

## 非結晶性シリカの経皮リスクに関する研究

研究分担者 中川 晋作 大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野 教授

### 研究要旨

本研究は、ナノマテリアルを利用した香粧品を安全に、そして安心して使用するために、ナノマテリアルの経皮リスクに関する情報収集を行うことを目的とする。昨年度に、香粧品に含有されているシリカの粒子サイズを 70 nm にまで微細化することで、細胞傷害性ならびに皮膚透過性が増大することが示唆された。そこで本年度は、同様にシリカを用いて、その粒子サイズや表面電荷と皮膚透過性ならびに経皮リスクとの関連性評価に関する検討を行い、下記の結果を得た。

1. 70 nm, 300 nm, 1000 nm という異なった粒子径を有するシリカの *in vivo* 皮膚透過性評価を行い、アセトン/ジエチルエーテルで皮膚を前処理することで透過性を亢進させた場合に、70 nm サイズシリカが皮膚透過することが示唆された。
2. 表面電荷の異なる 3 種類の 70 nm サイズシリカ (SP70, SP70-C, SP70-N) を耳介皮膚に 28 日間連日塗布したマウスにおいて、どの粒子においても、顕著な皮膚刺激性を示さず、血中組織障害マーカー値ならびに各組織病理所見について異常値また異常所見は認められなかった。

以上の結果より、ナノマテリアルは、70 nm という微小サイズにすることで、皮膚を透過することが示唆されたが、長期間連日皮膚に暴露しても、皮膚への顕著な組織傷害性を示さなかった。しかしながら、皮膚を透過したナノマテリアルが皮膚深部やその他の組織に与える影響については未だ結論が出ていない。今後、皮膚透過量を定量的に解析するとともに、より微細な粒子サイズのシリカで同様の検討を行い、更なる情報集積が必要になると考えられる。

### A. 研究目的

近年、シリカや酸化チタンなどのナノマテリアルが香粧品や医薬品の有用素材として汎用されている。しかしながら、ナノマテリアルはその微小サイズゆえに、従来までのマイクロサイズのマテリアルとは全く異なる挙動を示すと考えられており、未知なるリスク (ナノリスク) を発現することが懸念されている。一方で、ナノマテリアル研究は実用化に向けた検討に偏重しており、現状ではリスク評価に関する研究は遅れている。特に香粧品類に関しては、連

日大量に皮膚に暴露することから、ナノマテリアルの皮膚に対する影響 (経皮リスク) に関する研究は必須項目である。本観点から我々は、粒子径の異なるシリカや表面修飾基を付与したシリカを用いて、その皮膚透過性ならびに経皮リスクに関する検討を行った。

### B. 研究方法

#### B-1. *In vivo* 皮膚透過性評価

ICR マウス (雌性、6 週齢) の耳介皮膚に、アミノ



フルオレセイン標識SP70、SP300、SP1000 (Corefront Co., JAPAN) を 125 µg/ear/day で 24 時間間隔、3 日間連続塗布した。このとき acetone/diethyl ether の 1:1 混合溶液を用いて皮膚を前処理することで、物質の皮膚透過性を亢進させた状態に塗布する群も取り、その影響についても評価した。最終塗布から 24 時間後に各々のマウスから耳を摘出し、腹側と背側にピンセットを用いて 2 層に分離した。それぞれの皮膚を 20 mM EDTA 溶液に浮かべ、37°C で 4 時間作用させた。その後、ピンセットを用いて真皮層を剥離し、表皮シートを調製した。調製した表皮シートを、核染色ならびにアミノフルオレセインの蛍光退色を防ぐために、Probing Gold anti-fade reagent with DAPI (Invitrogen) を用いてマウントすることで永久組織標本を作製し、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP2, Leica microsystems) にて観察した。なお、マウスがグルーミングなどをして塗布したシリカを取る、または皮膚を傷つけることがないように、塗布期間中は常に動物用ネックレスを付けた。

#### B-2-1. 長期間塗布による皮膚刺激性評価

ICR マウス (雌性、6 週齢) の耳介皮膚に、ローダミン標識 SP70、SP70-C、SP70-N (Corefront Co., JAPAN) をそれぞれ 125 µg/ear/day で 24 時間間隔、28 日間連続塗布した。このとき、塗布直後に動物用ネックレスを装着し、12 時間後にネックレスをはずす操作を行った。最終塗布から 24 時間後にシリカ塗布部位を観察し、Draize の評価基準に従って皮膚の紅斑や浮腫の程度をスコア化した。なお本実験においても B-1 と同様に、皮膚透過性を亢進させた群についても同様の検討を行った。

#### B-2-2. シリカを長期間塗布したマウスの病理組織学的検査

B-2-1 に記載したスケジュールでシリカを連続塗布したマウスから耳、肝臓、腎臓、脾臓、頸部リンパ節、肺、脳を回収した。各臓器を 10% 中性ホルマリン緩衝液に浸漬させて固定処理を行った。各組織のパラフィン包埋ならびに組織切片 (4 µm) を作製し、ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色した標本の

病理組織学的観察はアプライドメディカルリサーチに依頼した。また、このときに耳介の一部を用いて、B-1 に記した方法により表皮シートを作製し、共焦点レーザー観察用に組織標本を作製した。

#### B-2-3. シリカを長期間塗布したマウスの血清生化学的試験

B2-1 のスケジュールでシリカを連続塗布したマウスの腹部大動脈から血液を回収し、5000 rpm で 15 分間遠心操作を行うことで、血清サンプルを得た。回収した血清サンプルを用いて、肝障害マーカーとして GOT 活性と GPT 活性を、また腎障害マーカーとしてクレアチニン濃度を、トランスアミナーゼ CII-テストワコー、クレアチニン-テストワコー (WAKO, JAPAN) の実験操作方法に準拠して行った。

### C. 研究結果

#### C-1. *In vivo* 皮膚透過性評価

当初、ナノシリカの皮膚透過性を評価する実験系として皮膚凍結切片の蛍光顕微鏡観察により検討を行った。しかし、皮膚凍結ブロックを剥切する操作により、ナノシリカが移動するために、正確な局在を把握できない結果となった。そこで、剥切操作を用いない表皮シート作製し、蛍光顕微鏡観察する実験系で検討を行った。

粒子径の異なるシリカ (SP70, SP300, SP1000) を 3 日間連日塗布したマウスの表皮シートを共焦点顕微鏡観察した結果、acetone/diethyl ether 処理した皮膚に 70 nm シリカを塗布した場合にのみ、青色で染色された表皮層に緑色のシリカ由来の蛍光が観察された (図 1)。しかしながら、その他の粒子サイズでは同様の蛍光像は得られなかった。本結果より 300 nm、1000 nm サイズのシリカが皮膚を透過しないと結論付けることはできないが、いずれにせよ 70 nm サイズのシリカは皮膚透過性を向上させた状態において、皮膚を透過する可能性が示唆された。

#### C-2. ナノシリカ長期塗布による経皮リスク評価

表面修飾基の異なる 70 nm サイズのシリカ (SP70,



SP70-C, SP70-N) を 28 日間マウス耳介皮膚に連日塗布した際の経皮リスク評価として、①塗布部位の皮膚刺激性試験、②各主要臓器の病理組織学的評価、③血中組織障害マーカー評価という 3 項目について評価した。

#### C-2-1. 皮膚刺激性試験

シリカ塗布部位を観察し、Draize の皮膚反応の評価基準に基づいて、紅斑、浮腫の程度をスコア化することで皮膚刺激性を評価した。いずれのシリカを塗布した場合においても、スコア 1 以下であったことから、70 nm シリカは表面修飾基の有無に関わらず、皮膚刺激性は示さないと考えられる。(図 2) また、acetone/diethyl ether 処理をした皮膚に塗布した場合においても同様に皮膚刺激性は観察されなかったことから、シリカの皮膚透過を亢進させた、つまりより皮膚透過する条件化においても顕著な皮膚刺激性の変化は認められなかった。

