

図7 ナノシリカを頻回投与したマウス肝臓のアザン染色像  
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. ( $\times 400$ )

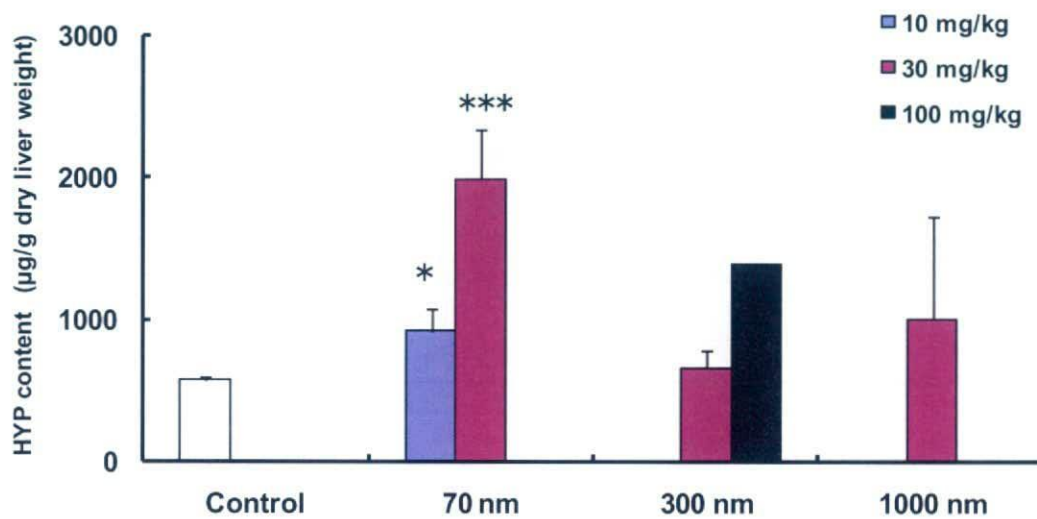


図8 肝臓ヒドロキシプロリン量.

Mice were injected labeled nano-silica twice a week for 4 weeks intravenously. After 3 days from final injection, HYP content were measured. \* $p < 0.05$  vs. Control \*\*\* $p < 0.005$  vs. Control

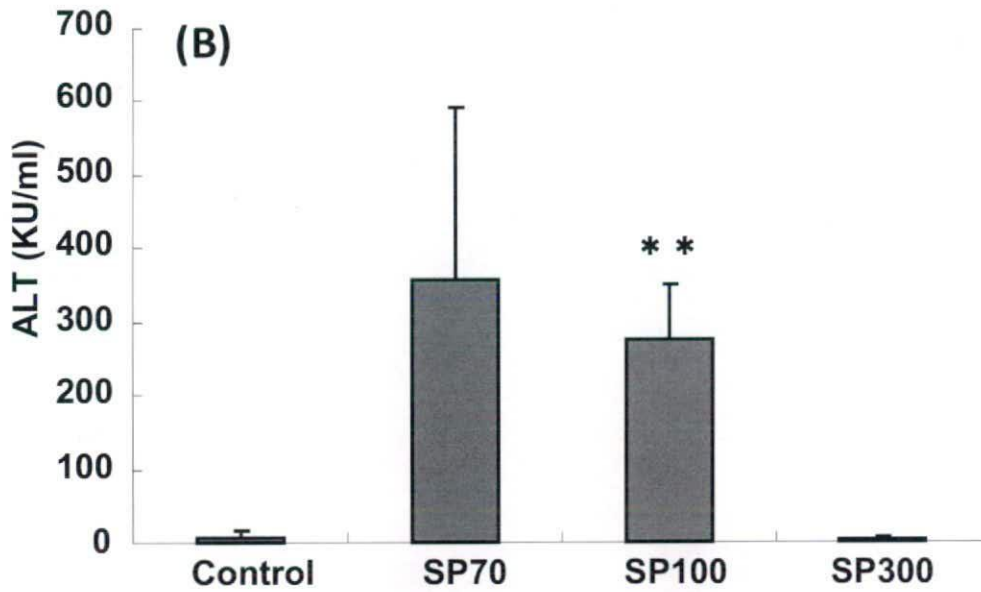
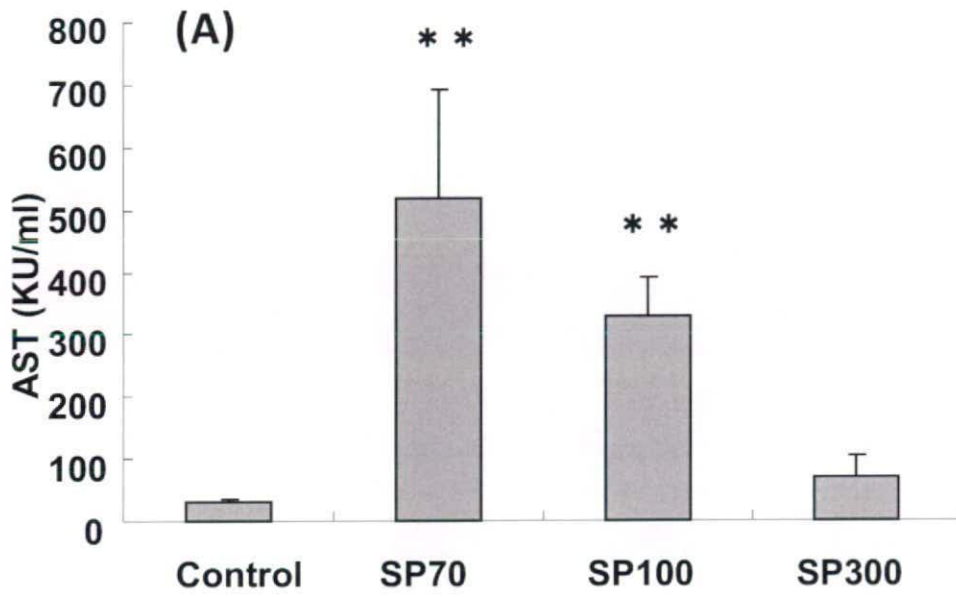


図9. SP100 を単回投与したマウスの急性肝傷害  
 SerumAST (A) and ALT (B) level of mice was measured.  
 \*\*:  $p < 0.01$  vs. Control

