

(第10回) 2014年度・研究助成報告

研究題名	食品ナノ粒子が腸内細菌に付着して起こる菌叢変化の解析
研究期間	2014年4月1日～2015(2016)年3月31日
研究機関・所属 研究者名	大阪府立大学 大学院工学研究科 物質・化学系専攻 化学工学分野 徳本 勇人

1. 2014(2015)年度研究成果の概要

食品中には、風味や食味を良くするために、多くの食品用ナノ粒子が添加されている。本研究では、生体内に摂取された食品用ナノ粒子が腸内細菌と接触し、その結果起こる細菌叢の変化を解析し、食品用ナノ粒子の開発にその知見をフィードバックすることを研究目的としている。2014年度の研究成果は、以下の通りである。

マウスの腸内細菌叢(糞)とスキムミルクを混合し、赤色着色料として広く用いられる Fe_2O_3 ナノ粒子(公称径0.3, 1.0 μm)を添加してバイアル内で*in vitro*で培養した結果、発酵産物である水素や二酸化炭素の発生量に変化は見られなかった。そこで、 Fe_2O_3 ナノ粒子は消化管内において、腸内細菌叢の構造を変化させるのではないかと考え、1週間に一回、28日間に渡って、マウスに経口投与針を用いて Fe_2O_3 ナノ粒子を生理食塩水に分散させたものを投与し、排出されたマウス腸内細菌叢を、*in vitro*で培養した。その結果、対照に比べて発酵産物である水素の生成量が減少した。また、投与後の日数が経過して採取した腸内細菌叢において、粒径がより大きい(1.0 μm)ほど、発酵産物量の変化が継続して見られたことから、粒径が大きいと消化管内での滞留時間が長くなるのではないかと推察される。

さらに、給餌する餌に Fe_2O_3 ナノ粒子を混練し、毎日、 Fe_2O_3 ナノ粒子を経口投与させる実験を行ったところ、2週間後に、粒径がより小さく(0.3 μm)投与量が多い場合において、マウスが2週間後に下痢を発症したことから、腸内細菌叢が変化したことがわかった。

以上の結果より、食味を感じられる粒径(1.0 μm)で、食品中のナノ粒子含有量をできるだけ少なくすると、腸内細菌叢への影響を抑制できるのではないかと考えられる。

2. 助成期間内での研究成果の概要

1. はじめに

金属ナノ粒子は食品業界では包装材料や着色料、製造助剤として広く利用されている。実際に、酸化第二鉄が赤色の着色料、二酸化チタンが白色の着色料や包装材料、二酸化ケイ素が粉末の物性改良などに使用されている。ナノ粒子はバルクと比べて、比表面積の大きさや反応性の高さ、磁性や導電性、光学特性に優れていることから注目を集めている。これらの特性を利用した製品も市販されており、製造量は急速に増加している。それに伴い、環境への放出量は増加していくと予想されている。工業分野でナノというと1 nm～100 nmの範囲

のことを指すが、食品分野におけるナノの範囲はまだ明確に決まっていない。その理由としては、食品では数 10 μm のスケールで食感や加工特性に大きな変化を与えるので、農林水産省委託研究プロジェクト「食品素材のナノスケール加工及び評価技術の開発」では平成 19 年度から平成 23 年度まで 100 μm ~10 nm の範囲を対象として研究が行われてきた。

2. 実験方法

2.1 使用したナノ粒子

本研究では、高純度科学研究所から購入した、公称径 0.3, 1.0 μm の乾燥状態にある Fe_2O_3 ナノ粒子を実験に用いた。分散液として使用する場合は、純水や生理食塩水を分散媒として、 Fe_2O_3 ナノ粒子を任意の濃度となるように超音波洗浄機で 15 分間分散させて用いた。

2.2 実験動物

日本 ILC より購入したマウス (2~3 週齢) 20 匹を 1 ゲージ当たり 4 匹で、投与するナノ粒子の粒径と投与量の違う合計 5 ゲージに分けて、大阪府立大学 C11 棟 (動物育成棟) で飼育した。飼育中のマウスの健康状態は、ゲージごとのマウスの平均体重の経時変化と腸内細菌の構造変化を指標にした。実験にはマウスのフンを腸内細菌として採取した。

