

# 平成25年度

## 食品健康影響評価技術研究成果発表会

日時：平成25年8月29日（木）13：30～16：40

会場：食品安全委員会 中会議室

（東京都港区赤坂5-2-20 赤坂パークビル22階）

### ～ プログラム ～

- (1) トランス脂肪酸による動脈硬化性疾患の発生機序の解明と健康影響評価手法の確立  
（主任研究者：平田 健一） 13：35～14：20
- (2) 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  
（主任研究者：堤 康央） 14：20～15：05
- (3) フタル酸エステルの生殖・次世代影響の健康リスク評価に関する研究  
（主任研究者：那須 民江） 15：05～15：50
- (4) 胎児移行性における種差を反映したヒト胎児毒性リスク評価手法の開発  
（主任研究者：登美 齊俊） 15：50～16：35

## ～発表者の紹介・研究成果概要～

研究課題名	トランス脂肪酸による動脈硬化性疾患の発生機序の解明と健康影響評価手法の確立
主任研究者	 <p>平田 健一（ひらた けんいち）</p> <p>神戸大学大学院医学研究科 内科学講座 循環器内科学分野 教授</p> <p>1984年 3月 神戸大学医学部卒業。 1992年 3月 神戸大学大学院医学研究科修了。 1996年 9月～1999年6月 米国Vanderbilt大学、Stanford大学研究員。 講師、准教授を経て 2007年 7月 神戸大学大学院医学系研究科 循環器内科学教授（現職）。日本循環器学会（理事）、日本動脈硬化学会（理事）</p>
研究成果概要	<p>人工的脂肪酸であるトランス脂肪酸は、心血管イベントを高めるとして、欧米では食品に表示義務があり、摂取が厳しく制限されている。しかし、本邦においては、含有量表示が義務化されていない。今研究において、冠動脈疾患患者と非冠動脈疾患患者の血清中トランス脂肪酸濃度を測定し、59歳以下の比較的若年の冠動脈疾患患者は血清中トランス脂肪酸濃度が高いことを確認した。日本人でもトランス脂肪酸摂取過多は、冠動脈疾患リスクとなることを初めて報告し、食品へのトランス脂肪酸量表示義務の必要性を、我々のデータは支持する。また、動物モデルにおいて、トランス脂肪酸が、冠動脈疾患を発症させる機序も解明した。</p>

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
主任研究者	<div data-bbox="475 398 1011 450" data-label="Text"> <p>堤 康央 (つつみ やすお)</p> </div> <div data-bbox="475 488 1329 524" data-label="Text"> <p>大阪大学大学院薬学研究科 教授/薬学研究科長・薬学部長</p> </div> <div data-bbox="475 539 1452 575" data-label="Text"> <p>1994年大阪大学薬学研究科応用薬学専攻博士課程 中退 (1997年薬学博士)</p> </div> <div data-bbox="475 575 1107 609" data-label="Text"> <p>1994年大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野 助手</p> </div> <div data-bbox="475 609 1466 676" data-label="Text"> <p>2004年国立医薬品食品衛生研究所大阪支所医薬基盤研究施設基盤研究第二プロジェクトチーム 副プロジェクト長</p> </div> <div data-bbox="475 676 1466 741" data-label="Text"> <p>2005年独立行政法人医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト プロジェクトリーダー</p> </div> <div data-bbox="475 741 1219 777" data-label="Text"> <p>2008年大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野 教授 (現職)</p> </div> <div data-bbox="475 777 1390 810" data-label="Text"> <p>2012年大阪大学薬学研究科 研究科長・大阪大学薬学部 薬学部長 (現職)</p> </div>
研究成果概要	<p>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。一方で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。</p>

研究課題名 フタル酸エステルの生殖・次世代影響の健康リスク評価に関する研究

主任研究者



那須 民江 (なす たみえ)

中部大学生命健康科学部 客員教授

1971年信州大学理学部卒業、1971年4月信州大学医学部衛生学講座助手、1982年10月医学博士（信州大学）、1982年12月信州大学医学部衛生学講座講師、1983年9月より6ヶ月大阪大学蛋白研究所内地留学、1988年9月より4ヶ月文部科学省在外研究員として、1989年7月より3ヶ月FIOH研究所奨学金で、1992年5月より5ヶ月日本学術振興会海外派遣事業で、Finnish Institute of Occupational Healthに留学、2001年6月信州大学医学部衛生学講座助教授、2002年1月名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学教授、2006年4月より3年間日本学術振興会学術システム研究センター研究員兼務、2011年10月より日本学術会議会員、2012年4月名古屋大学名誉教授、中部大学客員教授

研究成果概要

フタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)の Maus胎生期・授乳期曝露の次世代影響を検討した。  
妊娠したSv/129野生型、ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体(PPAR)  $\alpha$ -欠損およびヒトPPAR $\alpha$  (hPPAR $\alpha$ ) マウスに 0, 0.01, 0.05 または 0.1%DEHPを胎仔期・授乳期曝露した。離乳後マウスを2群に分け、市販の固形飼料と高脂肪食を8週間与え、11週齢目に解剖した。  
胎生期・新生仔期の影響については、DEHPは野生型とhPPAR $\alpha$  マウスの胎仔とPND2仔の生存仔数を減少させ、胚吸収数を増加させた。  
離乳後の影響については、0.05%DEHP曝露は離乳後の野生型とhPPAR $\alpha$  マウスの摂餌量を増加させた。高脂肪食群では観察されなかった。DEHPはPPAR $\alpha$  依存的にPND2とPND21の仔血漿のレプチン濃度を減少させた。この減少が、離乳後の摂餌量増加に関連したのであろう。離乳期マウスの精巣にはPPAR $\alpha$  遺伝子に関わらず、DEHP曝露によるアポトーシスの増加等の精巣毒性が観察された。  
成熟期の影響については、0.05%DEHPは、野生型11週齢マウスの血漿テストステロンを減少させた。一方、精巣セルトリ細胞の空胞変性数を高脂肪食を摂取させた場合に増加させた。0.05%DEHP曝露はPPAR $\alpha$  欠損マウスの肝臓TG濃度を上昇させた。  
親マウスへの影響については、野性型妊娠マウスのDEHP曝露は血漿TGのみならず4種の脂肪酸濃度を減少させたが、胎仔やPND2仔の肝臓の脂肪酸には影響を与えなかった。DEHPは親マウスの精巣や卵巣には影響を与えなかった。  
DEHP代謝の種差・個体差については、リパーゼの活性はヒトの方がマウスより低かった。ヒトのUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ活性値と、アルデヒド脱水素酵素活性値(2-エチルヘキサノールを基質)はマウスのそれぞれ1/6と1/2であった。一方、ヒトのアルコール脱水素酵素活性値(2-エチルヘキサノールを基質)はマウスの2倍であった。ヒトとマウスの間にDEHP代謝経路の違いが観察された。ヒトの4種のDEHP代謝酵素活性の個体差は10から26倍あった。総合すると、ヒトとマウスの間のDEHP代謝の種差は活性の大きさのみならず代謝経路も違うので、マウスの実験結果をヒトに外挿する場合の不確実係数は10を使用した方が無難であろう。個体差は種差より大きい可能性がある。

研究課題名	胎児移行性における種差を反映したヒト胎児毒性リスク評価手法の開発
-------	----------------------------------

主任研究者	
-------	--



## 登美 斉俊（とみ まさとし）

慶應義塾大学薬学部薬剤学講座 准教授

東北大学大学院薬学研究科博士後期課程中退。

2001年富山医科薬科大学（現 富山大学）薬学部助手。

2004年東北大学にて博士（薬学）。

2006年カリフォルニア大学ロサンゼルス校(UCLA)医学部博士研究員。

2009年に慶應義塾大学薬学部に専任講師として赴任し、2011年から現職。

研究領域は薬物動態学、特に胎盤関門を介した物質透過制御機構に関する研究。

日本薬学会評議員、日本薬物動態学会評議員。

### 研究成果概要

化学物質暴露による胎児毒性の評価にはラットが汎用されている。しかし、ラット・ヒト間の胎盤関門透過性には種差が存在するため、ラットデータを用いたヒト胎児毒性予測の精度は低い。本研究では、胎盤透過性における種差を明らかにすることでヒト胎盤透過性予測手法を構築することを目的とした。まず、動脈内単回投与および血管灌流を用いた胎盤透過性評価手法を構築し、化学物質の胎盤透過性を評価した。その結果、化学物質の胎盤透過性は脂溶性の増加に伴って上昇する傾向が示された。ただし、いくつかの水溶性化学物質の胎盤透過性はトランスポーター介在性の胎盤透過機構の存在により非常に高く、一方、MDR1やBCRPなどABC排出トランスポーターの基質となる脂溶性化学物質の胎児移行性は非常に低かった。ABC排出トランスポーターがビスフェノールAなど基質の胎盤透過性に及ぼす影響は、ヒトと比較してラットにおいて大きい傾向が示され、これは胎児毒性の種差に影響する可能性がある。メチル水銀システイン抱合体とロイシンは共に胎盤関門刷子縁膜に発現するLATトランスポーターの基質であるにもかかわらず、メチル水銀システイン抱合体の胎盤透過性はロイシンと比較して非常に低いことが示された。これは胎盤関門基底膜における透過機構の違いを反映している可能性がある。ベタインの胎児から母体方向の胎盤透過性は母体から胎児方向の透過性と比較して大きく、これは胎盤関門基底膜に発現するSNAT2を介した胎児からの取り込み機構によって説明できる。さらに、胎盤刷子縁膜(母体側細胞膜)および基底膜(胎児側細胞膜)ベシクルを胎盤絨毛組織から精製し、各細胞膜におけるトランスポーターの発現量を定量した。ヒト胎盤関門にはGLUT1, ENT1, MCT1, ASCT2, TauT, OATP2B1, OAT4, MDR1, MRP1, およびMRP4といったトランスポーターが発現し、その中でもASCT2, OATP2B1, OAT4, およびMRP1は主に基底膜に発現し、MDR1およびBCRPは主に刷子縁膜に発現していることが示された。以上の研究から、機能および分子レベルにおける胎盤透過性の評価技術手法を構築することができた。これら評価技術は化学物質の胎盤透過性における種差を理解する上で重要な役割を果たすことができる。

平成24年度 内閣府 食品安全委員会  
食品健康影響評価技術研究



# トランス脂肪酸による動脈硬化性疾患の 発生機序の解明と健康影響評価手法の確立

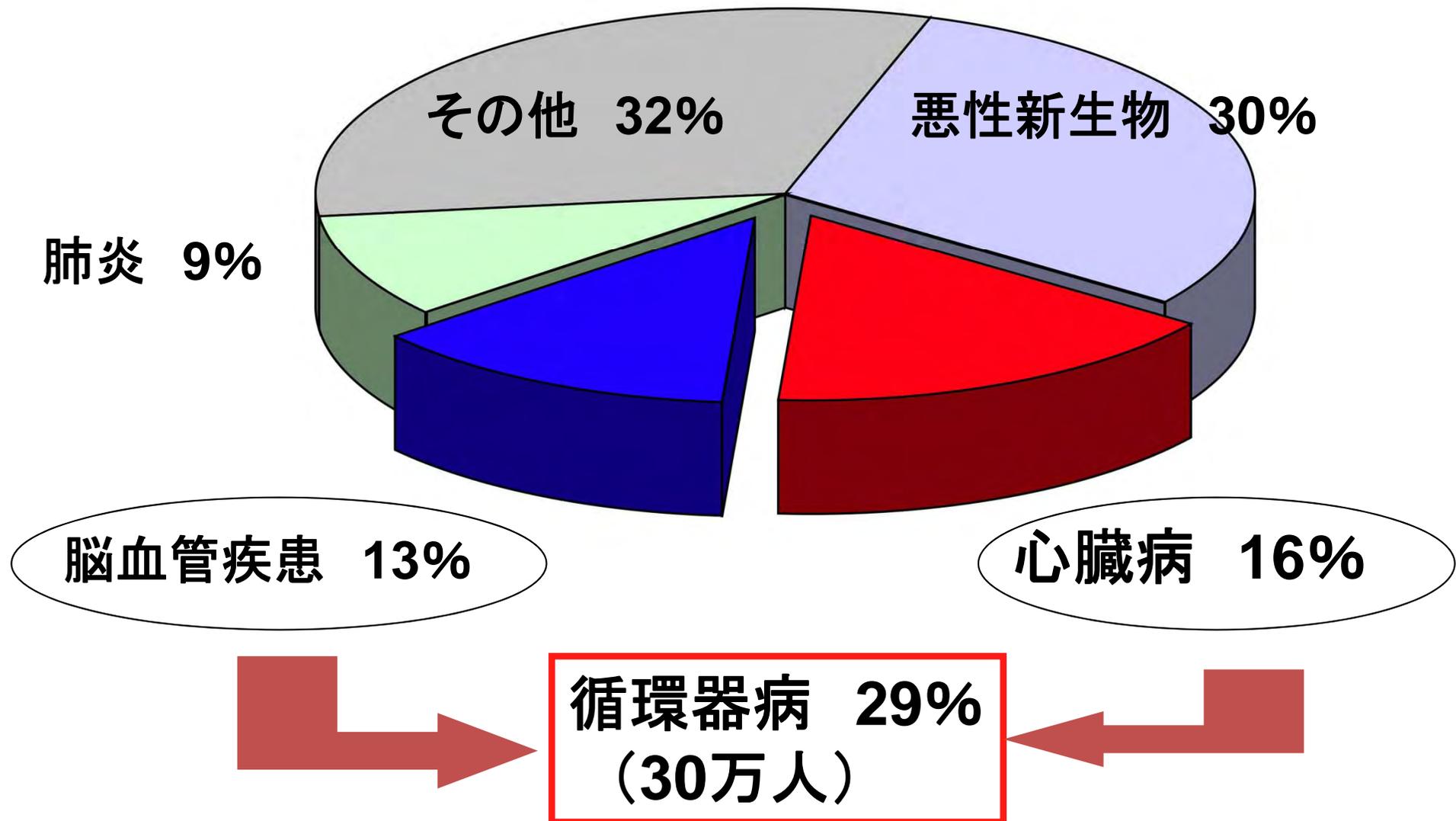


平田 健一

神戸大学大学院医学研究科  
内科学講座 循環器内科学分野



# 日本人の死因とその割合 (年間総死亡数 103万人)



日本人の“1/3”が動脈硬化を基盤とする疾患で死亡

# 急性冠症候群の病態

血管内皮傷害



動脈硬化進展



粥腫不安定化



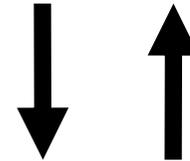
不安定粥腫の破綻



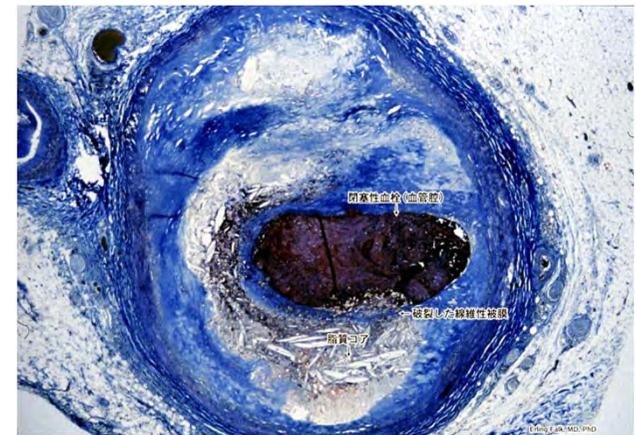
急性冠症候群 (ACS)

炎症、酸化ストレスが重要

慢性炎症



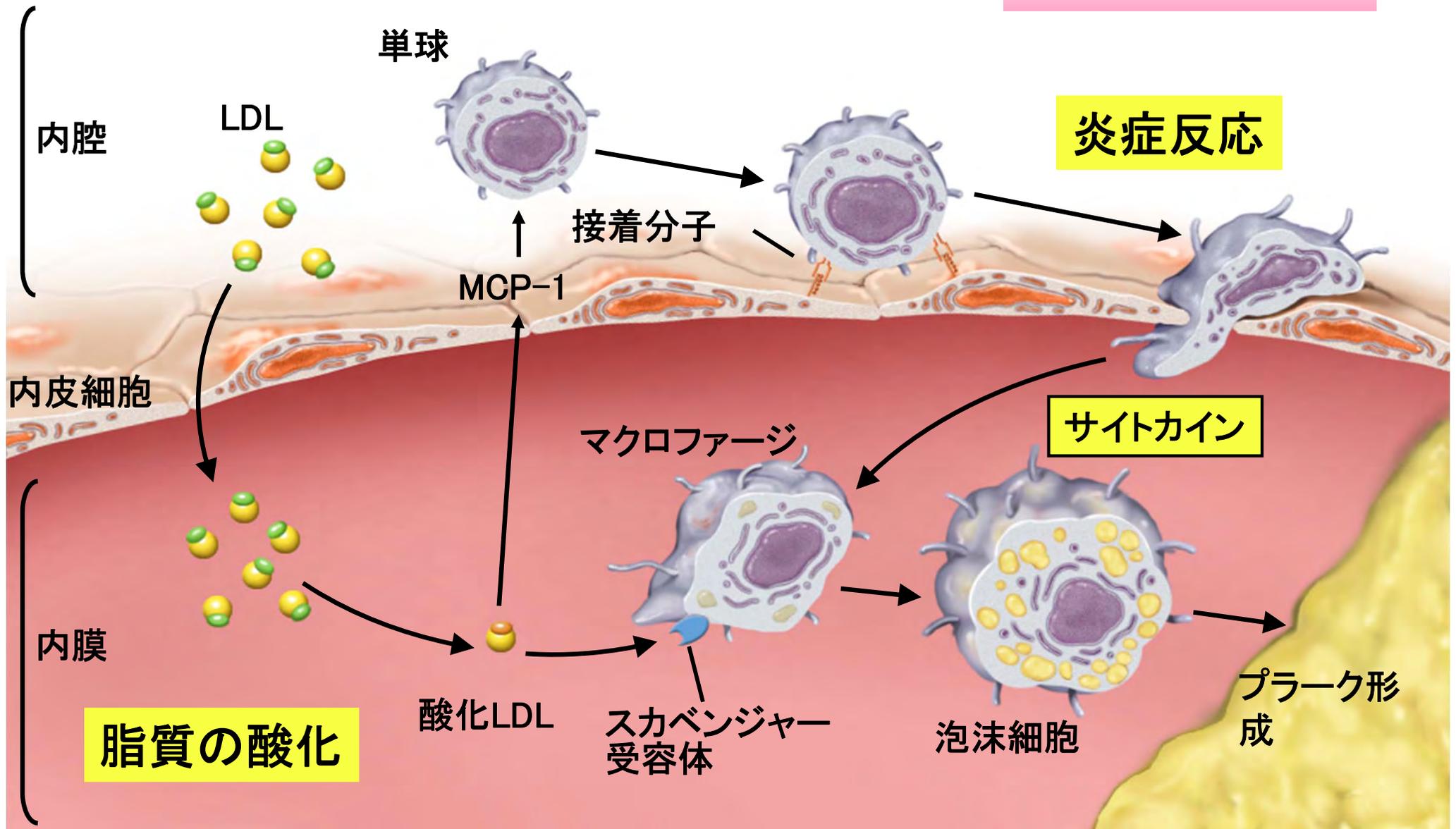
酸化ストレスの増大



# 動脈硬化形成のメカニズム

脂質代謝異常

血管内皮の障害

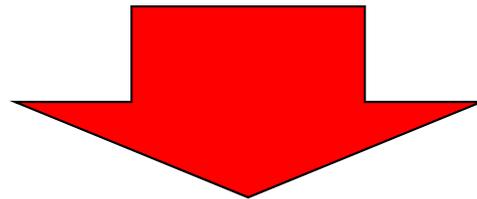


# 心血管イベントの抑制を目指して

**Lower LDL-C is better**  
(LDL-Cは低い方がよい)

しかし、...

**LDL-Cを下げるだけでは不十分**



**残余リスクの改善**

# 中性脂肪の構造

グリセロールに3つの脂肪酸が結合したものの



脂肪酸:長さ(炭素数)・二重結合の数と場所(不飽和度、位置異性体)



ステアリン酸  
(18:0)



オレイン酸  
(18:1)



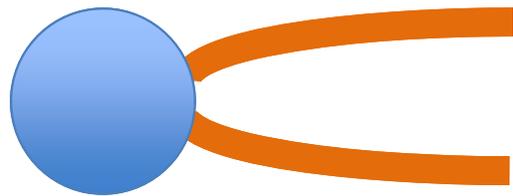
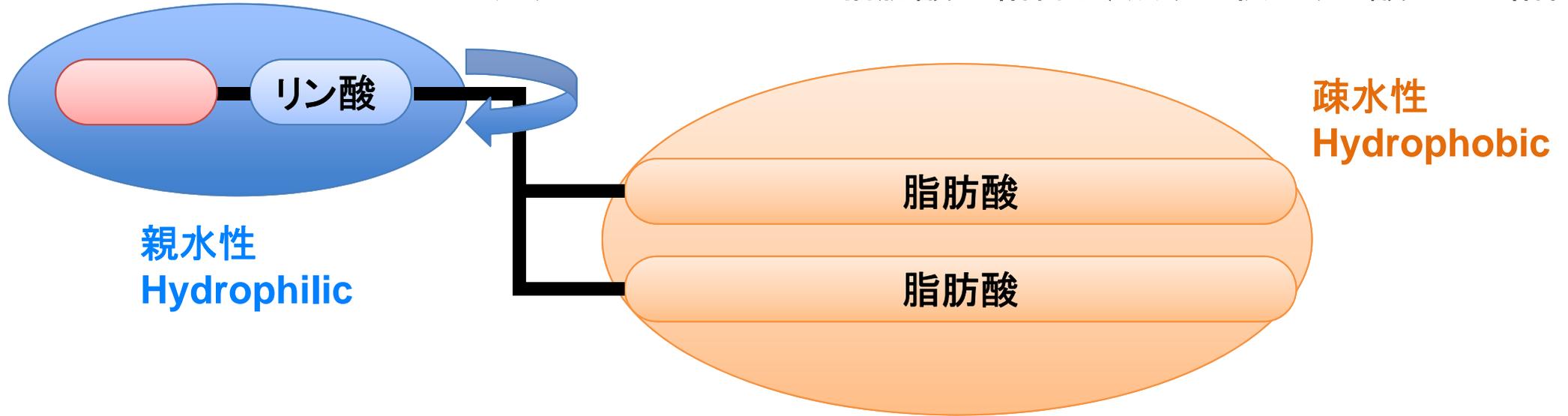
リノール酸  
(18:2)



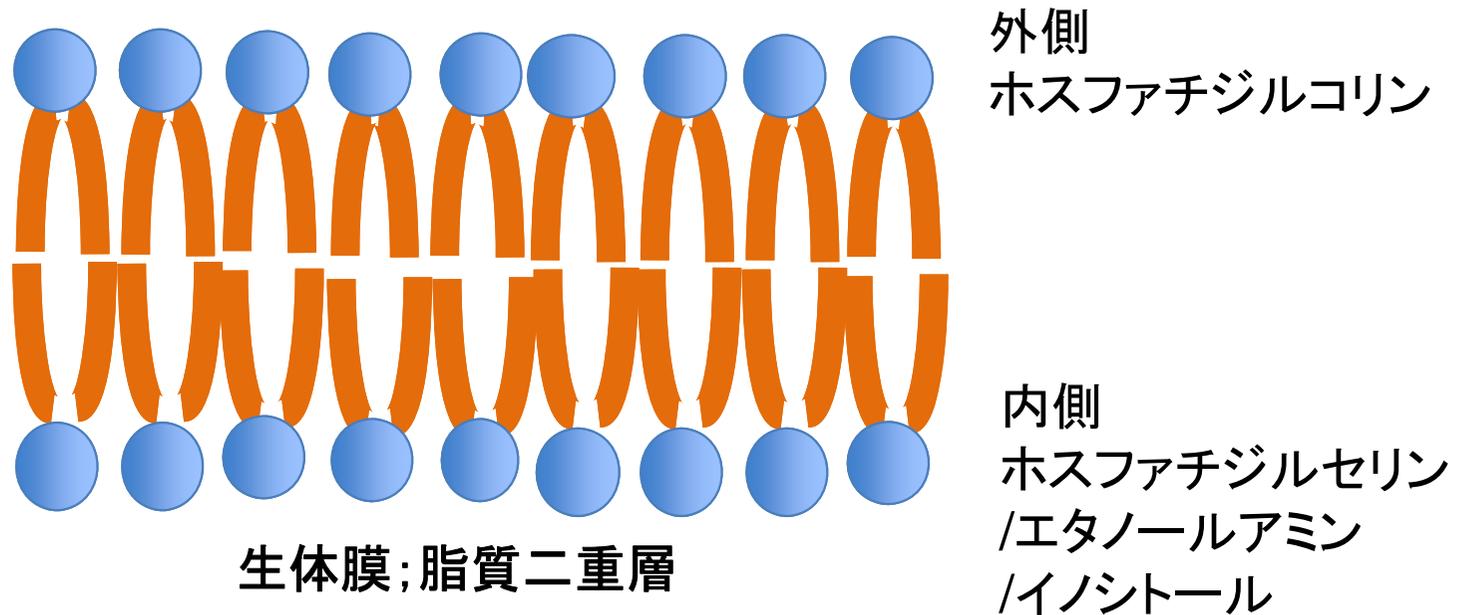
$\alpha$ -リノレン酸  
(18:3)

# リン脂質の構造

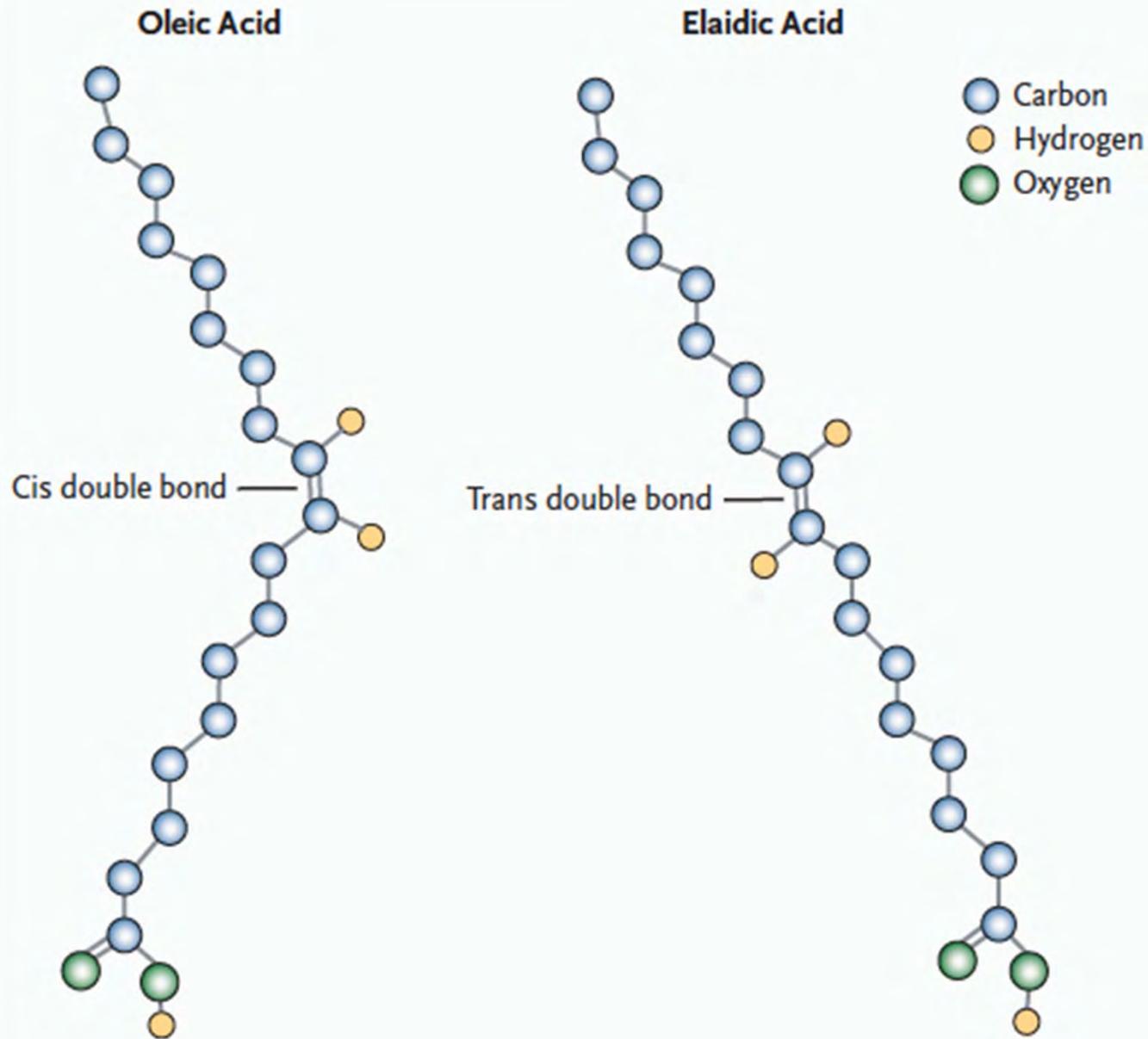
グリセロールに2つの脂肪酸が結合し、残りの枝にリン酸+ $\alpha$ が結合



リン脂質のモデル図



# トランス脂肪酸とは？



1.人工的に産生される群  
植物油は天然cis体では室温で液体。

↓  
水素添加にて二重結合を人工的に切つて飽和脂肪酸の割合を増やし、室温で固体の植物油を得る(マーガリン、ショートニング)

いちど切れた部分が反対向きになってまた二重結合してしまう。

↓  
トランス脂肪酸

2.自然界で産生される群  
反芻動物の腸内細菌によって産生

# 欧米ではトランス脂肪酸は規制対象

- ・摂取上限量の設定 (WHO/FDA 勧告)  
総エネルギー摂取量の1%未満に (2g未満に)
- ・加工食品への表示 (EU、オーストラリア)  
表示義務 (アメリカ、カナダ、韓国)  
総脂肪量、飽和脂肪酸量、トランス脂肪酸量
- ・トランス脂肪酸全廃を目指す政策  
カリフォルニア州

# 平成18年 内閣府食品安全委員会

国内に流通している食品のトランス脂肪酸含有量  
日本人1日あたりの平均的なトランス脂肪酸摂取量が  
推計評価

日本人1日あたりの平均トランス脂肪酸摂取量 = **0.7g**  
( 摂取エネルギー換算で **0.3%** )

対比参考

アメリカ 5.8g(2.6%)

EU 1.2g(ギリシア) - 6.7g(アイスランド)

# 欧米や他の地域ではトランス脂肪酸は規制対象



Saturated Fat 1g	5%
<u>Trans Fat 0g</u>	
Polyunsaturated Fat 1.5g	
Monounsaturated Fat 2g	
Cholesterol 0mg	0%
Sodium 140mg	6%
Total Carbohydrate 9g	3%
Dietary Fiber less than 1g	1%
Sugars 1g	
Protein 1g	
<hr/>	
Vitamin A 0%	• Vitamin C 0%
Calcium 0%	Iron 0%

欧米では2000年台前半の臨床研究・疫学研究の結果、**動脈硬化性疾患に対するリスク**と評価された。

- ・冠動脈疾患を増加させる
- ・LDLコレステロールを増加させる
- ・LDL粒子径が小さくなる(より悪玉となる)
- ・LDLが体内で代謝分解されにくくなる
- ・HDLコレステロールを減少させる
- ・HDLが体内で早く代謝分解される
- ・中性脂肪を増加させる
- ・全身の慢性炎症変化を亢進させる
- ・血管内皮機能が悪くなる
- ・インシュリン抵抗性

**では、日本では?**

# 研究の目的

- ・ 日本人のトランス脂肪酸摂取量と血中濃度を定量的に評価し、冠動脈疾患との関連性に関して検討する。
- ・ トランス脂肪酸が動脈硬化性疾患を増悪させる機序を明らかにする。

# 研究の概要

1. **トランス脂肪酸の動脈硬化性疾患（冠動脈疾患）へ与えるリスク評価（臨床研究）**
2. **トランス脂肪酸負荷の動脈硬化病変に与える影響の検討（疾患モデル動物を用いた研究）**

# 研究の概要

1. **トランス脂肪酸の動脈硬化性疾患（冠動脈疾患）へ与えるリスク評価（臨床研究）**
2. トランス脂肪酸負荷の動脈硬化病変に与える影響の検討（疾患モデル動物を用いた研究）

# 血清トランス脂肪酸濃度の分析



- ・ガスクロマトグラフ質量分析計を使用
- ・水素添加にて人工的に産生される主要なトランス脂肪酸

エライジン酸C18:1(9-*trans*)、リノエライジン酸C18:2(9,12-*trans*)を分析

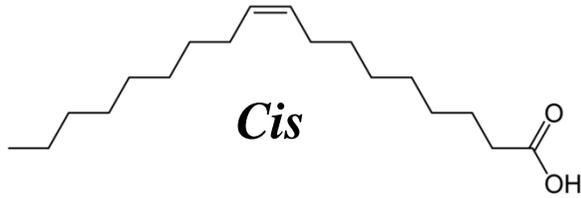
- ・質量分析総合センターにて

島津製作所

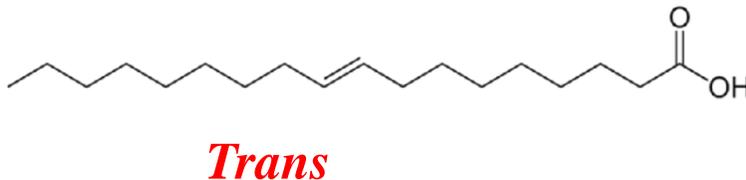
ガスクロマトグラフ質量分析計

## C18H34O2

Oleic acid  
(オレイン酸)

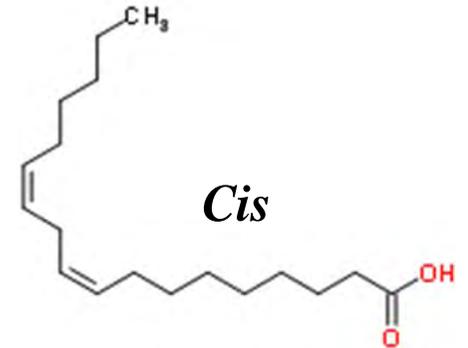


Elaidic acid  
(エライジン酸)

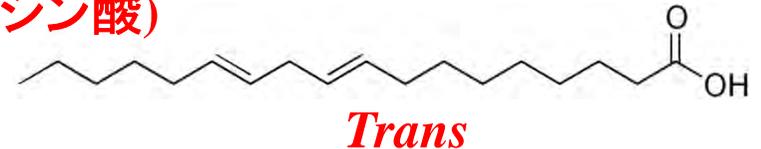


## C18H32O2

Linoleic acid  
(リノール酸)



