

Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. Influence of 70-nm silica particles in mice with cisplatin or paraquat-induced toxicity. *Pharmazie*, 64, 395-397 (2009).

Isoda K., Hsezaki T., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K. Influence by modification of nano-silica surface on nano-silica particles induced liver injury. In preparation.

Isoda K., Hsezaki T., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K. Influence of diameter 100nm silica particles on liver injury. In preparation.

Isoda K., Nishimori H., Kondoh M., Imazawa T., Tsutsumi Y., Yagi K. Histology examination of hepatic injury induced by silica nano-particles. In preparation.

② 学会発表

【国内学会発表：合計7件】

1. 西森光、磯田勝広、近藤昌夫、角田慎一、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（京都）、2009年3月
3. 西森光、磯田勝広、近藤昌夫、角田慎一、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（京都）、2009年3月
4. 西森光、磯田勝広、近藤昌夫、角田慎一、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（京都）、2009年3月
5. 長谷崎拓也、田中一成、磯田勝広、近藤昌夫、角田慎一、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（京都）、2009年3月

6. 長谷崎拓也、田中一成、磯田勝広、近藤昌夫、角田慎一、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（京都）、2009年3月

7. 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）、2010年3月（予定）

【国際学会発表：合計1件】

1. Kiyohito yagi, Hikaru Nishimori, Masuo Kondoh, Katsuhiko Isoda, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi, : Hepatotoxicity of silica nanoparticles in mice., 46th Congress of the European Societies of Toxicology., Germany, 13-16 September, 2009.

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

近藤昌夫、渡利彰浩、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、山浦利章、松下恭平、山本美美、鈴木英彦、李相儒

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nishimori H., Kondoh M., Yagi K. et al.	Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice.	Eur. J. Pharm. Bipharm.	72	626-629	2009
Nishimori H., Kondoh M., Yagi K. et al.	Silica nanoparticles as hepatotoxicants.	Eur. J. Pharm. Bipharm.	72	496-501	2009
Nishimori H., Kondoh M., Yagi K. et al.	Influence of 70-nm silica particles in mice with cisplatin or paraquat-induced toxicity.	Pharmazie	64	395-397	2009
Isoda K., Hsezaki T., Yagi K. et al.	Influence by modification of nano-silica surface on nano-silica particles induced liver injury.	In preparation			
Isoda K., Hsezaki T., Yagi K. et al.	Influence of diameter 100nm silica particles on liver injury.	In preparation			
Isoda K., Kondoh M., Yagi K. et al.	Histology examination of hepatic injury induced by silica nano-particles.	In preparation			

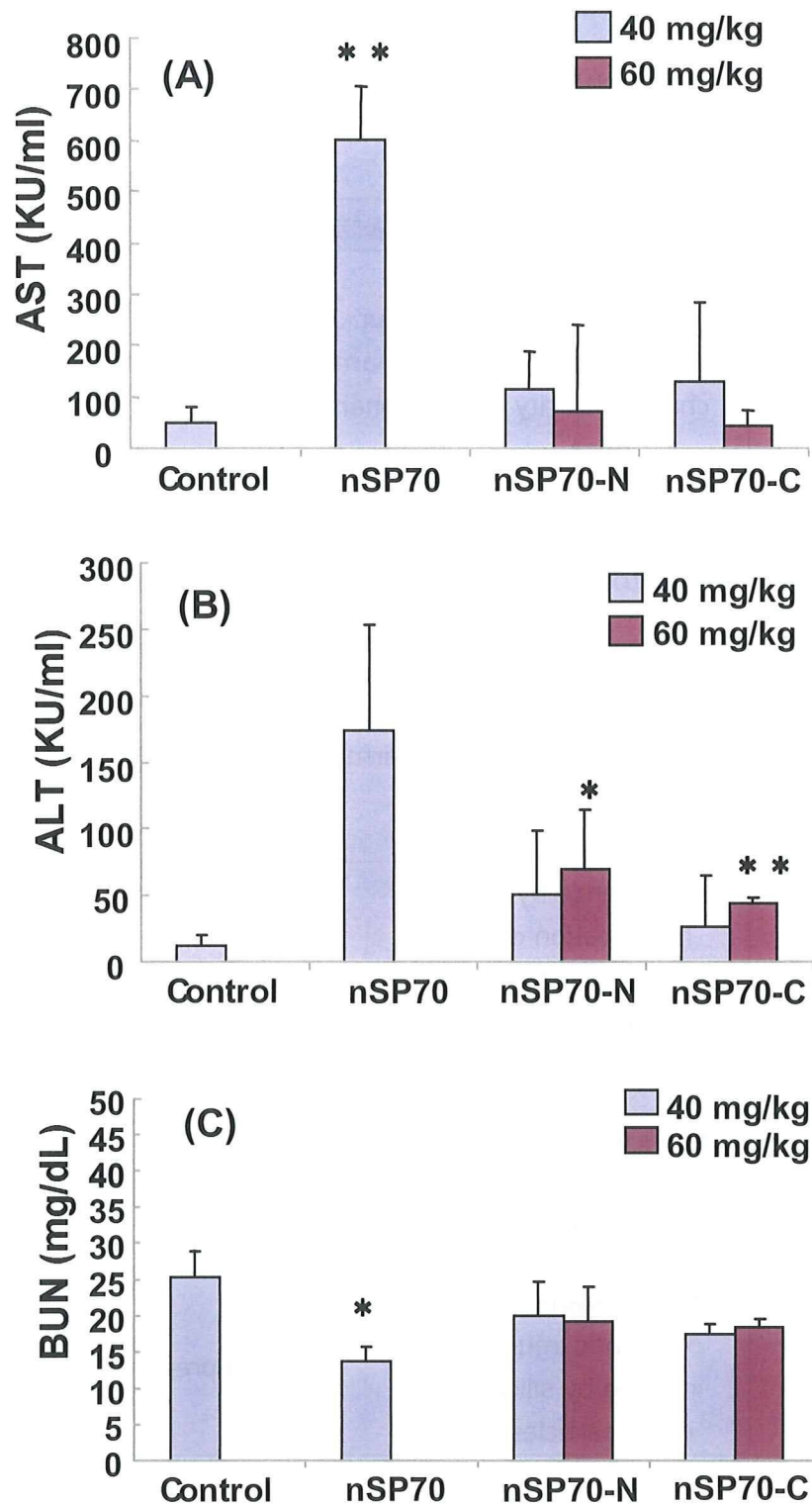


図1 表面修飾ナノシリカを頻回投与したマウスにおける慢性肝障害。
 未修飾ナノシリカ(nSP70)、修飾ナノシリカ(nSP70-N, nSP70-C)
 を尾静脈内に週2回、4週間(計8回)投与した。
 最終投与1日後に、血清中の(A)AST, (B)ALT, (C)BUNを測定した。
 *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ vs. Control

