

写真 9. 培養細胞に 1000 nm シリカを 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処置
細胞質内にシリカが侵入している

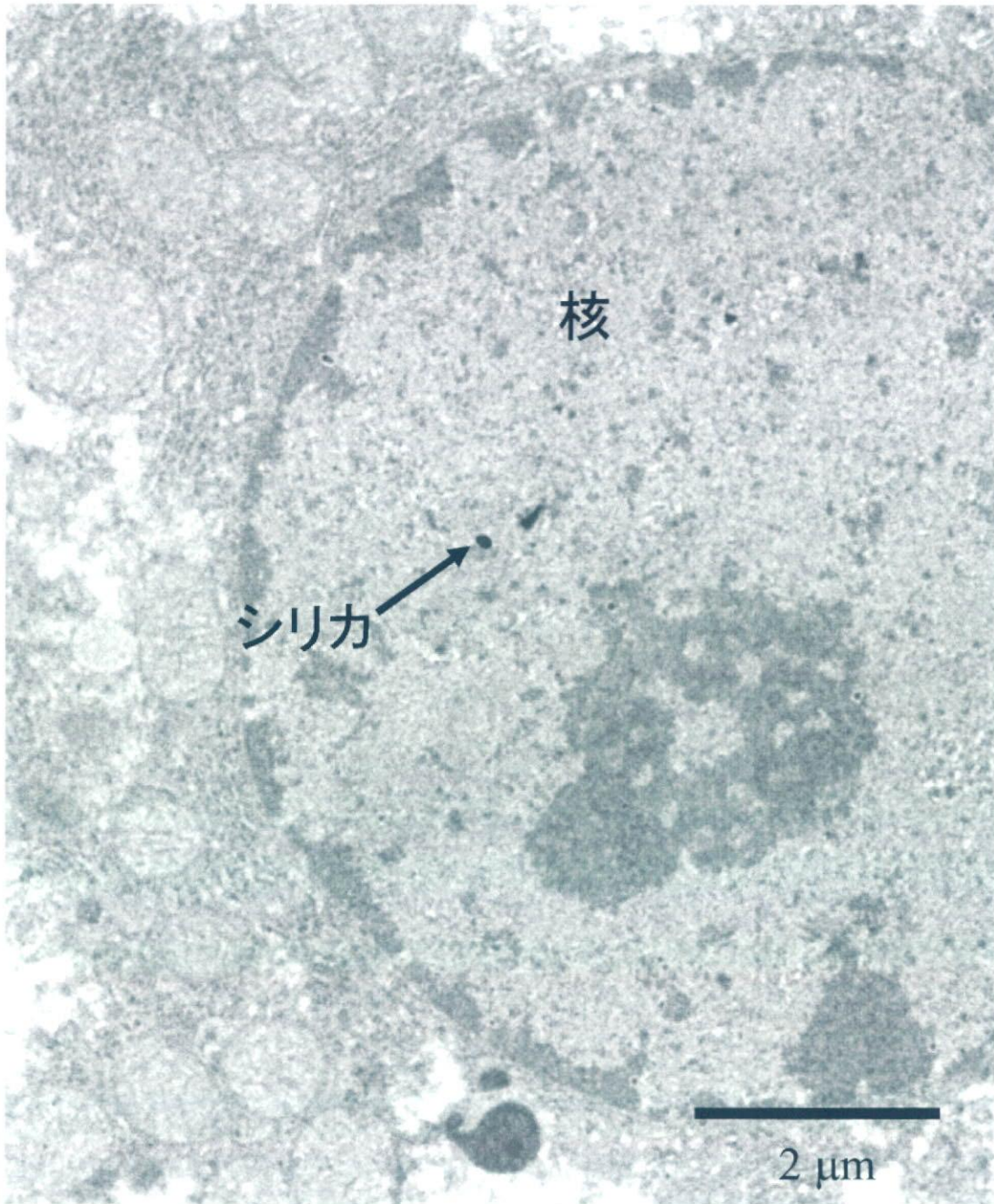


写真 10. マウス肝細胞、70 nm シリカを10 mg/kg 投与
核内にシリカが侵入している

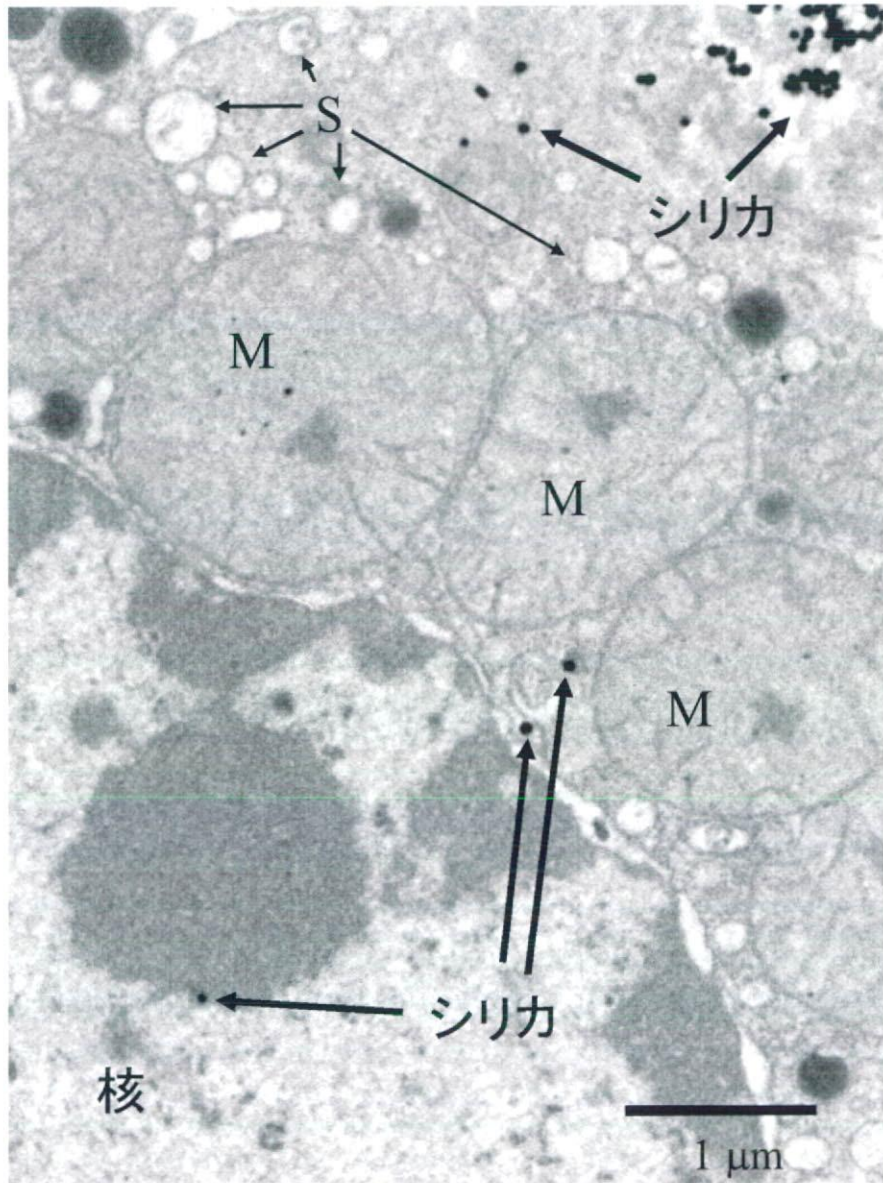


写真 11. マウス肝細胞、70 nm シリカ 100 mg/kg を投与、無染色
細胞質と核小体にシリカが侵入している。ミトコンドリア(M)内に沈着物、
細胞質に小管状物質(S)が見られる