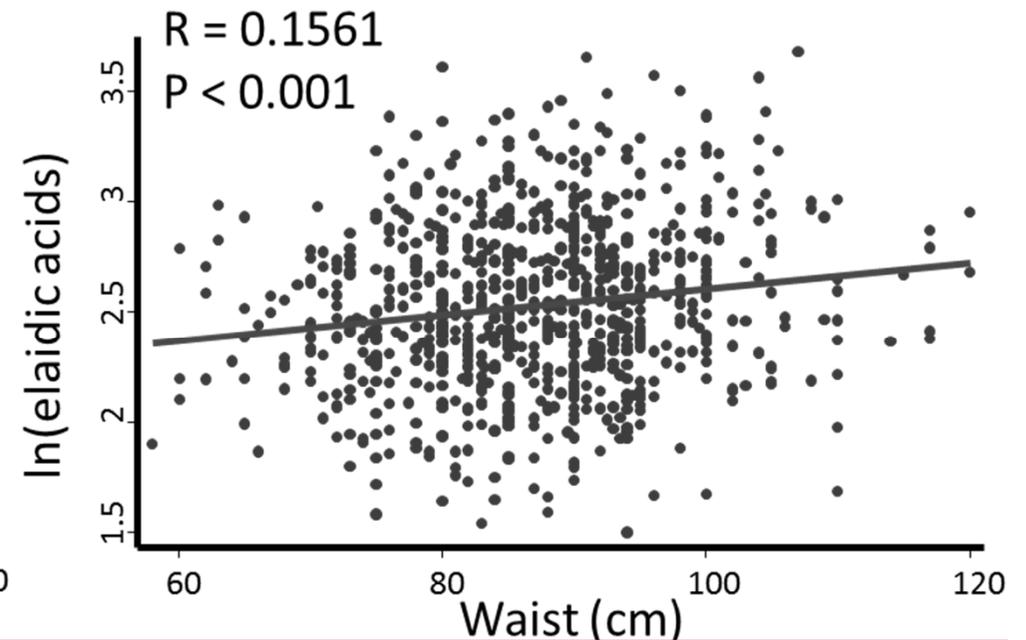
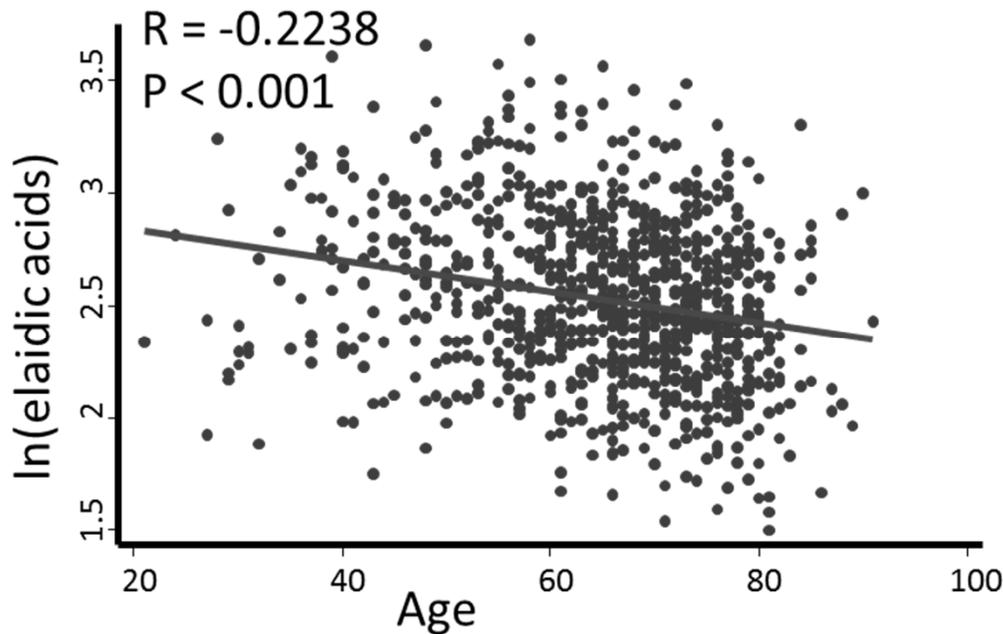
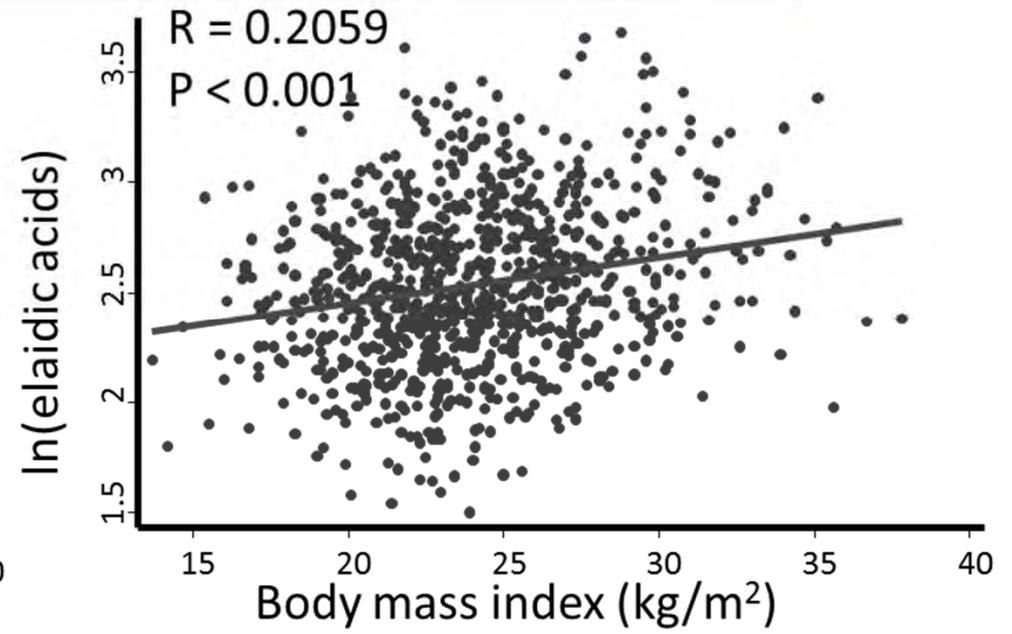
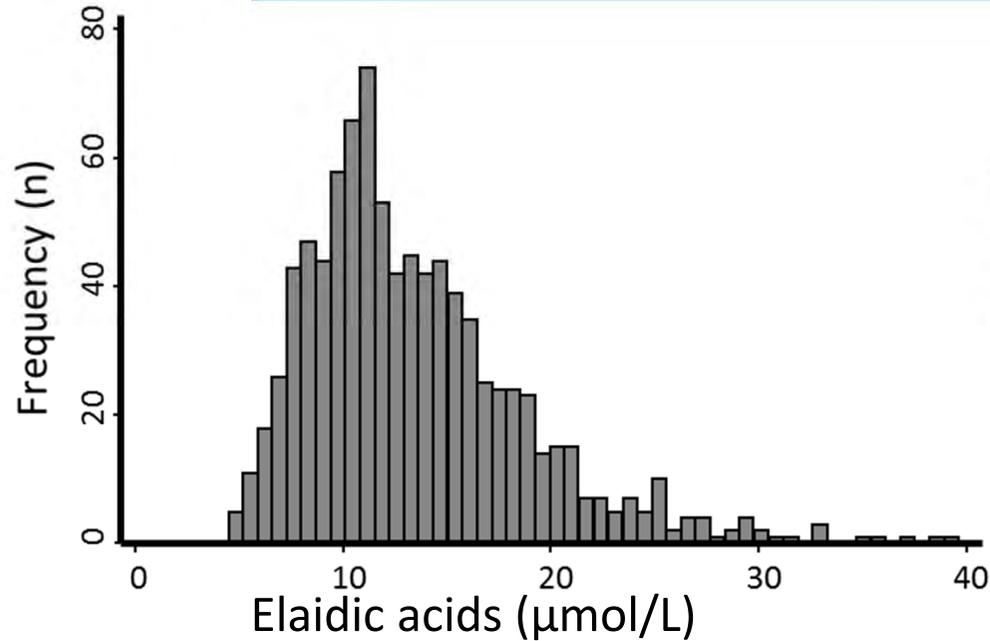
Linolelaidic acid  
(リノエライジン酸)



# 患者サンプルを用いた臨床研究 (冠動脈疾患群でトランス脂肪酸血中濃度は上昇?)

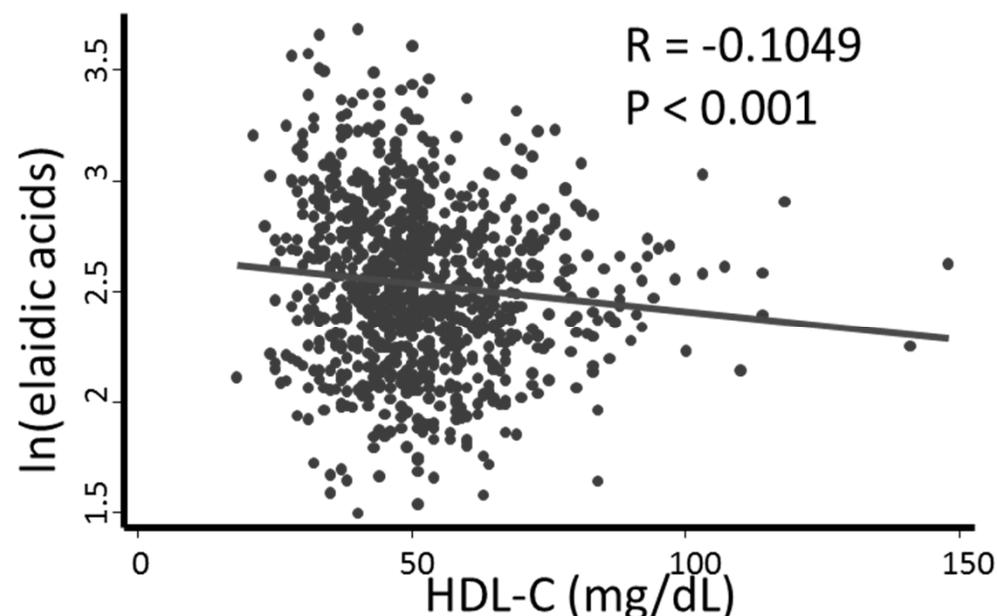
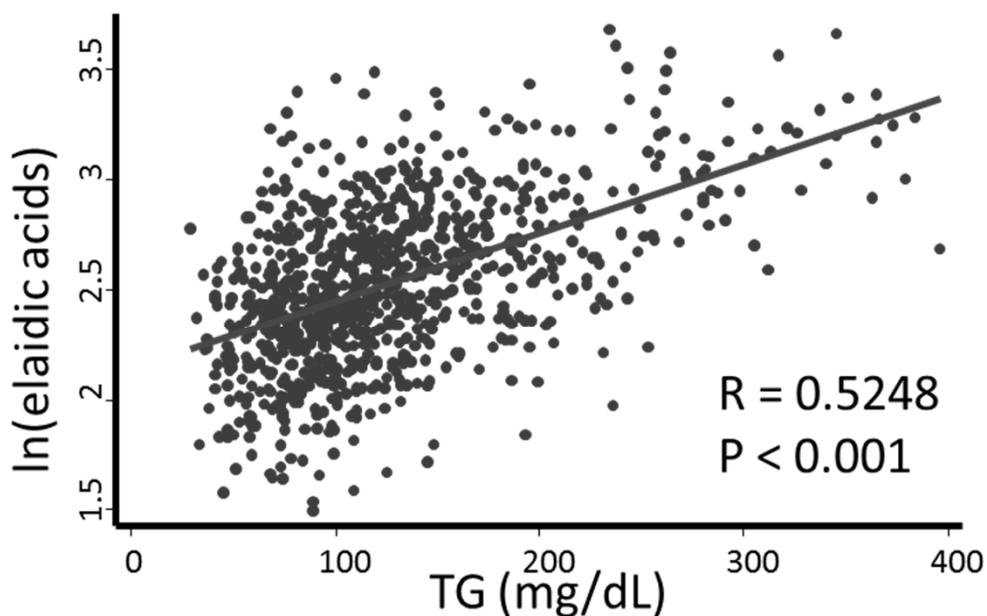
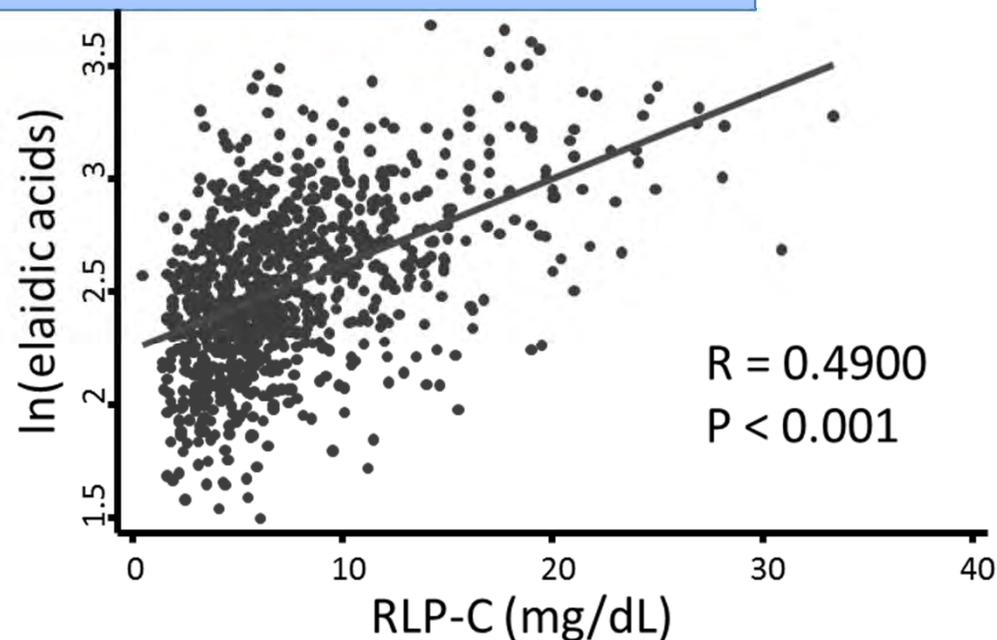
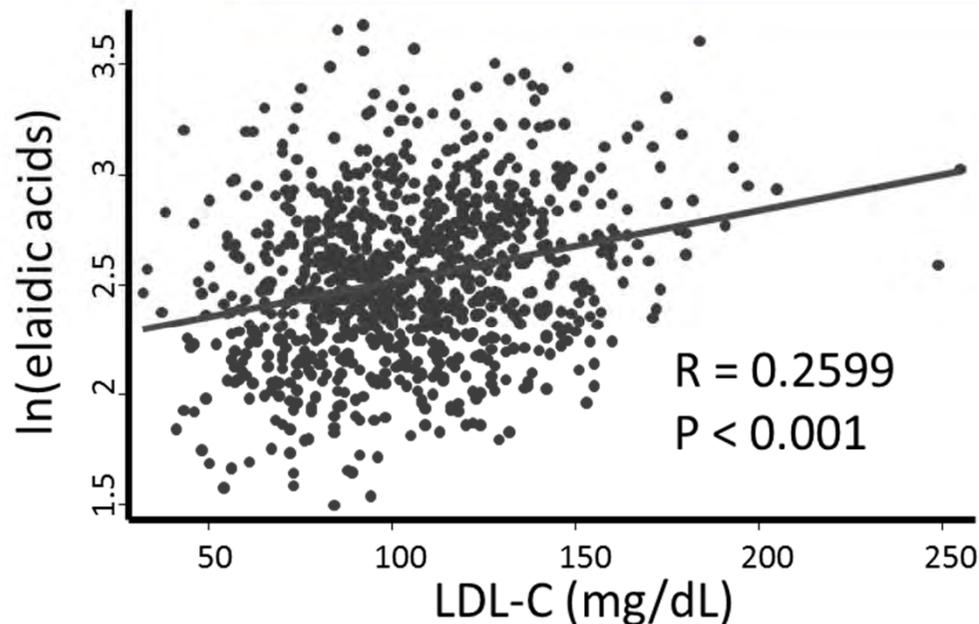
- 2008年7月から、2012年3月まで。
- 神戸大学附属病院 循環器内科  
入院症例 合計:902人
- 男性:624人、女性:278人

# 患者サンプルを用いた臨床研究結果



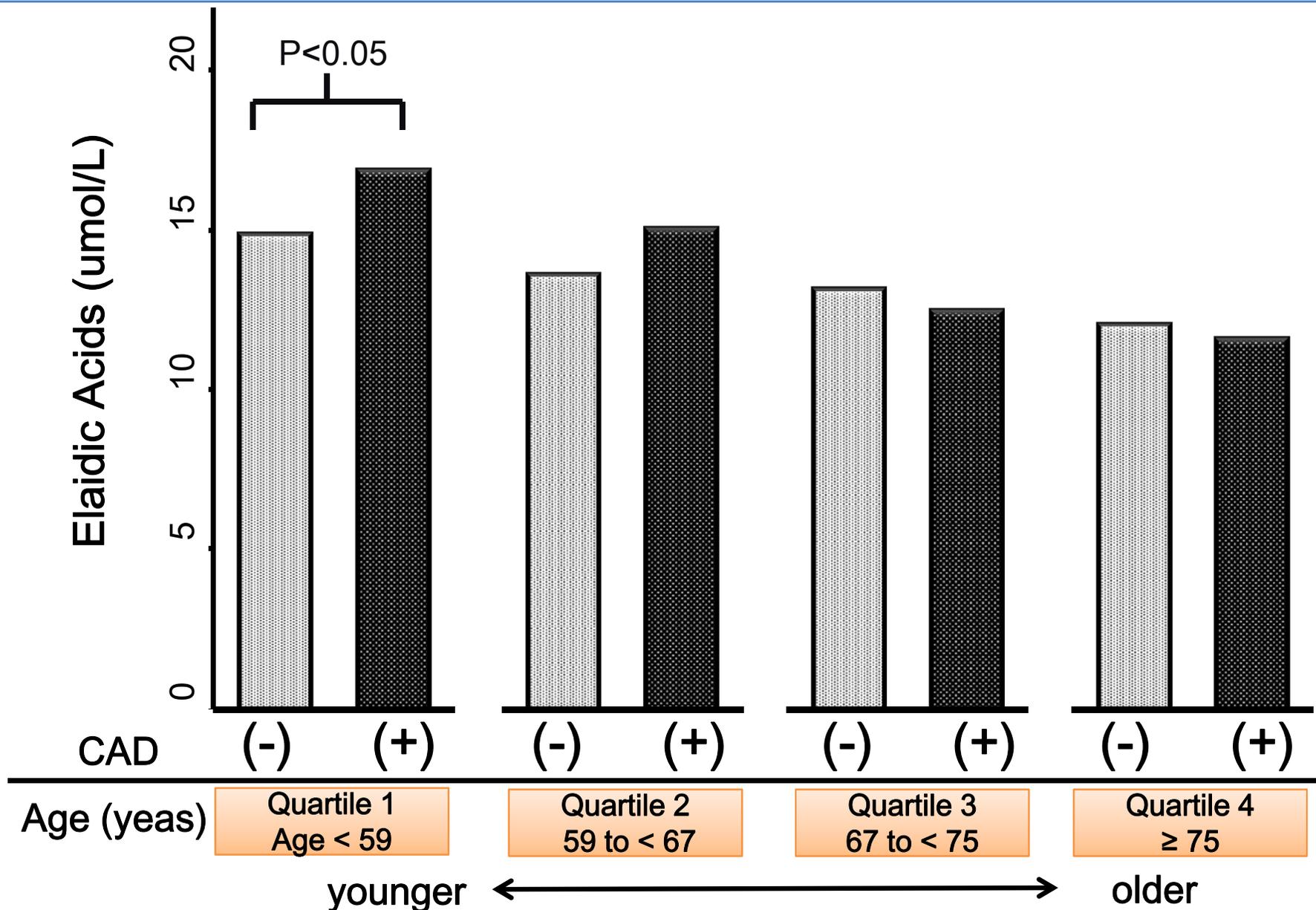
エライジン酸濃度は、年齢と逆相関し、BMI、腹囲と正相関を認めた。

# 患者サンプルを用いた臨床研究結果



エライジン酸濃度は、動脈硬化惹起性リポ蛋白濃度と正相関を示した。

トランス脂肪酸濃度が年齢と逆相関を認めたため、低年齢層での解析を進めた。年齢にて4群に分割し、解析を行った。



年齢が低い群において、エライジン酸濃度は、有意に冠動脈疾患群にて高値であった。

## 食事アンケート まとめ

- トランス脂肪酸摂取と食事内容に関して解析を行ったが、当初予想された「外食や洋菓子摂取をよくする症例はTFAが高値」などの結果は見られなかった。
- 野菜をあまり摂取しない症例はTFAが高値である。
- TFA摂取スコアを作成。
- 欧米食傾向をTFAリスクHigh、日本食傾向をTFAリスクLowとしてTFAスコアを作成。
- TFA摂取量は、TFAスコアと正相関。
- 肉類、パン、油、洋菓子、外食はTFAリスク高く、魚、卵、野菜はTFAリスクが低い。

## 臨床研究のまとめ

トランス脂肪酸摂取量が多い → トランス脂肪酸濃度が高い



若年層でトランス脂肪酸濃度が高い  
= 若年層でトランス脂肪酸摂取量が多い

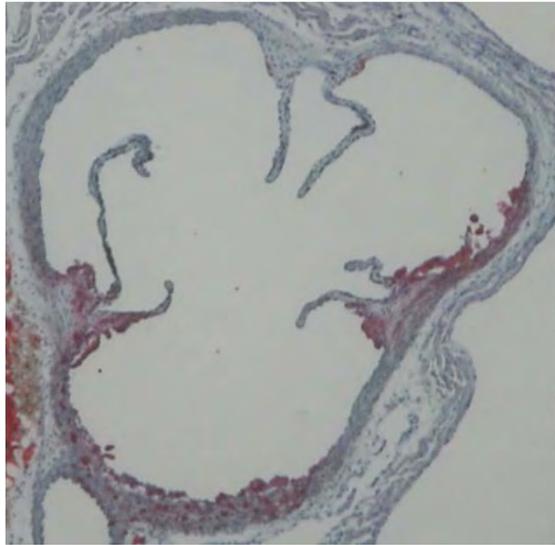


若年層で冠動脈疾患群でトランス脂肪酸濃度が高い  
= 若年層で冠動脈疾患発症原因として  
トランス脂肪酸摂取量が多いことが一因と考えられる。

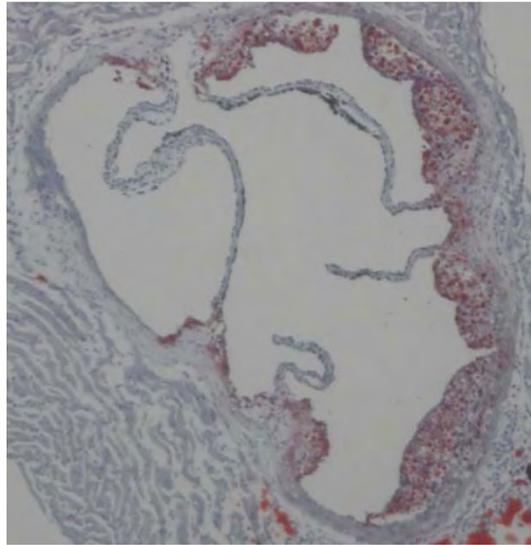
# 研究の概要

1. **トランス脂肪酸の動脈硬化性疾患（冠動脈疾患）へ与えるリスク評価（臨床研究）**
2. **トランス脂肪酸負荷の動脈硬化病変に与える影響の検討（疾患モデル動物を用いた研究）**

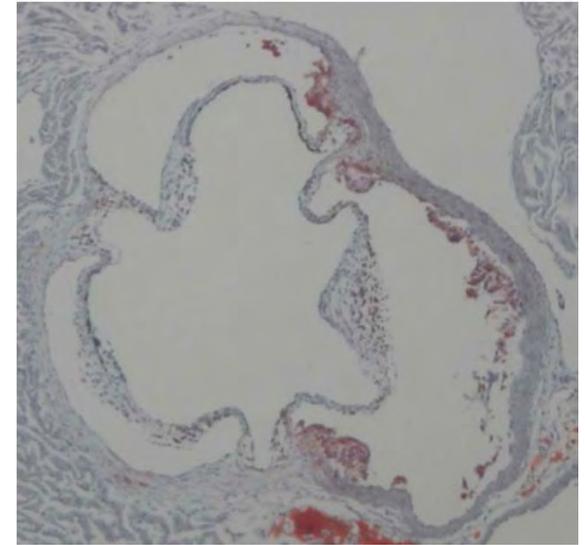
# エライジン酸負荷により動脈硬化が悪化する。



コントロール群

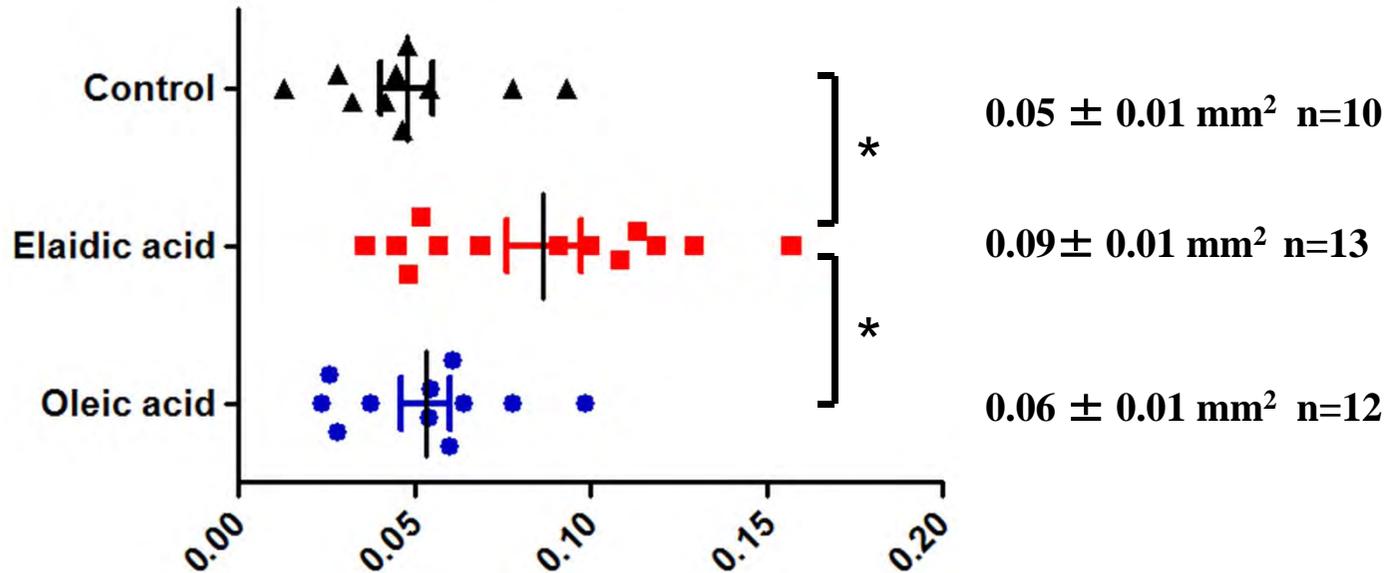


エライジン酸負荷群



オレイン酸負荷群

Plaque area



\* p < 0.05

## モデル動物を用いた研究のまとめ

1. トランス脂肪酸摂取により動脈硬化モデルマウスの動脈硬化は進展する。
2. トランス脂肪酸は臓器に蓄積し、炎症を惹起する。
3. トランス脂肪酸は血管内皮を障害、活性化し、血栓傾向を引き起こす。
4. トランス脂肪酸は、マウスにおいて慢性炎症、酸化ストレスを惹起し、動脈硬化を促進する。

## 消費者庁

# 平成23年8月23日栄養成分表示検討会報告 「脂質総量」のみが表示すべき栄養成分

## 「食品に含まれるトランス脂肪酸」評価書の概要

### 日本人のトランス脂肪酸の摂取実態と健康影響

平成24年 食品安全委員会

- 日本人の大多数はWHOの目標を下回っている。  
通常食生活では、健康への影響は小さい。
- ただし、脂質に偏った食事をしている人は、留意する必要あり。
- 脂質は重要な栄養素。  
バランスの良い食事を心がけることが必要。



## 栄養成分表示に関する声明

循環器疾患、動脈硬化性疾患の撲滅において、生活習慣の改善、なかでも食事栄養の改善は重要である。現在、食品の栄養表示は栄養表示基準(平成15年厚生労働省告示第176条)で義務付けられている。その一つに「3.脂質」があるが、脂肪には多くの種類があり、それらをひとまとめにして総体としての「脂肪」摂取を低減することを目的として「脂質」と表示することには問題があると考えられる。

今までの臨床研究結果から、全ての脂肪が健康障害に繋がるわけではなく、現時点で過剰摂取が動脈硬化性疾患を増加させる脂質としては、コレステロール、飽和脂肪酸、**トランス型不飽和脂肪酸(トランス脂肪酸)**が挙げられる。

コーデックス規格では、飽和脂肪酸の摂取量を低減させるよう求めており、北・南米諸国、オーストラリア、韓国、台湾、香港、マレーシアでは既に飽和脂肪酸の表示を義務付けている。また、**米国、カナダ、韓国、ウルグアイ、アルゼンチン、パラグアイ、ブラジル、香港、台湾などに食品を輸出している日本の食品企業は会社の規模を問わず、すでに「脂質」の表示に加え、少なくとも「飽和脂肪酸」、「トランス脂肪酸」の表示を実行しており、日本国内の消費者向けに販売される食品に関しても、表示を義務化することを切に要望するものである。**

これらのことから、「脂質」の表示に加え、動脈硬化性疾患発症のリスクとなる「コレステロール」、「飽和脂肪酸」、「**トランス脂肪酸**」の栄養表示をただちに行う必要性があることを表明する。

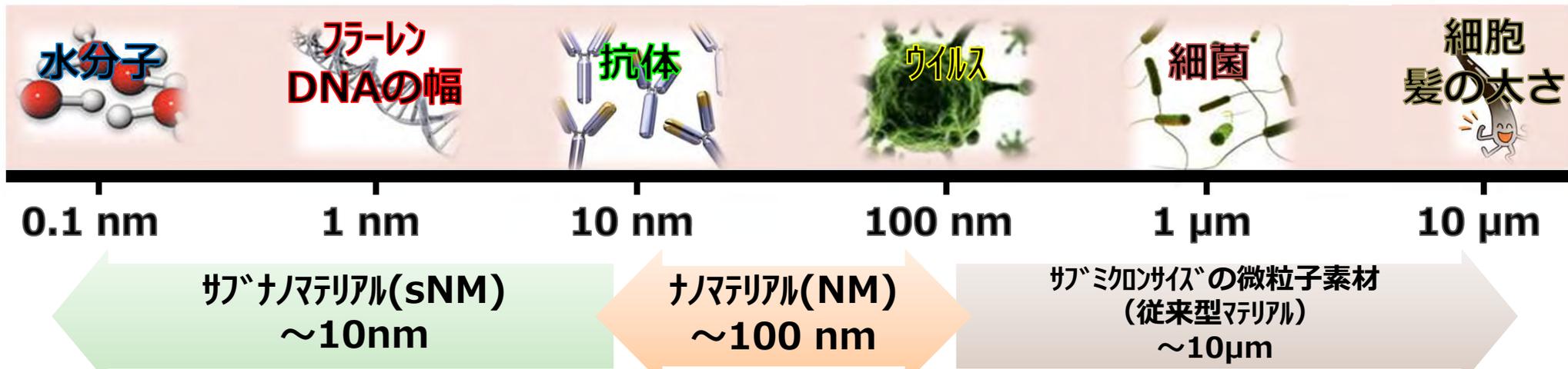
平成25年度食品健康影響評価技術研究成果発表会  
(発表35分、質疑10分：合計45分)

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



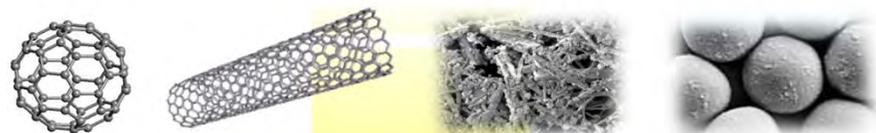
# 食品中ナノマテリアルの腸管吸収 及び体内動態の特性を利用 したリスク評価手法の開発

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 µg / 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 µg / 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 µg / 人/日** (銀含有サプリメント100 µg+日常食からの経口摂取量50 µg)
- 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-ド (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。
- 一方でナあるいはサブナサイズの素材は、ウイルス（100nm）～蛋白質（20nm）～低分子のバ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、ナ化あるいはサブナ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。

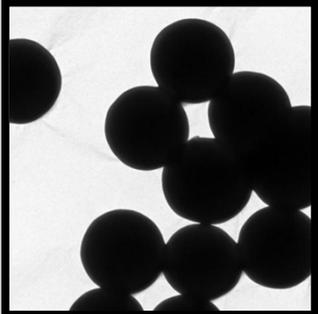
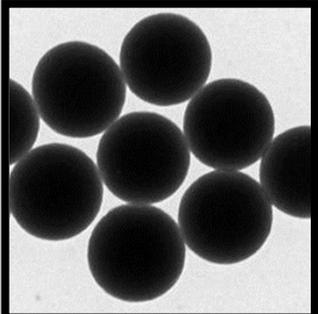
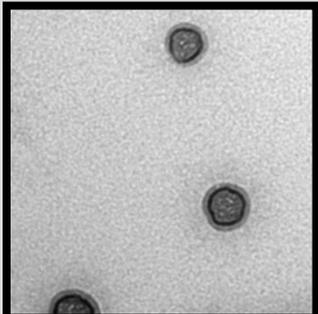
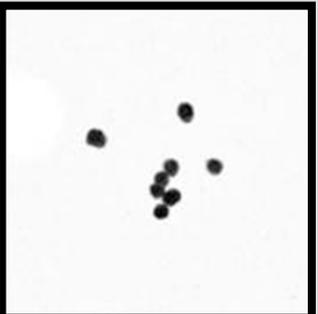
将来的に詳細なハザード評価研究やリスク解析研究が必要となるか否かといった是非を追求した。

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)

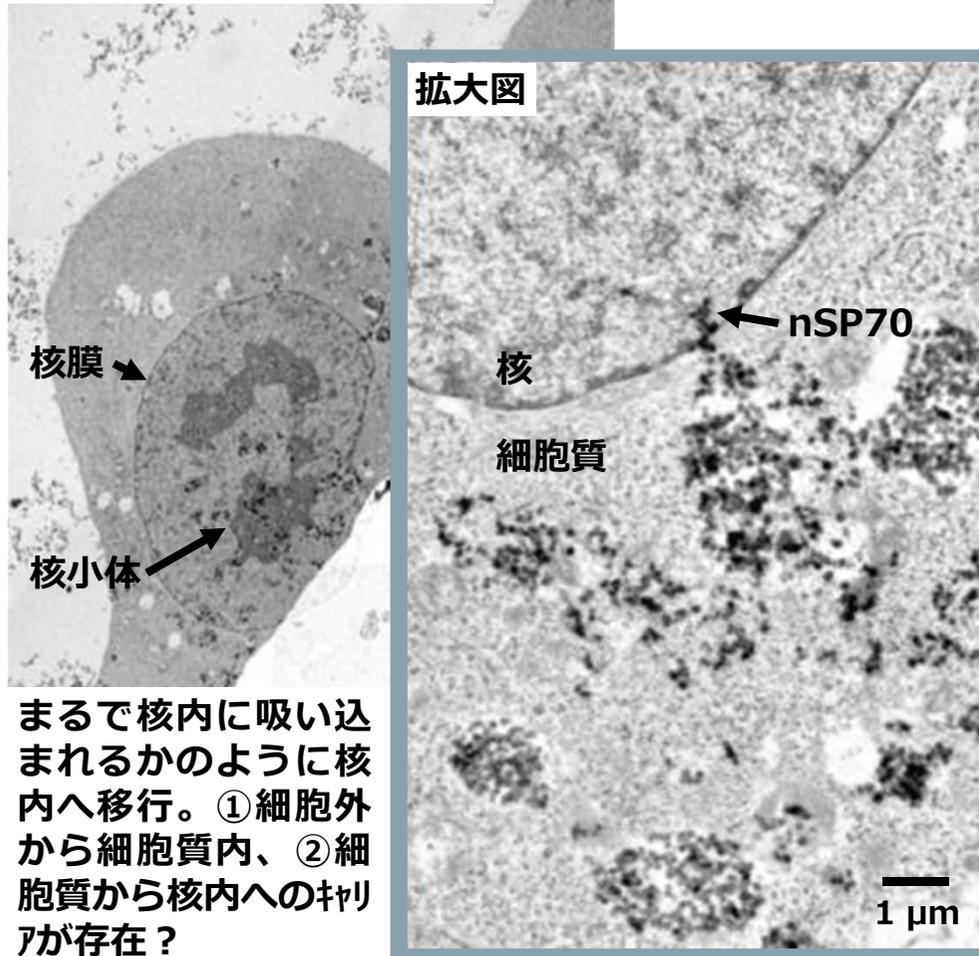
	ナノシリカ (nSP)	サブナノ白金粒子 (snPt)	サブナノ銀 (snAg)
			
サイズ	30-100 nm程度	1-10 nm程度	1-10 nm程度
用途	固結防止剤	抗酸化剤	抗菌剤
製品例	製菓、インスタ食品など	サプリメントなど	食器、保存袋など

	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。

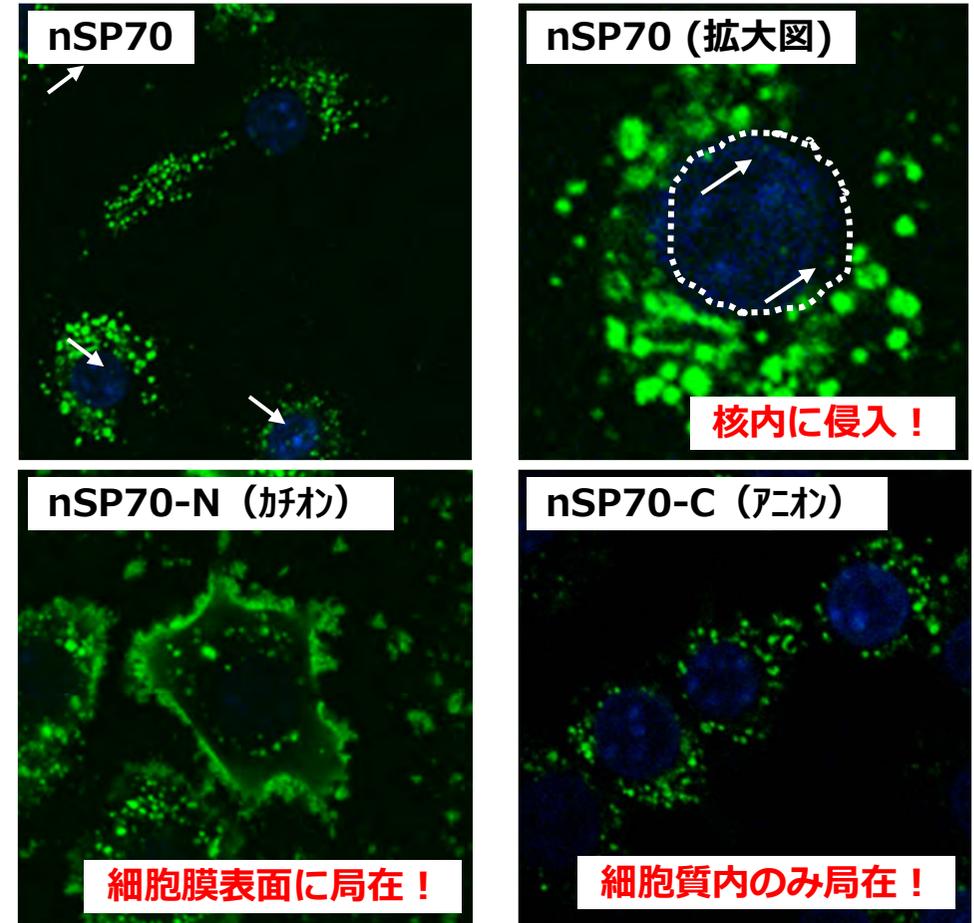
## 透過型電子顕微鏡

1次・2次粒径：70 nm  
<添加24時間後>



## 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>

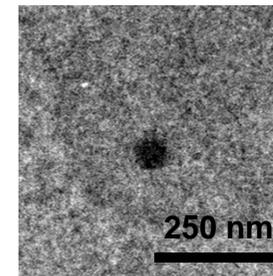
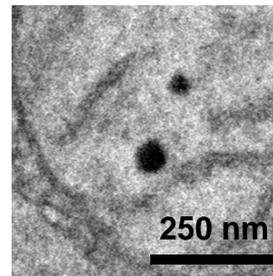
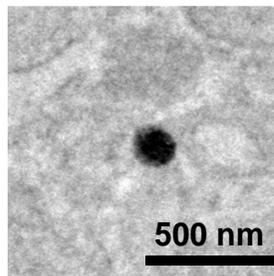
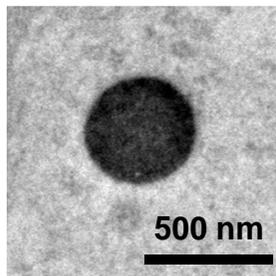
nSP70  
<粒径 : 70nm>

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、

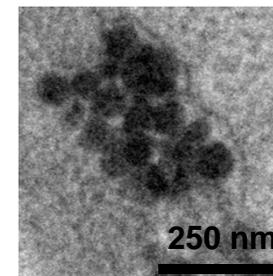
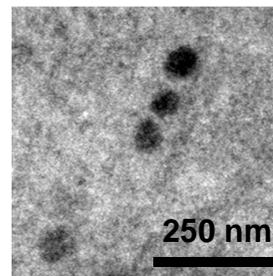
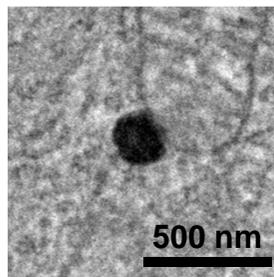
nSP70やnSP30は経口曝露後、一部が吸収され、