#### C-2-2. 病理組織学的評価

各ナノシリカを長期間塗布したマウスから回収した各臓器の HE 染色像を観察し、病理所見をスコア化した。どのシリカを塗布した場合においても、何も塗布していないコントロール群と比較して、病理所見のスコアに変化は認められなかった。(図 3)

#### C-2-3. 血中組織障害マーカーの測定

同様に長期間シリカを塗布したマウスの血清中 GOT 活性、GPT 活性、クレアチニン濃度を測定した。いずれのシリカを塗布したマウスの各マーカーの値はコントロール群と比較して、有意な差は認められなかった。また、若干マーカー値が増加傾向にある群も見られたが、どれもマウス正常値範囲内であったことから、シリカを塗布することで、血清中の組織障害マーカーに影響を与えることはないことが示唆された。

#### D. 考察

70 nm サイズのシリカが皮膚を透過する可能性があることから、経皮リスク評価として、皮膚自体に

与える影響ならびにシリカが体内に入り、循環血中に移行した場合を考えて、全身に与える影響についても検討したが、とくに目立った傷害性を示さなかった。この結果は 70 nm シリカに表面修飾基を付与し、表面電荷が変化したシリカ (SP70-N, SP70-C) についても同様に顕著な組織傷害性を示さず、表面修飾基の有無による変化は認められなかった。これまでの *in vitro* の系において、シリカは高濃度領域においてのみ細胞傷害性を示すことを考慮に入れると、シリカ塗布による組織傷害性が認められなかったのは、シリカの皮膚透過量が非常に微量であったことが一つの要因として考えられるが、その微量の皮膚透過が生体に与える影響に関しては未解明である。今後は、電子顕微鏡による直接的な皮膚内部のシリカの検出、ならびに、皮膚を透過した量を定量的に解析する実験系を確立し、評価する必要があると考えられる。

また現在開発研究されている化粧品や医薬品類には、70 nm サイズ以下ならびに様々な修飾基を施したナノマテリアルが汎用されており、その皮膚浸透性を亢進させるために、経皮吸収促進添加剤を併用する場合もある。そこで今後はより微細な粒子サイズや様々な修飾基を施したナノマテリアルを用いた検討や、種々添加剤の併用による影響についての検討を行うことで、ナノマテリアルの物性や皮膚透過性と経皮リスクとの関連性を評価し、ナノマテリアルを含有した化粧品の安全・安心使用のための基礎情報の収集を図っていく予定である。

#### E. 結論

1. 70 nm, 300 nm, 1000 nm という異なった粒子径を有するシリカの *in vivo* 皮膚透過性を評価し、70 nm シリカが皮膚を透過する可能性が示唆された。
2. 70 nm シリカの長期塗布後の経皮リスク評価において、皮膚ならびに全身に対して際立った組織傷害性を示さず、その作用は表面修飾の有無に寄らないことが示唆された。

以上の結果より、70 nm という微小サイズのシリカは皮膚を透過する可能性を有するものの、皮膚刺激性という観点ではその影響は軽微であるものと考えられる。しかしながら、本結果は、一部のシリカが体内に侵入する可能性を示唆するデータであることから、今後、その皮膚透過量、血中移行量の定量や、より微細なサイズのシリカを用いた検討が必要であることが示された。

## F. 健康危険情報

該当事項なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

該当事項なし

### G-2 論文発表

- 1) 松尾一彦、免山智行、角田慎一、堤 康央、向 洋平、吉岡靖雄、岡田直貴、中川晋作 : ナノシリカの皮膚透過性と経皮リスクに関する基礎検討 (講演ハイライトに選定)、日本薬学会129年会、2009年3月、京都、発表予定

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H-1 特許取得

該当事項なし

### H-2 実用新案登録

該当事項なし

## I. 研究協力者

- 向 洋平 大阪大学大学院薬学研究科・助教  
岡田 直貴 大阪大学大学院薬学研究科・講師  
松尾 一彦 大阪大学大学院薬学研究科・博士後期課程1年  
石井 裕美子 大阪大学大学院薬学研究科博士前期課程2年  
川合 泰明 大阪大学大学院薬学研究科博士前期課程2年



