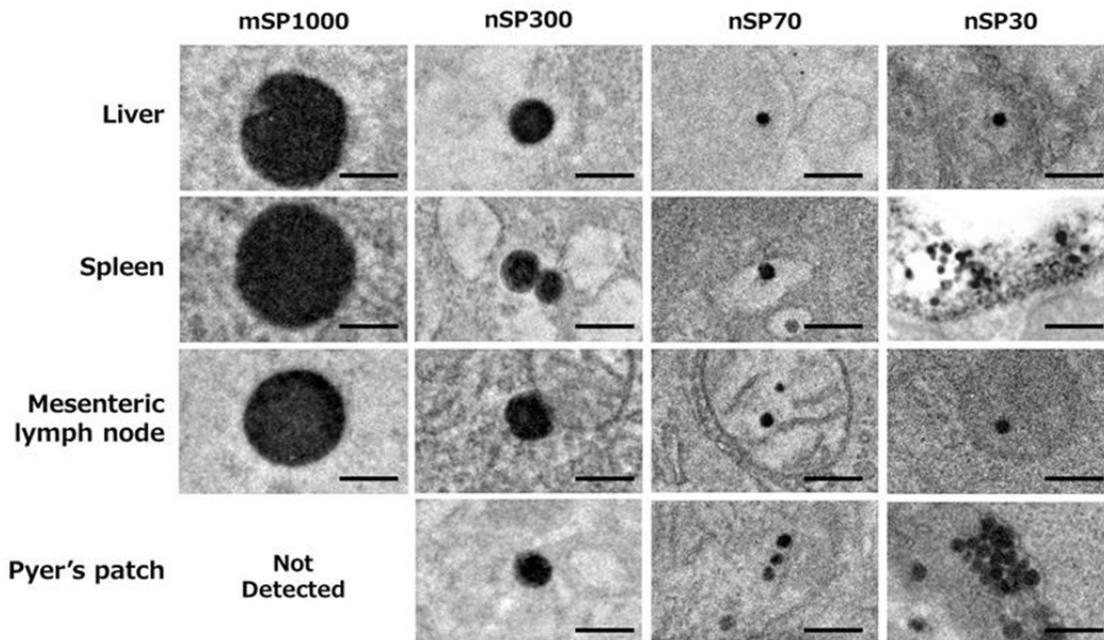


図 4. 粒子径の異なる非晶質シリカの消化管吸収性・生体内局在の解析

mSP1000、nSP300、nSP70、nSP30 をマウスに 2.5 mg/day/mouse で 28 日間連続経口投与した。最終投与から 24 時間後に、生体内局在を透過型電子顕微鏡により観察した。

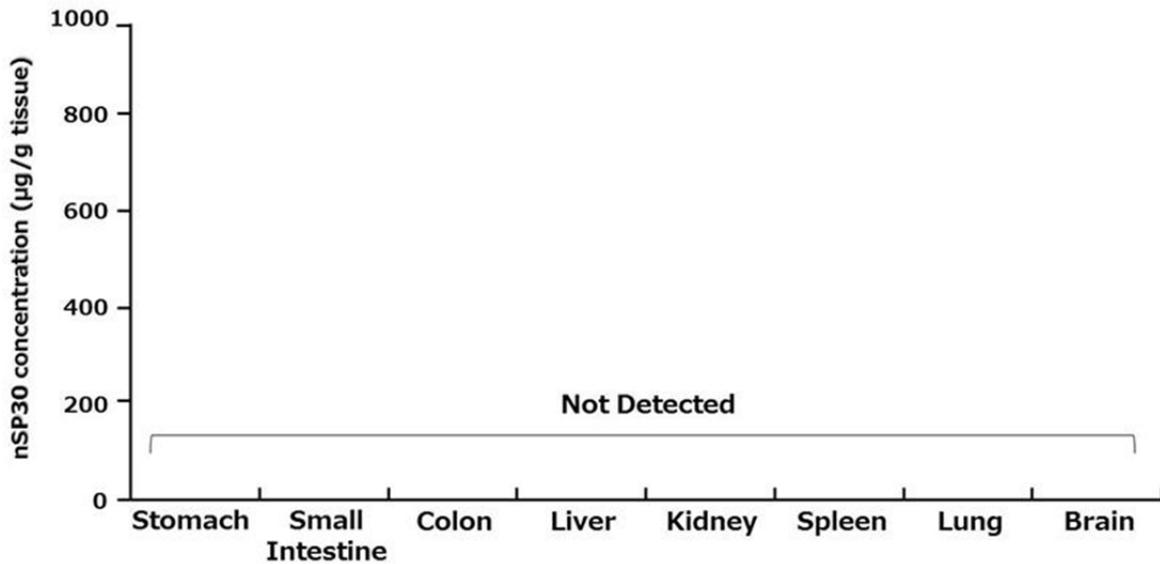


図 5. ICP-AES を用いた nSP30 の経口投与後生体内局在の定量

nSP30 をマウスに 0.8 mg/day/mouse で 28 日間連続経口投与した。最終投与から 24 時間後に臓器を回収し、生体内局在を ICP-AES により測定した。