腸管膜  
リンパ節



肝臓

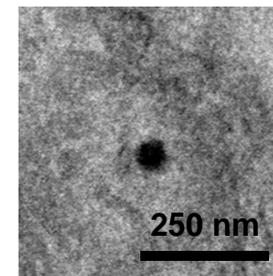
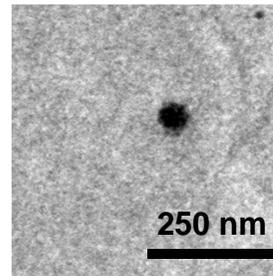
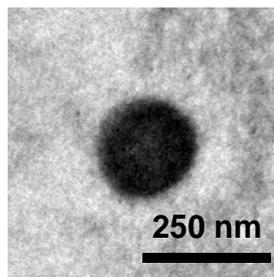
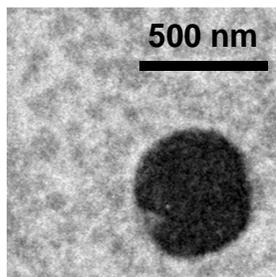
粒子は  
観察されず



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

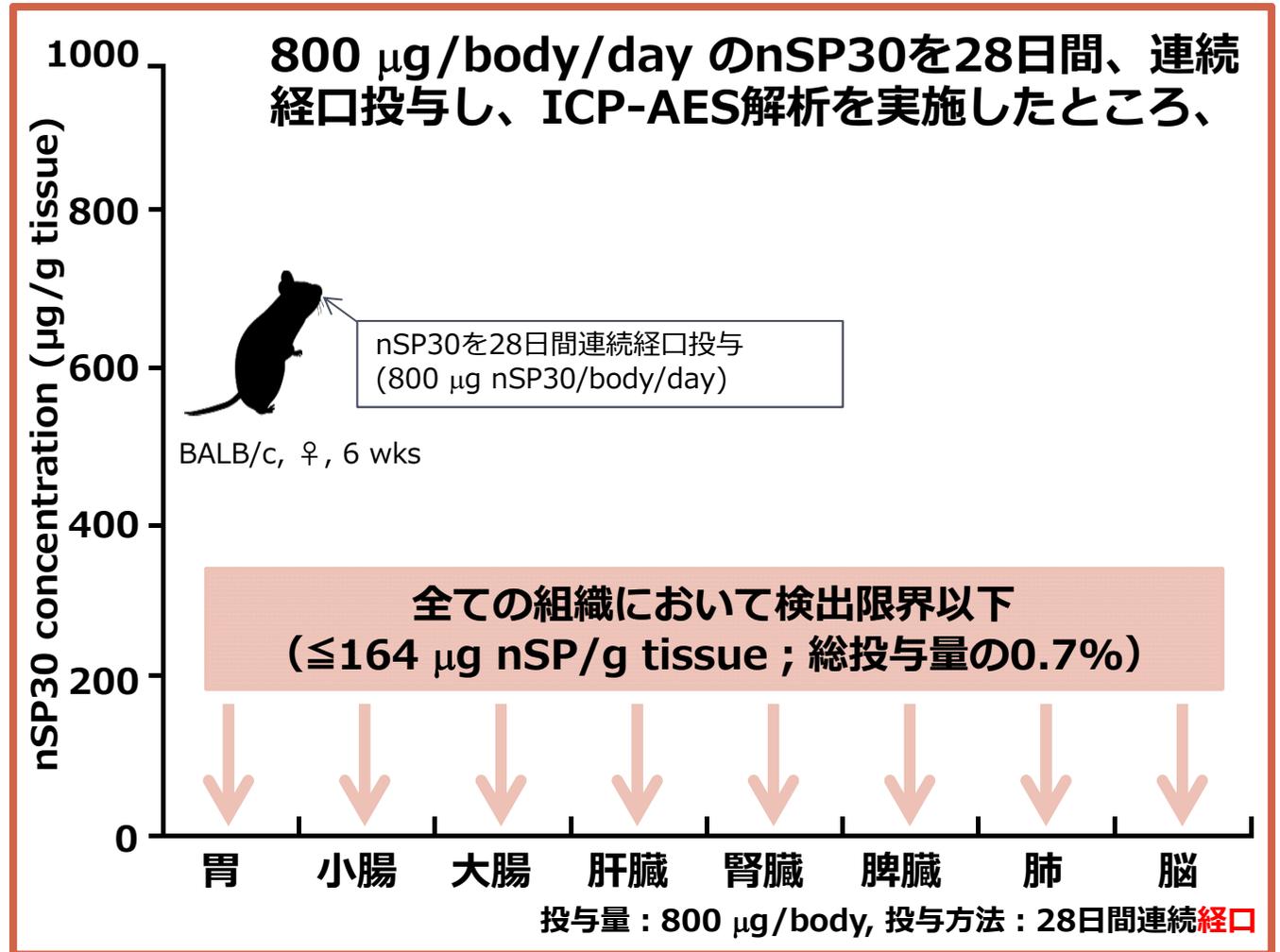
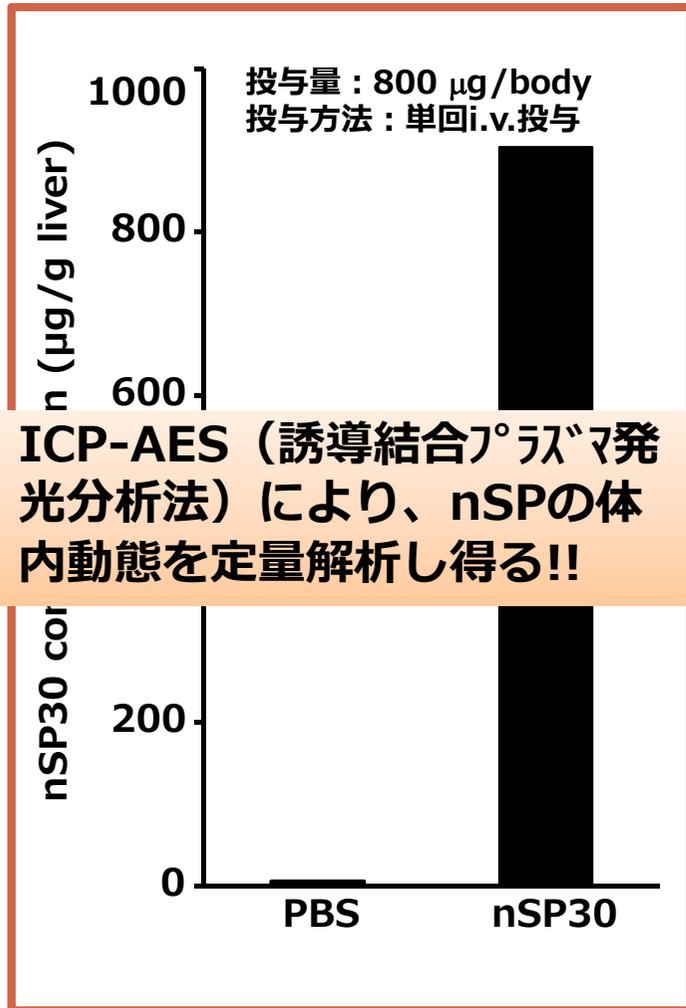


胆汁排泄されることが判明した (体内には殆ど蓄積しない) 。

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。

# 非晶質ナシリカ (nSP) の消化管吸収性の定量

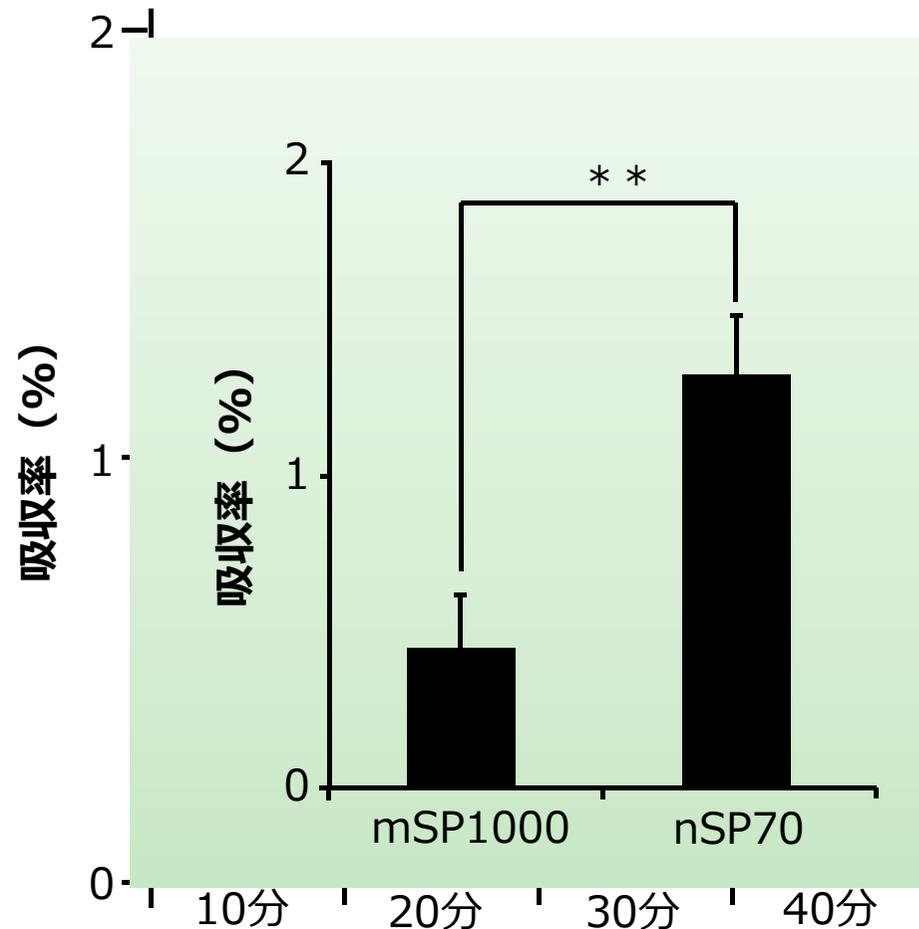
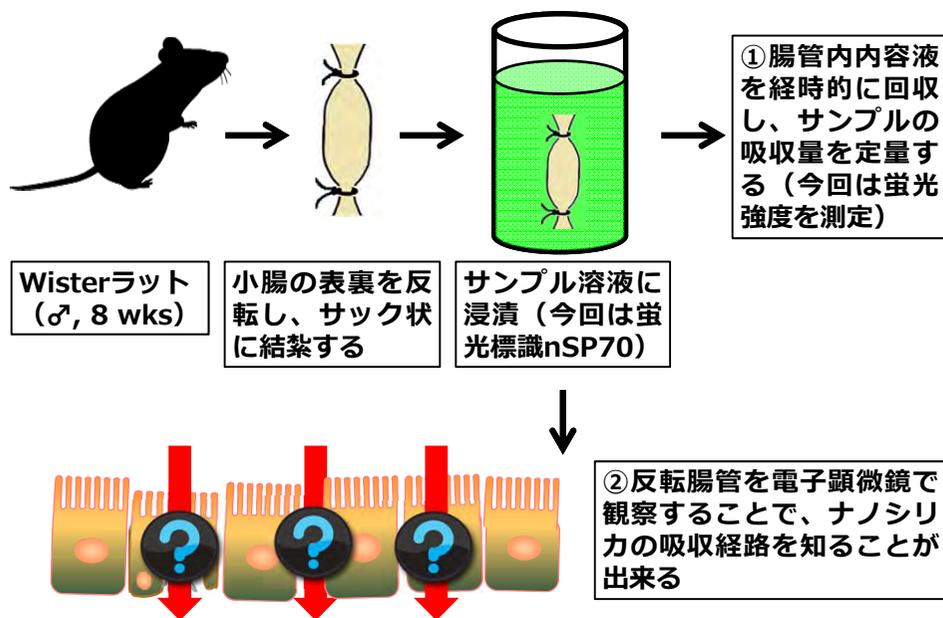
10



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。

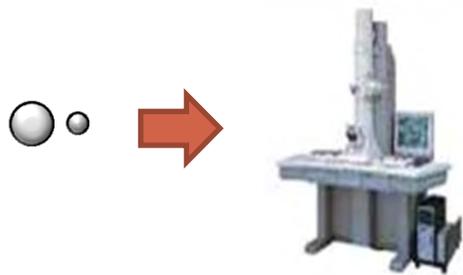


本実験系（ラット腸管反転法）は、細胞間隙ルートを通過するなど、主として受動拡散経路の定量評価ではあるものの、nSPが経時的に吸収され得ること、その吸収速度は非常に緩やかであることが判明した。

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



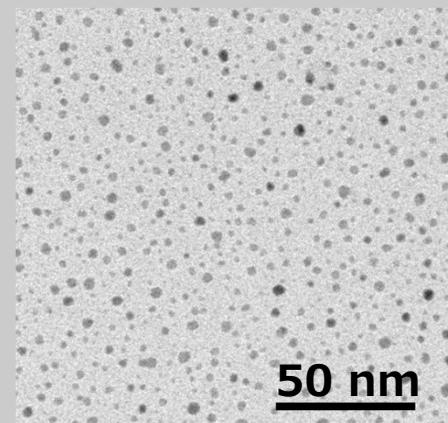
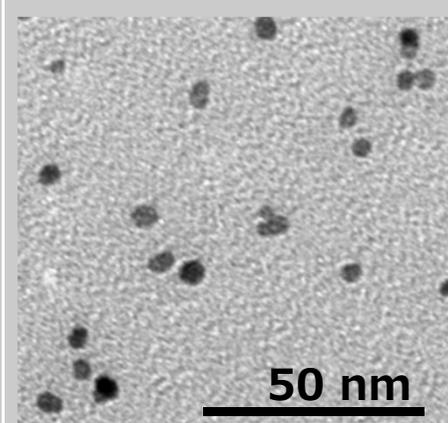
透過型電子顕微鏡を用いて粒子の像を観察した。

### ●二次粒子径

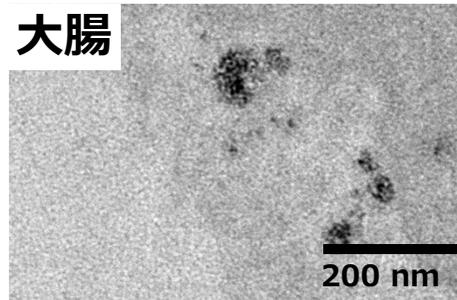
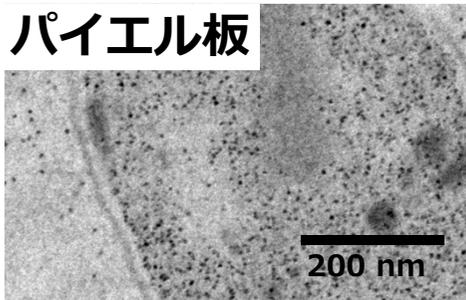
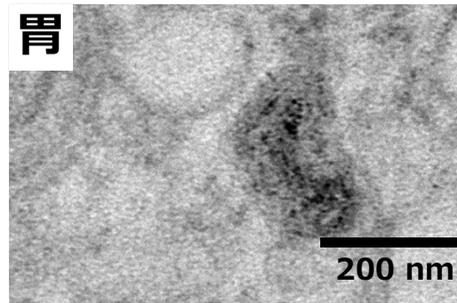
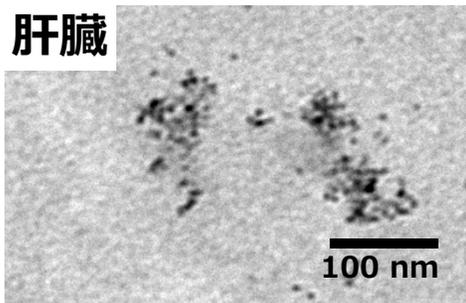
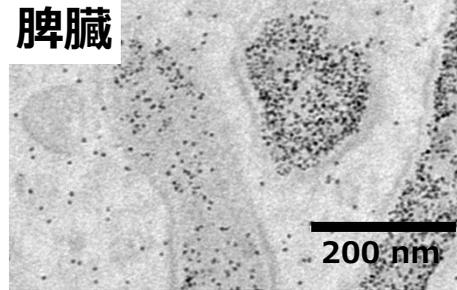
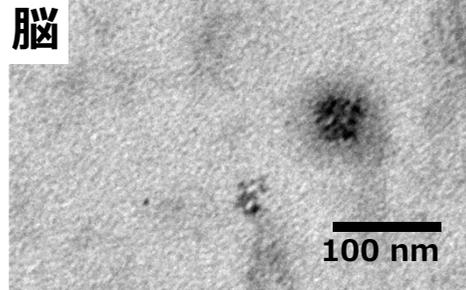
動的光散乱(DLS)法で物性情報を収集した。

**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

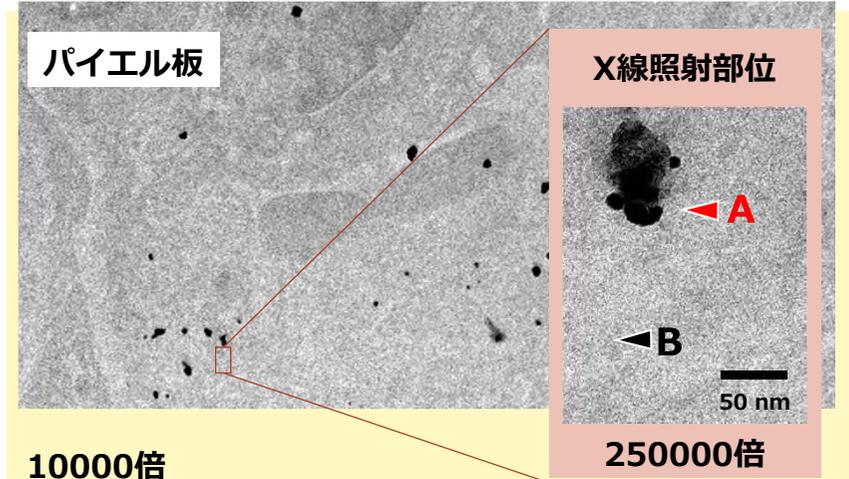
	snPt1	snPt8
透過型電子顕微鏡像		
二次粒子径 (nm)	0.63 ± 0.07	8.04 ± 1.95

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>



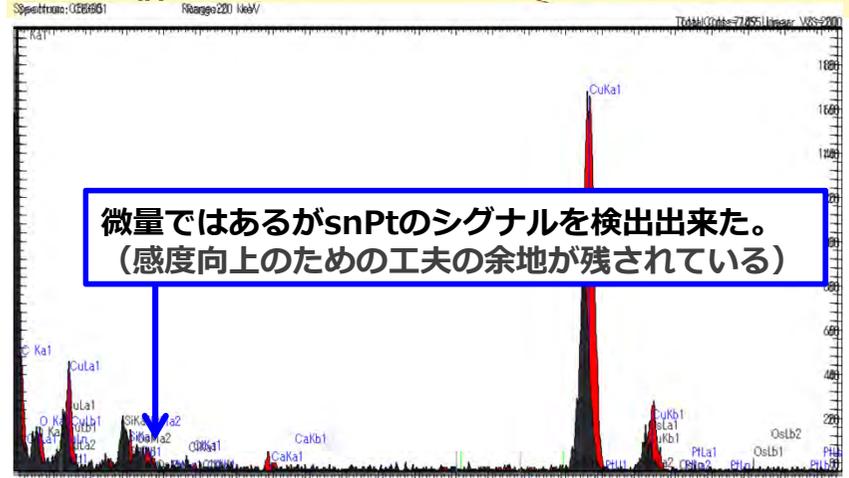
消化管吸収され、広範な組織分布を示す！

## 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。

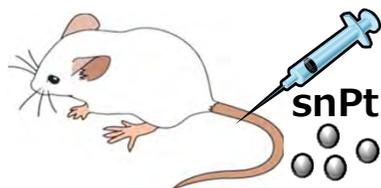
以上、サナノ白金の消化管吸収を定性評価し得ること、吸収後、広範な組織に分布することが判明した。次に、ICP-MSによる定量評価系を構築したうえで、体内吸収性を評価した。

## 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

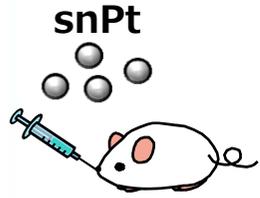
- ・ 血中白金濃度の推移を調べる
- ・ 経口投与・尾静脈内投与のデータを比較し、バイオアベイラビリティを算出した

(※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)

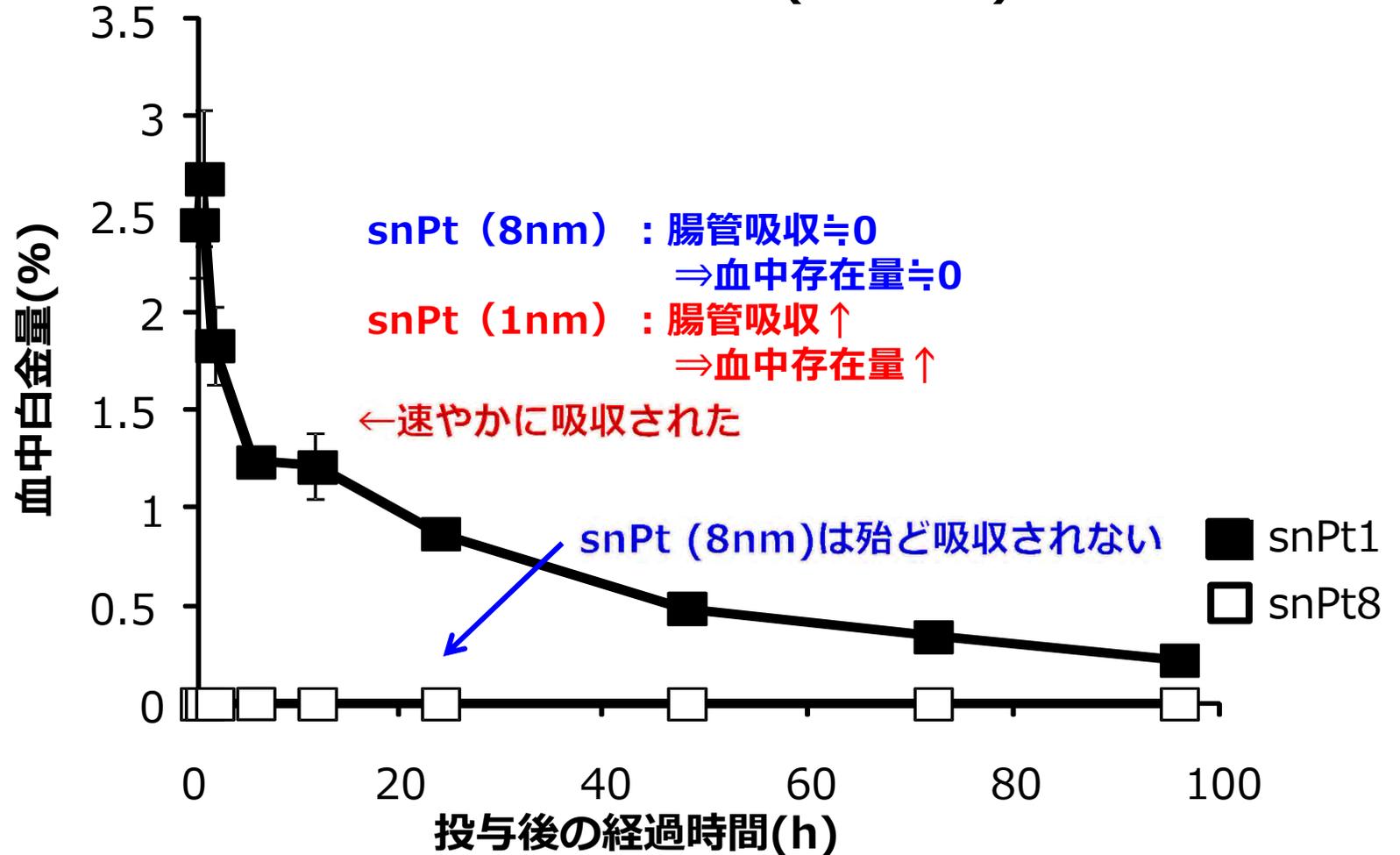
BALB/c  
(♀, 6 weeks)

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

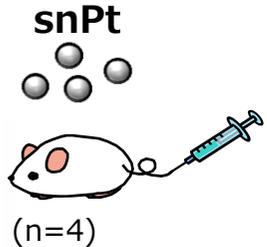
## 血中白金移行率の推移(経口投与)



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】

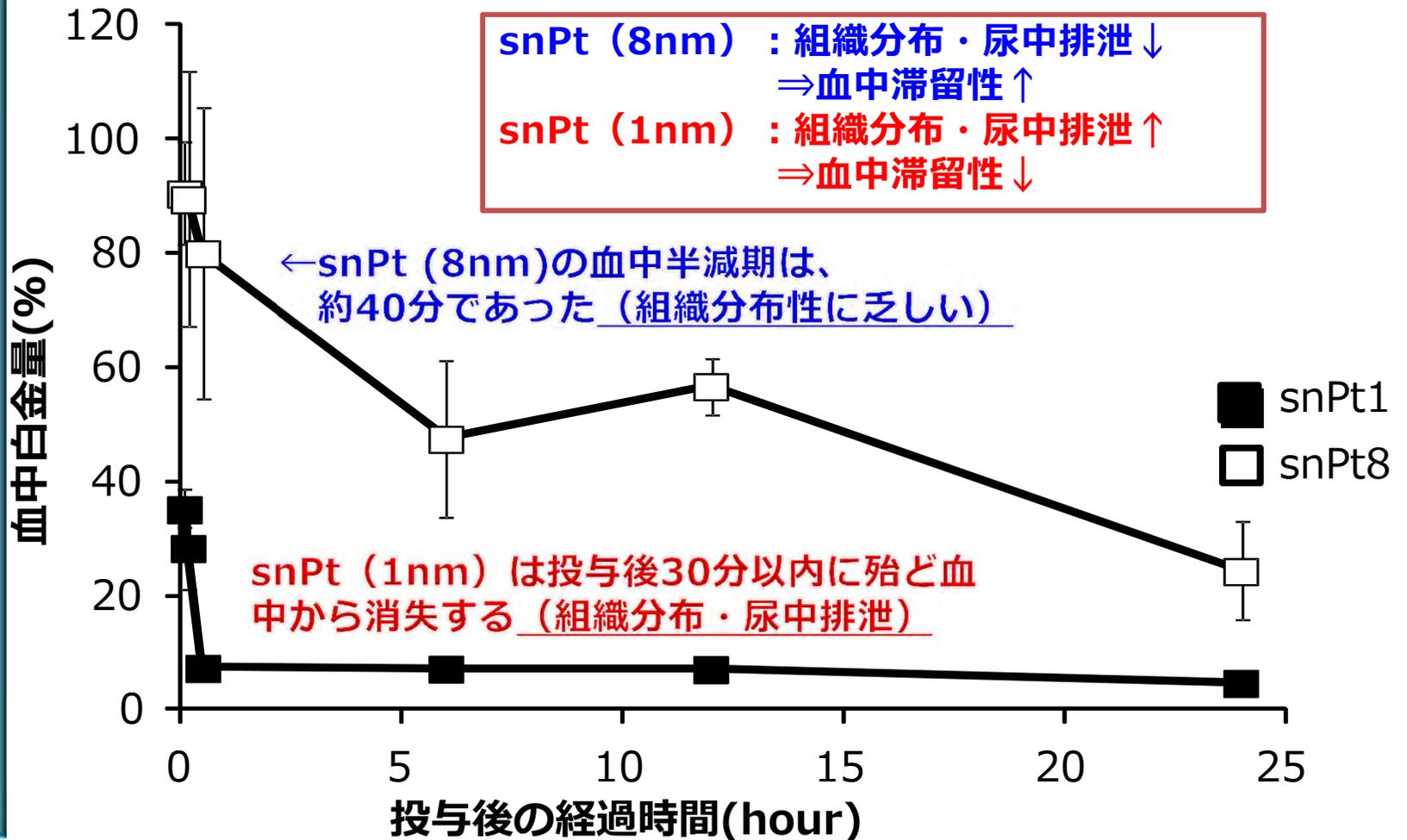


BALB/c  
(♀, 6 weeks)

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

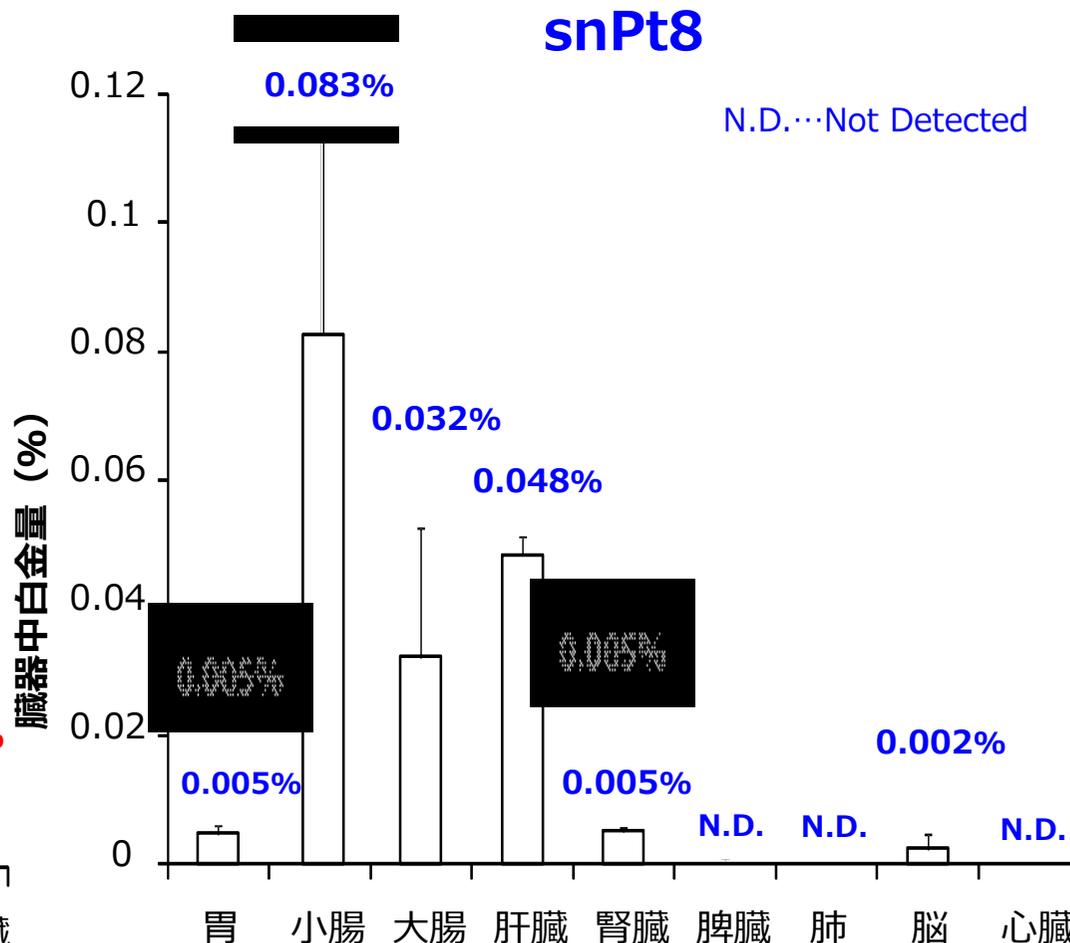
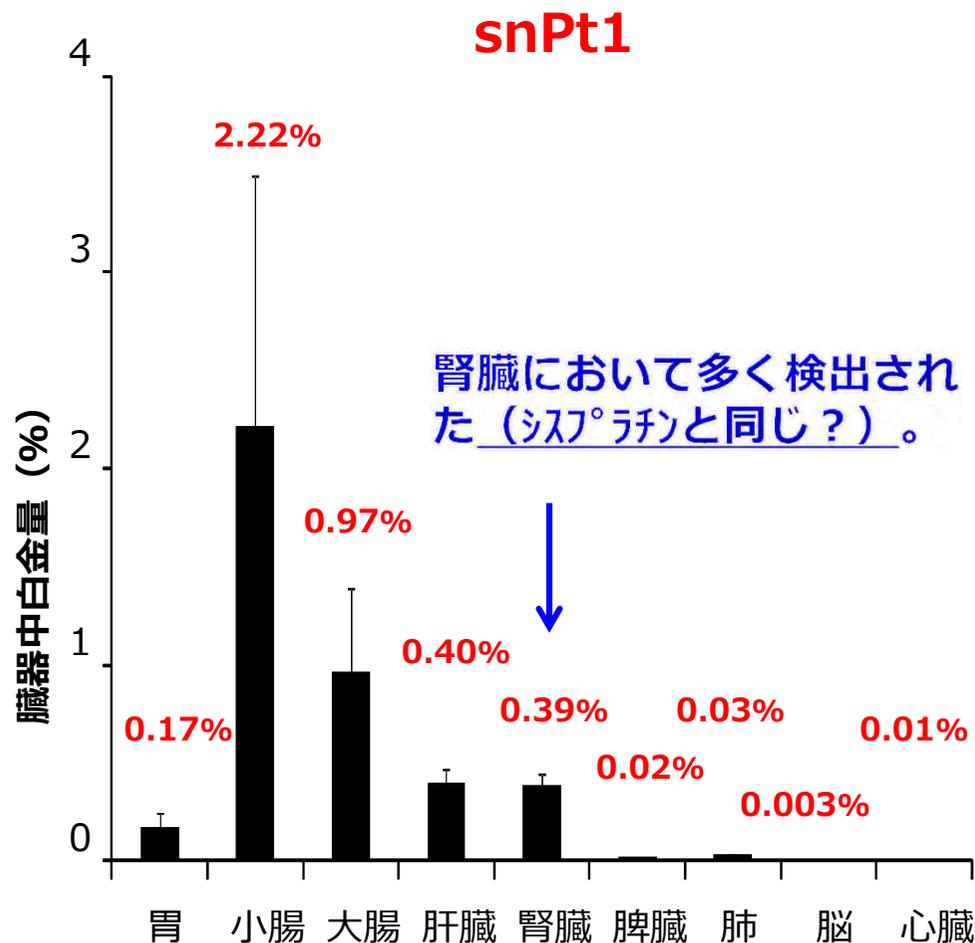
## 血中白金量の推移(尾静脈内投与)



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、

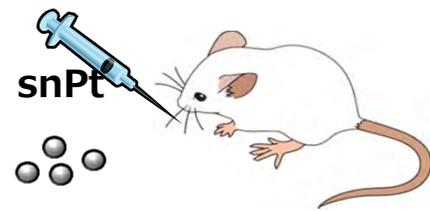
## snPt単回経口投与24時間後の臓器中のPt残留率

※残留率(%) = 100 \* 各臓器当たりのPt量 / 投与量

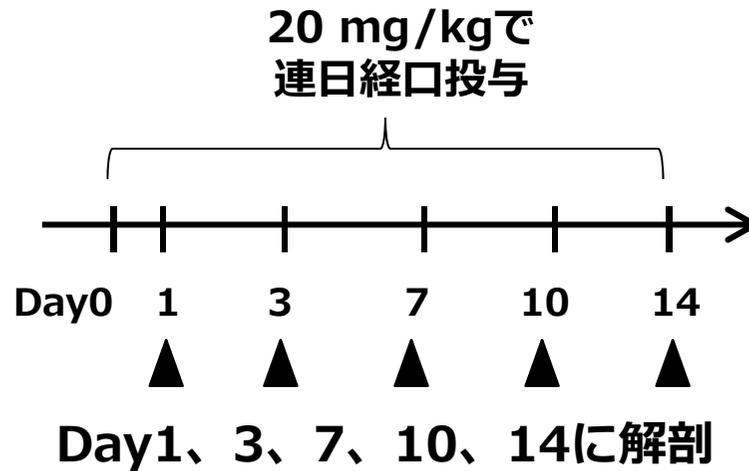


投与局所の消化管だけでなく、脳以外のすべての臓器において白金が検出され、特に、腎臓・肝臓に多く残存していることが明らかとなった。さらに、経時的に残存率を解析した結果、投与後56日においても、**腎臓**でsnPtが検出された。

## 【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

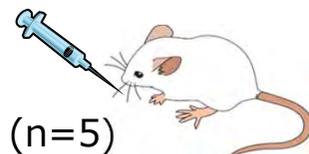
(※20 mg/kg…一週間経口投与した際に一般毒性を示さない最大量)

- 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)

