＜平成 27 年度助成＞

食品添加物ナノ粒子が引き起こす腸内細菌叢の変化とその解析

徳本　勇人
（大阪府立大学大学院 工学研究科）

1. 緒言

ナノ粒子（NPs）の製造技術の進歩に伴い、食感や色合いを向上させる食品添加物ナノ粒子が多数市販されるようになり、食事により摂取する頻度が増加している。しかし、既往の研究では、食品添加物 NPs をマウスに摂取させると、腸炎発生を予防する *Lactobacillus* 属が、腸内で有意に減少することなどが報告されており、安全面について懸念され始めている。本研究では、食品添加物ナノ粒子をマウスに経口投与し、糞便から腸内細菌叢の構成菌種の変化を解析するとともに、疾病に繋がるリスクについても検討を加えた。

2. 実験方法

2.1 TiO_2、SiO_2 、Fe_2O_3 NPs の経口投与実験

公称径 0.5 μm のアナターゼ型 TiO_2 NPs と公称径 0.8 μm の SiO_2 NPs、および公称径 0.3μm の Fe_2O_3 NPs の 3 種類の NPs について検討を行った。マウスの粉末飼料に、TiO_2 NPs は 0.05, 0.15, 1.0 %、SiO_2 NPs は 0.05, 0.15, 1.0 %、粒径 0.3 μm の Fe_2O_3 NPs は 0.014, 0.14%、粒径 1.0 μm の Fe_2O_3 NPs は 0.007, 0.07% の含有率で混錬し、飼料を調製した。この飼料をマウスに給餌し、排出された糞便に含まれる腸内細菌叢の発酵挙動と構成菌種の変動を解析した。マウスの健康状態は、体重変化と糞便の含水率を指標にした。

2.2 腸内細菌叢の構造変化

腸内細菌の DNA は MORA-EXTRACT kit を用いて抽出した。抽出した DNA を鋳型として PCR を行い、16S rRNA 遺伝子の可変領域である V3-V4 領域、約 460 bp の DNA 断片を増幅した。その後、次世代シークエンサーを用いて、PCR 産物の塩基配列を読み取り、腸内細菌叢内の微生物種の同定や存在比率を算出した。

2.3 腸内細菌の発酵挙動

容積 20.6 mL のバイアル瓶に、マウスより採取した糞便 300 mg と 5 g/L スキムミルク水溶液を全液量 10 mL で封入し、気相を窒素で置換した。嫌気条件下、37 ℃で静置培養を行い、発酵産物である気相のバイオガス生成量を GC で測定した。

3. 実験結果

3.1 TiO_2 NPs の経口投与実験

経口投与期間中、摂餌量、飲水量、糞便の含水率共に異常はなかった。**Fig. 1** に TiO_2 NPs 経口投与 21 日目における腸内細菌叢の構成菌種の存在割合を示した。 Control と比較すると、TiO_2 NPs の含有率が高くなるにつれて、*Lactobacillaceae* 科と *Bifidobacteriaceae* 科が減少するとともに *Clostridiales* 目が増加し、TiO_2 NPs の経口投与により腸内細菌叢が変化したことが示された。*Lactobacillaceae* 科と *Bifidobacteriaceae* 科の菌には、腸内有用菌として腸内腐敗菌の増殖を抑制し、腸内環境を整える働きがあると報告されている [1)]。一方、*Clostridiales* 目には酸を生成する主要な腸内腐敗菌が含まれることから [2)]、TiO_2 NPs により前者の菌の増殖が抑制されたことが、*Clostridiales* 目の増加に

