

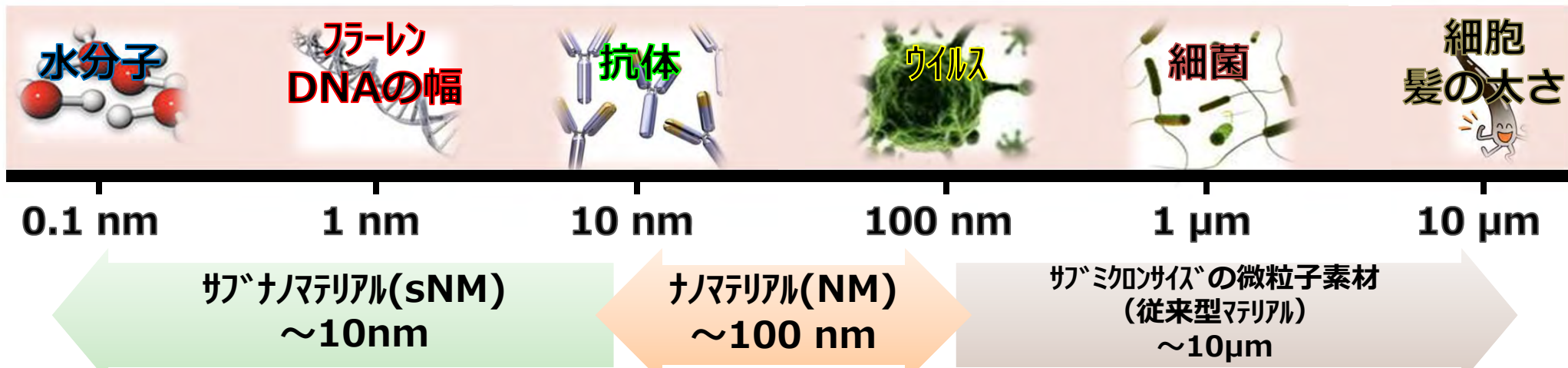
平成25年度食品健康影響評価技術研究成果発表会  
(発表35分、質疑10分：合計45分)

日時： 平成25年8月29日(木)14:20～15:05  
場所： 内閣府食品安全委員会事務局  
赤坂パークビル 22階中会議室



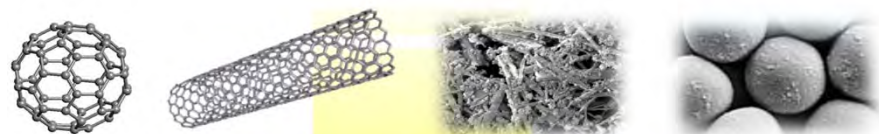
# 食品中ナノマテリアルの腸管吸収 及び体内動態の特性を利用 したリスク評価手法の開発

堤 康央・吉岡靖雄（阪大院薬）  
松田りえ子（国立衛研）



## ナノ・サブナノ材料の発展

NMとは、1次元が100 nm 以下の素材。サブミクロンサイズの素材にはない画期的機能を発揮する。



様々な分野で  
応用



医薬品



化粧品



食品



工業製品

## 規制・ガイドラインの欠如



NM・sNMの品質を評価、管理、保障し、安全・安心に製造・使用していくための規制・ガイドラインについては全く整備されていない。

# ナノ材料 (NM) の社会受容と持続利用の促進を目指して ~Sustainable Nanotechnologyの推進~

## Nano-Safety Science (ナノ安全科学) の視点から

### 有用性・安全性の検証

- ・ハザード同定
- ・体内/細胞内動態の定性解析・微量同定

NMの動態 (ADME) 評価 (定量的)

NMのハザード (T) 評価 (定量的)

得られたADMET情報から、NMのリスク解析や安全性把握を推進



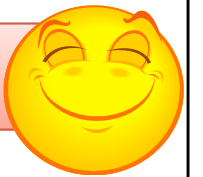
## Nano-Safety Design (ナノ最適設計) の視点から

### 有用性・安全性の向上



安全性が懸念

安全性が保証



リスク管理/使用規制



ヒト健康の確保!

むしろ

安全性を確保していく

- ・安全なNMに仕立て上げる
- ・ハザード発現の原因を追及
- ・毒性を回避する方法を提案

積極的に有効活用



食品



医薬品



化粧品

# 研究背景①：食品中ナノ材料の安全性評価の現状 4

2008年の米国食品医薬品局（FDA）の調査では、NM・sNM含有食品・飲料は既に80品目を超えていることが報告されており、2030年にはサブナノ・ナノ食品市場は2500億円に達することが予測されている。

## ● NM（10～100nm）の食品への利用

	非晶質ナノ粒子 (nSP)	ナノ酸化チタン (nTiO <sub>2</sub> )
サイズ	10～70 nm (30nm程度が主流)	10～100 nm (数10nmが主流)
用途	固結防止剤	着色料 (欧米)
製品例	製菓、インスタ食品など	チョコレート、清涼飲料水など

## ● sNM（0.1～10nm）の食品への利用

	サブナノ粒子 (snSP)	サブナノ銀 (snAg)	サブナノ白金 (snPt)
サイズ	1-10 nm程度	1-10 nm程度	1-10 nm程度
用途	固結防止剤	抗菌剤	抗酸化剤
製品例	製菓、インスタ食品など	サプリメント、食品保存袋など	サプリメントなど

### 推定曝露量

- ・ 微粒二酸化チタン (ナノ粒子) 530  $\mu\text{g}$  / 人/日 (出典：食品安全委員会 添加物評価書)  
 国外においてはヨーヨークリームに5.1 g/kg、スプレッドミックスに4.9 g/kg、インスタスープに0.6 g/kg、粉末ミルクに5.4 g/kgで含有される例が報告され、仮にこれら4製品を1日に摂取するだけで**非晶質ナノ粒子の摂取量は750 mg/day**となる
  - ・ ナノ白金 17  $\mu\text{g}$  / 人/日 (出典：厚生労働省 国内におけるナノ材料の使用実態調査2008)
  - ・ ナノ銀 150  $\mu\text{g}$  / 人/日 (銀含有サプリメント100  $\mu\text{g}$ +日常食からの経口摂取量50  $\mu\text{g}$ )
- 体内分布などのADME<動態>は不明ではあるが、曝露局所では思いの外、高濃度である！



一方でNM・sNMが、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材では認められなかった**特有のバグ-ト** (ナノ毒性；NanoTox) を発現してしまうことが、世界的に危惧され始めており、2011年に欧州EFSA・2012年にFDAが、食品中NMに関するリスク評価がトーンを出している。



# 研究背景②：食品中ナノ材料の安全性評価に向けて 5

現在のNM・sNMの安全性評価研究は、細胞毒性や遺伝毒性、発がん性といった一部の「ガード」情報の収集に偏っていることに加え、**最も重要で、緊急性の高いこととして、曝露実態（動態：曝露量/吸収性・量/蓄積性・量/局在性など）に関する情報が決定的に欠落している点である。**これらを追求し、今後のリスク解析研究の必要性や、その是非を見極めることが急務と言える。

## 【何故、曝露実態（動態）の解析が必要なのか？？？】

\*特にナノ材料に関しては「ガード」・動態情報とも皆無。

- 確かに、従来までのサブミクロサイズ（100nm）以上の素材は体内に殆ど吸収されないため、仮に「ガード」（毒性）が強くとも、殆ど体内曝露されないことになり、結果的にリスクは低く、安全であったと言える。
- 一方でナノあるいはサブナノサイズの素材は、ウイルス（100nm）～蛋白質（20nm）～低分子のレベルまで微小化されており、過去の経験からすると、もはや**体内に吸収される可能性を完全に排除できない。**

即ち、もし体内に微量でも吸収されるのであれば、過去に『**吸収されにくがゆえに、安全であることが判明していた従来素材（構造式が同じ）**』であったとしても、ナノ化あるいはサブナノ化されることに伴い、①長期的に曝露した場合の慢性毒性のチェック、②曝露局所のみでなく、全身を対象とした臓器毒性のチェックが必要となるなど、詳細な動態や「ガード」の評価と、これらを活用したリスク解析が**今後、必要**となってくる。

→纏めますと、このままでは、**様々な健康状態の、あらゆる世代のヒトが、“思いの外、多量”**の食品中NM・sNMを、“**生涯に渡って**”摂取してしまう可能性がある。だからこそ**今、腸管吸収性といった動態を精査し、その後、もし必要となれば、引き続いて、NM・sNMの「ガード」評価、そしてリスク解析を早急**に実施すべき。

**ようは、何よりもまず、吸収されるかどうかを明確にすることが重要ミッション！！**

病人



妊婦/胎児



乳幼児



小児



青少年



成人（男女）



老人



非晶質ナノシリカ (nSP) ・ サブナノ白金粒子 (snPt) ・ サブナノ銀粒子 (snAg) を中心に、

① NM・sNMの、微量同定・定量化技術を開発・最適化する。


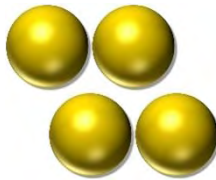

② 定量的な経口曝露後動態情報の収集を試みる。

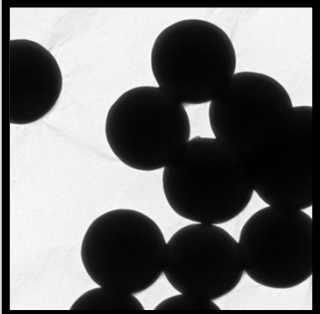
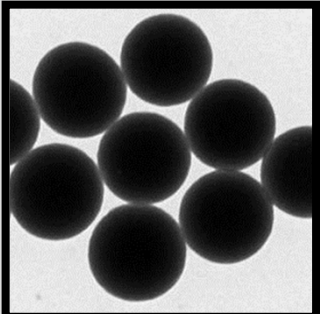
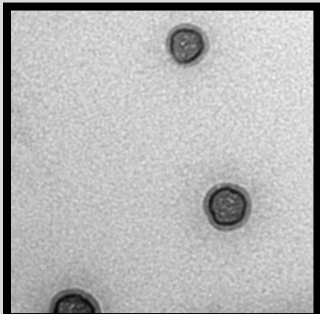

