

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。本実験ではナノシリカを尾静脈内投与していることから、血中の異物の処理として脾臓で大食細胞に貪食されたものと考えられた。

脾臓が血管系に介在し、血液の浄化器官としての働きを有するのと同様にリンパ節はリンパ管の経過中に介在し、大食細胞によって異物を貪食してリンパを濾過・浄化する機能を有している。鼠頸リンパ節において 70 nm および 300 nm シリカの未修飾、修飾に関わらず、いずれも大食細胞に貪食されていた。しかし、未修飾体、修飾体にかかわらず 1000 nm シリカはリンパ節では観察されなかった。これは 300 nm 以下のサイズであればリンパ内に流入するが、1000 nm のサイズは他の臓器で処理され、リンパ内へほとんど流入しないものと考えられた。

心臓および腎臓ではいかなる粒子も観察されなかったのは、静脈内から投与されたナノシリカは心臓内を通過して、血中で異物として認識された粒子は主に脾組織および肝組織の貪食細胞に貪食・処理されるからである。そして、異物として認識されずに貪食されなかった粒子は肝類洞や毛細血管から取り込まれ、周囲の細胞内に侵入するものと考えられた。また、異物として認識されない一部の粒子は腎糸球体や尿細管も通過し、尿中へ排泄される可能性も考えられた。

以上、ナノシリカは粒子径の差異のみならず、未修飾と修飾による細胞内の局在性や侵入量の明らかな違いが見られた。これは、未修飾体は修飾体よりも凝集性が低いことが一つの原因と考えられた。

E. 結論

動物実験において 70 nm シリカの未修飾、修飾にかかわらず肝細胞内に観察されたが、SP70 は投与量が少ないにもかかわらず細胞内に侵入量が最も多かった。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。肺組織においても SP70 のみ

が毛細管血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。また、70 nm シリカの未修飾、修飾にかかわらず、大脳皮質の BBB を通過し、星状膠細胞へ達していた。

ナノシリカの粒子径の差異のみならず、表面の未修飾と修飾による細胞内の局在性の明らかな違いが見られた。

以上のことから、70 nm より小さいナノシリカは生体に有害影響を引き起こす可能性が示唆された。

今後、ナノシリカについて皮膚の透過性について超微形態学的に検討する。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

①論文発表

②学会発表

第 35 回日本トキシコロジー学会、東京 2008. 6.
ナノマテリアルの細胞内局在性および細胞毒性について電子顕微鏡による検討
今澤孝喜、西森光、角田慎一、吉川友章、鍋師裕美、磯田勝広、近藤昌夫、八木清仁、堤康央

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

②実用新案登録

③その他

I. 研究協力者

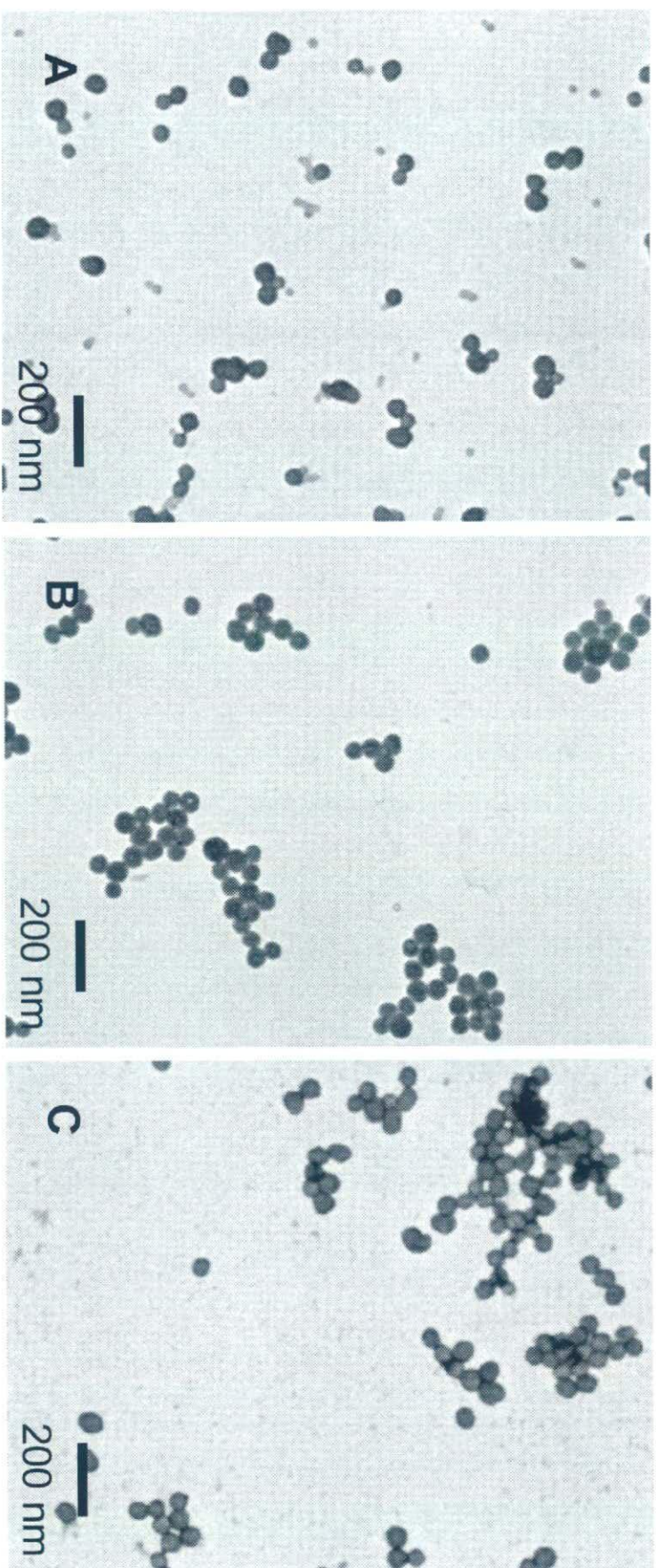


写真1 各70 nmシリカの電顕像

A: 70 nm 未修飾体シリカ(SP70)

B: 70 nm COOH修飾体シリカ(SP70-C)

C: 70 nm NH₂修飾体シリカ(SP70-N)

粒子はいずれも球形を呈し、SP70は単独あるいは2~4個の凝集、SP70-CおよびSP70-Nは凝集塊を形成し、単独の粒子は少ない

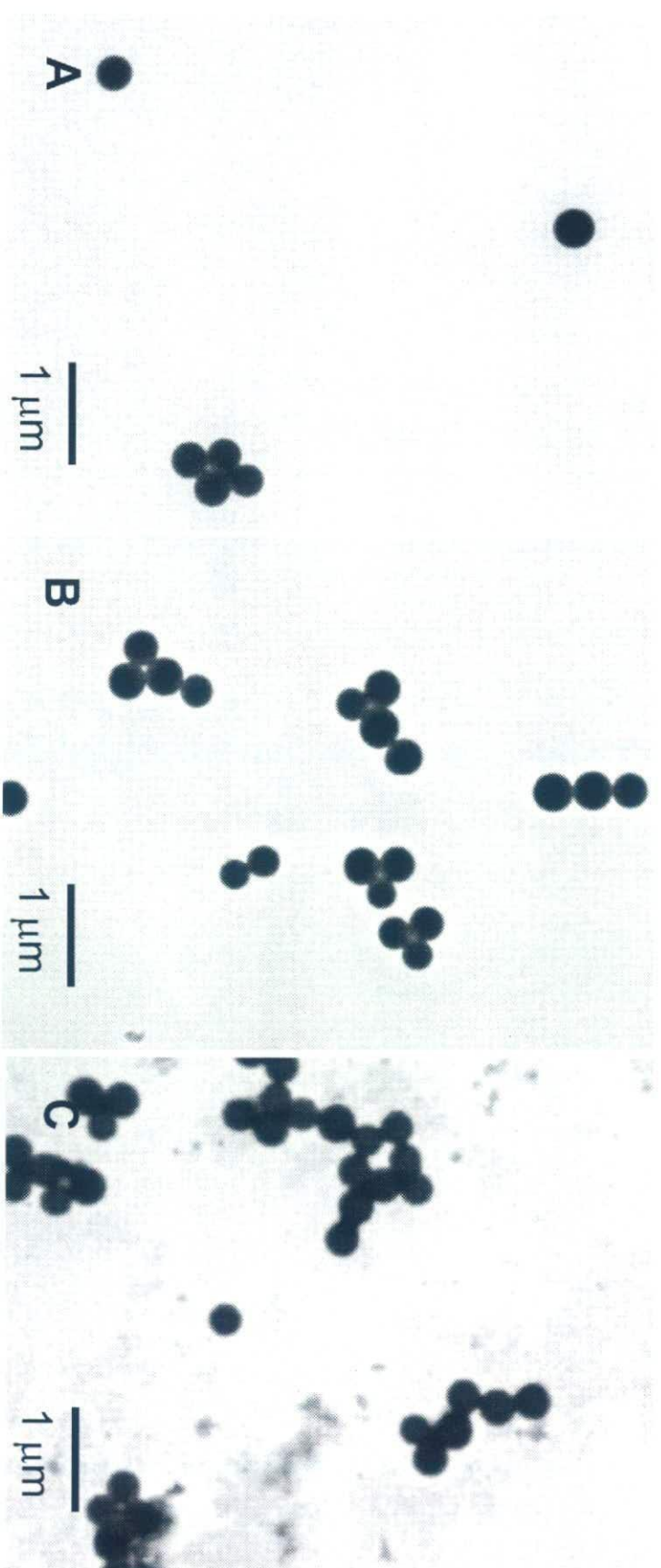


写真2 各300 nmのシリカの電顕像

A: 300 nm 未修飾体シリカ(SP300)

B: 300 nm COOH修飾体シリカ(SP300-C)

C: 300 nm NH₂修飾体シリカ(SP300-N)