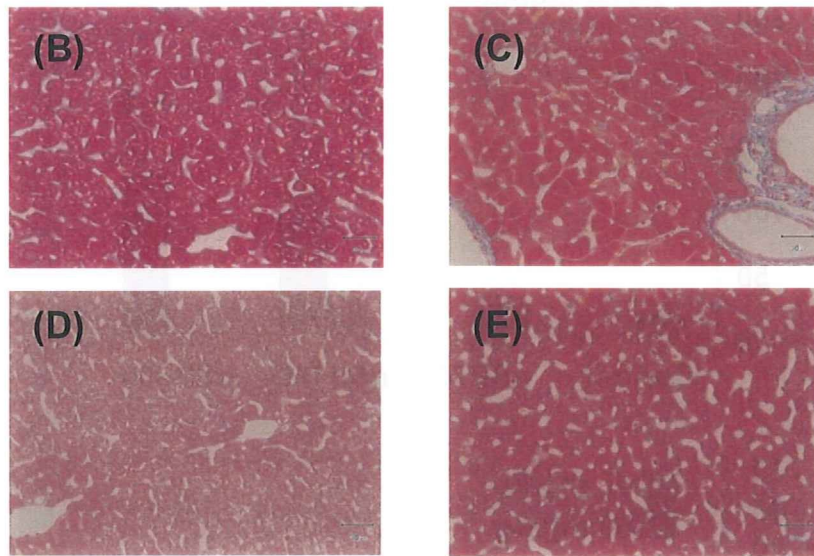
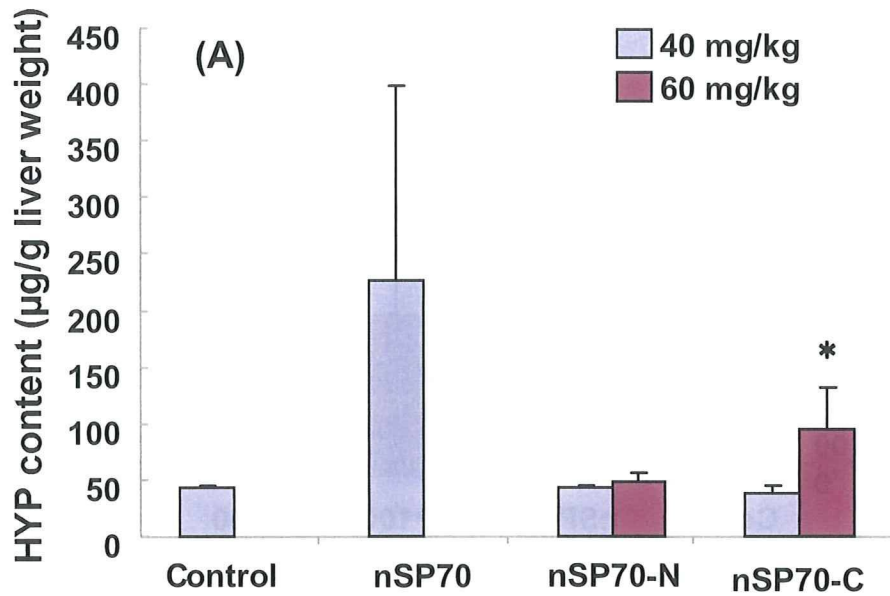
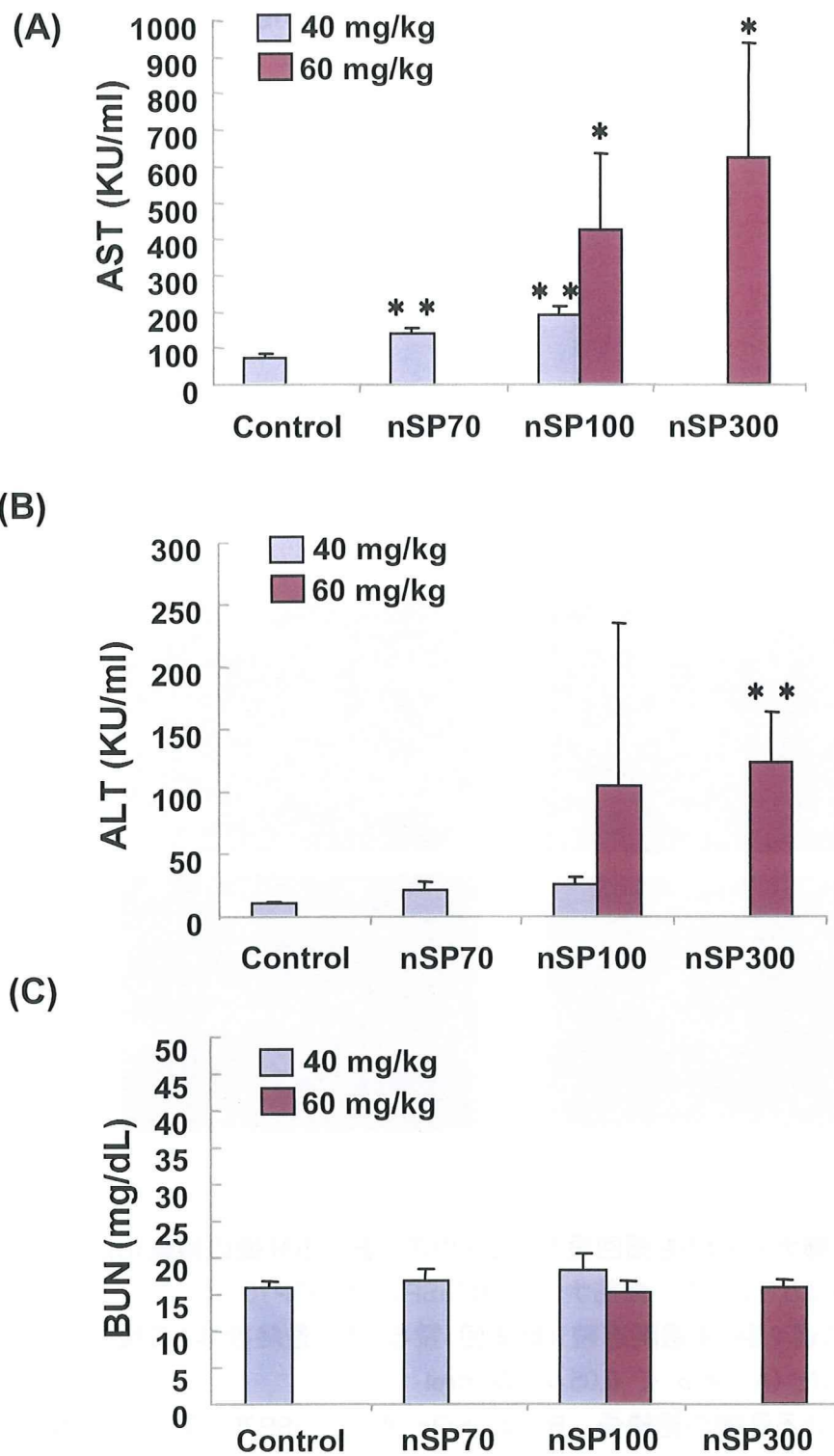