2.3 経口投与針 (ゾンデ) による経口投与

滅菌した 0.9% 生理食塩水に、1 回の投与で、 Fe_2O_3 ナノ粒子の投与量が 1.6, 8.0 mg となるように調整したナノ粒子分散液 400 μL をゾンデにより投与した。このときの飼育条件を Table 1 に示す。対照では、生理食塩水 400 μL をゾンデにより経口投与した。経口投与は週に一回、合計で四回行った。2.3 の実験では、マウスによるナノ粒子の摂取は 28 日間の実験期間内で、この 4 回だけである。

2.4 ナノ粒子を混練した餌を給餌する経口投与

マウス粉末飼料と Fe_2O_3 ナノ粒子を混合し、純水を粉末飼料と同量加え、15 分間混練を行った。その後、ペレット状に成形して 100 $^\circ\text{C}$ で乾燥させた。予備実験により、 Fe_2O_3 ナノ粒子を 1.6 mg 投与すると、粒径 0.3 μm では約 20%、粒径 1.0 μm では約 10% のナノ粒子が腸内細菌と共に排出したことから、これをマウスが 1 日で排出可能なナノ粒子量と仮定し、マウスの 1 日の接餌量を測定し、マウス飼料への Fe_2O_3 ナノ粒子の含有率を決定した。このときの飼育条件を Table 2 に示す。2.4 の実験では、ナノ粒子は毎日マウスに摂取される。

Table 1 ゲージごとの飼育条件

ゲージ	粒径 [μm]	投与量 [mg]
1	-	-
2	0.3	1.6
3	0.3	8.0
4	1.0	1.6
5	1.0	8.0

Table 2 ゲージごとの飼育条件

ゲージ	粒径 [μm]	含有率 [%]
1	-	-
2	1	0.007
3	1	0.07
4	0.3	0.014
5	0.3	0.14

2.5 対照のマウス群から採取した腸内細菌へのナノ粒子投与実験

純水にスキムミルク粉末を 10 g/L となるように投与し、液体培地を作製した。内容積 21 mL のオートサンプラーバイアル瓶を用いた。総液量を 5 mL とし、作製した液体培地 2.5 mL に、Fe₂O₃ ナノ粒子の分散液 2.5 mL を最終槽内濃度で 50 mg/L、対照のマウスから採取した腸内細菌を 40 mg となるようにそれぞれ投与した。対照は分散液の代わりに純水を投与した。バイアル瓶をブチルゴム栓とアルミシールで密閉した後、ガス置換装置（三紳工業社製、IP-8）を用いてヘッドスペースを窒素ガスで置換し、1.2 気圧とした。ガス置換により嫌気状態としたバイアル瓶を 310 K で静置培養を行った。

2.6 ナノ粒子を経口投与して採取した腸内細菌の培養実験

純水にスキムミルク粉末を 10 g/L となるように投与し、基質溶液を作製した。次にオートサンプラーバイアル瓶（容積 21 mL）に、基質溶液を 10 mL（最終槽内濃度 10 g/L）、マウスの腸内細菌 250 mg を投入後、ゴム栓で密封した。対照は分散液の代わりに純水を投与した。ガス置換装置を用いて、ヘッドスペースを窒素ガスで置換し、1.2 気圧とした。ガス置換により嫌気状態としたバイアル瓶を 310 K で静置培養を行った。

2.7 気相分析

バイアル瓶のヘッドスペースからガスタイトシリンジで 0.5 mL の気相成分を採取し、ガスクロマトグラフィー（Shimadzu GC-8APT）でバイオガスの組成を分析した。カラムは 3 m×3.0 mm のステンレスカラムに充填した Prapak Q（日本ウォーターズ株式会社）を用いた。キャリアガスにはアルゴンガスを使用し、流速は 20 mL/min とした。インジェクターとカラムオープン、検出器の温度はそれぞれ 373 と 343、373 K に設定した。標準ガス(STD) として 80%の窒素と 20%の二酸化炭素からなる混合ガスと、100%のメタンガス、100%の水素ガスを使用した。データは3つの独立した培養器から測定し、平均値と標準誤差を算出した。