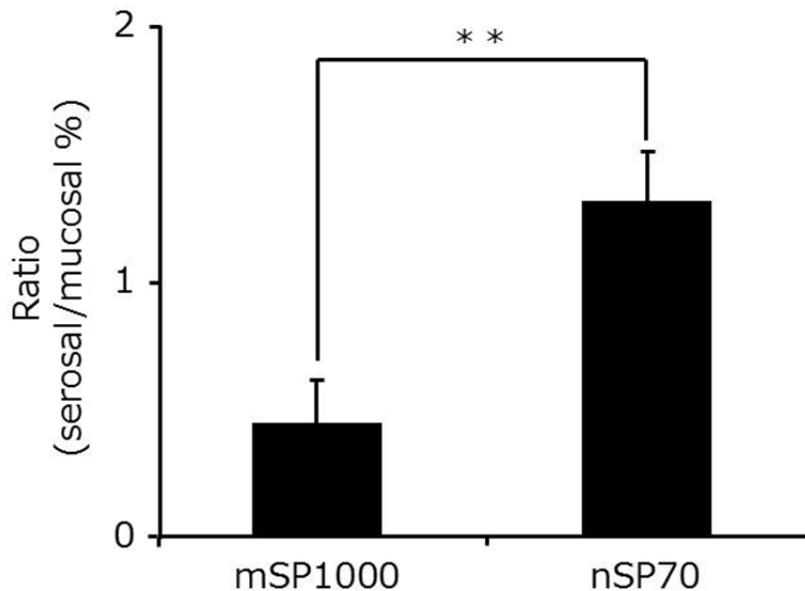


図 6. 粒子径の違いによる非晶質シリカの腸管吸収率の比較

反転したラットの小腸を、蛍光標識した mSP1000 および nSP70 溶液 (12.5 mg/mL) に浸け、37°C で 45 分間インキュベートした。反転した腸管の外側から内側に浸透したシリカ溶液の濃度を、蛍光強度を指標として測定した。なお、吸収率 (%) = $100 \times \frac{\text{【漿膜側(内側)のシリカ濃度】}}{\text{【腸管を浸ける前の粘膜側(外側)のシリカ濃度】}}$ として算出した。

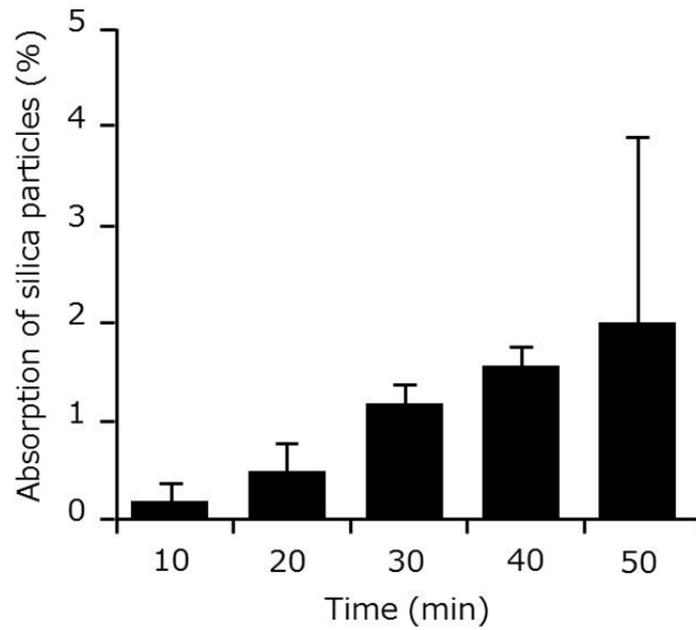


図 7. nSP70 の経時的な腸管吸収率

反転したラットの小腸を、蛍光標識した nSP70 溶液 (12.5 mg/mL) に浸け、37°C で 10、20、30、45、60 分間インキュベートした。反転した腸管の外側から内側に浸透したシリカ溶液の濃度を、蛍光強度を指標として測定した。

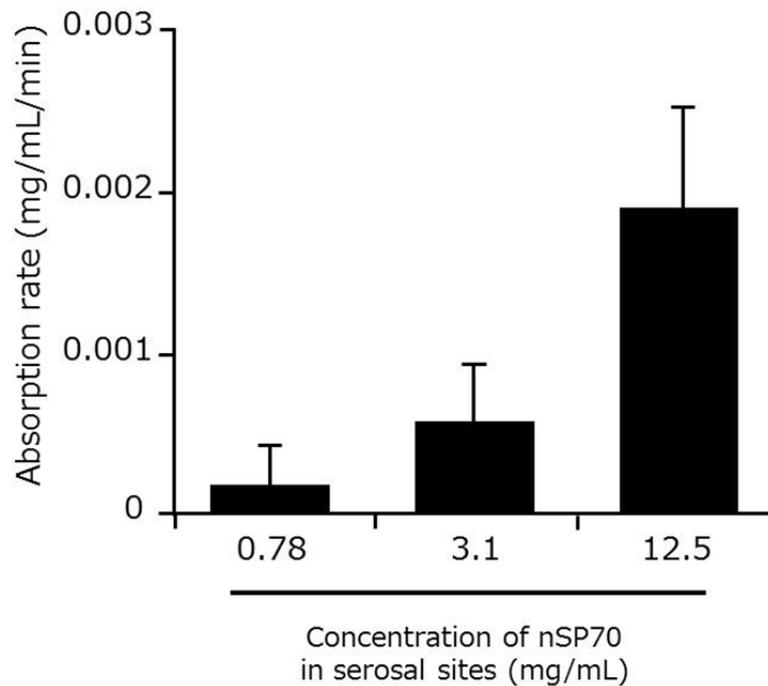


図 8. nSP70 の腸管吸収率の濃度依存性

反転したラットの小腸を、蛍光標識した 0.78 mg/mL、3.1 mg/mL、12.5 mg/mL の nSP70 溶液に浸け、37°C で 45 分間インキュベートした。反転した腸管の外側から内側に浸透したシリカ溶液の濃度を、蛍光強度を指標として測定した。