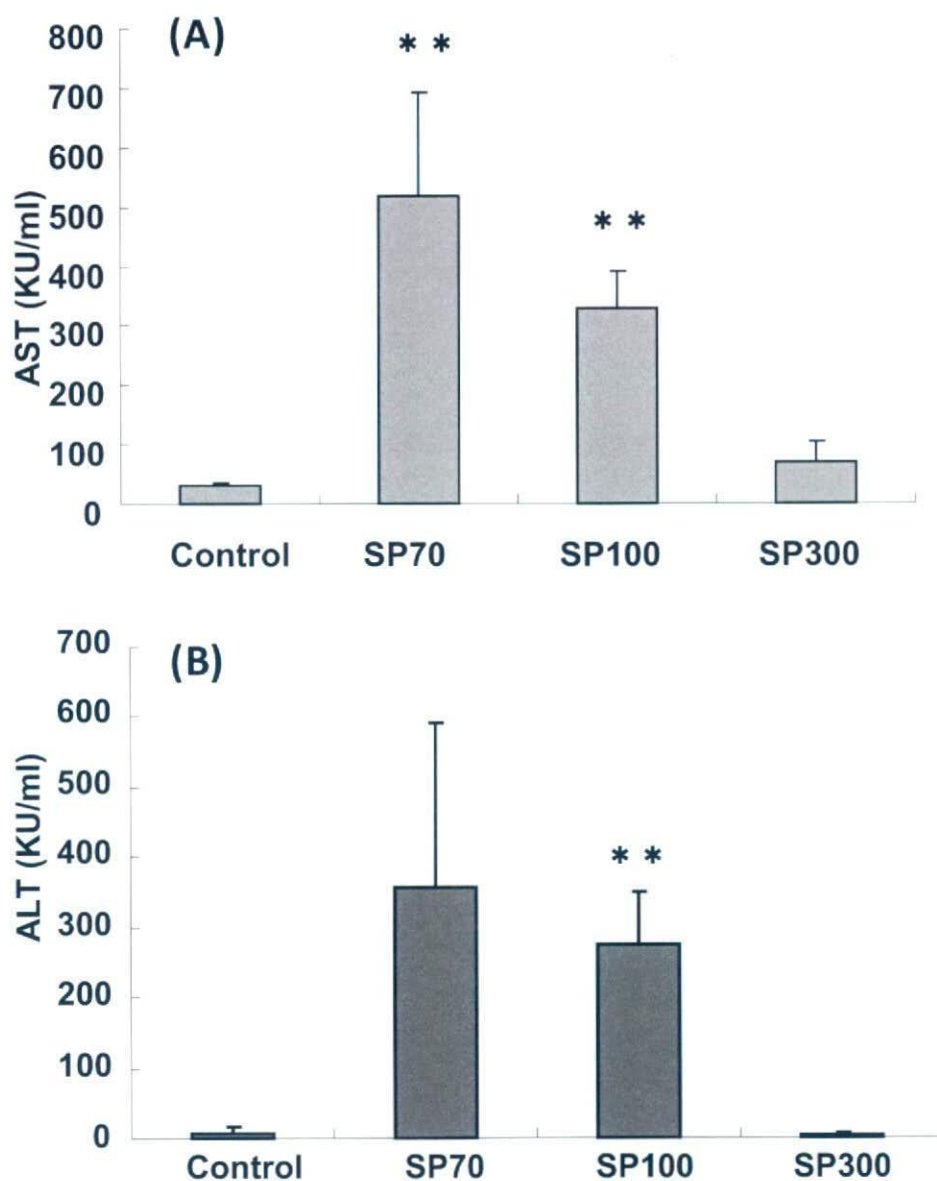


図9. SP100 を単回投与したマウスの急性肝傷害  
 SerumAST (A) and ALT (B) level of mice was measured.  
 \*\*:  $p < 0.01$  vs. Control

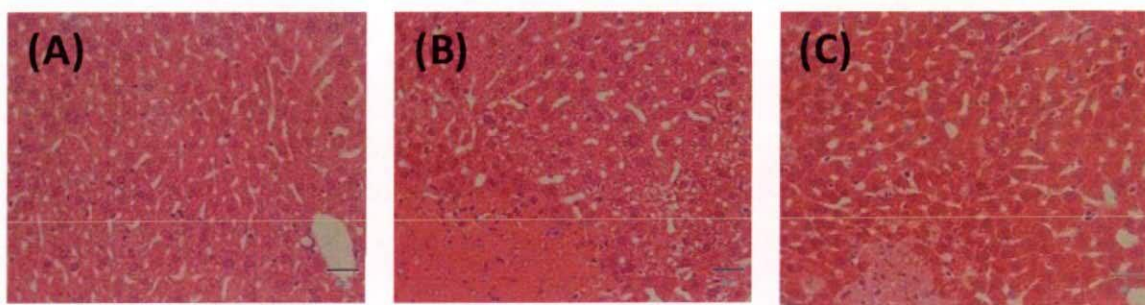


図10. SP100を単回投与したマウス肝臓のHE像  
Control(A), SP70 40 mg/kg b.w. (B) SP100 60 mg/kg b.w. (C) injected mice.  
(×400)

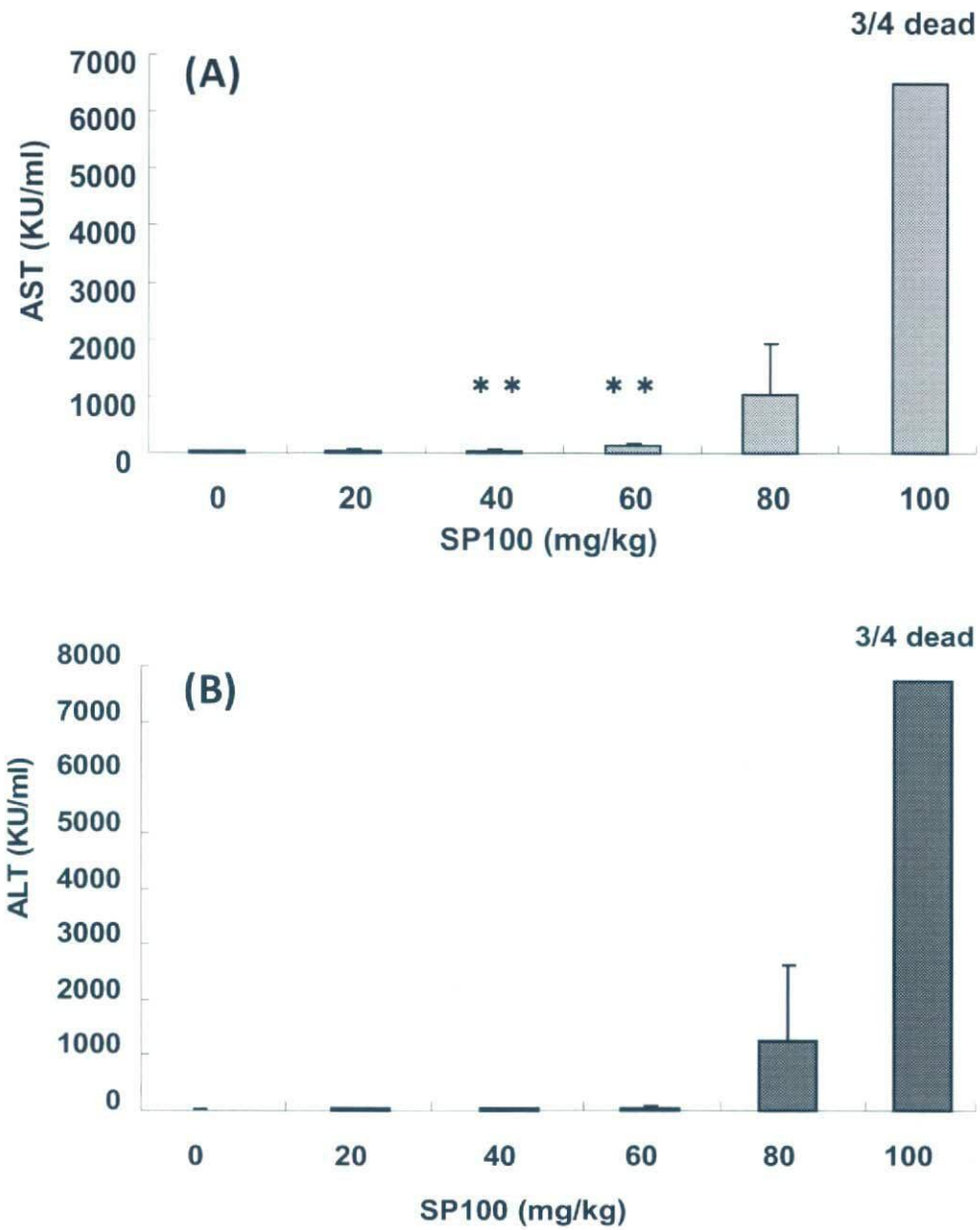


図11. SP100を単回投与したマウス肝傷害の用量依存性  
 After 12 hours, SerumAST (A) and ALT (B) level in mice was measured.  
 \*\*:  $p < 0.01$  vs. Control