粒子はいずれも球形を呈し、SP300-CおよびSP300-NはSP300と比較して凝集性が強い

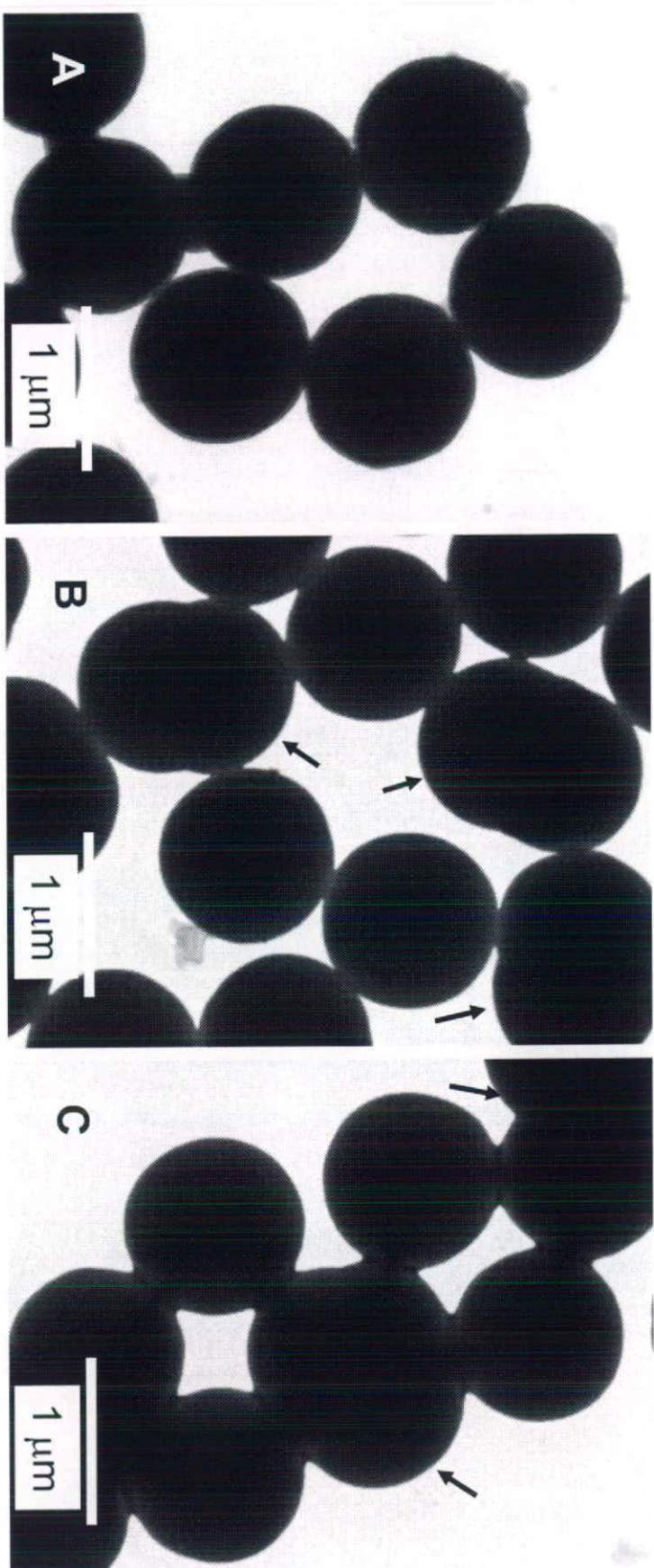


写真3 各1000 nmのシリカの電顕像

A: 1000 nm 未修飾体シリカ(SP1000)

B: 1000 nm COOH修飾体シリカ(SP1000-C)

C: 1000 nm NH₂修飾体シリカ(SP1000-N)

粒子はいずれも球形を呈し、SP1000-CおよびSP1000-Nは粒子の上に粒子が積み重なった状態で凝集している (矢印)

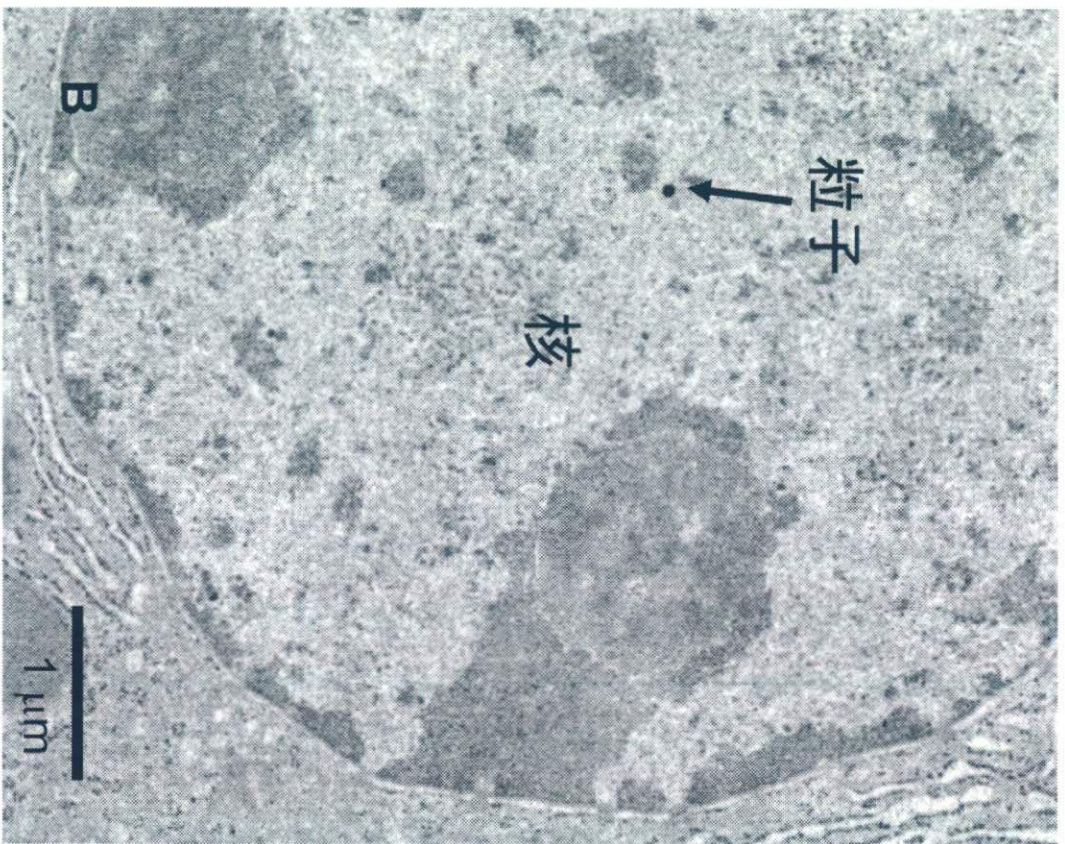
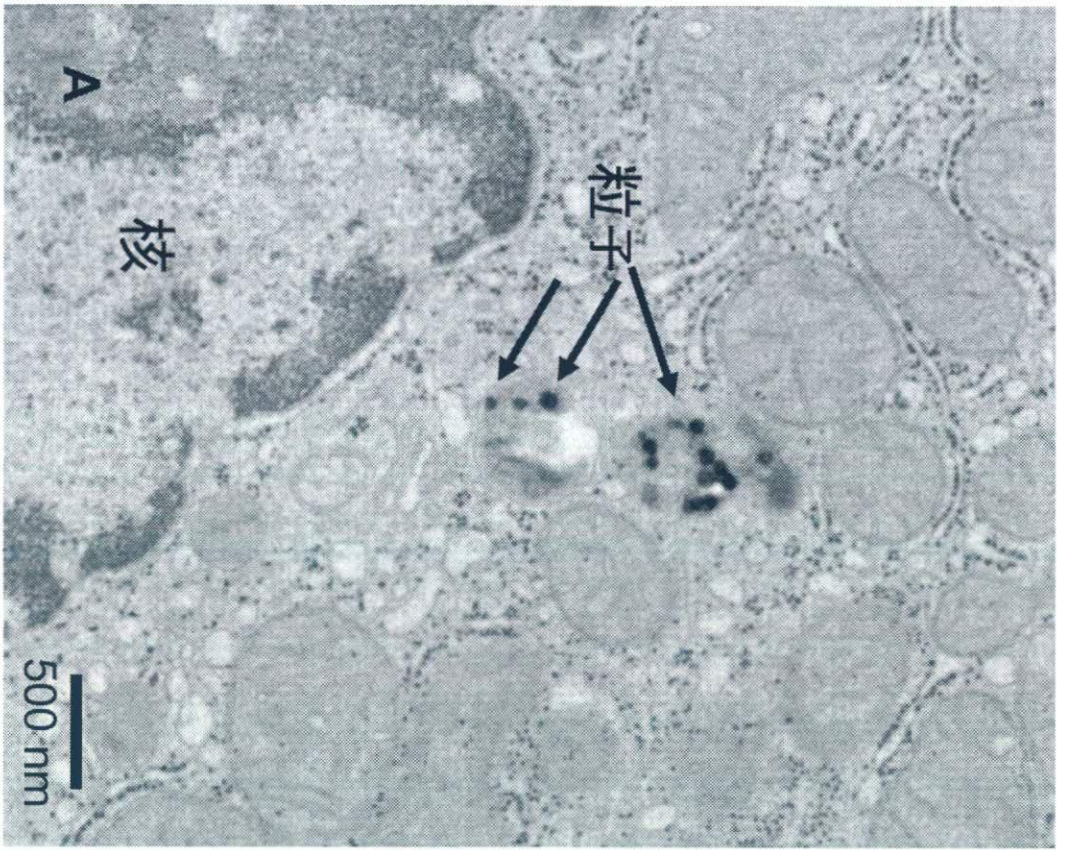