将来的に詳細なハザード評価研究やリスク解析研究が必要となるか否かといった是非を追求した。

① ナノ・サブナノ材料の同定・定量化技術の開発および最適化 (阪大院薬：堤)

② 微量同定・定量化技術の妥当性評価 (国立衛研・食品部：松田)

③ 上記の基盤技術を用いた経口曝露後動態の解析 (阪大院薬：堤)

	ナノシリカ (nSP)	サブナノ白金粒子 (snPt)	サブナノ銀 (snAg)
			
サイズ	30-100 nm程度	1-10 nm程度	1-10 nm程度
用途	固結防止剤	抗酸化剤	抗菌剤
製品例	製菓、インスタ食品など	サプリメントなど	食器、保存袋など

	mSP1000	nSP300	nSP70	nSP30
透過型電子顕微鏡像				
1次粒子径 (nm)	1000	300	70	30
2次粒子径 (nm)	1136 ± 32.1	264 ± 7.2	76 ± 1.7	39 ± 4.2
表面電荷 (mV)	-33.2 ± 1.4	-25.8 ± 0.7	-19.5 ± 1.0	-14.0 ± 1.3

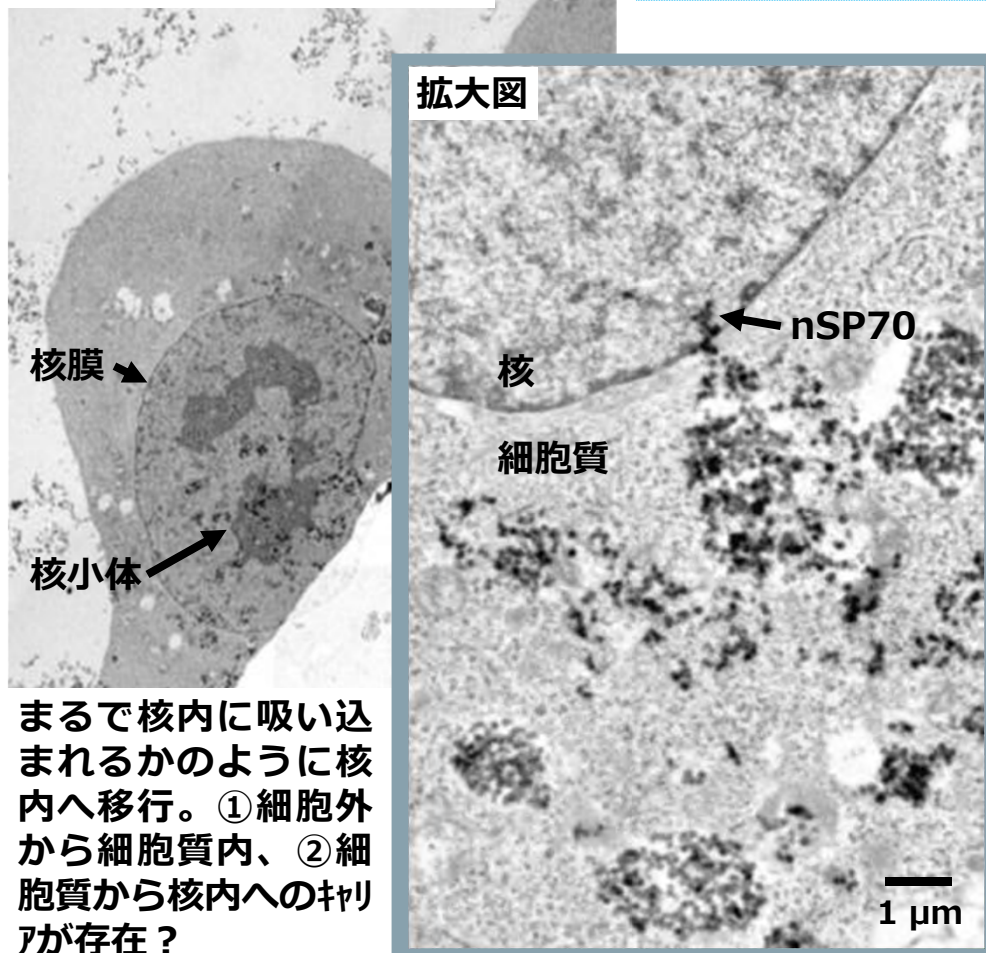
**ヒトの1日シリカ摂取量は少なくとも500 μg/dayであると推定**：国外においてはコーヒー・クリームに5.1 g/kg、アイスミックスに4.9 g/kg、インスタントスープに0.6 g/kg、粉末ソースに5.4 g/kgで含有される例が報告されている。仮にこれら4製品を1日に摂取するだけで**非晶質ナシリカの摂取量は750 mg/day**となることから、我々は推定値以上に非晶質ナシリカを摂取していると考えられる。



# 非晶質ナノカ (nSP) の細胞内動態 (局在) 解析 8

## 透過型電子顕微鏡

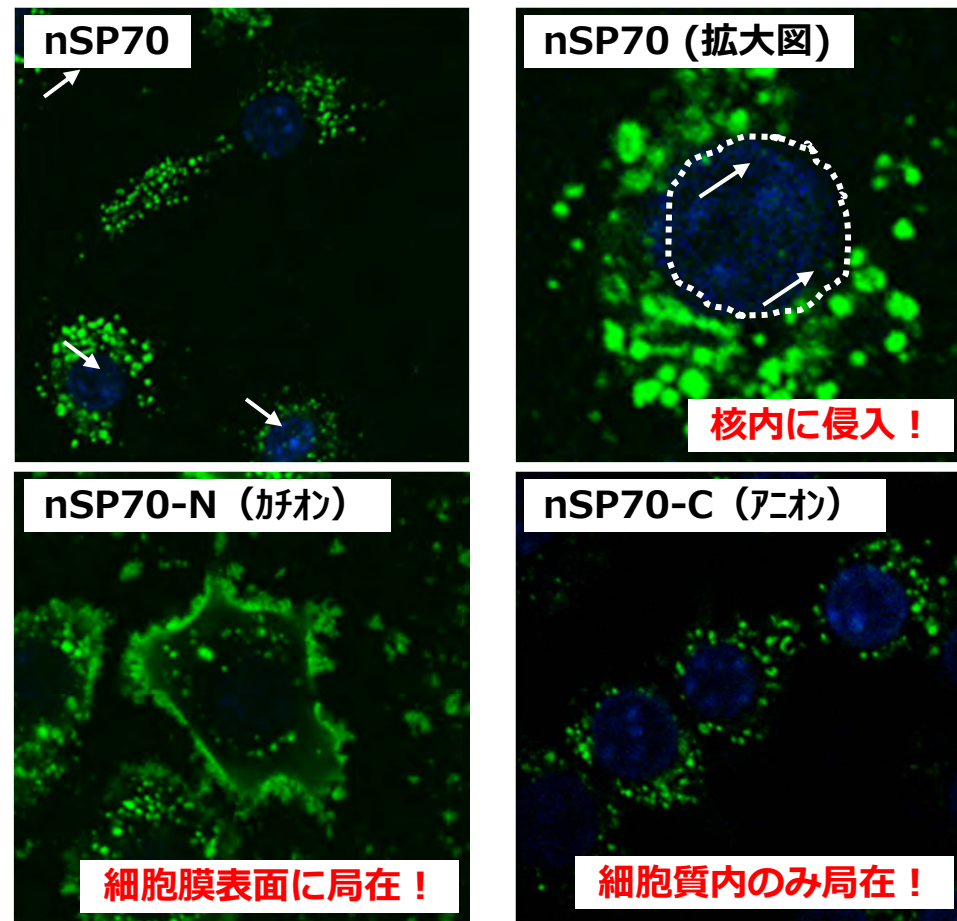
1次・2次粒径：70 nm  
<添加24時間後>



まるで核内に吸い込まれるかのように核内へ移行。①細胞外から細胞質内、②細胞質から核内へのキャリアが存在？

## 共焦点レーザー顕微鏡

1次・2次粒径：70 nm



Nanoscale Research Letters 2011, 693に公表済み。

100nmより小さくなると、同一組成であっても、100nm以上のサブミクロンサイズの従来素材と動態がまるで異なってくること、さらに、表面性状も動態特性を変動させること（蛋白質間相互作用の変化？）が判明した。