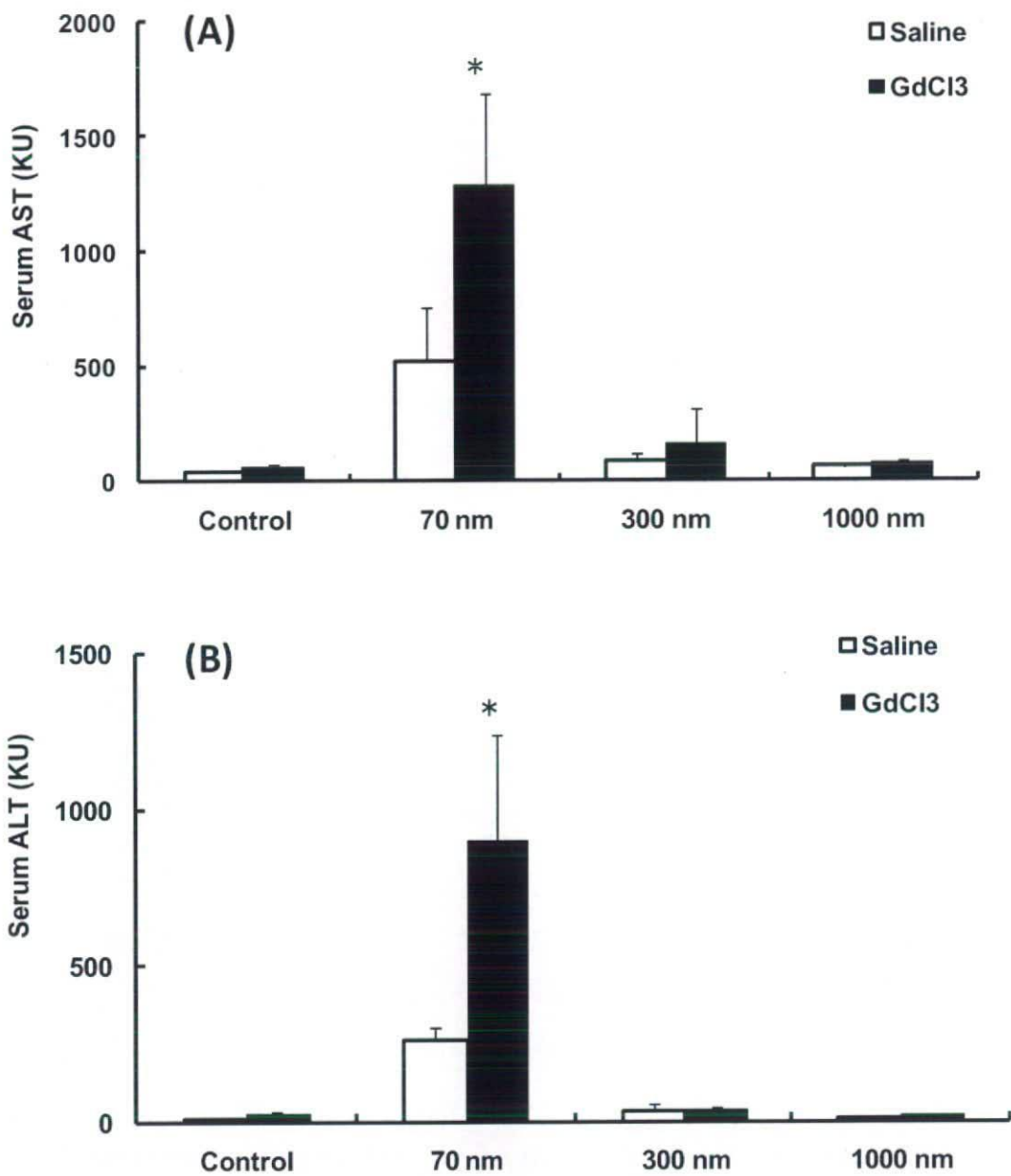


図12. ガドリニウムクロライドとナノシリカ併用による急性肝障害。Serum AST (A) and ALT (B) level of mice was measured.  
\* $p < 0.05$  vs. Saline

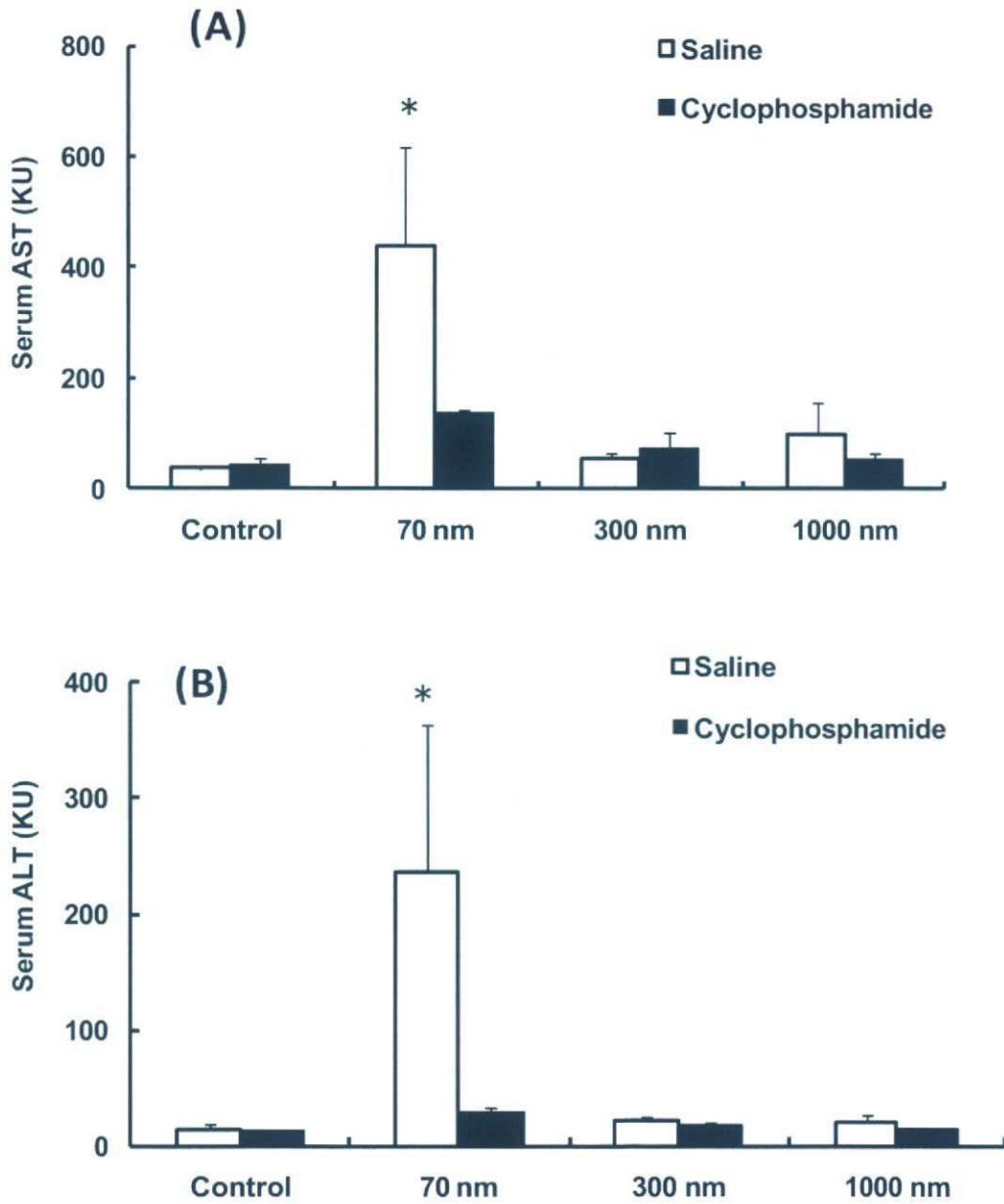


図13. シクロフォスファミドとナノシリカ併用による急性肝傷害  
SerumAST (A) and ALT (B) level of mice was measured.

\* $p < 0.05$  vs. Saline

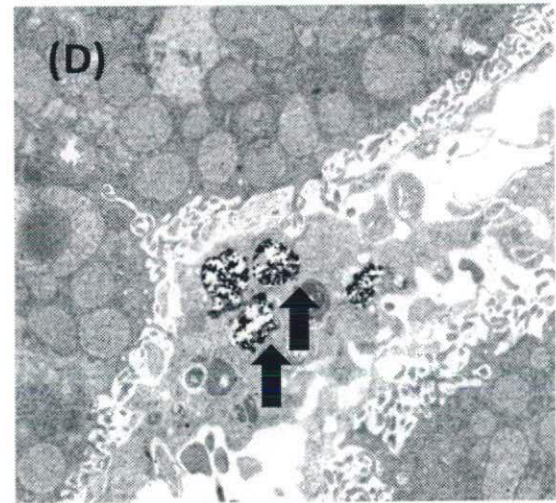
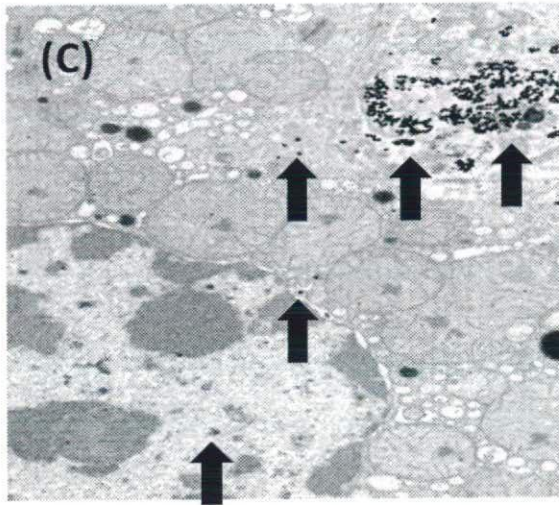
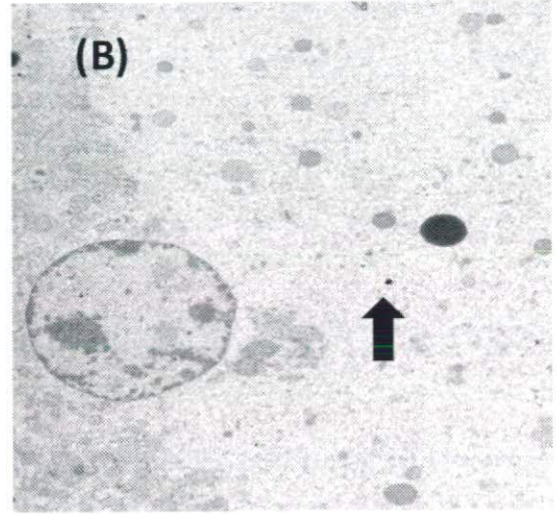
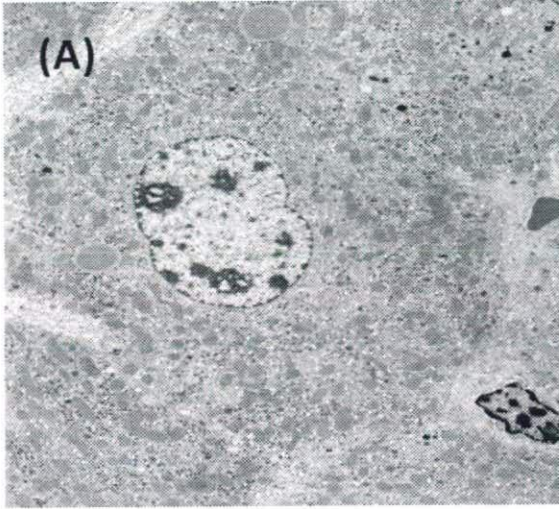