写真4 SP70を投与した肝細胞

A: 肝細胞内に侵入した粒子が観察される。無染色で観察
粒子が観察される。無染色で観察

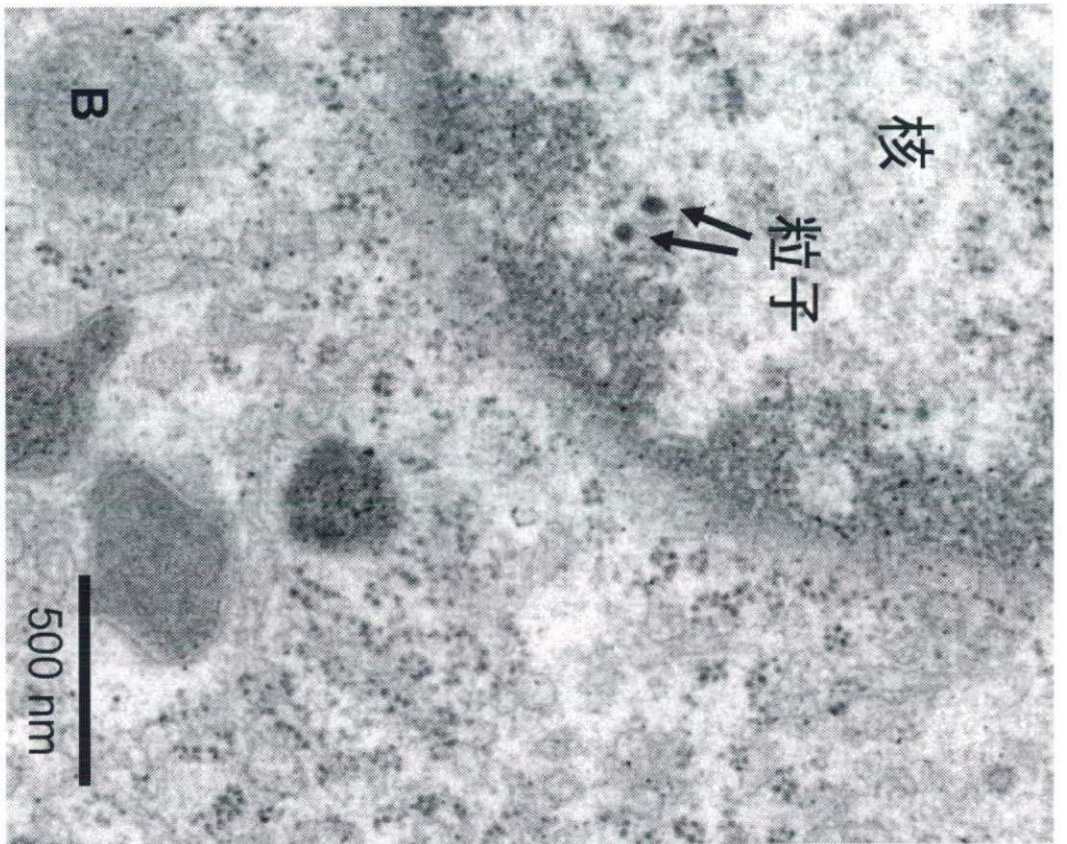
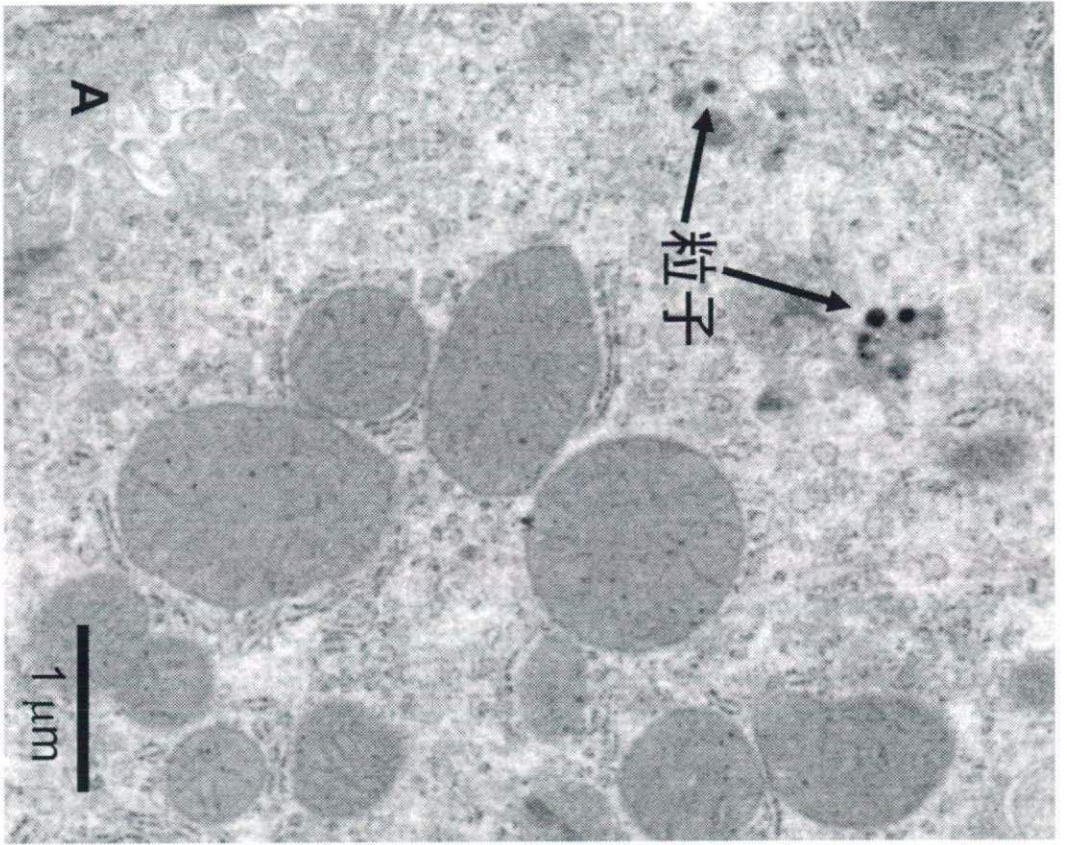


写真5 SP70-Cを投与した肝細胞

A: 肝細胞内に侵入した粒子が観察される。B: 肝細胞の核内に侵入した粒子が観察される。無染色で観察

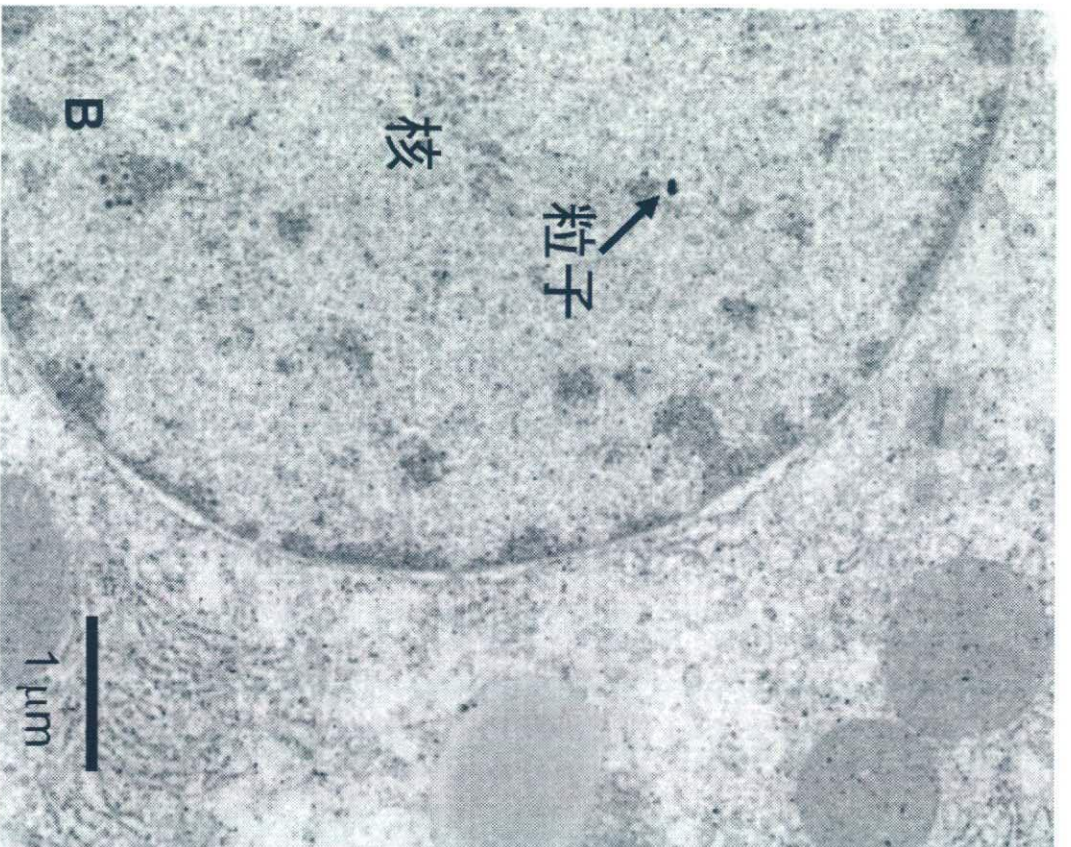
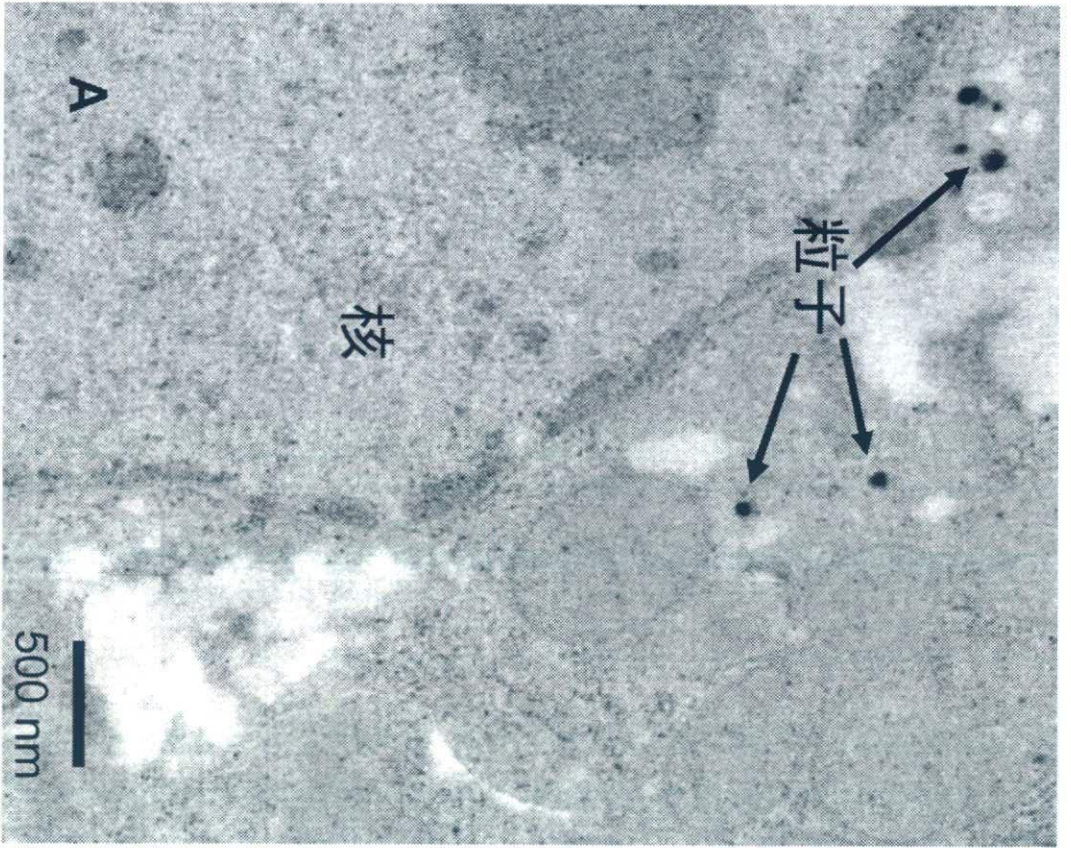