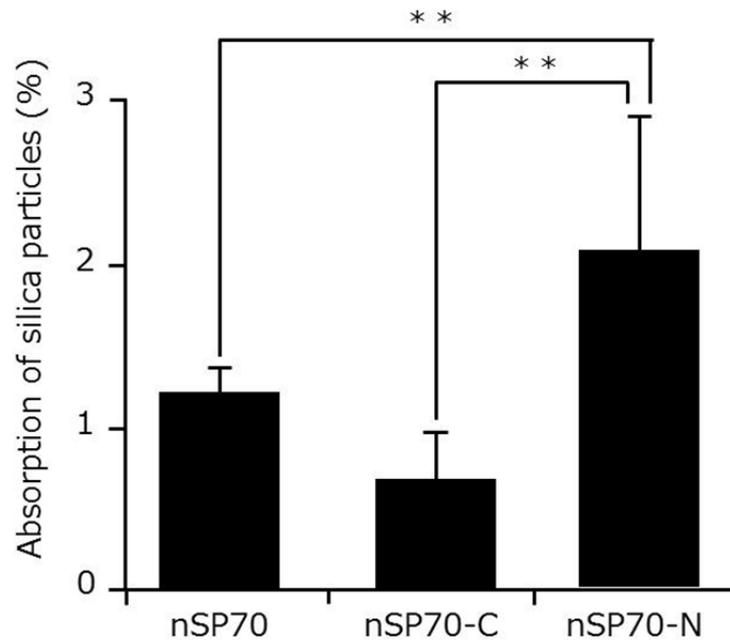


図 9. nSP70 の表面性状の違いによる腸管吸収率の比較検討

反転したラットの小腸を、蛍光標識した nSP70、nSP70-C、nSP70-N 溶液 (12.5 mg/mL) に浸け、37℃で 45 分間インキュベートした。反転した腸管の外側から内側に浸透したシリカ溶液の濃度を、蛍光強度を指標として測定した。

3) 個別課題名：白金ナノコロイドの生体内/細胞内動態追跡動態追跡

サブナノ白金について、定性/定量解析法の確立を試みた。まず、サブナノ白金の生体内局在について、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて評価した。BALB/cマウスに1次粒子径1 nmのサブナノ白金 (snPt1) を強制経口投与 (900 $\mu\text{g}/\text{body}$: 7日間) し、最終投与24時間後に各種臓器 (胃・小腸・大腸など) を回収した。これらの臓器を用いてTEMによるサブナノ白金の局在を観察した。その結果、サブナノ白金は、胃・小腸・大腸といった消化管組織のみならず、肝臓・脾臓・肺などの細網内皮系、さらには腎臓や脳にまで到達していた。また、パイエル板で観察された黒いドットに対してEDX-TEM解析を適用したところ、極わずかではあるが白金由来のシグナルが検出された。以上の結果から、サブナノ白金のEDX-TEM解析の最適化を完了し、本法を用いてサブナノ白金の経口投与後生体内局在を定性することに成功した。

下記の、「(1-2) 研究項目名：食品中ナノマテリアルの腸管吸収および体内動態を初めとする暴露実態の分析法の確立に向けたバリデーション解析」の「2) 個別課題名：白金ナノコロイド分析法のバリデーション」で詳細説明しているが、サブナノ白金の定量にはICP-MSが適用可能であり、マイクロウェーブ分解法による検出下限は0.036 $\mu\text{g}/\text{g}$ であることを見出している。そこで、ICP-MSを用いてサブナノ白金の経口投与後生体内局在の定量を試みた。本検討ではsnPt1とsnPt8の体内動態を比較解析した。まず、経口投与後の体内吸収性を検討した。BALB/cマウスに、snPt1およびsnPt8を10 mg/kg (血中のALT、AST、BUNなどの組織障害マーカーに変化の認められなかった最大用量) で経口投与した後、ICP-MSを用いて血中の白金量を経時的に測定した。その結果、snPt8は体内へ殆ど吸収されない一方で、snPt1は投与1時間後に血中最大濃度 (0.917 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、全投与量の2.68%が移行) に達し、その後、速やかに体内へ吸収されることが明らかとなった。すなわち、snPt1とsnPt8では、経口暴露後に全く異なる挙動を示すことが判明した。さらに、血中移行後の動態を精査する目的で、BALB/cマウスにsnPt1およびsnPt8を10 mg/kgで静脈内投与後、血中白金濃度を経時的に測定した。その結果、snPt1、snPt8投与群の血中白金濃度推移は分布相と消失相の二相性を示し、2-コンパートメントに分布することが明らかとなった。なお、分布相は、薬物が循環血流中から組織への分布が完了するまでの過程、消失相は、血中と組織内濃度が平衡に達した後、血中から消失していく過程である。分布相の血中半減期を算出した結果、snPt1は約0.07時間、snPt8は約0.58時間であり、消失相の血中半減期を算出した結果、snPt1は約37.2時間、snPt8は約21.6時間であることが判明した。従って、snPt1はsnPt8と比較して、分布相の血中半減期が短く、消失相の半減期が長いことから、血中移行後組織に分布しやすく、血中から消失しにくいことが明らかとなった。また、経口投与後の経時的な血中濃度推移を比較することにより、snPt1、snPt8のバイオアベイラビリティ (投与された薬物のうち全身循環血に到達した割合) および全身クリアランス (排泄されやすさの指標) を算出した。その結果、snPt1のバイオアベイラビリティはsnPt8の約8000倍、全身クリアランスはsnPt8の約5倍であり、snPt1はsnPt8と比較して、経口投与後に体内吸収されやすく、吸収後は排泄されやすいことが明らかとなった。以上の結果より、snPt1とsnPt8では、経口暴露後の体内動態が全く異なることが示された。なお、代表的な白金製剤であるシスプラチンの血中半減期は、分布相が約0.5時間、消失相が約100時間であり、snPt1はシスプラチンと比較すると、分布相の血中半減期は約6分の1、消失相の血中半減期は約3分の1であり、snPt1はシスプラチンよりも組織に移行しやすく、血中から消失しやすいことが示唆された。

次に、snPt1およびsnPt8を経口暴露した際の体内分布を調べた。BALB/cマウスに、snPt1およびsnPt8を20 mg/kgで単回経口投与し、24時間後に胃、小腸、大腸、肝臓、腎臓、