図14. SP70投与24時間後の肝臓の透過型電子顕微鏡像.  
Control(A), SP70 (B), (C), (D).  
矢印 ; SP70.



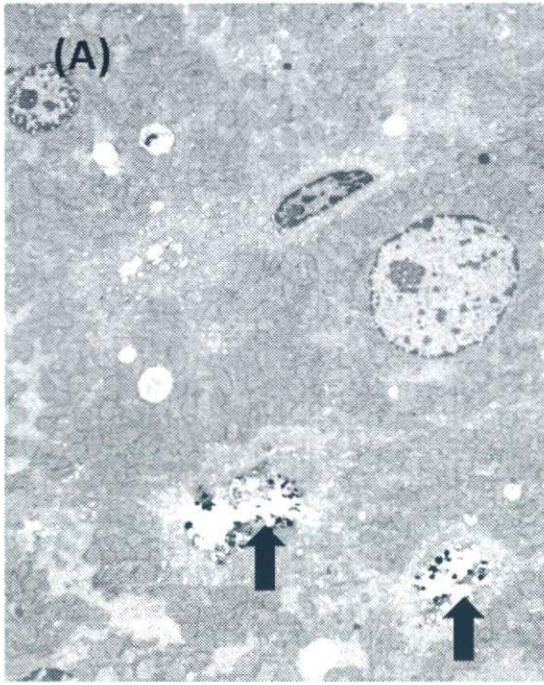


図15. SP300とSP1000投与24時間後の肝臓の透過型電子顕微鏡像。  
SP300 (A), SP1000 (B).  
矢印 ; SP300 and SP1000.

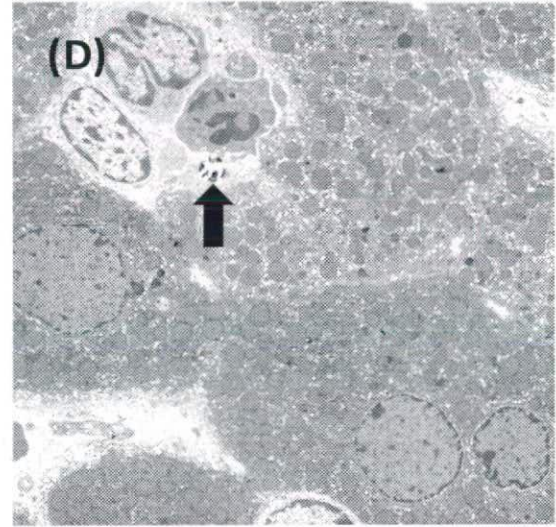
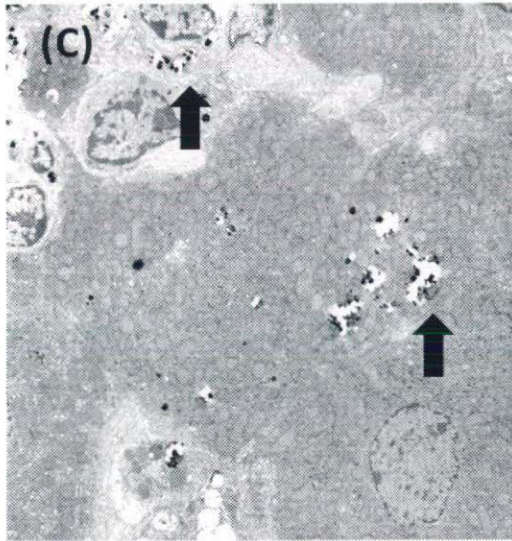
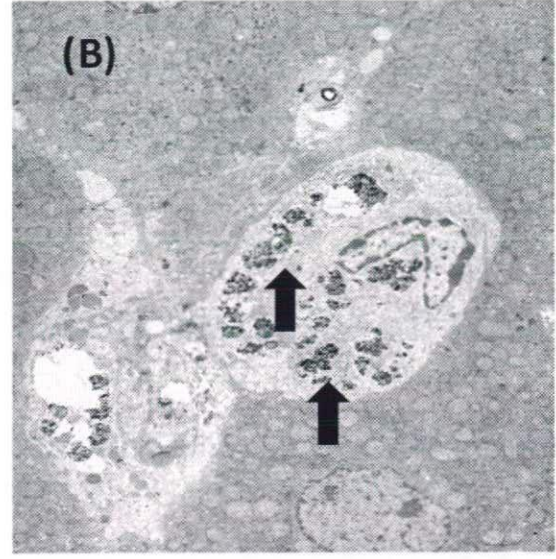
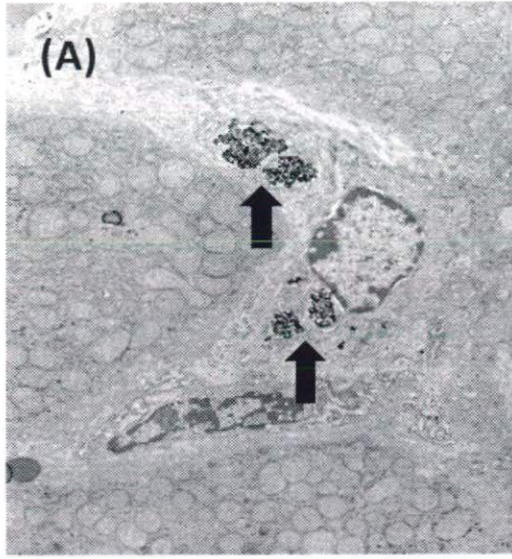


図16. ナノシリカ頻回投与（4回）3日後の肝臓の透過型電子顕微鏡像。  
SP70 (A) (B), SP300 (C), SP1000 (D).  
矢印；SP70、SP300 and SP1000.