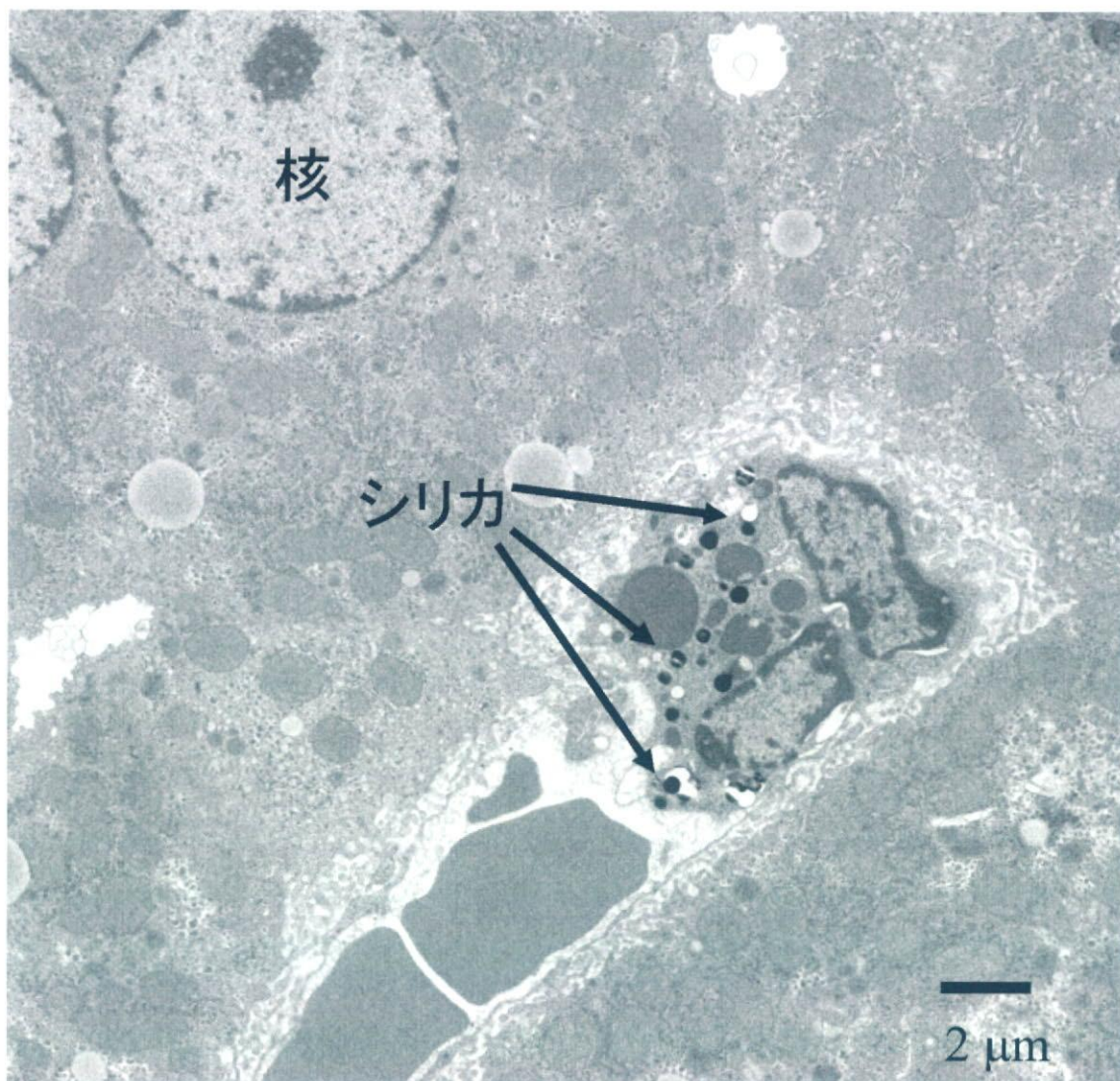


写真 12. マウス肝細胞 300 nm シリカ 10 mg/kg 投与
シリカはクッパー細胞に貪食されている

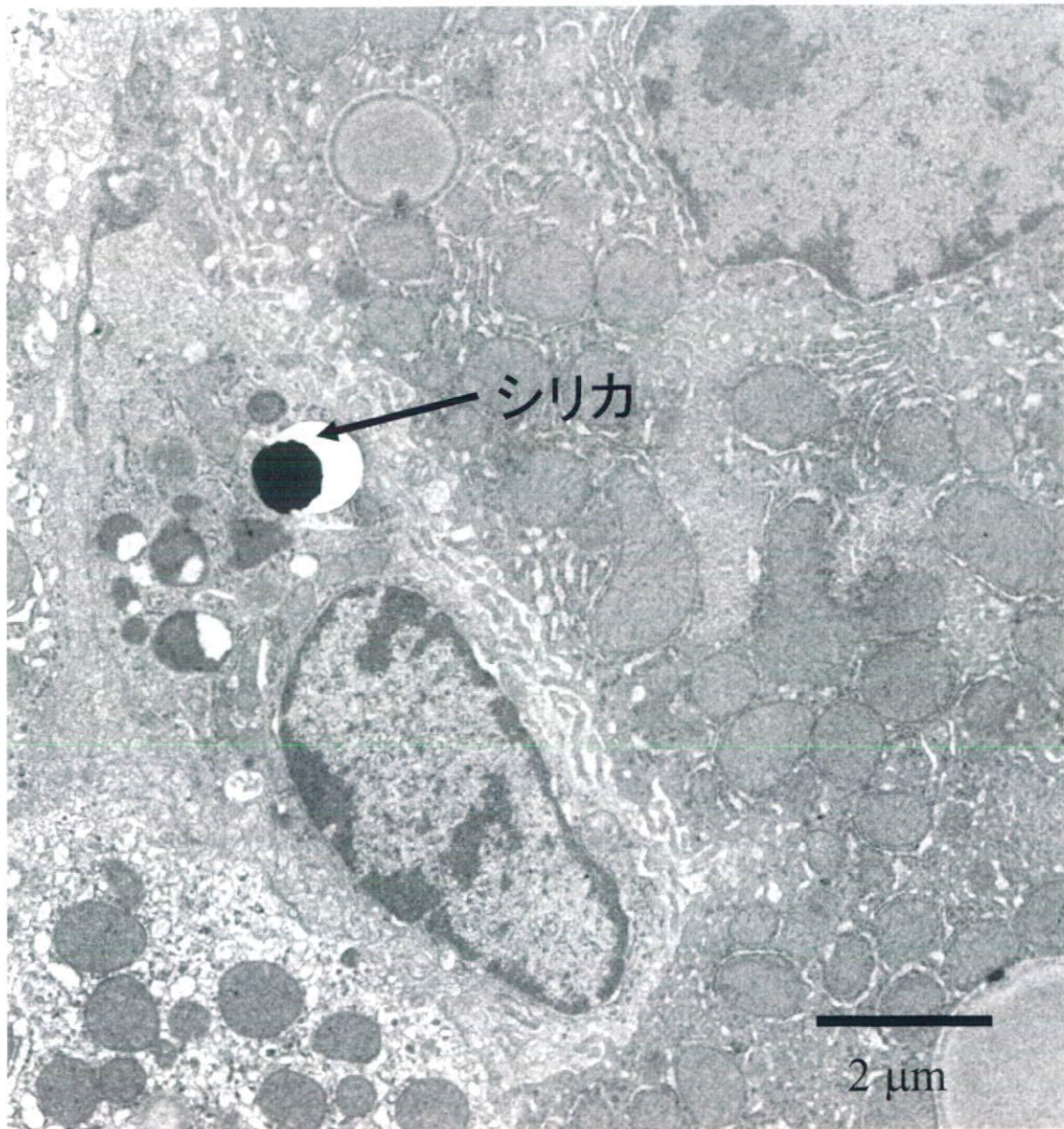


写真 13. マウス肝細胞 300 nm シリカ 10 mg/kg 投与
シリカはクッパー細胞に貪食されている

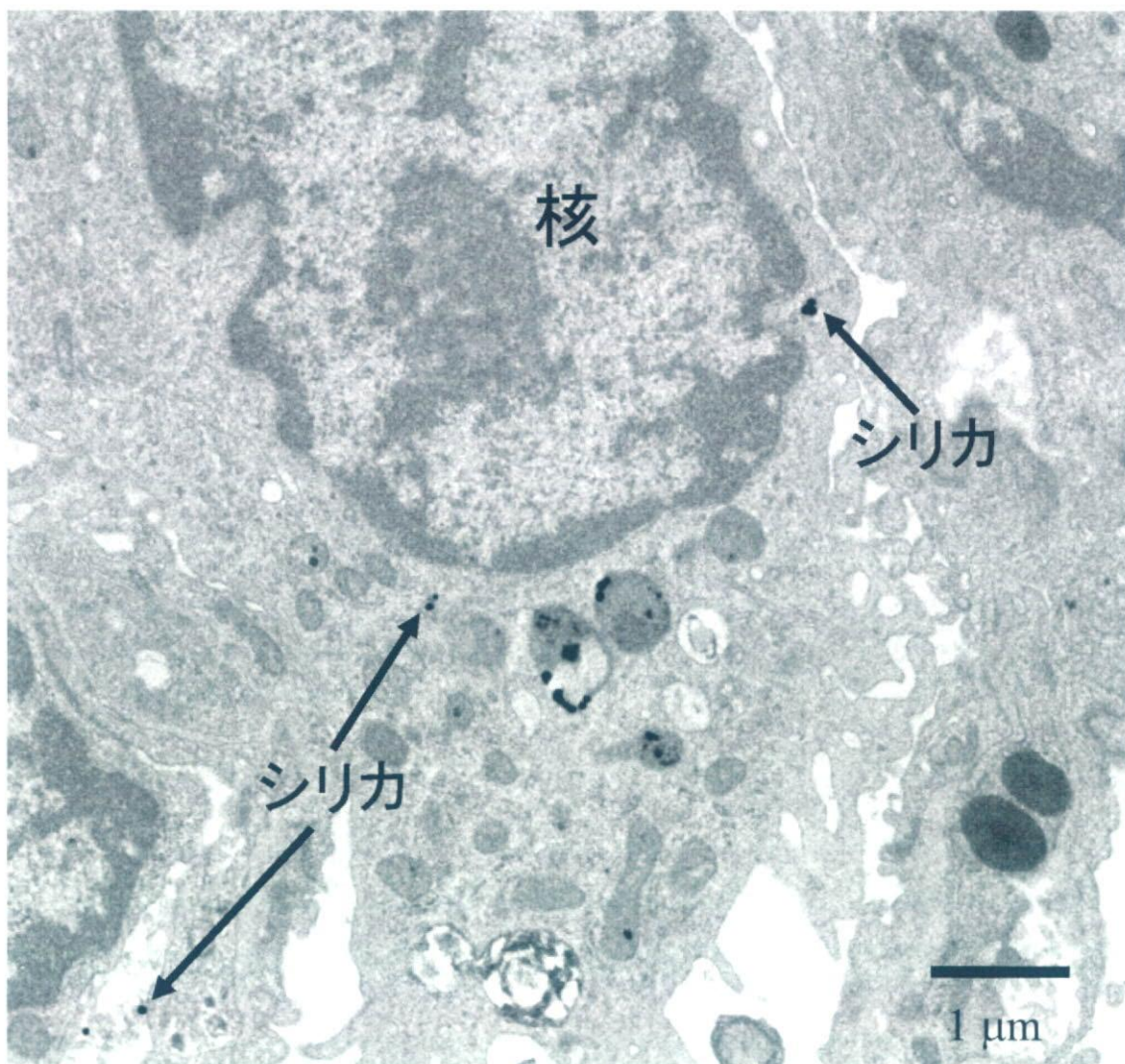


写真 14. マウス肺、70 nm シリカ 100 mg/kg 投与、無染色
肺胞上皮II型細胞に侵入している

ナノマテリアルの肝臓に対する安全性に関する研究

分担研究者 八木 清仁 大阪大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨

ナノマテリアルは次世代の万能素材として注目され、情報通信、バイオテクノロジー、医療など広範な分野においてすでに実用化されている。現在まで、ナノマテリアルの研究は機能面に焦点が当てられてきたが、最近、マクロマテリアルでは毒性を示さない素材がナノマテリアル化に伴い組織障害性を発揮することが示され、ナノマテリアルの安全性評価は社会的に大きな課題となっている。ナノマテリアルの呼吸器傷害など報告はされているが、人体の恒常性をつかさどる肝臓における安全性に関する報告は皆無である。本研究では、ナノマテリアルの肝臓に対する影響を主として研究を行った。ナノマテリアルとして既に化粧品などに使用されているシリカ (粒径 70、300、1000 nm) を用いた。ナノシリカをマウス (BALB/c, 8w, ♂) に尾静脈投与し、投与 24 時間後に肝傷害の指標である血清 ALT 値、腎傷害の指標である血清 BUN 値の測定を行った。結果、肝傷害の指標である血清 ALT 値は 70 nm ナノシリカ投与群でのみ大きく増加した。また、血清 BUN 値はナノシリカを投与した全てのマウスにおいて正常値を示した。更に、70nm ナノシリカの用量依存性の検討を行ったところ、用量依存的に血清 ALT 値が上昇した。これらのことから、肝臓に対してナノシリカが特異的に急性肝傷害を起こすことが示された。さらに、肝傷害を起こす薬物とナノシリカを併用したところ、肝傷害が増大する傾向が示された。以上のことより、ナノマテリアルの生体の肝臓に対する安全性の重要な知見が得られたと考えられる。

A. 研究目的

現在、世界的にナノテクノロジーが大きな注目を集め、次世代の主要技術として研究・開発が行われている。ナノテクノロジーは、ナノメートル単位 (nm : 1m の 10 億分の 1) の材料であるナノマテリアルの物性と構造を制御し、特異的性質を有する革新的なアプリケーションの創製である。例えば、フラーレン、カーボンナノチューブ、 dendrimer、量子ドットなど人工的に製造されたナノマテリアルは、その特異的物性のために電子機器、工学器械から医薬品、化粧品などの様々な分野において使用が試みられている。近年、急速に発展してきたナノテクノロジーによって、これまで地球環境上において存在しなかった人工加工されたナノマテリアルが、人類の生活圏に劇的に

増加する恐れがある。そこで、ナノマテリアルの安全性は国際的な課題となり、学際的領域が形成されつつあるが、研究成果の大きな発展は見られない。

ナノマテリアルの研究においては、生体内への進入経路、体内分布、肺における炎症作用などの報告があり、例を挙げると紫外線吸収素材であるナノフラーレンは皮膚に塗布すると、循環血を介して脳内に移行し、傷害性を示すことが示唆されている。しかし、工業的利用の視点からの応用研究は進んでいるが、細胞障害性、細胞透過性、さらに生体内の臓器に対する組織傷害性の研究は皆無である。

本観点から我々は、各種細胞株に対する細胞傷害性、さらに生体内で恒常性維持に主要な役割を

果たす肝臓におけるナノマテリアルの傷害性、沈着性、細胞内分布などの研究報告が皆無であることから、肝臓に対するナノマテリアル安全性評価・検討を *in vitro*、*in vivo* において行った。安全性を評価するモデルナノマテリアルとしては、規格品として一般に市販され、化粧品・UV カット剤中に添加されているナノシリカを用い、各種粒子径による安全性の評価を試みた。

B. 研究方法

B.1. ナノシリカ