2.8 有機酸濃度

腸内細菌を *in vitro* で培養後、液相中の有機酸組成を分析した。液相成分は注射器で嫌気状態を維持したままバイアルから 0.5 ml 採取し、15000 rpm で 5 分間遠心分離し、上澄み液をフィルター濾過して高速液体クロマトグラフィーに供した。

また、腸内細菌中に含まれる有機酸量を測定するために、腸内細菌を純水 10 mL 中に投入し、Voltex で十分攪拌した後、0.5 mL を採取し 15000 rpm で 5 分間遠心分離した。上澄み液をフィルター濾過後、高速液体クロマトグラフィーに供した。

有機酸濃度の測定は、高速液体クロマトグラフィー（日本分光株式会社 LC-2000Plus）で測定した。カラムはガードカラムに RSpak KC-G（昭和電工株式会社）、主カラムに RSpak KC-811（昭和電工株式会社）を 2 本連結して用い、カラムオープンの温度は 333 K とした。移動相として 3 mM 過塩素酸水溶液を使用し、流速は 0.8 mL/min とした。カラム通過後、反応液と反応させて呈色させ、吸光度を測定した。反応液は 0.2 mM BTB、15 mM リン酸水素ナトリウムの水溶液を用い、流速は 1.2 mL/min とした。標準試料として、代表的な有機酸を 1、5、10、50 mM となるように調製した水溶液を用いた。培養液中の有機酸の濃度は、ChromNAV（日本分光株式会社）で算出した。

3. 結果と考察

3.1 ゾンデによる経口投与時のマウスの状態

ゾンデによる 28 日間の経口投与実験期間中に、 Fe_2O_3 ナノ粒子を 1 週間に 1 回、合計 4 回投与したときの、ゲージごとのマウスの体重変化を Fig. 1 に示す。4 回目の投与終了後、1 週間が過ぎても、各ゲージのマウスの体重に大きな変化は見られなかった。また、投与直後においても、体重はほとんど変わらなかった。

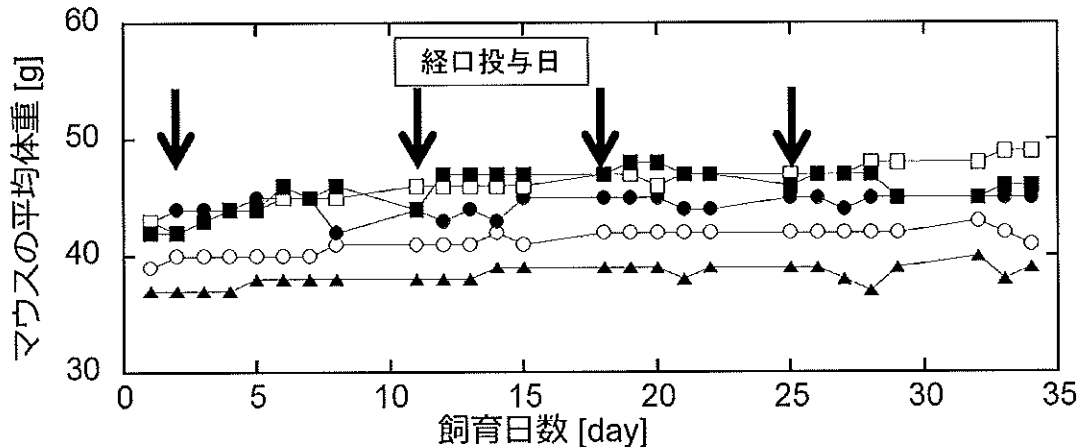


Fig. 1 マウスの平均体重の経時変化 (ゲージ1 (▲)、ゲージ2 (○)、ゲージ3 (●)、ゲージ4 (□)、ゲージ5 (■))

3.2 ナノ粒子を混練した餌を経口投与した時のマウスの状態

2 種類の粒径と投与量で飼育したマウスの体重変化を Fig. 2 に示す。その結果、ゲージ5の粒径 $0.3 \mu\text{m}$ の Fe_2O_3 ナノ粒子を餌への混練濃度 0.14 % で投与した条件において、飼育日数 12 日目から 14 日目にかけ体重が約 10% 以上も減少した。また、このゲージ内の全てのマウスが下痢を発症していたことから、下痢によって体内の水分と摂餌した餌を一時的に大量に排出したため、体重が急激に減少したと考えられる。