脾臓、肺、脳、心臓を摘出した。ICP-MSにより各組織の白金量を定量した結果、snPt1投与群において、投与局所の消化管だけでなく、すべての臓器において白金が検出された。さらに、各臓器への移行率を算出したところ、小腸に2.22%、肝臓に0.40%、腎臓に0.39%移行しており、これらの臓器に特に多く分布していることが明らかとなった。以上の結果から、サブナノ白金は、経口摂取後に体内に吸収され、全身に分布することが示された。この知見は、サブナノ白金の安全性評価において、投与局所である消化管だけでなく全身組織を対象としたハザード同定の必要性を示している。なお、他のNMの体内動態に関する報告では、肝臓や脾臓に分布するという知見が多いことを考慮すると、腎臓への移行性はsnPt1特有のものである可能性が考えられる。代表的な白金製剤であるシスプラチンは、有機カチオントランスポーター (OCT-2) によって取り込まれ、腎臓に蓄積することが知られているため、snPt1はシスプラチンと同様、OCT-2によって取り込まれたため、腎臓への移行性が高かった可能性が考えられる。一方、snPt8投与群においては、snPt1と比較すると非常に低い値ではあるものの、小腸に0.083%、大腸に0.032%、肝臓に0.048%残留しており、これらの臓器に特に多く分布していることが明らかとなった。snPt8の腎臓への移行性が低かったのは、snPt8はサイズの観点からOCT-2の基質になりにくいという可能性が考えられる。以上の結果から、snPtはサイズに関わらず経口摂取後に体内に吸収され、全身に分布すること、また、体内吸収量はサイズの小さいsnPt1の方が圧倒的に多いことが示された。しかし、今回は経口投与24時間後のデータしか得られていないため、臓器への分布速度を調べることができていない。今後、投与後から経時的に臓器中の白金量を測定することで、臓器への分布速度や移行性について、より詳細に検討していく必要がある。

次に、snPt1の残留量を評価する目的で、snPt1を経口投与後の、血液・肝臓・腎臓中の白金量を経日的に測定した。BALB/cマウスにsnPt1を20 mg/kgで経口投与し、1、3、7、14、28、56日後に血液・臓器を回収して白金量をICP-MSにより測定した。血中の白金の残留量を調べた結果、血中白金量は経日的に減少する一方で、投与56日後においても、微量（投与量のうち0.0003%）ではあるが、白金が検出された。このことから、snPt1は体内吸収後、数か月に渡り体内に残存することが明らかとなった。また、同様に肝臓・腎臓中の白金残留量を測定した結果、投与56日後の肝臓および腎臓中においても白金が検出された。さらに、消失しやすさの指標である消失速度定数を算出した結果、肝臓の消失速度定数は0.077 (hr⁻¹)、腎臓の消失速度定数は0.004 (hr⁻¹)であり、腎臓よりも肝臓からの方が、白金が消失しやすいことが明らかとなった。

次に、snPt1が長期に渡って血液や臓器中に残留することを踏まえ、snPt1およびsnPt8を連続投与した際の蓄積性を評価した。snPt1およびsnPt8を14日間連続経口投与し、Day1、3、7、10、14に解剖した。血液および臓器中の白金量を測定することにより、蓄積性を評価した。血中の白金を定量した結果、いずれのサブナノ白金も、投与回数を重ねることにより、血中の白金量が増えていることから、少しずつ蓄積していくことが明らかとなった。次に、snPt1投与群に関して、腎臓・肝臓中の白金量を測定した結果、腎臓・肝臓に関しても、投与回数を重ねることにより、白金量が増えていることから、少しずつ蓄積していくことが明らかとなった。また、10日目頃から蓄積量は飽和に達することが示唆された。以上の結果は、サブナノ白金が経口投与後に体内に吸収されて血液循環すること、ならびに到達した各種臓器を対象とした安全性評価が必須であることを示している。即ち、サブナノ白金のハザード解析や平均摂取量、そしてリスク解析が必要と考えられる。

なお現在、本研究成果について、より詳細なバリデーション評価を推進しており、本

報告書においては、図は割愛させていただく。

4) 個別課題名：ナノ銀の生体内/細胞内動態追跡

サブナノ銀について、定性/定量解析法の確立を試みた。まず、サブナノ銀の生体内局在について、TEMを用いて評価した。BALB/cマウスにサブナノ銀 (12.5 $\mu\text{g}/\text{body}$) を強制経口投与 (7日間) し、最終投与24時間後に各種臓器 (胃・小腸・大腸など) を回収した。これらの臓器を用いてTEMによるナノ銀粒子の局在を観察した。その結果、回収した全ての臓器において、サブナノ銀と思われる黒いドットが観察された。続いて、ナノ銀粒子の生体内局在の定量化を目的に、ICP-MSを用いたサブナノ銀粒子定量法の検出下限の算出を実施した。下記の、「(1-2) 研究項目名：食品中ナノマテリアルの腸管吸収および体内動態を初めとする暴露実態の分析法の確立に向けたバリデーション解析」の「3) 個別課題名：ナノ銀の分析法のバリデーション」で詳細説明しているが、サブナノ銀の定量にはICP-MSが適用可能であること、マイクロウェーブ分解法による定量限界は0.04 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。以上の結果から、ICP-MSを用いることで、0.04 $\mu\text{g}/\text{g}$ を下限として、サブナノ銀の経口投与後生体内局在や体内吸収性、血中半減期などを高感度に定量出来る事が明らかとなった。