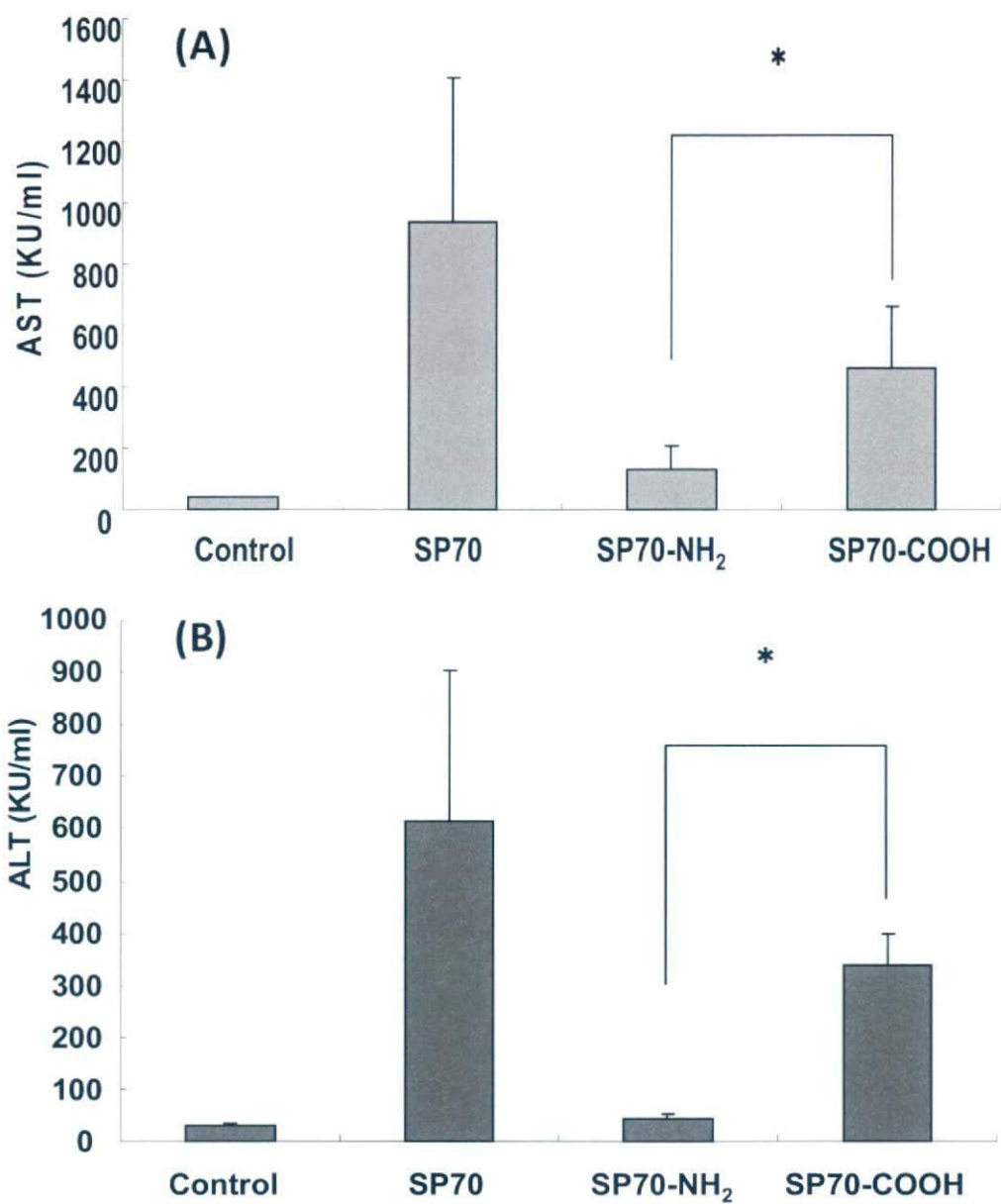


図17. 修飾体ナノシリカを単回投与したマウスの急性肝障害  
SerumAST (A) and ALT (B) level of mice was measured.

\* :  $p < 0.05$

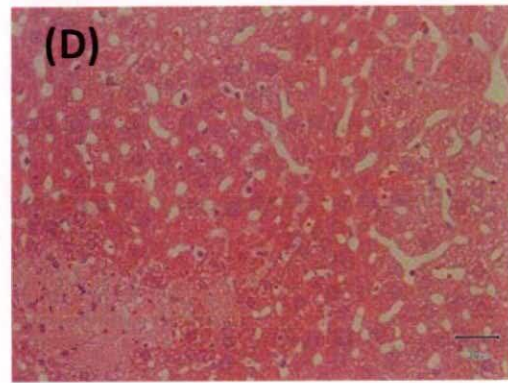
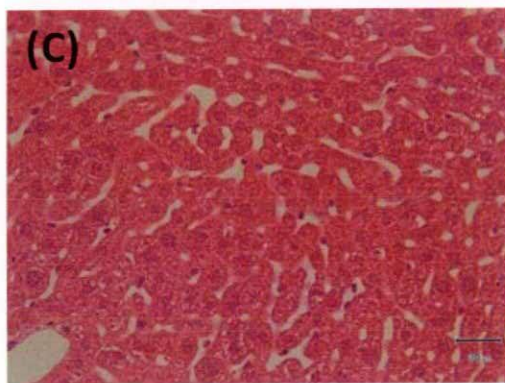
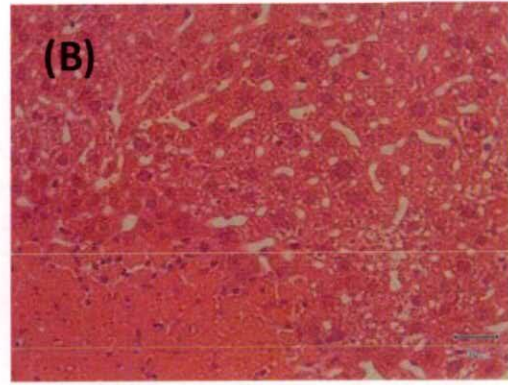
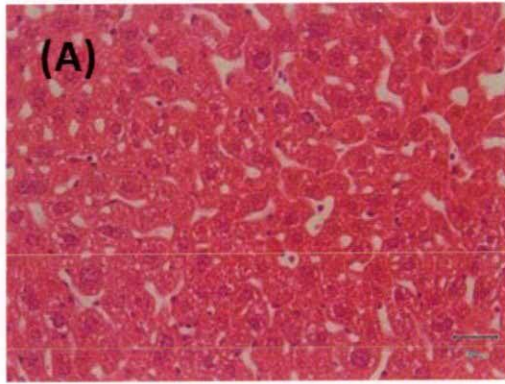


図18. 修飾体ナノシリカを単回投与したマウス肝臓のHE像  
Control (A), SP70 40 mg/kg b.w. (B) SP70-NH<sub>2</sub> 60 mg/kg b.w. (C)  
SP70-COOH 60 mg/kg b.w. (D) injected mice. (×400)