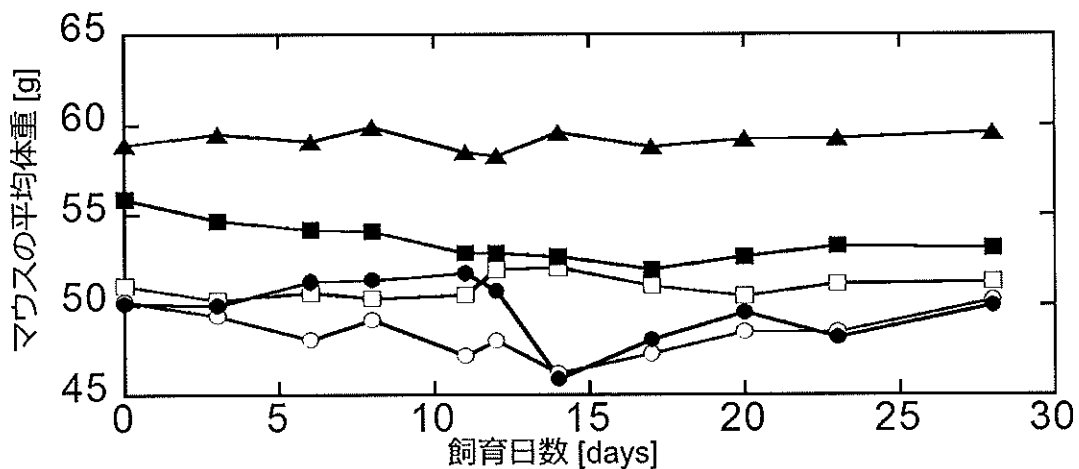


Fig.2 マウスの平均体重の経時変化 (ゲージ1 (▲)、ゲージ2 (□)、ゲージ3 (■)、ゲージ4 (○)、ゲージ5 (●))

3.3 対照のマウスの腸内細菌を採取して *in vitro* でナノ粒子を投与した培養実験

ナノ粒子を腸内細菌へ直接投与した時のバイオガス生成量を Fig. 3 に示す。培養 7 日目の CO_2 及び H_2 生成量は、対照で 3.31, 1.44 mL となった。一方、粒径 $0.3 \mu\text{m}$ の Fe_2O_3 ナノ粒子を投与した系では、3.24, 1.36 mL 生成した。また、粒径 $1.0 \mu\text{m}$ の Fe_2O_3 ナノ粒子を投与した系では、2.53, 1.34 mL となり、ナノ粒子の投与によるバイオガス生成量の変化は見られなかった。そのため、 Fe_2O_3 ナノ粒子は腸内細菌へ直接投与しても菌叢は変化しなかった。

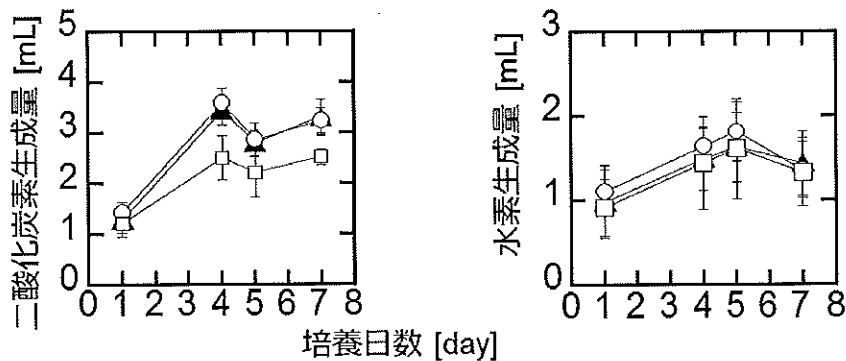


Fig.3 ナノ粒子を腸内細菌に直接投与したときのバイオガス生成量 (Control (▲)、粒径 $0.3 \mu\text{m}$ (○)、粒径 $1.0 \mu\text{m}$ (□))