一方で、例えばNM・sNMのADMEを理解するためには、血中移行性や血中半減期を定量する必要があり、短時間かつ簡便に多数のサンプルを定量する技術が必要になってくる。しかし、従来までのICP-MS法では、回収した血液をICP-MSで解析するにあたって、硝酸を加えた後にサンプル分解処理が必要であった。この前処理はデータのばらつきなどの原因になるうえ、多大な労力がかかる。そこで、サンプル希釈液を工夫 (界面活性剤を適量添加する) することによって、血液を前処理することなく、直接ICP-MSに供する手法の確立を試みた。硝酸銀水溶液をモデルとして用いて本法の妥当性を検証したところ、定量下限レベルの硝酸銀を添加した血液を測定した場合でも、血液単独よりも有意に高い (50倍以上) イオンカウントが得られた。すなわち、この結果から、独自に最適化した前処理を必要としない”直接ICP-MS法”を用いることで、サブナノ銀の血中移行量を定量出来る可能性が示された。実際、7.5 mgのサブナノ銀を単回経口投与したマウスを用いてサブナノ銀の血中移行量を分析したところ、投与24時間後であっても投与した内の0.2%が血中に残存していることが明らかとなった。

そこで、直接ICP-MSを用いてサブナノ銀の経口投与後生体内局在の定量を試みた。本検討では粒子径1 nmのsnAgと、粒子径20 nmのnAgの体内動態を比較解析した。また、コントロールとして銀イオンを投与した。BALB/cマウスに経口投与した後、ICP-MSを用いて血中の銀量を経時的に測定した。以上の結果から、サブナノ銀は、イオンともナノ銀とも異なり、経口投与後に多く吸収されることが判明した。以上の結果は、サブナノ白金が経口投与後に体内に吸収されて血液循環すること、ならびに到達した各種臓器を対象とした安全性評価が必須であることを示している。即ち、サブナノ白金のハザード解析や平均摂取量、そしてリスク解析が必要と考えられる。

なお現在、本研究成果について、より詳細なバリデーション評価を推進しており、本報告書においては、図は割愛させていただく。

(1-2) 研究項目名：食品中ナノマテリアルの腸管吸収および体内動態を初めとする暴露実態の分析法の確立に向けたバリデーション解析（研究担当者名：松田りえ子 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）

1) 個別課題名：微粒二酸化ケイ素（ナノシリカ）分析法のバリデーション

非晶質ナノシリカを定量するに当たっては、元素分析により組織中のケイ素含量を定量することによってナノシリカの体内局在を定量する。一般に、微量ケイ素の定量は、吸光光度法の他に、ICP-AESなどを用いることでppmレベルの定量が可能である。また、より高感度な元素分析装置としてICP-MSの適用が考えられるが、ケイ素（²⁸Si）が窒素（¹⁴N₂）の妨害を受けることから、ICP-MSを用いたケイ素の分析は困難である。そこで、本検討では、まず、原理的に質量数の影響を受けないICP-AESを用いてケイ素の検出下限の測定を試みた。予備検討の結果、ケイ素の検出限界は8.215 µg/gと算出された。しかし、本法では、最低でも1 gの組織が必要なため、肝臓（1 g）以外の組織を分析するためには多数のマウスから組織を回収する必要がある。また、ICP-MSと比較すると検出感度も1/100~1/1000程度であると言われている。従って、将来的には、分析の簡便性や精度の観点から、マウスを用いて微量の組織で定量できる手法の開発が必要になるものと考えられた。

2) 個別課題名：白金ナノコロイド分析法のバリデーション

白金ナノコロイド分析法の妥当性確認を実施した。まず、0、0.2、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 µg/Lの白金を含む検量線溶液を測定し、白金とタリウムのイオンカウントの比を求めた。イオンカウントを白金濃度に対して回帰し、検量線の一時回帰式を算出した。本妥当性確認中に7回の検量線作成が実施された。それぞれの検量線について、傾き、y-切片、相関係数、各検量線濃度で得られたイオンカウントから検量線を用いた逆推定した濃度と検量線溶液濃度との差（Diff.）及びDiffの検量線溶液濃度に対する比を%として示した値（Diff%）を求めた。その結果、いずれの検量線も相関係数0.9999以上の良好な直線性を示した。白金濃度0におけるカウント比は0.0003~0.001402の範囲であった。これは、白金濃度0.2 µg/Lのカウント比よりも十分に小さく、このレベルの測定の妨害とはならないと考えられた。Diff%は白金濃度0.5 µg/L以上では10%以下であった。以上のことから、検量線の直線性は十分と考えられた。

次に、試料の代わりに水を用いて得た測定ブランク溶液を測定し、その平均値および標準偏差を算出した。測定は1日の内に連続して10回測定し、残りの8回は5日に渡って測定された。測定ブランク溶液濃度の平均は0.018 µg/L、標準偏差は0.021 µg/Lであった。ブランク溶液から得られたカウント比は、濃度0 µg/Lの標準溶液および検量線のy-切片と同レベルであり、測定への環境からの白金のコンタミネーションはほとんど存在しないと考えられた。

次に、マウス肝臓をマイクロウェーブで分解し、ICP-MSにより白金を分析する方法が、マウスに投与したサブナノ白金の定量法として妥当であるかを確認した。未処理のマウス肝臓を用いて調製した試料溶液を測定した結果から、試料ブランクを5回測定した。試料ブランクは、試料溶液濃度から、次式により組織中濃度として表した。ただし、試料溶液濃度は上記の測定ブランクを差し引いた値を用いた。

試料中濃度(µg/g) = 試料溶液濃度(µg/L) × 0.01 (L) × 1.003 / 試料重量(g)

試料ブランクの平均は0.0001 µg/g、標準偏差は0.0036 µg/gであった。試料ブランク

の平均+3×標準偏差を検出限界とすると、検出限界は0.011 µg/gと算出された。同様に、試料ブランクの平均+10×標準偏差を定量限界とすると、定量限界は0.036 µg/gと算出された。定量限界が0.036 µg/gと推定されたことから、未処理マウスの肝臓に0.05 µg/gの白金を添加した試料の、1日2併行分析を5日間実施し、分析法の真度と精度を推定した。定量結果は試料中濃度から、上記の試料ブランク平均値を差し引いて求めた(図10)。その結果、真度は99.5%、併行精度は相対標準偏差として1.15%、室内精度は5.41%であった。食品中に残留する農薬などに関する試験法の妥当性評価ガイドライン(平成22年12月24日食安発1224第1号)では、0.05 µg/gの添加濃度での真度の目標値が70~120%、併行精度が<15%、室内精度が<20%とされている。この規準に照らせば、今回の妥当性確認から得られた結果に基づき、本分析法は目的に適合していると判断することができた。