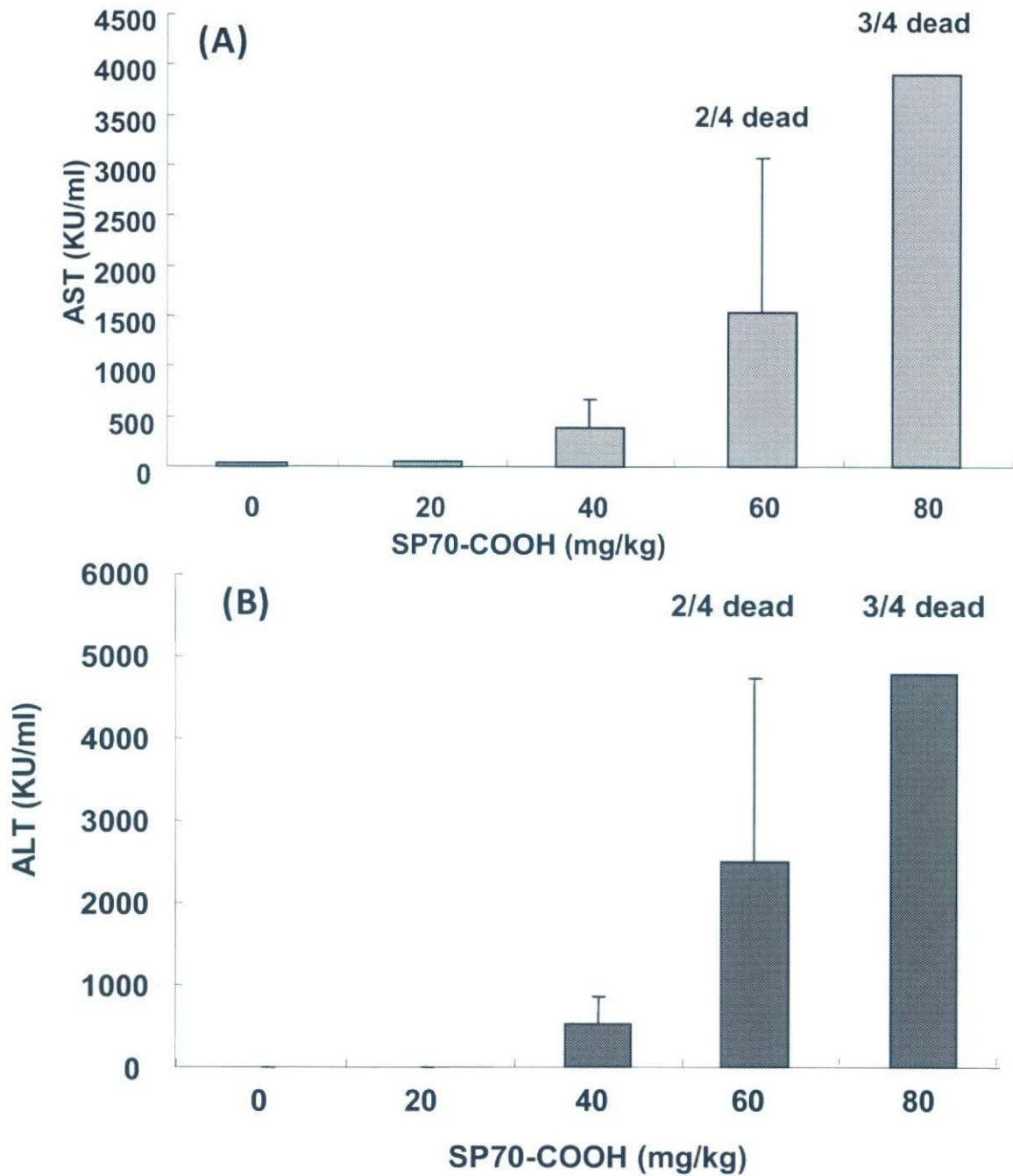


図19. 修飾体ナノシリカ単回投与 (SP70-C) したマウス肝障害の用量依存性投与24時間後、serum AST (A) and ALT (B) level

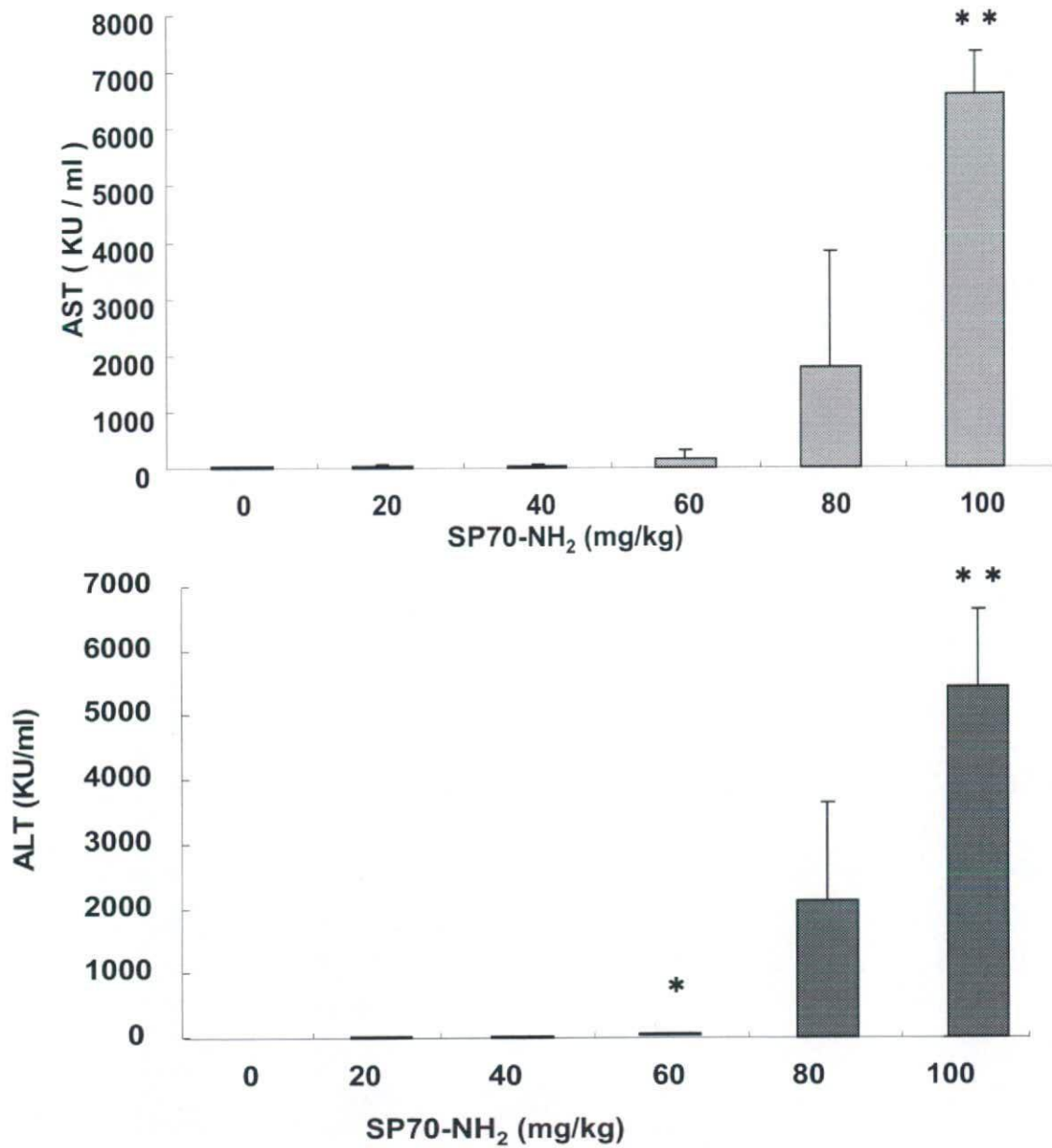


図20. 修飾体ナノシリカ単回投与 (SP70-N) したマウス肝障害の用量依存性  
 投与24時間後、serum AST (A) and ALT (B) level  
 . \*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.01$  vs. Control