3.4 ゾンデによる経口投与後に採取した腸内細菌の培養実験

Fig. 4 に 1 回目経口投与 1 日後に採取した腸内細菌を培養した時のバイオガス生成量を示す。培養終了時の最終 H_2 生成量が対照では 5.59 mL となった。一方、粒径 $0.3 \mu\text{m}$ の Fe_2O_3 ナノ粒子を 1.6 mg または、8.0 mg で投与した場合には 1.14 mL と 2.41 mL となり、対照と比較すると、最終 H_2 生成量はそれぞれ 80% と 57% に減少し、粒径 $1.0 \mu\text{m}$ を投与した場合にはそれぞれ 4.29 mL と 2.89 mL となり、23% と 48% に減少した。

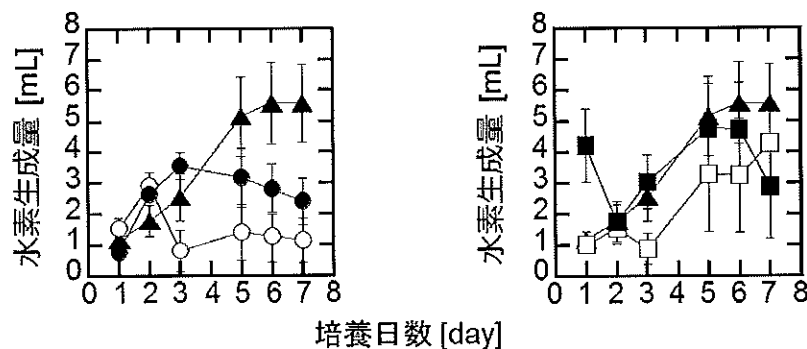


Fig. 4 経口投与 1 日後の腸内細菌を培養した時の水素生成量 (Control (▲)、粒径 $0.3 \mu\text{m}$ 1.6 mg (○)、粒径 $0.3 \mu\text{m}$ 8.0 mg (●)、粒径 $1.0 \mu\text{m}$ 1.6 mg (□)、粒径 $1.0 \mu\text{m}$ 8.0 mg (■))

また、経口投与 1, 3, 7 日後に採取した腸内細菌を 7 日間培養し、培養終了時の最終 H_2 生成量を Fig. 5 に示す。経口投与 1, 3, 7 日後の腸内細菌による最終 H_2 生成量は対照でそれぞれ、5.59, 2.97, 1.28 mL となった。これに対し、粒径 $0.3 \mu\text{m}$ の Fe_2O_3 ナノ粒子を 1.6 mg で投与した場合には、1.14, 2.88, 0.93 mL となり、対照と比較して、20%, 96%, 73% に減少した。

また、粒径 1.0 μm のナノ粒子 1.6 mg を投与した場合には 4.29, 2.08, 1.68 mL となり、対照と比較して、77%, 70%, 130% となった。この結果の差はわずかだが、傾向は明らかで、粒径が大きい Fe_2O_3 ナノ粒子は腸内細菌叢へ長期的な影響を与える可能性が示唆された。さらに、 Fe_2O_3 ナノ粒子は、日数が経過すれば腸内からすべて排出されると考えられるので、消化管内でナノ粒子が与えた菌叢の変化も一過的であると考えられる。

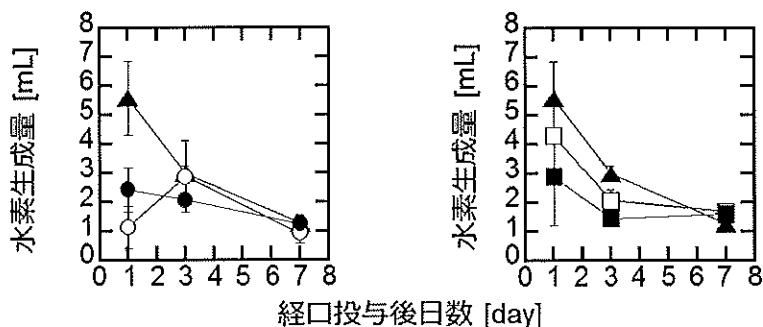


Fig. 5 経口投与1, 3, 7日後の腸内細菌を7日間培養した時の最終水素生成量 (Control (▲)、粒径0.3 μm 1.6 mg (○)、粒径0.3 μm 8.0 mg (●)、粒径1.0 μm 1.6 mg (□)、粒径1.0 μm 8.0mg (■))