写真6 SP70-Nを投与した肝細胞

A: 肝細胞内に侵入した粒子が観察される。B: 肝細胞の核内に侵入した粒子が観察される。無染色で観察

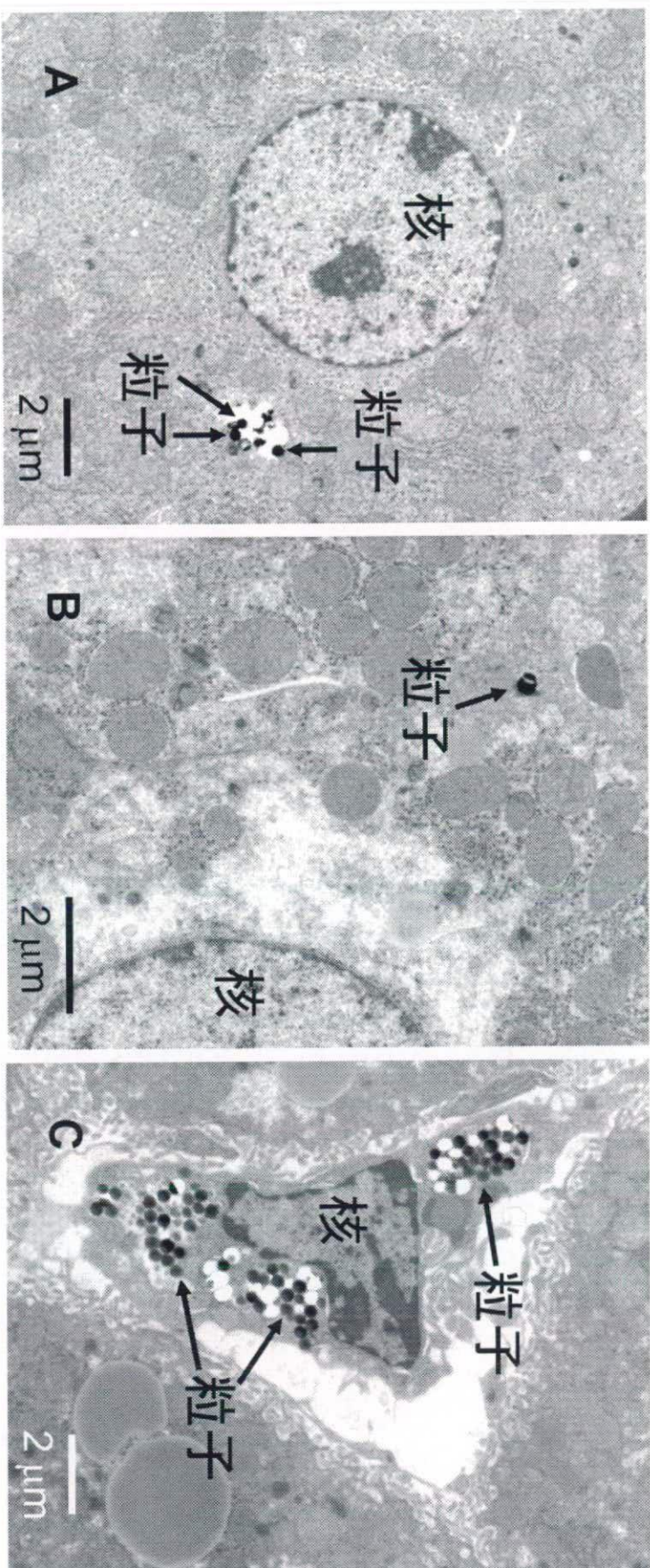


写真7 SP3300(A), SP3300-C(B), SP3300-N(C)を投与した肝組織

A: 肝細胞内に侵入した粒子が観察される

B: 肝細胞内に僅かに侵入した粒子が観察される

C: クツパー細胞に貪食されている多数の粒子が観察される

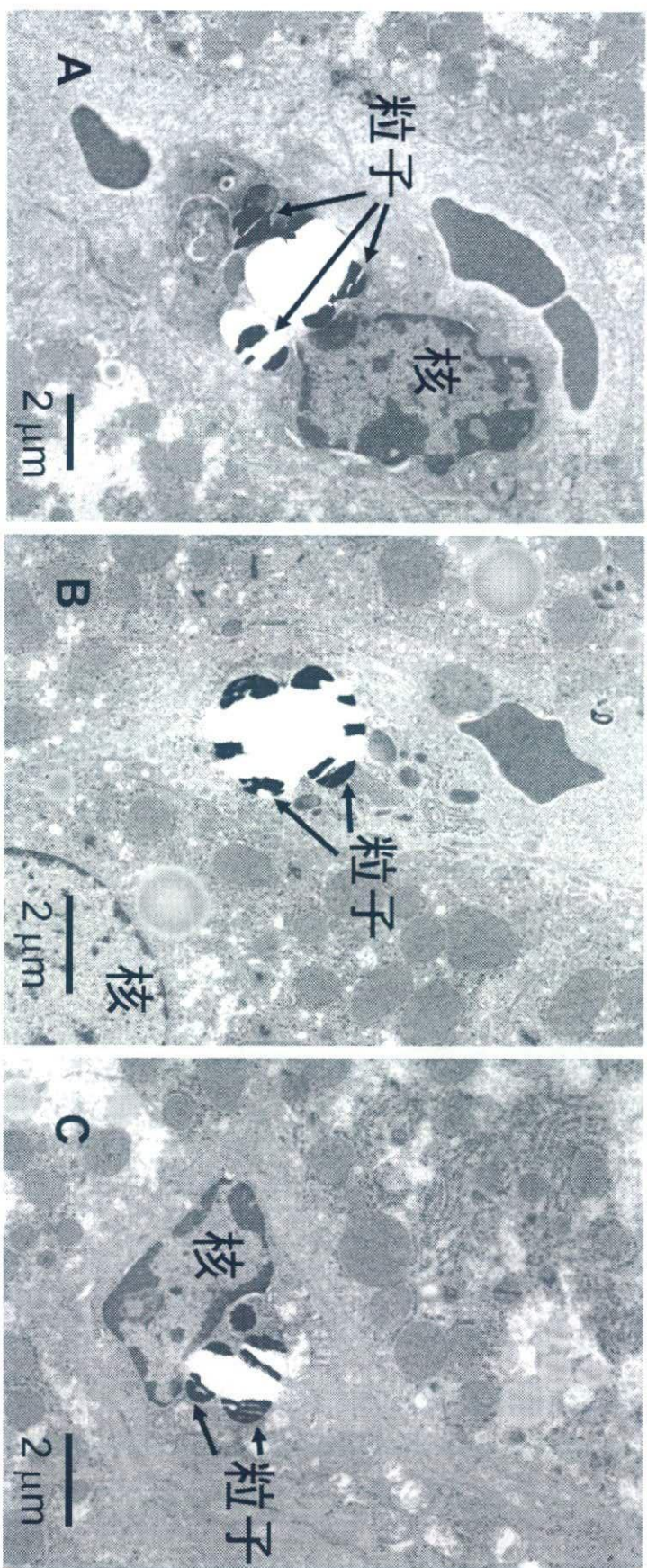


写真8 SP1000(A), SP1000-C(B), SP1000-N(C)を投与した肝組織
いずれの粒子もクッパー細胞に貪食された粒子が観察される

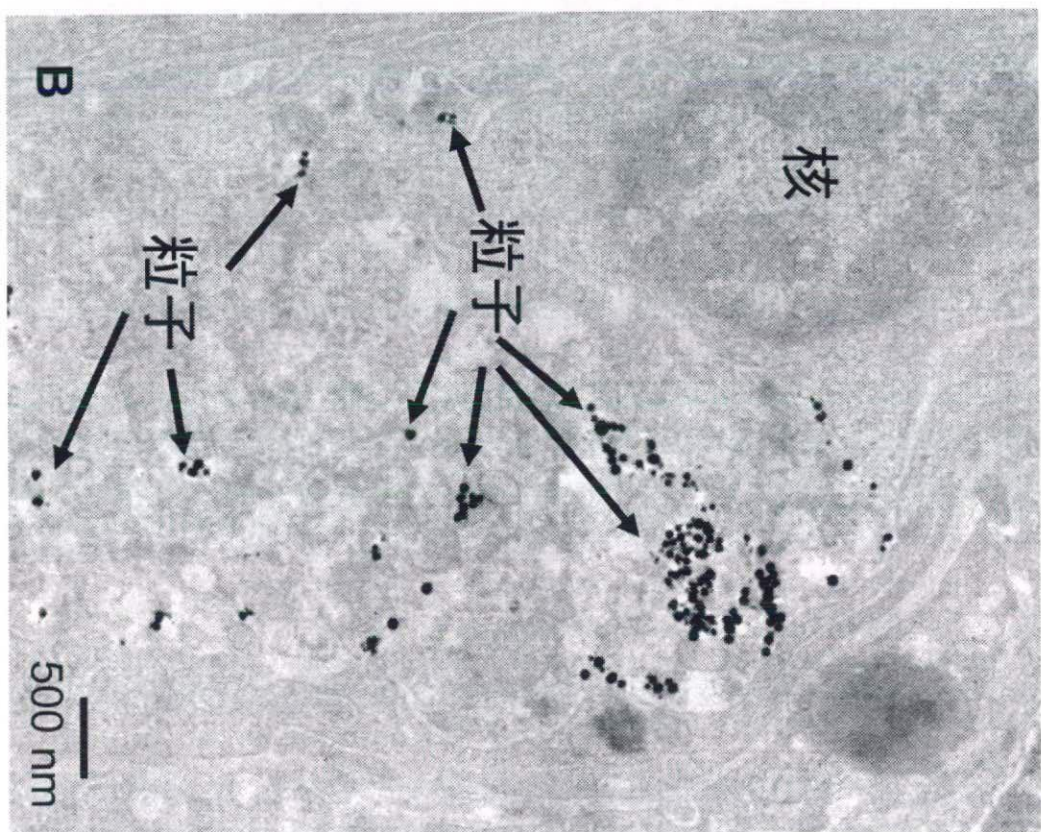
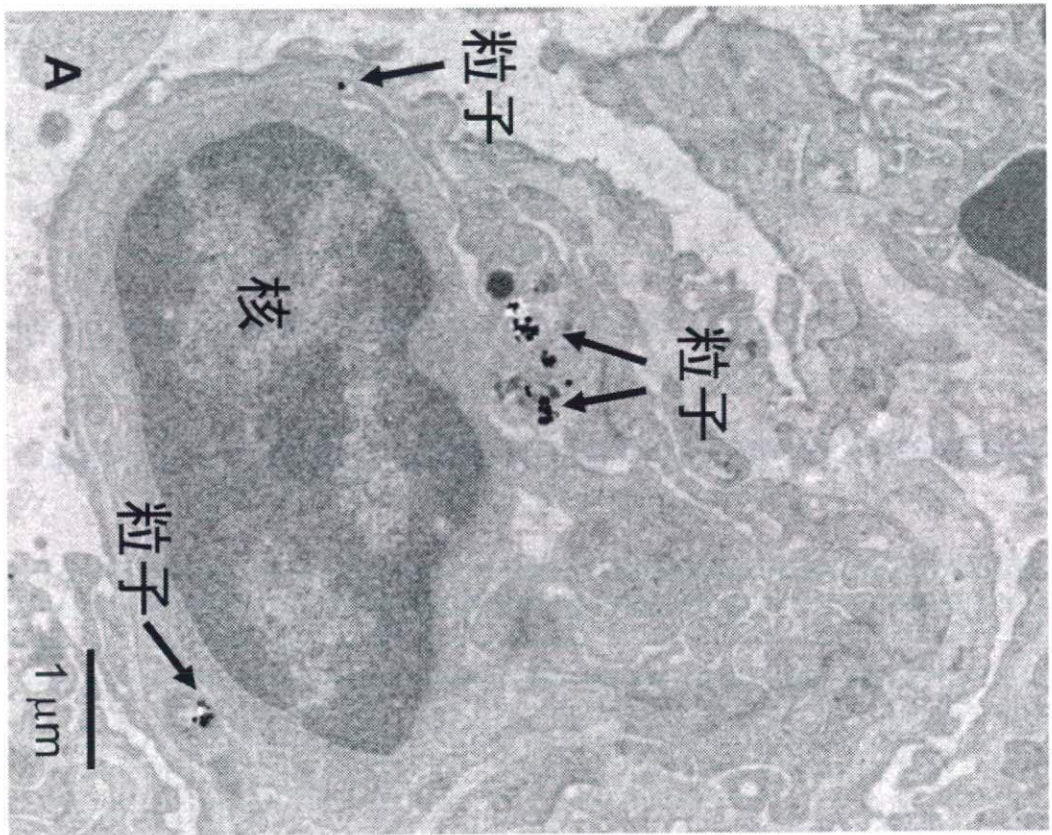


