

- の動態特性と免疫毒性., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
15. 長野一也, 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 森下裕貴, 鍋師裕美, 阿部康弘, 吉川友章, 角田慎一, 齊藤 滋, 河合裕一, 眞弓忠範, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-5 ナノマテリアルの動態特性と生殖発生毒性., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
  16. 鍋師裕美, 吉川友章, 仲里泰太郎, 栃木彩恵子, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-6 表面修飾ナノシリカの安全性評価と安全なナノマテリアルの開発支援., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
  17. 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 栃木彩恵子, 近藤小百合, 平井敏郎, 伊藤徳夫, 堤 康央: 薬学領域におけるナノマテリアルの安全性確保研究 ~ナノマテリアルの体内相互作用解析と安全性との関連追求~, 第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 東大阪 (大阪), 2009 年 10 月.
  18. Yoshida T., Yoshioka Y., Kayamuro H., Yamashita K., Higashisaka K., Fujimura M., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Urban aerosol directly stimulates antigen presentation cells in vitro and cause airway inflammation in vivo., 第 39 回 日本免疫学会学術集会, 大阪 (大阪), 2009 年 12 月.
  19. 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 森下裕貴, 吉田徳幸, 藤村真穂, 鍋師裕美, 長野一也, 阿部康弘, 吉川友章, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 眞弓忠範, 角田慎一, 堤 康央: 安全確保に向けた非晶質ナノシリカの生殖発生毒性に関する検討., ファーマバイオフォーラム 2009, 名古屋 (愛知), 2009 年 11 月.
  20. 李 相儒, 渡利彰浩, 近藤昌夫, 堤 康央, 八木清仁: ナノシリカ粒子と薬物と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 130 年会, 岡山 (岡山), 2010 年 3 月
  21. 平井敏郎, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 栃木彩恵子, 近藤小百合, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 樹状細胞を標的としたナノシリカの経皮安全性評価., 日本薬学会 第 130 年会, 岡山 (岡山), 2010 年 3 月.
  22. 栃木彩恵子, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 平井敏郎, 近藤小百合, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 血液凝固系に着目した非晶質ナノシリカの安全性評価., 日本薬学会 第 130 年会, 岡山 (岡山), 2010 年 3 月.
- 【国際学会発表: 合計 9 件】**
1. Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : In vitro nanotoxicological study of silica nanoparticles using dermal cell lines., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
  2. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas., The 46th Congress of the European

- Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
3. Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent intracellular distribution and genotoxicity of amorphous nanosilicas in human keratinocytes., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
  4. Nakazato Y., Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Differential acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas: The role of surface physicochemical properties., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
  5. Yoshida T., Yoshioka Y., Kayamuro H., Yamashita K., Higashisaka K., Nakanishi R., Abe Y., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Urban aerosol directly stimulates antigen presentation cells in vitro and cause airway inflammation in vivo., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
  6. Yoshioka Y., Morishige T., Tanabe A., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Nanosilicas with different sizes and surface charges induce different profiles of cytokine production on macrophages., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
  7. Yagi K., Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Hepatotoxicity of silica nanoparticles in mice., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
  8. Yamashita K., Yoshioka Y., Kayamuro H., Yoshida T., Higashisaka K., Abe Y., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Cancer hazard of carbon nanotubes: size/shape-dependent induction of DNA damage and inflammation., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon (Portugal), 18-21 October, 2009.
  9. Yoshioka Y., Morishige T., Inakura H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Inflammatory responses of titanium dioxide with different size and properties., 49th Annual Meeting & ToxExpo (SOT2010), Salt Lake City, (USA), 7-10 March, 2010.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- ① 特許取得  
該当なし
  - ② 実用新案登録  
該当なし
- その他**
- 研究協力者**  
鎌田春彦、吉川友章、阿部康弘、山根美紀、鍋師裕美、伊藤徳夫、今井直、野村鉄也、長野一也、

萱室裕之、小野寺章、岡村賢孝、仲里泰太郎、松山恵吾、山下浩平、吉田徳幸、荻田郁弥、東阪和馬、栃木彩恵子、渡邊貴信、藤村真穂、有田修平、山下琢矢、赤瀬貴憲、東阪和馬、中西亮介、磯部将彰、有森亮裕、橋野のぶよ、物部容子、向洋平、森重智弘、渡辺光、松尾一彦、吉川舞、川合泰明、小島拓記、久保 貴、瀬戸正志、津森優希、齋場 雄貴、横田やよい、川端洋輝、姚 醒蕾、成松翔伍、稲倉裕、近藤昌夫、磯田勝広、角谷秀樹、吉田猛史、高橋梓、松久幸司、河原倫之、佐伯理恵、斎藤郁美子、松下恭平、山本芙美、鈴木英彦、李相儒

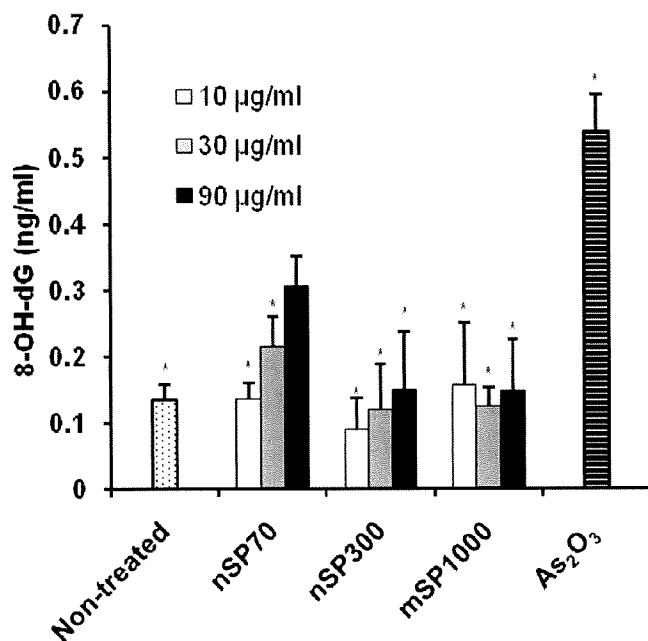


図 1. ナノシリカ処置 HaCaT 細胞における DNA の酸化的損傷の検出  
種々の濃度のシリカ、あるいはポジティブコントロールとして三酸化ヒ素(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)を HaCaT 細胞に作用させ、3 時間インキュベートした。その後、DNA を抽出・加水分解処理した後、ELISA 方を用いて 8-OHdG の含有量を測定した。\**P* < 0.01 vs nSP70 (90 μg/ml)。