図2 表面修飾ナノシリカを頻回投与したマウスにおける肝臓の線維化。未修飾ナノシリカ(nSP70)、修飾ナノシリカ(nSP70-N, nSP70-C)を尾静脈内に週2回、4週間連続(計8回)投与した。最終投与1日後に、HYPを測定した(A)。*: $p < 0.05$ vs. Control
AZAN染色による肝臓の組織像。(B)コントロール, (C) nSP70, (D) nSP70-N, (E) nSP70-C (X400)



82
 図3 粒子径 100nm ナノシリカを頻回投与したマウスにおける慢性肝障害。
 nSP70, nSP100, nSP300 を尾静脈内に週 2 回、4 週間連続 (計 8 回) 投与した。
 最終投与1日後に、血清中の (A) AST, (B) ALT, (C) BUN を測定した。
 *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ vs. Control

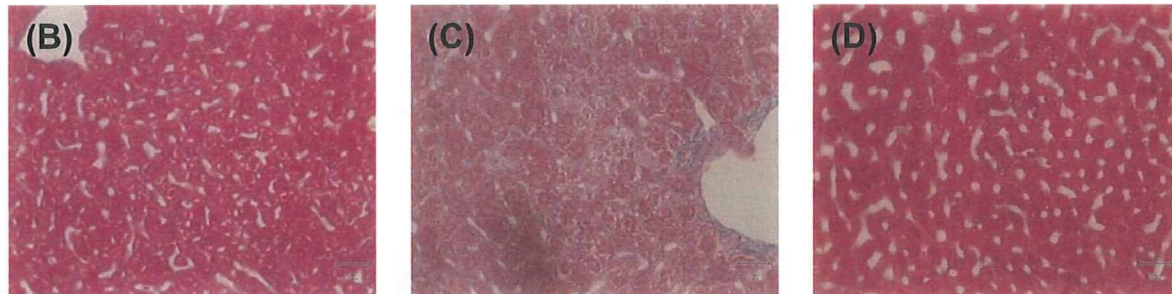
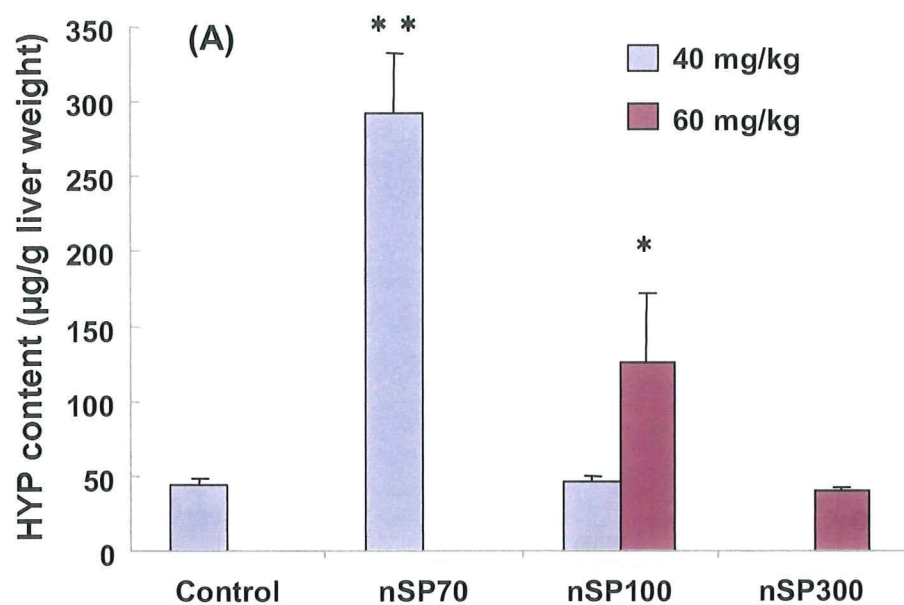


図4 粒子径 100nm ナノシリカを頻回投与したマウスにおける肝臓の線維化。
 nSP70, nSP100, nSP300 を尾静脈内に週 2 回、4 週間連続 (計 8 回) 投与した。
 最終投与1日後に、HYP を測定した (A)。*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ vs. Control
 AZAN 染色による肝臓の組織像。(B) コントロール, (C) nSP70, (D) nSP100 (X400)