写真9 SP70を投与した肺組織

A: 毛細血管上皮細胞内に侵入した粒子が観察される。B: II型肺胞上皮細胞内に侵入あるいは貪食された多数の粒子が観察される。無染色で観察

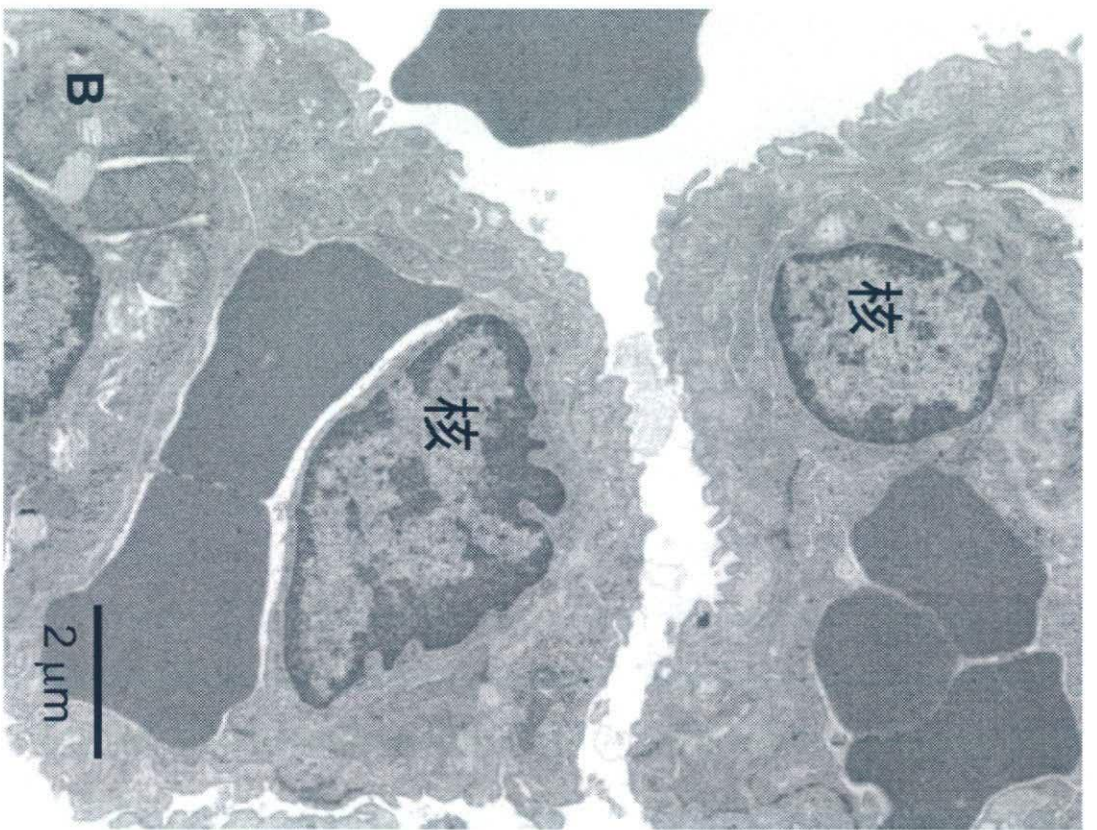
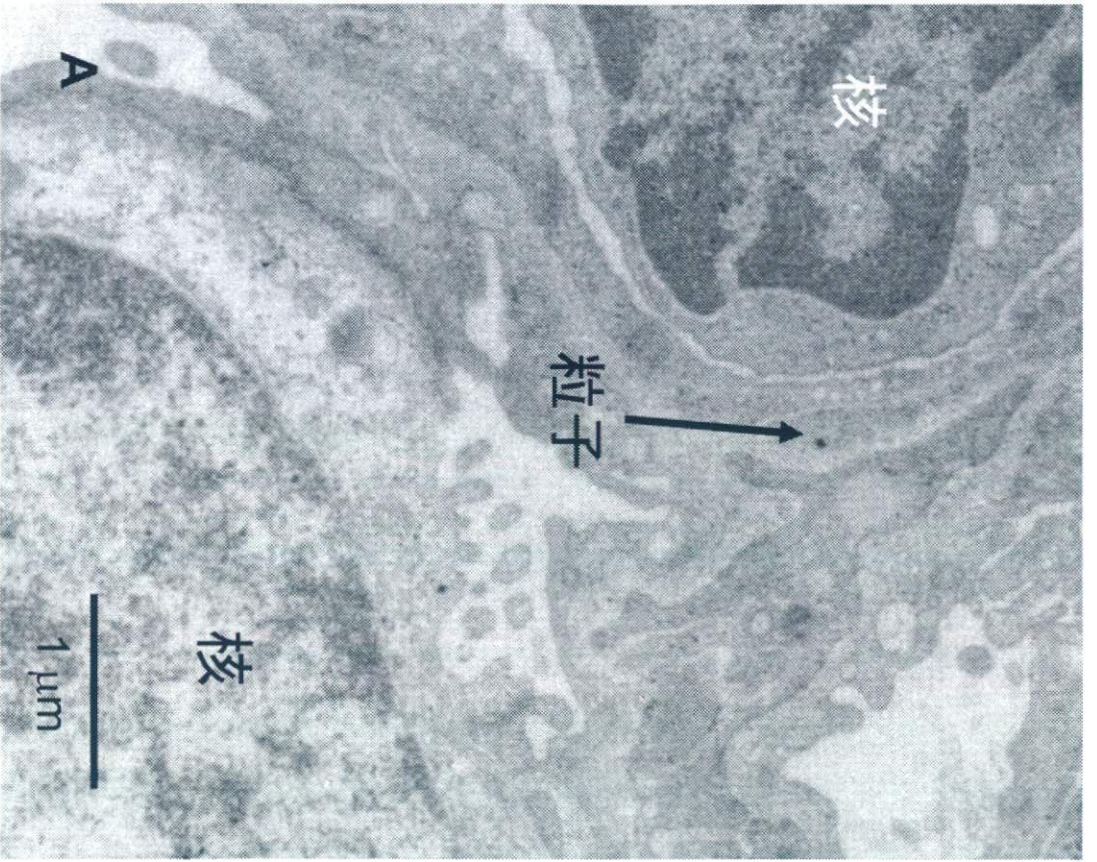