本研究で使用したナノシリカ（商品名；sicastar[®] red-F、マイクロモッド社）は蛍光標識が付加されている粒径 70nm、300nm、1000nm を用いた。また、蛍光標識がされていないナノシリカ（商品名；sicastar[®] plain、マイクロモッド社）も粒径 70nm、300nm、1000nm を用いた。各粒径のナノシリカは、粒径測定装置（Zetasizer）を用い、平均粒径を確認し、実験に用いた。本報告書では、蛍光標識が付加されたナノシリカをナノシリカ、蛍光標識が付加されていないナノシリカを非標識ナノシリカと記載する。

B.2. ナノシリカ単回投与による肝臓に対する検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、70 nm シリカ（Lot:14798 40H）を 25、50、75、100 mg/kg b.w.、300 nm シリカ（Lot:09199 40G）・1000 nm シリカ（Lot:00607 40T）は 100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。ナノシリカは注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。投与 24 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40 分間室温で放置後、4°C 6000 rpm、10 min で遠心分離を行い、上清を血清として回収した。ナノシリカの肝臓への影響を評価するため、肝傷害の指標として血清中の Alanin aminotransferase (ALT) 活性の測定を行った。また腎傷害のマーカーとして血清中の Blood urea nitrogen (BUN) 値の

測定を行った。

B.3. ナノシリカの肝臓に対する用量依存性の検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、70 nm シリカを 0～60 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。シリカは注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。投与 12 時間後に心採血により血清を回収した。また、脱血後、肝臓を採取した。ナノシリカの肝臓への影響を評価するため、肝傷害の指標として血清中の ALT 値の測定を行った。加えて、血清中の炎症性サイトカインである IL-6、TNF- α 濃度、また BUN 値を測定し、さらに肝臓の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、組織傷害を観察した。

B.3. 腎・肺・脾臓の組織傷害の観察

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、70 nm シリカを 30 mg/kg、300・1000 nm シリカを 100 mg/kg の用量で尾静脈内に単回投与した。シリカは注射用水を用いて希釈し、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。投与 24 時間後に脱血後、腎臓、肺、脾臓また肝臓を採取し、HE 染色を行い、組織レベルでの傷害を解析した。

B.4. 非標識ナノシリカ単回投与による肝臓に対する検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、粒径 70・300・1000 nm の非標識ナノシリカ（sicastar[®] plain、Lot:06105 43T2、23601 43H、06105 43T2）を 30、50 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。シリカは注射用水を用いて希釈し、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。

投与 24 時間後に心採血により血清を回収した。ナノシリカの肝臓への影響を評価するため、肝傷害の指標として血清中の ALT 値と BUN 値の測定を行った。

B.5. ナノシリカによる炎症性サイトカインの発現

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、70 nm シリカを 30 mg/kg b.w.、300・1000 nm シリカを 100 mg/kg b.w. 尾静脈内に単回投与した。ナノシリカは注射用水を用いて希釈し、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。