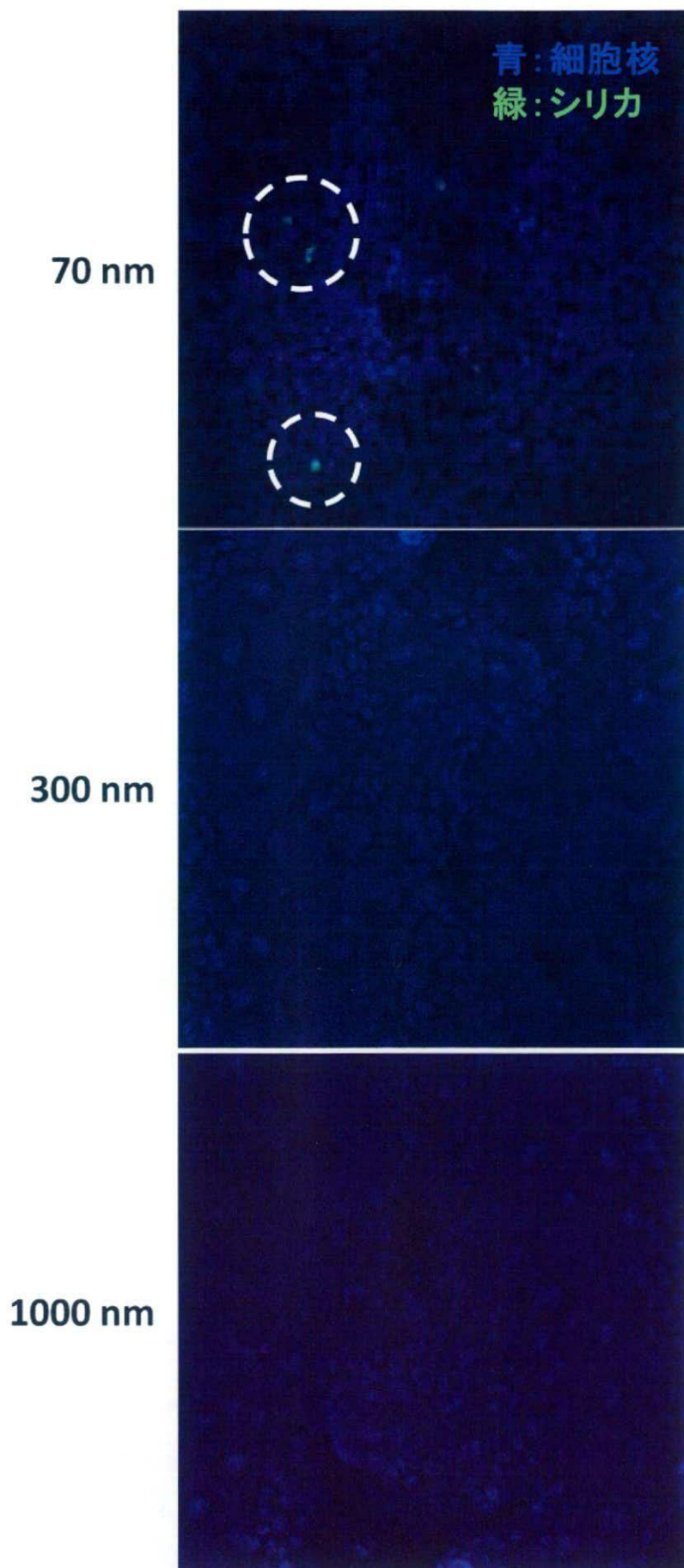


図1 シリカの *in vivo* 皮膚透過性評価



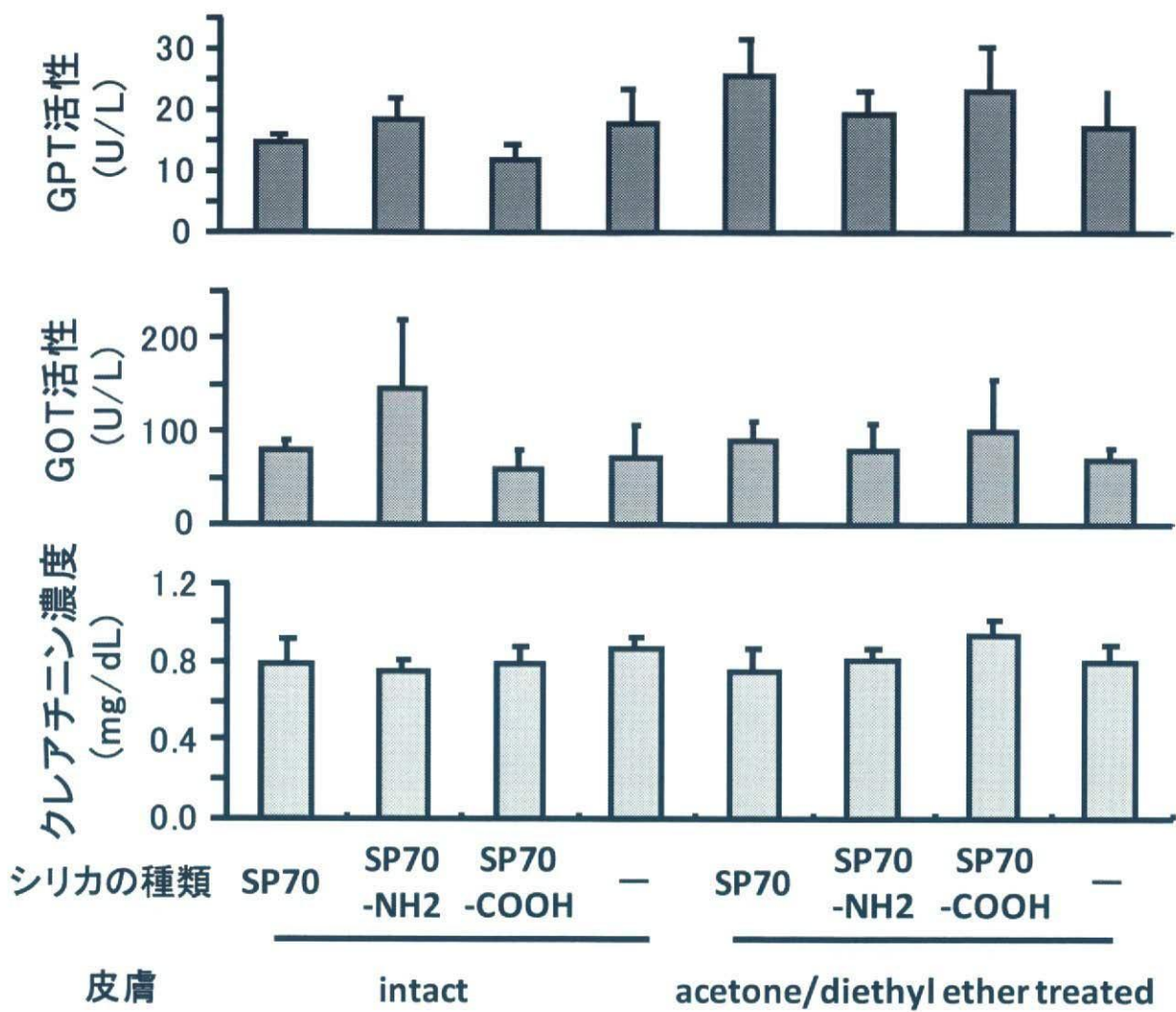


図3 シリカ長期間塗布マウスの血中組織障害マーカー値の測定



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
「ナノマテリアルの経皮毒性に関するトキシコキネティクスおよび  
トキシコプロテオミクス等の融合による有害性評価法・リスク予測法の開発」  
分担研究報告書

## ナノマテリアルの肝臓に対する安全性評価

研究分担者 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。昨年度、我々は肝臓に対してナノシリカ（粒径 70nm）が急性肝傷害を起こすこと、および化学物質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あることを見出した。本年度は、ナノシリカ頻回投与による慢性肝傷害の検討を行った。ナノシリカをマウス（BALB/c, 8w, ♂）に週 2 回 4 週間尾静脈投与し、マウス生存率、肝傷害の指標である血清 ALT、AST 値、腎傷害の指標である血清 BUN 値、および肝線維化の指標であるヒドロキシプロリン量の測定、組織染色による傷害性の観察を行った。結果、生存していたマウスにおいて、血清 ALT、AST 値は 70 nm ナノシリカ投与群において大きく増加した。さらに 70 nm ナノシリカ投与群は肝線維化が起こっていた。次に一般的なナノマテリアル粒子は粒子径 100nm 以下であることから、粒子径 100nm ナノシリカの肝臓に対する安全性を評価した。ナノシリカをマウス（BALB/c, 8w, ♂）に尾静脈投与し、投与 24 時間後に血清 ALT、AST 値の測定を行った。結果、70nm、100 nm ナノシリカの投与群は ALT、AST 値が上昇し、70nm ナノシリカが 100nm ナノシリカと比較して肝傷害は強かった。また、ナノマテリアルの表面性質と肝傷害の関連性を検討するために、ナノマテリアル表面に-COOH 基、-NH<sub>2</sub> 基（SP70-C、AP70-N）を修飾したナノシリカ粒子（粒径 70nm）の肝臓に対する安全性評価を行った。各ナノシリカをマウス（BALB/c, 8w, ♂）に尾静脈投与し、投与 24 時間後に血清 ALT、AST 値の測定を行った。結果、修飾体ナノシリカは、いずれのシリカ粒子も用量依存的に急性肝障害を示した。同一粒子径の比較では、肝傷害の強い順に並べると、SP70 > SP70-C > SP70-N であった。また、シスプラチンと、単独では影響を及ぼさない低用量の 70nm ナノシリカをマウスに投与することにより、肝傷害が起こることを見出した。以上のことは、粒子径と表面性質によるナノマテリアルの肝臓に対する安全性評価、ナノマテリアルと薬物の相互作用を検討する上で重要な知見になると考えられる。



## 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、特徴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、 dendリマー、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為的加工されたナノマテリアルが、人類の生活圏で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。

生体内で物質代謝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の安全性評価・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 カット製品中に添加されているナノシリカを用い、各種粒子径における安全性の評価を試みた。さらに表面に-COOH 基と-NH<sub>2</sub> 基を修飾したナノシリカを用い安全性評価を試みた。

## 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<sup>®</sup> 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、100nm、300nm、1000nm を用いた。また、粒子表面に-COOH と-NH<sub>2</sub> が修飾されたナノシリカ (商品名 ; sicastar<sup>®</sup> redF、マイクロモッド社) の粒径 70nm 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、未修飾体の粒径 70nm、100nm、300nm、1000nm ナノシリカを SP70、SP100、SP300、SP1000、粒子表面に-COOH、-NH<sub>2</sub> を修飾したナノシリカを SP70-C、SP70-N と表記した。