写真10 SP70-C(A), SP70-N(B)を投与した肺組織

A: 毛細血管上皮細胞内に侵入した粒子が僅かに観察される。B: SP70-N
 粒子は肺組織では観察されなかった。無染色で観察

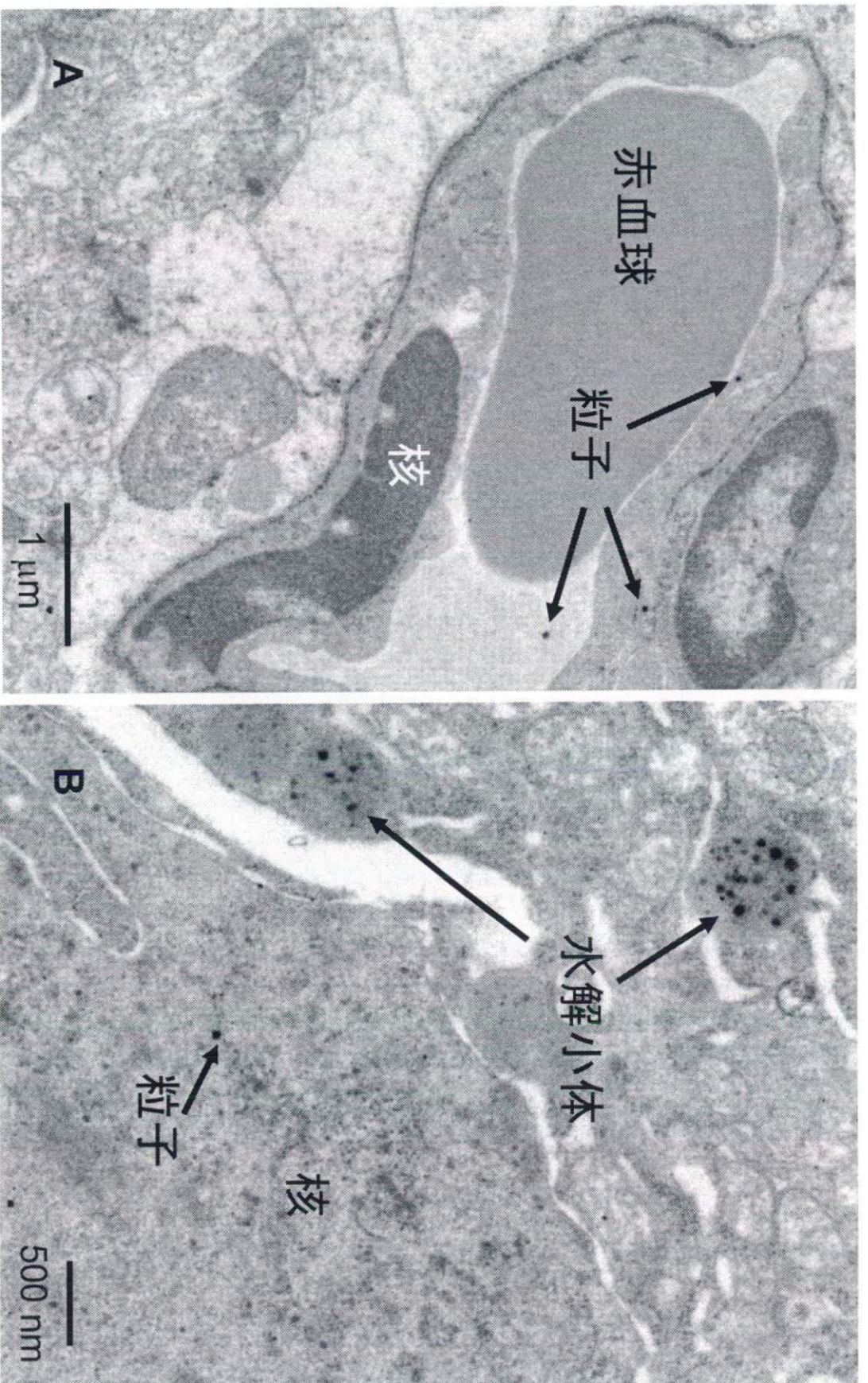


写真11 SP70を投与した大脳皮質

A: 毛細血管内および内皮細胞内に侵入した粒子が観察される。B: 星状膠細胞の核内に侵入および水解小体内に粒子が観察される。無染色で観察

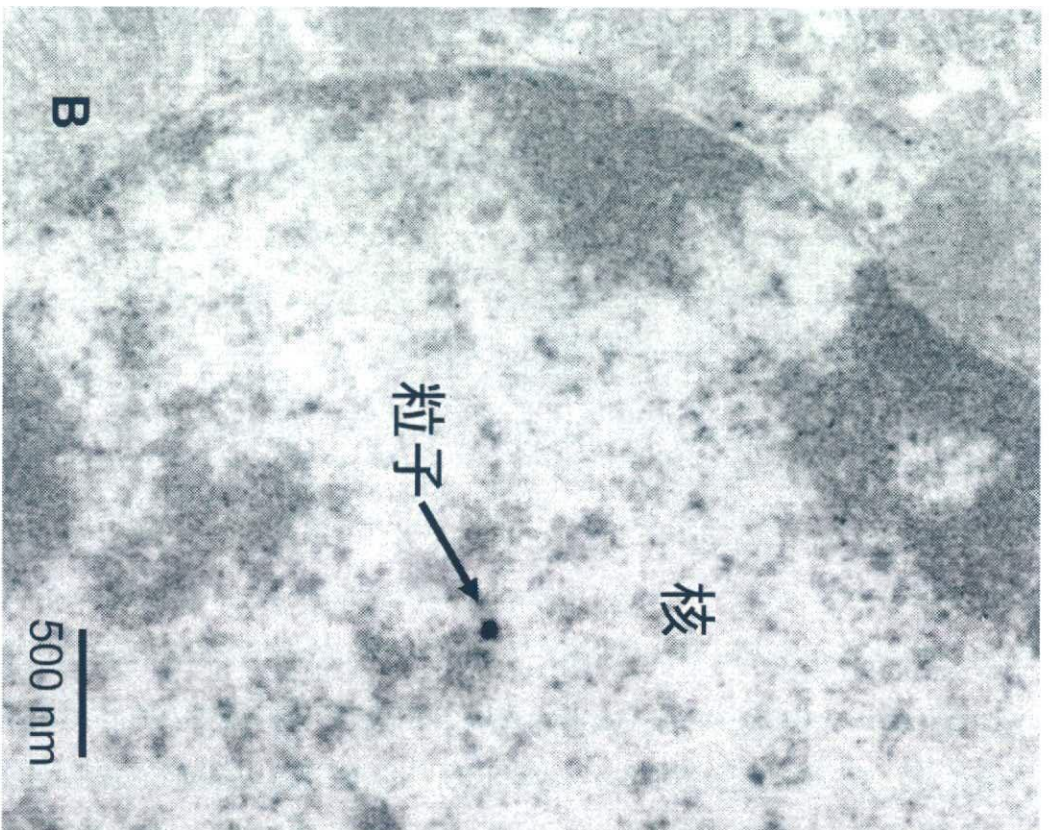
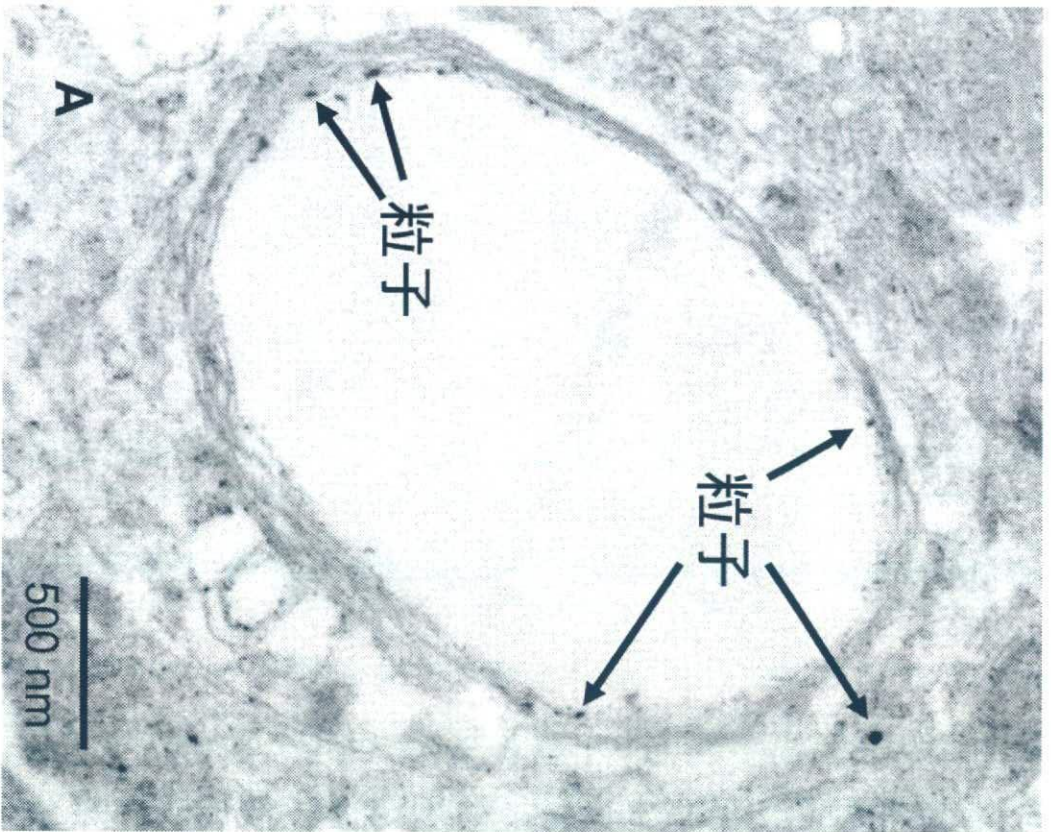


写真12 SP70-Cを投与した大脳皮質

A: 毛細血管内皮細胞内に侵入した粒子が観察される。B: 星状膠細胞の核内に侵入した粒子が観察される。無染色で観察

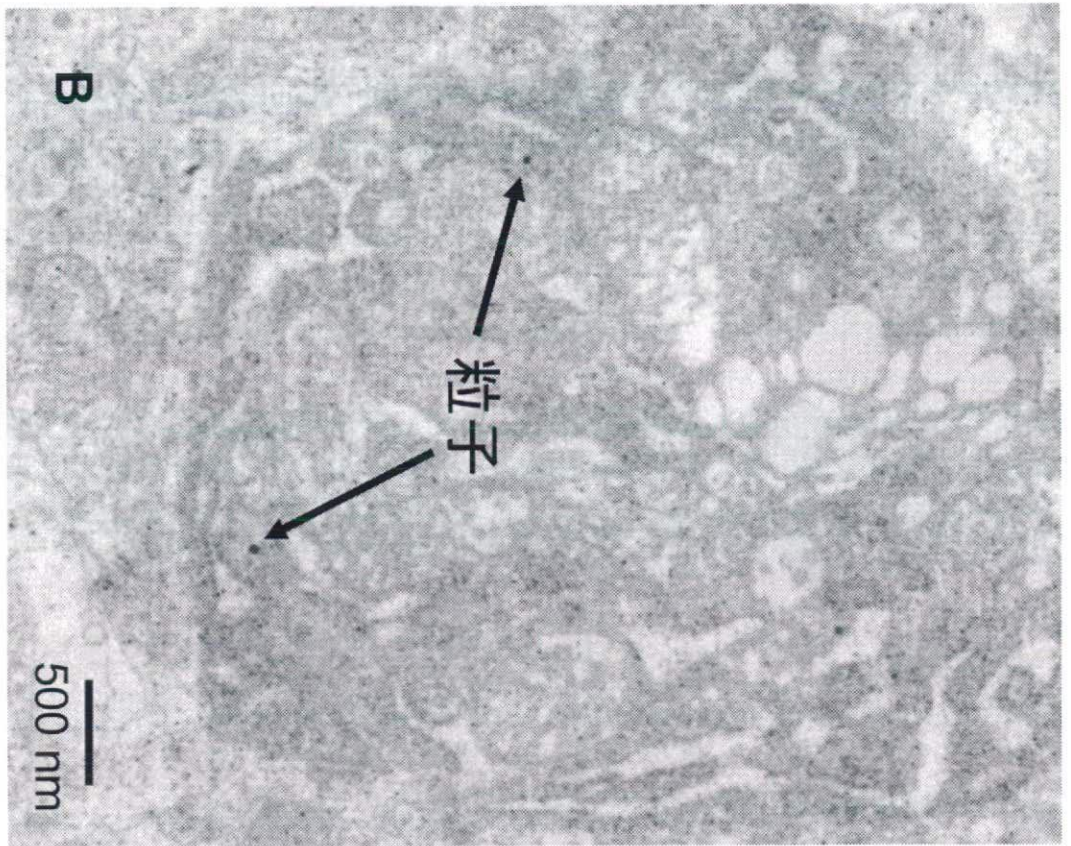
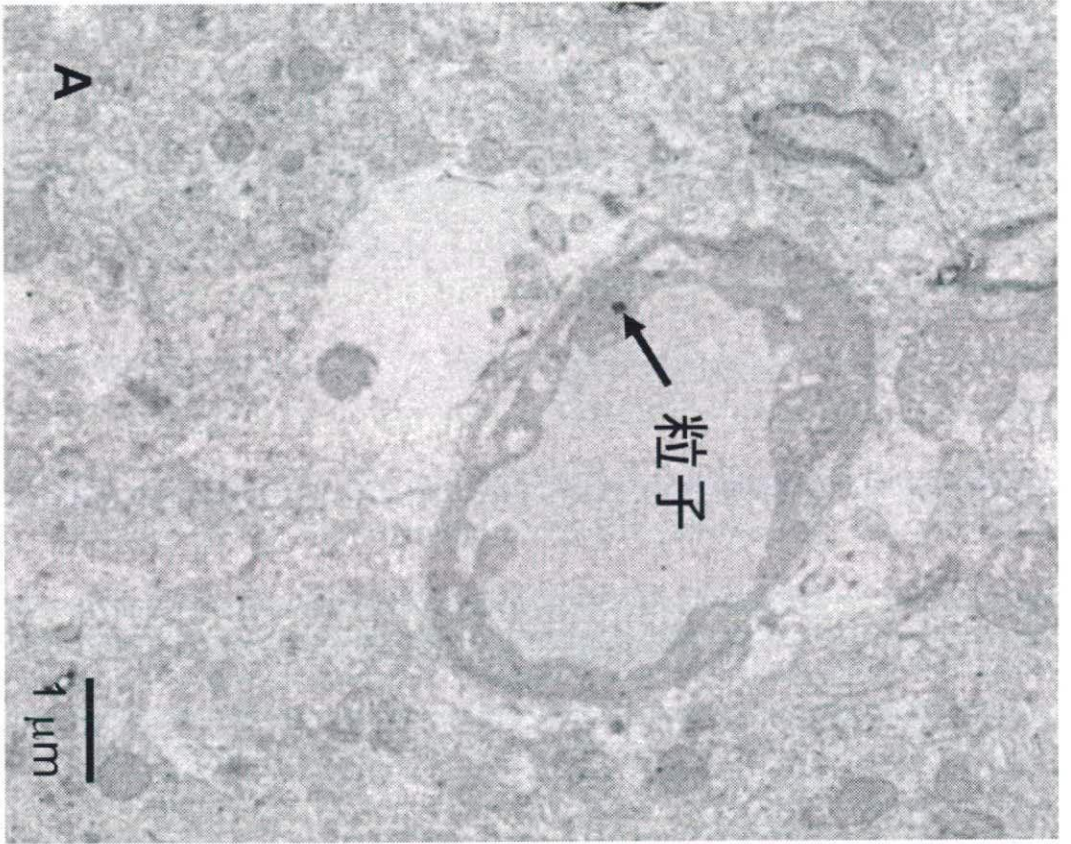