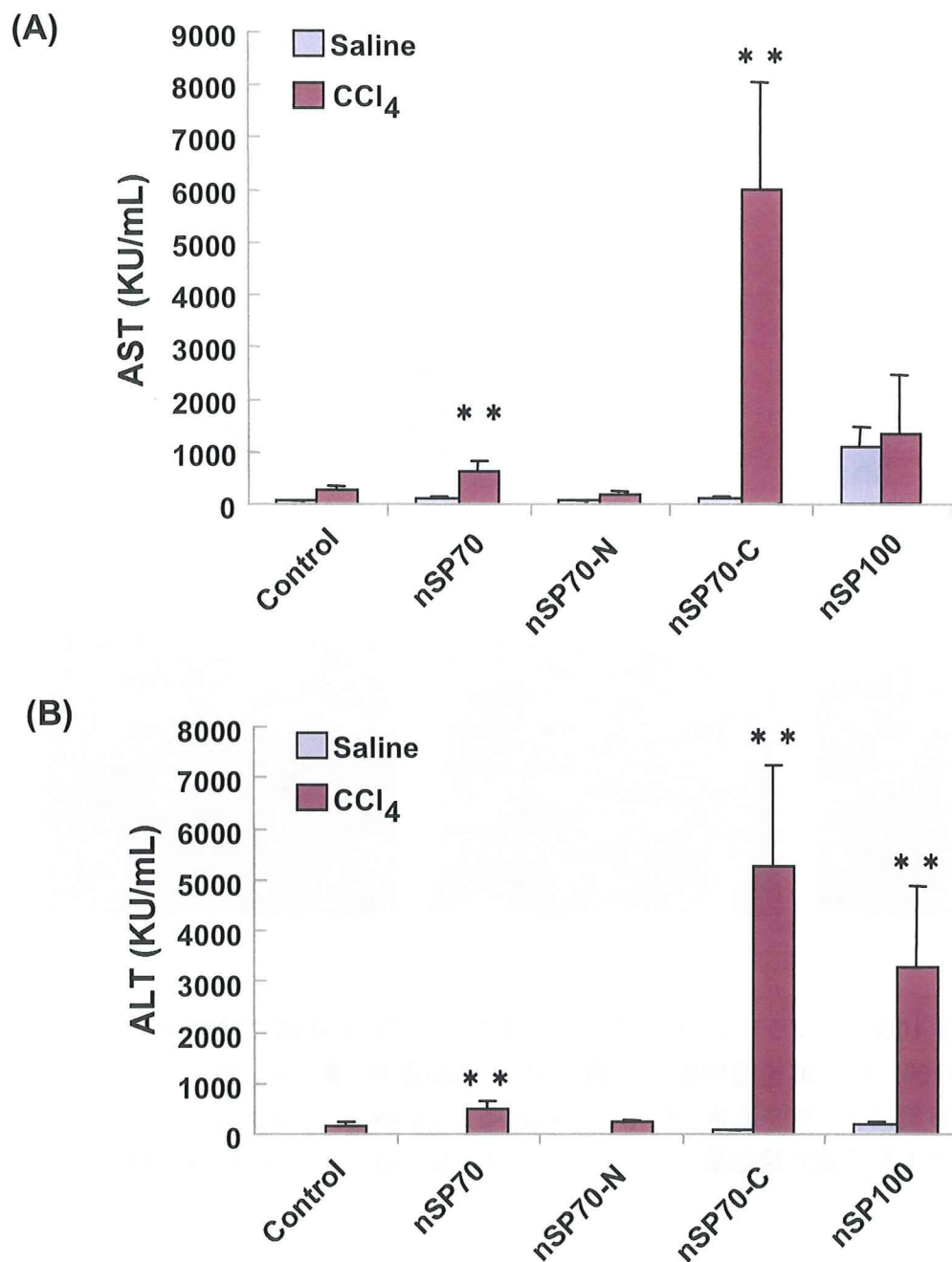
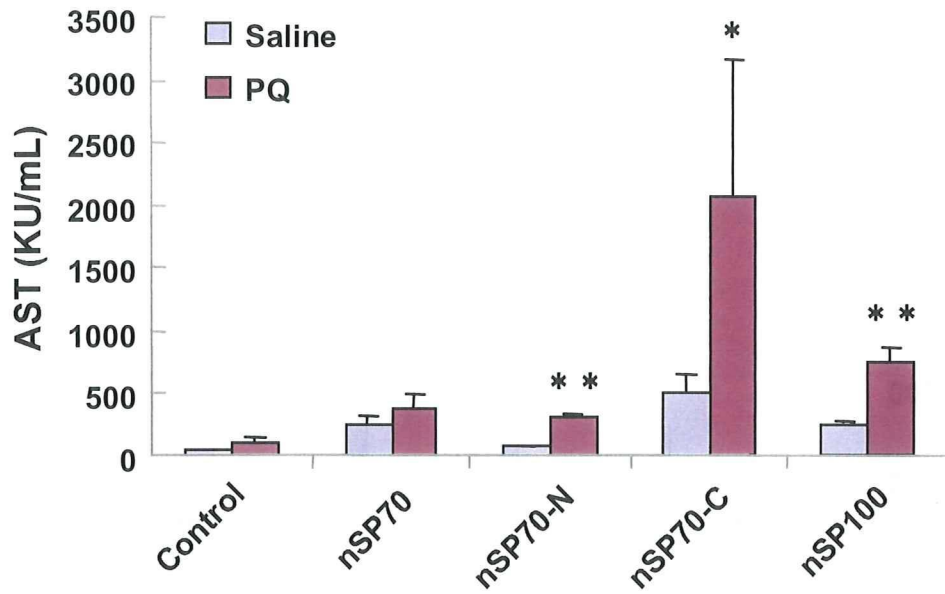


図5 四塩化炭素 (CCl₄) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害。四塩化炭素は腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。

**: $p < 0.01$ vs. Control

(A)



(B)