3.4 ナノ粒子を混練した餌を経口投与して採取した腸内細菌の培養実験

経口投与を開始してから、15 日目に排出された腸内細菌を採取して培養した時の、バイオガス生成量の経時変化を Fig. 6 に示す。対照と比較して、培養 7 日後の二酸化炭素生成量は全ての条件で増加した。水素生成量は、対照では 0.76 mL、粒径 0.3 μm の Fe_2O_3 NPs を含有率 0.014, 0.14% で投与した条件では、2.59, 7.46 mL 生成し、粒径 1.0 μm の Fe_2O_3 NPs を含有率 0.007, 0.07% で投与した条件では、2.18, 7.87 mL 生成した。この結果より、 Fe_2O_3 NPs の投与量が多いほど、バイオガス生成量が増加することが分かった。粒径 0.3 μm の Fe_2O_3 NPs を含有率 0.14% で投与した条件では、全てのマウスが下痢を発症していた。

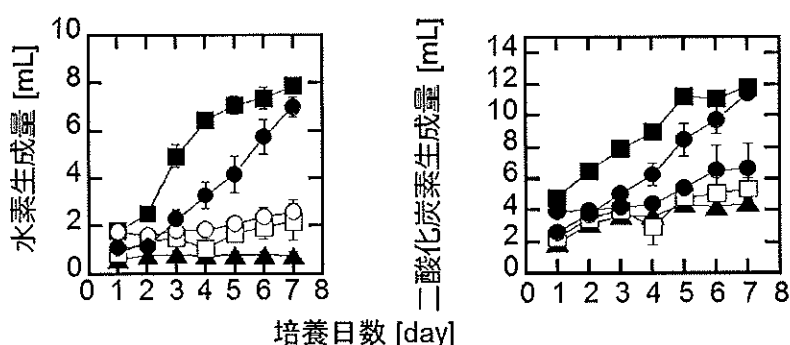


Fig. 6 経口投与15日目に採取した腸内細菌を培養した時の水素生成量の経時変化 (Control (▲)、粒径1.0 μm 0.007% (○)、粒径1.0 μm 0.07% (●)、粒径0.3 μm 0.014% (□)、粒径0.3 μm 0.14% (■))

下痢を発症した条件の腸内細菌から生成する水素生成量は、対照と比較して劇的に増加した。嫌気発酵の中間段階である酸生成過程では、水素と二酸化炭素を生成することから、下痢の原因菌である酸生成菌が特異的に増加したためだと考えられる。

3.5 体重変化の前後の腸内細菌叢が生成する有機酸

体重が大きく減少した15日目とその前後(4日目と26日目)の腸内細菌を採取して *in vitro* で培養した時の液相中の有機酸生成量を分析した結果を Fig. 7 に示す。一般に、酢酸は *Clostridiaceae* 科、乳酸は *Lactobacillaceae* 科の微生物の代謝産物である。図より、下痢時の乳酸生成量は、下痢前と比較して増加した。これは、*Clostridiaceae* 科が優勢化している菌叢では、*Lactobacillaceae* 科の乳酸生成が促進されたからであると考えられる。また、下痢を発症する前と比較して、治癒した後の酢酸生成量は約60%減少した。これは、*Lactobacillaceae* 科が優勢化した菌叢では *Clostridiaceae* 科などの酢酸生成菌の代謝が抑制されたのではないかと考えられる。以上より、*Clostridiaceae* 科が菌叢内で優勢化に伴って、*Lactobacillaceae* 科が優勢化した結果、乳酸の生成が促進され、酢酸生成菌の代謝が抑制されたのではないかと考えられる。