図 10. サブナノ白金分析法の真度および精度

1	2	3	4	5	µg/g	SD	RSU%	SD	RSU%
0.05183	0.05081	0.04700	0.05187	0.04767					
0.05288	0.04983	0.04626	0.05247	0.04709	0.04977	99.5	0.000573	1.15	0.002692

3) 個別課題名：ナノ銀の分析法のバリデーション

サブナノ銀の分析法の妥当性確認を実施した。まず、0、0.2、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 µg/Lの銀を含む検量線溶液の傾き、y-切片、相関係数、各検量線濃度で得られたイオンカウントと内部標準(ロジウム)から得られたイオンカウントの比から検量線を用いて逆推定した濃度と検量線溶液濃度との差(Diff.)及びDiffの検量線溶液濃度に対する比を%として示した値(Diff%)を求めた。0-20.0 µg/Lの範囲の検量線では、切片が0.2 µg/Lのカウント比の半分程度であること、0.5 µg/LでのDiff%が-10%以下となる場合が認められることなど、定量に用いる検量線として不適切であった。検量線の濃度範囲を0-10.0 µg/Lとしたところ、y-切片が小さくなり、0.5 µg/LでのDiff%も低下したことから、検量線の濃度範囲は0-20.0 µg/Lを0-10.0 µg/Lとして定量を行った。

次に、試料の代わりに水を用いて得た測定ブランク溶液を測定し、その平均値および標準偏差を算出した。測定は1日の内に連続して10回測定し、残りの8回は5日におわたって測定された。測定ブランク溶液濃度の平均は0.004 µg/L、標準偏差は0.052 µg/Lであった。ブランク溶液から得られたカウント比は、濃度0の標準溶液および検量線のy-切片よりも低いことがあり、負となる場合も多くみられた。

次に、マウス肝臓をマイクロウェーブで分解し、ICP-MSにより銀を分析する方法が、マウスに投与したサブナノ銀の定量法として妥当であるかを確認した。未処理のマウス肝臓を用いて調製した試料溶液を測定した結果から、試料ブランクを測定した。試料ブランクは、試料溶液濃度から、次式により組織中濃度として表した。ただし、試料溶液濃度は上記の測定ブランクを差し引いた値を用いた。試料中濃度(µg/g) = 試料溶液濃度(µg/L) × 0.01 (L) × 1.003 / 試料重量 (g)

試料ブランクの平均は0.0001 µg/g、標準偏差は0.004 µg/gであった。試料ブランク

の平均+3×標準偏差を検出限界とすると、検出限界は 0.012 µg/g と算出された。同様に、試料ブランクの平均+10×標準偏差を定量限界とすると、定量限界は 0.04 µg/g と算出された。定量限界が 0.036 µg/g と推定されたことから、未処理マウスの肝臓に 0.05 µg/g の銀を添加し、1日2 併行分析を5日間実施し、真度と精度を推定した。定量結果は試料ブランク平均値を差し引いて求めた(図 11)に示す。その結果、真度は 109.5%、併行精度は相対標準偏差として 2.7%、室内精度は 3.4%であった。これらは、前出の妥当性評価ガイドラインの値を満足しており、本分析法のナノ銀投与実験における使用の妥当性が確認された。一方で、ブランクには環境からの影響が見られないにもかかわらず、真度が 100%を超えていた。また、検量線の切片が大きいため装置への銀の吸着の可能性があり、今後もさらなる改善を進めていく予定である。

図 11. サブナノ白金分析法の真度および精度

										内精度	
										RSD%	
0.03163	0.03061	0.04700	0.03167	0.04767	0.04977	99.5	0.000573	1.15	0.002692	5.41	

(2) 研究全体の成果、考察及び結論

食品中NM・sNMの安全性が世界的に危惧されているものの、NM・sNMのリスク情報は国内外を問わず、皆無に等しいばかりか、肝心の、食品中NM・sNMが腸管吸収されるのか、体内移行し全身分布・組織移行するのかさえ、未解明であり、食の安全確保の観点で、食品中NM・sNMのリスク評価が必要か否かが当面の課題となっている。またNM・sNMの暴露実態（消化管吸収、その後の組織分布・細胞内局在、滞留性・蓄積性、排泄など）など、ヒト健康影響を評価し得る基盤手法も確立されていない。そこで本研究では、様々な物性（サイズ・形状・表面電荷など）の種々NM・sNMの経口投与後の動態（暴露実態）を定性的かつ定量的に解析できる手法を確立し、経口投与後のNM・sNMの動態情報を解明し、これらの知見を元に、NM・sNMの体内/細胞内動態の視点から、食品中NM・sNMが新たな危害要因となる可能性を探求することを目指した。

その結果、本事業では主に、下記の成果を得た。

■NM・sNMの生体内・細胞内局在解析技術

- ① 共焦点レーザー顕微鏡を用いた非晶質ナノシリカの細胞内局在イメージング法を確立した。
- ② TEMを用いた非晶質ナノシリカの生体内/細胞内局在イメージング法を確立した。
- ③ EDX-TEMを用いた非晶質ナノシリカの生体内局在同定法を確立した。
- ④ ICP-AESを用いて非晶質ナノシリカの検出限界・定量限界を算出した。
- ⑤ 腸管反転法による非晶質ナノシリカの腸管吸収性予測法を確立した。
- ⑥ TEMを用いてサブナノ白金とサブナノ銀の生体内局在イメージング法を確立した。
- ⑦ ICP-MSを用いてサブナノ白金とサブナノ銀の検出限界・定量限界を算出した。
- ⑧ 直接ICP-MSによる血中サブナノ銀定量技術を確立した。