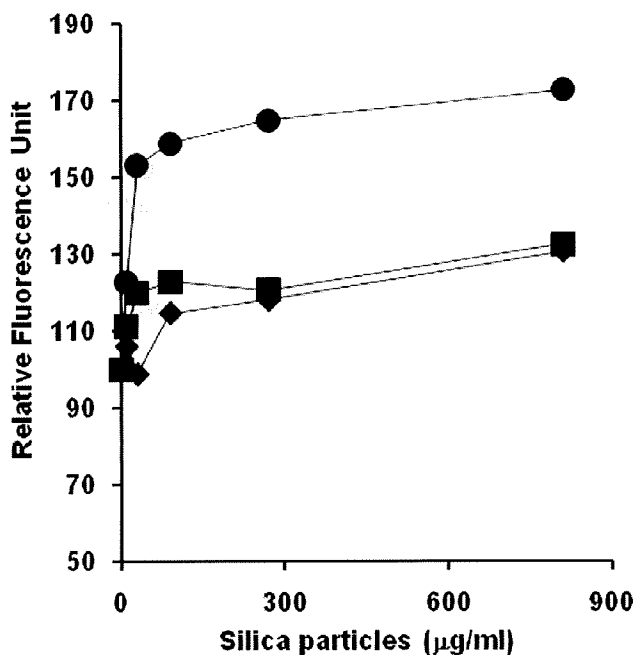
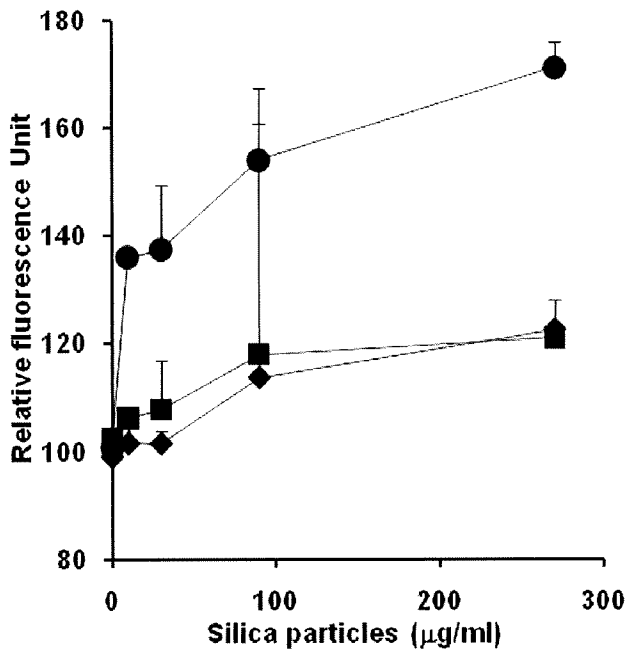
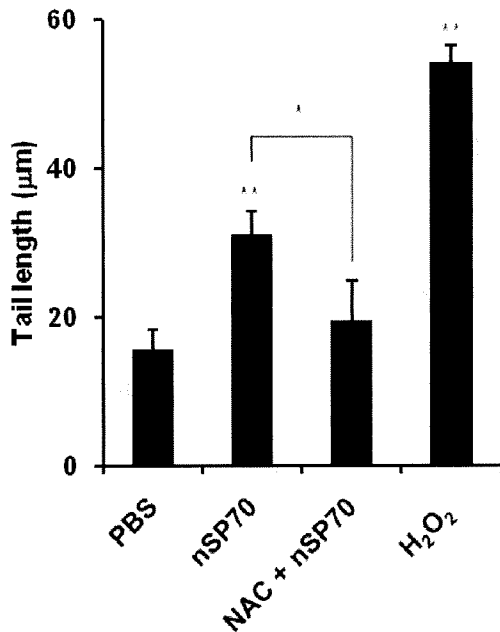


図 2. ナノシリカ処置 HaCaT 細胞における ROS の産生  
種々の濃度のシリカを HaCaT 細胞に作用させ、3 時間インキュベートした。これらの細胞を回収・洗浄した後に細胞膜透過性 ROS 特異的プローブである DCFH-DA を添加して 30 分間反応させた。細胞を洗浄した後 DCFH 由来の蛍光(励起波長: 485 nm、蛍光波長: 530 nm) を蛍光プレートリーダーを用いて測定した。



**図 3. ナノシリカ処置 HaCaT 細胞におけるヒドロキシルラジカルの産生**

種々の濃度のシリカを HaCaT 細胞に作用させ、3 時間インキュベートした。これらの細胞を回収・洗浄した後に細胞膜透過性ヒドロキシルラジカル (OH) あるいは次亜塩素酸 (OCI) の特異的プローブである HPF を添加して 30 分間反応させた。細胞を洗浄した後 HPF 由来の蛍光 (励起波長: 485 nm、蛍光波長: 530 nm) を蛍光プレートリーダーを用いて測定した。



**図 4. ナノシリカによる HaCaT 細胞の DNA 損傷発現に対する ROS 阻害剤の影響**

HaCaT 細胞を 2 mM の N-アセチルシステイン (NAC) で 30 分間前処置した後に、90 μg/ml の nSP70 を添加し、3 時間後に細胞を回収した。ポジティブコントロールとして 0.2 mM の過酸化水素を用いた。ナノシリカ処置細胞の DNA 損傷の度合いをコメットアッセイにより検出し定量した。\*\* $P < 0.01$  vs PBS, \* $P < 0.01$  vs nSP70.

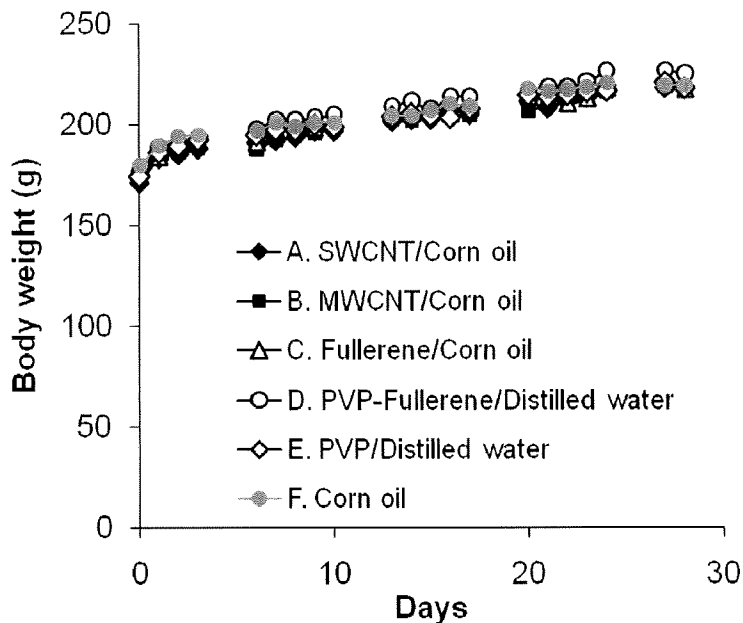


図 5. 反復投与経皮毒性 (28 日) 試験 (OECD TG410) におけるラットの体重変化.

A, SWCNT/Corn oil ( 200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$  )、 B, MWCNT/Corn oil ( 200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$  )、 C, Fullerene/Corn oil ( 200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$  )、 D, PVP-Fullerene/Distilled water ( 10  $\text{mg}/\text{mouse}/\text{days}$  )、 E, Corn oil ( 200  $\mu\text{l}/\text{mouse}/\text{days}$  )、 F, PVP/Distilled water ( 10  $\text{mg}/\text{mouse}/\text{days}$  ) をラット (Wistar 系) の背部に 28 日間反復塗布し、塗布期間中の体重を測定した。

表1. 反復投与経皮毒性 (28日) 試験 (OECD TG410) における塗布局所の所見.