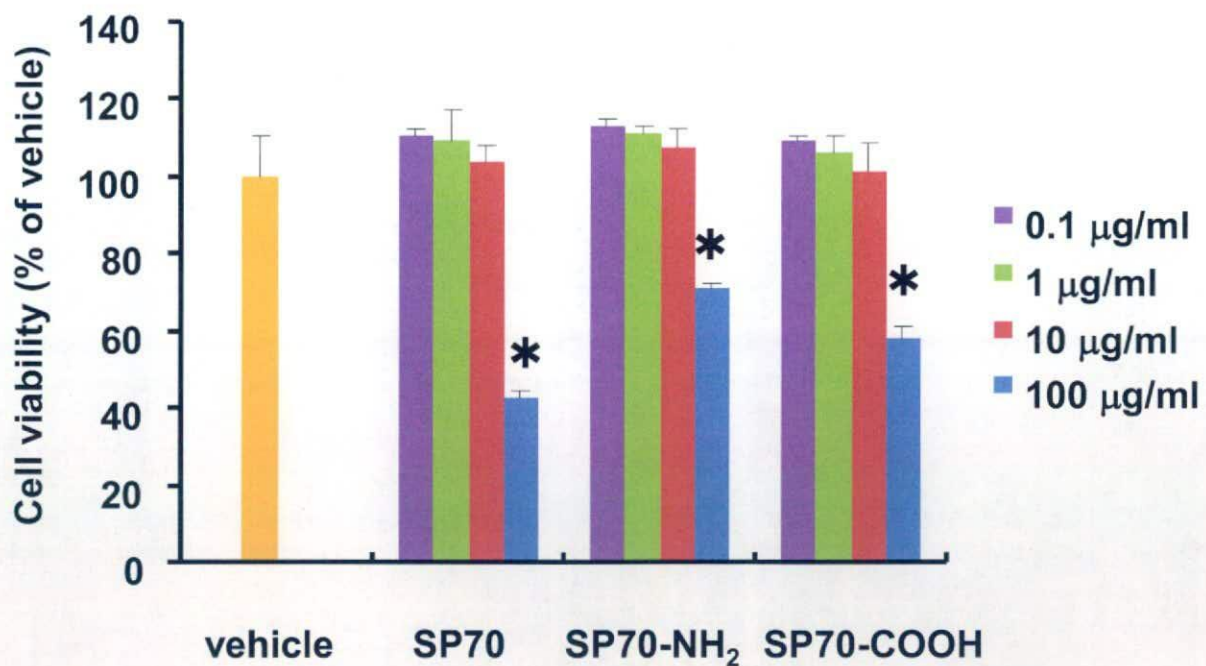


図 21. ナノシリカを添加した初代培養肝細胞の細胞生存率変化  
 \* $p < 0.01$  vs. vehicle

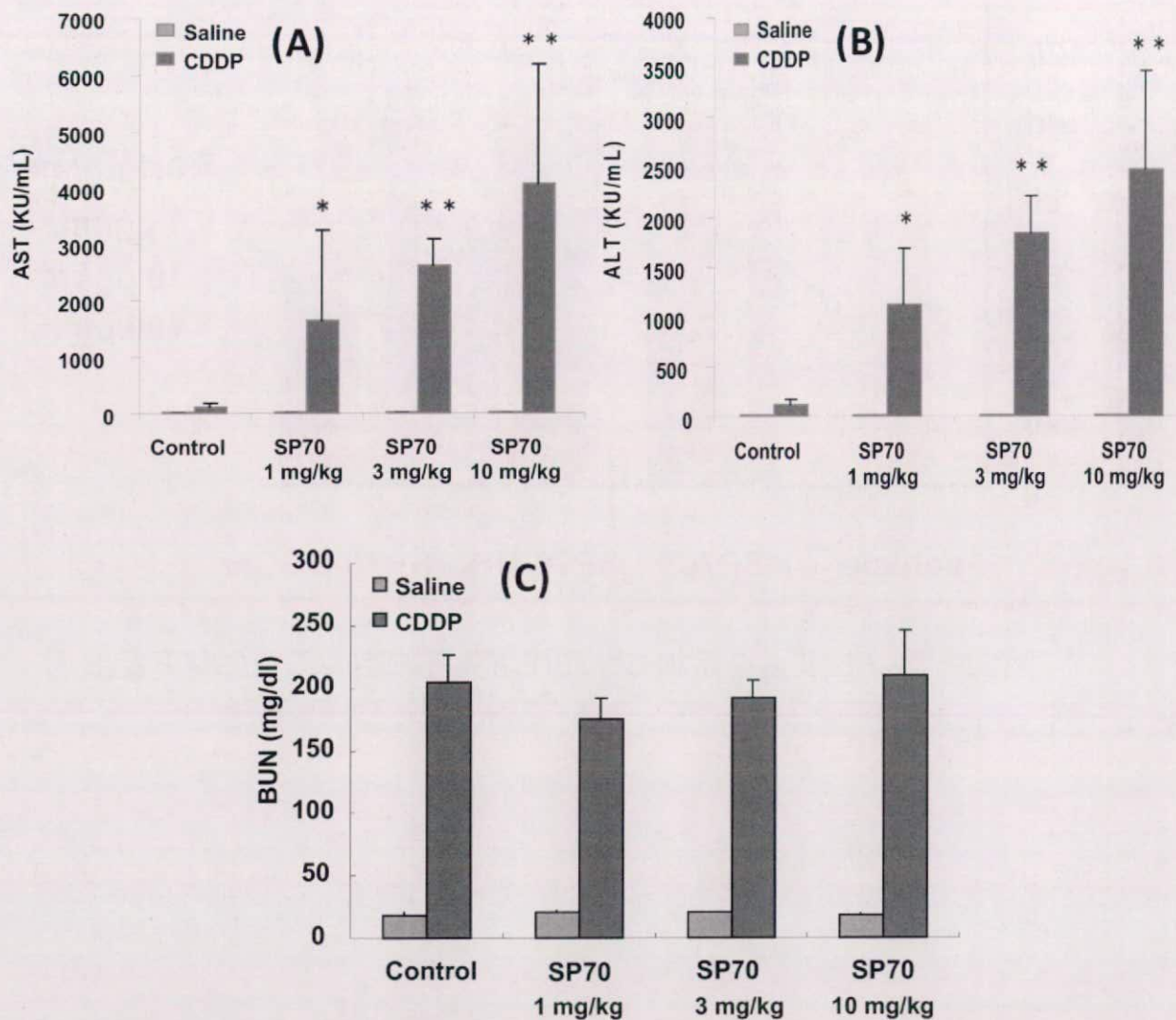


図22. SP70とシスプラチン (CDDP) を併用したマウスの急性肝傷害  
 Serum AST (A) and ALT (B) level BUN (C) of mice was measured.  
 \*\*:  $p < 0.01$  \*:  $p < 0.05$  vs. saline, only CDDP



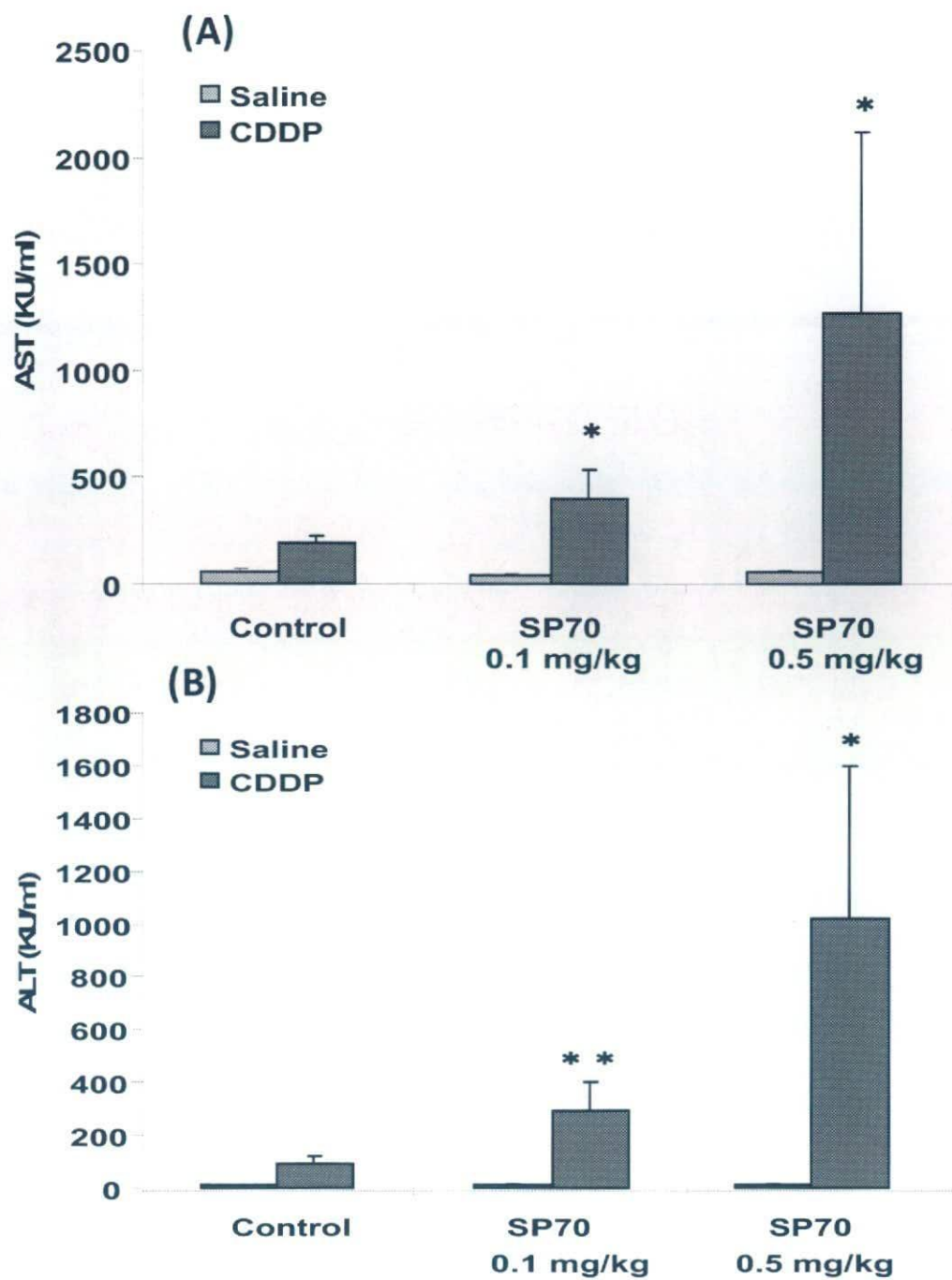


図23. 低用量SP70とシスプラチン (CDDP) を併用したマウスの急性肝傷害  
 SerumAST (A) and ALT (B) level of mice was measured.

\*\*: $p < 0.01$  \*: $p < 0.05$  vs. saline, only CDDP

## 電子顕微鏡によるナノマテリアルの主要臓器における各細胞内局在 性に関する研究

研究分担者 今澤 孝喜 (独) 医薬基盤研究所生物資源研究部 共用機器実験室 室長

### 研究要旨

平成19年度は、培養正常表皮細胞を用いた実験を実施し、70 nm シリカは細胞質内に取り込まれ、核内および核小体に侵入した像が観察された。300 nm および 1000 nm シリカは細胞質内に取り込まれたが、核内では全く観察されなかった。マウスを用いた実験では、70 nm シリカは肝細胞や核内に侵入し、細胞毒性も誘発されることを明らかにした。また、肺においても 70 nm シリカのみが毛細血管内皮細胞に侵入し、さらに肺胞上皮細胞へも侵入することが判明した。一方、300 nm および 1000 nm シリカはクッパー細胞に貪食されており、肝細胞および肺上皮細胞内には侵入しないことを明らかにした。このように、粒子径の差異による細胞内における粒子の局在性の違いを明らかにした。