投与量 : 2.5 mg/body  
投与期間 : 28日間経口  
<最終投与24時間後>

mSP1000  
<粒径 : 1 $\mu$ m>

一方で、100 nm以下のサイズになると、

nSP300  
<粒径 : 300nm>

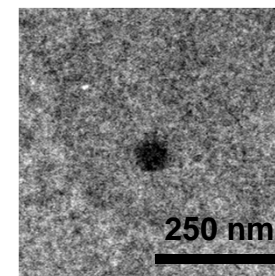
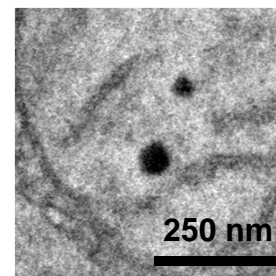
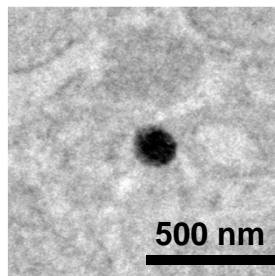
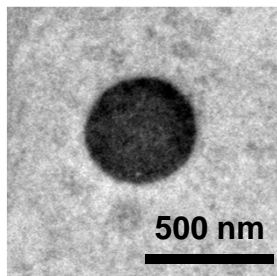
nSP70  
<粒径 : 70nm>

nSP30  
<粒径 : 30nm>

経口曝露後、量的には少ないものの、mSP1000、nSP300は吸収され、

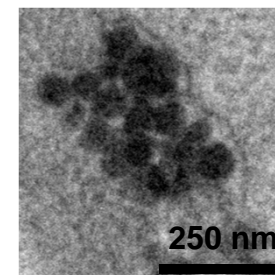
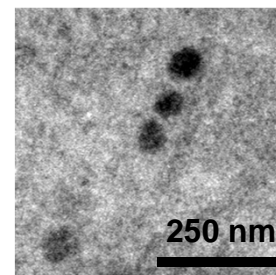
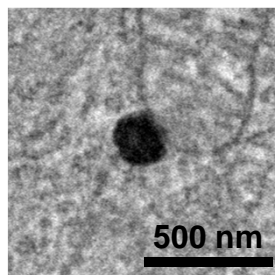
nSP70やnSP30は経口曝露後、一部が吸収され、

腸管膜  
リンパ節



肝臓

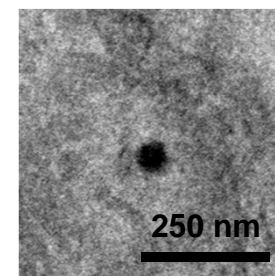
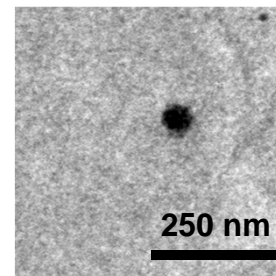
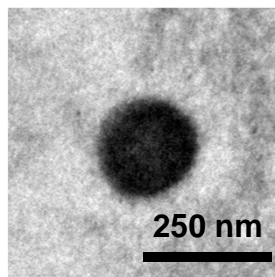
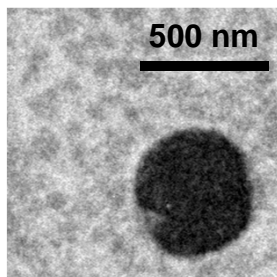
粒子は  
観察されず



肝臓の非実質細胞に分布し (実質には殆ど行かない) 、

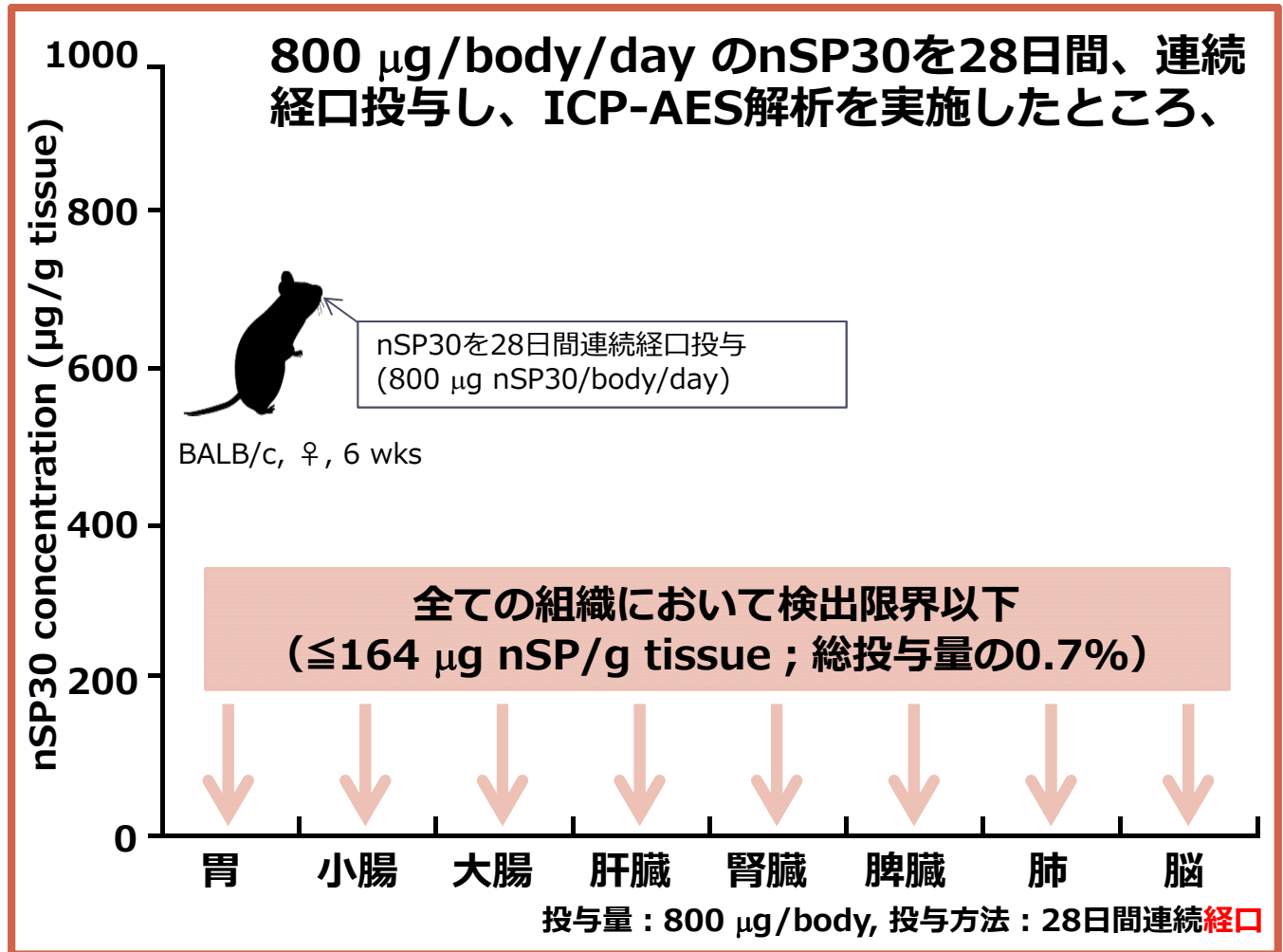
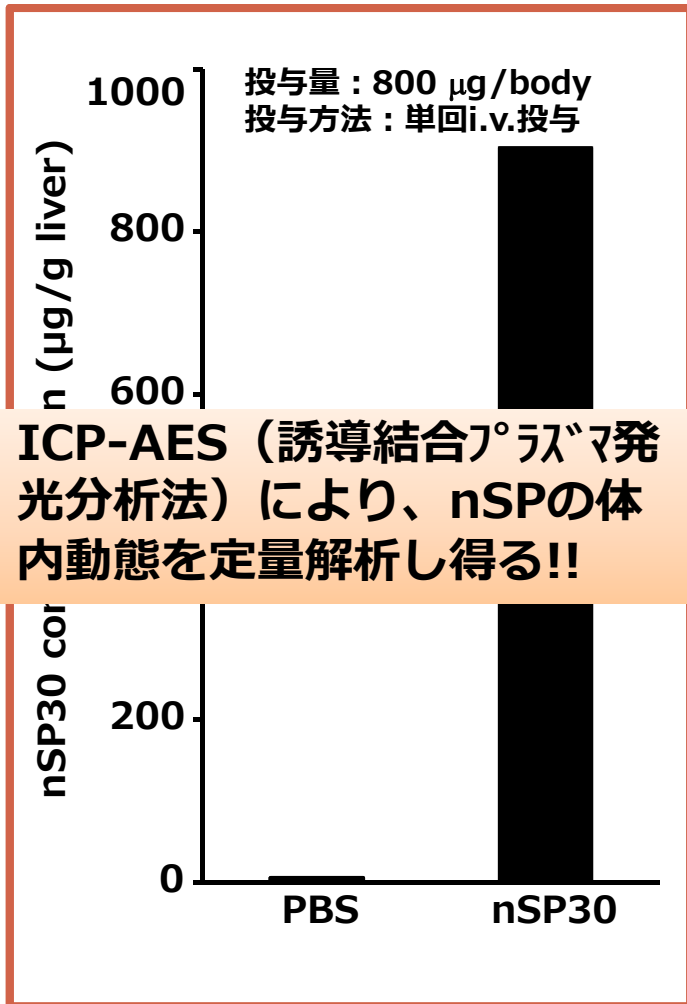
主として肝臓の実質細胞に分布し、