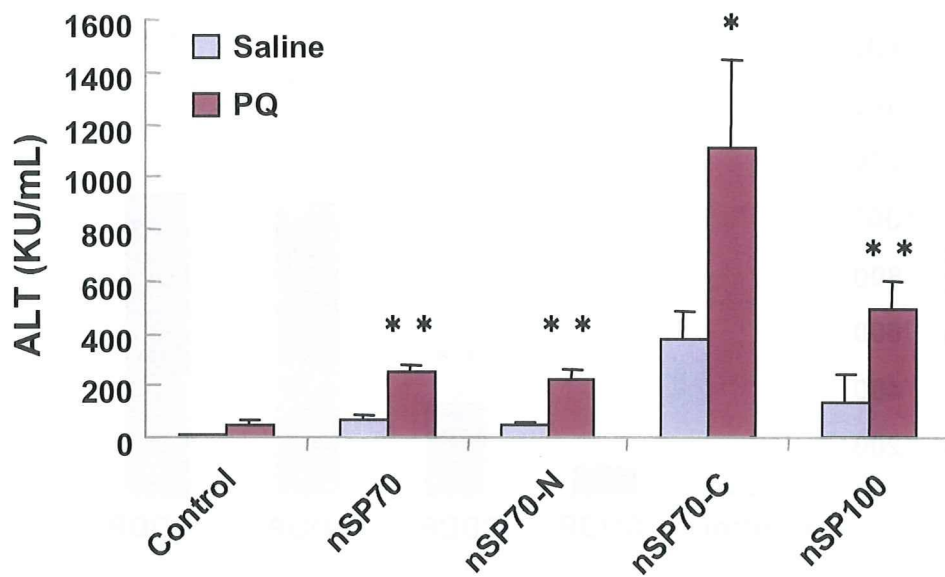


図6 パラコート (PQ) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害。パラコートは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。

**: $p < 0.01$ vs. Control

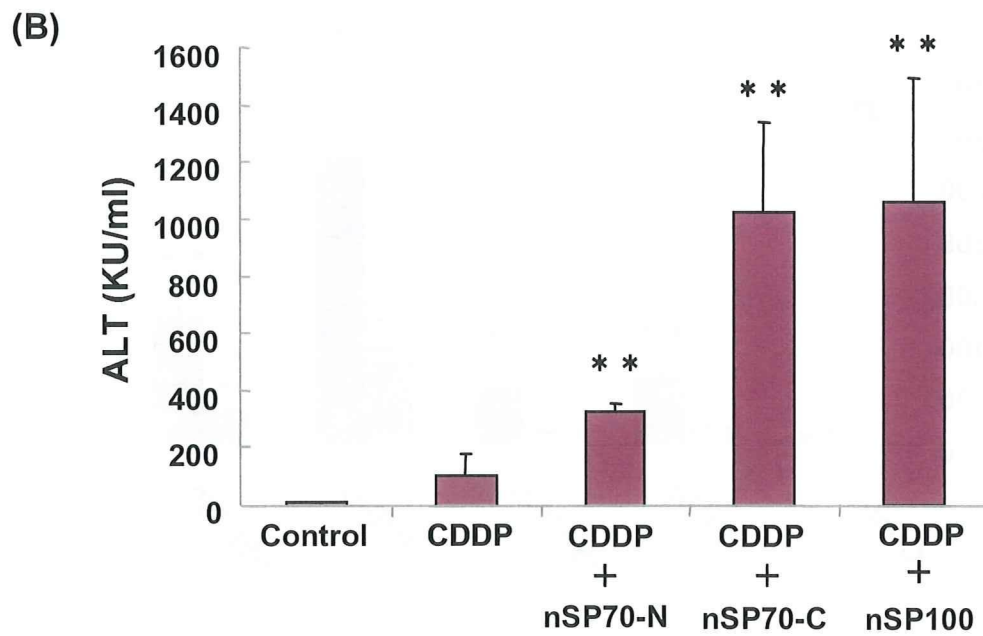
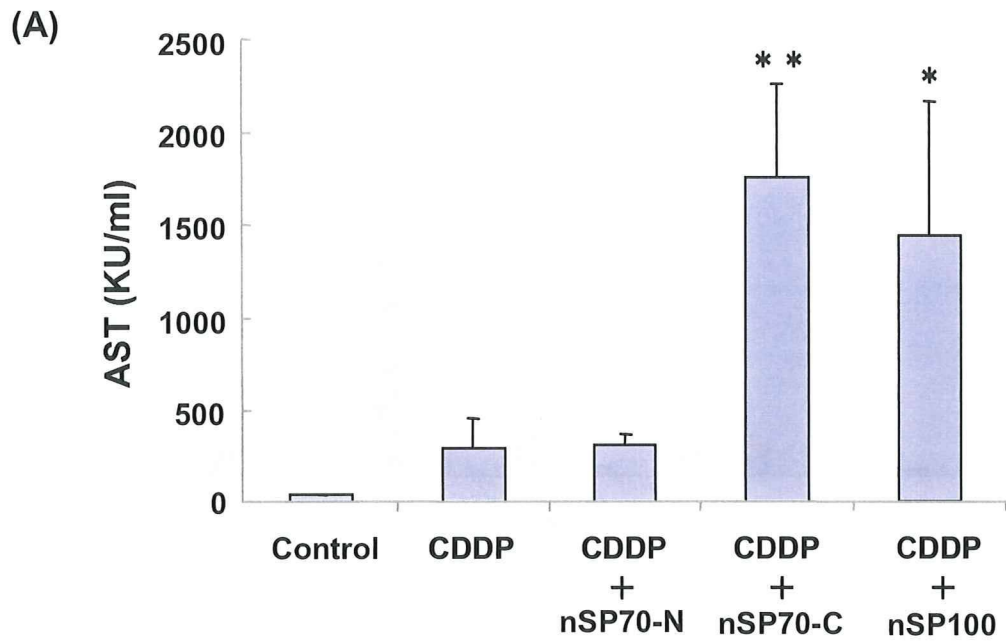
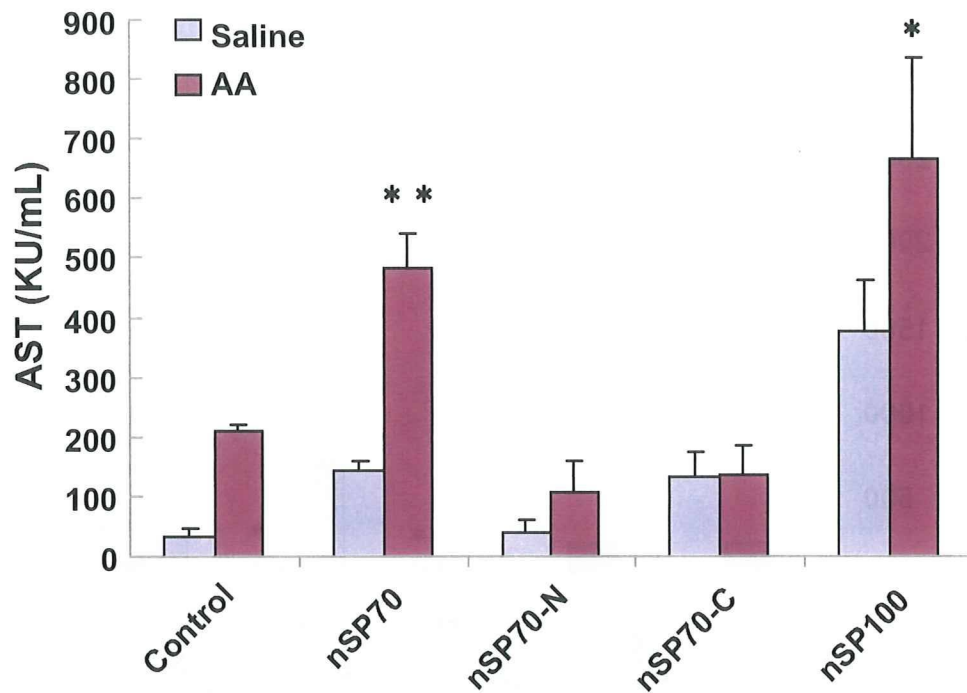