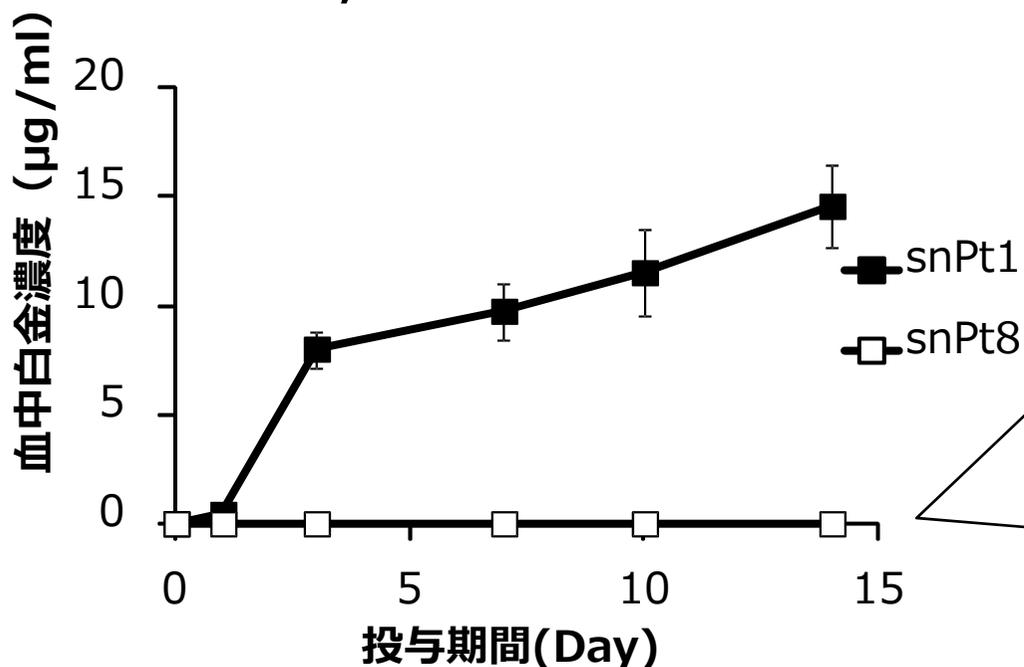
snPt



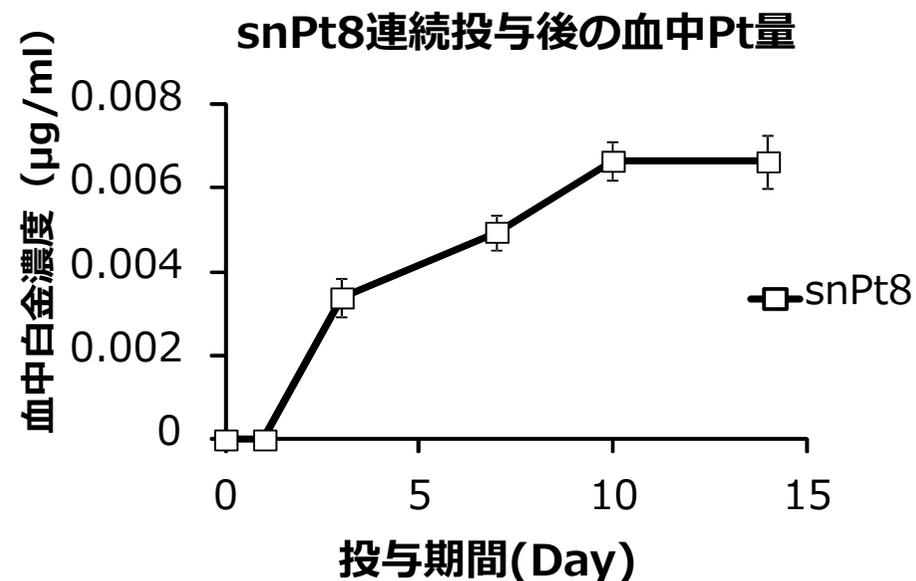
20 mg/kgで  
14日間連続  
経口投与

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。

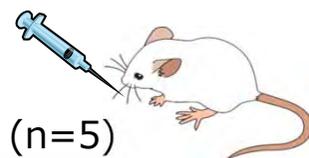
# snPt1の連続投与による体内分布

20

## 【実験方法】

BALB/c (♀, 6 weeks)

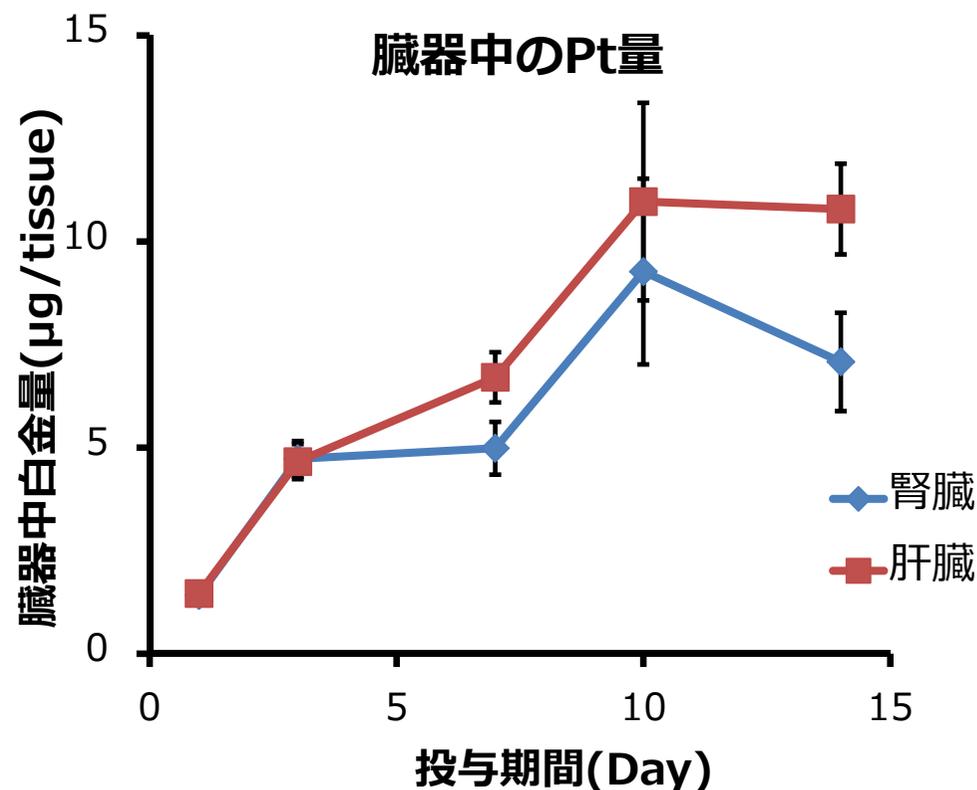
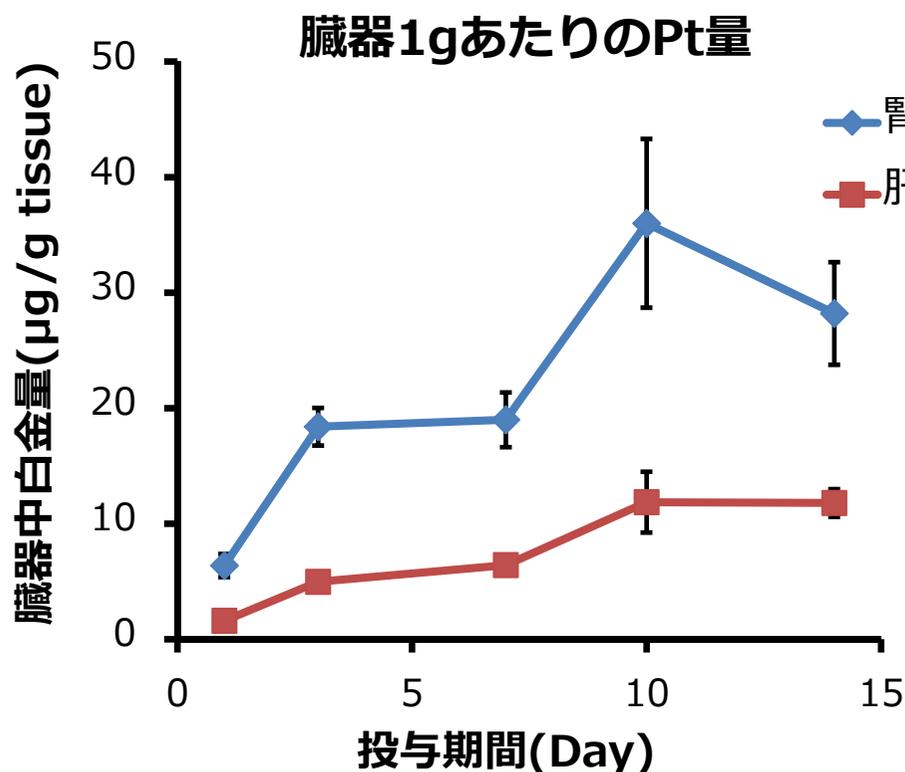
snPt



(n=5)

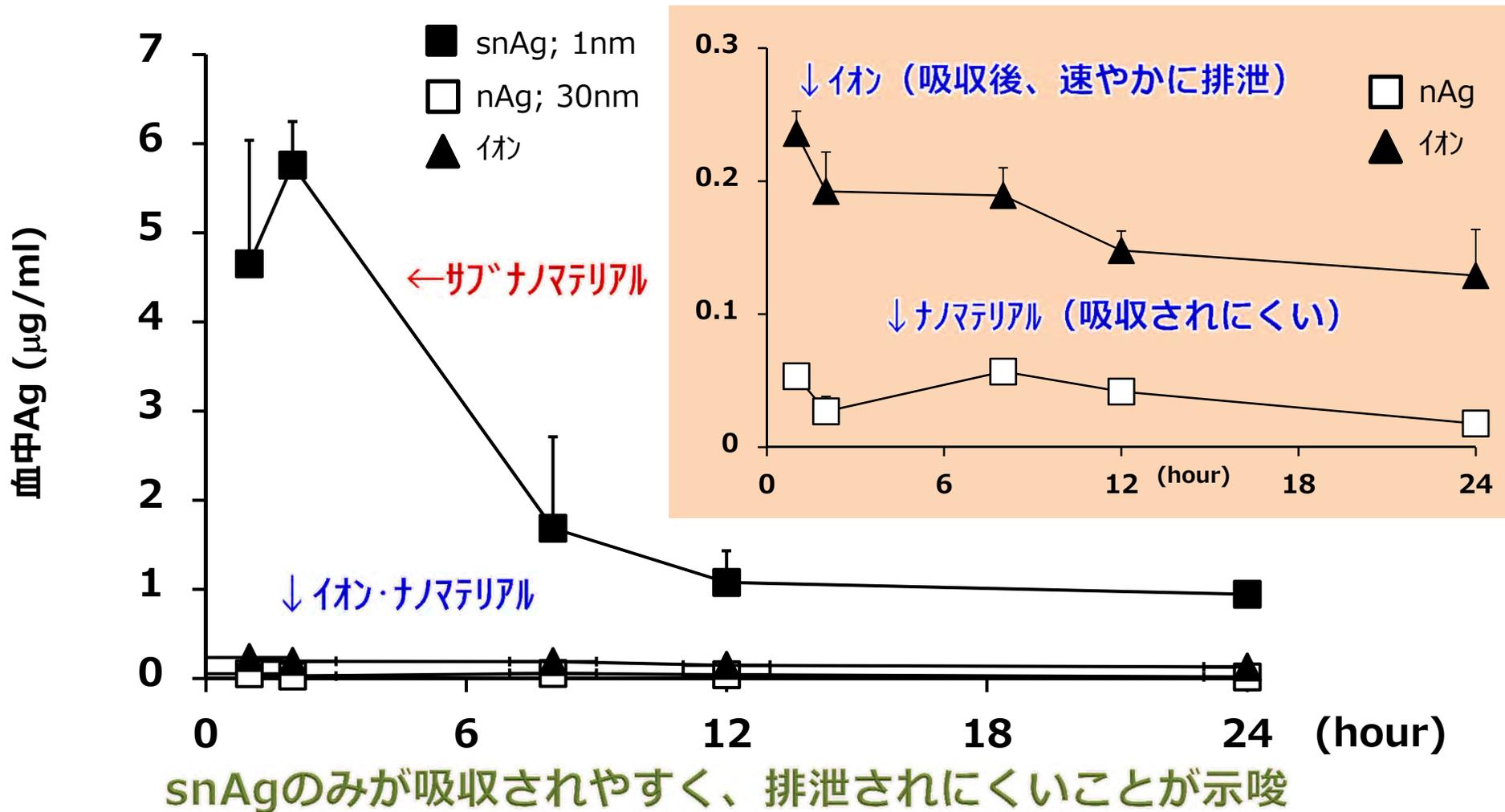
20 mg/kgで  
14日間連続  
経口投与

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。

# フタル酸エステルの生殖・次世代影響の 健康リスク評価に関する総合研究

1

名古屋大学名誉教授

中部大学生命健康科学部客員教授

那須民江

2013年8月29日

(中部大学・名古屋大学・名古屋市立大学共同研究)

# \* Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD)

食事由来

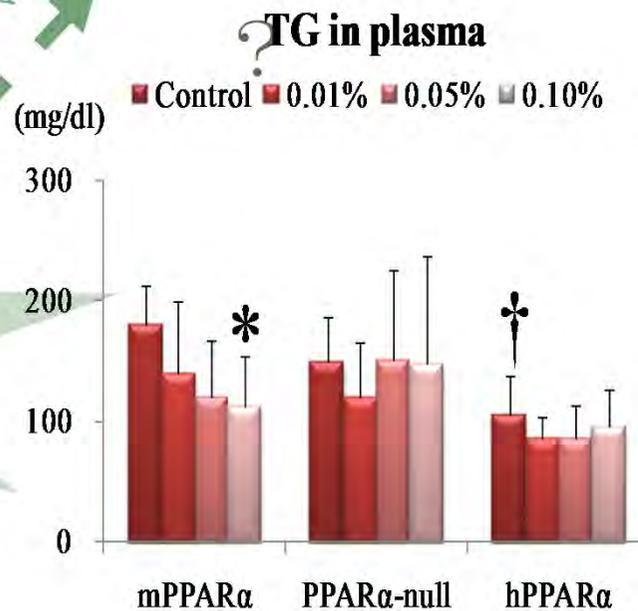
低栄養

生活習慣病

次世代児(仔)

母

化学物質由来  
(PPAR $\alpha$  アゴニスト)



私たちの研究室では国に先駆けて化学物質曝露の子供の健康への影響を検討しています

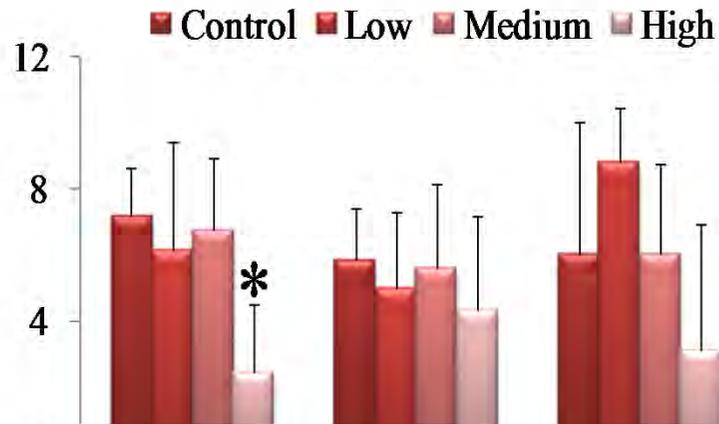
子どもたちは、あしたの地球を生きてゆく。

子どもたちが、次の世代が、  
すこやかに成長できる地球環境を未来に残すには  
どうしたらよいのでしょうか。

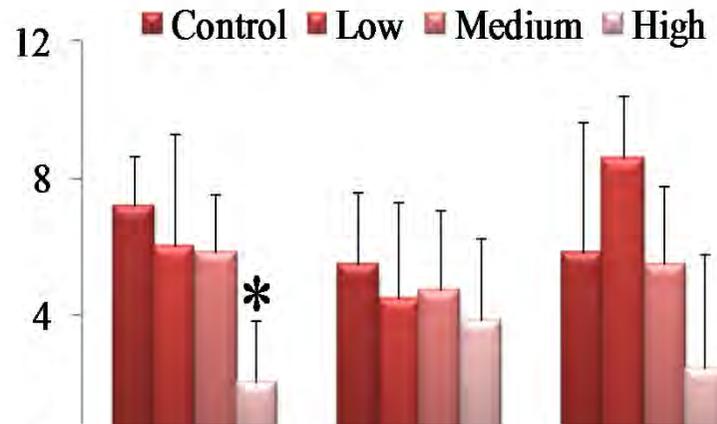
2011年にスタートする「エコチル調査」。  
環境が人間の健康にもたらす影響をさぐる、全国的な調査です。

# DEHP研究の背景

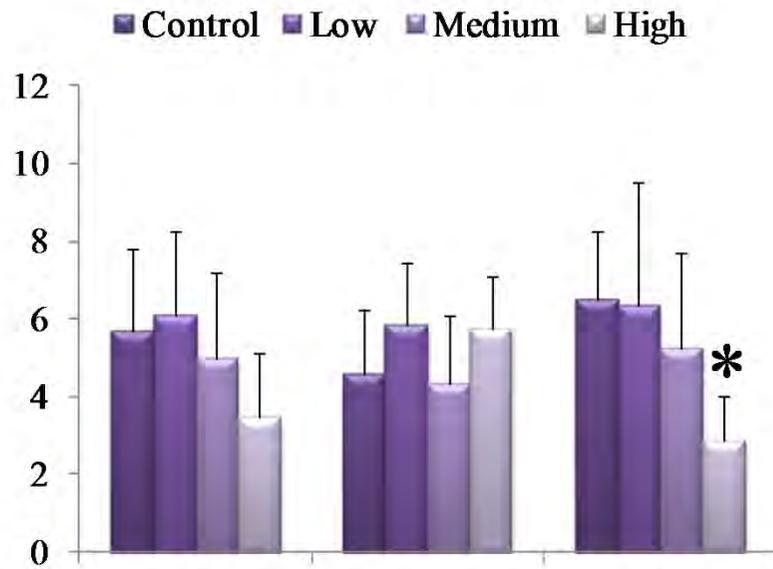
## Fetuses / litter



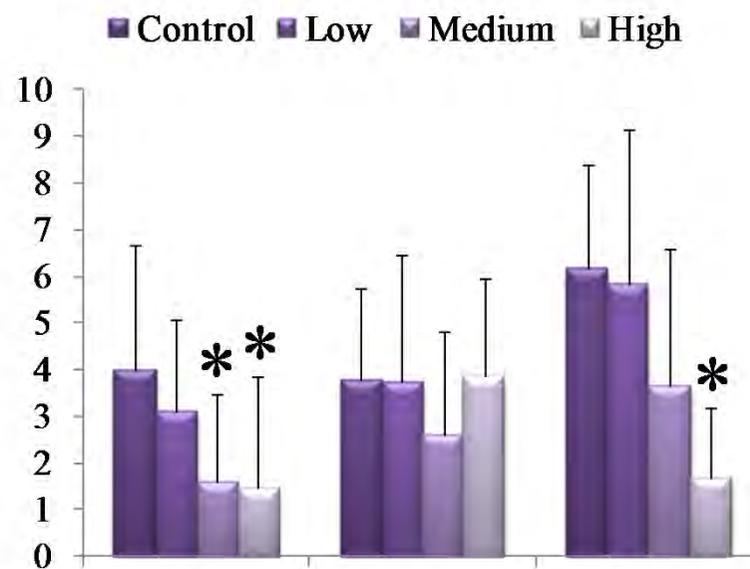
## Live fetuses / litter



## Pups born / litter



## Live pups / litter



胎仔・新生仔の生存数の減少は肝臓PPARαに関係している 母親の栄養状態に着目

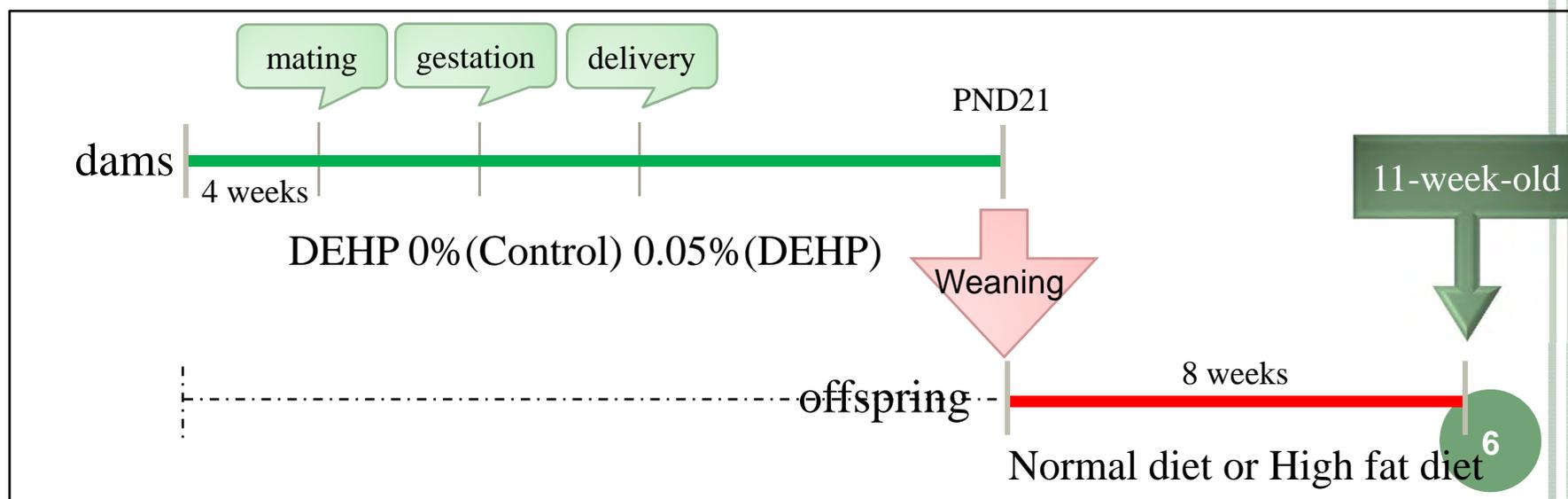
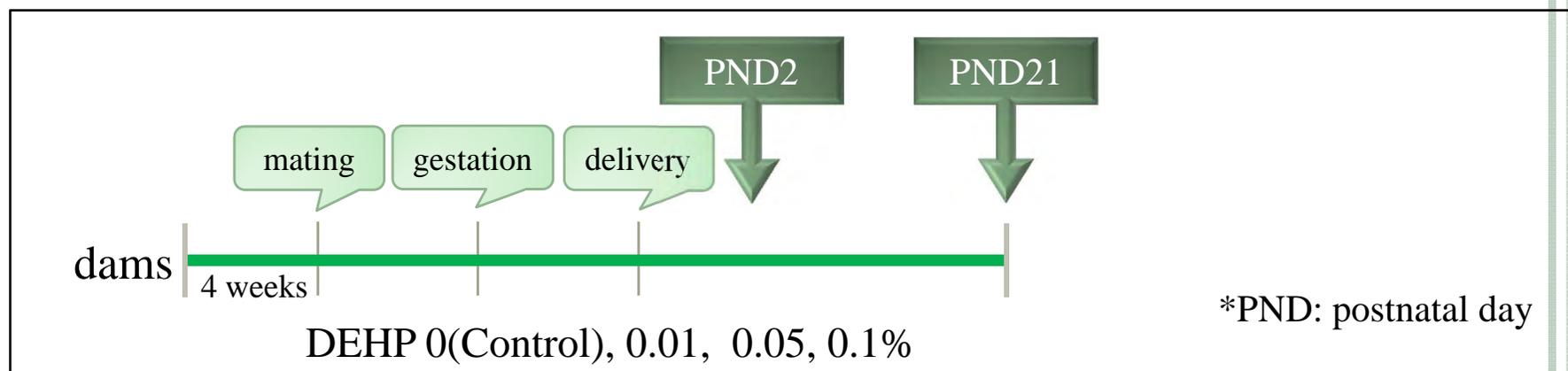
# DEHP研究の目的

- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- 2) DEHP胎仔期曝露の次世代影響
  - 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
  - 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
  - PPAR $\alpha$ のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
  - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
  - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR $\alpha$ の役割
  - マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR $\alpha$ の役割および種間差

# 実験方法

12 weeks of age (male and female)

129/sv (mPPAR $\alpha$ ), Ppara $\alpha$ -null, humanized PPAR $\alpha$  (hPPAR $\alpha$ )



# 目的

## ➤1) DEHP曝露の親世代への影響

## ➤2) DEHP胎生期(・授乳期曝露)の次世代影響

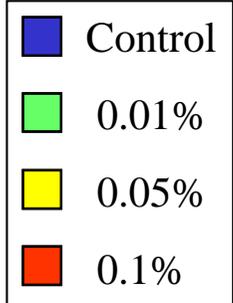
- 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
- 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
- PPAR $\alpha$ のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
- 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
- 脳への影響: 学習・行動(海馬)

## ➤3) DEHP代謝の種間差とPPAR $\alpha$ の役割

- マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR $\alpha$ の役割および種間差

# n-3系

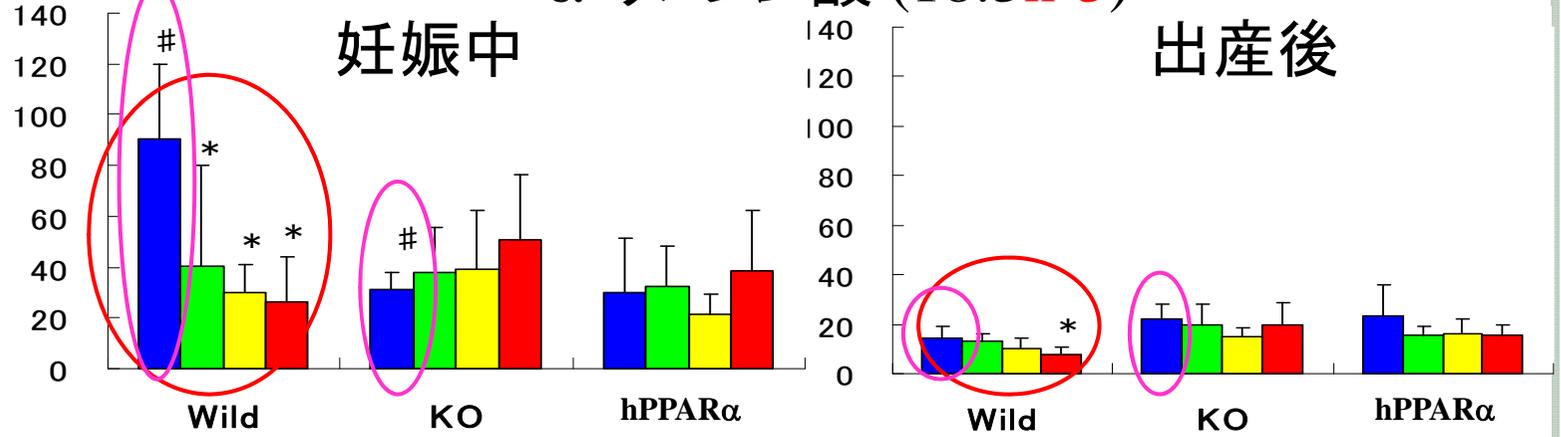
(nmol/ml)



## α-リノレン酸 (18:3n-3)

### 妊娠中

### 出産後



飼料中の  
DEHP濃度

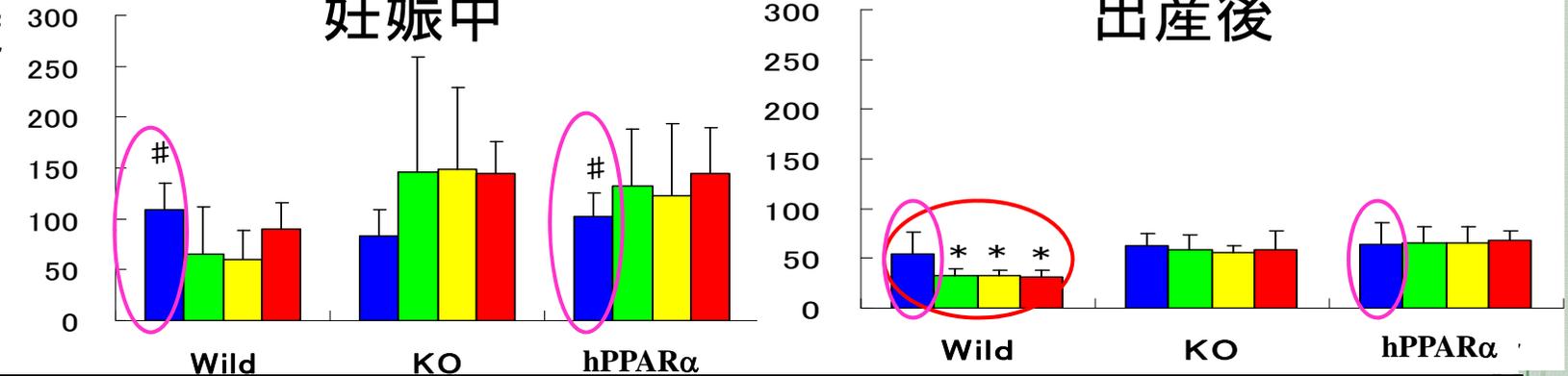
## EPA (20:5n-3)

### 妊娠中

### 出産後

mean ± SD

\* Control 群と  
比較し有意差  
有り(p<0.05)

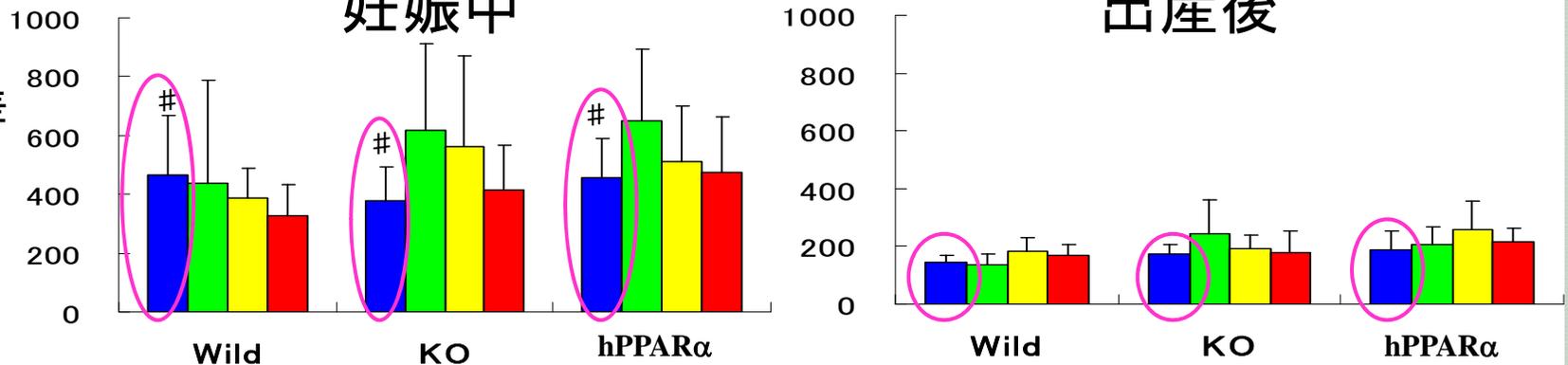


# 出産後の  
Control 群と  
比較し有意差  
有り(p<0.05)

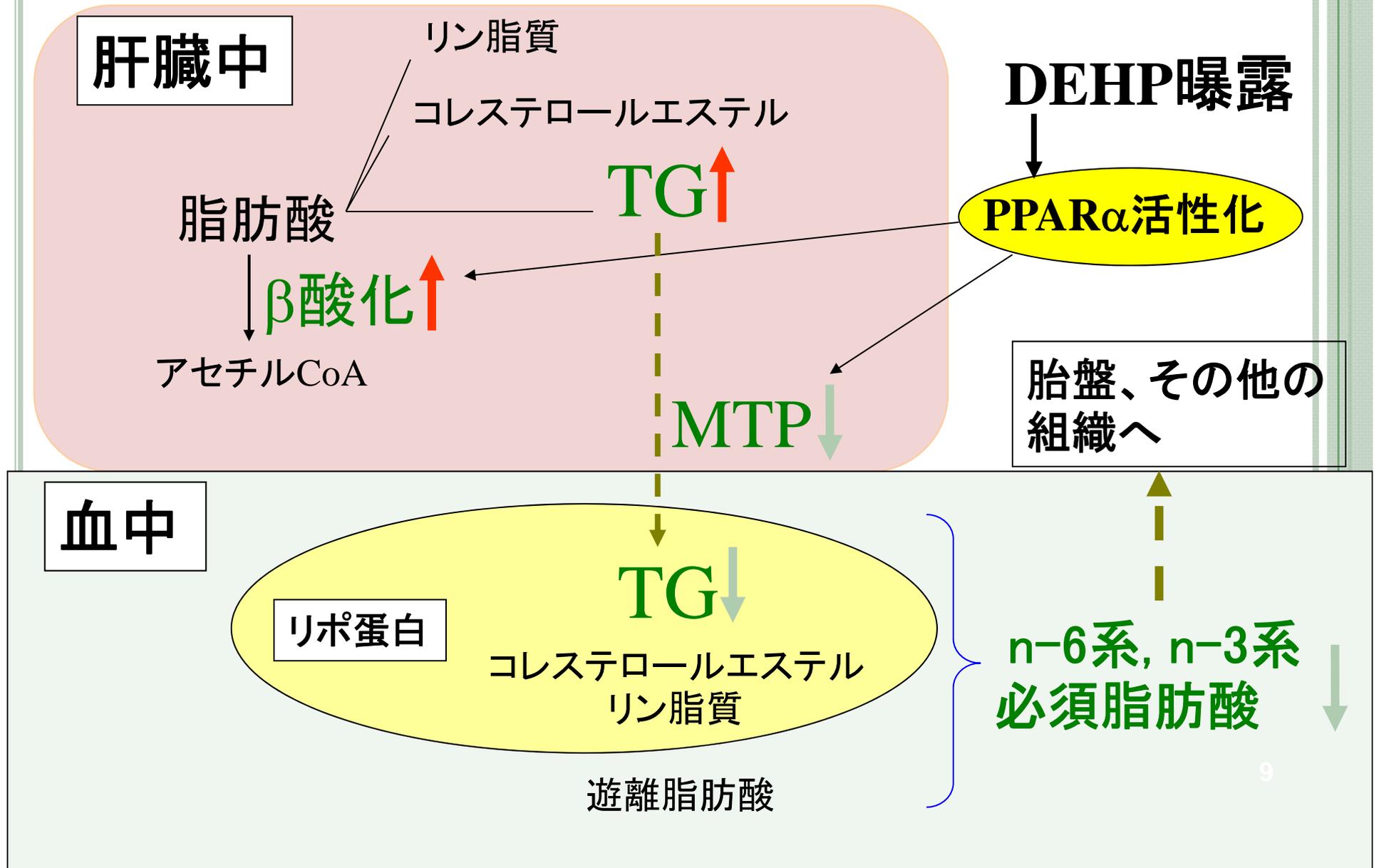
## DHA (22:6n-3)

### 妊娠中

### 出産後



# 胎生期DEHP曝露による野生型妊娠マウス体内変化



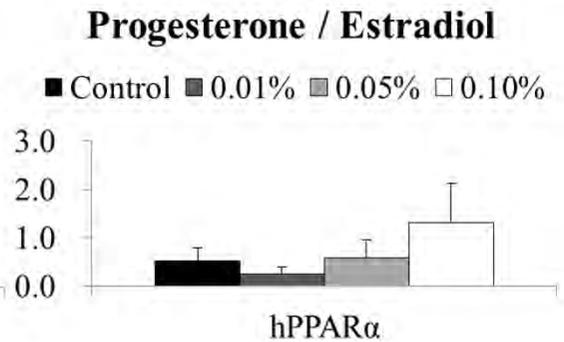
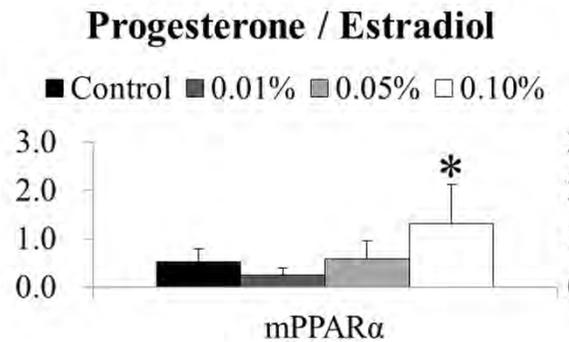
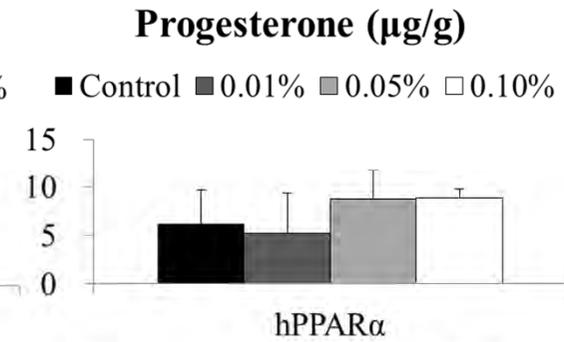
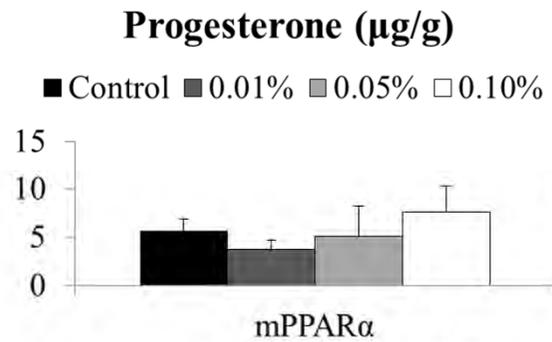
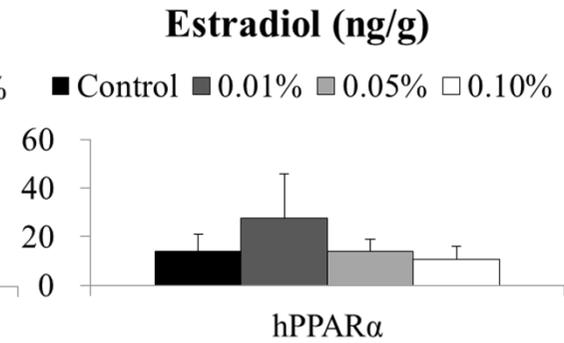
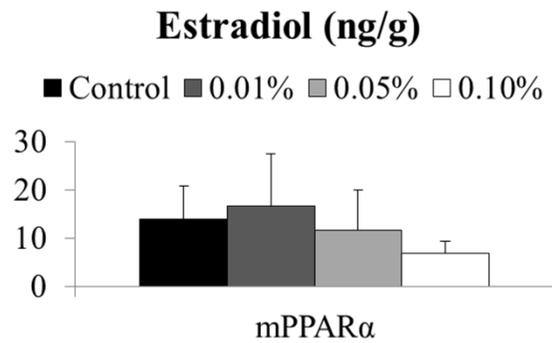
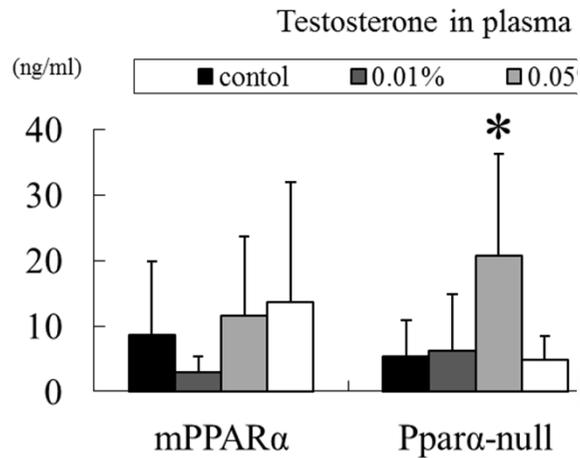
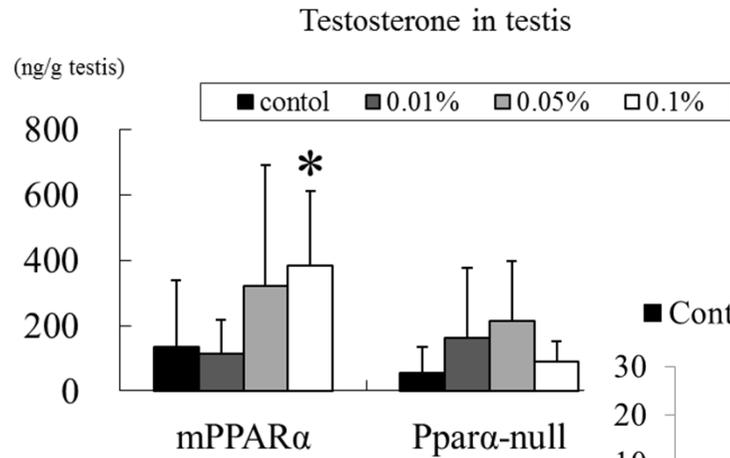
## 母マウス血漿脂質と肝臓脂質代謝への影響