	Day 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A. SWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. MWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Fullerene/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D. PVP-Fullerene/ Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. PVP/Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Day 15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
A. SWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. MWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Fullerene/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D. PVP-Fullerene/ Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. PVP/Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : 異常なし

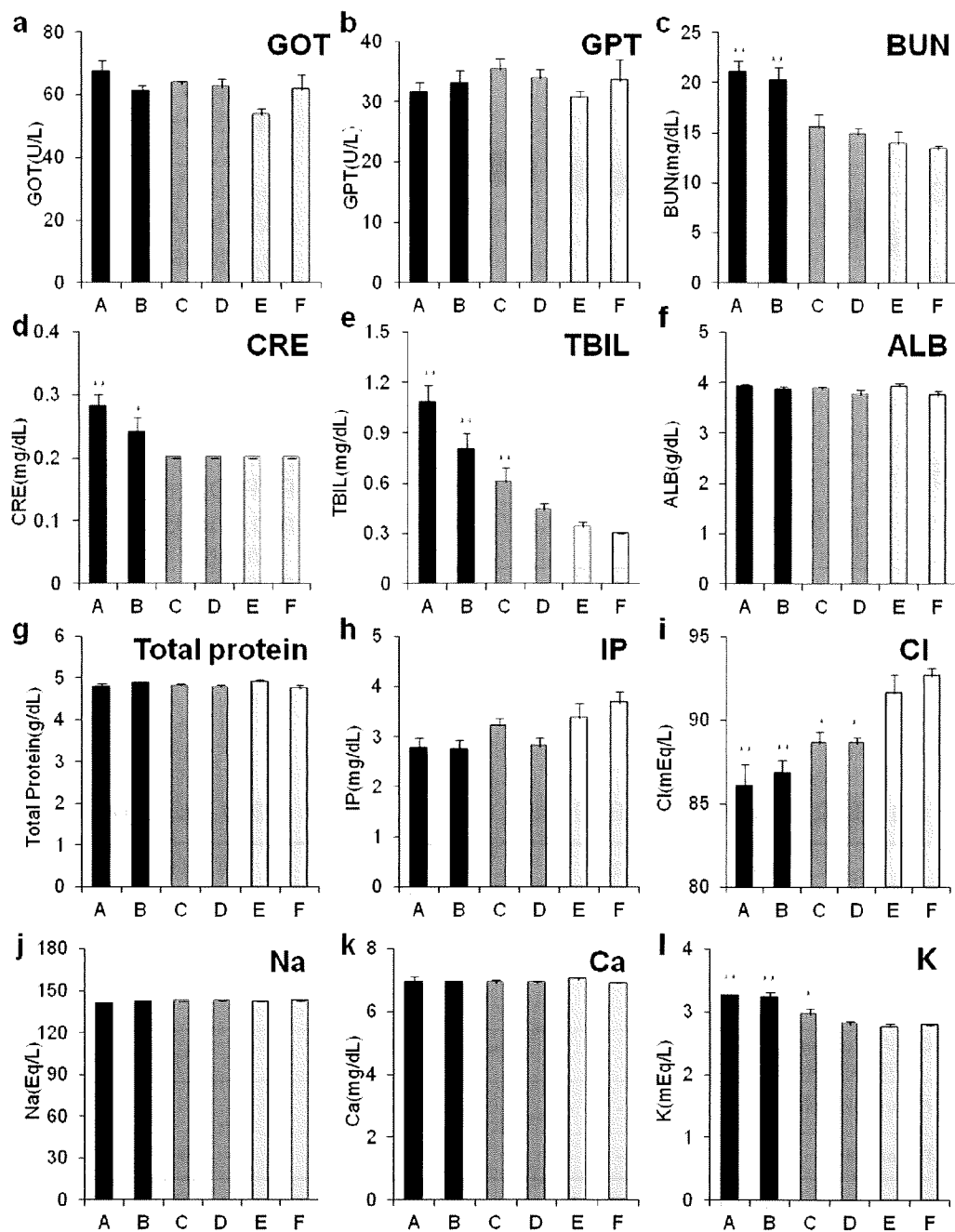


図 6. 反復投与経皮毒性 (28 日) 試験 (OECD TG410) における血液生化学検査

A, SWCNT/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、B, MWCNT/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、C, Fullerene/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、D, PVP-Fullerene/Distilled water (10 mg/mouse/days)、E, Corn oil (200  $\mu$ l/mouse/days)、F, PVP/Distilled water (10 mg/mouse/days) をラット (Wistar 系) の背部に 28 日間反復塗布した。最終塗布から 24 時間後に心臓から回収した血液を用いて血液生化学検査 (グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミラーゼ (GPT)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、血清ビリルビン (TBIL)、アルブミン (ALB)、総タンパク量 (Total protein)、無機リン (IP)、塩素 (Cl)、ナトリウム (Na)、カルシウム (Ca)、カリウム (K)) を実施した。\*\* $P < 0.01$  vs E, \* $P < 0.05$  vs E

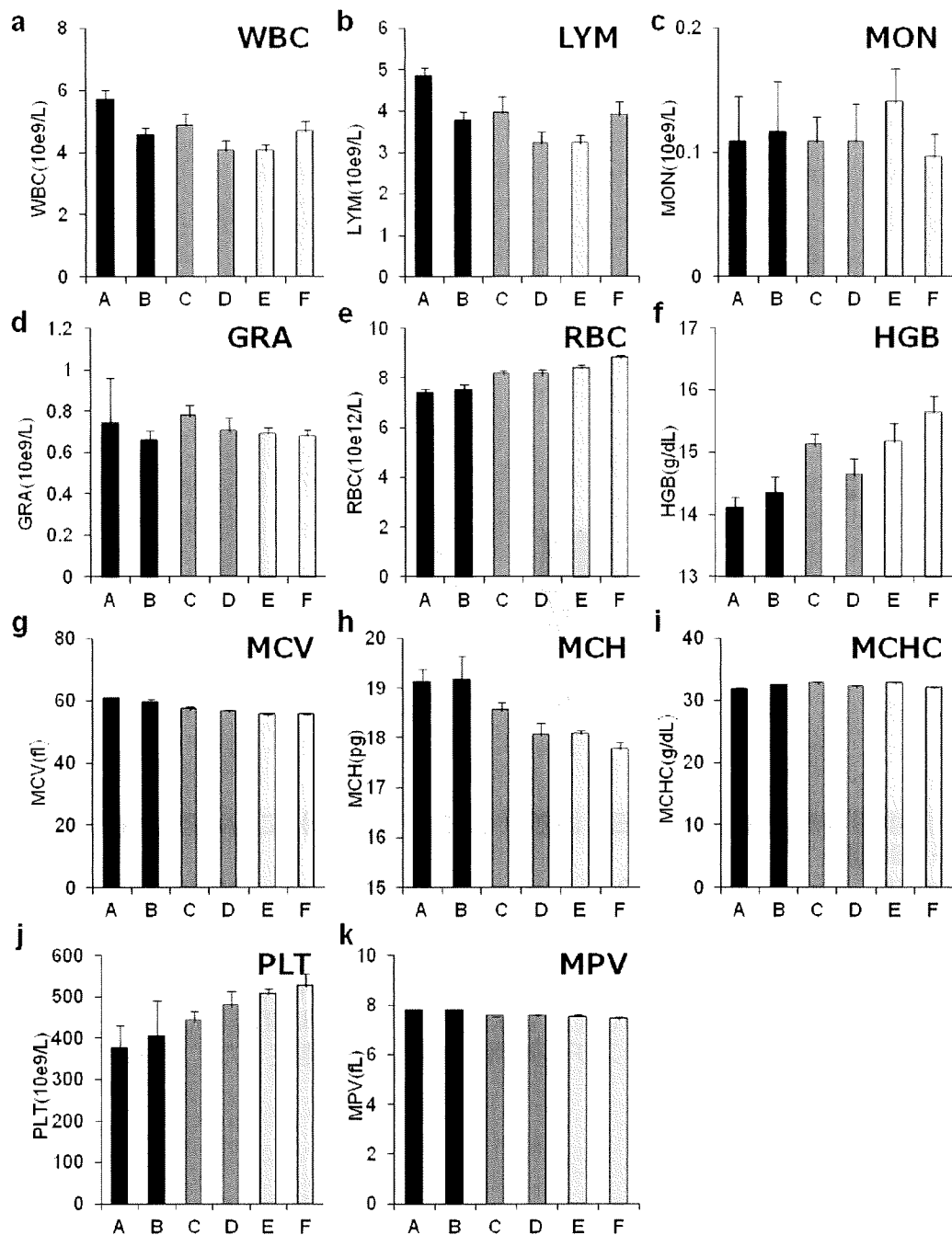
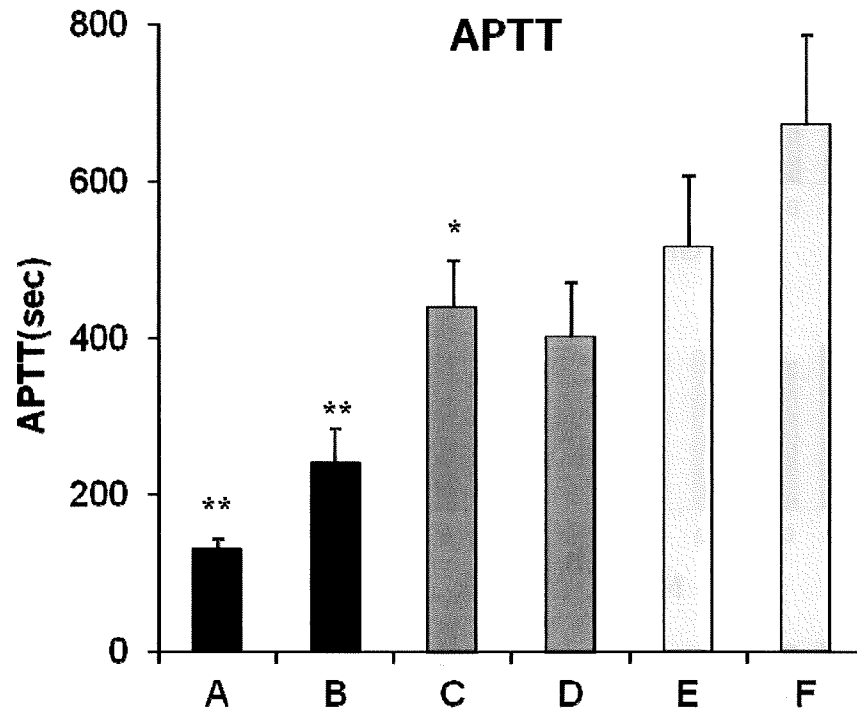