■NM・sNMの生体内・細胞内局在に関する情報

- ⑨ 非晶質ナノシリカの表面性状が細胞内局在に著しく影響することを明らかとした。
- ⑩ ナノシリカが消化管細胞株の核内に到達することを見出した。
- ⑪ 直径30 nmの非晶質ナノシリカ（nSP30）が消化管局所（胃・小腸・大腸）のみならず、血中移行して脾臓にまで到達することを見出した。
- ⑫ 脾臓に到達したnSP30を同定することに成功した。
- ⑬ 100 nm以下の非晶質ナノシリカが、サブミクロンサイズとは異なる体内分布特性を示すことを明らかとした。
- ⑭ 独自の腸管吸収性予測法を確立し、経口投与した非晶質ナノシリカがサブミクロンサイズよりも腸管吸収されやすいことを明らかとした。
- ⑮ サブナノ白金が消化管局所（胃・小腸・大腸）のみならず、血中移行して脳・肝・肺・脾などに到達することを見出した。
- ⑯ 経口投与したサブナノ白金は、胃や大腸等の消化管局所だけでなく、血中に移行した後に脳・脾臓・肝臓・パイエル板にまで到達することを明らかとした。
- ⑰ 経口投与したサブナノ白金の体内動態を明確にし、動態パラメータを算出した。
- ⑱ 経口投与したサブナノ白金は、血中移行後、肝臓や腎臓への移行性が高いことを明らかとした。
- ⑲ 経口投与したサブナノ銀は、胃や大腸などの消化管局所だけでなく、血中に移行した後に脳・脾臓・肝臓・パイエル板にまで到達することを明らかとした。
- ⑳ 単回経口投与したサブナノ銀は、銀イオンやナノ銀とも異なり、体内移行しやすいことを明らかとした。

特に、snPt1とsnPt8は、体内吸収性・血中移行後の動態・体内分布が異なり、snPt1は投与局所である消化管だけでなく、腎臓や肝臓に多く分布し、蓄積することが示された。本結果は、粒

子径1-8 nmの間に、体内動態に関する閾値・転換点が存在する可能性、また、snPt1の安全性を評価するにあたり、腎臓・肝臓などを対象とした評価が必要であることを示している。今回、粒子径1 nmと8 nmという、わずかな差によって、体内動態が異なる結果が得られたのは、①腸管のバリアは1~2 nmであるため、snPt1は腸管バリアを通り抜けるのに対し、snPt8は腸管バリアを通らずパイエル板を介するなど、吸収経路が異なる可能性、②snPt1およびsnPt8では、血中のタンパク質との相互作用が異なる可能性、③snPt1およびsnPt8では、腎臓のトランスポーターとの相互作用が異なる可能性が考えられる。従って、今後は、sNMの体内吸収機構や排泄機構など、より詳細な体内動態解析を進めると共に、ハザード発現との関係性を精査していく必要があると考えられる。一方で、蓄積性、排泄・分解性についても、より詳細な検討が必要だと考えられる。

NMやsNMなどの新規素材の安全性研究において、体内吸収性や体内動態などの暴露実態情報の収集は重要であるにも関わらず、これらの情報は乏しいのが現状である。従って、本事業で得られた知見は、NM・sNMの安全性確保、ひいてはナノ産業の発展、NM・sNMの社会受容の促進（Sustainable Nanotechnology）に貢献できるものと確信している。

III 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

Nabeshi H, Yoshikawa T, Arimori A, Yoshida T, Tochigi S, Kondoh S, Hirai T, Akase T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, Yoshioka Y, Tsutsumi Y. : Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Research Letters*. 2011, 6:93.

2 本研究を基にした学会発表の実績

1. 吉田徳幸, 吉川友章, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経口曝露における免疫攪乱作用の解析., 第9回次世代を担う若手ファーマ・フォーラム2010, 京都(京都), 2010年10月.
2. 吉田徳幸, 吉川友章, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 吉岡靖雄, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経口影響に関する基礎情報の収集., 第60回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪(大阪), 2010年10月.
3. 吉田徳幸, 吉川友章, 鍋師裕美, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経口曝露における安全性評価., 日本薬学会 第131年会, 静岡(静岡), 2011年3月.
4. 宇治美由紀, 吉川友章, 吉田徳幸, 三里一貴, 宇高麻子, 森 宣瑛, 平井敏郎, 市橋宏一, 高橋秀樹, 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, 堤 康央: 経口投与したサブナノ白金の腎障害誘発性に関する基礎検討., 日本薬学会第132年会., 札幌(北海道), 2012年3月.
5. 森 宣瑛, 吉川友章, 吉田徳幸, 平井敏郎, 宇治美由紀, 市橋宏一, 高橋秀樹, 宇高麻子, 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: マウスモデルにおけるサブナノ銀粒子の経口ハザード同定., 日本薬学会第132年会., 札幌(北海道), 2012年3月.(発表予定)
6. 吉岡靖雄, 宇治美由紀, 吉田徳幸, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 食品中サブナノマテリアルの安全性評価: 経口投与したサブナノ白金の体内動態及び生体影響に関する基礎検討., 日本食品衛生学会第103回学術講演会., 東京(東京), 2012年5月.
7. 宇治美由紀, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 三里一貴, 宇高麻子, 森 宣瑛, 平井敏郎, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの腸管吸収性に関する基礎情報の収集., 第39回日本毒性学会学術年会., 仙台(宮城), 2012年7月.
8. 吉岡靖雄, 森 宣瑛, 吉田徳幸, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 食品中サブナノマテリアルの安全性評価: 経口投与したサブナノ銀の生体影響に関する基礎検討., 第104回日本食品衛生学会学術講演会., 岡山(岡山), 2012年9月.
9. 宇治美由紀, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 三里一貴, 宇高麻子, 森 宣瑛, 山口真奈美, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの腸管吸収性に関する基礎情報の収集., 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会., 西宮(兵庫), 2012年10月.
10. 三里一貴, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 宇高麻子, 森 宣瑛, 山口真奈美, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 東阪和馬, 堤 康央: 食品ナノ安全科学研究 ~食品中サブナノ素材の安全性評価に向けた腸管吸収性・体内分布の解析~, 日本薬学会第133年会., 横浜(神奈川), 2013年3月.
11. 山口真奈美, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 宇高麻子, 森 宣瑛, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 東阪和馬, 堤 康央: サブナノ素材の体内動態解析に関する基礎的検討., 日本薬学会第133年会., 横浜(神奈川), 2013年3月.
12. Uji M, Yoshioka Y, Yoshida T, Misato K, Udaka A, Mori T, Akase T, Tsunoda S, Nab