肝臓



胆汁排泄されることが判明した (体内には殆ど蓄積しない) 。

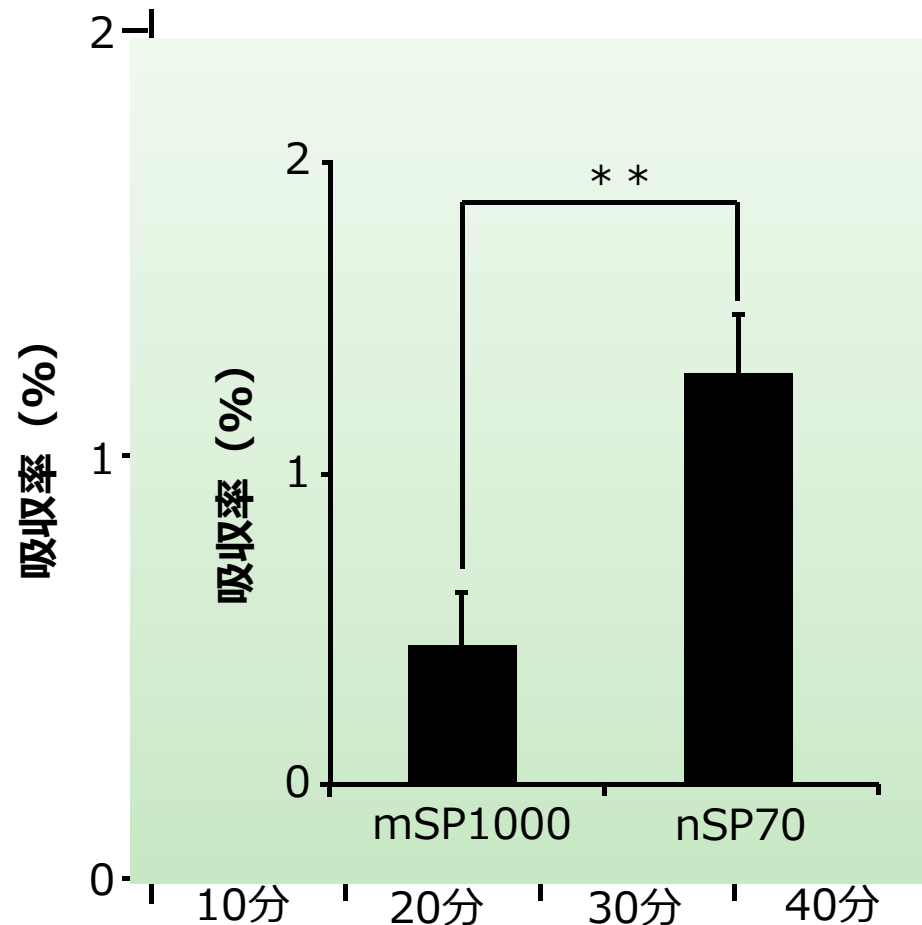
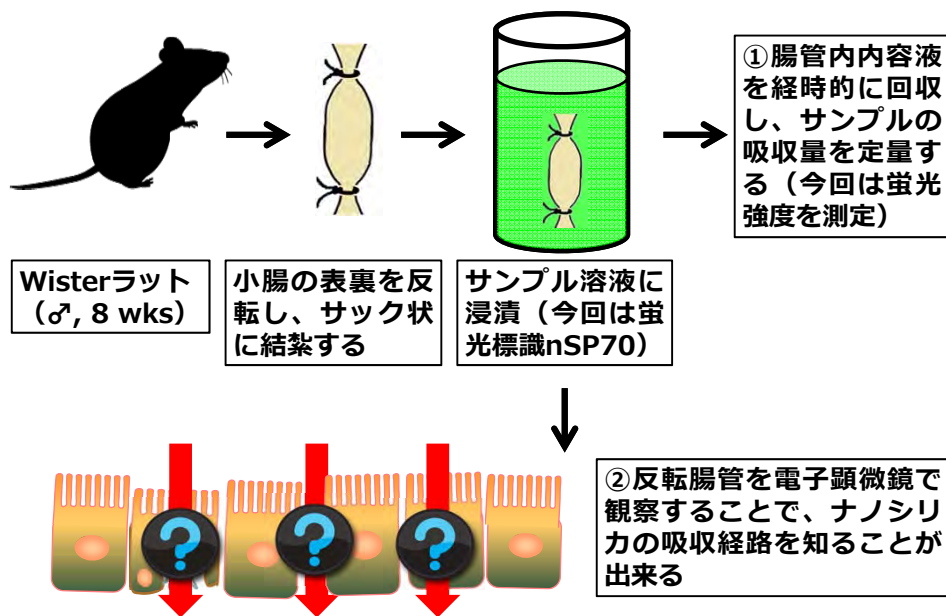
量的な大小は不明ではあるものの、体内に滞留し得ることを認めた。



以上の事実を総合して考えると、経口曝露の場合、nSPは、従来までのサブリミナル以上の従来型シリカよりも体内へ吸収され易いものの、**微量であり、その大部分は吸収されずに糞便中に排泄されている**ことを示唆している。そこで次に、nSPが確かに腸管吸収されているのかを再検証、確認するため、**腸管吸収されるのかどうかという点にのみフォーカスし、部分的に体内吸収性の予測を試みた。**

ラット腸管反転法を用い、nSP70の消化管吸収性を経時的に観察したところ、

サック状に結紮した反転腸管（主にラット小腸）をサンプル溶液に浸漬し、腸管内内容物のサンプル量を定量する方法。経時的に腸管内内容物を回収することで、単位時間あたりのサンプルの吸収量を把握できる。本法で定量した吸収量は、腸管吸収性を予測するうえで有益な情報となる。



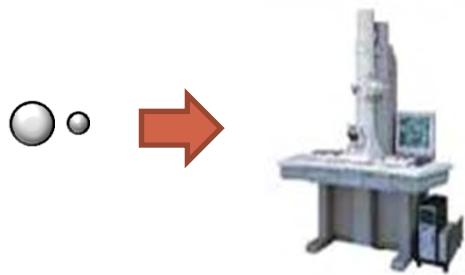
本実験系（ラット腸管反転法）は、細胞間隙ルートを通過するなど、主として受動拡散経路の定量評価ではあるものの、nSPが経時的に吸収され得ること、その吸収速度は非常に緩やかであることが判明した。

以上、食の安全性確保の観点では、微量であったとしても、長期間、曝露され得ることを鑑み、今後の「ゲート」評価とリスク解析（閾値の設定）が重要と考えられた（事実、800 $\mu$ gの投与量で、腸内細菌叢の変動や免疫系の変動が観察されている）。次に、サリナ白金の消化管吸収性について報告する。



## 【実験方法】

### ●透過型電子顕微鏡像



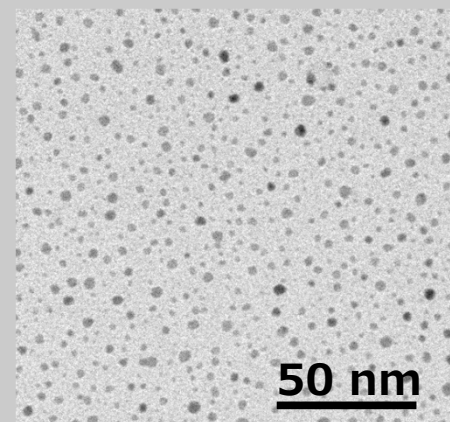
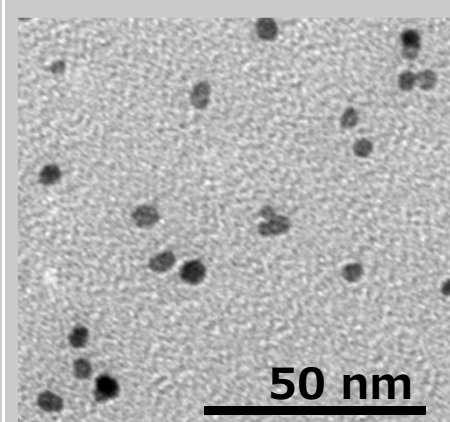
透過型電子顕微鏡を用いて粒子の像を観察した。

### ●二次粒子径

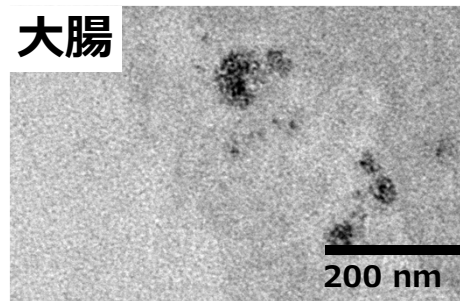
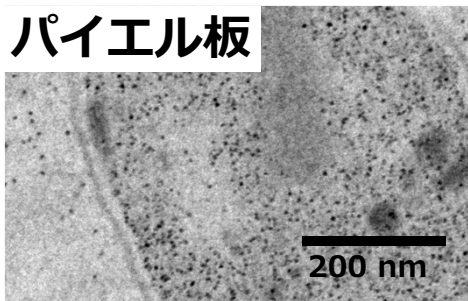
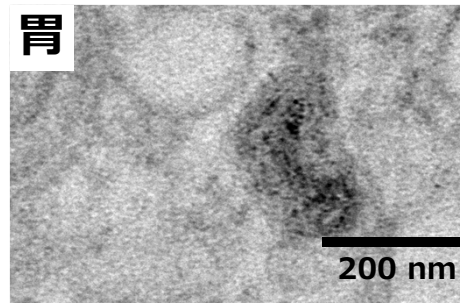
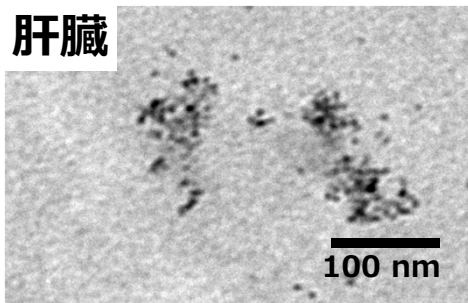
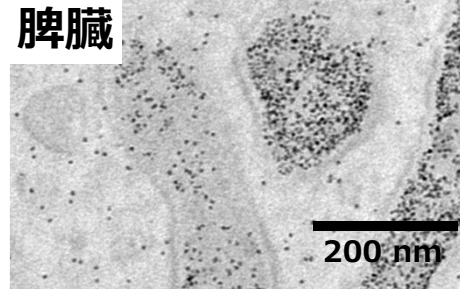
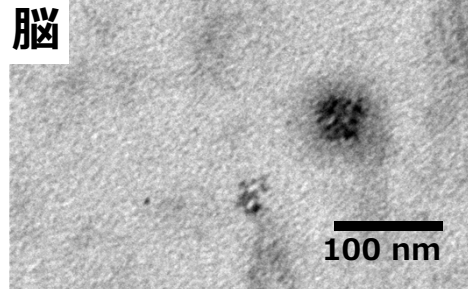
動的光散乱(DLS)法で物性情報を収集した。