投与 3、6 時間後に心採血により血清を回収した。ナノシリカの肝臓への影響を評価するため、血清中 IL-6、TNF- α 濃度の測定を行った。

B.6. 四塩化炭素の肝毒性に対するナノシリカの影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、四塩化炭素を 0.005 mL/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて 70 nm シリカを 20、30 mg/kg b.w.、300・1000 nm シリカを 100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。ナノシリカは注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の投与量で投与し、Control 群には注射用水のみ等量投与した。投与 24 時間後に心採血により血清を回収した。肝傷害の指標として血清中の AST、ALT 活性の測定を行った。

B.7. パラコートとシスプラチンの肝毒性に対するナノシリカの影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、パラコートを 50 mg/kg b.w. 用量で腹腔内に投与し、続いて 70 nm シリカを 10、20、30 mg/kg b.w.、300・1000 nm シリカを 40、100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。また、シスプラチンは 100 μ mol/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて 70 nm シリカを 30、40 mg/kg b.w.、300・1000 nm シリカを 40、100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。ナノシリカは注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の投与量で投与し、Control 群には注射用水のみ等量投与した。投与 24 時間後に血清を回収し、ALT 活性の測定を行った。

B.8. 肝実質細胞に対するナノシリカの影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウス (♂、8W) より肝実質細胞をコラゲナーゼ灌流法により採取した。96 穴プレート (FALCON) に肝細胞 (5×10^3 Cells/well) を播種し、細胞播種 6 時間後に粒径 70・300・1000 nm のナノシリカを濃度 0.1、1.0、10.0、50.0、100 μ g/ml を添加した。添加の際の培養液は William's Medium E を用いた。ナノシリカ添加 24、48 時間後に WST 法により生存細胞数を測定した。

B.9. Tight junction (TJ)に対するナノシリカの影響

96 穴プレート (FALCON) に Caco2 細胞 (1×10^4 Cells/well) を播種し、細胞播種 24 時間後に粒径 70・300・1000 nm のナノシリカを濃度 0.1、1.0、10.0、50.0、100 μ g/ml を添加した。添加の際の培養液は DMEM を用いた。ナノシリカ添加 24、72 時間後に WST 法 (細胞測定キット SF、ナカライ) により生存細胞数を測定した。さらに、Caco2 細胞を Transwell (Corning) に播種し、TER 値を安定後、粒径 70・300・1000 nm のナノシリカを 100 μ g/ml を添加し、添加 6、12、18、24 時間後の TER 値を測定した。

C. 研究結果

C.1. ナノシリカ単回投与による肝傷害

70 nm ナノシリカを 50、75、100 mg/kg 投与 24 時間後、これら 3 種類の dose で投与されたマウスはほとんどが死亡し、50 mg/kg 投与群において 1 匹生存しているのみであった。このため、70 nm 50 mg/kg 投与群では、生存していた 1 匹のマウスのみから血液サンプルを回収し、血清中の ALT 値の測定を行った。Fig.1 にナノシリカ投与 24 時間後の血清中の ALT 活性の測定結果を示した。70 nm 投与群では AST 値・ALT 値共に Control 群と比べて増加していた。一方、300・1000 nm 投与群では、ほとんど血清 ALT 値が増加していなかった。腎傷害の指標として、血清中の BUN 値を測定した。BUN は、血中の尿素窒素のことであり、腎臓に傷

害が起こると血中に溜まる物質である。そのため、BUN の血中濃度は腎傷害のマーカーとして一般的に用いられている。Fig.2 に結果を示した。70nm 投与群の血清 BUN 値は、Control 群と比較し、低かった。これは肝傷害によるためだと考えられる。300・1000 nm 投与群では、ほとんど血清 BUN 値が増加していなかったことから腎障害は、ないことが示された。

C.2. ナノシリカによる急性肝傷害の用量依存性

70 nm ナノシリカを用量 50・60 mg/kg b.w. で投与したマウスは、投与 12 時間後に 50 mg/kg b.w. 投与群において生存率 25 % (4 匹中 3 匹死亡)、60 mg/kg b.w. 投与群において生存率 0 % であった (4 匹中 4 匹死亡)。Fig.3 に 70 nm シリカを 0~40 mg/kg b.w. の用量で投与 12 時間後の血清中の ALT 活性の測定結果を示した。結果、ALT 活性は用量依存的に増加していた。Fig.4 に 70 nm ナノシリカを 0~40 mg/kg b.w. の用量で投与 12 時間後の血清中の IL-6・TNF- α 濃度の測定結果を示した。IL-6、TNF- α 共に用量依存的に増加した。Fig.5 に 70 nm シリカ投与 12 時間後の血清 BUN 濃度の測定結果を示した。血清 BUN 値の用量依存的な減少傾向が見られた。Fig.6 に HE 染色結果を示した。70 nm ナノシリカを 30, 40, 50 mg/kg b.w. の用量で肝細胞壊死を起こしている部位が観察された。

C.3. ナノシリカ単回投与による腎臓・肺・脾臓の組織傷害の観察

Fig.7 に腎臓、Fig.8 に肺、Fig.9 に脾臓、さらに Fig.10 に肝臓の HE 染色像を示した。70 nm ナノシリカ投与群においては肝臓で傷害が見られたが、他の 3 臓器に傷害は見られなかった。また、300・1000 nm ナノシリカ投与群は、肝臓、腎臓、肺において傷害は見られなかった。1000 nm ナノシリカ投与群の脾臓において巨核球の増加が見られた。

C.4. 非標識ナノシリカ単回投与による肝傷害

Fig.11 に非標識ナノシリカ投与 24 時間後の血清 ALT 活性の測定結果を示した。70 nm ナノシリカ投与群の ALT 活性は Control 群と比べて増加していた。一方、300・1000 nm ナノシリカ投与群では、ALT 活性は増加していなかった。Fig.12 に非標識ナノシリカ投与 24 時間後の血清 BUN 濃度の測定結果を示した。70・300・1000 nm ナノシリカ投与群全てにおいて、血清 BUN 値の増加は見られず、70 nm ナノシリカ投与群のみ減少傾向が見られた。

C.5. 炎症性サイトカインの発現

Fig.13 にナノシリカ投与 3、6 時間後の血清中 IL-6、TNF- α の結果を示した。300・1000 nm ナノシリカ投与群では、血清中 IL-6、TNF- α の大きな増加は見られなかった。一方、70 nm ナノシリカ投与群では、投与 3 時間後に血清中 IL-6、TNF- α が急激な増大を示し、6 時間後以降急速に減少していた。

C.6. 四塩化炭素とパラコート、シスプラチンによる肝毒性に対するナノシリカの影響

Fig.14 に四塩化炭素と各粒径のナノシリカ同時投与し、24 時間後の血清中の AST・ALT 活性の測定結果を示した。70 nm ナノシリカと四塩化炭素を併用することで、四塩化炭素単独投与群と比較し、有意に AST 活性の増加が見られ、また ALT 活性も増加する傾向が見られた。しかし、300・1000 nm ナノシリカと四塩化炭素の併用により AST、ALT 活性の有意な増大は示さなかった。Fig.15 にパラコートとナノシリカを同時投与し、24 時間後の血清中 ALT 活性の測定結果を示した。70 nm ナノシリカの 20、30mg/kg b.w. 投与とパラコートを併用することで、パラコート単独投与と比較し、ALT 活性が大きく増加する傾向であった。しかし、70 nm ナノシリカの 10mg/kg b.w. 投与量とパラコートの併用によっても、ALT 活性の増加傾向が見られた。300 nm ナノシリカとパラコートの併用による ALT 活性の増加は見られなかった。1000 nm ナノシリカとパラコートの併用により単独投与群と比較し、わずかに ALT 活性が増

加する傾向であった。

シスプラチンと 70 nm ナノシリカ 30、40 mg/kg b.w.を同時投与し、24 時間後、これらの用量で投与されたマウスは全て死亡した。Fig.16 にシスプラチンとナノシリカ同時投与し、24 時間後の血清中 ALT 活性の測定結果を示した。1000 nm ナノシリカとシスプラチンを併用することで、シスプラチン単独投与と比較し、ALT 活性の増加する傾向が見られた。一方、300 nm ナノシリカとシスプラチンの併用による ALT 活性の増加は見られなかった。

C.7. マウス肝実質細胞に対するナノシリカの影響

Fig.17 にナノシリカを添加し、24、48 時間培養したマウス肝細胞の生存率を示した。生存率は、添加していない Control 群を 100%し、各粒径のナノシリカを添加したときの細胞生存率を相対的に%で示した。各粒径のナノシリカを 1、10 μ g/ml にて添加した肝細胞の生存率は、コントロール群と同等であり、細胞毒性を示さなかった。各粒径のナノシリカを 100 μ g/ml にて添加した肝細胞の生存率は、コントロール群より大きく低下し、肝実質細胞に対し細胞毒性があることを示した。