eshi H, Yoshikawa T, Tsutsumi Y. : Biological effect of sub-nano platinum following oral administration, The 6th International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012), Beijing (China), 4-7 September, 2012.

3 特許及び特許出願の数と概要

該当無し

4 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築など）

1. 2010年11月8日付けの日本経済新聞11面に、ナノマテリアルの安全性評価研究の成果が掲載された。
2. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会優秀研究発表賞を受賞。演題名：ナノマテリアルの安全性確保に向けて～非晶質ナノシリカの細胞内局在と安全性の連関に関する基礎情報の集積～（2010年6月）
3. 2011年2月25日付けの毎日工業新聞3面にナノマテリアルの安全性評価研究の成果が掲載された。
4. 2011年4月11日付けのChemical & Engineering News (April 11, 2011, Volume 89, Number 15, P35) にナノマテリアルの安全性評価研究の成果が掲載された。
5. 2011年4月25日付けの日本経済新聞11面に、ナノマテリアルの安全性評価研究の成果が掲載された。
6. 日本薬学会第132年会にて下記のシンポジウムをオーガナイズ
タイトル：ナノマテリアルの開発・安全性評価の最前線～産官学の取り組み～
座長：吉岡靖雄・堤 康央
日時：平成24年3月30日(金)
7. 2012年2月6日付けの朝日新聞（夕刊）9面（関西版）に、ナノマテリアルの安全性評価研究の成果が掲載された。
8. 2012年2月6日付けの朝日新聞（夕刊）1面（関東版）に、ナノマテリアルの安全性評価研究の成果が掲載された。
9. 薬事日報（2012年3月21日の日本薬学会第132年会特集号）に、ナノマテリアルの開発・安全性評価の最前線～産官学の取り組み～（オーガナイザー：吉岡靖雄・堤 康央）の記事が掲載された。

IV 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	4. 5	<p>ナノ・サブナノマテリアルのリスク評価を実施するに当たっては、これら素材の暴露実態（体内吸収性/動態/局在）を定性/定量解析する必要がある。しかしながら、現状は、定量技術が未発達である点が、ナノマテリアル・サブナノマテリアルのリスク評価における潜在的な課題であった。その点、本研究は、潜在的なこれらの課題にいち早く着目し、高感度かつ高精度な機器を駆使して克服した点で、妥当な研究であり、国民の健康確保や安全安心確保の観点での行政ニーズ・社会ニーズと照らしあわせても、必須の取組であったといえる。また、定量解析手法の開発においては、単に定量数値を算出するだけでなく、得られた結果の科学的かつ統計学的な妥当性評価が必須である。その点、当該事業においては、毒性学・薬物動態学をバックグラウンドとして有する研究代表者の堤 康央（阪大院・薬）と、食品中の化学物質の微量分析・バリデーションの専門家である分担研究者の松田りえ子（国立衛研・食品部）の連携により、上記を達成し得る万全の体制で遂行されたものである。さらに、当初予定していたナノマテリアルに加えて、今後市場へ浸透することが予想されるサブナノマテリアルをも評価対象に組み入れた点は、本課題の重要性と継続性を見据えたものであり、先見性・継続性・社会的重要性の観点からも妥当性の高い研究と言える。</p>
2 研究目標の達成度	4. 5	<p>本研究では、ナノマテリアルに加えて、サブナノマテリアルの動態解析基盤を構築したうえで、経口暴露後の体内動態を詳細に評価するなど、研究目標を不足無く実施期間内に着実に達成できたものと考えている。一方、ナノシリカについては、簡便性・感度の点で、in vitro 解析法は改善すべき点があるものと考えているものの、in vitro 代替法を開発するなど、十分な成果を挙げたものと考えている。</p>
3 研究成果の有用性	4. 5	<p>本研究では、ナノ・サブナノマテリアルの暴露実態（体内吸収性/動態/局在）を定性/定量解析する技術を開発したうえで、経口暴露後の体内動態を詳細に評価した。本成果は、ナノ・サブナノマテリアルのハザード評価やリスク解析、素材の物性とこれらの現象との因果関係の追求などが、近未来的に必要な可能性を示しており、国策主導の食品健康影響評価の必要性を裏付けるものである。特に、サブナノマテリアルに着目したハザード同定などが必須であることを先駆けて提唱するなど、今後の食品ナノ・サブナノマテリアルの安全性評価における道筋を提案したものと考えている。すなわち、本研究で得られる成果は、リスク解析・評価の技術として汎用性・継続性・精度の点で有用であり、食の安全・安心の確保、さらには安全な食の開発</p>

		や提供の視点から、有用性は極めて高い。
合 計	13.5	
<p>総合コメント</p> <p>以上、本事業では、当初予定を逸脱することなく常に前倒しで研究を進めてきた点を評価し、また、資金の使用について、内閣府の職員の方々と連携しつつ、適切に支出した点を評価し、合計13.5点を付けた。今後、事後評価を受け、課題設定・手法・対象素材の選択・研究グループの構成・資金支出の点についても、様々な視点からの適切かつ厳正なご指導ご叱責を賜り、今後の研究推進・構築の参考にさせていただければと願っている。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。