写真13 SP70-Nを投与した大脳皮質

A: 毛細血管内皮細胞内に侵入した粒子が観察される。B: 星状膠細胞内に侵入した粒子が観察される。無染色で観察

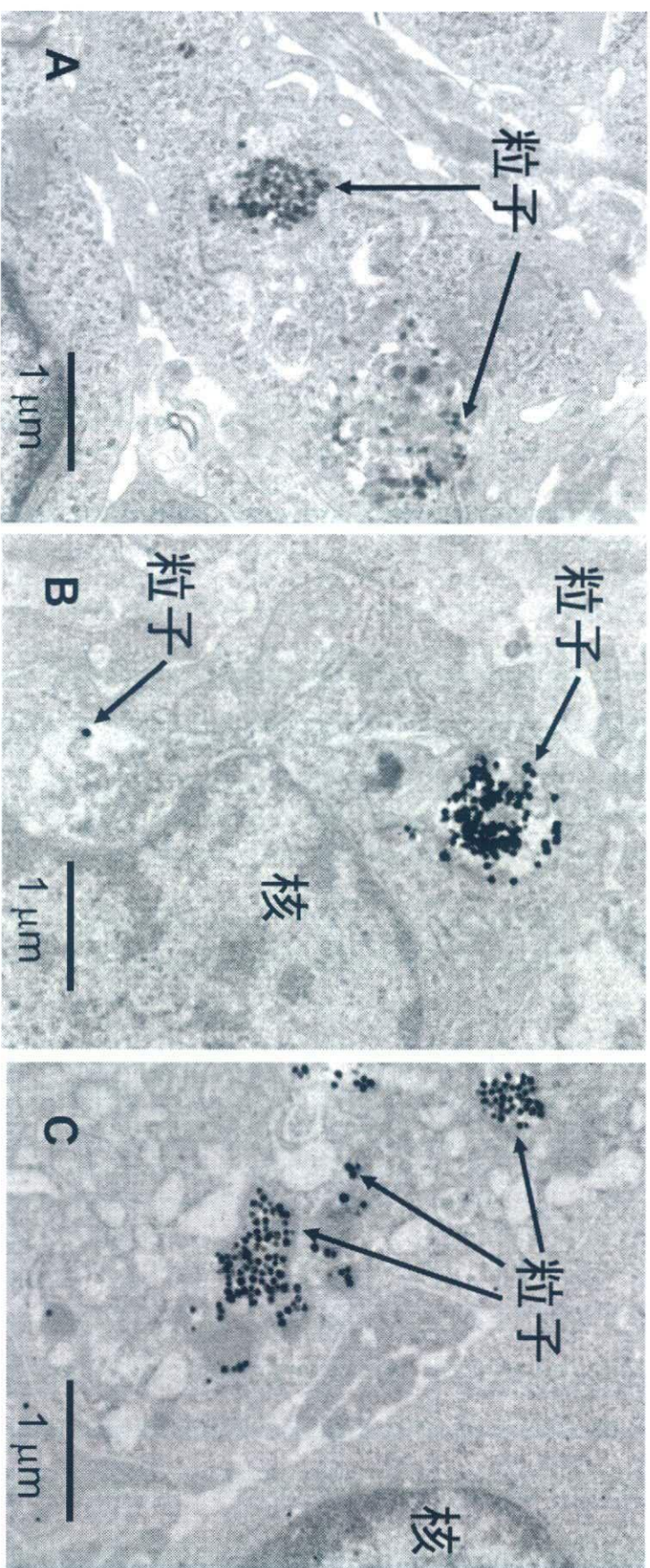


写真14 SP70(A), SP70-C(B), SP70-N(C)を投与した脾組織

未修飾体、修飾体のいずれの粒子も大食細胞に多数貪食されている。

無染色で観察

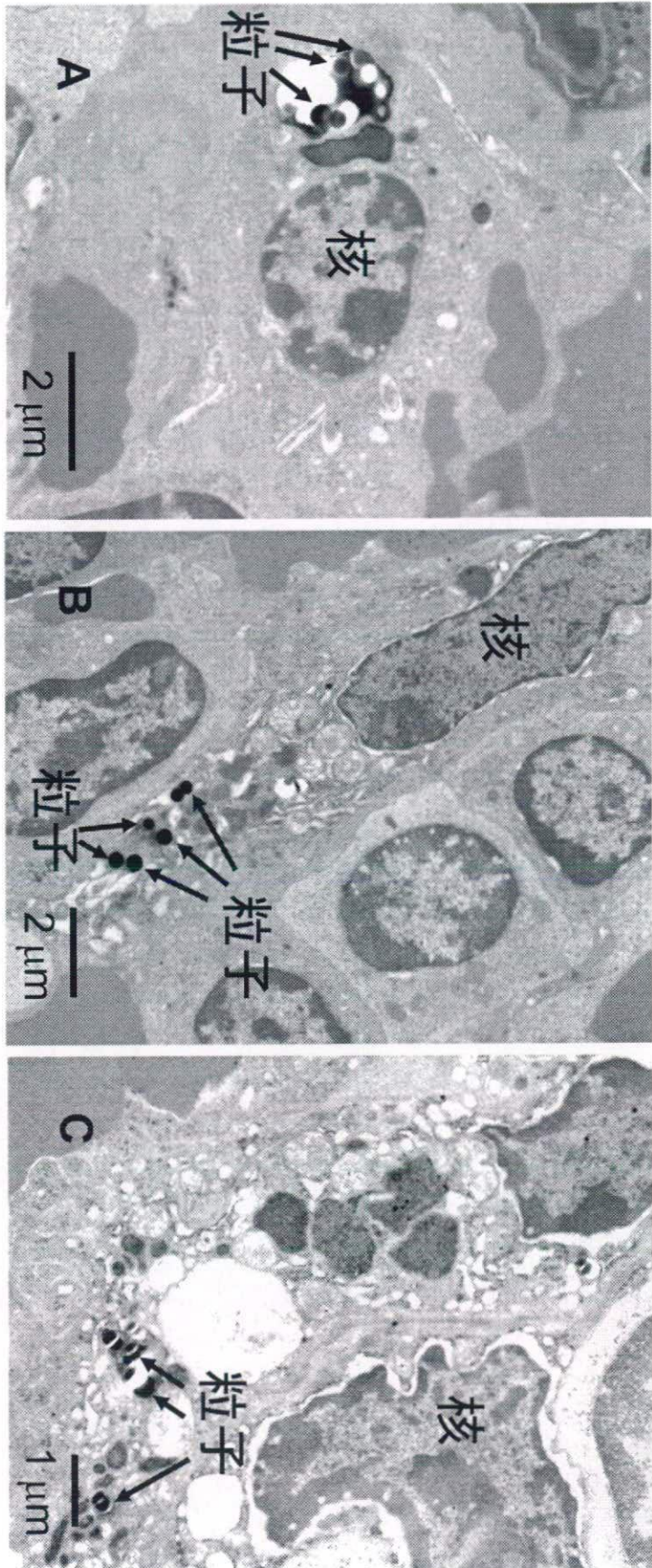


写真15 SP300(A), SP300-C(B), SP300-N(C)を投与した脾組織
 いずれの粒子も大食細胞に貪食されている

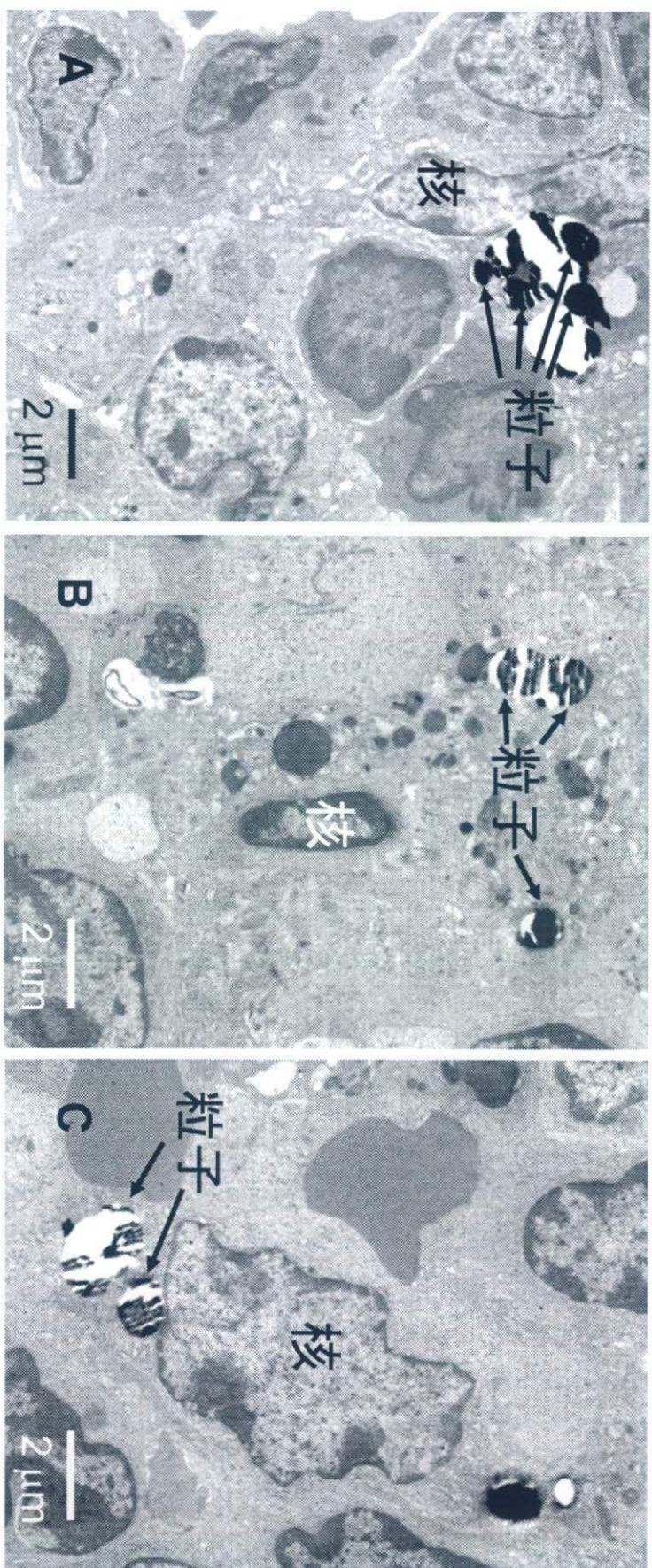


写真16 SP1000(A), SP1000-C(B), SP1000-N(C)を投与した脾組織
いずれの粒子も大食細胞に貪食されている

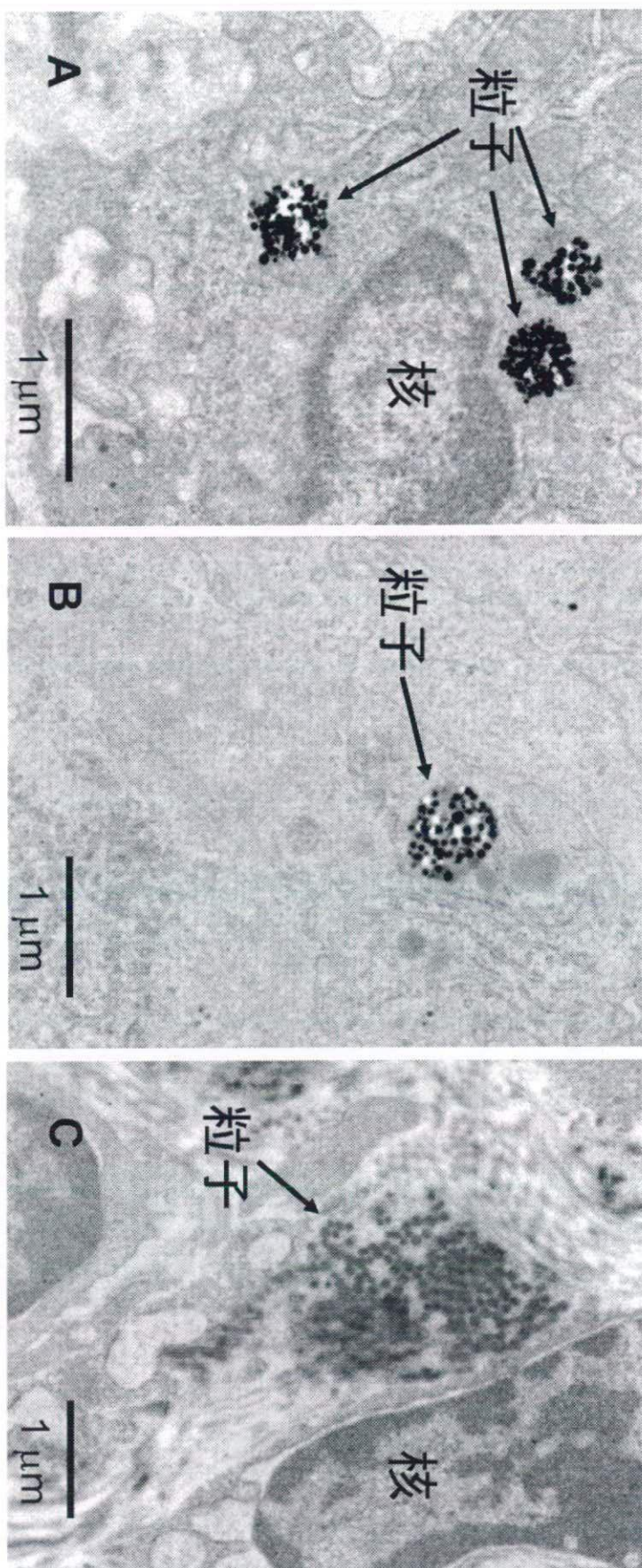


写真17 SP70(A), SP70-C(B), SP70-N(C)を投与した鼠頸リンパ節
未修飾体、修飾体のいずれの粒子も大食細胞に多数貪食されている。
無染色で観察

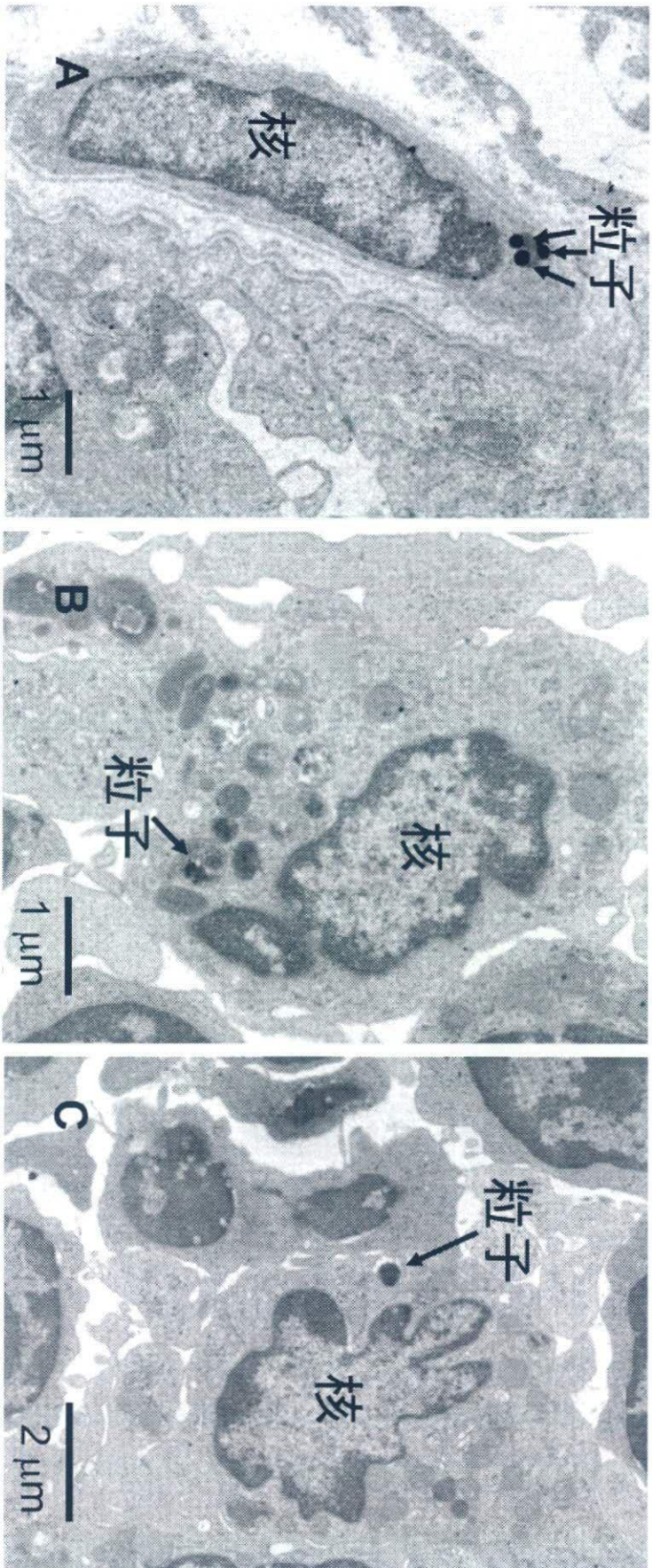


写真18 SP300(A), SP300-C(B), SP300-N(C)を投与した鼠頸リンパ節
いづれの粒子も大食細胞に貪食されている

ナノマテリアルの細胞傷害性評価並びにその誘導機序に関する研究

研究分担者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師 (常勤)

研究要旨

近年、酸化チタンやシリカなどの種々ナノマテリアルが化粧品・医薬品成分として汎用されつつあり、その適用範囲は飛躍的に拡大している。その一方で、ナノマテリアルが生体において炎症を惹起することが報告されるなど、その安全性が懸念されている。従って、今後のナノマテリアルの安全性確保には、粒子特性に応じた生体影響評価が急務であると考えられる。本観点から我々は、ナノマテリアルの社会受容促進や健康福祉の観点から、ナノマテリアルの安全性評価として、主に免疫システムに与える影響に着目し検討を進めている。本年度は、粒子径、表面修飾、形状等が異なるシリカ、酸化チタンを用いて、炎症惹起作用と免疫抑制作用について検討した。