**サブナノ白金**：触媒作用や抗酸化作用（腸内で活性酸素を除去する抗酸化作用があると言われている）を有する金属粒子

使用例（出典：厚生労働省 国内におけるナノマテリアルの使用実態調査2008,含有量は各製品メーカー調べ）  
健康補助食品(一粒あたり5 μg)、  
ヨーグルト(一個あたり4 μg)、  
ミネラルウォーター(一本あたり8 μg) など

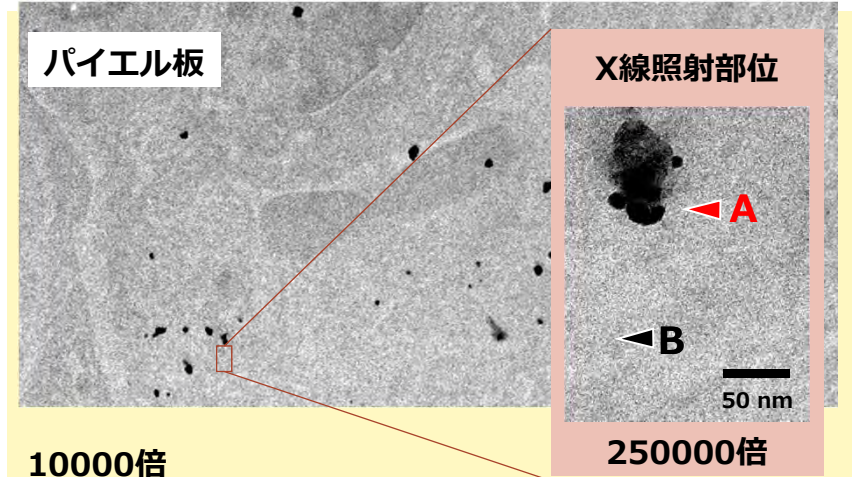
	snPt1	snPt8
透過型電子顕微鏡像		
二次粒子径 (nm)	0.63 ± 0.07	8.04 ± 1.95

snPt 1次粒径 : < 1 nm 投与量 : 900 $\mu$ g/body 投与期間 : 7日間経口  
<最終投与24時間後に観察>



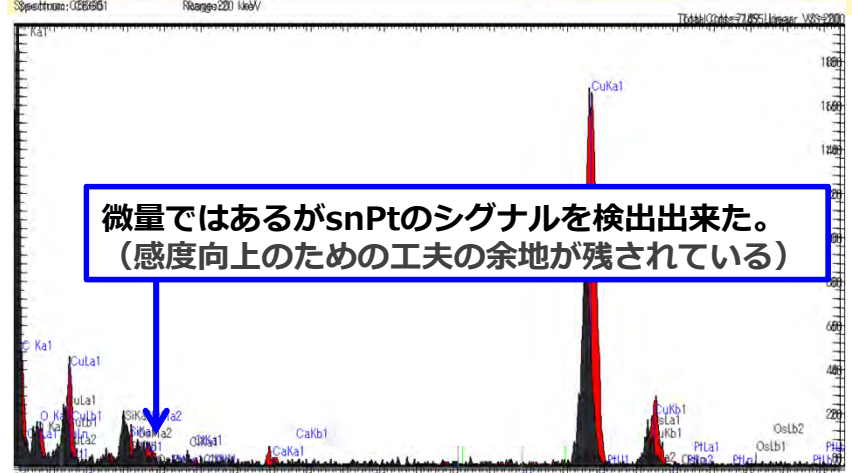
消化管吸収され、広範な組織分布を示す！

## EDX-TEM解析



10000倍

250000倍



確かにsnPtが消化管吸収されることが判明。

以上、サナノ白金の消化管吸収を定性評価し得ること、吸収後、広範な組織に分布することが判明した。次に、ICP-MSによる定量評価系を構築したうえで、体内吸収性を評価した。

## 経口投与 体内吸収性評価



10 mg/kgで  
単回経口投与

## 尾静脈内投与 投与したsnPtが全て血中に移行した際の動態を調べる



10 mg/kgで  
尾静脈内投与

経時的に血液を回収  
⇒Pt量を誘導結合プラズマ質量分析計  
(ICP-MS)で測定

- ・ 血中白金濃度の推移を調べる
- ・ 経口投与・尾静脈内投与のデータを比較し、バイオアベイラビリティを算出した

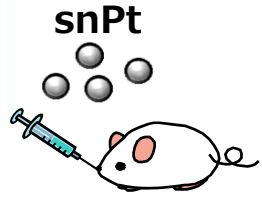
(※10 mg/kg…尾静脈内投与した際に一般毒性を示さない最大量)

## \* 薬物動態パラメータを算出 \*

- ・ 血中最高濃度( $C_{max}$ )
- ・ 最高血中濃度到達時間( $T_{max}$ )
- ・ 血中半減期(分布相;  $\alpha$ 相)
- ・ 血中半減期(消失相;  $\beta$ 相)
- ・ AUC (利用された薬物総量) - 静注
- ・ AUC (利用された薬物総量) - 経口
- ・ バイオアベイラビリティ(F)



## 【実験方法】



(n=4)

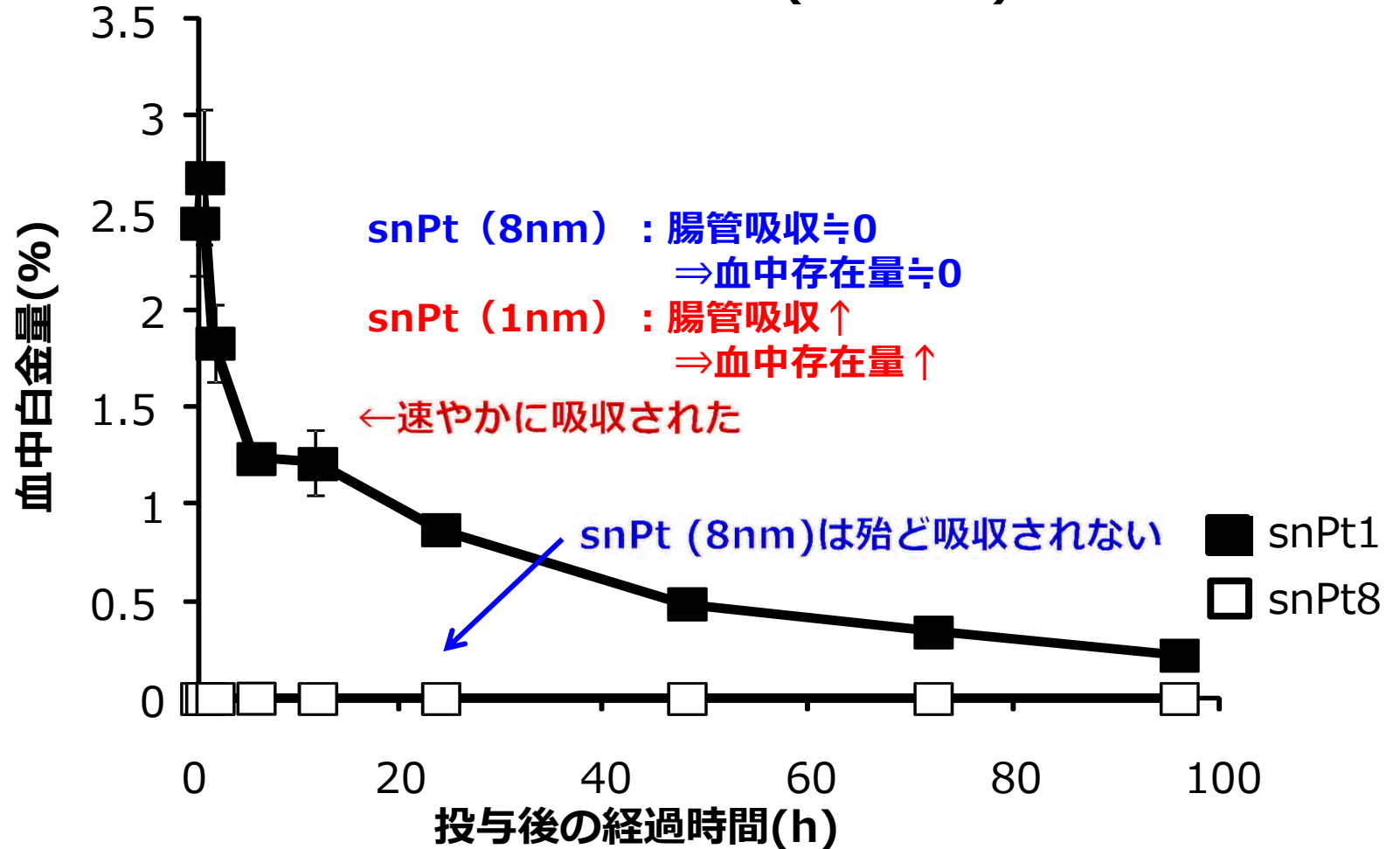
BALB/c  
(♀, 6 weeks)