- 出産前は出産後より血漿中トリグリセライドが高い
- 出産前は出産後より血漿中脂肪酸(アラキドン酸を除く)濃度が高い
- 野生型妊娠マウス血漿中トリグリセライドの増加抑制
- 野生型妊娠マウス血漿中脂肪酸、特に、リノール酸(C18)、 $\alpha$ -リノレン酸(C18)、パルミチン酸(C16)、オレイン酸(C18)の増加抑制
- 野生型マウスでのみ観察されるので、PPAR $\alpha$ 依存性の変化である。
- 肝臓MTP(TG 輸送蛋白)の発現抑制が一因

Hayashi et al Toxicology 2011  
Nakashima et al Toxicology (2013)

## 親世代の生殖器への影響(次頁PP)

- DEHP曝露は雄の生殖器病理には殆ど影響を与えないが、血漿テストステロン濃度を上昇
- DEHP曝露は雌の卵巣のプロゲステロン/エストラジオール比を上昇。



## 目的

- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- 2) *DEHP胎仔期曝露の次世代影響*
  - 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
  - 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
  - PPAR $\alpha$ のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
  - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
  - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR $\alpha$ の役割
  - マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR $\alpha$ の役割および種間差

## 胎生期DEHP曝露の仔の栄養状態 (必須脂肪酸)への影響

- 出産後2日目 (PND2)の肝臓中TG,脂肪酸濃度の方が胎仔よりはるかに高い(親マウスは妊娠期>出産後)
- DEHP曝露による影響は大きくない(死亡胎仔の測定は行っていないことに留意)
- PND2の肝脂肪酸の割合は母マウスの血漿中濃度の割合と類似
- 胎仔肝脂肪酸濃度の割合は母マウスと若干異なる(リノレン酸が少なく、ステアリン酸が多い)

Hayashi et al Toxicology 2011  
Nakashima et al Toxicology 2013

	Pregnant ( $\mu\text{mol/ml plasma}$ )	Postpartum ( $\mu\text{mol/ml plasma}$ )	Fetus ( $\mu\text{mol/g liver}$ )	New-born pup ( $\mu\text{mol/g liver}$ )
LA	2.91 $\pm$ 0.92 (34.4)	0.93 $\pm$ 0.05 (34.5)	3.69 $\pm$ 0.73 (8.6)	47.21 $\pm$ 31.01 (24.5)
AA	0.46 $\pm$ 0.19 (5.5)	0.28 $\pm$ 0.09 (10.5)	2.76 $\pm$ 0.44 (6.4)	13.86 $\pm$ 2.67 (7.2)
ALA	0.09 $\pm$ 0.03 (1.1)	0.01 $\pm$ 0.00 (0.5)	0.04 $\pm$ 0.01 (0.1)	0.60 $\pm$ 0.45 (0.3)
EPA	0.11 $\pm$ 0.03 (1.3)	0.06 $\pm$ 0.02 (2.0)	0.29 $\pm$ 0.06 (0.7)	1.40 $\pm$ 0.77 (0.7)
DHA	0.47 $\pm$ 0.20 (5.5)	0.15 $\pm$ 0.02 (5.4)	3.58 $\pm$ 0.68 (8.3)	21.76 $\pm$ 5.31 (11.3)
Palmitic acid	1.90 $\pm$ 0.71 (22.4)	0.59 $\pm$ 0.12 (21.7)	12.32 $\pm$ 2.93 (28.7)	45.66 $\pm$ 16.17 (23.7)
Palmitoleic acid	0.08 $\pm$ 0.04 (1.0)	0.04 $\pm$ 0.02 (1.4)	0.60 $\pm$ 0.10 (1.4)	1.83 $\pm$ 1.13 (0.9)
Stearic acid	0.76 $\pm$ 0.25 (9.0)	0.34 $\pm$ 0.05 (12.6)	15.85 $\pm$ 4.08 (36.9)	32.57 $\pm$ 2.78 (16.9)
Oleic acid	1.67 $\pm$ 0.59 (19.7)	0.31 $\pm$ 0.04 (11.3)	3.81 $\pm$ 0.67 (8.9)	27.92 $\pm$ 20.78 (14.5)
Total FAs	8.46 $\pm$ 2.83	2.71 $\pm$ 0.15	42.95 $\pm$ 8.90	192.80 $\pm$ 78.65

Nakashima et al., 2013<sup>15</sup>

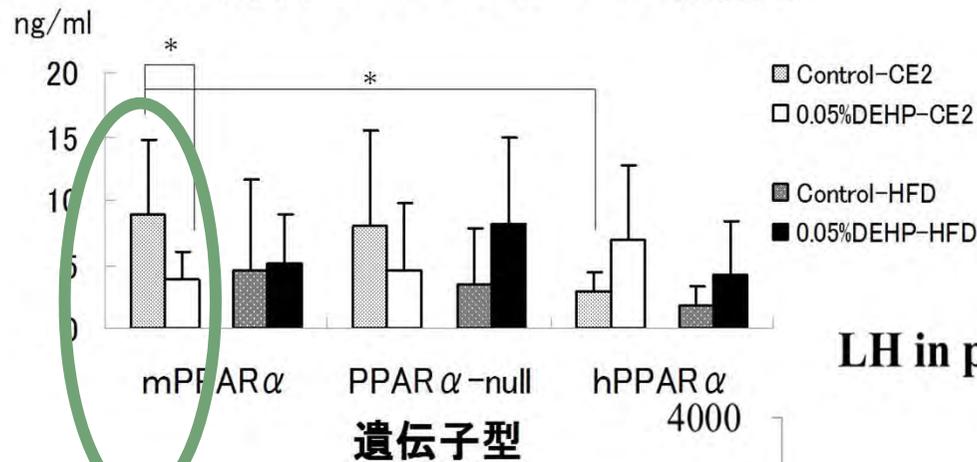
野生型コントロールマウス血漿あるいは肝臓脂肪酸構成割合

## 目的

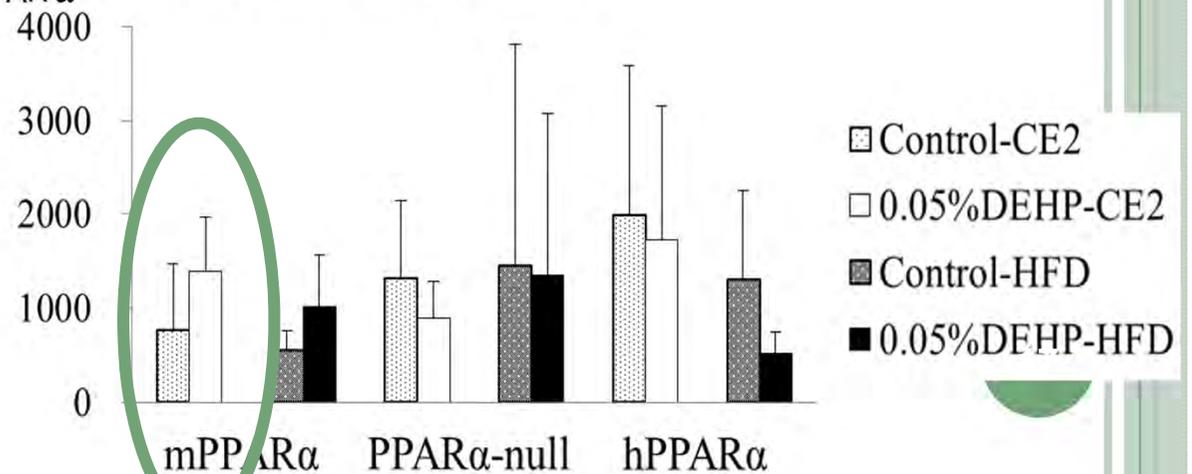
- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- **2) DEHP胎仔期曝露の次世代影響**
  - 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
  - **生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明**
  - PPAR $\alpha$ のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
  - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
  - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR $\alpha$ の役割
  - マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR $\alpha$ の役割および種間差

# 胎生期・授乳期DEHP曝露の 次世代影響(11週齢)

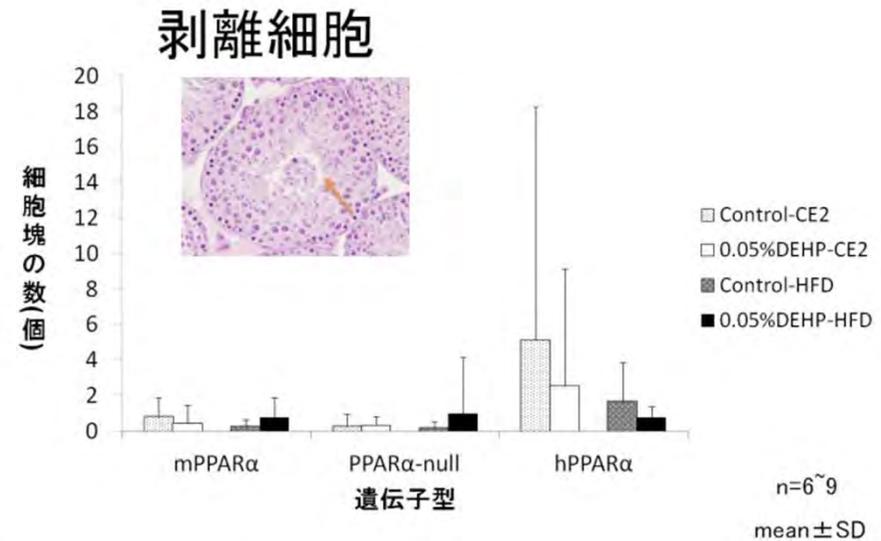
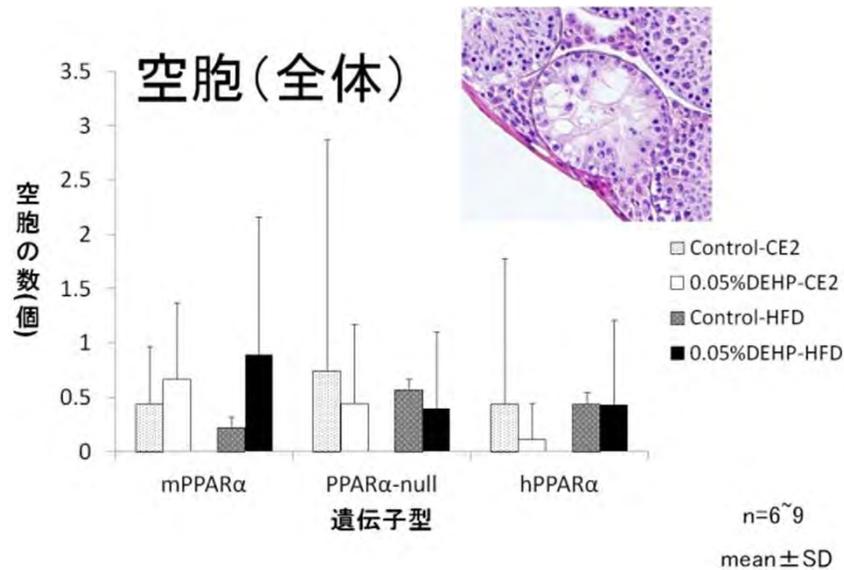
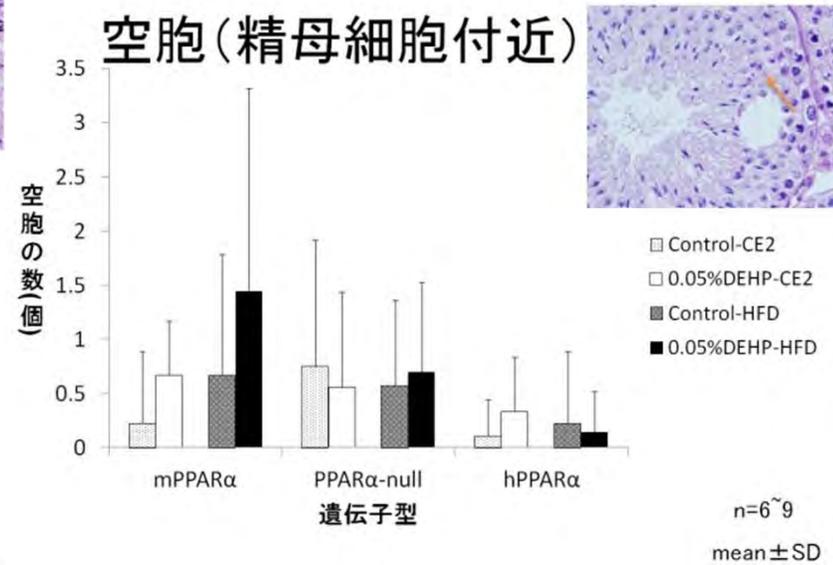
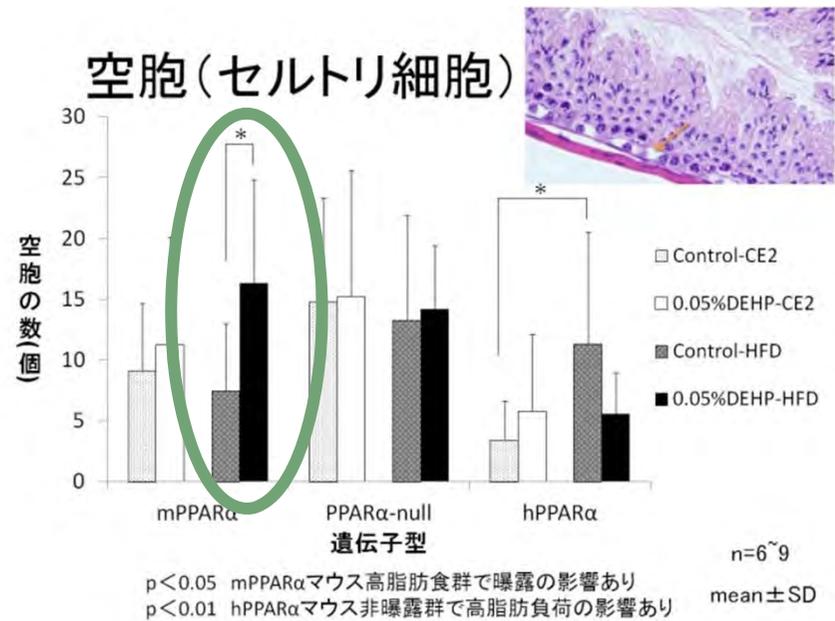
## 血漿テストステロン濃度



## LH in plasma (pg/ml)



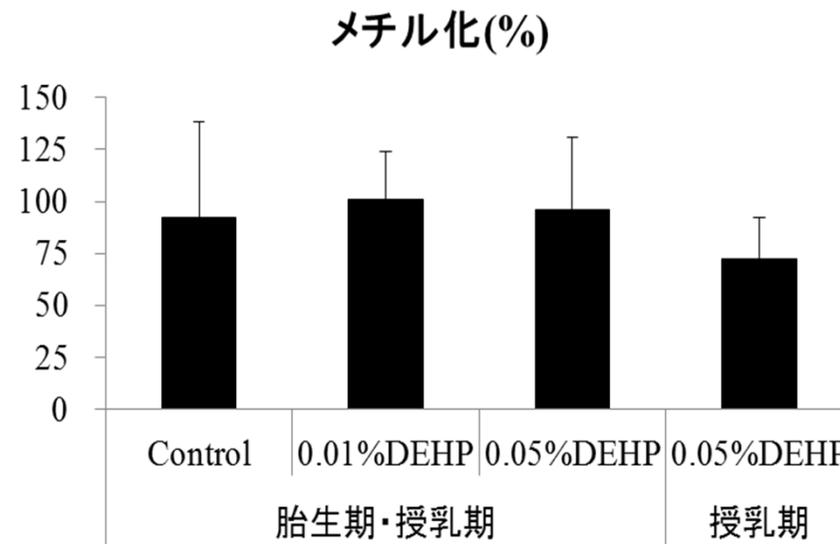
# 胎生期・授乳期DEHP曝露の次世代影響(11週齢)



## 目的

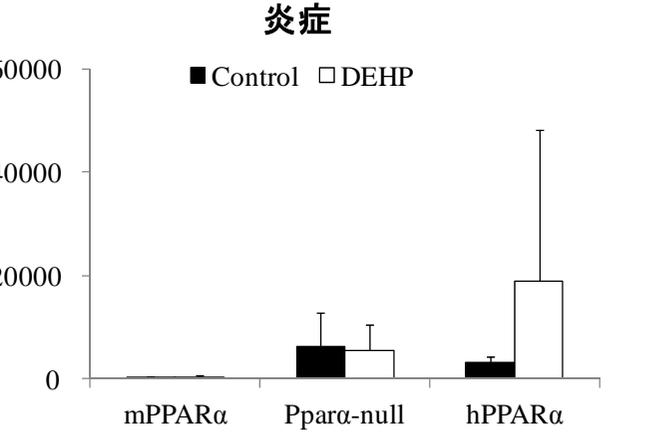
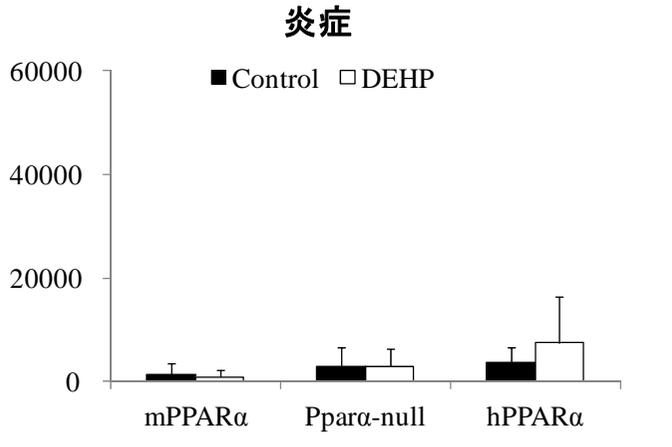
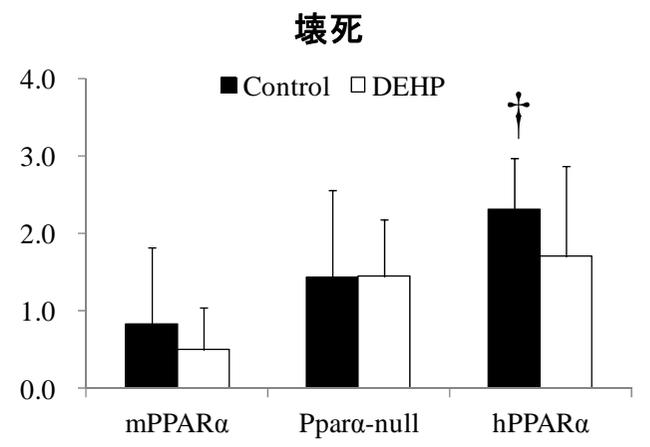
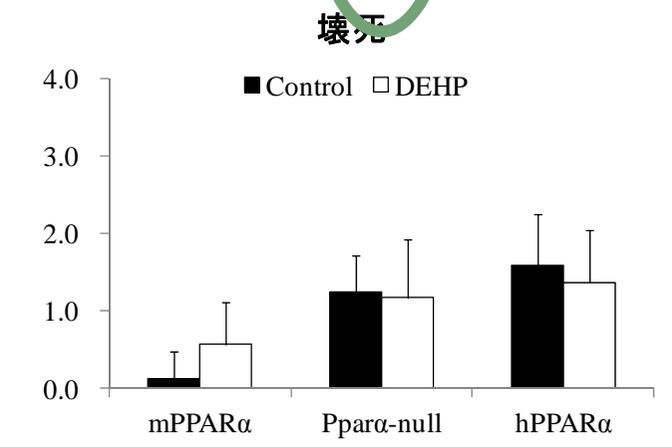
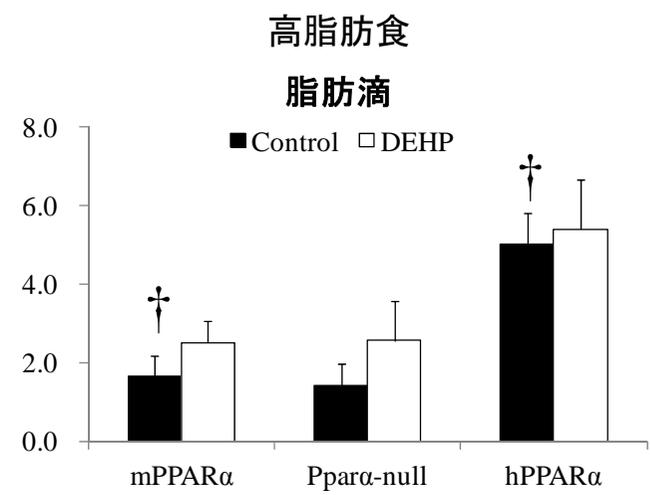
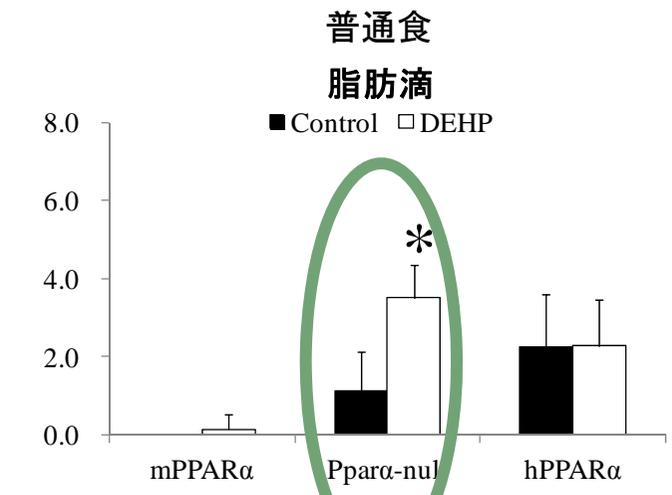
- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- 2) **DEHP胎仔期曝露の次世代影響**
  - 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
  - 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
  - **PPAR $\alpha$ のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響**
  - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
  - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR $\alpha$ の役割
  - マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR $\alpha$ の役割および種間差

## DEHPの胎生期曝露はPPAR $\alpha$ のメチル化割合には影響を与えなかった

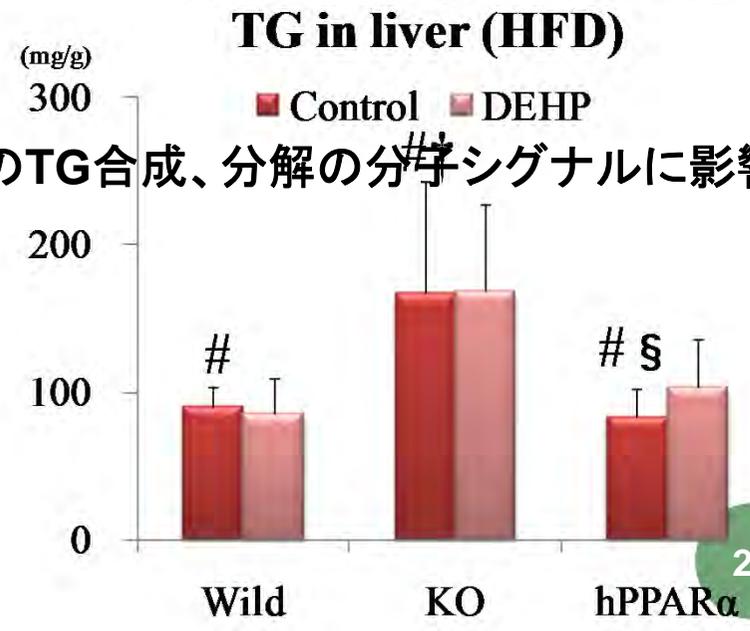
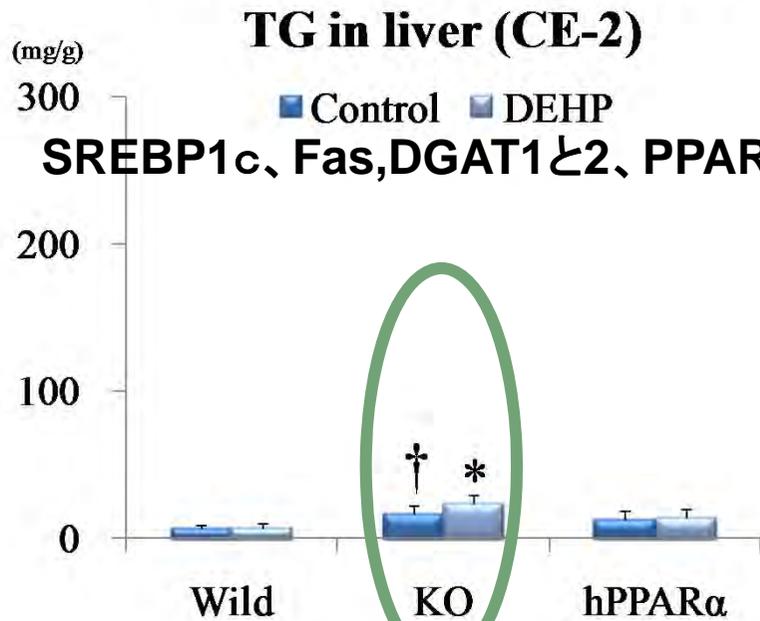
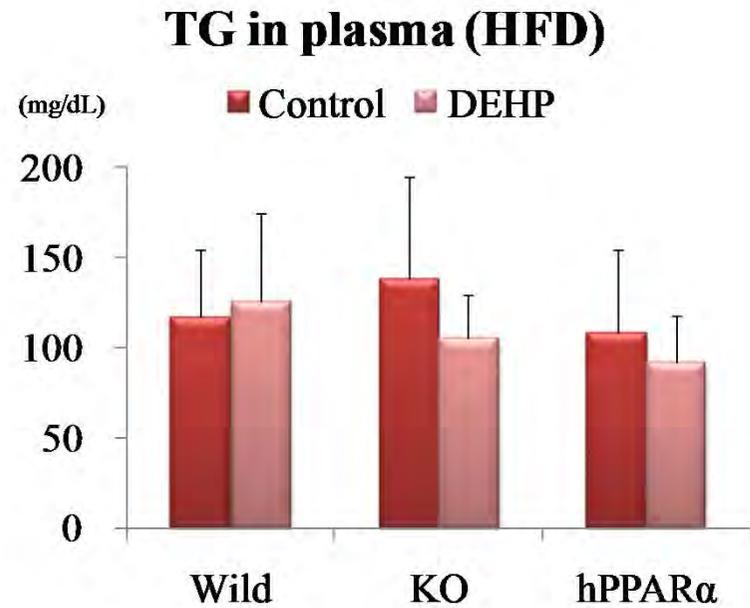
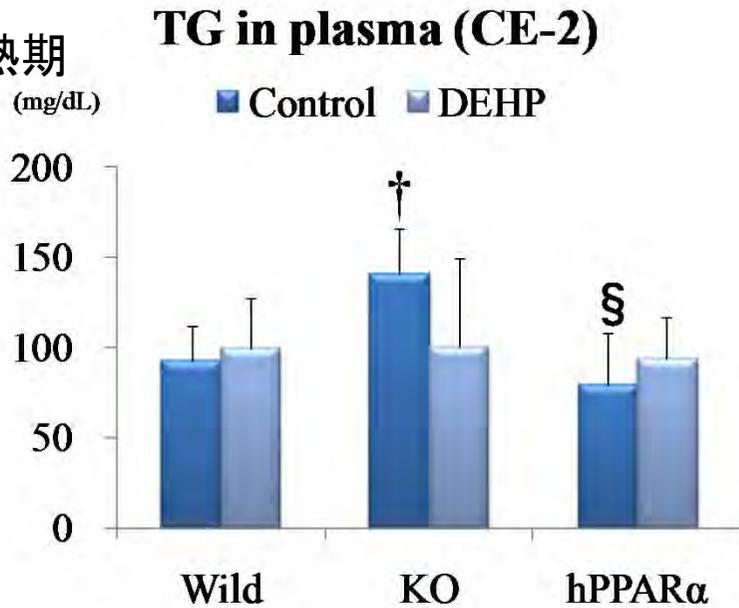


20

肝臓の脂質濃度(TG)に影響を与えたが、TCには影響を与えなかった  
(PPAR $\alpha$ ノックアウトマウス)



成熟期



SREBP1c、Fas、DGAT1と2、PPAR $\alpha$ 等のTG合成、分解の分子シグナルに影響なし

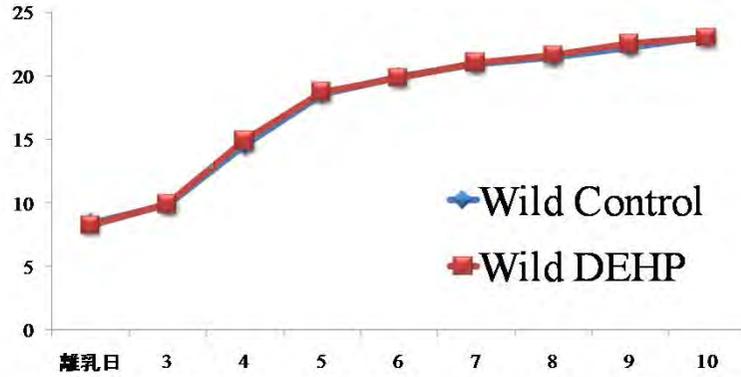
\*significantly different from respective control group. (p<0.05) †Significantly different from control group in wild-type mice. (p<0.05)  
#Significantly different from respective CE-2 control group. (p<0.05) § Significantly different from control group in KO mice(p<0.05)

## 目的

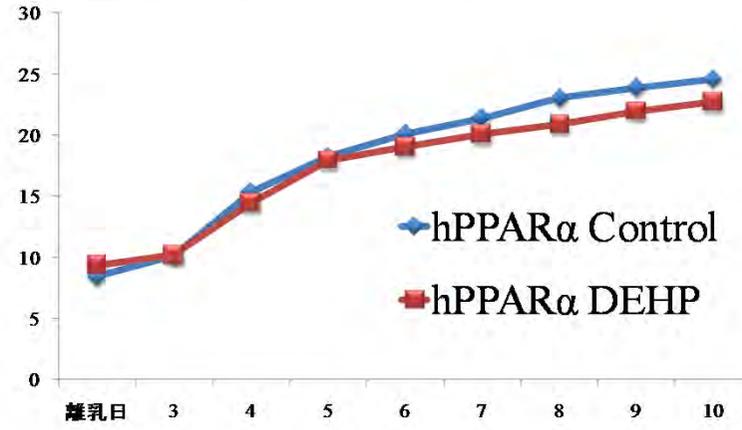
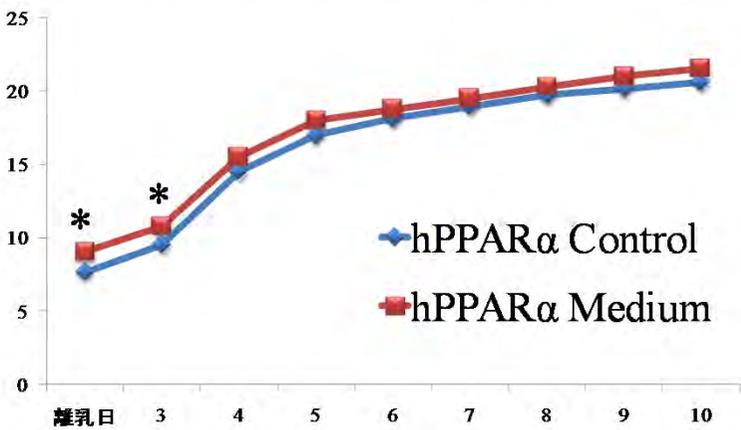
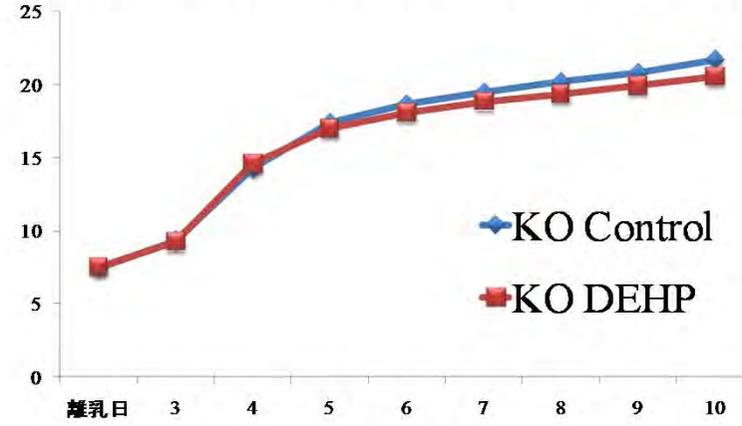
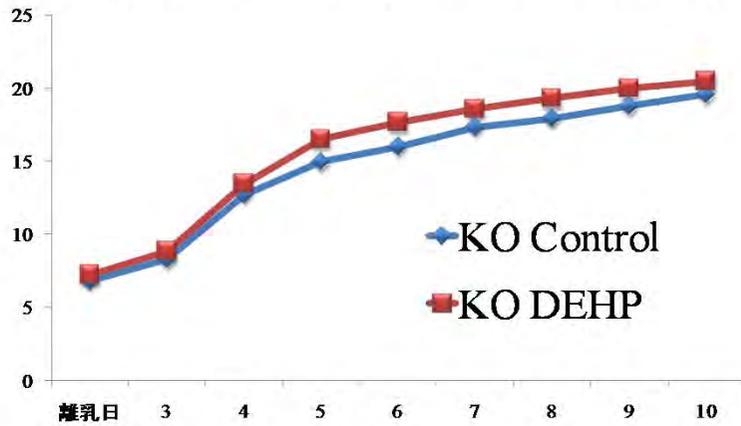
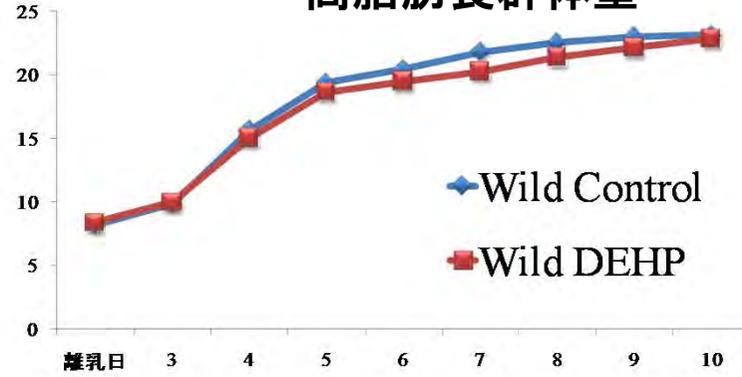
- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- 2) DEHP胎仔期曝露の次世代影響
  - 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
  - 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
  - PPAR $\alpha$ のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
  - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
  - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR $\alpha$ の役割
  - マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR $\alpha$ の役割および種間差

# 離乳後の体重・摂餌量への影響

### 普通食群体重



### 高脂肪食群体重



## 考察

- DEHP曝露により離乳期に血漿中レプチン濃度の減少は、離乳期から成熟期にかけての摂餌量増加に関与しているのかもしれない。
- 成熟期・授乳期DEHPはレプチン濃度を上昇させたが、授乳期の曝露した場合レプチンの減少は認められなかったことから、**胎生期曝露**の重要性が明らかとなった (DEHPの曝露は胎生期>授乳期 Hayashi et al, Arch Toxicol 2011)。
- 胎生期DEHP曝露による影響は**PPAR $\alpha$ 遺伝子を持つ**マウスのみでみられたことから、PPAR $\alpha$ が重要な役割を担っているのかもしれない。

## 目的

- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- 2) DEHP胎仔期曝露の次世代影響
  - 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
  - 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
  - PPAR $\alpha$ のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
  - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
  - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR $\alpha$ の役割
  - マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR $\alpha$ の役割および種間差

## 胎生期DEHP曝露の学習・行動への影響

- GABAレセプターやグルタミン酸レセプターを測定し、学習・行動への影響を検討した。
- 胎生期DEHP曝露のこれらの遺伝子発現系にはほとんど影響を与えなかった
- 一方、高脂肪食の影響は多くの遺伝子発現に観察され、成長期の栄養状態(特に高脂肪食摂取)の重要性が提示された。別の研究費で詳細に検討する必要がある。

## 目的

➤1) DEHP曝露の親世代への影響

➤2) DEHP胎仔期曝露の次世代影響

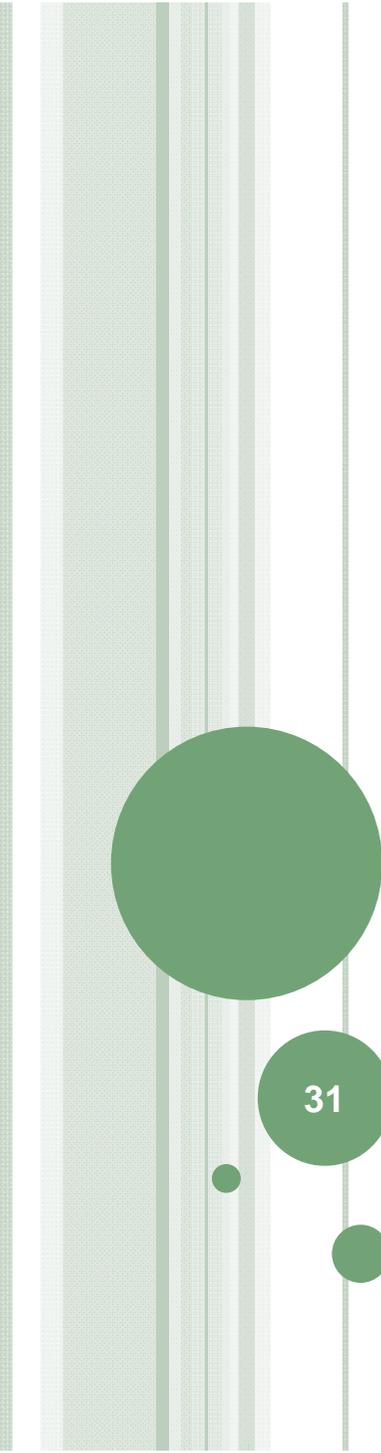
- 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
- 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
- PPAR $\alpha$ のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
- 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
- 脳への影響: 学習・行動(海馬)