昨年度の結果を踏まえ、本年度はマウスに各種サイズの未修飾体(Plain)ナノシリカ、カルボキシル基(COOH)修飾体ナノシリカおよびアミノ基(NH<sub>2</sub>)修飾体ナノシリカをそれぞれ尾静脈内に単回投与し、肝臓、肺臓、大脳、脾臓、鼠頸リンパ節、腎臓、心臓について透過型電子顕微鏡で観察し、各種ナノシリカの組織や細胞での局在性・侵入性などについて検討した。70 nm シリカは未修飾、修飾にかかわらず肝細胞内に粒子が観察された。また 300 nm シリカでも肝細胞に侵入することが証明された。肺組織においては 70 nm 未修飾体シリカのみが毛細血管内皮細胞内および肺胞上皮細胞内に多数の粒子が観察された。大脳皮質では 70 nm シリカの未修飾、修飾にかかわらず、BBB を通過し、星状膠細胞内に粒子が観察された。一方、300 nm および 1000 nm ナノシリカの未修飾体、両修飾体はいずれも大脳皮質では観察されなかった。脾組織ではナノシリカの粒子径の大きさ、未修飾、修飾に関わらず、いずれも大食細胞に貪食されていた。鼠頸リンパ節では 70 nm、300 nm ナノシリカの未修飾体および両修飾体のいずれも大食細胞に貪食されていたが、1000 nm ナノシリカの未修飾体および両修飾体のいずれも観察されなかった。心臓および腎臓では 70 nm、300 nm および 1000 nm シリカの未修飾体および両修飾体のいずれも組織や細胞などへの侵入は観察されなかった。



## 研究目的

ナノマテリアルは医薬品、化粧品、食品領域で広く使用されている。例えば、ドラッグデリバリー、日焼け止め、栄養強化などの目的であるが、それらは生体に対して毒性を示す可能性があることが知られている。我々が昨年度に実施したナノシリカのマウスを用いた実験結果では、70 nm シリカが肝細胞内および肺胞上皮細胞内に侵入した像が観察され、さらには肝細胞では細胞毒性も誘発することが確認された。以上のことから本年度は前年度の結果を踏まえ、ナノシリカのより詳細な生体影響・健康影響評価として透過型電子顕微鏡により超微形態学的に検索する目的で以下の動物実験を実施した。

マウスにナノシリカを単回投与し、肝、肺組織を含めて他臓器の組織や細胞に侵入するか否かについて、さらに未修飾体ナノシリカと修飾体ナノシリカを用い、各組織や細胞への取り込みあるいは侵入性などについて超微形態学的に検討した。

## 研究方法

実験には粒子径 70 nm、300 nm、1000 nm の未修飾体(Plain)ナノシリカ(それぞれ SP70, SP300, SP1000 と表示)、表面にカルボキシル基(COOH)を修飾したナノシリカ(それぞれ SP70-C, SP300-C, SP1000-C と表示)およびアミノ基(NH<sub>2</sub>)を修飾したナノシリカ(それぞれ SP70-N, SP300-N, SP1000-N と表示)を用いた。

本実験を開始する前にそれぞれのナノシリカの特徴を電子顕微鏡で観察した。その結果、粒子径のサイズにかかわらず修飾体ナノシリカは未修飾体ナノシリカよりも凝集性が強かった(写真 1~3)。

ナノシリカは注射用水に懸濁し、投与量 2 mg/mouse (ほぼ 100 mg/kg に相当)、対照として注射用水のみをそれぞれ雌 BALB/c マウス各 1 匹に尾静脈内から投与した。但し、SP70 を 2 mg/mouse 投与すると十数時間以内にマウスが死

亡するため、この群のみ 0.6 mg/mouse (ほぼ 30 mg/kg に相当) の投与量とした。投与 24 時間後、フェノバルビタールで麻酔・屠殺後、肝臓、肺臓、大脳(皮質)、腎臓(皮質)、心臓、脾臓、鼠頸リンパ節を摘出し、直ちに冷 2.5 % グルタルアルデヒド溶液で 2 時間固定し、0.1 M リン酸緩衝溶液で洗浄後、1 % 四酸化オスミウム溶液で 1 時間後固定し、上昇エタノールで脱水した。常法に従いエポキシ樹脂で包埋し、熱重合で硬化させた。標本はダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛の二重電子染色後、電顕で観察した。但し、70 nm シリカの場合、染色することにより確認が困難になるため無染色での観察も行った。

## C. 研究結果

組織や細胞に観察された各種ナノシリカの局在性については表 1 にまとめた。

肝組織ではナノシリカの未修飾体、修飾体、粒子径のサイズにかかわらず全ての投与群でクッパー細胞に多数のナノシリカが貪食されていた。

肝細胞内および肝細胞核内では多少の差があるものの SP70、SP70-C および SP70-N の全ての 70 nm シリカが観察された(写真 4~6)。また SP300 および SP300-C でも肝細胞内に観察されたが、核内では観察されなかった(写真 7-A, 7-B)。一方、SP300-N、SP1000、SP1000-C および SP1000-N はいずれも肝細胞内では観察されなかった(写真 7-C, 8)。

肺組織では SP70 が毛細血管内皮細胞および II 型肺胞上皮細胞内に侵入した像が観察された(写真 9)。SP70-C は毛細血管内皮細胞内に僅かに侵入した像が観察されたが、SP70-N は肺組織では観察されなかった(写真 10-A, 10-B)。300 nm および 1000 nm シリカの未修飾体、両修飾体はいずれも肺組織では観察されなかった。



大脳皮質では 70 nm ナノシリカの未修飾体、両修飾体のいずれも (SP70、SP70-C および SP70-N) 毛細血管内皮細胞内、星状膠細胞内あるいは星状膠細胞核内に僅かではあるが侵入像が観察された (写真 11~13)。また、SP70 粒子が星状膠細胞の水解小体 (ライソゾーム) に捕捉されている像も観察された (写真 11-B)。一方、300 nm および 1000 nm ナノシリカの未修飾体、両修飾体はいずれも大脳皮質では観察されなかった。

脾組織では 70 nm、300 nm および 1000 nm シリカの未修飾体および両修飾体のいずれも大食細胞に貪食されていた (写真 14~16)。

鼠頸リンパ節では 70 nm、300 nm ナノシリカの未修飾体および両修飾体のいずれも大食細胞に貪食されていたが (写真 17, 18)、1000 nm ナノシリカの未修飾体および両修飾体のいずれも観察されなかった。

心臓および腎臓では 70 nm、300 nm および 1000 nm シリカの未修飾体および両修飾体のいずれも組織や細胞内などへの侵入は観察されなかった。

#### D. 考 察

粒子径 70 nm、300 nm および 1000 nm の未修飾体ナノシリカ、COOH 修飾体ナノシリカおよび NH<sub>2</sub> 修飾体ナノシリカをそれぞれマウスに投与し、主要臓器の細胞内の局在性および侵入性について比較検討した。

肝組織において本実験で用いた粒子径の最も小さい 70 nm シリカは未修飾体、修飾体にかかわらずいずれも肝細胞内に容易に侵入し、さらに核内にも侵入した像が観察された。昨年度に実施した実験でも 70 nm シリカは肝細胞内および核内に観察され (第 35 回日本トキシコロジー学会で発表)、今回も同様の結果が得られた。しかし、SP70 は SP70-C や SP70-N と比較して投与量が約 1/3 と少ないにもかかわらず肝細胞内への侵入量が大きく観察された。

また、昨年度の実験では 300 nm シリカは肝細胞内では観察されなかったが、今回の実験では SP300 は比較的多くの粒子が、SP300-C は僅かの粒子が肝細胞内に侵入した像が観察された。300 nm のサイズでも特に未修飾体シリカは肝細胞にも容易に侵入することが明らかになった。

肺組織においては、SP70 は毛細血管上皮細胞と II 型肺胞上皮細胞への侵入が観察された。一方、SP70-C は毛細血管内皮細胞のみに僅かに観察された程度であり、SP70-N は全く観察されなかった。このように未修飾体ナノシリカは修飾体ナノシリカと比較して細胞内により多く侵入することが判明した。これは電顕で観察 (写真 1~3) されたように修飾体ナノシリカが未修飾体ナノシリカより凝集し易いことにより異物として認識・貪食され、細胞内へ侵入する量が少ないものと考えられた。

大脳皮質において 70 nm シリカは未修飾体、修飾体にかかわらずいずれも僅かではあるが毛細血管内皮細胞、星状膠細胞あるいは星状膠細胞核内に観察された。中枢神経系における毛細血管壁の物質透過性は他の組織や器官に比べてかなり特異的で、いろいろな物質に対して透過を制限するように調節されている。脳毛細血管では血液中の物質を透過させない一種の関門機構、すなわち血液脳関門 (Blood-Brain-Barrier: BBB) があり、これによって脳の内部環境が恒常に保たれ、極めて高度に維持されると考えられている。星状膠細胞は血管の周囲に突起を出してこれを囲み、関門の形成に関与しているといわれている。しかし、本実験では 70 nm シリカが BBB を通過し、星状膠細胞に侵入することが判明した。このようなことから将来、中枢神経系に何らかの影響が出るものと考えられる。

脾臓の主な機能のひとつは血液の濾過という血中の異物の捕捉とその処理である。このように脾臓は血管系に介在し、血液の浄化器官としての働きを有する。脾組織においてナノシリカの粒子径の大きさ、