10 mg/kgで  
単回経口投与

経時的に血液を回収  
⇒白金量をICP-MS  
で測定  
体内吸収性を検討

※移行率(%) = 100 \* 血中の白金量 / 投与量

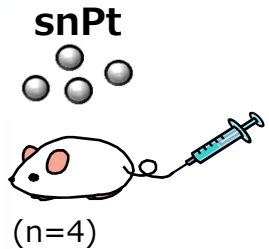
## 血中白金移行率の推移(経口投与)



snPt8は経口投与後ほとんど血中へ移行しないのに対し、snPt1は投与1時間後に血中最大濃度に達し、速やかに体内に吸収されることが明らかとなった。

⇒snPt1とsnPt8は、経口摂取後の体内吸収性が全く異なる！

## 【実験方法】

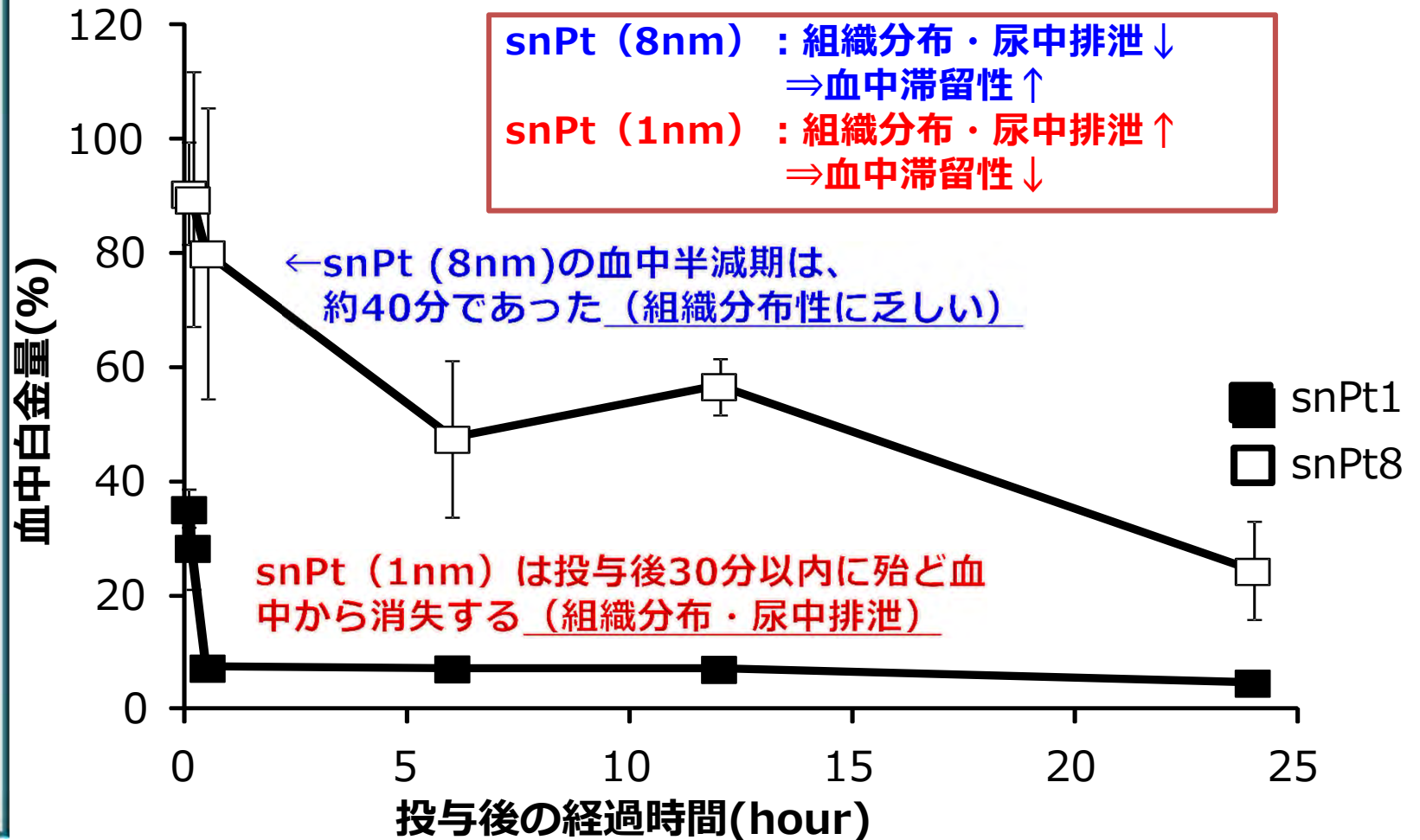


BALB/c  
(♀, 6 weeks)

10 mg/kgで  
単回尾静脈内投与

経時的に血液を回収  
⇒白金量をICP-MS  
で測定  
血中残留性を調べる

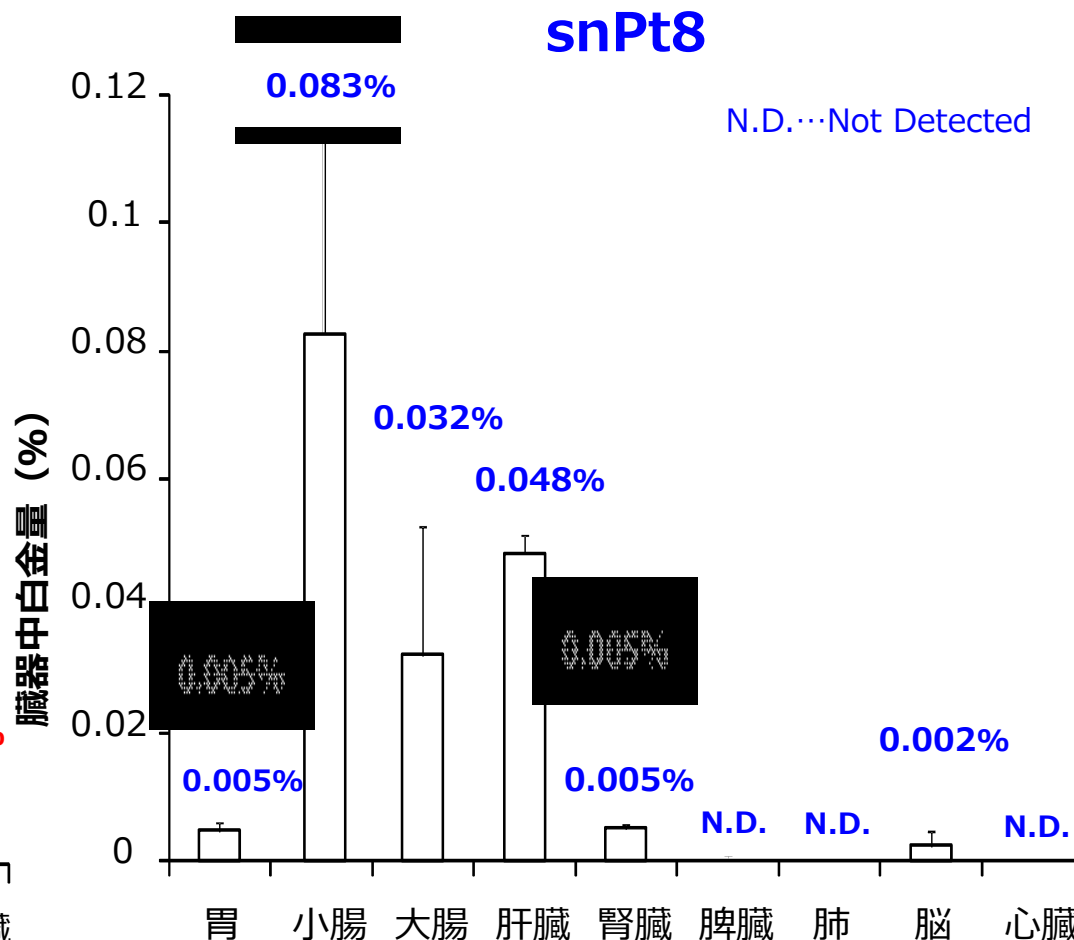
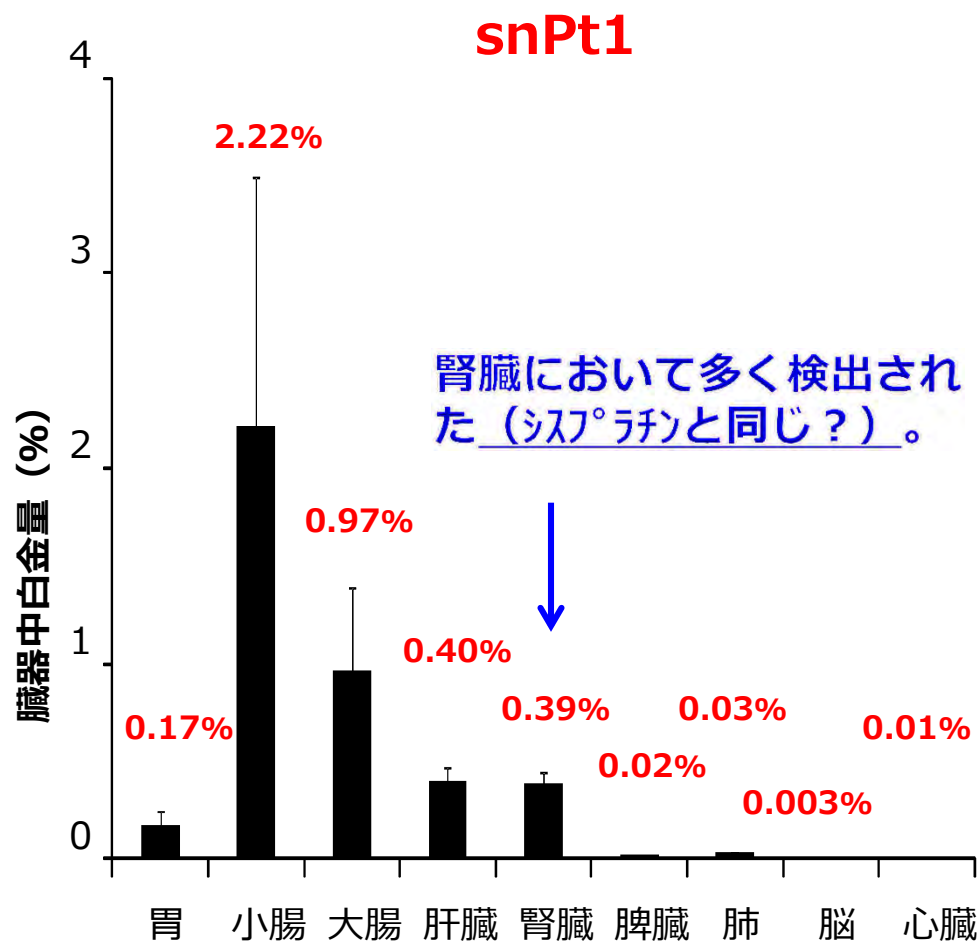
## 血中白金量の推移(尾静脈内投与)



snPtは、尾静脈内投与後と経口投与後とで異なる血中滞留性を示すこと、さらに粒子径の違いにより、曝露後に全く異なる挙動を示すことが明らかとなった。さらに、経口投与後の各臓器へのsnPtの移行率を評価したところ、