図7. 反復投与経皮毒性 (28日) 試験 (OECD TG410) における血液血球検査

A, SWCNT/Corn oil (200 μg/mouse/days)、B, MWCNT/Corn oil (200 μg/mouse/days)、C, Fullerene/Corn oil (200 μg/mouse/days)、D, PVP-Fullerene/Distilled water (10 mg/mouse/days)、E, Corn oil (200 μl/mouse/days)、F, PVP/Distilled water (10 mg/mouse/days) をラット (Wistar 系) の背部に28日間反復塗布した。最終塗布から24時間後に心臓から回収した血液を用いて血液血球検査 (総白血球数 (WBC)、リンパ球数 (LYM)、単球数 (MON)、顆粒球数 (GRA)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (HGB)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球 HGB 量 (MCH)、平均赤血球 HGB 濃 (MCHC)、血小板パーセント (PLT)、平均血小板容積 (MPV)) を実施した。





**図 8. 反復投与経皮毒性 (28 日) 試験 (OECD TG410) における活性化部分トロンボプラスチン時間**

A, SWCNT/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、B, MWCNT/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、C, Fullerene/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、D, PVP-Fullerene/Distilled water (10  $\text{mg}/\text{mouse}/\text{days}$ )、E, Corn oil (200  $\mu\text{l}/\text{mouse}/\text{days}$ )、F, PVP/Distilled water (10  $\text{mg}/\text{mouse}/\text{days}$ ) をラット (Wistar 系) の背部に 28 日間反復塗布した。最終塗布から 24 時間後に心臓から回収した血液を用いて活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した。\*\* $P < 0.01$  vs E, \* $P < 0.01$  vs F

## ナノマテリアルの経皮リスクに関する研究

分担研究者 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

近年、ナノマテリアルは化粧品・医薬品・食品から電子部品に至るまであらゆる分野において、有用な素材として注目されており、現在数多くのナノマテリアルを含有した製品 (ナノ製品) が上市されている。特に化粧品分野においては、シリカや酸化チタンなどの化粧品材料の有用性をさらに高めるために、これらをナノサイズにまで微細化したナノマテリアルを含有する化粧品が多数販売されている。しかしながらナノマテリアルは微小サイズであるがゆえに、生体に暴露した場合に、未知の生体内挙動やリスク発現を示す可能性があることから予期せぬ毒性 (ナノ毒性; NanoTox) が生じることが危惧される。特にこれらを化粧品として使用する際には、皮膚は連日大量のナノマテリアルの暴露を受けることになるため、その経皮および生体に与える有害性が懸念されている。しかしながら OECD を中心に世界各国で NanoTox 研究が推進されているものの、十分な情報収集はできていないのが現状である。そこで本研究では、ナノマテリアルを経皮的に投与した際の有害性 (経皮 NanoTox) に関する情報収集を目的に、ナノマテリアルの物性、皮膚透過性、毒性発現の関連評価を行ってきた。平成 20 年度までに、ナノシリカを標準ナノマテリアルとして用いて、表面未修飾非晶質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增大すること、表面修飾基の有無に関わらず 28 日間連日塗布した場合に皮膚局所に対する刺激性ならびに起炎性、全身性の有害反応は全く認められないこと、を見出している。そこで本年度は、本邦において OECD 主導のもと NanoTox 情報収集が早期に求められている単層カーボンナノチューブ (SWCNT)、多層カーボンナノチューブ (MWCNT)、フラーレンに関して、OECD テストガイドラインに基づく試験法である、反復投与経皮毒性 : 21 日または 28 日試験 (TG401) を行い、下記の結果を得た。

1. SWCNT、MWCNT、フラーレン、PVP-フラーレンについて反復経皮投与毒性試験を行った結果、どのナノマテリアルについても投与部位局所に対する一次刺激性ならびに接触アレルギー反応は認められなかった。

以上の結果より、SWCNT、MWCNT、フラーレン、PVP-フラーレンは、皮膚への刺激性はほとんどないと示唆される。しかしながらこれらの皮膚透過性、組織移行性ならびに組織傷害性については未だ結論が出ていない。今後、生体内動態に関する情報収集を行い、毒性情報と関連させることが重要であると考えられる。

## A. 研究目的

OECD テストガイドラインとは化学物質の安全性を評価するために使用されている試験方法を国際的に共通のものとして集成的なもので、各国における試験方法の違いをなくし国際的な調和を促進するために制定されたものである。近年の NanoTox 研究においても OECD 主導の下、ナノマテリアルの安全性情報収集を促進する計画が進められている。本邦においても、フラーレンや SWCNT、MWCNT について全世界の中心となって安全性情報を収集することを表明しており、厚生労働省を始めとする関係省庁にてその試験が開始されている。そこで本研究では、OECD テストガイドラインに準じた SWCNT、MWCNT ならびにフラーレンを経皮的に投与した際の安全性情報の収集を試みた。