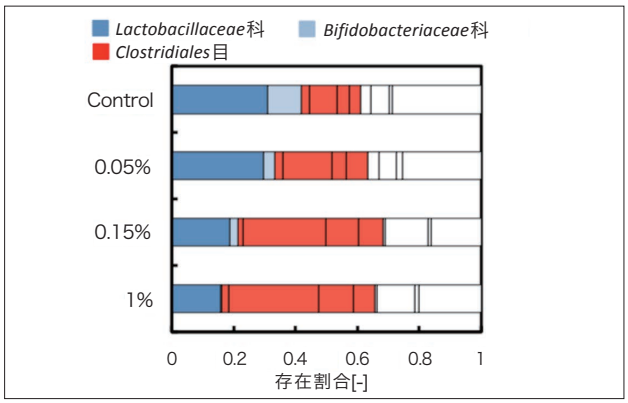

Fig.1　TiO_2NPs（粒径 0.5μm）を含有した飼料を経口投与した場合の、NPs 含有率ごとのマウス腸内細菌叢の構成菌種の存在割合

繋がったと考えられる。

次に、**Fig. 1** で同定された菌叢変化を発酵挙動から確認するために、TiO_2 NPs 経口投与 21 日目に採取した腸内細菌叢を 4 日間培養した時の、糞便 1 mg あたりのバイオガス生成量の経時変化を観察した（**Fig. 2**）。培養 4 日目の H_2 および CO_2 生成量は Control でそれぞれ 21.3、31.8 μL/mg-feces である一方、TiO_2 NPs 含有率 1 % の条件で 29.1、42.4 μL/mg-feces となり、TiO_2 NPs 含有率が高い条件ではバイオガス生成量が顕著に増加することが分かった。嫌気発酵の中間段階である酸生成過程において、嫌気性微生物は酢酸や H_2、CO_2 を生成する。*Clostridiales* 目はこの酸生成過程に関与しており H_2 や CO_2 を生成することから [3]、*Clostridiales* 目が菌叢中で優勢化したことで、H_2 と CO_2 生成量が増加したと考えられ、構成菌種の変化からの予測される結果と良い一致を示した。以上より、TiO_2 NPs が消化管を介して腸内に過剰量流入すると、腸内細菌叢中の腸内有用菌である *Lactobacillaceae* 科と *Bifidobacterium* 科が減少することで、腸内腐敗菌である *Clostridiales* 目が優勢化し、菌叢構造が変化すると示された。

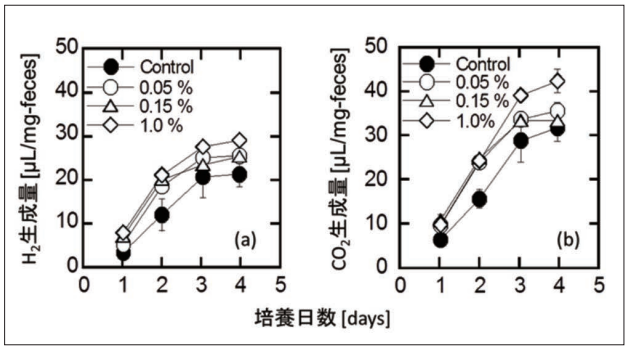

Fig.2　TiO_2NPs 投与マウスから採取した腸内細菌叢を用いた発酵試験における、(a) 水素、(b) 二酸化炭素生成量の経時変化（培養温度 37℃、エラーバーは独立した 3 サンプルの標準誤差を示す）

3.2 SiO_2 NPs の経口投与実験

経口投与期間中、マウスの摂餌量、飲水量、糞便の含水率共に異常は観察されなかった。**Fig.3** に SiO_2 NPs を 1% 含有した飼料を経口投与した条件の、腸内細菌叢の構成菌種の経時変化を示す。SiO_2 NPs 投与前は腸内有用菌である *Lactobacillaceae* 科の存在割合は 34% であったが、投与 28 日目では、*Lactobacillaceae* 科が 9% まで減少した。そこで、SiO_2 NPs 含有試料の投与を中止したところ、*Lactobacillaceae* 科の存在割合は 58% まで回復した。この結果から、SiO_2 NPs の投与により、腸内細菌叢中の *Lactobacillaceae* 科が顕著に減少することが示された。一方、腸内腐敗菌である *Clostridiales* 目の存在比率は変化が観察されなかった。

SiO_2 NPs 含有率 1% の飼料を経口投与した条件での、投与前、投与 28 日目、投与中止 17 日目に採取した糞便を 4 日間培養した時の、バイオガス生成量の経時変化を **Fig. 4** に示す。培養 4 日目における H_2 および CO_2 生成量は、投与前の腸内細菌叢でそれぞれ 10.8、25.6 μL/mg-feces、投与 28 日目のもので 9.2、26.4 μL/mg-feces、投与中止 17 日目では 9.6、24.8 μL/mg-feces となり、大きく変化しなかった。これは、TiO_2 NPs 含有飼料を投与した場合とは異なり、酸生成過程に関与して H_2 や CO_2 を生成す