➤3) DEHP代謝の種間差とPPAR $\alpha$ の役割

- マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR $\alpha$ の役割および種間差

## 方法と結果

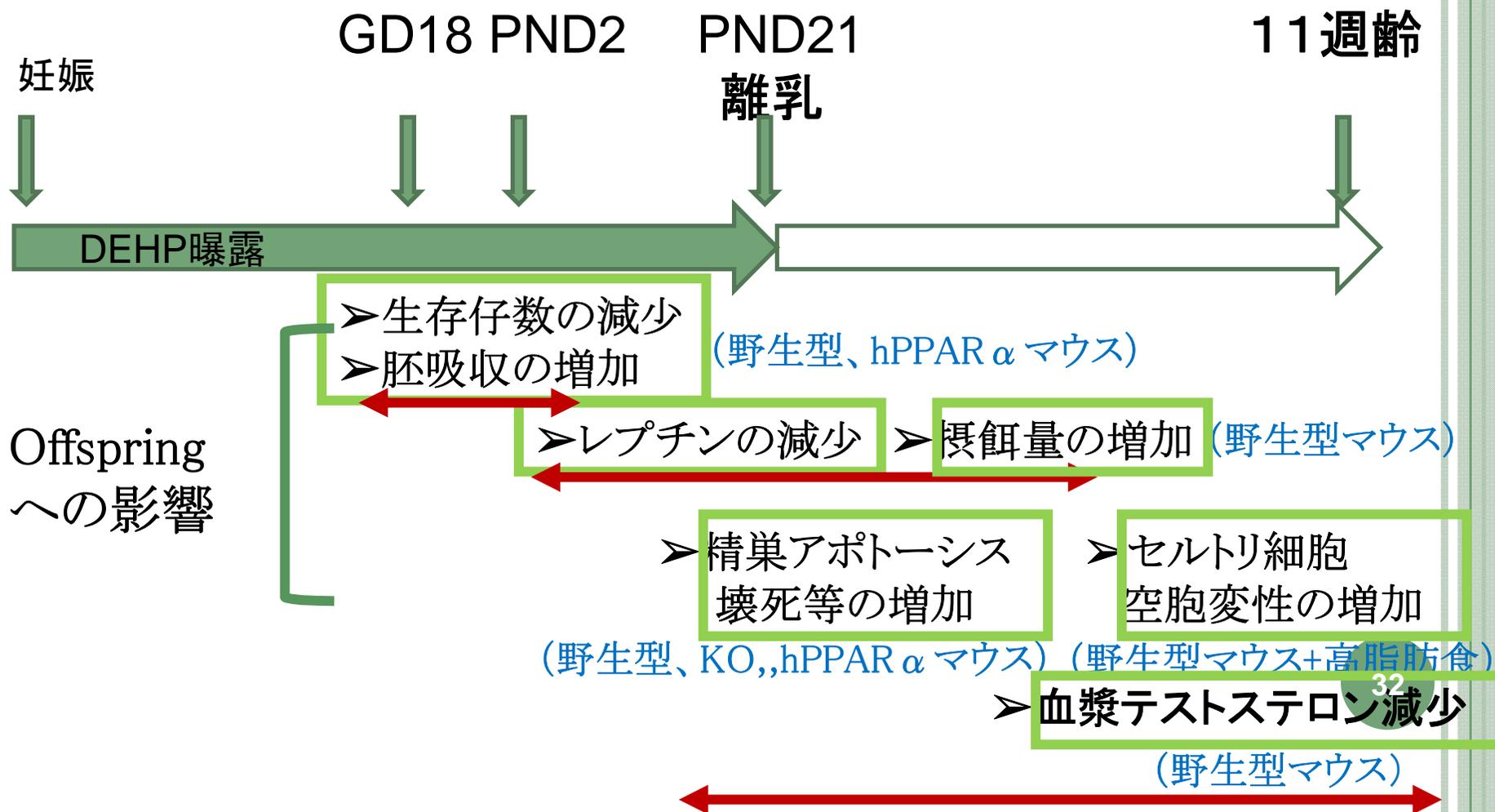
- ヒトの肝臓は倫理審査委員会承認後、NPO法人 HAB研究機構より入手した。内訳は、白人男性24人(10代:1、20代:1、30代:5、40代:5、50代:5、60代:4、70代:2、80代:1)、白人女性5人(40代:5)、アジア系:1人、黒人:3人、ヒスパニック:5人である。
- リパーゼ活性、UGT活性、ADH、ALDH活性、マウスの尿中代謝物を測定



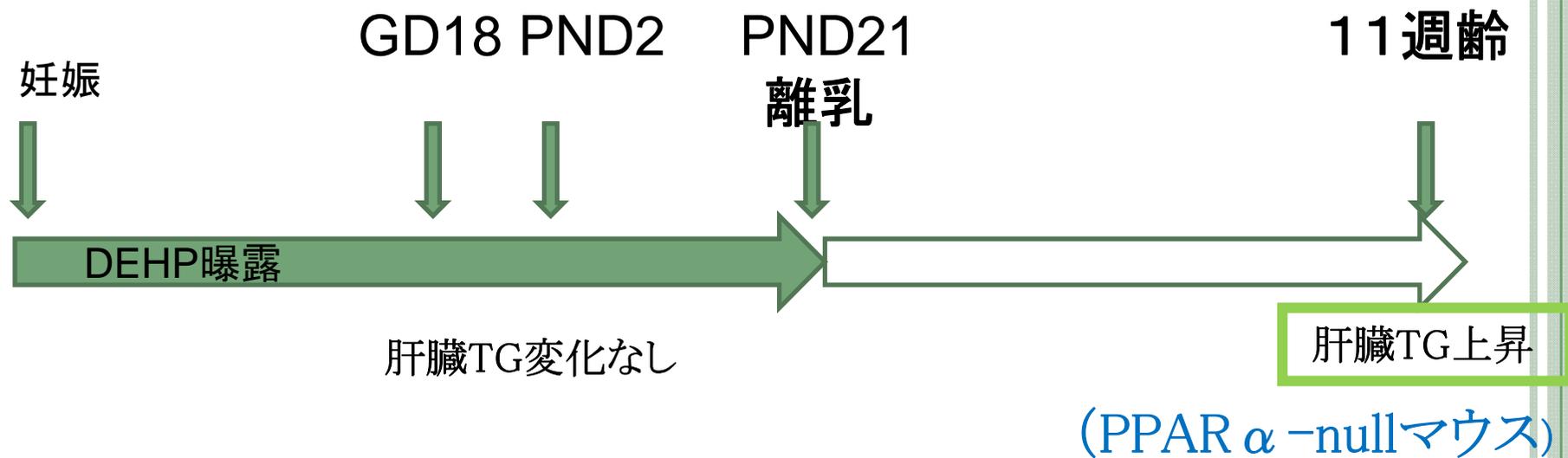
# 3年間の研究総括

31

# DEHP胎生期・授乳期曝露の次世代影響とPPAR $\alpha$ 遺伝子



# DEHP胎生期・授乳期曝露の 次世代影響(11週齢肝臓脂質)とPPAR $\alpha$ 遺伝子



## DEHP胎生期・授乳期曝露とDOHaD

- PPAR $\alpha$ -nullマウスの肝臓脂質 (TG)の上昇
- 病的にはPPAR $\alpha$ -nullマウスの肝臓脂肪滴の増加
- 離乳後の高脂肪食負荷すると影響は消える
- 上記所見は野生型マウスではみられない
- PPAR $\alpha$ -nullマウスは $\beta$ 酸化酵素の活性が極めて低いので、これが影響しているか検討が必要

## DEHP代謝の種差と個体差

- **DEHP**代謝の種間差と**PPAR $\alpha$** の役割
- リパーゼ(5.1倍)、UGT(5倍)、ALDH(1.5倍) : マウス > ヒト  
ADH(2倍) : マウス < ヒト
- **DEHP**の尿中代謝物はマウス > ヒト、しかし、代謝物によってはヒト > マウス (特に5cx-MEPPと5OH-MEHP)
- PPAR $\alpha$ は5cx-MEPPの経路に関与
- いずれの酵素活性も個人差が10から28倍
- 種差と個体差の不確実係数はすくなくとも、それぞれ10

# 今後の課題

- 野生型のみを観察された影響が多く、PPAR $\alpha$ に關与しているかもしれないが、詳細なメカニズム解析は今後の課題
- 仔マウス(次世代)への影響は研究費の關係で1doseしか検討していない。量-反応關係も検討する必要がある。
- DEHPの胎生期曝露の生存仔マウスの減少は、DEHPの直接影響か、親マウスの脂質代謝への影響の間接影響か？
- ヒトでの疫学研究が必要

# 平成25年度食品健康影響評価技術研究成果発表会

I 化学物質関連分野(胎児期・発達期の暴露に関する研究)

研究開発  
課題名:

胎盤移行性における種差を反映した  
ヒト胎児毒性リスク評価手法の開発

研究代表者:

登美 斉俊 (慶應義塾大学薬学部・准教授)

薬剤学講座

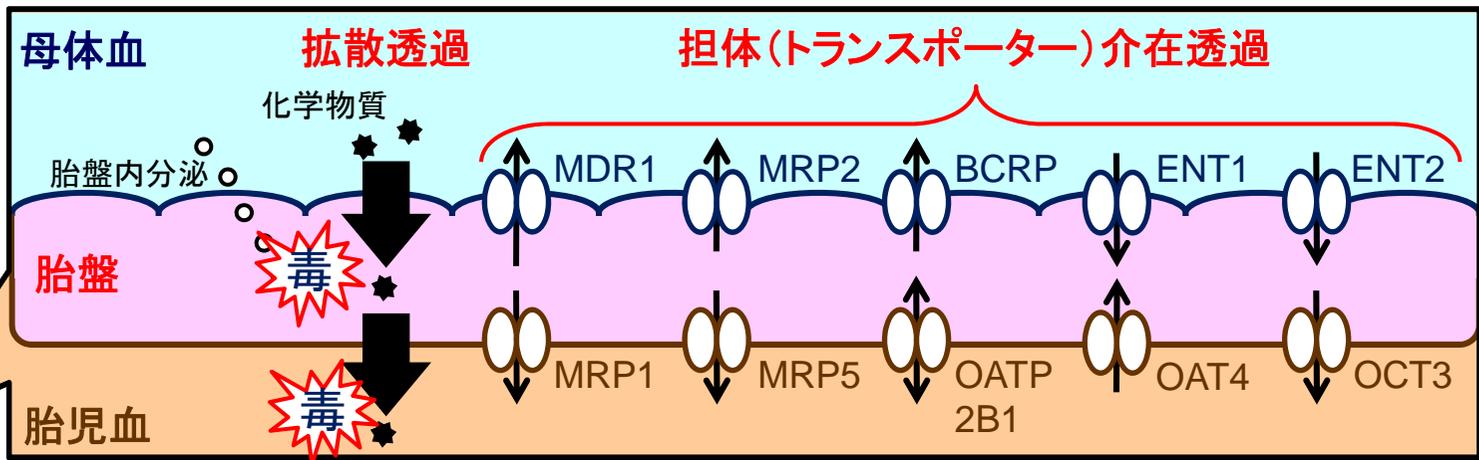
組織関門を介した物質透過メカニズムの研究

胎児期・発達期栄養環境が生活習慣病発症に及ぼす影響の研究

研究分担者:

丸山 哲夫 (慶應義塾大学医学部・専任講師) 産婦人科学教室生殖内分泌研究室  
産科  
不育症、子宮由来疾患の病因解明

# ヒト胎児毒性リスク評価の現状・課題



胎児・胎盤移行性の種差

化学物質の胎児・胎盤移行性はヒト・ラット共に、胎盤関門を介した  
 ①脂溶性に従った拡散透過  
 ②トランスポーターを介した選択的透過によって規定

標的細胞での感受性種差

但し、輸送速度、トランスポーター発現量には動物種差が存在

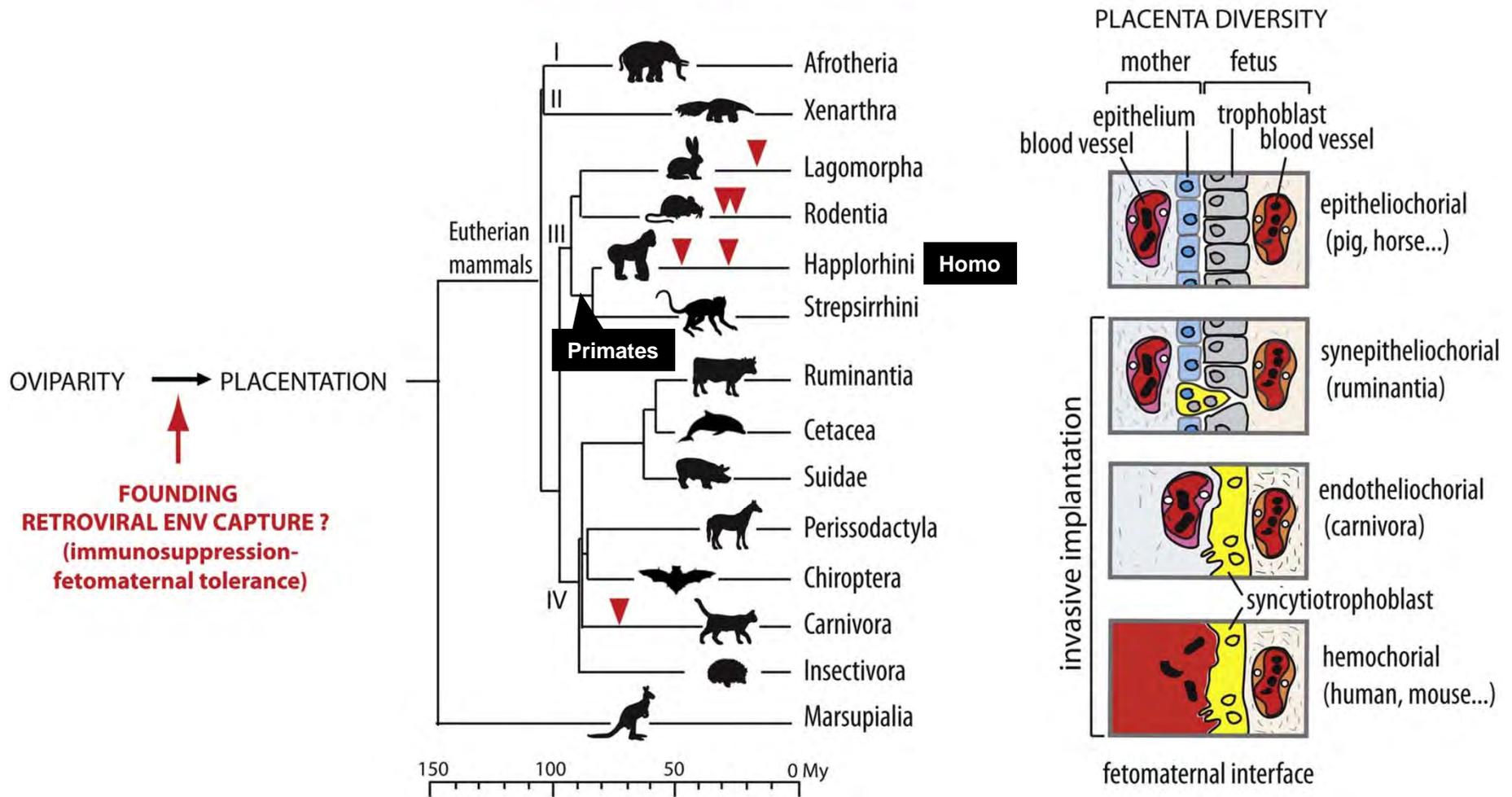
胎盤関門細胞膜透過機構に関わる定量的情報の欠如により、動物データからのヒト胎児・胎盤移行性予測が現状では不可能



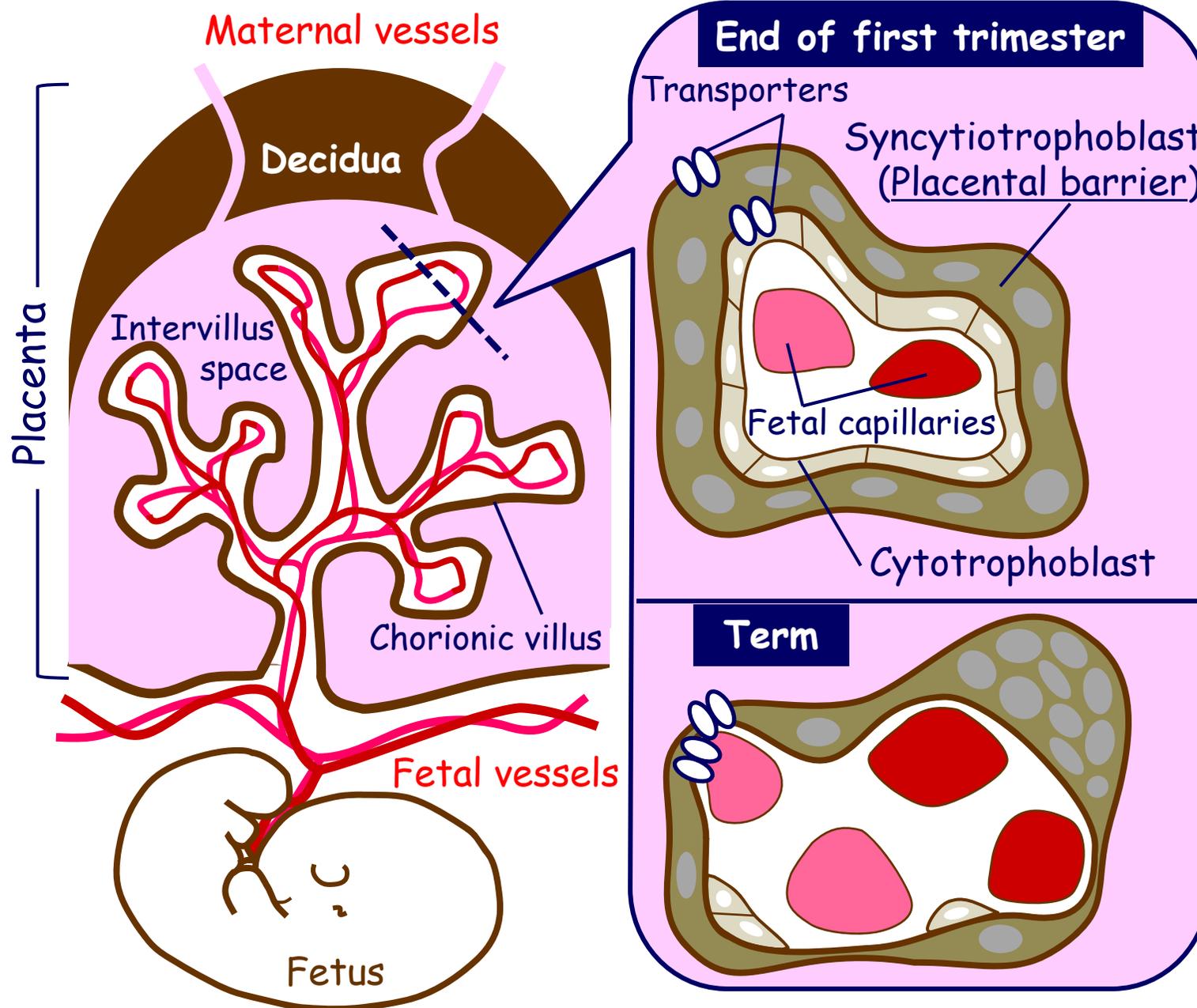
①胎盤拡散透過速度  
 ②胎盤トランスポータータンパク発現量  
 ③胎盤トランスポーター輸送能力

の定量的情報基盤を各々構築することで、ラット胎児・胎盤移行性からヒト移行性を高精度に外挿させた、動物種差を反映したヒト胎児毒性リスクの評価手法が開発できる。

**MULTIPLE SYNCYTIN CAPTURES  
(variable extent of syncytialization)**



**Fig.** Multiple captures of syncytin genes across evolution and diversity of placental structures in mammals. The phylogenetic tree of mammalian evolution shows the time of insertion of the six syncytin genes identified to date (middle). Roman figures indicate the four major eutherian clades: Afrotheria (I), Xenarthra (II), Euarchontoglires (III) and Laurasiatheria (IV). At this time, syncytins have been identified in the Euarchontoglires (primates, muroids and leporids) and Laurasiatheria (carnivores) classes. Capture of varied syncytins with differing properties and expression sites could explain the observed diversity of placenta organization among mammalian species. The right panel shows a schematic representation of the materno-fetal interface in the four main types of placental structures. Placental types are classified in order of increasing invasive properties and extent of syncytialization.



## Structure of the human placental barrier

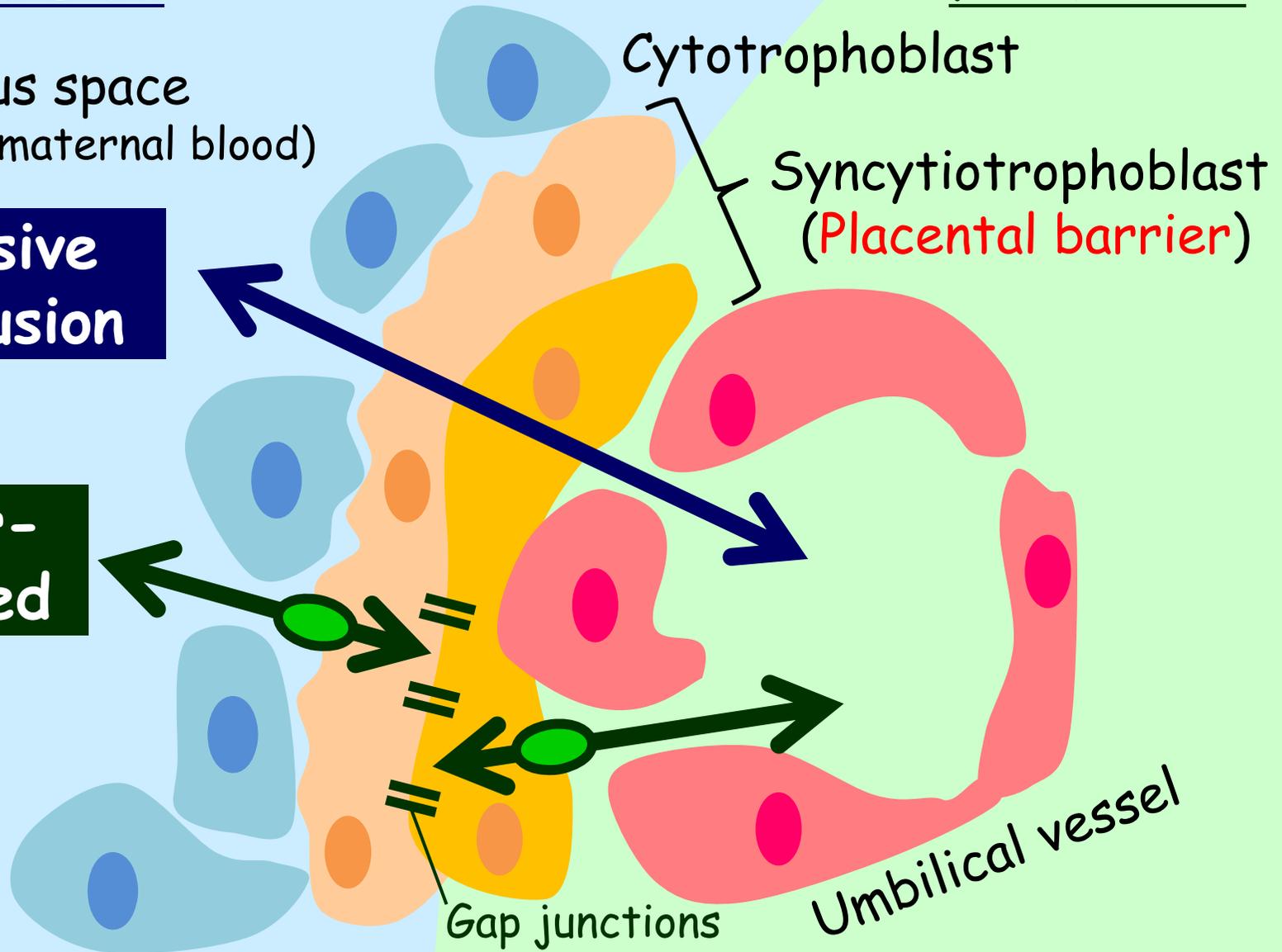
Maternal side

Fetal Side

Intervillous space  
(Filled with maternal blood)

Passive  
diffusion

Carrier-  
mediated



Fetal drug transfer mechanisms across the rodent placental barrier

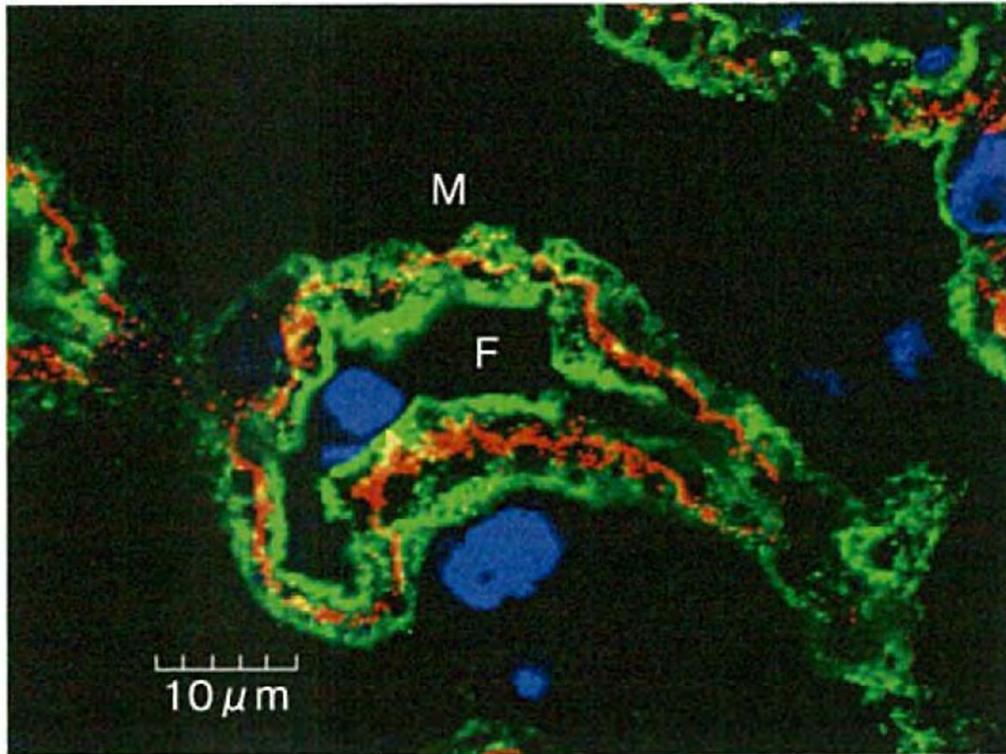


図1 ラットシンシチオトロフォブラスト(ST)層における GLUT1 (緑)およびコネキシン26(赤)の局在

M : 母体血側, F : 胎児血側。

登美, 産婦人科の実際 62(8), 1041-1046 (2013).

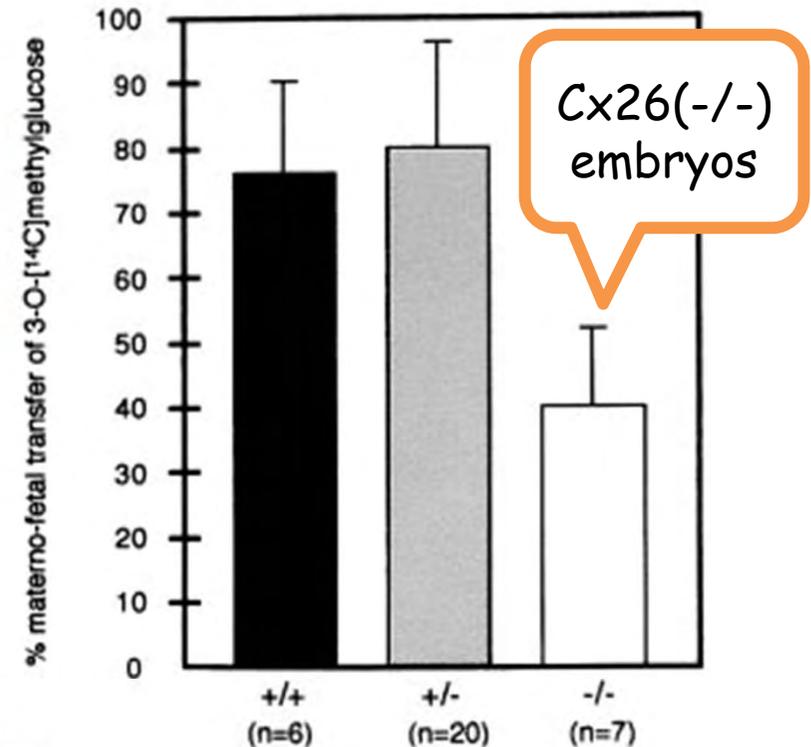


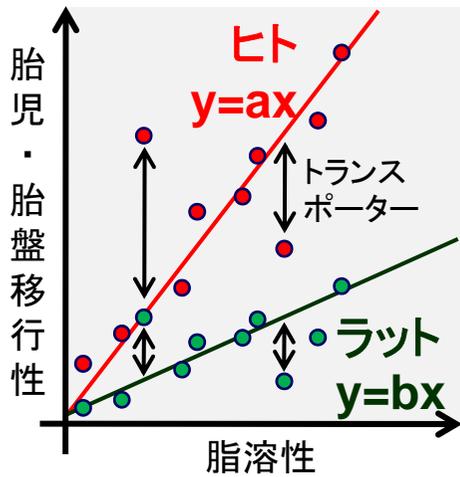
Fig. Uptake of 3-O-[<sup>14</sup>C]methyl-D-glucose into whole embryos at day 10 pc from maternal blood across the placenta

Decreased accumulation of radioactivity was measured in homozygous Cx26-defective embryos compared with heterozygous and wild-type embryos.

Gabriel et al., *J Cell Biol* 140:1453-1461 (1998).

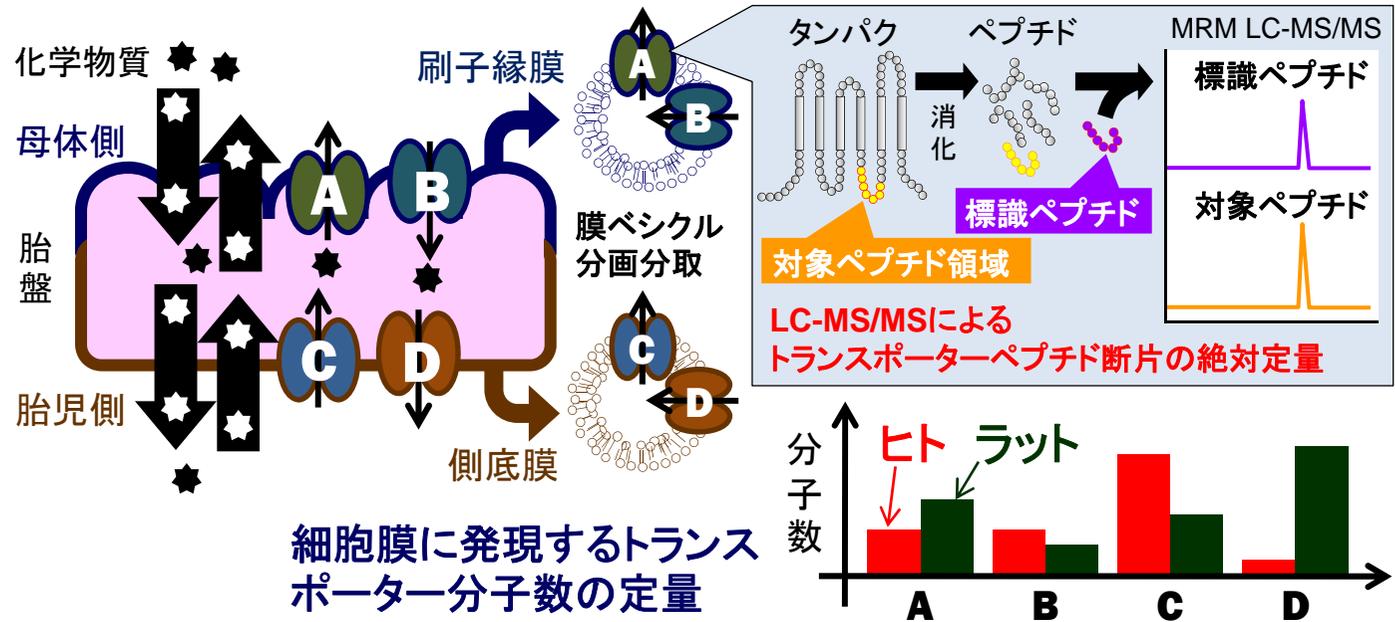
## Glucose transfer mechanisms across the rodent placenta

### 1. 「拡散透過」における種差の解明



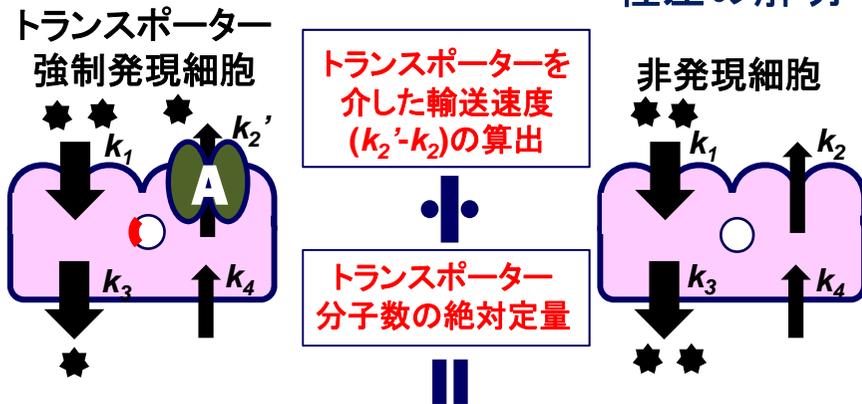
ヒト/ラット拡散移行比の算出

### 2. 「胎盤トランスポーター発現量」における種差の解明



細胞膜に発現するトランスポーター分子数の定量

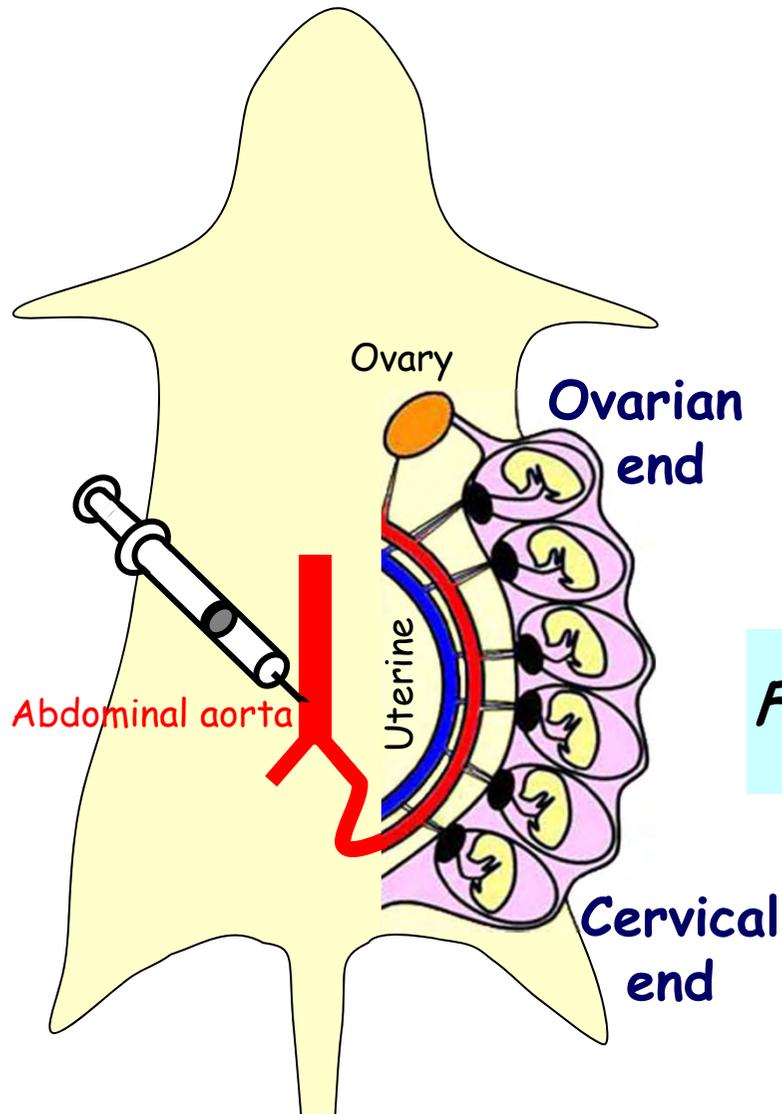
### 3. 「胎盤トランスポーター機能」における種差の解明



トランスポーター1分子あたりの輸送活性を算出

「胎盤移行性における種差を反映したヒト胎児毒性リスク評価手法の開発」研究の全体構想

## 1) 胎盤拡散透過における種差の解明



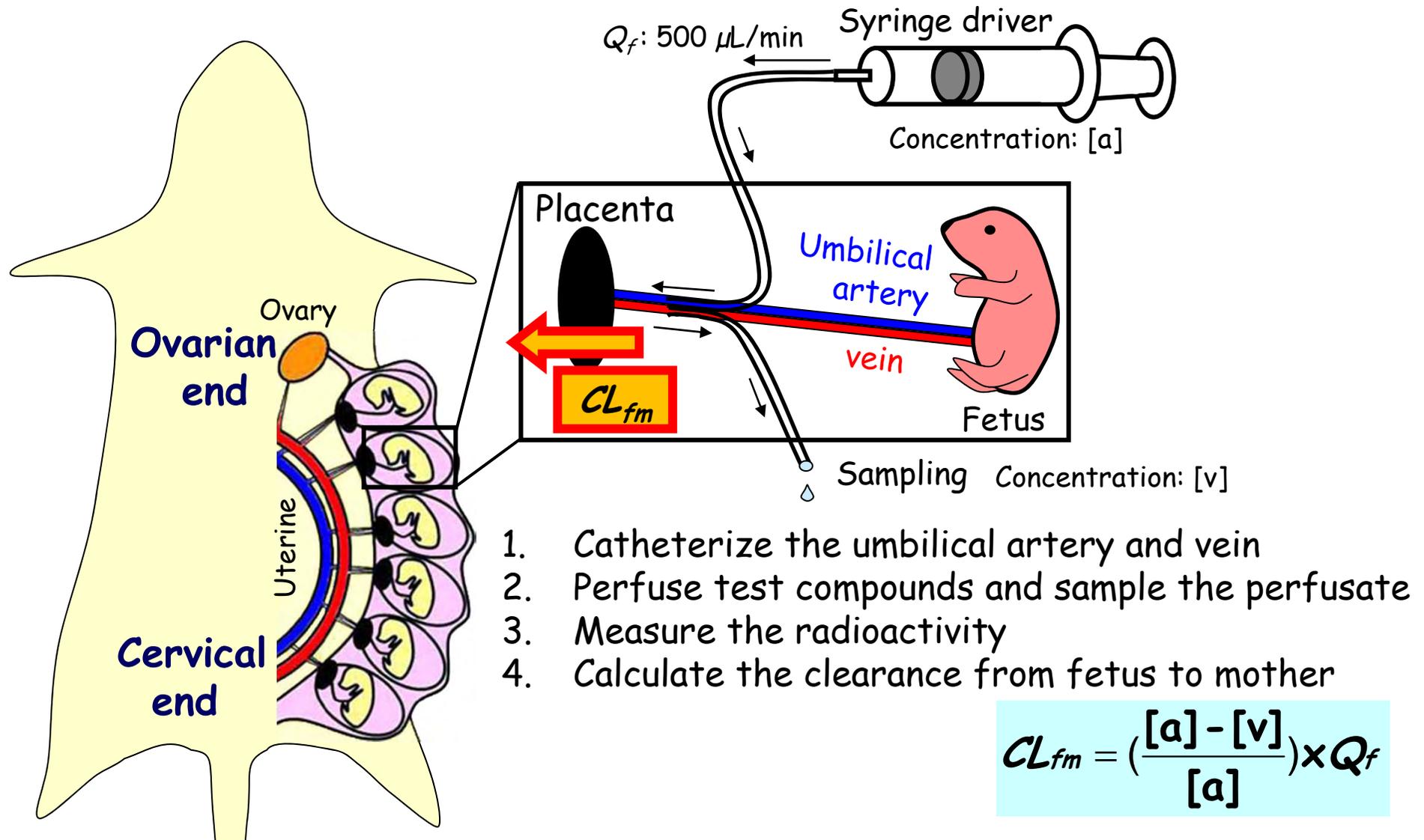
1. Inject the bolus containing the compound of interest and antipyrine (reference compound) into the abdominal aorta of the pregnant rat (GD19) under anesthesia
2. Isolate the fetus at cervical end 10 seconds after the injection
3. Measure the radioactivity
4. Calculate the uptake ratio to antipyrine (reference compounds)

$$FUI = \frac{[\text{test}]/[\text{antipyrine}](\text{dpm, fetus})}{[\text{test}]/[\text{antipyrine}](\text{dpm, injectate})}$$