## B. 研究方法

### 1. ナノマテリアル

SWCNT、MWCNT は名城ナノカーボンより購入した。フラーレン、PVP-フラーレンはビタミン C60 バイオリサーチから提供いただいた。SWCNT、MWCNT、フラーレンはそれぞれ 1 mg/ml となるようにコーン油 (和光純薬) に懸濁し、PVP-フラーレンは 50 mg/ml となるように蒸留水に溶解して、実験に供した。コントロールサンプルとしては、コーン油、そして PVP-フラーレンの PVP はほとんどが遊離型であることを考慮し、PVP 溶液 (50 mg/ml) を用いた。

### 2. 21/28 日反復経皮投与毒性試験

#### 2-1. ナノマテリアルの塗布方法

Wistar クリーンラット (9 週齢、雌、体重 180 ~200 g) の背部皮膚 (2 × 2 cm<sup>2</sup>) を剃毛し、その部位に各濃度に調製したナノマテリアルサンプル、コントロールサンプルを 200 µl/site で塗布した。塗布した部位を医療用ガーゼで覆い、保護テープで固定した。6 時間後、保護テープならびにガーゼをはずし、塗布部位に付着しているサンプルを洗い流した。塗布スケジュールについては

図 1 に示す。

#### 2-2. 経皮毒性評価

各ナノマテリアルサンプルの塗布期間中ラットの体重測定を行い、その推移を指標にナノマテリアルの生体への影響を調べた。

またナノマテリアルサンプルの最終塗布から 24 時間後に塗布局所の皮膚を観察し、Draize 判定基準 (図 2) に従ってナノマテリアルの皮膚刺激性について評価した。

さらに、各組織へのナノマテリアルの移行性ならびに傷害性を検討する目的に、血液、皮膚、脳、肺、肝臓、腎臓、鼠頸部リンパ節を回収した。血液は 3.13%クエン酸ナトリウム水溶液と 1:9 の割合で混合し、遠心操作により血漿サンプルと血餅サンプルとに分離した。また、皮膚は 3 等分して 1 つは液体窒素にて急速凍結、1 つは病理組織観察用に 10%中性ホルマリン緩衝液に、もう 1 つは電子顕微鏡観察用サンプルとして氷冷した 2.5% グルタルアルデヒド溶液に浸漬して固定処理を行った。脳、肺、肝臓、腎臓については摘出後、重量を測定し、2 つに分けて、片方を 10%中性ホルマリン緩衝液に浸漬して固定処理を行い、もう片方を急速凍結処理した。

## C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

### D. 考察

各ナノマテリアルサンプルを経皮塗布したラットの体重推移を計測したところ、どのサンプルを塗布した場合においてもコントロールサンプル適用ラットと同様のプロファイルを示した (図 3)。

また皮膚刺激性についても評価した結果、どのサンプルにおいても紅斑や浮腫は全く認められず (図 4)、SWCNT、MWCNT、フラーレン、PVP-フラーレンは経皮投与局所に対して一次刺激性および接触アレルギー反応は示さないと判断される。

これらのナノマテリアルの組織移行性ならび

に組織傷害性については明らかとなっておらず、現在生体内挙動と毒性発現の連関評価についても解析を進めている。また香粧品を始めとするほぼ毎日使用するナノ製品については、連日長期間にわたって使用することから、より長期間の経皮毒性試験が必要とされる。

なお、その他の組織サンプルを用いた検討結果については本研究プロジェクト分担研究者である角田慎一先生（独立行政法人医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト）の報告書に記載している。

## E. 結論

本研究において、現在上市されているナノマテリアルである SWCNT、MWCNT、フラーレン、PVP-フラーレンの 28 日間経皮投与後の経皮 NanoTox 評価において皮膚局所に顕著な傷害性は認められないことを明らかとした。

今後、これらナノマテリアルの皮膚透過性、組織移行性などの生体内動態について詳細に解析を進め、ナノマテリアルの「物性」「生体内動態」「毒性発現」の連関情報の収集を行う予定である。

## 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：新規香粧品素材として注目されるナノシリカの経皮リスクに関する基礎検討、第 34 回日本香粧品学会、2009 年 6 月、東京

## 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

岡田 直貴 大阪大学大学院薬学研究科・准教授

向 洋平 大阪大学大学院薬学研究科・助教

松尾 一彦 大阪大学大学院薬学研究科・博士後期課程 2 年

翟 優 大阪大学大学院薬学研究科・研究生



図1 ナノマテリアルサンプルの経皮投与スケジュール

紅斑および痂皮の形成		評点	浮腫の形成		評点
紅斑なし		0	浮腫なし		0
非常に軽度の紅斑		1	非常に軽度の浮腫		1
明らかな紅斑		2	軽度浮腫		2
中等度ないし高度の紅斑		3	中等度浮腫		3
高度紅斑からわずかな痂皮の形成		4	高度浮腫		4