### B.2. ナノシリカ頻回投与の肝臓に対する影響の検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、SP70 (sicastar<sup>®</sup> red-F、Lot : 14798 40H) を 10、30 mg/kg b.w.、SP300 または SP1000 を 30、100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に週 2 回、4 週間 (計 8 回) 投与した。各ナノシリカは注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の用量で投与し、Control 群には注射用水のみ等量投与した。

最終投与 3 日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。また、心臓灌流により脱血後、肝臓、腎臓、肺及び脾臓を採取した。この 4 臓器に対するナノシリカの慢性毒性を評価するため、HE 染色を行い組織レベルでの慢性傷害の解析を行った。また、肝臓及び腎臓に対する慢性毒性を評価するため、肝傷害の指標として血清中の AST、ALT 活性の測定を、腎傷害の指標として BUN 値の測定を行った。更に肝臓に対しては線維化の度合いを検討するために AZAN 染

色及び Hydroxyproline (HYP) 量の測定を行った。

### B.3. 粒子径 100nm ナノシリカ単回投与の肝臓に対する影響の検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、蛍光標識された SP70 (sicastar®red-F, Lot: 14798 40H) を 40 mg/kg b.w. SP100 (Lot: 17898 40H) を 60 mg/kg, SP300 (Lot: 09199 40G) を 100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。さらに用量依存性を検討する為に SP100 を 100、80、60、40、20 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。

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 AST、ALT 活性の測定を行った。また、肝臓の障害を組織学的に評価するために HE 染色を行った。

### B.4. ナノシリカ誘導急性肝傷害のメカニズムの検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、各ナノシリカを投与する 30 時間前と 6 時間前に肝クッパー細胞阻害剤ガドリニウムクロライドを 10 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。ガドリニウムクロライド前投与後、SP70 を 30 mg/kg b.w.、SP300 または SP1000 を 100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。ガドリニウムクロライドは生理食塩水を用いて希釈後、2.5 mL/kg b.w. の用量で投与し、Control 群には生理食塩水のみ等量投与した。またナノシリカは注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の用量で投与し、Control 群には注

射用水のみ等量投与した。ナノシリカ投与 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。ガドリニウムクロライドを前投与したときの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 AST、ALT 活性の測定を行った。

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、各ナノシリカを投与する 24 時間前に肝類洞内皮細胞阻害剤シクロホスファミド (CPA) を 300 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に投与した。CPA 前投与後、SP70 を 30 mg/kg b.w.、SP300 または SP1000 を 100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。CPA は注射用水を用いて希釈後、30 mL/kg b.w. の用量で投与し、Control 群には注射用水のみ等量投与した。以下、上記と同様の方法で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.5. ナノシリカ投与に対する肝臓の透過型電子顕微鏡像の検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、蛍光標識された SP70 (sicastar®red-F, Lot: 14798 40H) を 40 mg/kg b.w.、SP300 または SP1000 (Lot: 09199 40G) を 100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。投与 24 時間後に肝臓サンプルを採取し、組織固定後、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、SP70 (sicastar®red-F, Lot: 14798 40H) を 30 mg/kg b.w.、SP300 または SP1000 を 100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に週 2 回、2 週間 (計 4 回) 投与した。各ナノシリカは注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の用量で投与し、Control 群には注射用水のみ等量投与した。投与 72 時間後に肝臓サンプルを採取し、組織固定後、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。



## B.6. 表面修飾ナノシリカ単回投与の肝臓に対する影響の検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、蛍光標識された SP70 (sicastar<sup>®</sup>red-F、Lot : 14798 40H) を 40 mg/kg b.w. の用量で、SP70-C(Lot : 06058 40-01) または SP70-N (Lot : 07028 40-01) を 60 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。さらに用量依存性を検討する為に各ナノシリカを 100、80、60、40、20 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。

投与 24 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、60 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・及び腎臓への影響を評価するため、AST、ALT を測定した。また、肝臓の傷害を組織学的に評価するために HE 染色を行った。

## B.7. ナノシリカの初代培養肝細胞に対する影響の検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスから、コラゲナーゼ灌流法により肝実質細胞を単離し、培養した。培養 6 時間後、無血清培地へ培地交換を行うとともに各ナノシリカ (SP70、SP70-NH<sub>2</sub>、SP70-COOH) を 0.1、1、10、50、100 µg/mL の用量で添加した。

ナノシリカの肝実質細胞に対する影響を検討するため、添加 24 時間後における肝実質細胞の生細胞数を WST assay を用いて解析し、コントロール群と比較することで細胞生存率を算出した。

## B.8. シスプラチンの肝毒性に対する SP70 の影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、シスプラ

チンを 50 µmol/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて SP70 (Lot : 14798 40H) を 1、3、10 mg/kg の用量で尾静脈内に投与した。シスプラチンは生理食塩水を用いて希釈後、20 mL/kg b.w. の投与量で投与し、シスプラチンを投与しない群には、生理食塩水のみ等量投与した。ナノシリカは注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の用量で投与し、Control 群には注射用水のみ等量投与した。また、SP70 の用量依存性を確認するためにシスプラチンを 50 µmol/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて SP70 (Lot : 14798 40H) を 0.5、0.1 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。

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。シスプラチンの副作用に対するナノシリカの併用の影響を、肝臓において評価するため、肝傷害、腎障害の指標として血清中の AST、ALT、BUN 活性の測定を行った。

## C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

## D. 考察

### D1. ナノシリカ頻回投与の肝臓に対する影響の検討

図 1 に各ナノシリカ頻回投与による生存率の変化を示している。SP70 を頻回投与したマウスは死亡しなかったのに対し、SP300 または SP1000 を 100 mg/kg b.w. 頻回投与することで、SP300 頻回投与マウスは 6 匹中 4 匹が死亡、SP1000 頻回投与マウスは全匹死亡した。これらのことより、マイクロマテリアルは大量頻回投与により致死毒性があった 30mg/kg 以下の用量で各ナノシリカを頻回投与した結果、全てのマウスが生存していた。次に図 2~5 に最終



投与 3 日後の HE 染色像を示した。図 2 に示している腎臓の組織像を観察したところ、いずれのナノシリカ投与群も Control 群と同様の組織像を示しており、傷害は観察されなかった。図 3 に示している脾臓の組織像を観察したところ、各ナノシリカを 30 mg/kg 投与した群において、巨核球やマクロファージの増加が認められるものの、傷害は観察されなかった。図 4 に示している肺の組織像を観察したところ、SP70 投与群は Control 群と同様の組織像を示しているにも関わらず、SP300、SP1000 投与群においては、肺血管の塞栓が見られた。図 5 に示している肝臓の組織像を観察したところ、SP1000 投与群は Control 群と同様の組織像を示しているにも関わらず、SP70 または SP300 投与群の組織像では小肉芽が観察され、SP300 投与群においては重度の細胞浸潤が観察された。

図 6A、6B に最終投与 3 日後の血清中の AST・ALT 活性の測定結果を示した。SP70 投与群ではいずれの投与量でも、Control 群と比べて AST・ALT 活性が増加していた。また、単回投与では毒性がほとんど見られなかった SP300 投与群でも AST・ALT 活性の増加が見られた。一方、SP1000 投与群ではほとんど増加していなかった。図 6C に最終投与 3 日後の BUN 量の測定結果を示した。今回、いずれの投与群においても BUN 量の増加は見られなかった。

図 7 に最終投与 3 日後の肝臓の AZAN 染色像を示した。SP300、SP1000 投与群は Control と同様の組織像を示しているのに対し、SP70 投与群では、投与量が 10 mg/kg b.w. でも青く染色されている線維化部分が観察された。図 8 に最終投与 3 日後の肝臓の HYP 含量を示した。SP300 または SP1000 投与群は Control 群と比較し同程度であるにも関わらず、SP70 投与群では、30 mg/kg b.w. 投与群のみならず、10 mg/kg b.w. 投与群においても増加が見られた。