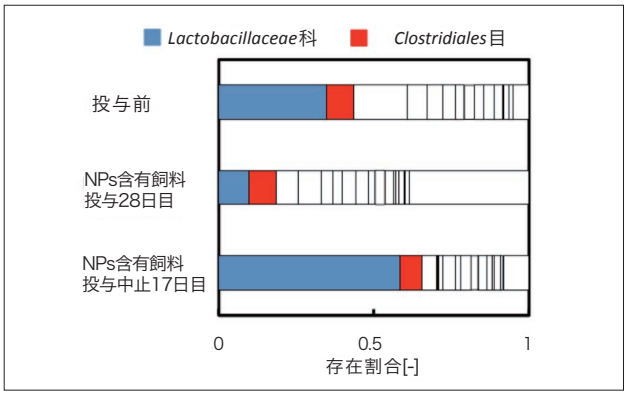

Fig.3　SiO_2NPs（粒径 0.8μm）を 1% 含有した飼料を経口投与した場合の、マウス腸内細菌叢の構成菌種の経時変化

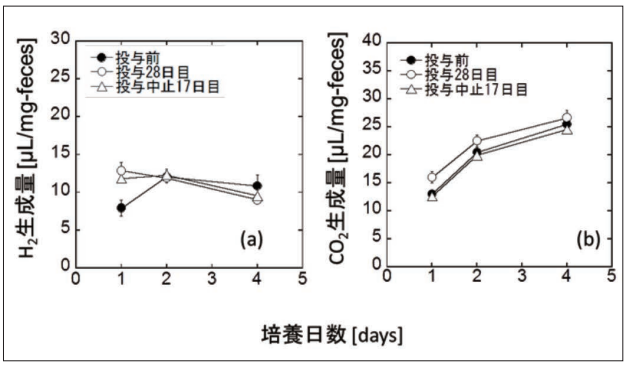

Fig.4　SiO_2NPs 投与マウスから採取した腸内細菌叢を用いた発酵試験における、(a) 水素、(b) 二酸化炭素生成量の経時変化（培養温度 37℃、エラーバーは独立した 3 サンプルの標準誤差を示す）

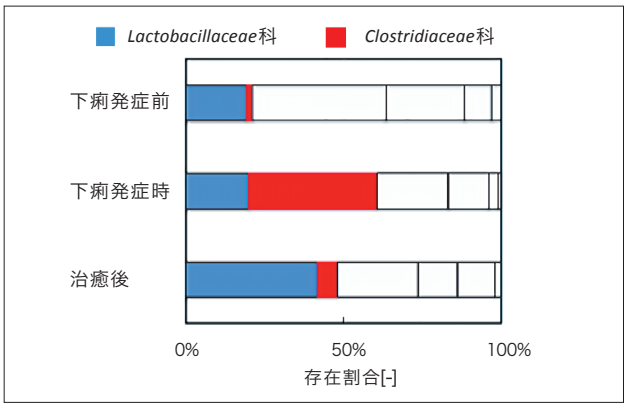

Fig.5　Fe_2O_3NPs（粒径 0.3μm）を 0.14% 含有した飼料を経口投与した場合の、下痢発症時およびその前後でのマウス腸内細菌叢の構成菌種の変化

る酸生成菌が腸内で増減せず一定量で存在していたことを示唆している。**Fig. 3** に示したように、嫌気発酵の中間段階である酸生成過程に関与し、酢酸や H_2、CO_2 を生成する *Clostridiales* 目の存在比率は変化がなかったことから、菌叢構造解析の結果と一致する結果が得られた。以上より、SiO_2 NPs が消化管を介して腸内に過剰量流入すると、腸内細菌叢中の *Lactobacillaceae* 科が減少し、腸内細菌叢の菌叢構造が変化するが、*Clostridiales* 目のような腸内腐敗菌の存在比率に与える影響は比較的小さいことがわかった。これは SiO_2 NPs が不溶性であり、なおかつ粒径も比較的大きいことから、腸内菌叢周囲の環境へ与える影響が小さいためであると考えられる。