図2 Draize判定基準

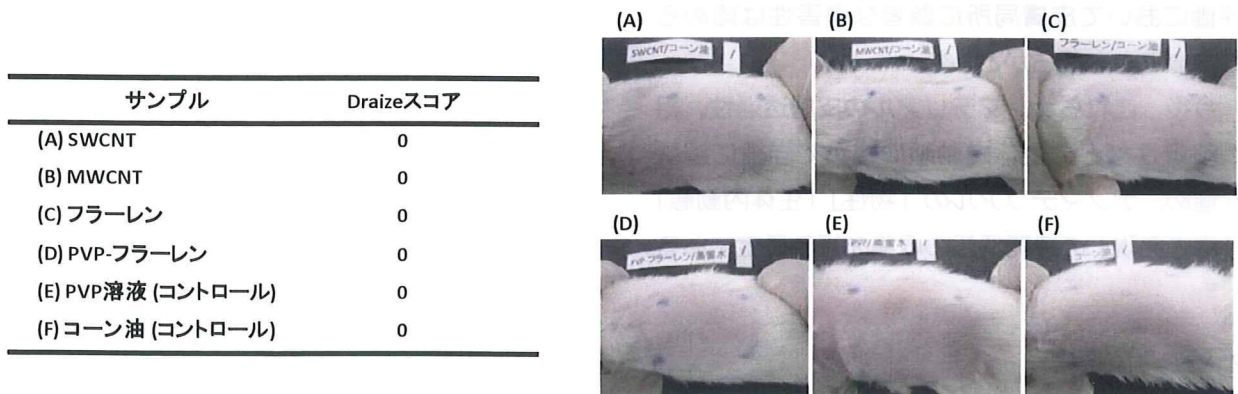


図3 Draize試験

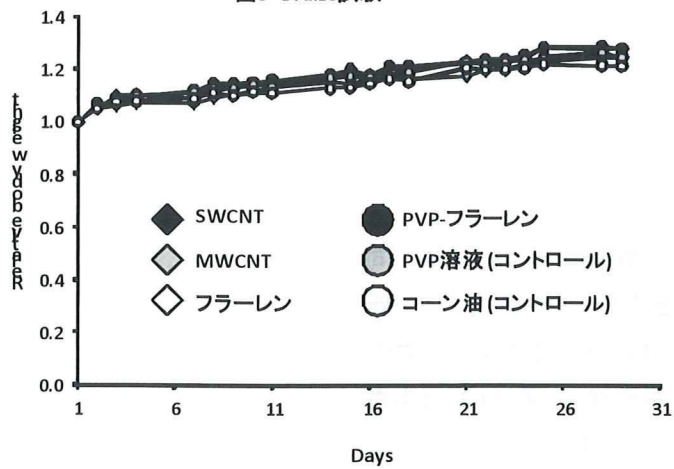


図3 体重推移変化

## 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。これまでにナノマテリアルによる呼吸器傷害などが報告されているものの、人体の恒常性を司る肝臓に関する安全性の報告は皆無である。本研究では、主にナノマテリアルの肝臓に対する影響について研究を行った。前年度までの検討から、ナノシリカは肝障害を誘発すること、薬剤との併用により肝障害が増悪すること、粒子径や表面修飾により急性肝障害が軽減されることなどを明らかにした。そこで本年度は、表面修飾ナノシリカや粒子径の異なるナノシリカの肝臓への影響について更なる検討を行った。その結果、ナノシリカ頻回投与により誘発される慢性肝障害は、ナノシリカの表面を修飾することにより軽減されることが明らかとなった。また、ナノシリカの粒子径を変えらるることでも慢性肝障害が軽減された。さらに、薬剤による肝毒性を促進させるナノシリカの肝障害作用も、表面修飾ナノシリカにより軽減されるものがあることを見出した。各種ナノシリカが誘発する肝障害は、シクロフォスファミドを用いた検討から、未修飾ナノシリカと同様に肝類洞内皮細胞が関与する可能性が示された。一方、ガドリニウムクロライドによる検討では、未修飾ナノシリカとは異なり、クッパー細胞が関与しない可能性が示された。続いて、現代病である肥満から引き起こされる脂肪肝に対するナノシリカの影響を検討した結果、ナノシリカの脂肪肝に対する障害性は正常肝と同程度であった。以上の結果は、今後さらに開発が進むナノマテリアルの毒性回避法や病態との関連性において有用な知見を提供すると考えられる。

### A. 研究目的

現在、ナノテクノロジーは次世代の主要技術として大きく発展することが予想されたことから、企業や研究機関などで盛んに研究・開発が行われている。ナノテクノロジーとは、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を創製する技術である。例えば、フラレン、カーボンナノチューブ、 dendri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、これまで地球環境において存在しえなかった人為的に加工されたナノマテリアルが、人類の生活圏内で劇的に増加することが予想されている。そのため、ナノマテリアルの安全性が国際的な課題となり、検証研究が進められているものの、現状として未だ不十分である。

ナノマテリアルの研究は、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少数の報告例があるものの、工業的利用の観点から推進される応用研究がほとんどである。そのため、ナノマ

テリアル物の安全性の検証として細胞障害性、細胞透過性、さらに様々な臓器に対する組織傷害性の検証が急務であるが、それらの検証は立ち遅れている。

肝臓は生体内で最大の臓器であり、その機能は代謝、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。ナノマテリアルは呼吸器や皮膚から全身循環血液中に進入後、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が想定される。そのため、肝臓におけるナノマテリアルの安全性評価は早急な課題であるが未だ皆無である。そこで我々は肝臓に対するナノマテリアルの安全性評価・検討を *in vitro* 及び *in vivo* において行った。今年度は、表面に-COOH基と-NH<sub>2</sub>基を修飾したナノシリカを用いた安全性評価をはじめとして、各種薬剤との併用による肝臓への影響、さらに脂肪肝などの病態に対するナノシリカの影響について検討を行った。

## B. 研究方法

### 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 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 ナノシリカを nSP70、nSP100、nSP300、粒子表面に COOH、NH<sub>2</sub> を修飾したナノシリカを nSP70-C、nSP70-N と表記した。

### 2. 表面修飾ナノシリカ頻回投与における

#### 肝臓への影響

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP70 (Lot: 14798 40H) を 30 mg/kg b.w. nSP70-C (Lot: 06058 40-01) ・ nSP70-N (Lot: 07028

40-01) を 40、60 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に週 2 回、4 週間連続（計 8 回）投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。

最終投与 1 日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。また、心臓灌流により脱血後、肝臓を採取し、HE 染色を行い組織レベルでの慢性傷害の観察を行った。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。さらに、肝臓における線維化の程度を検討するため AZAN 染色及び Hydroxyproline (HYP)量の測定を行った。

### 3. 粒子径 100nm ナノシリカ頻回投与における肝臓への影響

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP70 (Lot: 14798 40H) を 40 mg/kg b.w.で、nSP100 (Lot: 17898 40H) を 40、60 mg/kg b.w.で、nSP300 (Lot: 09199 40G) を 60 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に週 2 回、4 週間連続（計 8 回）投与した。Control 群には注射用水のみ投与した。

最終投与 1 日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、血清を採取した。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。さらに、肝臓における線維化の程度を検討するため AZAN 染色及び HYP 量の測定を行った。

### 4. 四塩化炭素による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 nSP70 (Lot: 14798 40H) を 30 mg/kg ・ nSP70-C (Lot: 06058 40-01) ・ nSP70-N (Lot: 07028 40-01) ・ nSP100 (Lot: 17898 40H) を 60 mg/kg b.w.の用量で尾静脈

内に投与した。四塩化炭素はオリーブオイルを用いて希釈後、5 mL/kg b.w. の用量で投与し、四塩化炭素を投与しない群には、オリーブオイルのみ投与した。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投与した。

投与 24 時間後に心採血により血清を回収した。四塩化炭素の肝毒性に対するナノシリカ併用の影響を、肝傷害の指標である血清中の AST、ALT 活性を測定することにより検討した。

## 5. パラコートによる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( paraquat : PQ )を 50 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて nSP70 (Lot : 14798 40H) を 30 mg/kg ・ nSP70-C (Lot : 06058 40-01) ・ nSP70-N (Lot : 07028 40-01) ・ nSP100 (Lot : 17898 40H) を 60 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。パラコートは生理食塩水を用いて希釈後、20 mL/kg b.w. の用量で投与し、パラコートを投与しない群には、生理食塩水のみ投与した。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投与した。

投与 24 時間後に心採血により血清を回収した。パラコートの毒性に対するナノシリカ併用の影響を肝臓において評価するため、肝傷害の指標である血清中の AST、ALT 活性を測定した。

## 6. シスプラチンによる肝毒性に対する nSP70-C、nSP70-N、nSP100 の影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、シスプラチンを 50  $\mu$ mol/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて nSP70-C (Lot : 06058 40-01) ・ nSP70-N (Lot : 07028 40-01) ・ nSP100 (Lot : 17898 40H) を 10 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。Control 群には注射用水のみ投与した。

投与 24 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、血清を回収した。シスプラチンの副作用

に対するナノシリカ併用の影響を肝臓において評価するため、肝傷害の指標として血清中の AST、ALT 活性の測定を行った。

## 7. アセトアミノフェンによる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、アセトアミノフェン(acetaminophen:AA)を 500 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて nSP70 (Lot : 14798 40H) を 30 mg/kg ・ nSP70-C (Lot : 06058 40-01) ・ nSP70-N (Lot : 07028 40-01) ・ nSP100 (Lot : 17898 40H) を 60 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。アセトアミノフェンは 3.5% DMSO 生理食塩水を用いて希釈後、20 mL/kg b.w. の用量で投与し、アセトアミノフェンを投与しない群には、3.5 % DMSO 生理食塩水のみ投与した。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、血清を回収した。アセトアミノフェンの毒性に対するナノシリカ併用の影響を肝臓において評価するため、肝傷害の指標である血清中の AST、ALT 活性を測定した。