図7 シスプラチン (CDDP) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害。シスプラチンは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。

**: $p < 0.01$ vs. Control

(A)



(B)

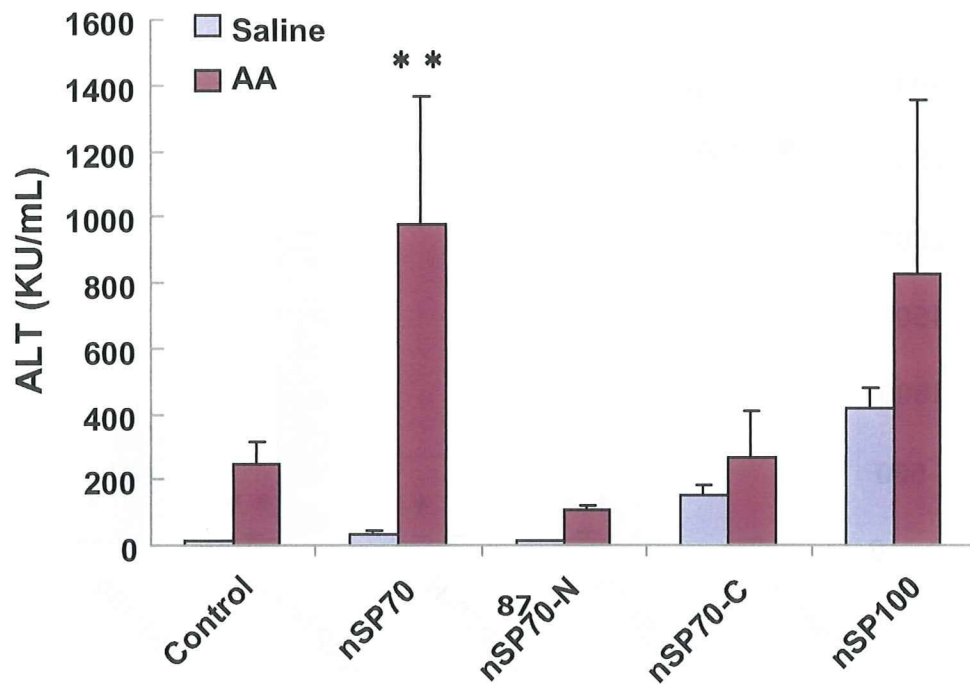
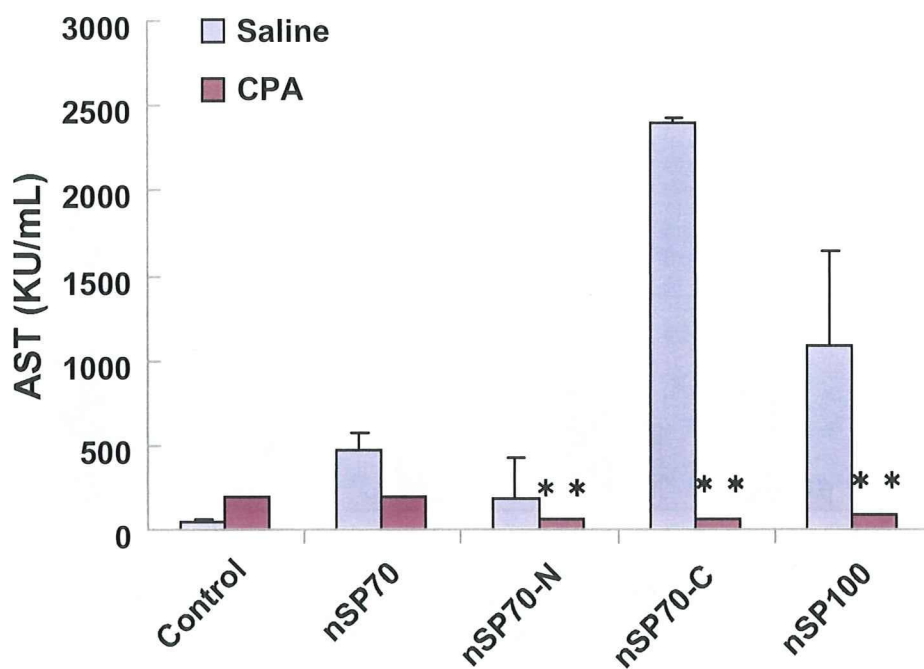