*FUI* ; fetal uptake index

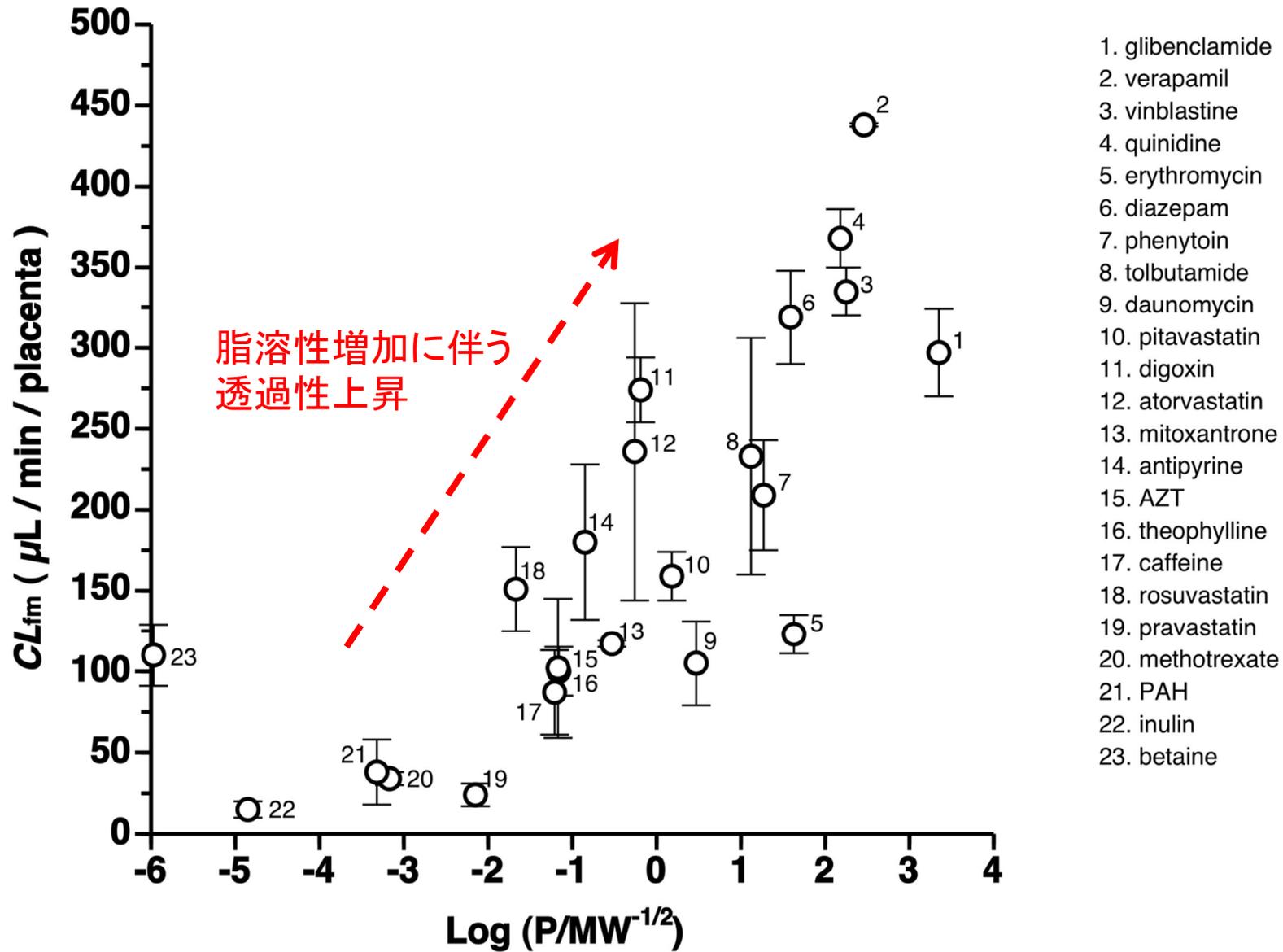
Experimental method for evaluation of the maternofetal transfer across the rat placenta

# 1) 胎盤拡散透過における種差の解明



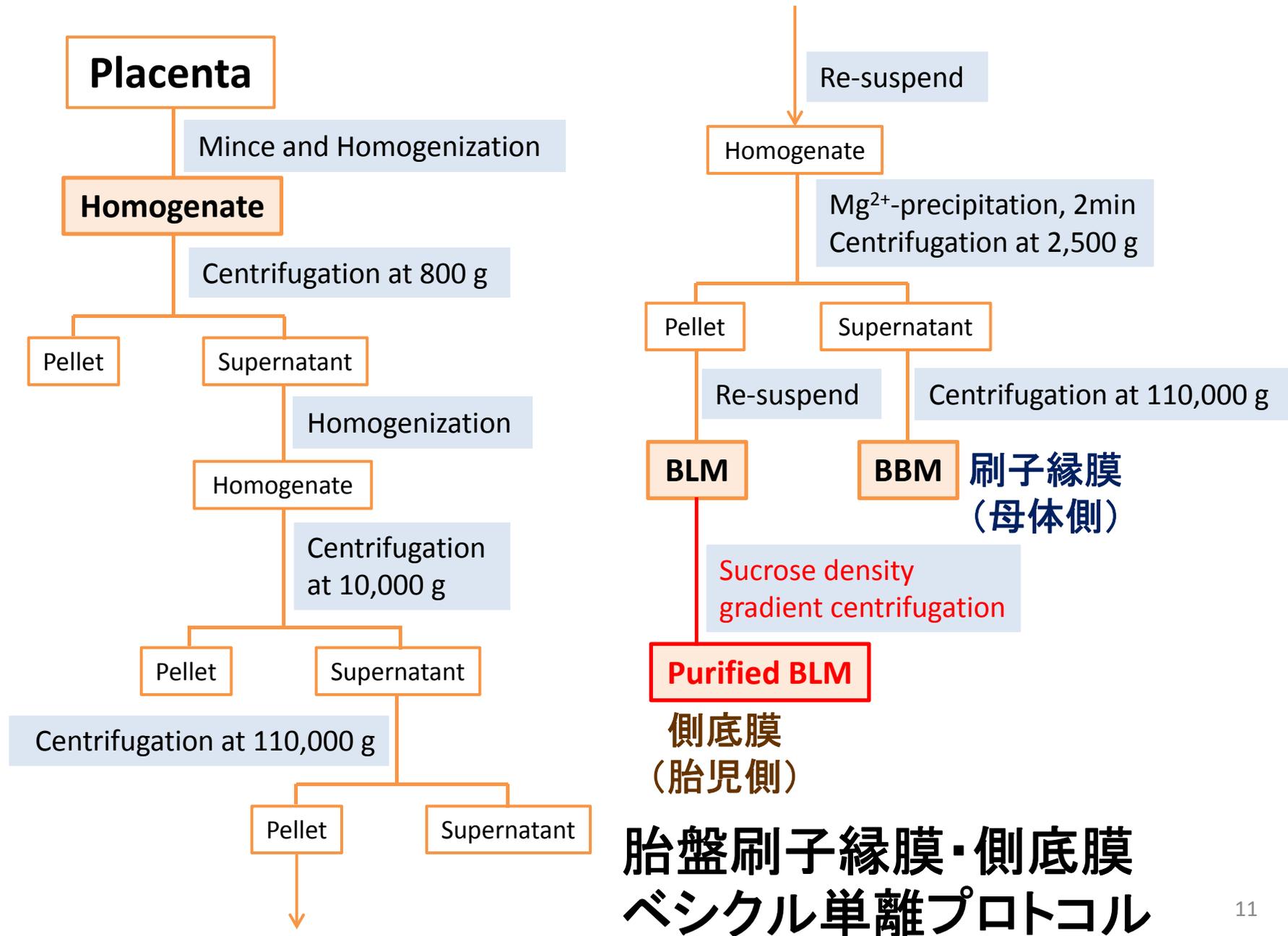
Experimental method for evaluation of the fetomaternal transfer across the rat placenta

# 1) 胎盤拡散透過における種差の解明



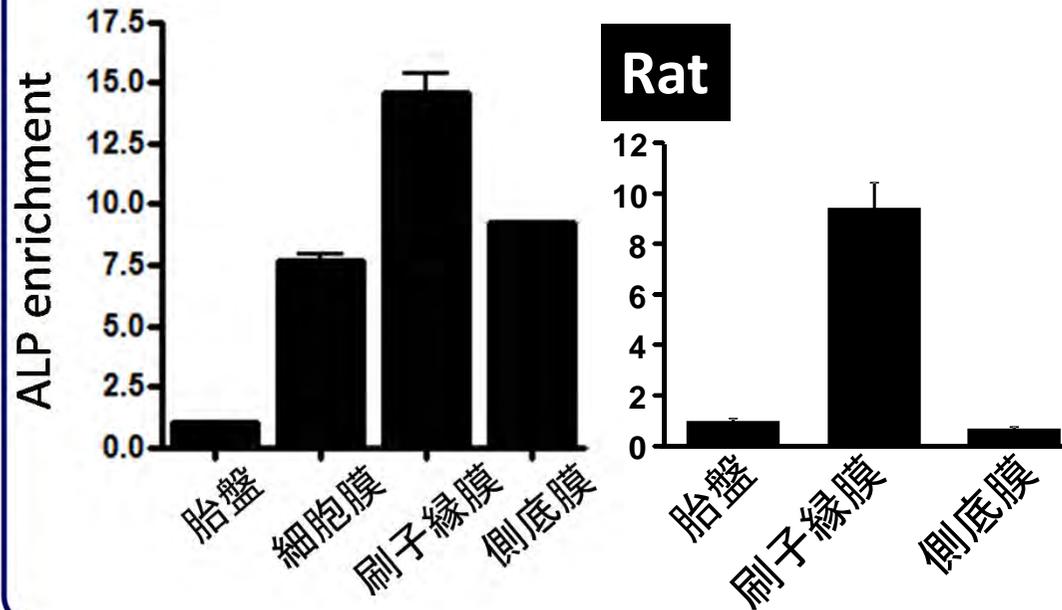
脂溶性・分子量と胎児から母体への胎盤透過性との相関性

## 2) 胎盤トランスポーター発現量における種差の解明

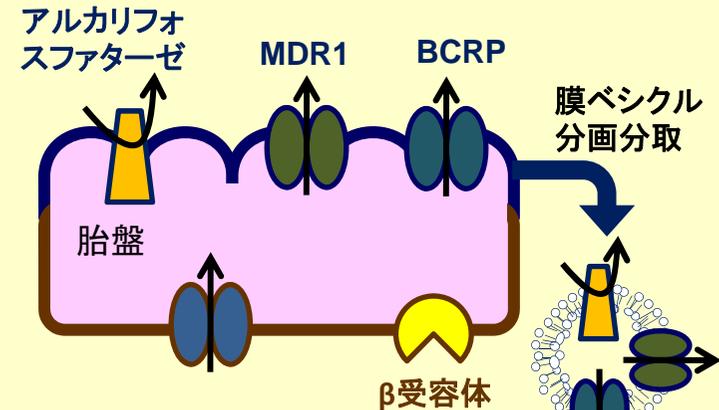


## 2) 胎盤トランスポーター発現量における種差の解明

### Human アルカリフォスファターゼ活性



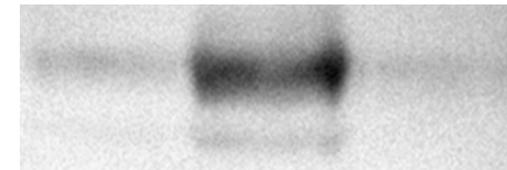
### Brush-Border membrane (BBM; Maternal side)



### Basolateral membrane (BLM; Fetal side)

Rat

### Mdr1/Abcb1



### Bcrp/Abcg2



胎盤  
刷子縁膜  
側底膜

Human

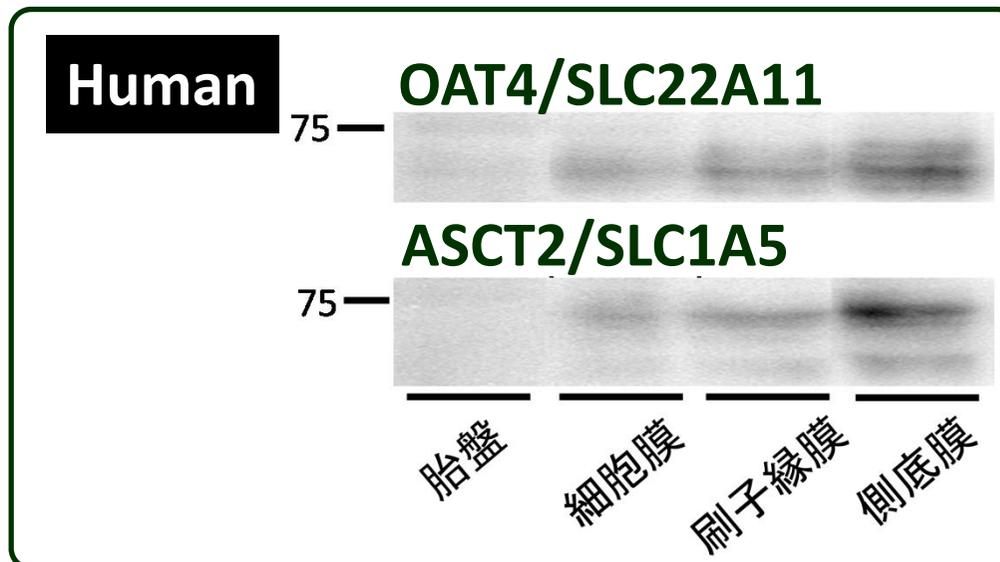
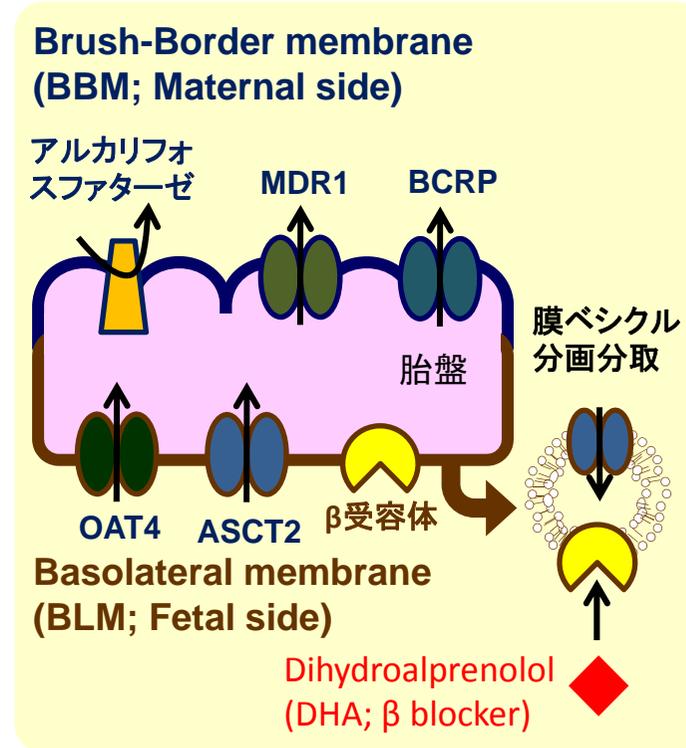
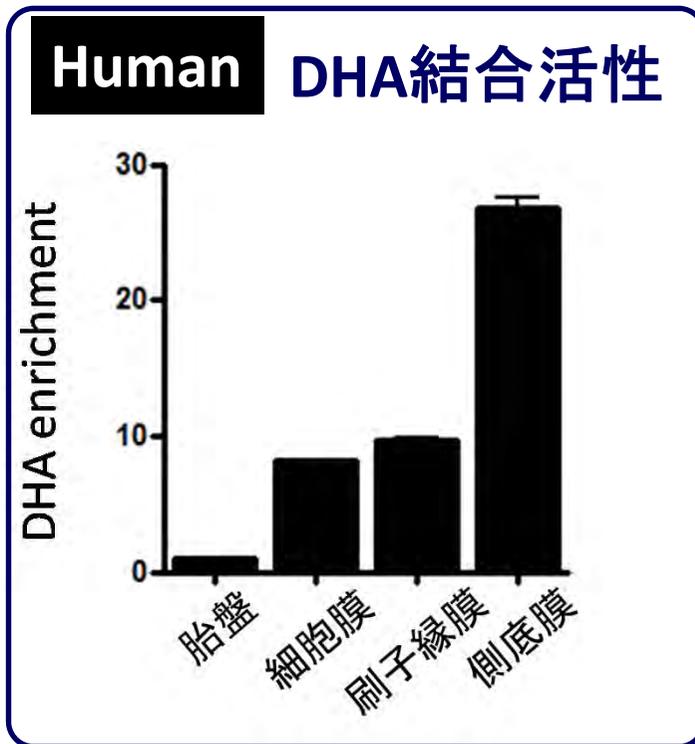
### MDR1/ABCB1



胎盤  
細胞膜  
刷子縁膜  
側底膜

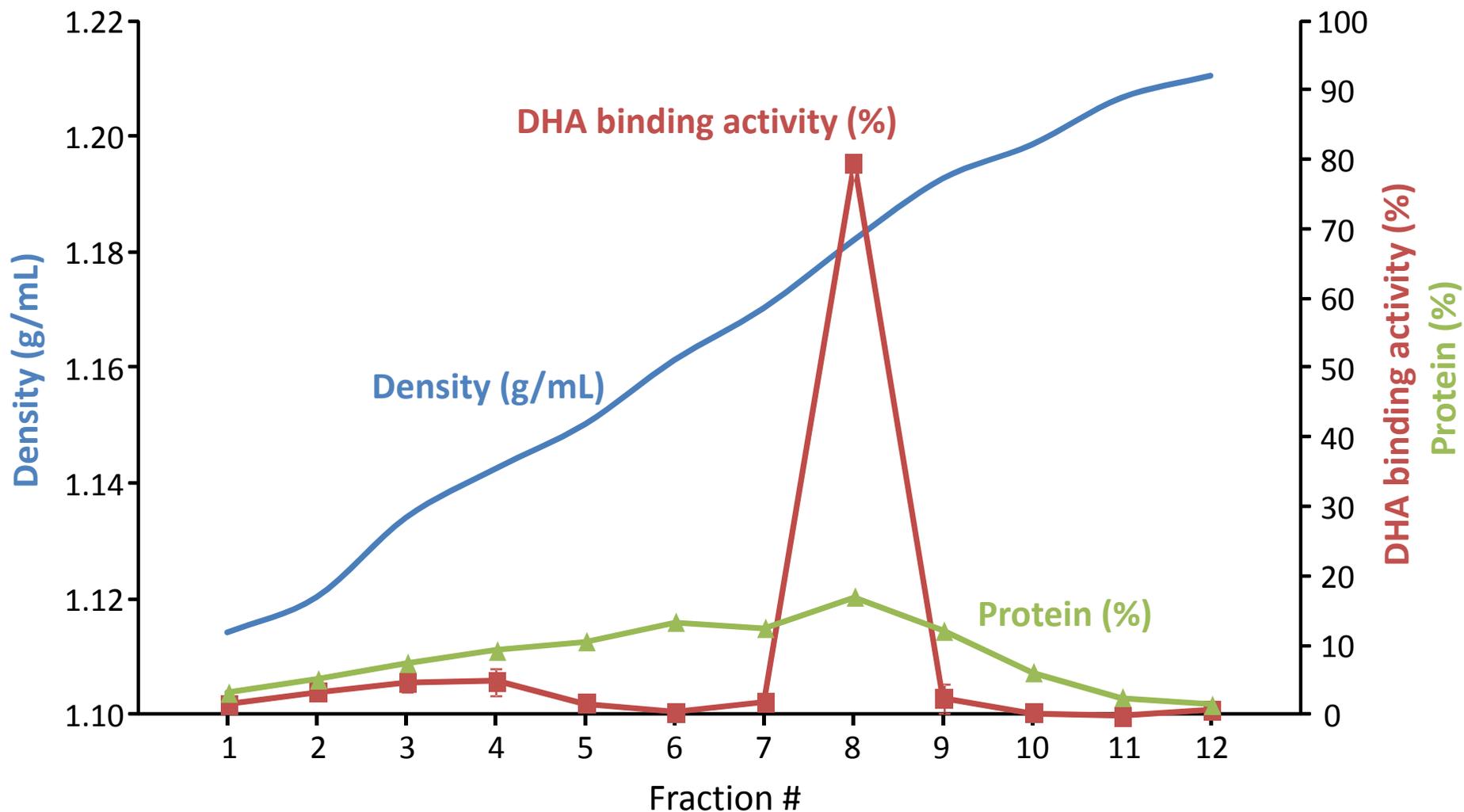
## 胎盤刷子縁膜ベシクルの評価

## 2) 胎盤トランスポーター発現量における種差の解明



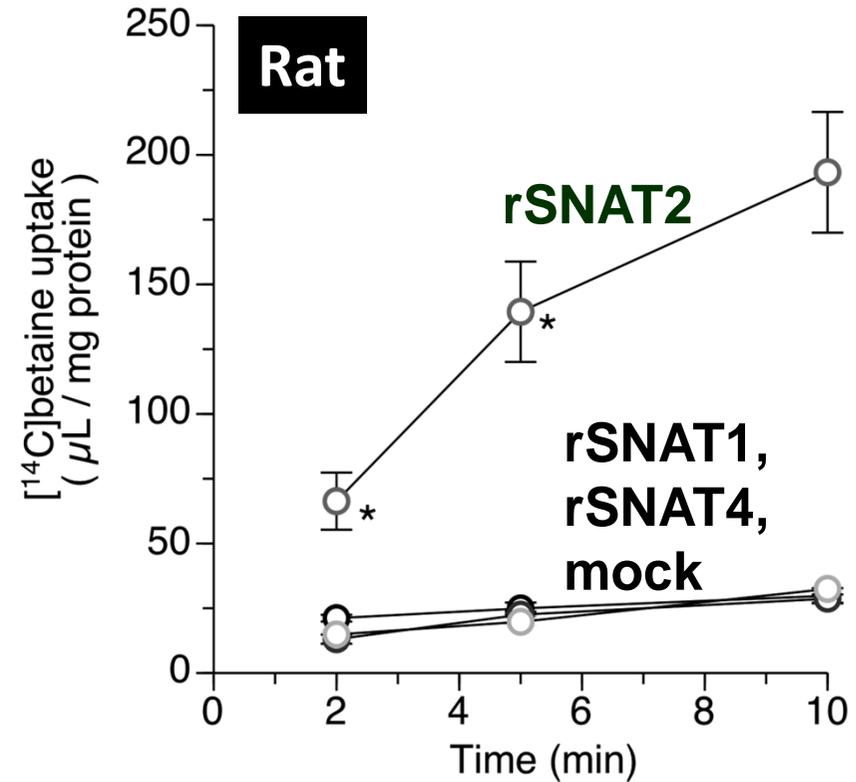
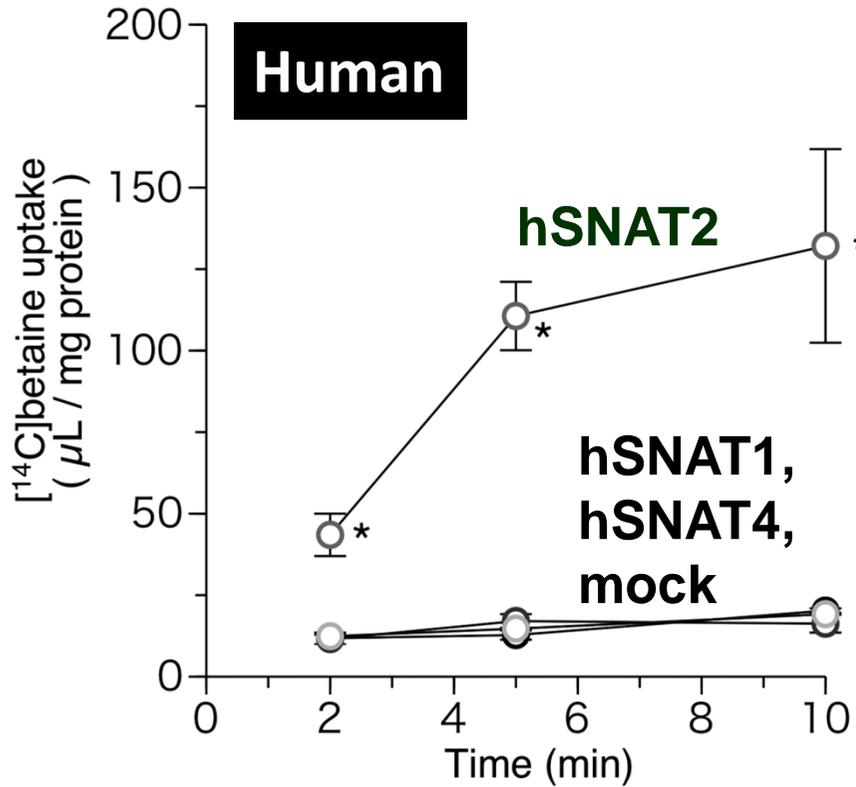
胎盤側底膜  
ベシクルの評価

## 2) 胎盤トランスポーター発現量における種差の解明



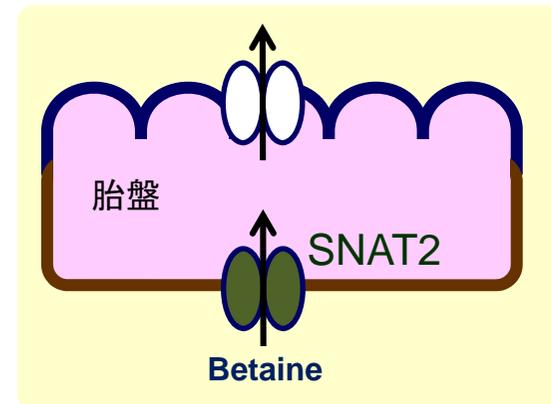
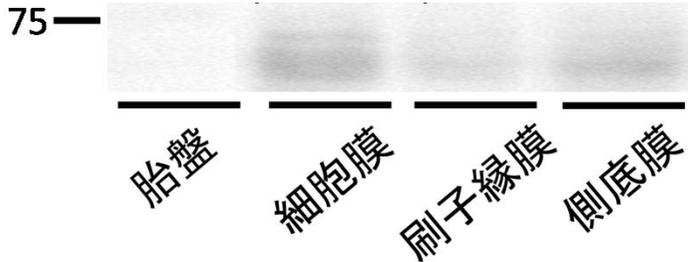
密度勾配遠心によるラット胎盤側底膜ベシクル精製の検討

### 3) 胎盤トランスポーター機能における種差の解明



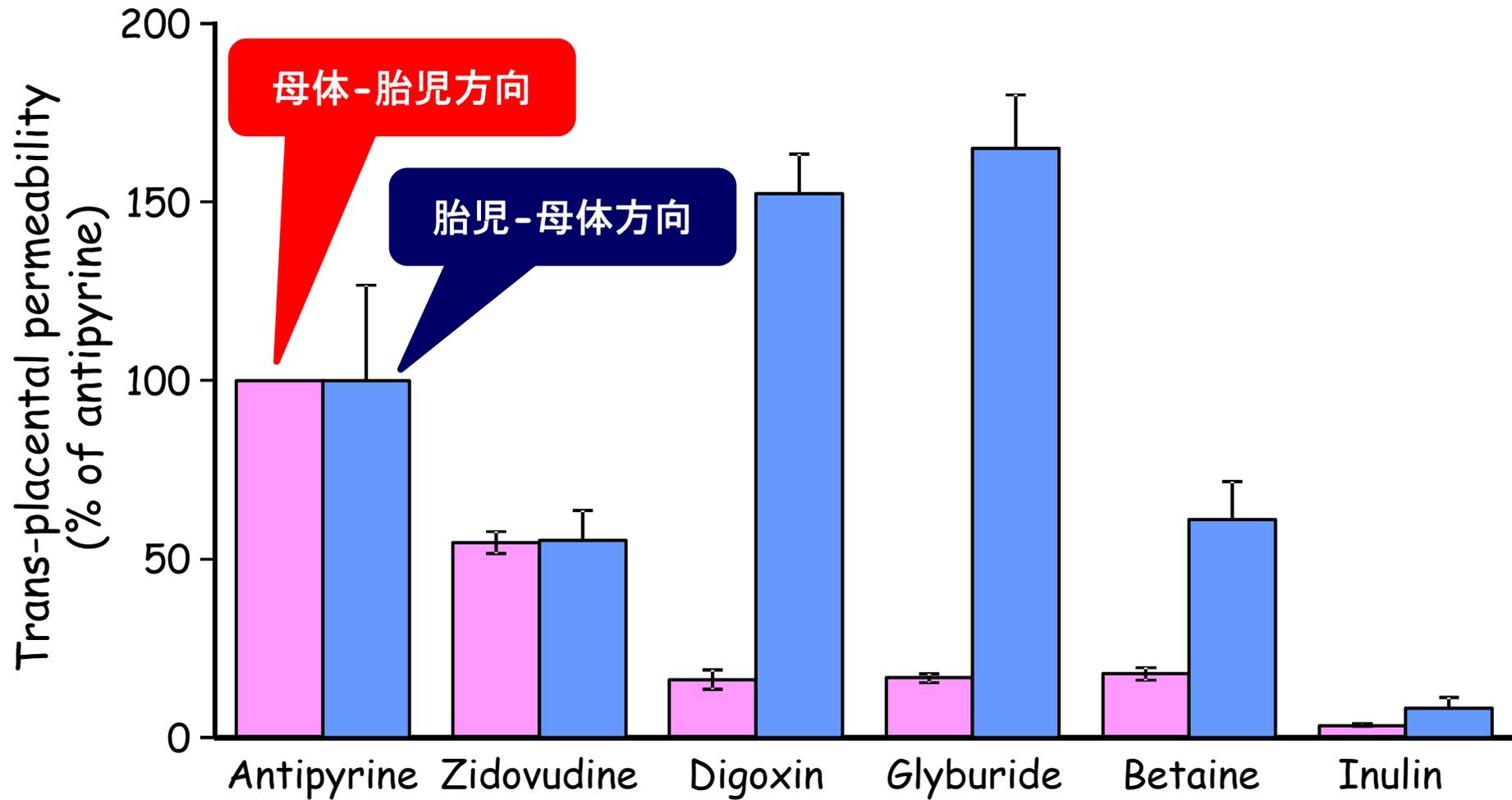
**Human**

**SNAT2/SLC38A2**



**SNAT2を介したベタイン輸送機構**

# 排出トランスポートー機能種差



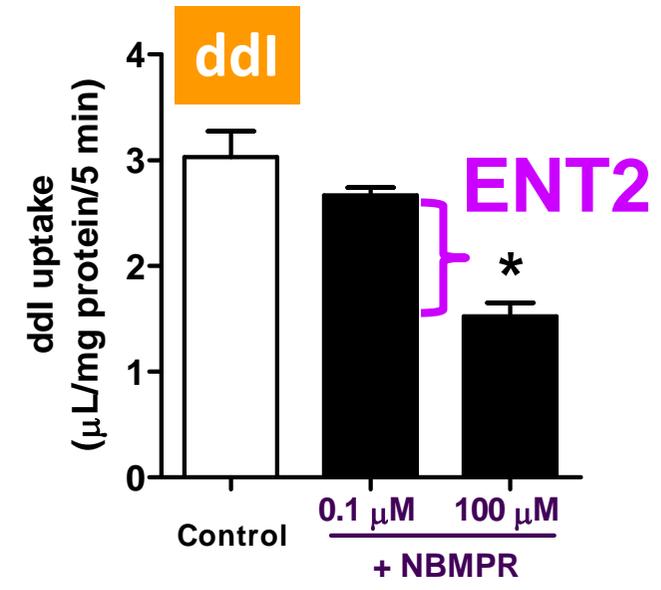
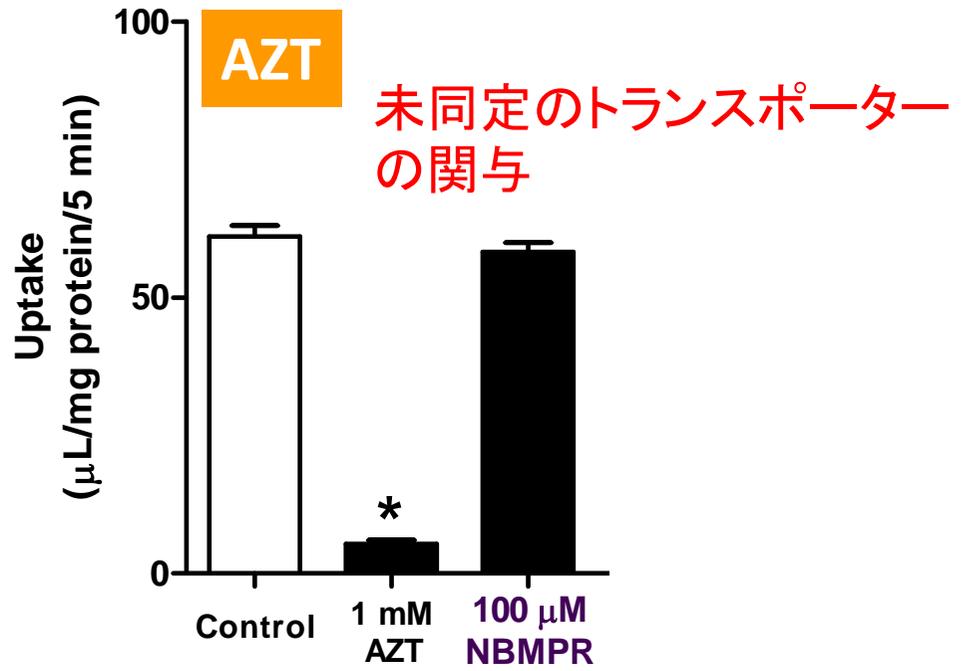
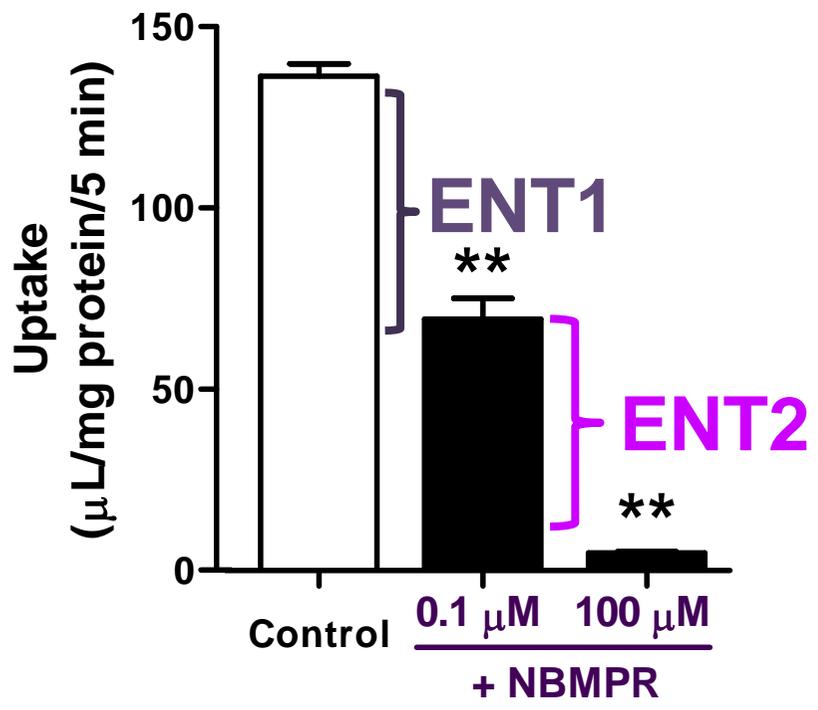
## 母体-胎児方向と胎児-母体方向の胎盤透過性の比較

登美, *Drug Delivery System* 28(4) (2013).