## 8. 各種ナノシリカによる急性肝障害のメカニズムの検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに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 投与 24 時間後に、nSP70 (Lot : 14798 40H) を 30 mg/kg ・ nSP70-C (Lot : 06058 40-01) ・ nSP70-N (Lot : 07028 40-01) ・ nSP100 (Lot : 17898 40H) を 60 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. の投与量で投与し、Control 群には注射用水のみ投与した。

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、各ナノシリカを投与する 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. の用量で静脈内に投与した。ガドリニウムクロライド前投与後、nSP70 (Lot : 14798



40H) を 30 mg/kg・nSP70-C (Lot : 06058 40-01)・nSP70-N (Lot : 07028 40-01)・nSP100 (Lot : 17898 40H) を 60 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投与した。Control 群には注射用水のみ投与した。

ナノシリカ投与 24 時間後に心採血により血清を回収した。その後、肝傷害の指標である血清中の AST、ALT 活性の測定を行った。

## 9. 脂肪肝マウスモデルに対するナノシリカの影響

8 週齢の雄性 C57BL/6 マウスにコントロール食 RD (pellet type; Oriental Yeast, Tokyo, Japan) 及び高脂肪食 HFD (Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) を 2 ヶ月間食べさせ、脂肪肝モデルマウスを作成した。このマウスに nSP70 を 0、20、40 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投与した。毎回投与前に体重を測定した。最終投与 3 日後、マウスを一晩絶食させ、翌日に肝臓及び血清を採取した。採取した肝臓において HE による組織像の観察、肝線維化の指標であるヒドロキシプロリン (HYP) 量の測定を行った。血清では、脂質であるトリグリセリド (TG) 量の測定、肝傷害の指標である ALT、AST 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

### 1. 表面修飾ナノシリカ頻回投与における

#### 肝臓への影響

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。そのため、表面を改質したナノマテリアルが今後増加するものと考えられる。そこで、同一粒子径のナノマテリアルの表面にアミノ基 (-NH<sub>2</sub>) やカルボキシル基

(-COOH) を修飾したナノシリカ (nSP70-C、nSP70-N) を用いて、表面修飾ナノシリカの肝臓に対する安全性評価を行った。昨年度の検討により、単回投与では表面修飾ナノシリカ nSP70-N 及び nSP70-C は未修飾の nSP70 に比べ肝臓への障害性が低いことが明らかとなった。そこで今年度は表面修飾ナノシリカ頻回投与における肝臓への影響を検討した。表面修飾ナノシリカである nSP70-N 及び nSP70-C と未修飾ナノシリカである nSP70 とを頻回投与した後、肝障害の指標として AST、ALT 活性を測定した。AST 活性において、nSP70 はコントロールに比べ顕著な上昇が観察されたが、nSP70-N、nSP70-C は共にコントロール群と同程度の活性を示した (図 1A)。一方、ALT 活性は nSP70 に比べ低い活性を示したものの、nSP70-N 及び nSP70-C 共に高用量投与群において有意な上昇が観察された。(図 1B) また、腎障害を検討するため BUN の測定を行ったところ、いずれの群においても有意な差は観察されなかった。(図 1C) 次に、肝臓の線維化を検討するため、肝臓における HYP 含量の測定と AZAN 染色を行った。コントロール群と比較し nSP70 では顕著な HYP 値の上昇が観察されたが、nSP70-N、nSP70-C 低用量投与群では共にコントロールと同程度の値を示した。一方、高用量投与群では nSP70-C において HYP 値の有意な上昇が観察された (図 2A)。そこで、AZAN 染色を行い組織像から評価したところ、nSP70-C 高用量投与群においても肝線維化は観察されなかった (図 2E)。以上の結果から、表面修飾ナノシリカの頻回投与における肝障害性は単回投与における場合と同様に、未修飾ナノシリカよりも低いことが明らかとなった。また、障害性の強さは nSP70-C に比べ nSP70-N の方が低いことが分かった。よって、ナノシリカの表面を適切に修飾することで、安全なナノシリカの利用が可能となると考えられる。

### 2. 粒子径 100nm ナノシリカ頻回投与における肝臓への影響

昨年度の検討により、単回投与では粒子径

100nm ナノシリカ (nSP100) は粒子径 70nm ナノシリカ (nSP70) に比べ肝臓への障害性が低いことが明らかとなった。そこで今年度は nSP100 頻回投与における肝臓への影響を評価した。nSP100 頻回投与の肝傷害の結果を図 3 に示した。nSP70 及び nSP100 の頻回投与において ALT 活性の上昇は観察されなかったものの、AST 活性は同程度上昇することが分かった (図 3 A, B)。また、BUN は nSP70 及び nSP100 において有意な差は見られなかった (図 3 C)。続いて、肝臓の線維化を検討するため、肝臓における HYP 含量の測定と AZAN 染色を行った。その結果、nSP70 では HYP 値が著しく上昇したにも関わらず、nSP100 ではコントロールと同程度の値を示した (図 4 A)。これらの結果は AZAN 染色による組織像の観察においても確認された (図 4 B, C, D)。以上の結果から粒子径 100nm のナノシリカは粒子径 70nm ナノシリカと比較して、頻回投与による慢性肝毒性が低いことが明らかとなった。よって、ナノシリカの粒子径を適切に設計する事で、安全なナノシリカの利用が可能となると考えられる。

### 3. 四塩化炭素による肝毒性に対するナノシリカの影響

四塩化炭素 ( $\text{CCl}_4$ ) 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。前年度までに  $\text{CCl}_4$  とナノシリカの併用投与により肝障害が相加的に上昇することを明らかにした。そこで、今年度は各種ナノシリカとの併用投与が  $\text{CCl}_4$  による肝障害作用にどのような影響を及ぼすかを検討した。

AST 活性を検討した結果、nSP70 及び nSP70-C において  $\text{CCl}_4$  との併用により AST 活性が上昇することが確認された。これに対し、nSP70-N 及び nSP100 ではコントロール群と同程度の活性を示した (図 5 A)。次に ALT 活性を検討した結果、nSP70-N を除き全てのナノシリ

カにおいて  $\text{CCl}_4$  との併用により ALT 活性が上昇した。特に nSP70-C 及び nSP100 については大きく値が上昇した (図 5 B)。今回の検討により、nSP70-N を除き、ナノシリカと四塩化炭素による相乗的な肝障害の憎悪化が観察された。AST 及び ALT 活性上昇の詳細な原因は今後の検討課題であるが、nSP70 は nSP300 と比べ ROS 産生能が高いため  $\text{CCl}_4$  のラジカル誘導作用と協調的に働き急性肝障害を憎悪したと推察される。また、ナノシリカ表面修飾の違いにより肝障害作用が異なることから、適切な修飾方法を選択することが安全性確保に重要であることが示された。

### 4. パラコートによる肝毒性に対するナノシリカの影響

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。前年度までに、ナノシリカとの併用投与で肝障害が相加的に上昇することが明らかとなっている。そこで、今年度は各種ナノシリカとの併用による肝臓への影響を検討した。図 6 に示すように、多くのナノシリカ粒子においてパラコートとの併用により AST・ALT 活性が有意に上昇した。この結果から、表面修飾に関わらず、ナノシリカと薬剤との併用時には肝障害が上昇することが示唆された。