図8 アセトアミノフェン (AA) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害。アセトアミノフェンは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。

**: $p < 0.01$ vs. Control

(A)



(B)

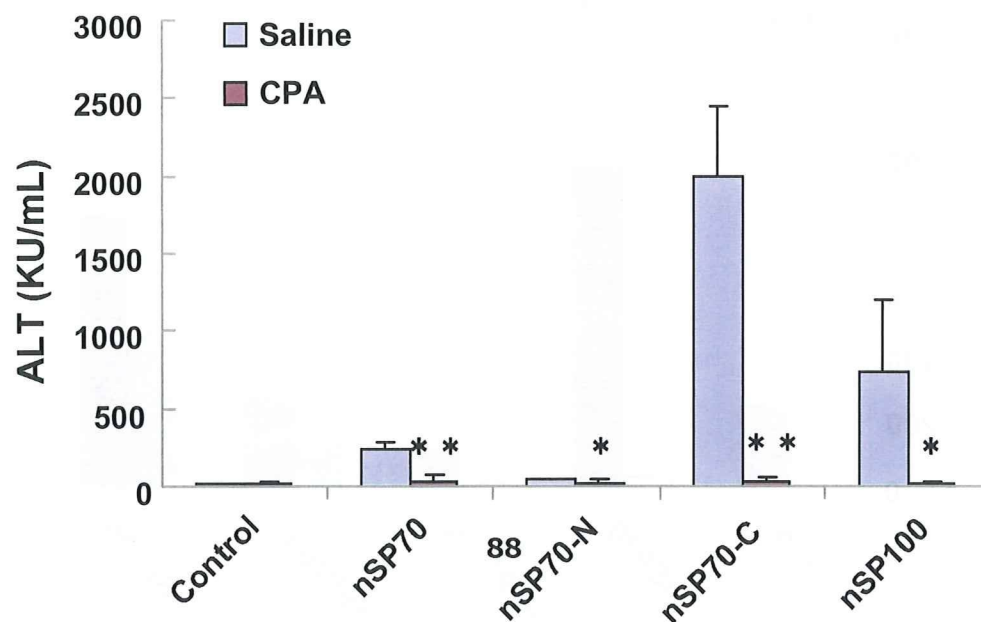
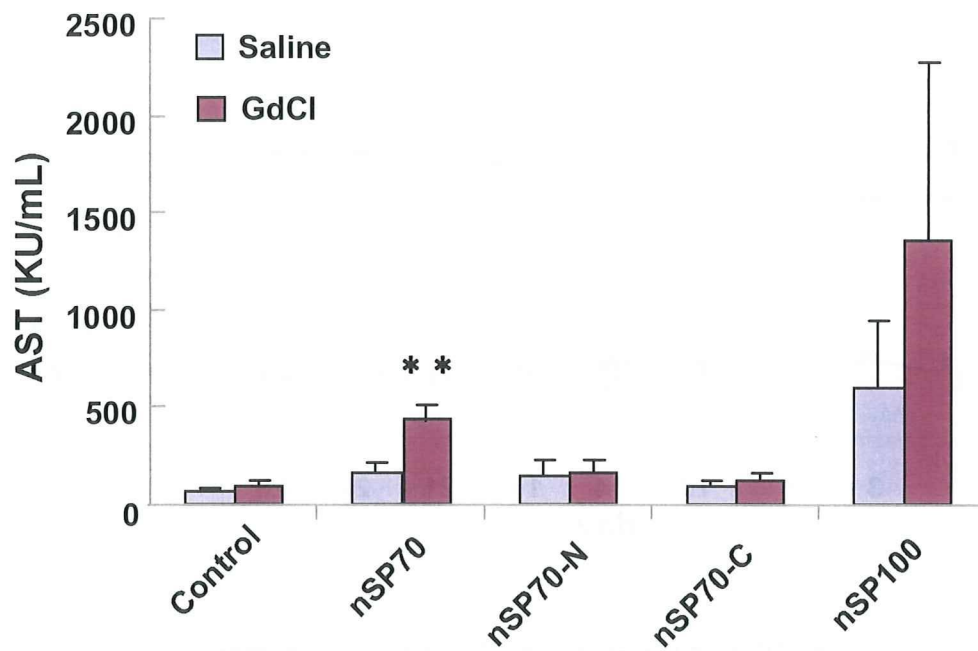


図 9 シクロフォスファミド (CPA) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害。シクロフォスファミドは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。

**: $p < 0.01$ vs. Control

(A)



(B)

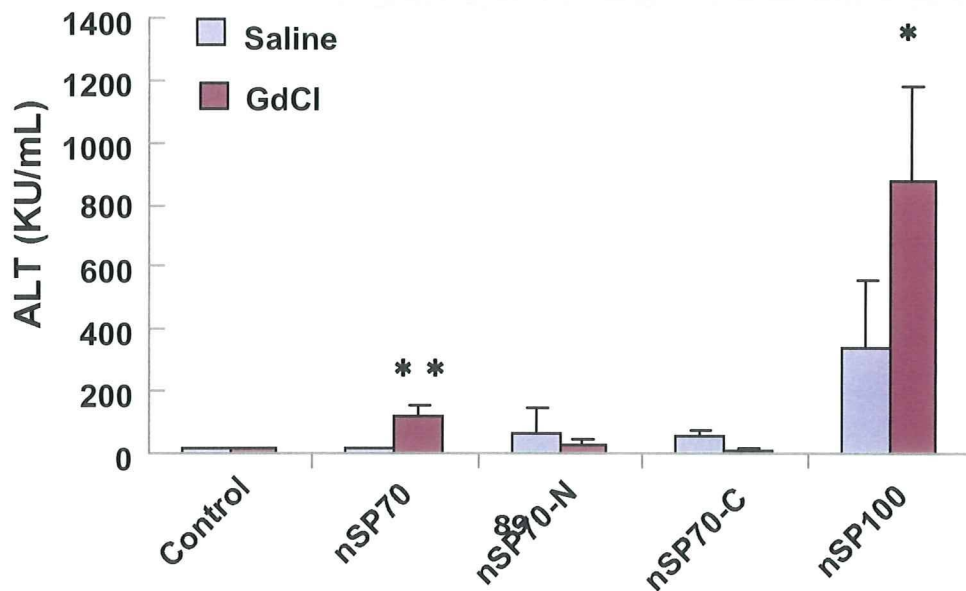


図 10 ガドリニウムクロライド (GdCl) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害。ガドリニウムクロライドは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。
 **: $p < 0.01$ vs. Control