その結果、直径 70 nm のシリカは TNF α 産生を誘導することで炎症を惹起する一方で、直径 1000 nm のシリカは IL-1 β 産生により炎症を惹起する可能性が示唆された。また、これら起炎性は、シリカの表面電荷を変化させることで低減可能であることを見出した。さらに、表面が負に荷電した直径 70 nm のシリカは、LPS 刺激による炎症を抑制する可能性を見出した。これら成果は、ナノマテリアルの粒子径、表面電荷の違いにより、免疫細胞に与える影響が全く異なることを示すものである。次に、酸化チタンの起炎性を評価した結果、マイクロサイズの酸化チタンが強い IL-1 β 産生を伴う起炎性を有していることを見出した。更に、将来的に成人のみならず胎児免疫システムへの影響を評価する目的で、ナノシリカの胎児への移行を評価した。その結果、母体に投与したシリカは胎盤を通過し、胎児にまで移行することを見出した。以上の結果は、今後の安全なナノマテリアルの創製において、有用な情報を提供するものである。

A. 研究目的

産業技術の発展に伴い、物質をナノメートルサイズで自在に制御するナノテクノロジーに大きな期待が寄せられ、21 世紀を担う新技術として各国での研究競争が過熱している。中でも、ナノテクノロジーを駆使して創製したナノ物質 (ナノマテリアル) は、“一つの次元の大きさが 1~100 nm の素材” として幅広く定義され、従来のマイクロマテリアルと比較して、①サイズ減少に伴う組織浸透性の増大、②電子反応性の増大、③安定性の向上、といった特性を有することから、医学・工学・薬学などあらゆる領域への応用が図られている。薬学領域においては、低分子薬物やタンパク質、遺伝子の徐放化基材とし

て、あるいは日焼け止めやファンデーション等の化粧品主材として広く利用されつつある。また、分散性を向上させるための表面加工や、表面積を増大させるための形態制御など更なる加工技術も精力的に研究されており、現在も新たな機能性ナノマテリアルが続々と開発されている。

しかしながら、ナノマテリアルが環境や人体へ及ぼす影響については十分に解明されていないのが現状である。ナノマテリアルは、ナノサイズであることに起因する未知の体内挙動を取る可能性や、単位重量当たりの表面積増大による反応性の増強等による未知の有害性を示す可能性も十分に考えられる。そのため、ナノマテリアルが環境や人体に及ぼす影