### 5. シスプラチンによる肝毒性に対する

#### nSP70-C、nSP70-N、nSP100 の影響

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、また肝障害作用として ALT 及び AST 活性が上昇することが報告されている。前年度までに報告したように、抗がん剤として使用されているシスプラチンは、ナノシリカとの併用投与により強い毒性を示すことが分かっている。そこで今年度は、シスプ

ラチンと各種ナノシリカとの併用時における肝臓への影響を検討した。図7に示すように、nSP70-Nではシスプラチン単独投与と同様なAST及びALT活性を示したが、nSP70-C、nSP100ではAST及びALT活性が著しく上昇した。しかし、nSP70ではこの用量でAST活性が4000程度まで上昇しているのに対し、nSP70-C、nSP100では1500程度と半分以下であるため、相乗効果の程度はナノシリカ粒子自体の傷害性の違いに依存するものと推察される。

## 6. アセトアミノフェンによる肝毒性に対する ナノシリカの影響

アセトアミノフェンは解熱鎮痛剤として広く使用されている薬剤である。そこで、ナノシリカがアセトアミノフェンによる肝臓への毒性に影響を及ぼすかを検討した。図8に示すように、これまでに検討を行った薬物とは異なり、アセトアミノフェンではnSP70・nSP100において相乗効果が観察されたのに対し、nSP70-N・nSP70-Cでは相乗効果が観察されなかった。詳細な原因については検討課題であるが、表面修飾ナノシリカと未修飾ナノシリカでは、アセトアミノフェンに関連する代謝経路が異なっているため今回のような結果になった可能性が想定される。また、ナノシリカの表面を適切に修飾することで、安全なナノシリカの利用が可能となると考えられる。

## 7. 各種ナノシリカによる急性肝傷害の メカニズムの検討

各種ナノシリカ投与による肝障害のメカニズムを解明するために、肝非実質細胞であり異物貪食能をもつ肝クッパー細胞、及び肝臓内の有窓血管を形成する類洞内皮細胞の関与について検討した。シクロフォスファミド(CPA)は類洞内皮細胞の働きを抑える阻害剤として使用されている。そこで、ナノシリカとCPAを併用投与した時の肝障害について検討した。図9に示すように、いずれのナノシリカを用いた場合でもCPA併用によって有意にAST及びALT活性が減少した。前年度に行ったnSP70における検討から、類洞

内皮細胞がナノシリカによる肝毒性に関与することが示されている。よって、表面修飾ナノシリカ及び粒子径100nmナノシリカにおける急性肝障害においても類洞内皮細胞が関与している可能性が示唆された。

続いてガドリニウムクロライド(GdCl)との併用による検討を行った。GdClはクッパー細胞の働きを抑える阻害剤として使用されている。そこで、ナノシリカとGdClを併用投与した時の肝障害について検討した。図10に示すように、nSP70及びnSP100ではGdClとの併用によりAST及びALT活性の上昇が観察された。一方、nSP70-N及びnSP70-CではAST及びALT活性の上昇が観察されなかった。昨年度の検討から、クッパー細胞がnSP70を取り込むことが明らかとなっている。そのため、nSP100も同様に取り込まれている可能性が考えられる。逆に、表面修飾体ではその取り込みが無くなった可能性が推察される。しかし、GdClと各種ナノシリカの急性肝障害に関する詳細は不明であり、今後の検討が必要である。

## 8. 脂肪肝マウスモデルに対するナノシリカ の影響

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、肥満やインスリン抵抗性によって引き起こされた脂肪肝に、セカンドヒットとして酸化ストレスや脂質過酸化が起こることで発症することが知られており、NASHの発症にはROSが関与していると考えられている。一方、ナノシリカによる肝傷害にもROSの関与が報告されている。これらの知見から、脂肪肝患者がナノマテリアルと接触すると、NASHに進行する可能性が考えられる。そこで、脂肪肝モデルマウスへのナノシリカ投与に伴うNASH発症を解析した。まず、マウスに常食、高脂肪食を2ヶ月間与え、脂肪肝モデルマウスが作成されたかをマウスの体重変動、肝臓におけるトリグリセリド(TG)量およびHE染色による肝組織像により検討した。常食を与えたマウスと比較し、高脂肪食を与えたマウスでは体重増加が観察された(図11)。また、高脂肪食を与えたマウスの肝臓では、脂肪肝特有の油滴が観察された

(図 12A, B)。さらに、肝臓におけるトリグリセリドの量を比較したところ、高脂肪食を与えたマウスの方が常食を与えたマウスに比べ高い値を示した(図 12C)。以上の結果から、高脂肪食摂取による脂肪肝モデルマウスの作成を確認した。作成した脂肪肝モデルマウスを用い、nSP70 頻回投与による肝臓への影響を主に NASH 進展の指標(脂肪肝の進展、肝障害、肝臓の線維化)に着目して調べた。まず、肝臓における TG 量を測定した。その結果、正常、脂肪肝マウスどちらにおいても nSP70 の投与量依存的な TG 量の変動は観察されなかった(図 12C)。従って、nSP70 は脂肪肝の進展を促進しないことが明らかとなった。次に、肝障害の指標である ALT 及び AST 活性を測定した。正常、脂肪肝マウスどちらにおいても nSP70 の投与量依存的な ALT 及び AST 活性の上昇が観察されたものの、両マウス間での値に差は認められなかった(図 13)。この結果から、脂肪肝において nSP70 による肝障害の増悪化は観察されないことが示された。続いて、肝臓線維化の指標である肝臓内の HYP 含量を測定した。nSP70 の投与量に依存して HYP 値の上昇が、正常・脂肪肝の両マウスにおいて見られたが、線維化程度はほぼ同等であった(図 14)。この結果から、脂肪肝は nSP70 の肝線維化を促進しないことが分かった。

以上、TG 量、ALT、AST 値及び HYP 値の結果から総合的に考えて、nSP70 頻回投与による NASH への進展は観察されないことが明らかとなった。しかし、図 11 に示すように、脂肪肝マウスにおいて nSP70 投与群では体重減少が観察されたことから、nSP70 は肝臓以外に何らかの影響を及ぼすものと予想された。この結果に関する詳細は不明であり、今後の検討が必要とされる。

## E. 結論

1. 単回投与の場合と同様に、頻回投与による慢性肝障害はナノシリカの表面をカルボキシル基、アミノ基で修飾することにより軽減できることを示した。

2. 単回投与の場合と同様に、頻回投与による慢性肝障害はナノシリカの粒子径を 100nm にすることにより軽減できることを示した。

3. 四塩化炭素とナノシリカ併用による肝障害の増悪化は、ナノシリカの表面をアミノ基で修飾する事により軽減できることを示した。

4. 薬剤とナノシリカ併用による肝障害の増悪化は、ナノシリカの表面修飾により軽減される薬剤がある一方、軽減されない薬剤もあることから、各薬剤においてナノシリカの影響を検証する必要があることを示した。

5. 表面修飾ナノシリカ、nSP100 が誘発する肝障害は、nSP70 と同様に肝類洞内皮細胞が関与する可能性を示した。

6. 表面修飾ナノシリカは、未修飾ナノシリカとは異なりクッパー細胞による取り込みが行われない可能性を示した。

7. 脂肪肝がナノシリカの肝毒性増強要因とはならないことを明らかにした。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ① 論文発表

Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice. *Eur. J. Pharm. Bipharm.*, 72, 626-629 (2009).

Nishimori H., Kondoh M., Isoda, K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J. Pharm. Bipharm.*, 72, 496-501 (2009).