3.3　Fe_2O_3 NPs の経口投与実験

粒径 0.3 μm の Fe_2O_3 NPs を 0.14% 飼料に含有させ投与すると、経口投与 11-15 日目にかけてマウスの体重が激減し、全てのマウスが下痢を発症した。この原因が Fe_2O_3 NPs による腸内細菌叢の変化にあるのではないかと考え、マウスが下痢を発症する前、発症した際、下痢から回復した後の糞便を採取し、腸内細菌叢における構成菌種の存在割合を測定し、**Fig. 5** に示した。図より、下痢を発症する前と治癒した後の腸内菌叢における、*Clostridiaceae* 科の存在比は数 % であったが、下痢を発症した際の腸内菌叢では *Clostridiaceae* 科の存在比が約 40% まで増加していた。*Clostridiaceae* 科には、*C. difficile* や *C. perfringens* など下痢の原因菌が多く分類されることが知られており、これらの菌が腸内細菌叢中で優勢化すると下痢の症状を発症する[4]。そのため、粒子径が比較的小さい Fe_2O_3 NPs を過剰に摂取したことで、*Clostridiaceae* 科が腸内細菌叢中で優勢化し、下痢が誘発されたと推測される。そこで、腸内菌叢の発酵挙動から菌叢構造の変化を確認することを目的として、経口投与 15 日目に排出された糞便を培養し、バイオガス生成量の経時変化を観察した（**Fig. 6**）。培養 7 日目における糞便 1 mg あたりの H_2 および CO_2 生成量は Control ではそれぞれ 2.5、14.9 μL/mg-feces であるのに対し、粒径 0.3 μm の Fe_2O_3 NPs を 0.14% 含有した飼料を投与した条件では、24.9、38.1 μL/mg-feces と大幅に増加し、*Clostridiaceae* 科による H_2、CO_2 生成量の劇的な増加を確認することができた。以上より、Fe_2O_3 NPs が消化管を介して過剰量流入すると、腸内細菌叢中の *Clostridiaceae* 科が優勢化して菌叢構造が変化し、

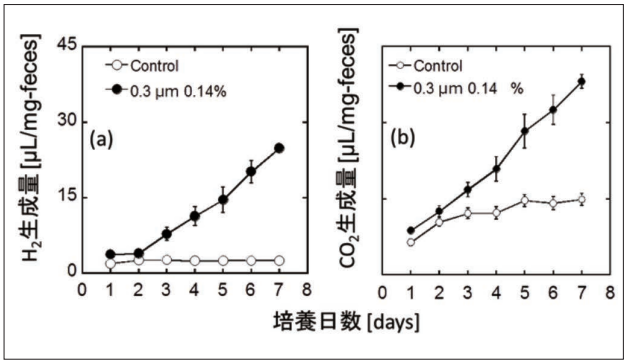

Fig.6　Fe_2O_3NPs 投与マウスから採取した腸内細菌叢を用いた発酵試験における、(a) 水素、(b) 二酸化炭素生成量の経時変化（培養温度 37℃、エラーバーは独立した 3 サンプルの標準誤差を示す）

マウスの下痢の原因となることが示唆された。これは Fe_2O_3 NPs が、SiO_2 NPs とは逆に粒径が小さく、また Fe が可溶性であるためだと考えられる。

以上の結果から、食品添加物ナノ粒子は、可溶性で粒径の小さなものほど、過剰摂取により腸内細菌叢の構造を大きく変化させ、下痢の原因菌である *Clostridiaceae* の優勢化により、消化器官に関連する疾病に繋がる恐れのあることが明らかとなった。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました 公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団ならびに関係者の皆様に篤く御礼申し上げます。

参考文献

1) H. Hove *et al*.（1999）European Journal of Clinical Nutrition, 53(5), 344-345
2) K. Ueki 嫌気微生物学 (1993)
3) Y. Zhang *et al*.（2015）Environmental Biotechnology, 99, 6091-6102
4) L. Marks *et al*.（2002）J Vet Intern Med, 16,533–540

Analysis of changes in the intestinal flora due to food additive nanoparticles

Hayato Tokumoto
Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University

Summary

Developments in nanoparticle (NP) production have resulted in the appearance of numerous food additive NPs in the market for the improvement of food texture and color, which are being consumed with increasing frequency. However, concerns exist regarding the risks of consuming these NPs. In this research, in order to study the effects of such NPs on the intestinal flora, three types of NPs, *viz.*, anatase TiO_2 NPs with a nominal particle size of 0.5 μm, SiO_2 NPs with a nominal particle size of 0.8 μm, and Fe_2O_3 NPs with a nominal particle size of 0.3 μm, were orally administered to mice, and the excreted feces were analyzed for intestinal flora. When either insoluble TiO_2 NPs or SiO_2 NPs were orally administered, the proportion of the useful intestinal bacteria, *Lactobacillaceae*, present in the intestinal flora decreased. Moreover, when only TiO_2 NPs were administered, *Clostridiales*, which cause diarrhea, exhibited a slight predominance, whereas this phenomenon was not seen with SiO_2 NP administration. However, when excessive soluble Fe_2O_3 NPs, whose particle size is small, was administered, there was a dramatic increase in the *Clostridiaceae*, and all of the mice developed diarrhea. These results indicate that the excessive consumption of soluble food additive NPs having a small particle size causes large changes in the intestinal flora composition, and there is a risk that these could lead to digestive tract disorders due to the increasing predominance of *Clostridiaceae*.