C.8. TJ に対するナノシリカの影響

Fig.18 にナノシリカを添加し、24、72 時間培養した Caco2 細胞の生存率を示した。Caco2 細胞は TJ を有している細胞である。生存率は、添加していない Control 群を 100%し、各粒径のナノシリカを添加したときの細胞生存率を相対的%で示した。各粒径のナノシリカを 1、10、100 μ g/ml にて添加した Caco2 細胞の生存率は、コントロール群と同等であった。このことより、ナノシリカは、Caco2 細胞に対して細胞毒性がないことが示された。Fig.19 に TER 値測定結果を示した。各粒径のナノシリカを 100 μ g/ml 添加し、添加 12、18、24 時間後の TER 値を測定した。結果、ポジティブコントロールである C-CPE 添加群は TER 値が低下したが、ナノシリカ添加群は TER 値の低下はしな

かった。これらのことより、ナノシリカは in vitro において TJ に影響を与えないことが示された。

D. 考察

D.1. ナノシリカ単回投与による急性肝傷害

肝臓は、生体内で最大の臓器であり、機能は代謝、解毒、グリコーゲン、ビタミン類の貯蔵など多岐にわたるため、生体の恒常性維持に欠かすことができない重要な臓器である。ナノマテリアルが呼吸器や皮膚から、全身循環血液中に進入後に、全身の血液が集まる肝臓に集積し、何らかの傷害を及ぼすことは容易に想像ができる。シリカは、比較的安全性の高い物質であるため、現在、化粧品成分に混合され、市販をされている。しかしながら、ナノシリカの安全性についての報告は皆無である。そこで 70nm ナノシリカを投与したところ、50 mg/kg b.w. 以上投与するとほとんどのマウスが死亡した。この原因は、現段階ではっきりとしたことは言えないが、重篤な急性肝傷害が原因として考えられる。まだ、肝臓以外の臓器の傷害性などを検討しておらず、今後のさらなる検討が必要である。また肝毒性は、70 nm ナノシリカ 25 mg/kg b.w. 投与群でも Control 群と比較し、有意に ALT 活性が増加していた。また、300 nm シリカや 1000 nm シリカ投与群では、有意差はあるものの、ほとんど ALT 活性の増加は見られなかった。さらに、70 nm ナノシリカを 10~40 mg/kg b.w. 投与した場合の ALT 活性と肝組織像を解析した結果、70 nm ナノシリカは用量依存的に肝傷害を起こしており、血清中の炎症性サイトカインも用量依存的に増加した。また、血清 BUN 値は用量依存的に減少傾向が見られた。血清 BUN 値は、腎傷害により増加し、肝傷害により減少するため、70 nm ナノシリカ投与により BUN 値の低下は、肝傷害が原因である可能性がある。これらのことより、肝傷害を起こすのは、70nm ナノシリカのみであることが示された。300nm、1000nm のシリカはわずかであるが、血清中の ALT を増加させた、しかしながら、顕著な ALT 値の増加は示さなかった。これらは、組織中においてナノシリカの動態

を観察するために蛍光標識がされたナノシリカを用いた。70nm のナノシリカはローダミンが標識されている。この急性肝傷害が蛍光標識体の影響であることを否定するために、蛍光標識が付加されていない非標識体のナノシリカを用い実験を行った。結果、非標識 70 nm ナノシリカでは、30、50 mg/kg 投与群において Control 群と比較し、ALT 値が有意に増加していた。また、非標識体 300・1000 nm シリカ投与群では、ほとんど ALT 活性の増加は見られなかった。更に、BUN 値は 70 nm 投与群で、やや減少する傾向にあり、蛍光標識体と同様の結果となった。このことより蛍光物質ではなく、70 nm シリカにより急性肝傷害が誘導されると考えられる。

各臓器の HE 染色像から、肝臓においてのみ 70nm ナノシリカによる傷害が観察された。肺、腎臓、脾臓などにおいて、傷害は観察されなかった。これらは、臓器においてナノシリカの集積性の違いなどが考えられるが、肝臓特異的傷害については、今後更なる解析が必要である。また、心臓、腸、脳などの他の臓器に関しても詳細な解析が必要である。

ナノシリカ投与 3 時間後の血清中の IL-6 と TNF- α は、70nm ナノシリカ投与群において大幅に上昇していた。またこれらサイトカインは、投与 6 時間後には急激に減少した。70nm ナノシリカは、炎症性サイトカインの発現を誘導することが示された。肝毒であるコンカナバリン A は、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインを発現誘導し、肝傷害を与えることが報告されている。70nm ナノシリカによって発現する炎症性サイトカインが、急性肝障害に関与している可能性があると考えられる。

D.2.薬物との併用によるナノシリカの影響

四塩化炭素は、肝細胞のチトクロム P-450 により代謝され、トリクロロメチルラジカル ($\cdot\text{CHCl}_3$) となり肝毒性を発現する。このトリクロロメチルラジカルの化学反応が肝実質細胞に傷害を与え、肝傷害が誘導される。パラコートは、

除草剤などの農薬として使用され、本邦においては中毒死者数が年間 200 人に上る。パラコートは細胞内でラジカルを発生し、酸化ストレスが生じる。酸化ストレス時の活性酸素が肝実質細胞に対し、細胞傷害を示す。シスプラチンは、DNA に結合し細胞周期を休止状態に導く作用を持つ抗癌剤として臨床で用いられており、精巣癌、卵巣癌、子宮癌、肺癌等幅広い適応を持つ。しかし、シスプラチンは ROS と関連し、神経障害などの副作用があり、また ALT・AST 値が上昇することが報告されている。

これら 3 種類の薬剤との併用により、ナノシリカが肝臓に与える影響を検討した。

四塩化炭素とナノシリカの併用実験では、300、1000 nm シリカと比較し、70 nm ナノシリカは、四塩化炭素の併用による血清 AST・ALT 活性の増加が認められた。この併用による増加は、四塩化炭素による AST、ALT の増加と、70 nm シリカによる増加と考えられる活性であり、四塩化炭素の肝傷害作用と 70 nm シリカによる肝傷害作用により相加的に肝傷害が増加している可能性が考えられる。

パラコートとナノシリカの併用実験では、70、1000 nm シリカとパラコートの併用により、各々の単独投与よりも ALT 活性が増加していた。ナノシリカの併用によりパラコートの毒性が増強された原因として考えられることは、ナノシリカが細胞内において ROS 誘導作用があり、パラコートとの ROS 誘導作用を促進し、細胞内の ROS 産生が進行し、より強力な急性肝傷害を引き起こしたと考えられる。ナノシリカによる肝臓における ROS 誘導作用は、今後、解析する必要があると考えられる。

シスプラチンとナノシリカの併用実験では、70 nm ナノシリカとシスプラチンを併用することにより、70 nm ナノシリカの投与量が 20 mg/kg b.w. という低投与量でありながら、ほとんどのマウスが死亡した。しかし、このときの ALT 活性はそれほど高い値を示しておらず、70 nm シリカとシスプラチンの併用によりマウスが死亡した原因は、

肝臓以外の臓器または組織において致命的な毒性が発現したと考えられる。また、70nm ナノシリカ投与群のみマウスが死亡していることから、シスプラチンによるマウスの致命的毒性の発生は、ナノマテリアル特異的なものであると考えられる。

D.3. *In vitro* におけるナノシリカの影響

肝臓内には TJ があり、組織密着性が保持されている。しかし、Caco2 細胞を用いた TJ への影響を検討したところナノシリカは TJ への影響を示さなかった。さらに肝実質細胞に対するナノシリカの細胞傷害性は、3 種類の粒径、すべて同等であった。このことより、肝実質細胞に対し、ナノシリカの直接作用における細胞傷害性は同等であると考えられる。このために、*in vivo* における 70nm 特異的肝傷害は肝細胞に直接ナノシリカが作用していないことが示唆された。今後、肝臓に対するナノシリカの影響に対し、詳細なメカニズムの検討が必要である。

E. 結論

1. ナノシリカをマウスの尾静脈から投与することにより、70nm ナノシリカが肝傷害を起こすことが示された。
2. 肝傷害を起こす薬物とナノシリカの併用により、薬物の起こす肝傷害をナノシリカが増大させることが示された。
3. ナノシリカは粒径に関係なく肝実質細胞に対し細胞傷害性があることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

①論文発表

- (1) Katsuhiko Isoda, Noritaka Kagaya, Soichiro Akamatsu, Shinji Hayashi, Makoto Tmesada, Aiko

Watanabe, Masakazu Kobayashi, Yoh-ichi Tagawa, Masuo Kondoh, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi. Hepatoprotective Effect of Vitamin B12 on Dimethylnitr osamine-Induced Liver Injury ., *Biol. Pharm. Bull.* 31, 309-311 (2008).