ナノシリカ頻回投与の結果、肝臓に対しての慢性毒性は、SP70 の頻回投与群において、

10 mg/kg b.w. という少ない投与量でも、肝傷害のみならず、肝線維化が進行するという形で見られた。また、30 mg/kg b.w. 用量の SP300 頻回投与群では肝傷害が見られるものの、肝線維化は起こっておらず、SP1000 頻回投与群では肝傷害すら起こっていなかった。SP70 投与群では肝傷害、肝線維化が見られ、また SP300 では肝傷害のみが見られるという現象は、① SP70 のみ、肝星細胞を直接的に、もしくは他の細胞に肝星細胞を活性化する何らかの因子を放出させ、間接的に肝星細胞を活性化するために肝線維化が進行したという、SP70 特有の現象である可能性と、② SP70 は肝星細胞に作用するというわけではなく、単に肝実質細胞の破壊を繰り返すことで、肝星細胞が活性化され線維化が進行したのであって、SP300 も持続的投与により肝傷害が見られるため、今後投与し続けることにより線維化が発生するという、SP70 特有の現象ではない可能性がある。SP70 が他の粒子径のシリカよりも肝線維化を進行させることは間違いないが、今後 SP70 が肝星細胞に対して直接作用しているかどうか検討することも必要であると考えられる。

## D.2. 粒子径 100nm ナノシリ単回投与の肝臓に対する影響の検討

ナノマテリアルは粒子径が 100nm 以下の粒子である。前年度または前項の結果、粒子径 70nm ナノマテリアルには肝毒性があることが示された。そこで、ナノマテリアルの粒子径による肝毒性域値を検討するため、粒子径 100nm ナノシリカ (SP100) と SP70 の単回投与による肝臓に対する安全性を検討した。結果、図 9 において SP100 は SP70 と同様に AST、ALT の上昇が観察され尾静脈投与によって急性肝傷害が引き起こされることがわかった。SP300 では AST、ALT はほとんど上昇しておらず肝傷害は起きていないと考えられる。図 10 の HE 染色の結果から、SP100 は広範に肝細胞死を起



こしていた。これらのことより、粒子径 100nm 以下のナノシリカは急性肝傷害を惹起すると考えられる。図 11 には SP100 の用量依存性を検討した結果を示した。SP100 においても SP70 と同様に用量依存的に急性肝障害が引き起こされることがわかった。しかし、SP70 では 50 mg/kg 以上を投与すると全てのマウスが死亡してしまうのに対し、SP100 では 1 匹ではあるが最大用量である 100 mg/kg を投与しても生存しているマウスがいた。また、60 mg/kg まで AST、ALT の上昇が観察された。よって SP100 は単回投与において急性肝障害を引き起こすがその作用は SP70 に比べると小さいものであると考えられる。

### D.3. ナノシリカ誘導急性肝傷害に対するメカニズムの検討

ナノシリカの投与による肝毒性メカニズムを検討するために、肝非実質細胞であり異物食能をもつ肝クッパー細胞、および肝臓内の有窓血管を形成する類洞内皮細胞に着目をした。肝クッパー細胞阻害剤ガドリニウムクロライドと肝類洞内皮細胞阻害剤シクロホスファミド (CPA) を投与し、検討を行った。

図 12 にガドリニウムクロライド前投与後ナノシリカを投与した 24 時間後の血清中の AST、ALT 活性の測定結果を示した。Control 群ではガドリニウムクロライドを投与することにより、僅かではあるが AST、ALT 活性の増加が見られた。また、SP300 または SP1000 投与群においても同様の傾向が見られた。一方、SP70 投与群では、ガドリニウムクロライドを前投与することで、AST、ALT 活性の顕著な増加が見られた。これらのことより、クッパー細胞のナノシリカの取り込みが急性肝傷害を抑制している可能性が示唆された。

図 13 に、CPA 前投与後ナノシリカを投与した 24 時間後の血清中の AST、ALT 活性の測定

結果を示した。Control 群では CPA を投与することによる AST・ALT 活性の変化は見られなかった。また、SP300 または SP1000 投与群においても同様の傾向が見られた。一方、SP70 投与群では、CPA を前投与することで、AST、ALT 活性の顕著な減少が見られた。結果より、CPA を前投与することにより、SP70 の肝傷害が抑制されていたため、類洞内皮細胞の存在が急性肝傷害に関与している可能性が示唆された。

### D.4. ナノシリカ投与に対する肝臓の透過型電子顕微鏡像の検討

投与したナノシリカの肝臓における状態を解析し、肝細胞内におけるナノシリカの動態を検討するために、各ナノシリカを単回および頻回投与したマウス肝臓の透過型電子顕微鏡像を観察することにより検討した。

図 14、図 15 に SP70、SP300、SP1000 を単回投与した際の肝臓の透過型電子顕微鏡像を示した。図 14B においては細胞が白色になり肝細胞のネクロシスが確認された。図 14C においては肝類洞内皮細胞内に SP70 が蓄積し、さらに SP70 はディッセ空を通過し、肝細胞内に侵入してさらに核内にまで侵入していることが分かった。また、図 14D においては肝クッパー細胞内に SP70 が蓄積されていることが観察された。以上のことより、肝類洞内皮細胞が SP70 の肝細胞内の侵入に関与し、肝細胞内に侵入した SP70 はネクロシスを誘起することが示された。図 15 に示した SP300、SP1000 においては肝細胞内への侵入は確認されなかった。また、肝細胞ネクロシスも確認されなかった。以上のことからナノシリカの急性肝傷害は、細胞内への侵入によって与えられること、さらに侵入する経路は肝類洞内皮細胞が関与していることが直接的に示された。図 16 にはナノシリカ頻回投与 (4 回) した際の肝臓の透過型電子顕微鏡像を示した。図 16A において肝



類洞内にあるクッパー細胞に SP70 が多数取り込まれ、さらに周りにコラーゲン線維の蓄積が観察された。これによって SP70 が肝線維化を誘導することが示された。また、図 16B において SP70 の多量の蓄積により肝細胞が壊死していることが確認できた。さらに SP300、SP1000 においては肝細胞内への侵入は確認されなかった (図 16C, D)。

#### D.5. 表面修飾ナノシリカ単回投与の肝臓に対する影響の検討

ナノマテリアルは急速な技術発展により、粒子表面を改質し、粒子の物性を様々に変化させることが可能となっている。今後、表面を改質したナノマテリアルは益々、増加すると考えられる。そこで、同一粒子径のナノマテリアルの表面改質による肝臓に対する安全性評価は必要であると考えられる。SP70 と SP70-C、SP70-N の 3 種類の同一粒子径ナノシリカを用い、肝臓に対する安全性を検討した。

図 17 にシリカ粒子投与 24 時間後の血清中の AST、ALT 活性の測定結果を示した。SP70-N では AST 値では control 群と比較して上昇傾向が観察されたが有意差は認められなかった。また SP70-C では AST 値、ALT 値共に Control 群と比べ顕著に増加していた。さらに、SP70-N と SP70-C を比較したところ有意に SP70-C の方が高い AST、ALT 値を示した。(図 17A・図 17B) また、HE 染色を行ったところ図 18B 及び図 18D に示すように SP70 及び SP70-C では肝細胞の壊死像が観察され、SP70 の方がより広範囲に壊死像が観察された。しかし、図 18C にあるように SP70-N では壊死部分はほとんど観察されなかった。

次に SP70-C と SP70-N の用量依存性を検討した。SP70-C では 100 mg/kg 投与群は全てのマウスが死亡し、80、60 mg/kg 投与群で 4 匹中 1 匹が死亡した。SP70-N は用量依存的な AST、ALT の上昇が観察された。以上の結果、