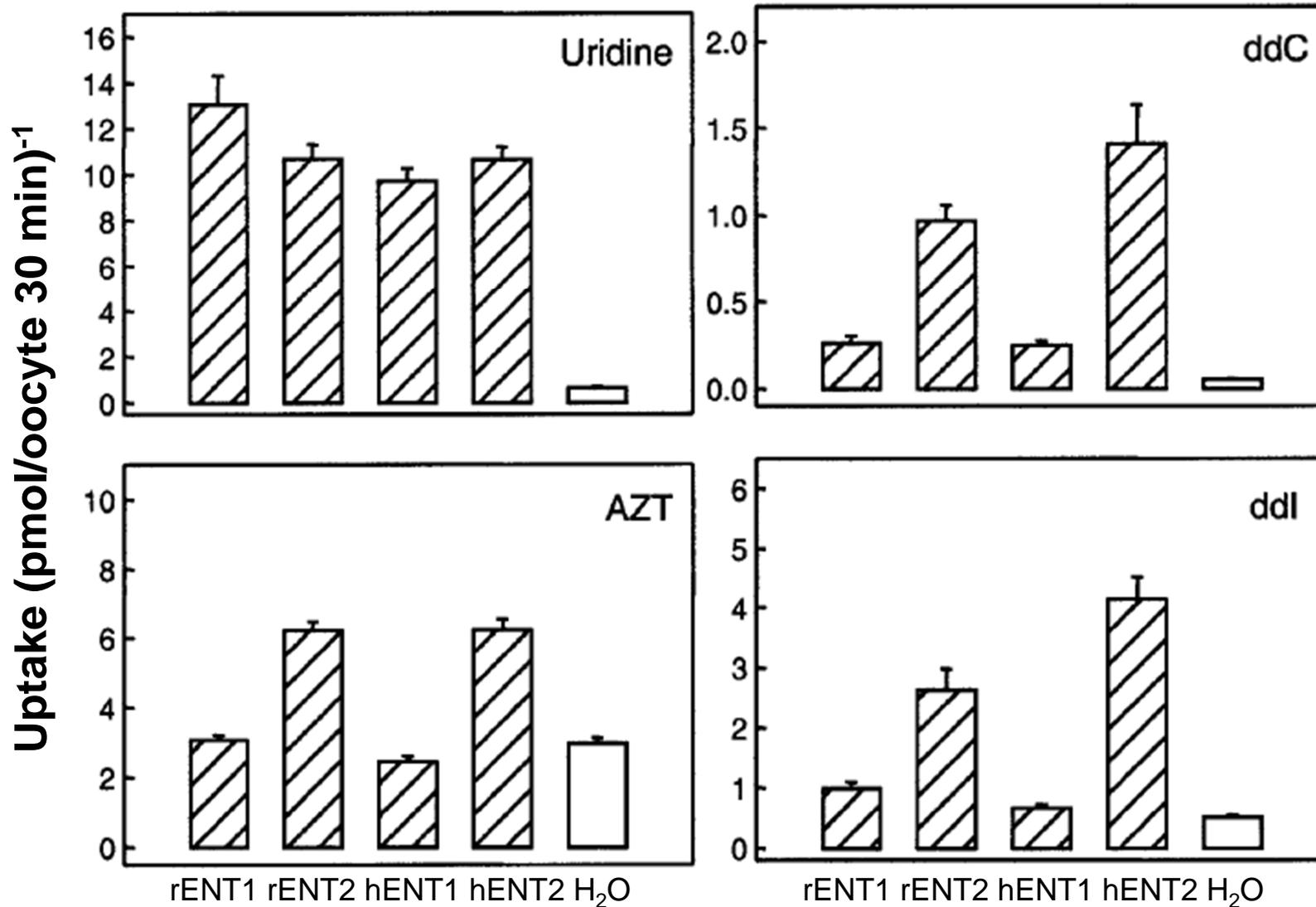
# 胎盤ヌクレオシド輸送の分子実体

**Uridine**

ENT1の基質の方が透過性が高い



ラット胎盤由来TR-TBT  
18d-1細胞への取り込み

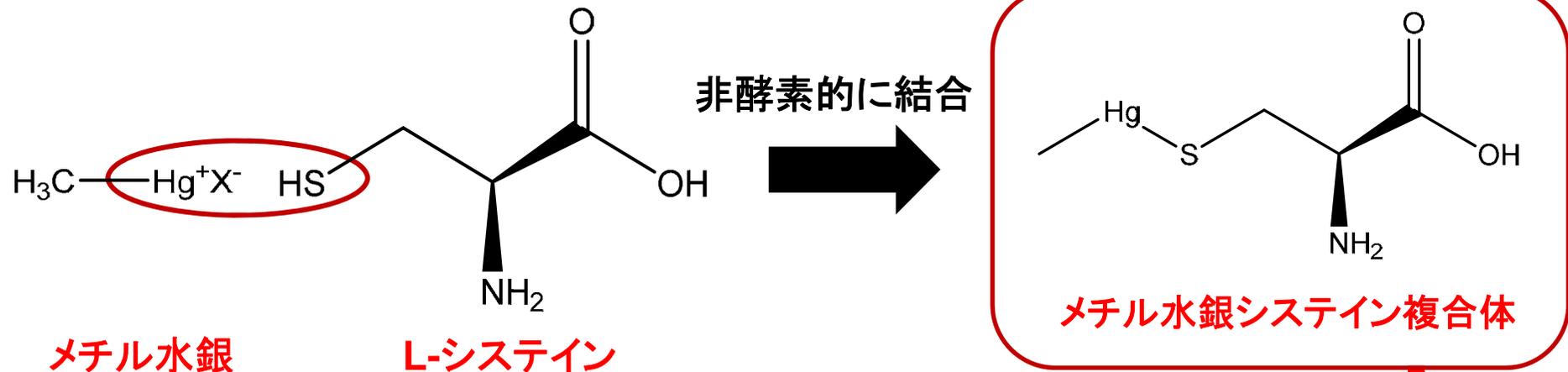


## ヌクレオシド系化合物のENTへの基質認識性

# 胎盤メチル水銀透過機構

# メチル水銀

- ✓ 胎児性水俣病の原因物質
- ✓ 胎児の神経形成を阻害



L-Type amino acid transporter (LAT)の基質



➤ LAT基質のrLAT1及びrLAT2に対する $K_m$ 値

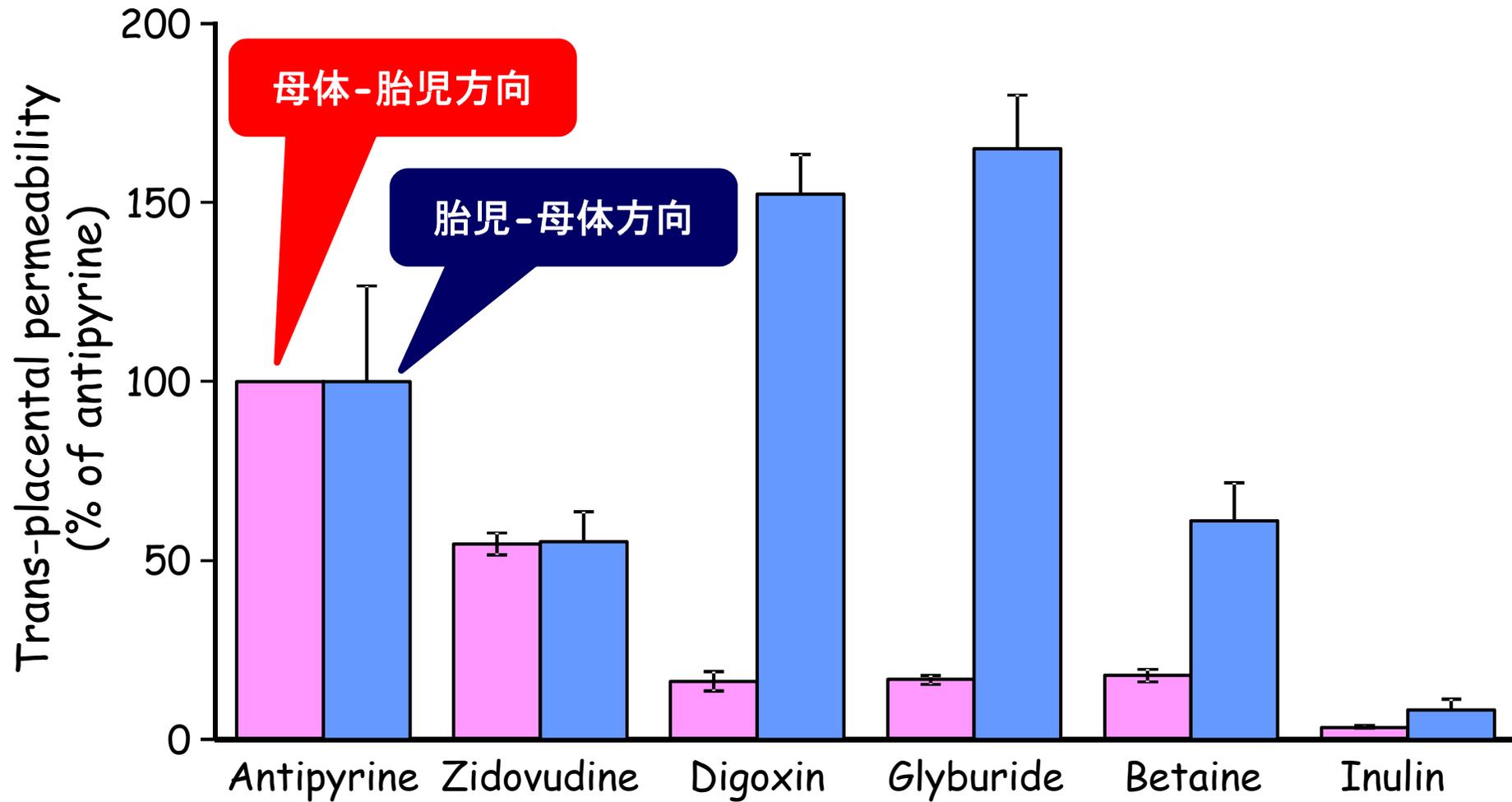
	rLAT1	rLAT2
L-ロイシン	18 ± 3 μM	119 ± 33 μM
メチル水銀複合体	98 ± 8 μM	64 ± 8 μM
L-システイン	—	109 μM

Kanai *et al.*, *J Biol Chem*, 273, 23629-23632 (1998).

Segawa *et al.*, *J Biol Chem*, 274, 19745-19751(1999).

Simmons-Willis *et al.*, *Biochem J*, 367, 239-246 (2002).

# 胎盤ベタイン透過機構

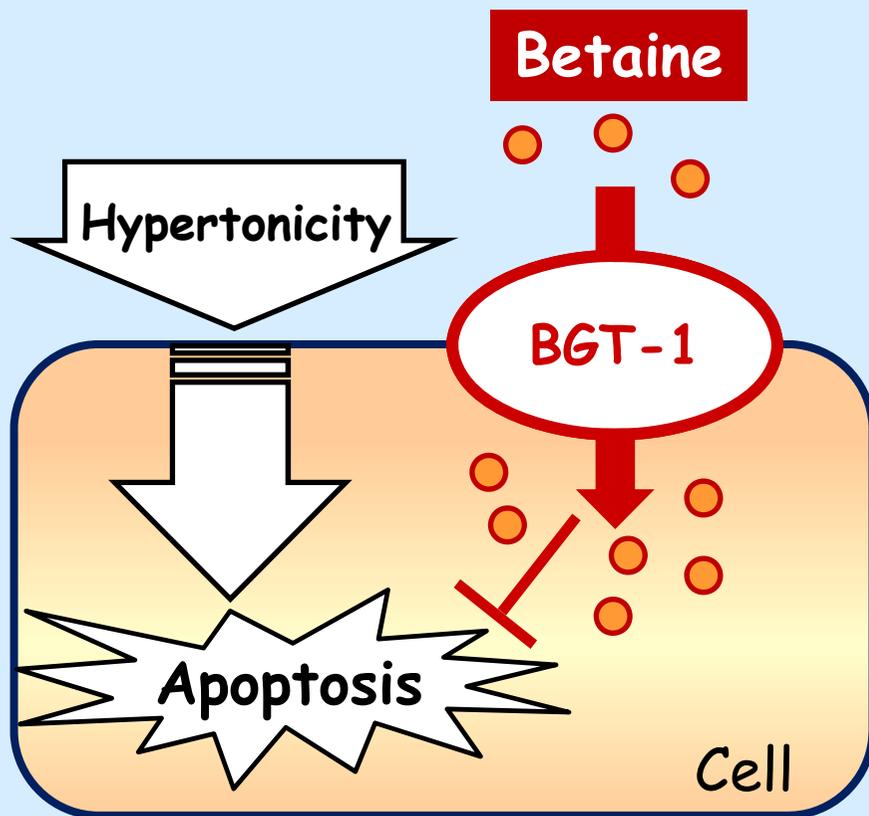
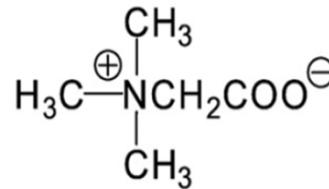


## 母体-胎児方向と胎児-母体方向の胎盤透過性の比較

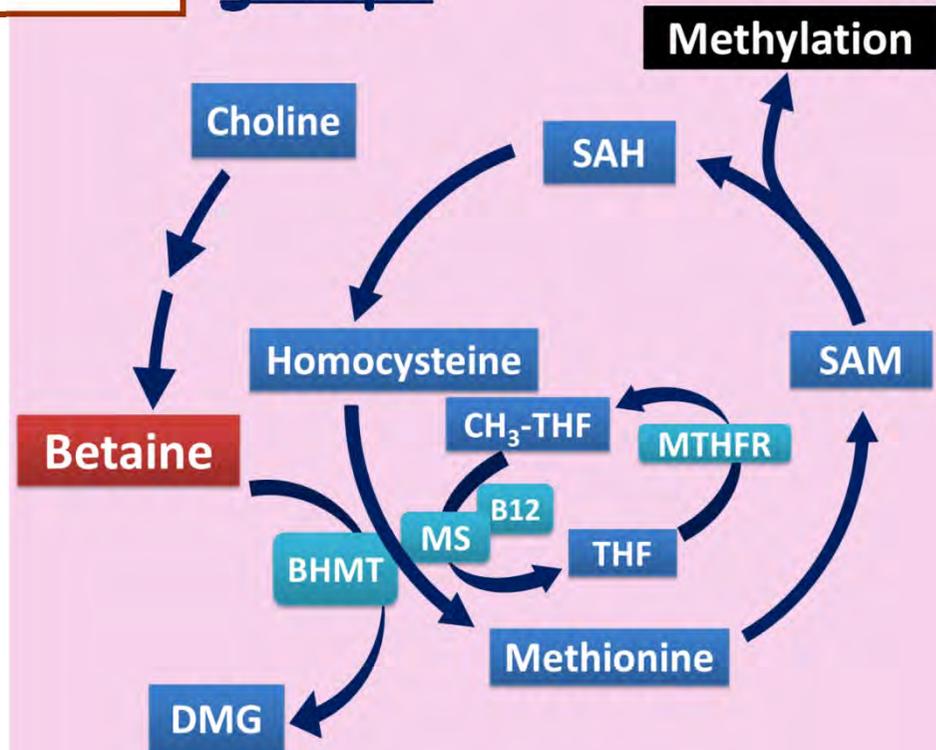
登美, *Drug Delivery System* 28(4) (2013).

# Roles of betaine

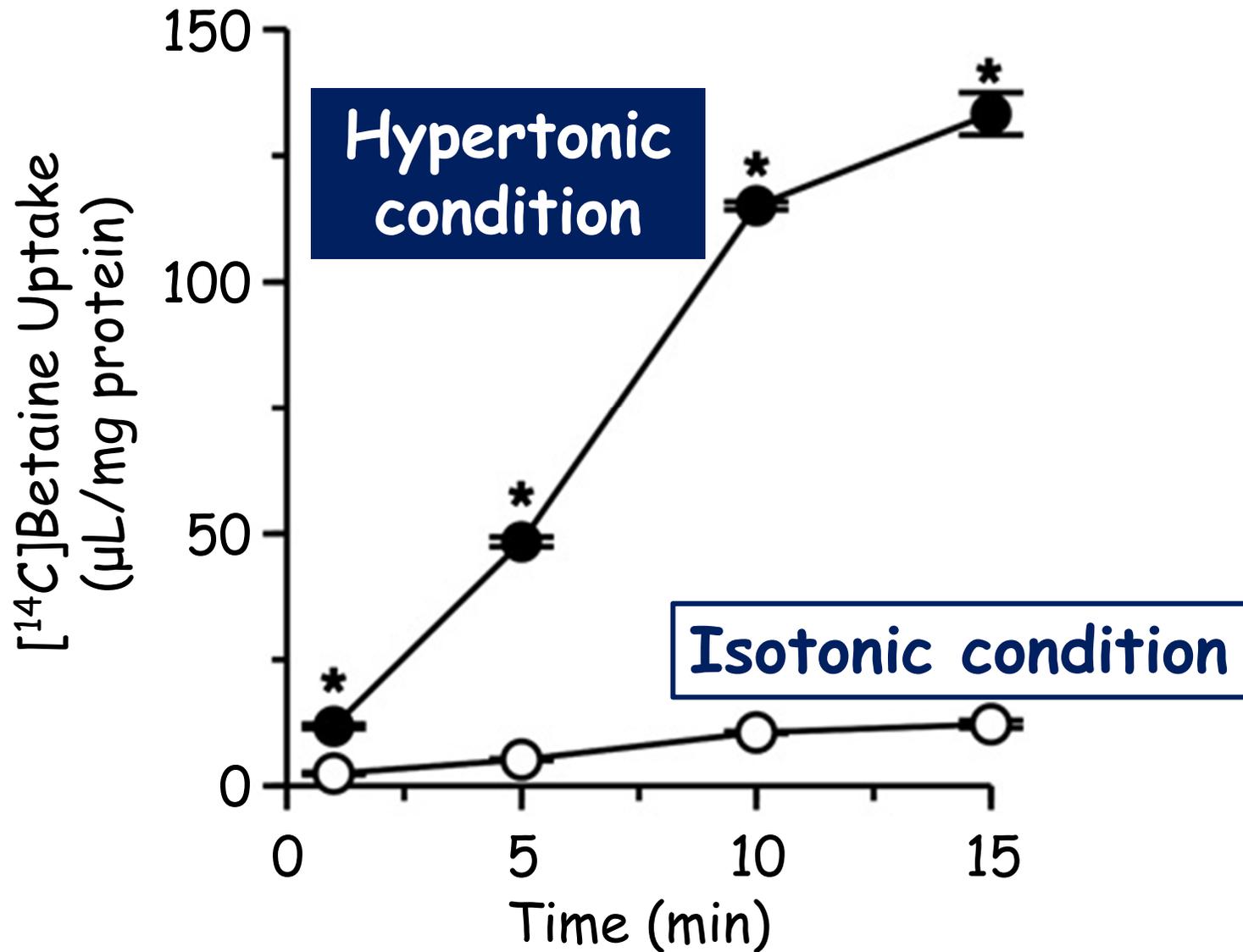
## Osmotic regulation



## Source of methyl groups



B12, vitamin B-12 (cobalamin); BHMT, betaine homocysteine methyltransferase; DMG, dimethylglycine; MS, methionine synthase; MTHFR, methylenetetrahydrofolate reductase; SAH, S-adenosylhomocysteine; SAM, S-Adenosyl-methionine; THF, tetrahydrofolate; CH<sub>3</sub>-THF, 5-methyltetrahydrofolate.

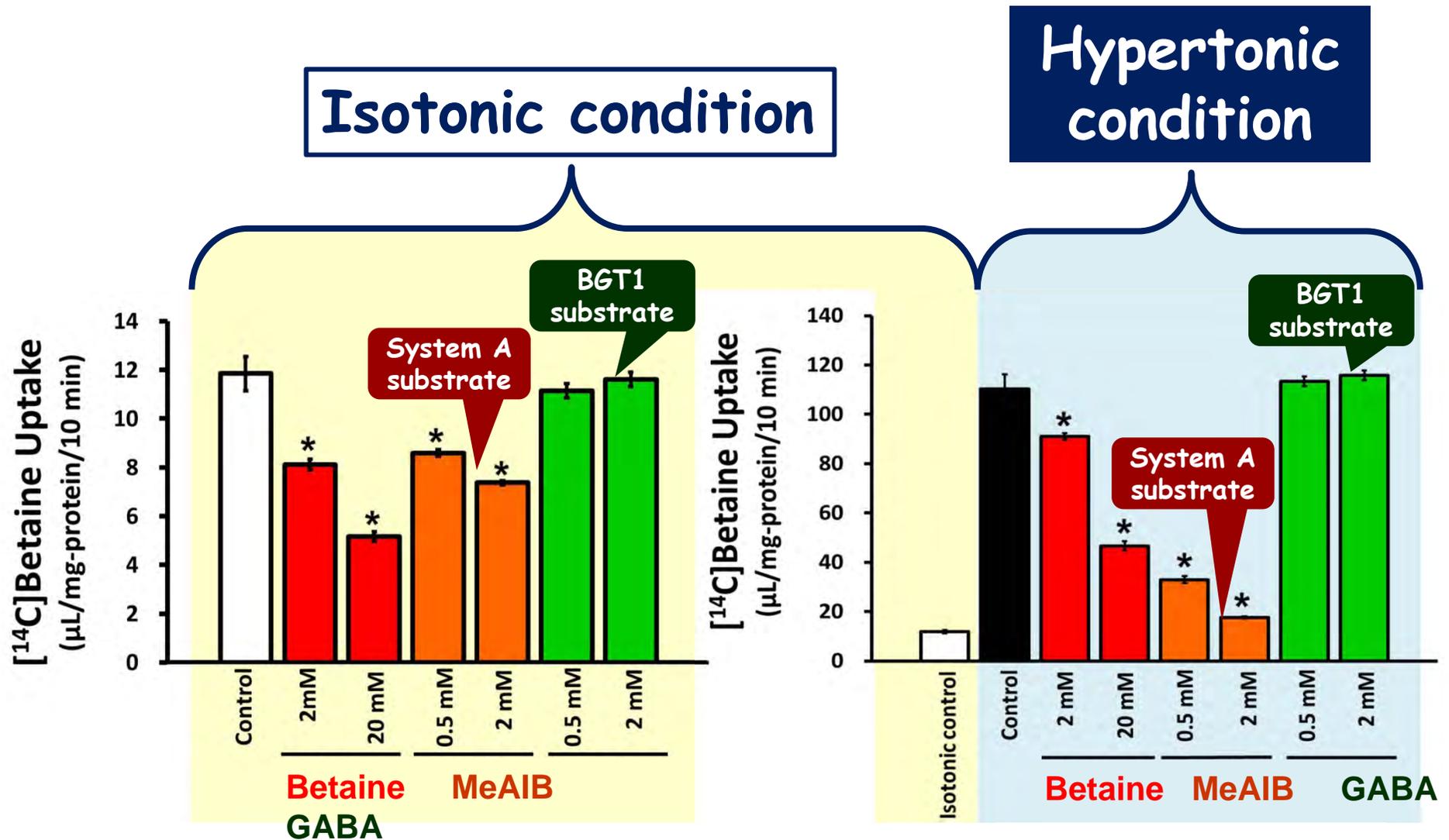


## Effect of osmotic stress on [<sup>14</sup>C]betaine uptake by the rat placental TR-TBT 18d-1 cell line

[<sup>14</sup>C]Betaine : 3 µM. Mean ± S.E.M. (n = 3-4). Uptake at 37°C in the presence of an inwardly directed Na<sup>+</sup> gradient. 26

A statistically significant difference is indicated by an asterisk \* (p < 0.05).

Nishimura et al., *Placenta* : 1003-1009 (2010).



## Effect of inhibitors on osmosensitive [<sup>14</sup>C]betaine uptake by the rat placental TR-TBT 18d-1 cell line

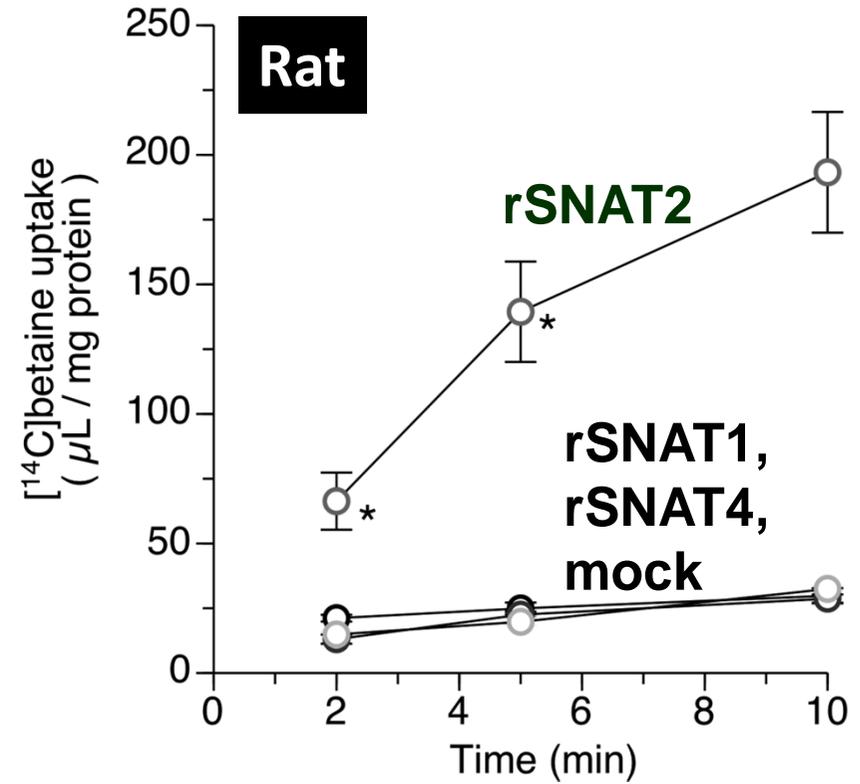
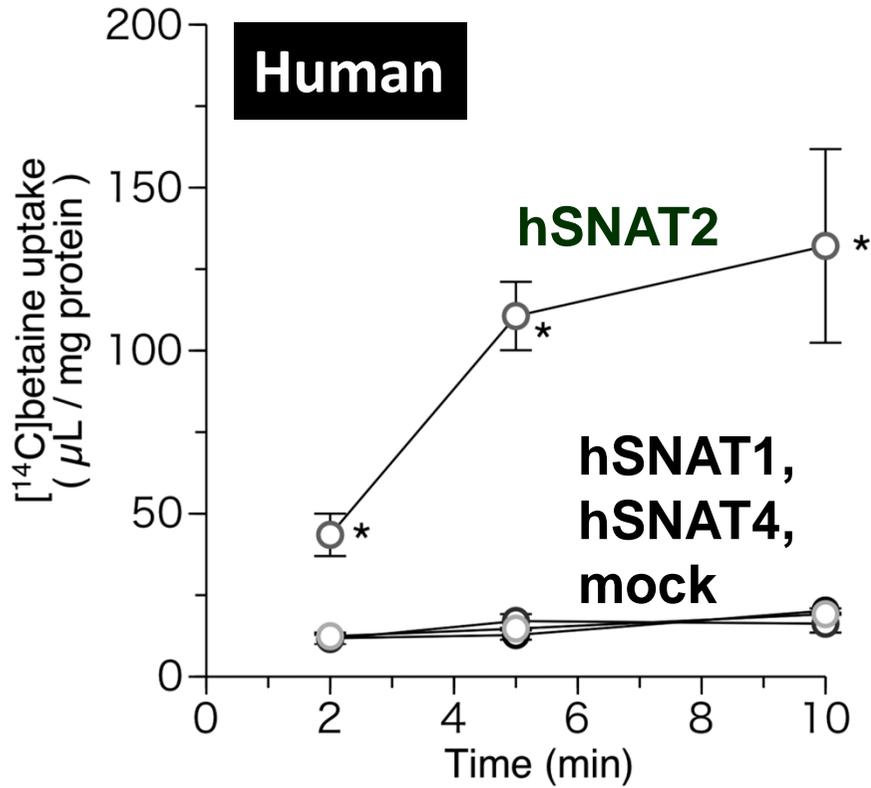
TR-TBT 18d-1 cells were cultured in isotonic (300mOsm/kg) or hypertonic (500mOsm/kg) medium . Uptake in the absence and presence of inhibitors. [<sup>14</sup>C]betaine : 3 μM. Mean ± S.E.M. (n = 3-4). \*, p < 0.05 vs control.

Nishimura et al., *Placenta* : 1003-1009 (2010).

# System A

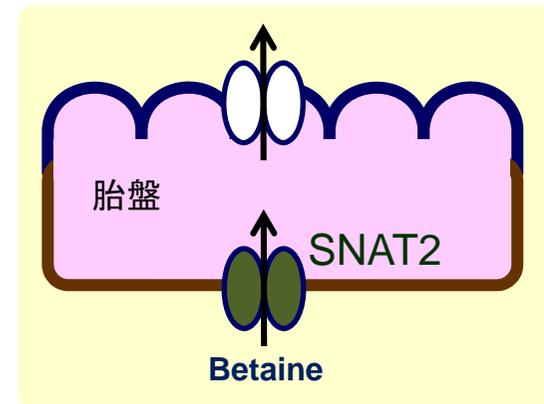
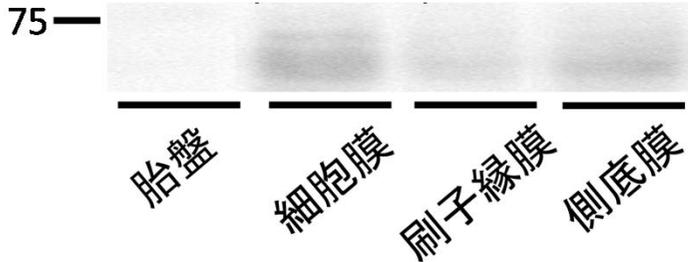
Protein name	SNAT1	SNAT2	SNAT4
Human gene name	SLC38A1	SLC38A2	SLC38A4
Former aliases	ATA1	ATA2	ATA3
Predominant substrates	Glutamine, Alanine Asparagine, Cysteine Histidine, Serine	Alanine, Asparagine Cysteine, Glutamine, Glycine, Histidine, Methionine Proline, Serine	Alanine, Asparagine, Cysteine, Glycine, Serine Threonine, Arginine, Lysine
Tissue distribution	Brain, Heart, Placenta	Widespread (including placenta)	Liver, Placenta
$K_m$ value for MeAIB	0.89mM	0.39mM	6.7mM

MeAIB : methylaminoisobutyric acid



Human

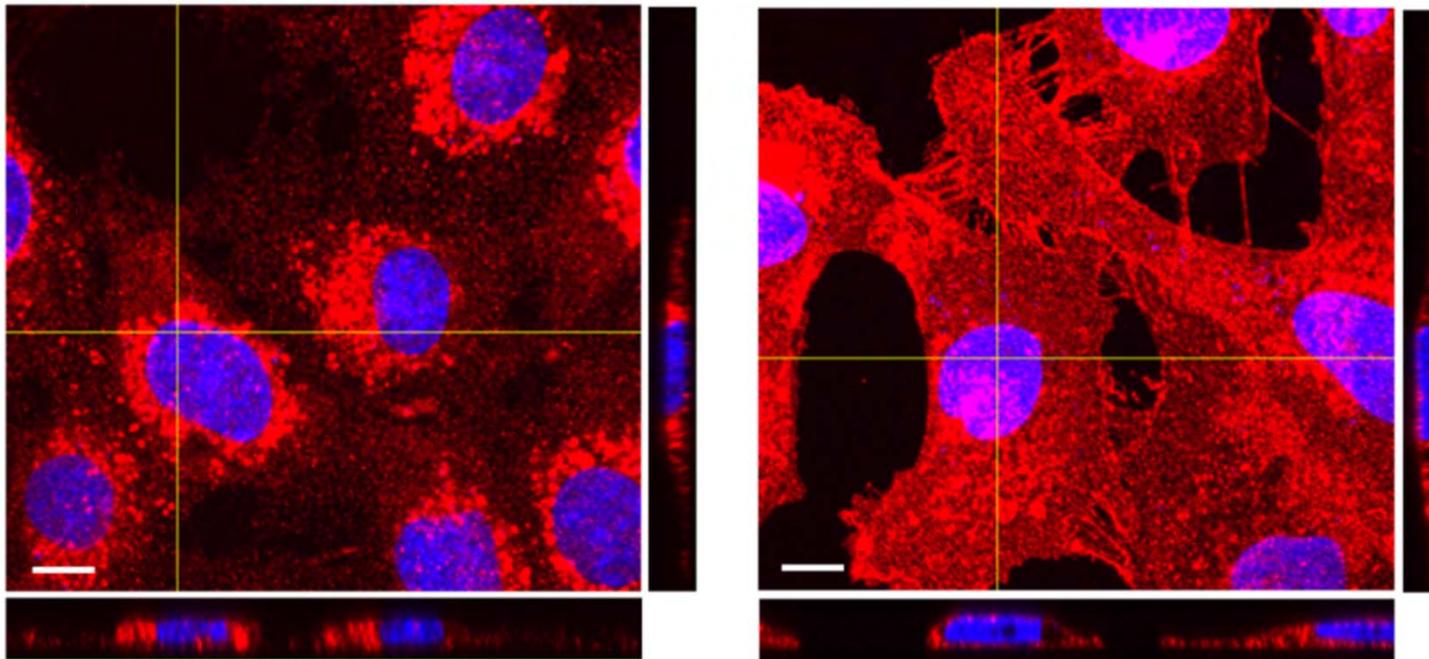
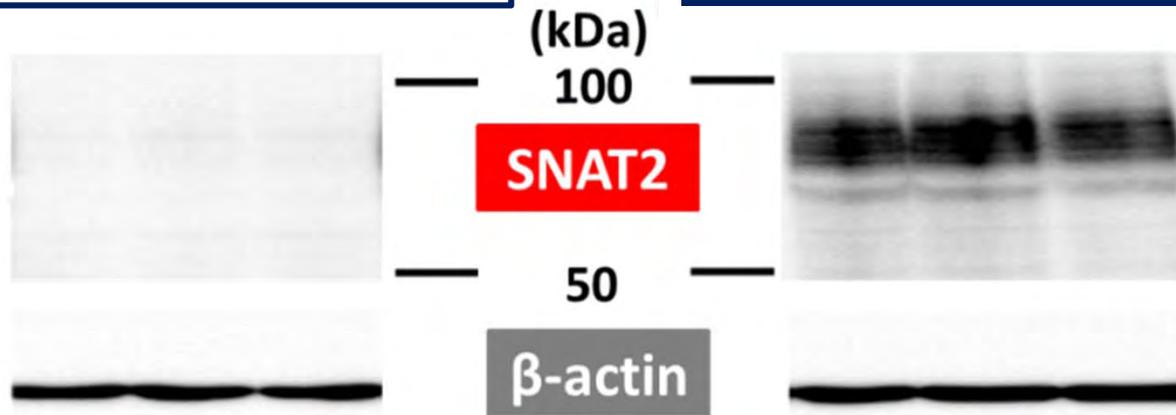
SNAT2/SLC38A2



SNAT2を介したベタイン輸送機構

Isotonic condition

Hypertonic condition



Western blot analysis : Protein was extracted from TR-TBT 18d-1 cells and expression of SNAT2 was analyzed by using an anti-SNAT2 antibody  
Immunocytochemical analysis : Magnification x600. Bars=10  $\mu$ m.

Induction of SNAT2 protein by hypertonicity in TR-TBT 18d-1 cells

# 総括

## 基盤となる胎盤透過機構解析技術の確立

胎盤透過性評価技術や、母体側および胎児側細胞膜の精製技術、トランスポーター絶対発現量の解析技術など、新規の胎盤透過機構解析系を確立できた。これら評価技術は透過機構解明を加速させる上で有用性が高い。

## 研究戦略の合理性を裏付ける知見

基質選択性が低く、多くの化学物質の胎児移行に関与するABC排出トランスポーター活性における種差を示すことができたなど、胎盤透過性種差を評価するための重要な知見を得た。

## 未達成の課題

化学物質の胎盤関門透過機構における種差の解明は一部において達成できたが、化学物質の胎児移行性を予測可能な状態には達していない。

胎盤透過性における種差を機構論的に解明することは、ヒト胎児移行性の予測評価手法確立にむけた基盤データとして、食品健康影響評価に貢献できる。一方で、幅広い化学物質のヒト胎児移行性予測評価手法確立には、より長期的な研究が必要である。

## 1 発表論文

T. Nishimura, T. Takanohashi, M. Tomi, M. Horikoshi, K. Higuchi, Y. Sai, E. Nakashima: Evaluation of rat in vivo fetal-to-maternal transfer clearances of various xenobiotics by umbilical perfusion, *J. Pharm. Sci.*, 102:3356-63 (2013).

## 2 発表学会

- ✓ 日本薬物動態学会第26年会 (2011年11月, 広島)
- ✓ 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2011年11月, 岡山)
- ✓ Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2011 (Dec, 2011, Kuala Lumpur)
- ✓ International Symposium of Past, Present and Future of Molecular Pharmacokinetics (Jan, 2012, Tokyo)
- ✓ 日本薬学会第132年会 (2012年3月, 札幌)
- ✓ 日本薬剤学会第26年会 (2012年5月, 神戸)
- ✓ 第7回トランスポーター研究会 (2012年6月, 京都)
- ✓ International Federation of Placenta Associations Meeting 2012 (Sep, 2012, Hiroshima)
- ✓ 日本薬物動態学会第27回年会 (Sep, 2012, Hiroshima)
- ✓ 第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2012年11月, 京都)
- ✓ 日本動物実験代替法学会第25回大会 (2012年12月, 東京)

## 3 受賞

第20回日本胎盤学会相馬賞

「Characterization of sodium dependent betaine uptake in human placental brush-border membranes」