- (2) Kiyohito Yagi, Midori Kojima, Suguru Oyagi, Etsuko Ikeda, Motihiro Hirose, Katsuhiko Isoda, Masaya Kawase, Masuo Kondoh, Hajime Ohgushi. Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine., *Yakugaku Zasshi.*, 128, 3-9 (2008).
- (3) Shinji Hayashi, Ayano Itoh, Katsuhiko Isoda, Masuo Kondoh, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi. Fucoidan partly prevents CCl4-induced liver fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.*, 580, 80-84 (2008).
- (4) Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi. The claudin family as a new approach for drug delivery. *Drugs of the Future.*, 32, 1-5 (2007).
- (5) Masuo Kondoh, Makiko Fujii, kiyohito Yagi, Yoshiteru Watanabe. Barriology-based Strategy for drug Absorption. *Yakugaku Zasshi.*, 127, 601-609 (2007).
- (6) Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi. Tight Junction Modulator : Promising Candidates for Drug Delivery. *Curr. Medicin. Chem.*, 14, 2482-2488 (2007).
- (7) Motoki Harada, Masuo Kondoh, Akane Masuyama, Tsuyoshi nakanishi, Naoki Utogushi, Yoshiteru Wtanabe. Effect of forskolin on the expression of claudin-5 in human trophoblast BeWo cells. *Phamizie.*, 62, 291-294 (2007).
- (8) Chiaki Ebihara, Masuo Kondoh, Motoki Harada, Makiko Fujii, Hiroyuki Mizuguchi, Shin-ichi

Tsunoda, Yasuhiko Horiguchi, Kiyohito Yagi, Yoshiteru Watanabe. Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin for modulation of tight junction. *Biochem. Pharmacol.*, 73, 824-830 (2007).

- (9) Motoki Harada, Masuo Kondoh, Chiaki Ebihara, Azusa Takahashi, Eriko Komiya, Makiko Fujii, Hiroyuki Mizuguchi, Shin-Ichi Tsunoda, Yasuhiko Horiguchi, Kiyohito Yagi, Yoshiteru Watanabe. Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Biochem. Pharmacol.*, 73, 206-214 (2007).

②学会発表

西森光、磯田勝広、近藤昌夫、今澤孝喜、角田真一、堤康央、八木清仁; ナノシリカの急性肝毒性と粒子径の相関; 日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜(予定)

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

なし

②実用新案登録

なし

③その他

なし

I. 研究協力者

近藤昌夫 大阪大学大学院薬学研究科 准教授

磯田勝広 大阪大学大学院薬学研究科 助教

西森光 大阪大学大学院薬学研究科 博士前期課程
2 年

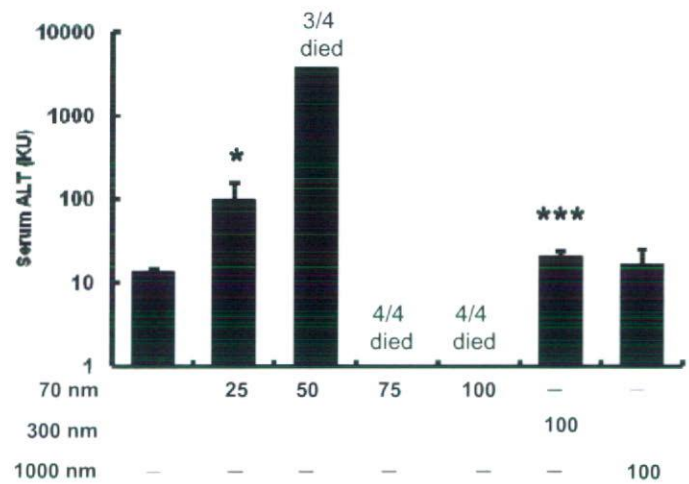


Fig.1. Acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Mice were injected labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, Serum ALT level of mice was measured. Each point represents the mean \pm S.D.(n=4) * : $p < 0.05$ vs. Control *** : $p < 0.005$ vs. Control

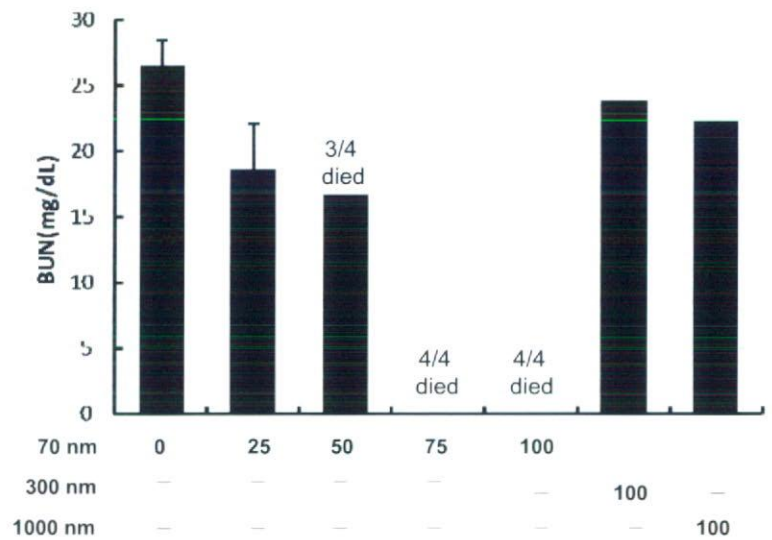


Fig.2. Acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Mice were injected labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, Serum BUN level of mice was measured. Each point represents the mean \pm S.D.(n=4)

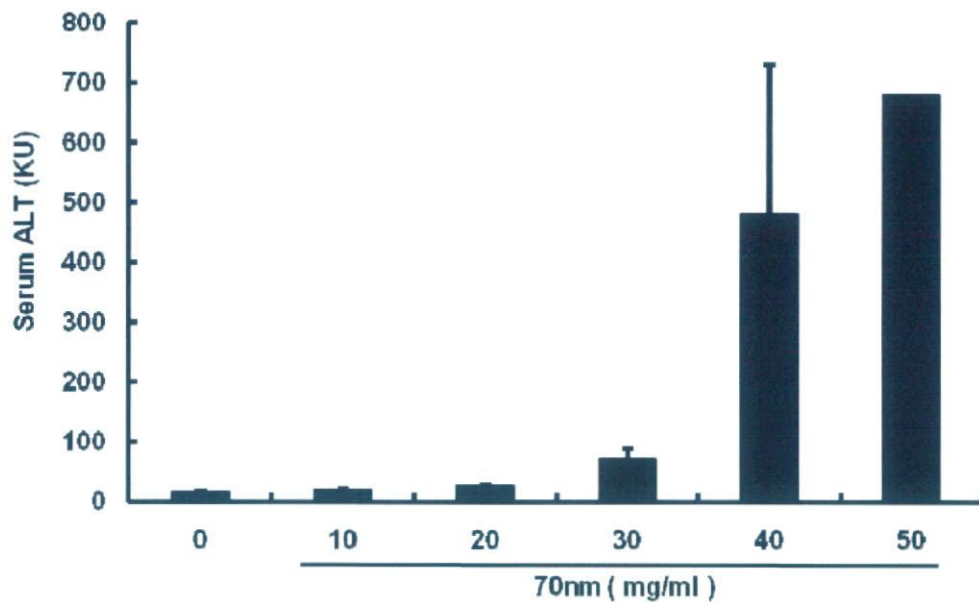


Fig.3. Dose dependency of acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Mice were injected labeled 70 nm silica intravenously (0 to 50 mg/kg body weight). After 12 hours, Serum level in mice was measured. Each point represents the mean \pm S.D.(n=4)