SP70-C では 40 mg/kg まで、SP70-N は 60 mg/kg まで control 群と比較して肝障害が観察された。(図 19、図 20)

#### D.6. ナノシリカの初代培養肝細胞に対する検討

同一粒子径 SP70 の 3 種類のナノシリカにおいて *in vivo* で肝毒性があったことから、肝細胞に対する細胞傷害性を検討するために、初代培養肝細胞を用いて検討を行った。

図 21 の結果においてナノシリカの添加用量 100 µg/mL でのみ、いずれのナノシリカ粒子も肝細胞障害性を示した。これは *in vivo* の結果とも同様の結果である。しかし、*in vivo* では有意に SP70-N と SP70-C との間に差が見られたが、本検討では SP70 も含め各粒子間に差は見られず *in vivo* の結果とは異なる結果が出た。これは、まず今回の検討は単に生細胞数においてのみ評価をしたものであり、ROS 産生などの他のパラメータなどについても検討を行う必要がある。また、ナノシリカが直接的に肝細胞に障害を与えるだけでなくマクロファージなどの取り込みから炎症性サイトカインを誘導するなど二次的にも障害を発生させている可能性も考えられる。

#### D.7. シスプラチンの肝毒性に対する SP70 の影響

最後に、昨年度、SP70 (投与量 20 mg/kg b.w.) とシスプラチン併用により、マウスが致死をした。原因を検討するために SP70 の投与量を 10mg/kg b.w.以下にして検討を行った。結果、図 22A と図 22B において、シスプラチン (CDDP) との併用により、SP70 の 10 mg/kg b.w.投与群では AST が 4000、ALT が 2500 程度まで上昇し強い急性肝障害が観察された。また、SP70 の用量 1、3 mg/kg b.w.投与群では用量依存的に急性肝障害が観察された。また、BUN では CDDP 単独投与群と SP 併用群に優位な差は観察されなかった。(図 22C) さらに



SP70の用量下げた結果を図23に示した。SP70の0.1 mg/kg b.w.投与においてCDDP併用により肝障害が観察された。

シスプラチンは、基礎研究より肝傷害性発現機構としてヒドロキシラジカルを中心としたROS産生の増大や、アポトーシスの誘導などが知られており、これらの作用にシリカ粒子が影響を与えている可能性が考えられる。

## E. 結論

1. ナノシリカをマウスの尾静脈から週2回4週間、頻回投与することにより、SP70は慢性肝傷害と肝線維化を起こした。

2. SP100はマウスの尾静脈から単回投与することにより、急性肝傷害を起こした。SP100の肝傷害性はSP70と比較して軽度であった。

3. ナノシリカ肝傷害誘導には、シクロフォスファミドを用いた検討および透過型電子顕微鏡像より、肝類洞内皮細胞が関与していることが示唆された。

4. 修飾体ナノシリカ SP70-N、SP70-Cは、いずれのシリカ粒子も用量依存的に急性肝障害を示した。同一粒子径の比較では、肝傷害の強い順に並べると、SP70 > SP70-C > SP70-Nであった。

5. シスプラチンとSP70を併用することによって相互作用が観察され、肝傷害が増悪した。さらにSP70の低用量においてもシスプラチンとの併用により肝障害が観察された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

- (1) Azusa Takahashi, Eriko Komiya, Hideki Kakutani, Takeshi Yoshida, Makiko Fujii, Yasuhiko Horiguchi, Hiroyuki Mizuguchi, Yasuo Tsutsumi, Shin-ichi Tsunoda, Naoya Koizumi, Katsuhiko Isoda, Kiyohito Yagi, Yoshiteru Watanabe and Masuo Kondoh. Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 1639-1648 (2008).
- (2) Eri Arita, Masuo Kondoh, Katsuhiko Isoda, Hikaru Nishimori, Takeshi Yoshida, Hiroyuki Mizuguchi and Kiyohito Yagi. Evaluation of promoter strength in mouse and rat primary hepatocytes using adenovirus vectors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70, 1-6 (2008).
- (3) Takayuki Suzuki, Fuminori Sakurai, Shin-ichiro Nakamura, Emi Kouyama, Kenji Kawabata, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Hiroyuki Mizuguchi miR-122a-regulated expression of a suicide gene prevents hepatotoxicity without altering antitumor effects in suicide gene therapy. *Mol. Ther.*, 17, 19-26 (2008).
- (4) Etsuko Ikeda, Kiyohito Yagi, Midori Kojima, Takahiro Yagyuu, Akira Ohshima, Satoshi Sobajima, Mika Tadokor, Yoshihiro Katsube, Katsuhiko Isoda, Masuo Kondoh, Masaya Kawase, Masahiro J Go Hisashi Adachi, Yukiharu Yokota, Tadaaki Kirita, Hajime Ohgushi. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*, 76, 495-505 (2008).
- (5) Hikaru Nishimori, Masuo Kondoh, Katsuhiko Isoda, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi, Kiyohito Yagi. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, in press. (2009).

- (6) Hikaru Nishimori, Masuo Kondoh, Katsuhiko Isoda, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi, Kiyohito Yagi. Influence of 70-nm silica particles in mice with cisplatin or paraquat-induced toxicity. *Pharmazie*, in press. (2009).

## G-2 学会発表

- (1) 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
- (2) 西森光、磯田勝広、近藤昌夫、角田真一、堤康央、八木清仁; 球状ナノシリカ粒子の急性肝傷害機構解析; 日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、(京都) 予定
- (3) 西森光、磯田勝広、近藤昌夫、角田真一、堤康央、八木清仁; ナノシリカ粒子頻回投与によるナノマテリアルの安全性評価; 日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、(京都) 予定
- (4) 西森光、磯田勝広、近藤昌夫、角田真一、堤康央、八木清仁; ナノシリカ粒と化学物質の併用によるナノマテリアルの安全性評価; 日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、(京都) 予定
- (5) 長谷崎拓也、田中一成、磯田勝広、近藤昌夫、角田真一、堤康央、八木清仁; 球状シリカ粒子の肝傷害性に及ぼす粒子径の影響; 日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、(京都) 予定
- (6) 長谷崎拓也、田中一成、磯田勝広、近藤昌夫、角田真一、堤康央、八木清仁; 球状ナノシリカ粒子の肝傷害性に対する表面化電の影響; 日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、(京都) 予定