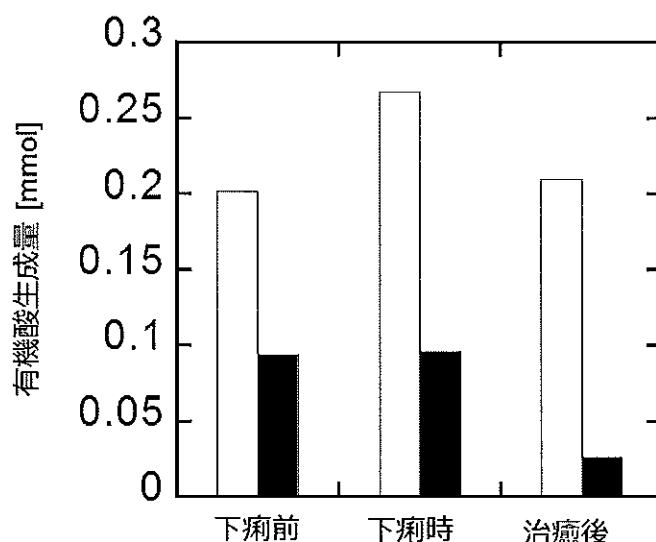


Fig. 7 培養1日後に生成された有機酸生成量 (乳酸 (□)、酢酸 (■))

4. おわりに

食品用ナノ粒子は、今後その利用は拡大すると考えられる。食品添加物として利用される場合、その安全性は厳しく審査されるため、生体への影響は低いと考えられるが、ナノ粒子はバルクと比べて、比表面積の大きさや反応性が高いことから、腸内細菌叢の微生物には大きな影響を与える可能性が高い。今回、粉体工学研究情報センターより本申請課題に対して助成を頂き、腸内細菌叢に食品用ナノ粒子が与える影響について、実験基盤を構築することができた。特に、経口投与から消化管内において、各種消化液を分泌されながら構築される腸内細菌叢に対してナノ粒子が直接的に与える影響を解析することができ、その影響の要因として、食品添加物として有用な粒子の粒径、食品中への含有率について、非常に有用な知見が得られた。今後は、この実験系を発展させて、他の食品用粒子と食品成分の組み合わせにおいて、腸内細菌叢へ与える影響を解析していきたい。

最後に、粉体工学情報センターの関係各位に心より深謝申し上げます。

3. 研究発表

中島淑乃, 村田森広, 井沢加奈, 宮崎準平, 栗山雄太, 竹田恵美, 野村俊之, 徳本勇人, “ナノ粒子が根の細胞伸長に及ぼす影響”, 日本植物学会第 78 回大会, 川崎 (2014.9), 講演要旨集, P-075.

平田 咲, 中島淑乃, 中川拓実, 竹田恵美, 野村俊之, 徳本勇人, “花粉管を用いた植物の生殖細胞へナノ粒子が及ぼす影響の解析”, 日本植物学会第 78 回大会, 川崎 (2014.9), P-076.

中島淑乃, 竹田恵美, 野村俊之, 徳本勇人, “ナノ粒子がタバコカサネの増殖に及ぼす影響”, 日本植物学会第 78 回大会, 川崎 (2014.9), P-077.

大谷俊晴, 星 英之, 木下卓也, 武藤明徳, 徳本勇人, “金属ナノ粒子が動物の腸内細菌に与える影響の解析”, 環境微生物系学会合同大会 2014, 大阪 (2014.10), 講演要旨集, P18-4.

渡邊一史, 佐藤成朗, 野村俊之, 徳本勇人, “集積培養菌叢に対する酸化亜鉛ナノ粒子の毒性”, 環境微生物系学会合同大会 2014, 大阪 (2014.10), 講演要旨集, P18-6.

渡邊一史, 佐藤成朗, 野本健太, 野村俊之, 徳本勇人, “酸化亜鉛ナノ粒子が嫌気性微生物生態系に及ぼす変化”, 環境微生物系学会合同大会 2014, 大阪 (2014.10), 講演要旨集, P18-7.

徳本勇人, 星英之, 野本健太, 大谷俊晴, 新居靖崇, “食品添加物ナノ粒子がマウスの腸内細菌叢に与える影響の解析”, 環境バイオテクノロジー学会 2015 年度大会, 東京 (2015.6), 講演要旨集, P-30.