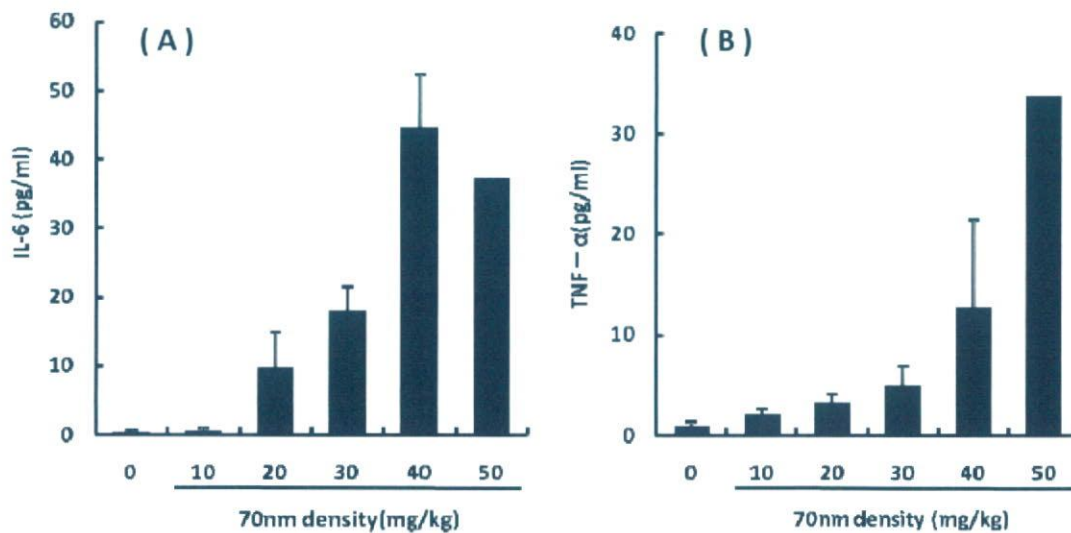


Fig.4. Dose dependency of acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Mice were injected labeled 70 nm silica intravenously (0 to 50 mg/kg body weight). After 12 hours, concentration of IL-6 (A), TNF- α (B) in mice was measured. Each point represents the mean \pm S.D.(n=4)

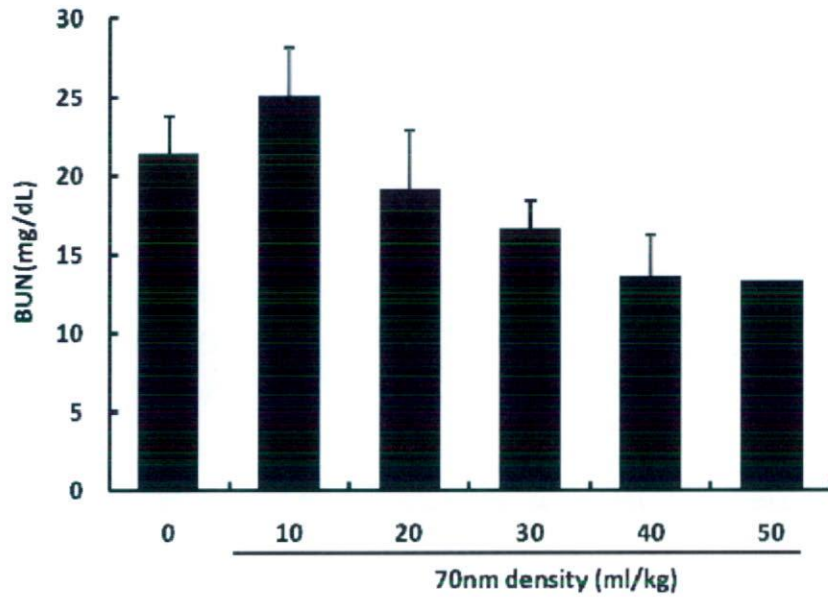


Fig.5. Dose dependency of acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Mice were injected labeled 70 nm silica intravenously (0 to 40 mg/kg body weight). After 12 hours, Serum BUN in mice was measured. Each point represents the mean \pm S.D.(n=4)

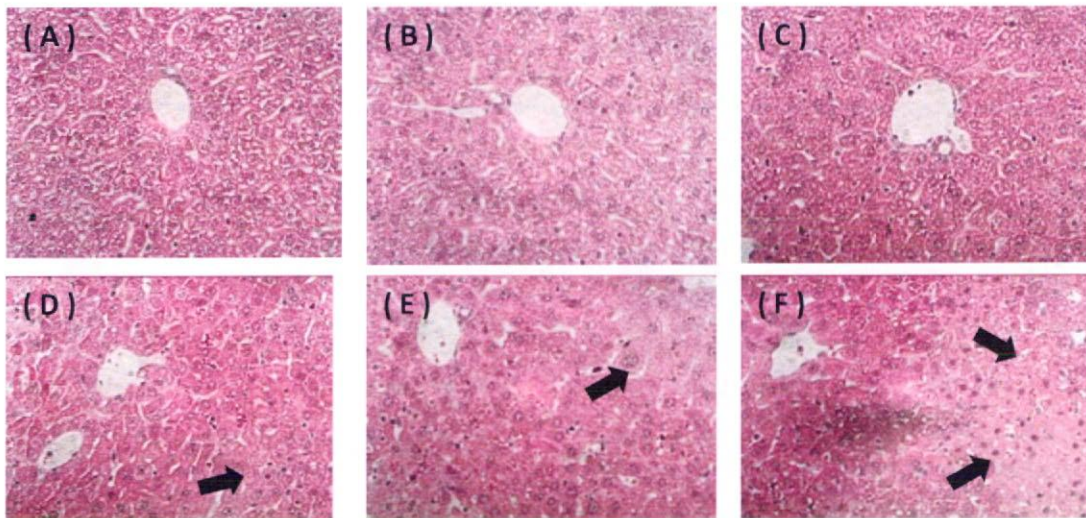


Fig.6. Dose dependency of acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Liver samples were obtained 12 hours after labeled 70 nm silica intravenous injection from untreated (A), 70 nm silica 10, 20, 30, 40, 50 mg/kg b.w. injected mice (B, C, D, E, F). The arrows was a part becoming the liver injury. ($\times 400$)

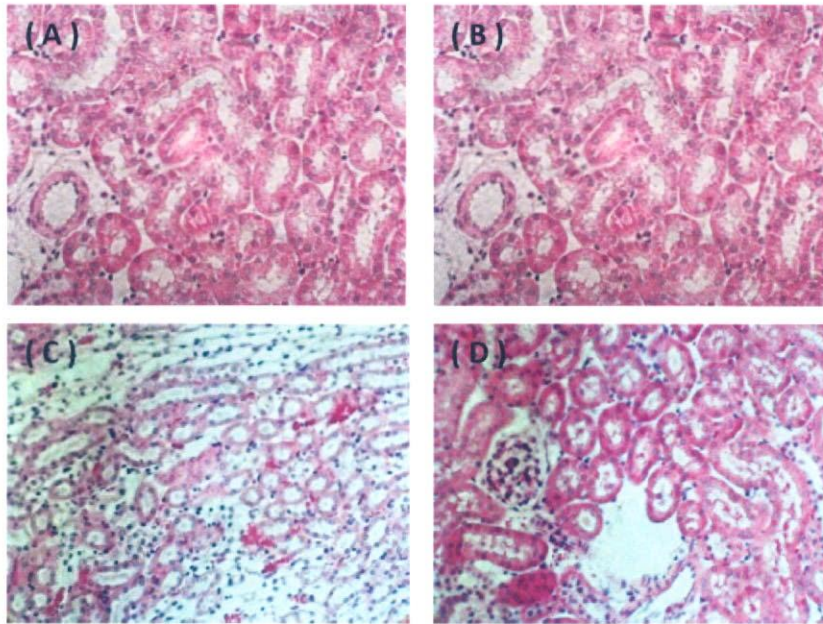


Fig.7. Acute kidney injury in mice treated with labeled nano-silica. Kidney samples were obtained 24 hours after labeled nano-silica intravenous injection from untreated (A), 70 nm-silica 30 mg/kg b.w. (B), 300 nm-silica 100 mg/kg b.w. (C), 1000 nm-silica 100 mg/kg b.w. (D) injected mice. ($\times 400$)

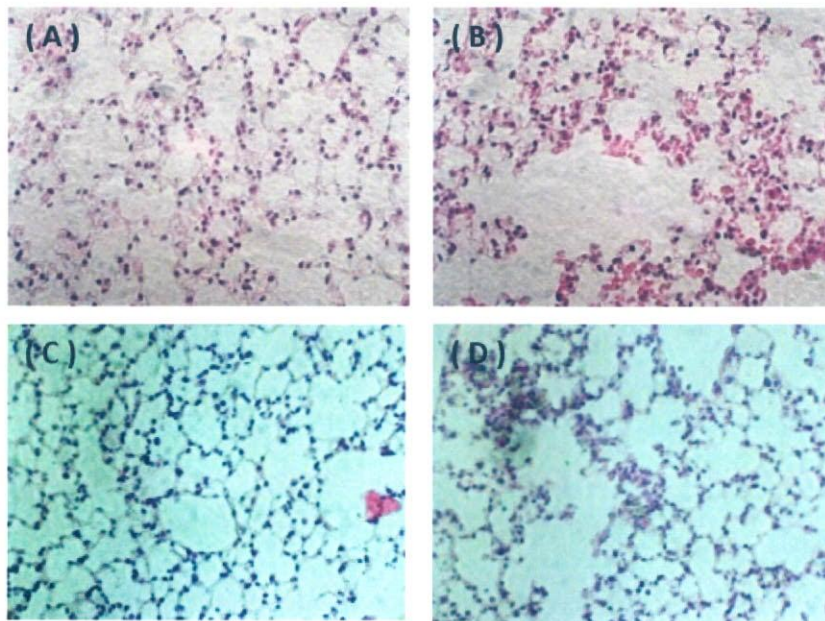


Fig.8. Acute lung injury in mice treated with labeled nano-silica. Lung samples were obtained 24 hours after labeled nano-silica intravenous injection from untreated (A), 70 nm-silica 30 mg/kg b.w. (B), 300 nm-silica 100 mg/kg b.w. (C), 1000 nm-silica 100 mg/kg b.w. (D) injected mice. ($\times 400$)