## snPt単回経口投与24時間後の臓器中のPt残留率

※残留率(%) = 100 \* 各臓器当たりのPt量 / 投与量



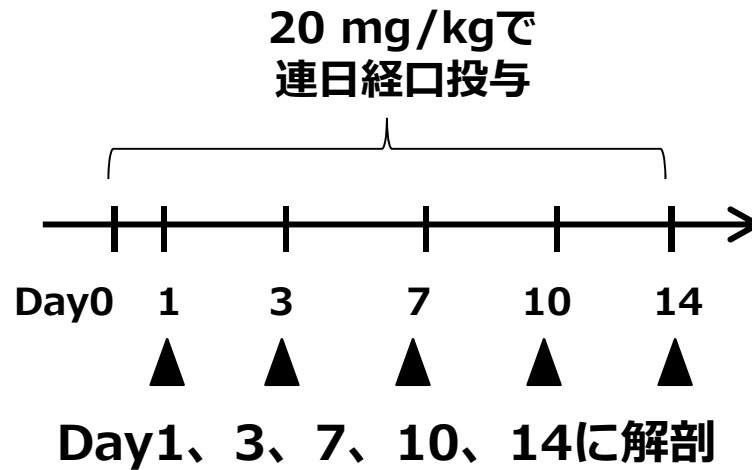
投与局所の消化管だけでなく、脳以外のすべての臓器において白金が検出され、特に、腎臓・肝臓に多く残存していることが明らかとなった。さらに、経時的に残存率を解析した結果、投与後56日においても、**腎臓**でsnPtが検出された。



## 【実験方法】



BALB/c (♀, 6 weeks)



1、3、7、10、14 回経口投与後に解剖し、血液・臓器を回収⇒Pt量をICP-MSで測定

蓄積性を調べる

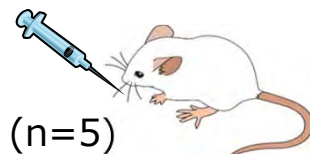
(※20 mg/kg…一週間経口投与した際に一般毒性を示さない最大量)

- 血中の蓄積性(snPt1、snPt8)
- 肝臓・腎臓における蓄積性(snPt1)

## 【実験方法】

BALB/c (♀, 6 weeks)

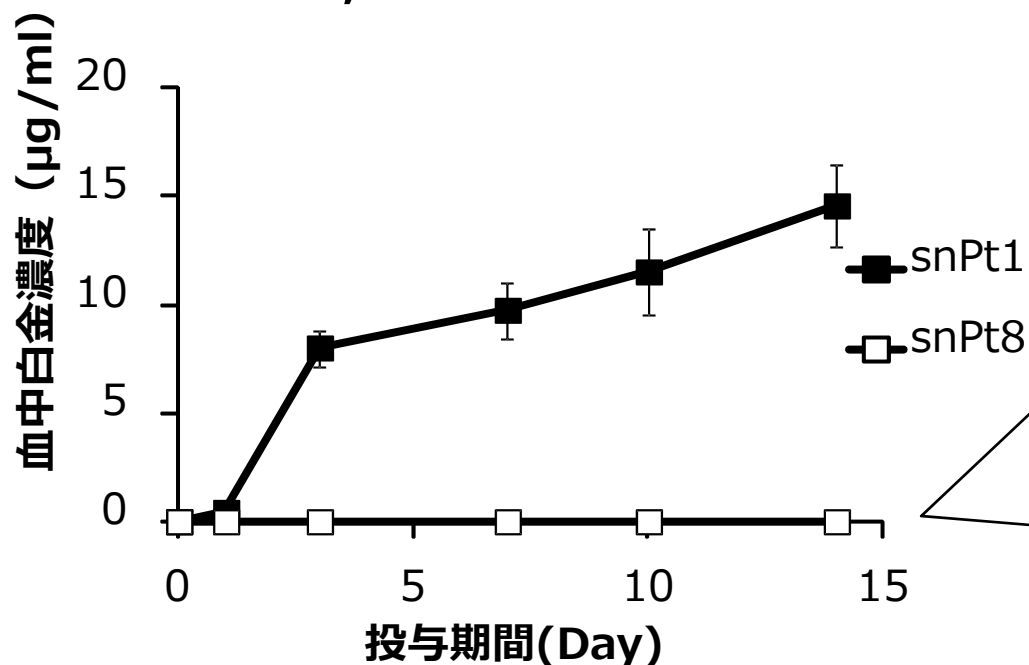
snPt



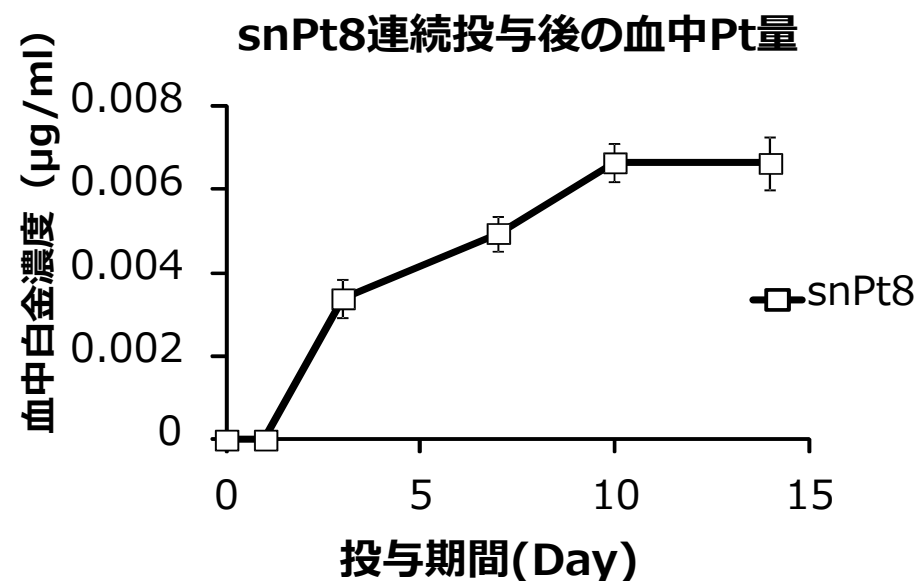
20 mg/kgで  
14日間連続  
経口投与

1、3、7、10、14回経口投与後に解剖し、血液・臓器を回収  
⇒白金量をICP-MSで測定

## snPt1,8連続投与後の血中Pt量



## snPt8のみ拡大



snPt1を連続経口投与すると、血液中白金量が増大していくことが示された。また、蓄積量は飽和に達する傾向が認められた。

# snPt1の連続投与による体内分布

20

## 【実験方法】

BALB/c (♀, 6 weeks)