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H-1 特許取得

なし

### H-2 実用新案登録

なし

### H-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

長谷崎拓也 大阪大学大学院薬学研究科 博士前期課程 2 年

田中一成 大阪大学薬学部 4 年生



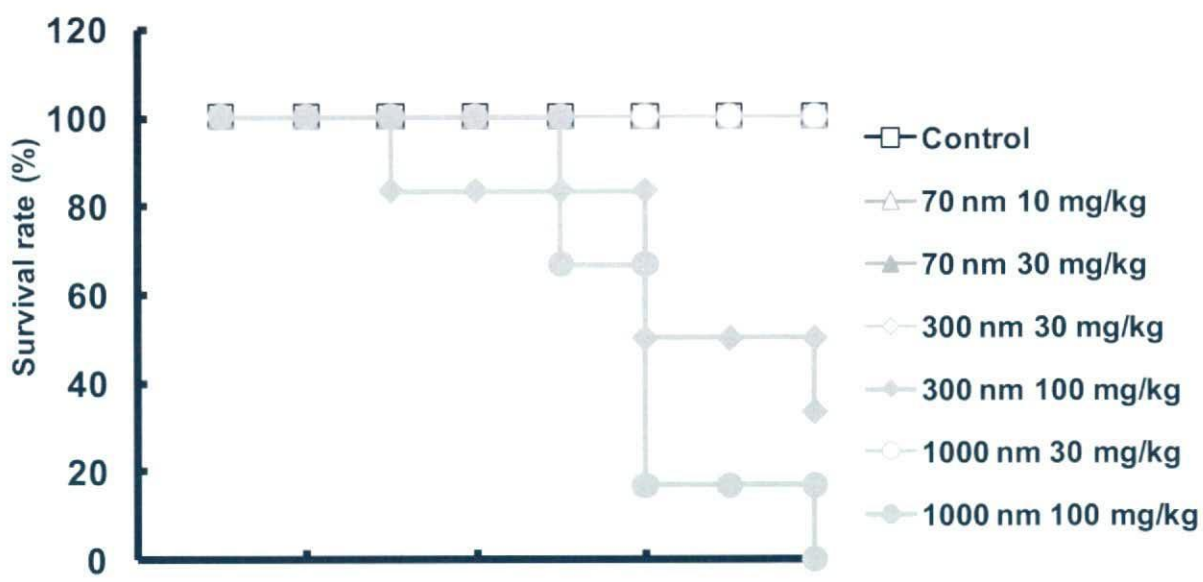


図1. ナノシリカ頻回投与によるマウスの生存率変化

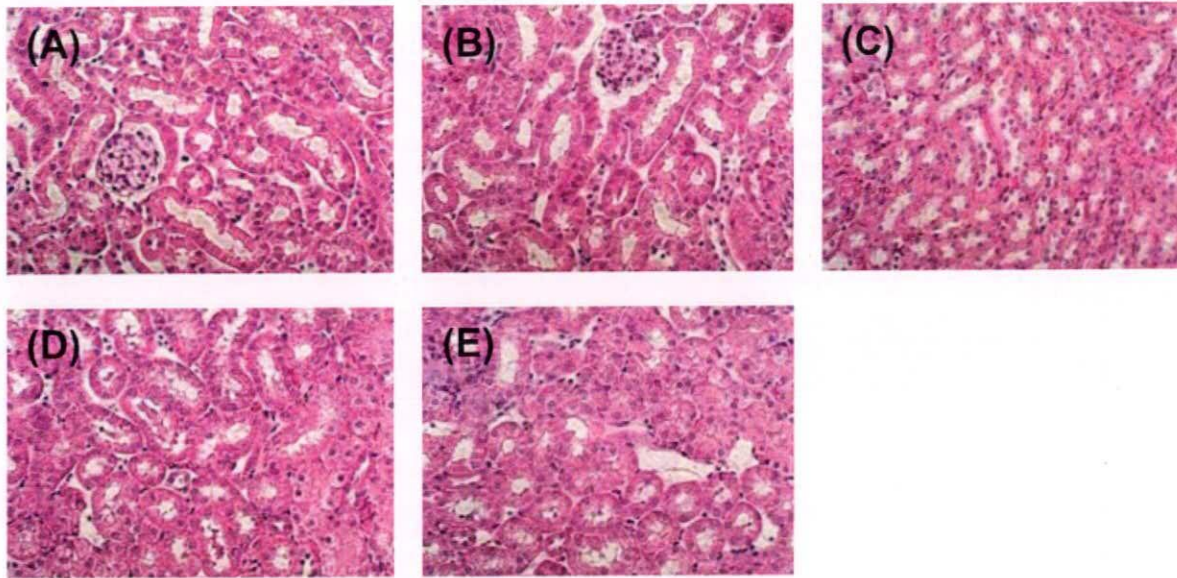


図2. ナノシリカを頻回投与したマウス腎臓のHE像 .  
 Control (A), 70 nm-silica 10 mg/kg b.w. (B), 30 mg/kg b.w. (C), 300 nm-silica 30 mg/kg b.w. (D), 1000 nm-silica 30 mg/kg b.w. (E) injected mice.  
 (×400)

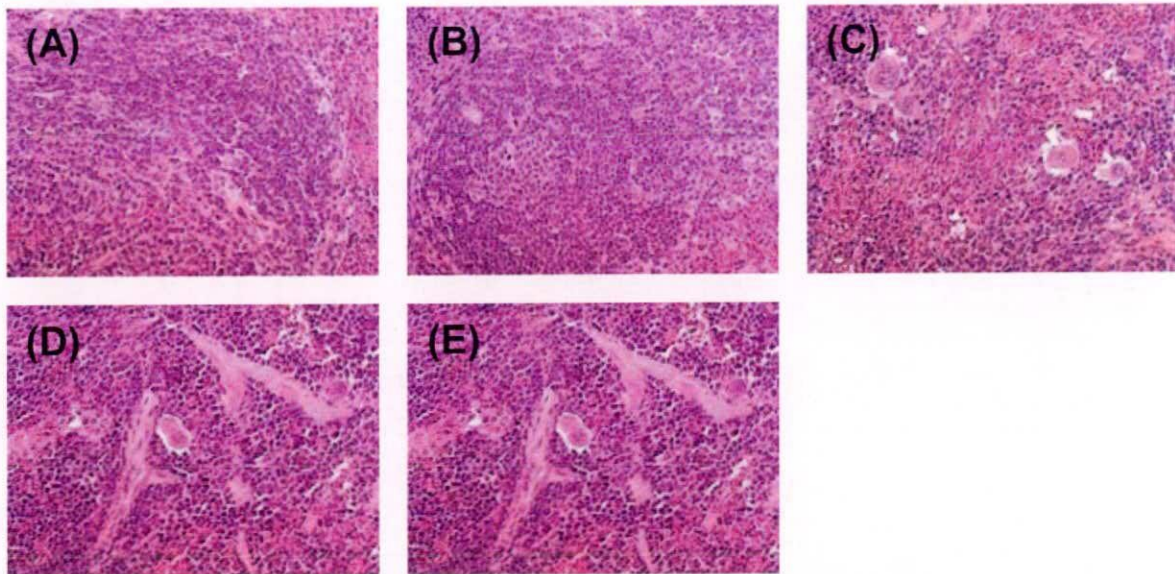


図3. ナノシリカを頻回投与した脾臓のHE像 .  
 Control (A), 70 nm-silica 10 mg/kg b.w. (B), 30 mg/kg b.w. (C), 300 nm-silica 30 mg/kg b.w. (D), 1000 nm-silica 30 mg/kg b.w. (E) injected mice.  
 (×400)



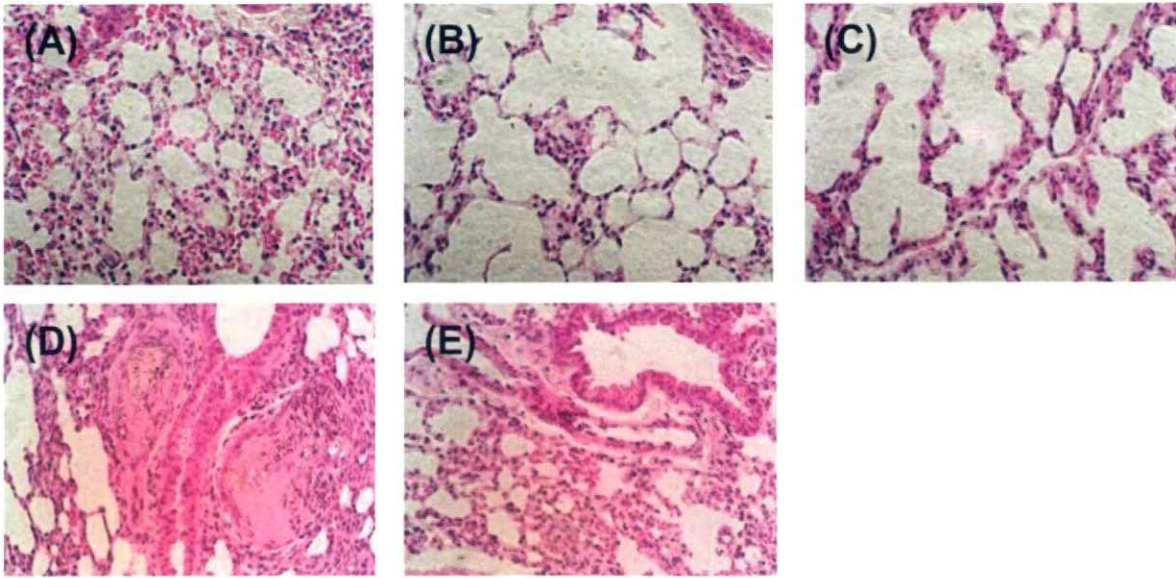


図4. ナノシリカを頻回投与した肺のHE像  
 Control (A), 70 nm-silica 10 mg/kg b.w. (B), 30 mg/kg b.w. (C), 300 nm-silica 30 mg/kg b.w. (D), 1000 nm-silica 30 mg/kg b.w. (E) injected mice.  
 (×400)