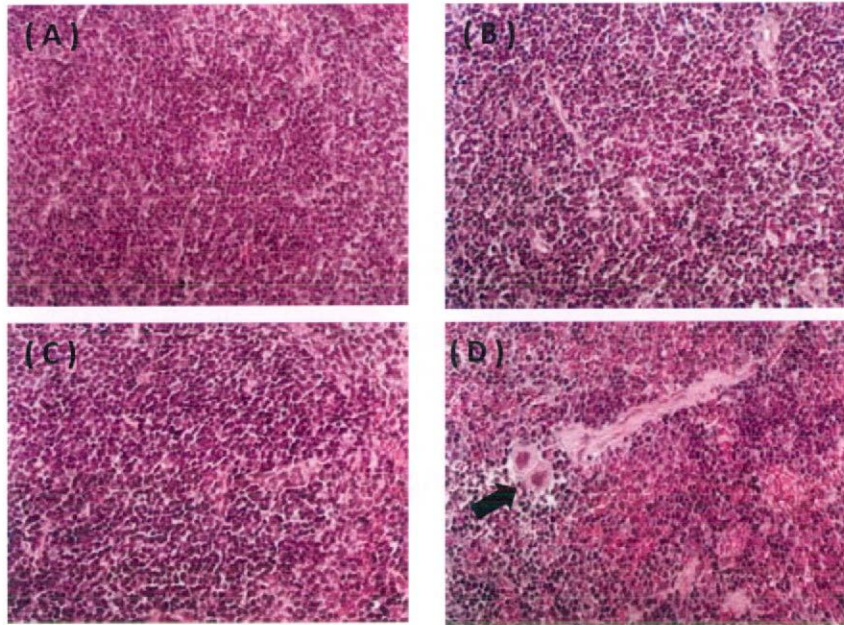


Fig.9. Acute spleen injury in mice treated with labeled nano-silica. Spleen samples were obtained 24 hours after labeled nano-silica intravenous injection from untreated (A), 70 nm-silica 30 mg/kg b.w. (B), 300 nm-silica 100 mg/kg b.w. (C), 1000 nm-silica 100 mg/kg b.w. (D) injected mice. The arrow was blood megakaryocyte.($\times 400$)

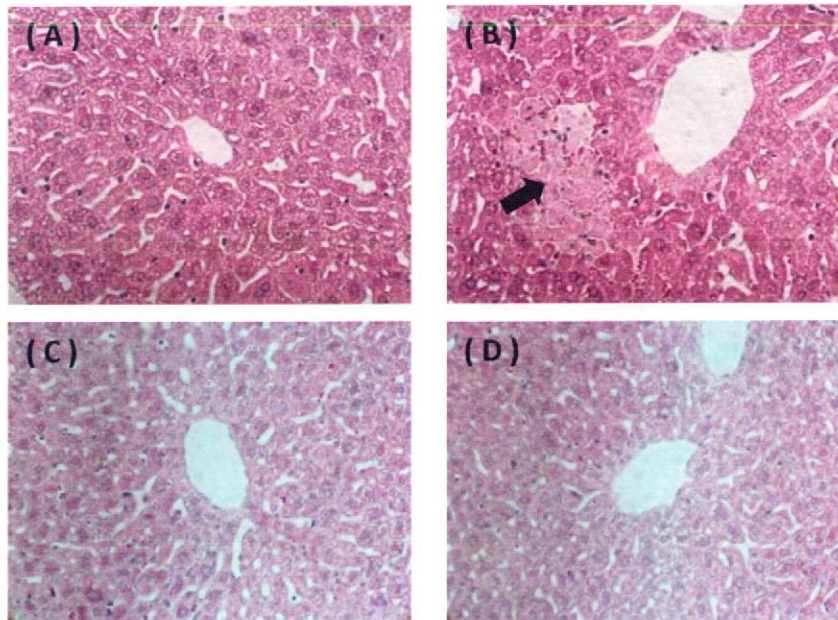


Fig.10. Acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Liver samples were obtained 24 hours after labeled nano-silica intravenous injection from untreated (A), 70 nm-silica 30 mg/kg b.w. (B), 300 nm-silica 100 mg/kg b.w. (C), 1000 nm-silica 100 mg/kg b.w. (D) injected mice. The arrows was a part becoming the liver injury. ($\times 400$)

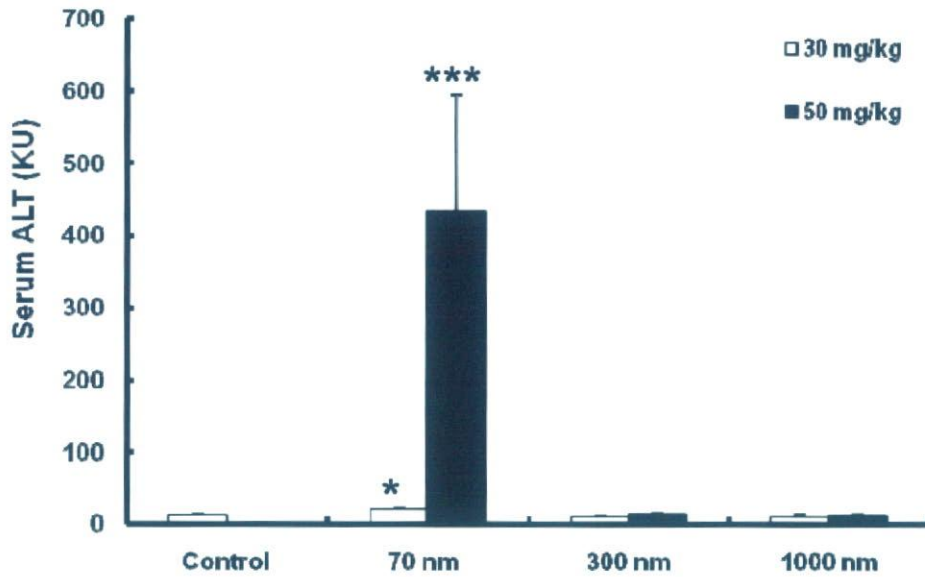


Fig.11 Acute liver injury in mice treated with non-labeled nano-silica. Mice were injected none-labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, SerumALT level of mice was measured. Each point represents the mean \pm S.D.(n=4). * $p < 0.05$ vs. Control . *** $p < 0.005$ vs. Control .

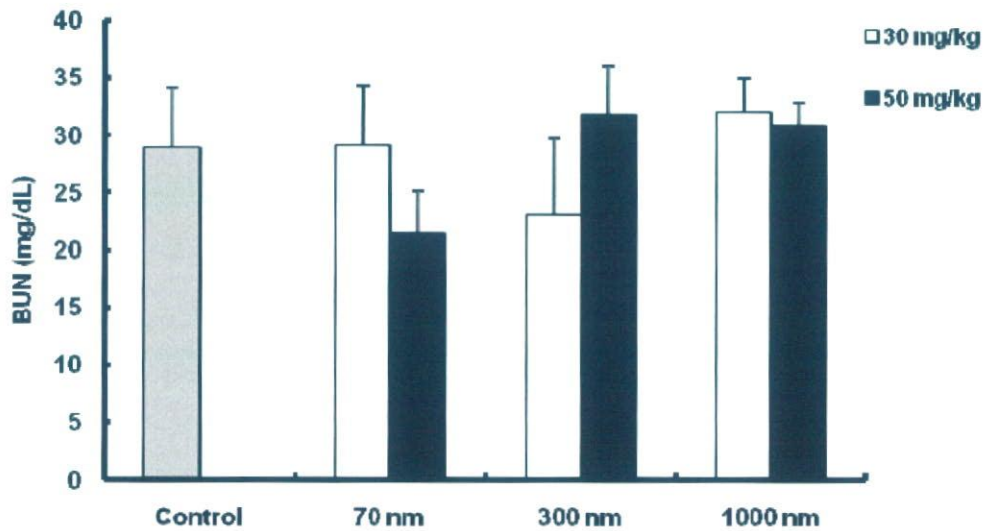


Fig.12 Acute liver injury in mice treated with non-labeled nano-silica. Mice were injected none-labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, Serum BUN level of mice was measured. Each point represents the mean \pm S.D.(n=4).