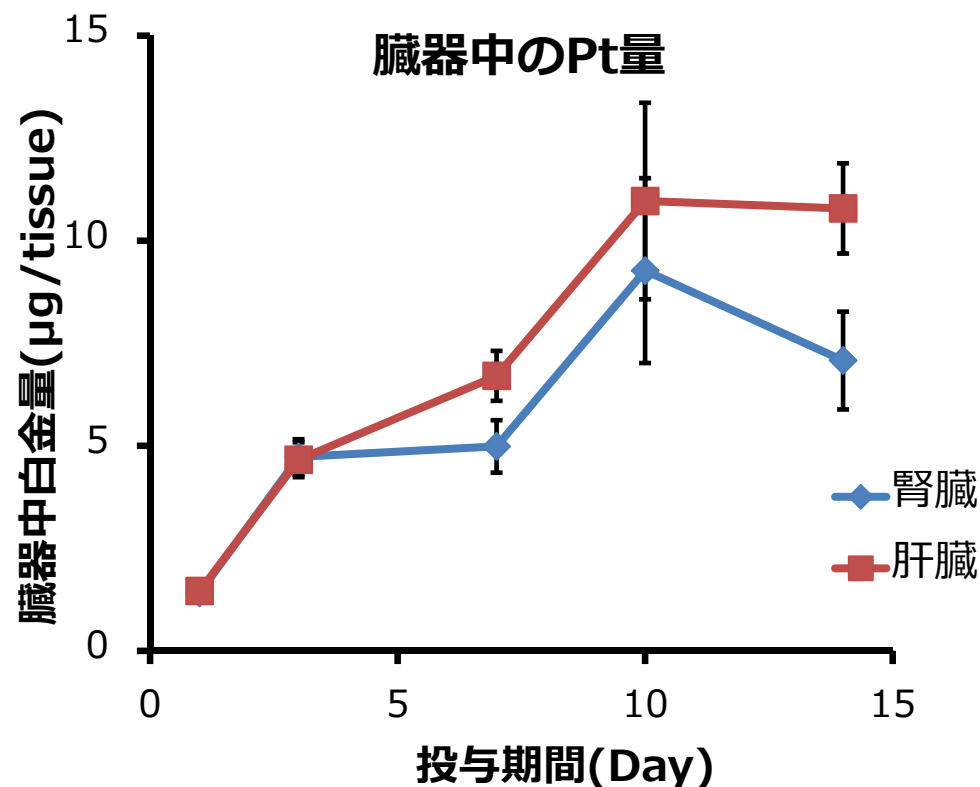
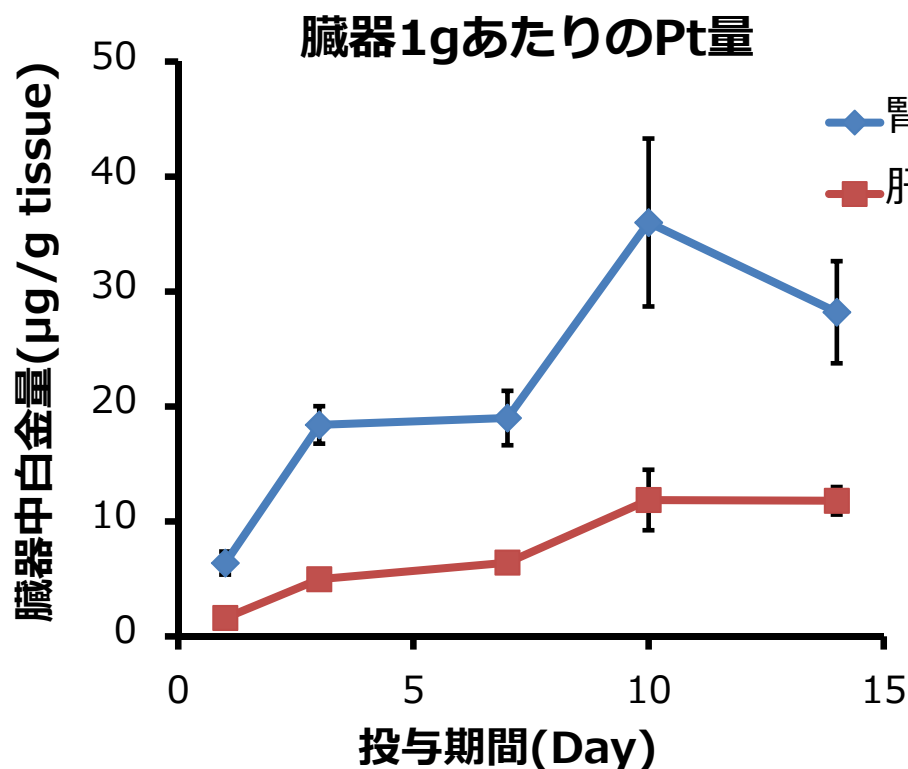
snPt



(n=5)

20 mg/kgで  
14日間連続  
経口投与

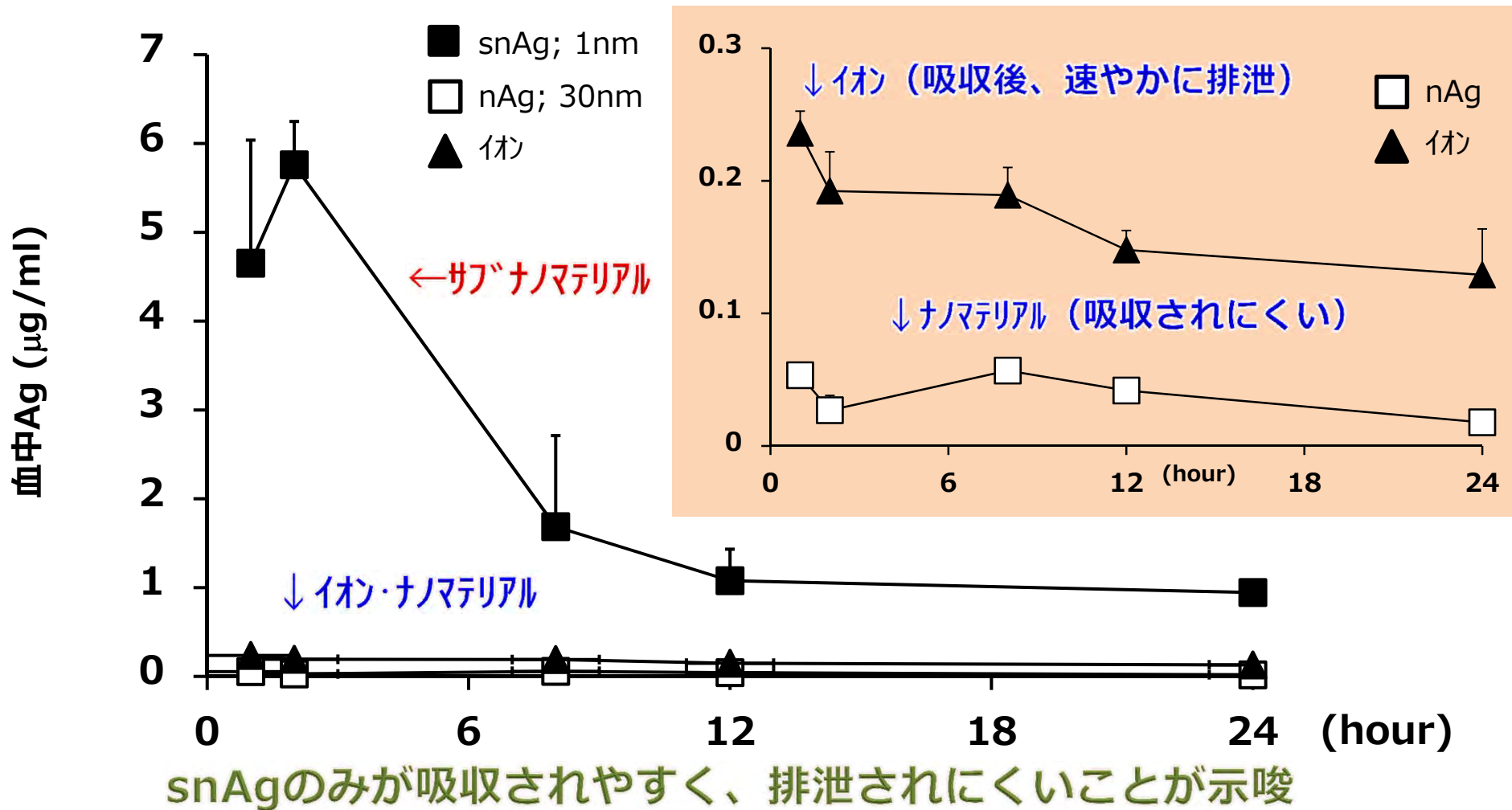
1、3、7、10、14回経口投与後に解剖し、血液・臓器を回収  
⇒白金量をICP-MSで測定



snPt1を連続経口投与すると、血液中白金量と同様に、臓器中へ蓄積していくことが示された。また、蓄積量は飽和に達する傾向が認められた。これまでの動態データをまとめてみると、



経口投与（血中滞留性） snAg, 投与量：7.5 mg/body（単回投与）



即ち、サブナノメリアルは、イオンともナノメリアルとも異なる体内侵入性や蓄積性を有することが判明した。現在、全く情報の無い蓄積や排泄にフォーカスしつつ、詳細検討を進めている。

## 【ナノシリカ（当初計画通りに実施）】

- ✓ EDX-TEMや共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージング法、ICP発光を駆使したナノ・サブナノ材料の定性/定量法を確立・最適化した。
- ✓ TEMイメージング法を用いて、100 nm以下のナノシリカがサブミクロン以上の従来型素材とは全く異なる細胞内分布特性を示し得ることを見出した。
- ✓ 非晶質ナノシリカが、消化管吸収され得ること、ならびにこれを定量し得ることを見出した。

## 【サブナノ白金について（当初計画通りに実施）】

- ✓ サブナノ白金についてTEMイメージング法やICP-MSを駆使した定量法を確立・最適化した。
- ✓ サブナノ白金が、消化管吸収されて肝・腎・脾・肺へと移行し得ることを、定性かつ定量的に明らかとした。
- ✓ サブナノ白金が、腎集積性を示すことを初めて明らかとした。

## 【サブナノ銀について（当初計画通りに実施）】

- ✓ サブナノ銀について、前処理を必要としない直接ICP-MS技術を確立した。
- ✓ サブナノ銀が、単回投与後に消化管吸収されることを明らかとした。

ナノ・サブナノ材料が、サブミクロンの従来素材とは、体内吸収性や細胞内局在といった細胞内・体内動態（曝露実態）が異なり、消化管吸収されて、全身組織に分布し得ること、この事実は、ナノ・サブナノ材料を含有した食品の安全性には十分に配慮する必要があること、また食品の安全性確保や安全なナノ・サブナノ材料の開発に際しては、曝露実態（動態）の精査、ハザード評価とリスク解析などが必須であると考えられる。本研究で得られた知見は、圧倒的な優位性をもった、『安全なナノ材料』の開発にも直結するため、この健康確保と国民・産業界がナノの恩恵を最大限に享受した豊かな社会の構築に寄与するものである。

一方で、今後の検討課題も多く残されており、現在、既に検討を開始している。

# The End

-Thank you for your attention-

3年間、多大なるご支援・ご指導を頂き、有難うございました。心から感謝申し上げます。