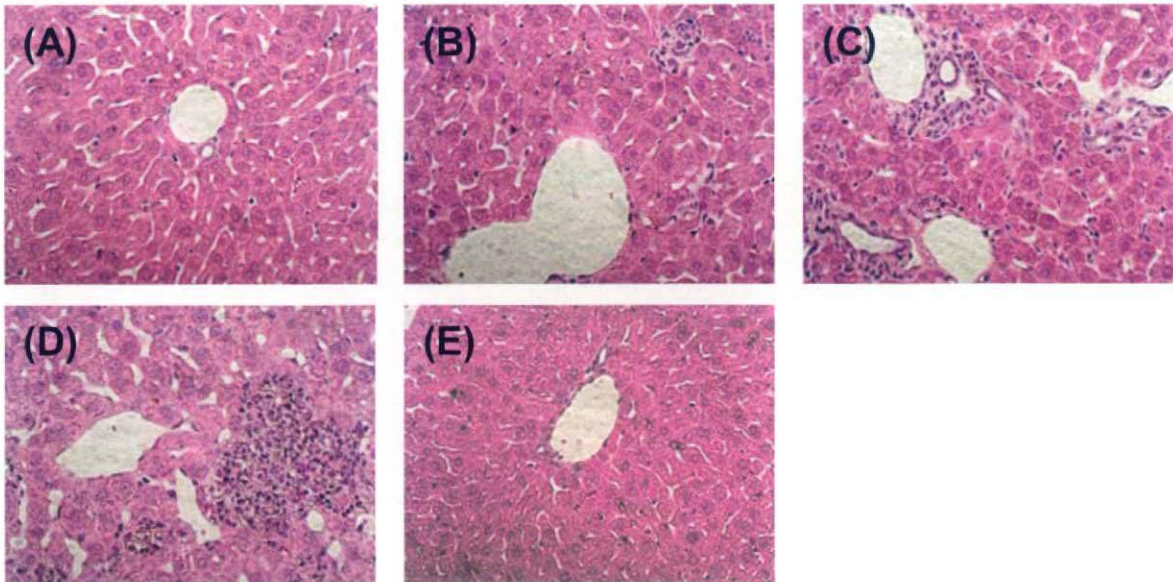


図5. ナノシリカを頻回投与した肝臓のHE像  
 Control (A), 70 nm-silica 10 mg/kg b.w. (B), 30 mg/kg b.w. (C), 300 nm-silica 30 mg/kg b.w. (D), 1000 nm-silica 30 mg/kg b.w. (E) injected mice.  
 (×400)

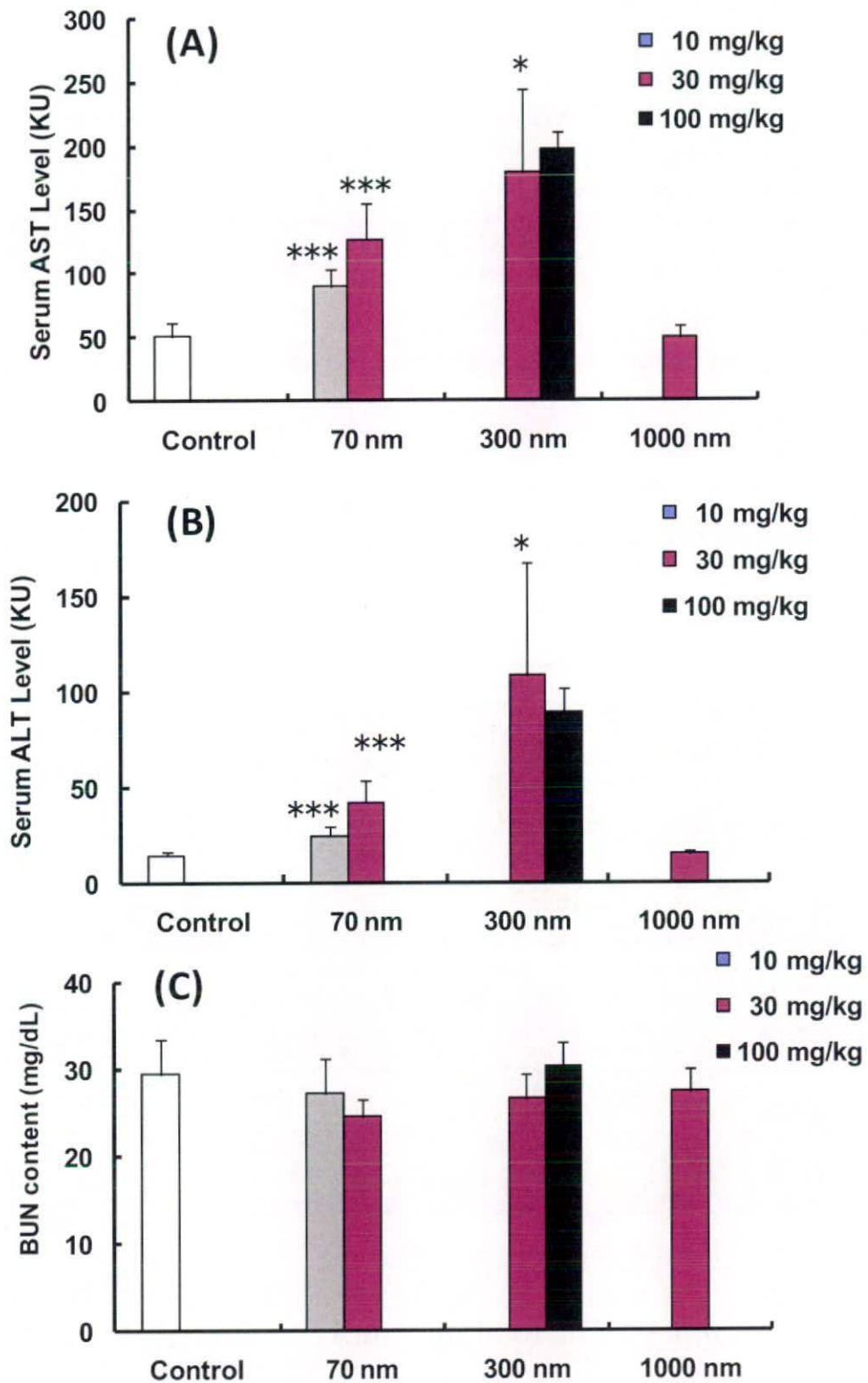


図6. ナノシリカの頻回投与による慢性肝傷害  
 Serum AST (A) and ALT (B) and BUN (C) were measured.  
 \*  $p < 0.05$  vs. Control      \*\*\*  $p < 0.005$  vs. Control