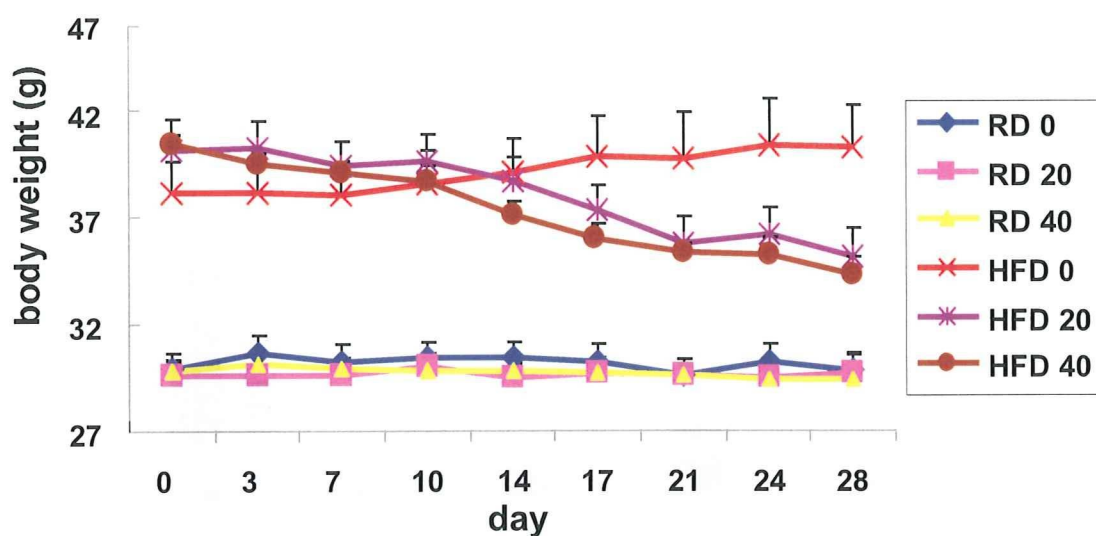
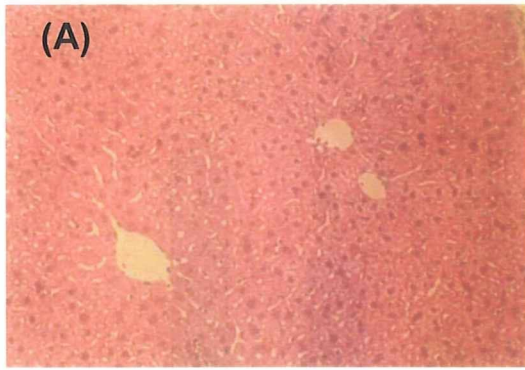
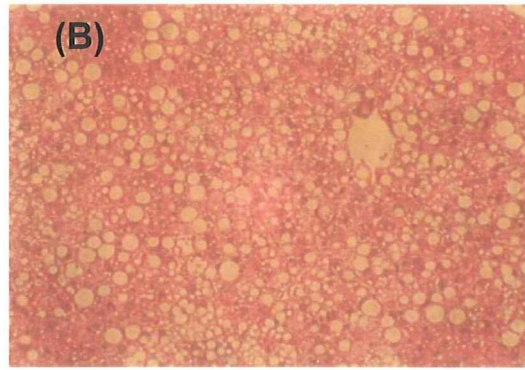


図 11 ナノシリカを頻回投与した脂肪肝モデルマウスの体重変動。正常マウス (RD)、脂肪肝モデルマウス (HFD) にナノシリカを尾静脈内に週 2 回、4 週連続 (計 8 回) 投与した。投与ごとに体重を測定した。



RD



HFD

(C)

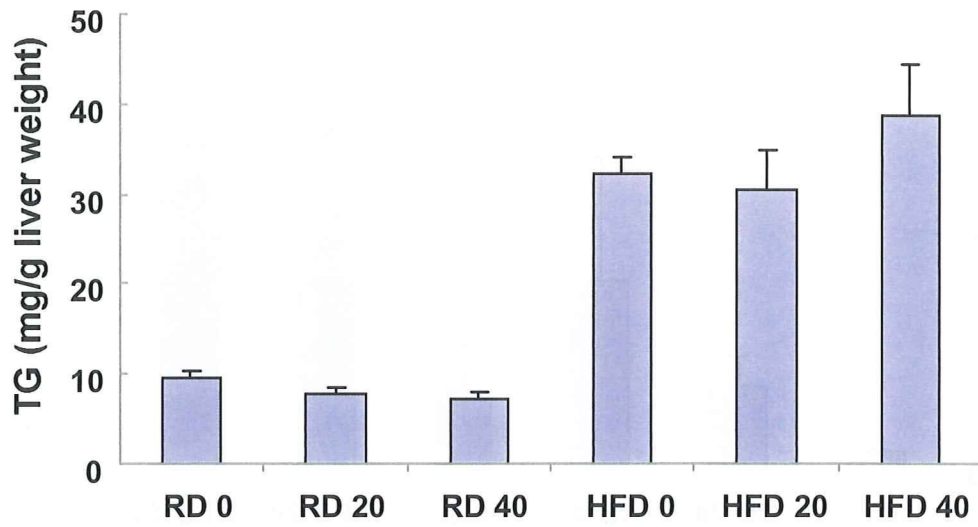


図 12 ナノシリカを頻回投与した脂肪肝モデルマウスの肝脂質。
正常マウス(RD)、脂肪肝モデルマウス(HFD)にナノシリカを尾静脈内に週2回、
4週連続(計8回)投与した。最終投与後の HE 染色による肝組織像。RD(A)、HFD(B)
(X200)。肝臓のトリグリセリド (TG) 量(C)。

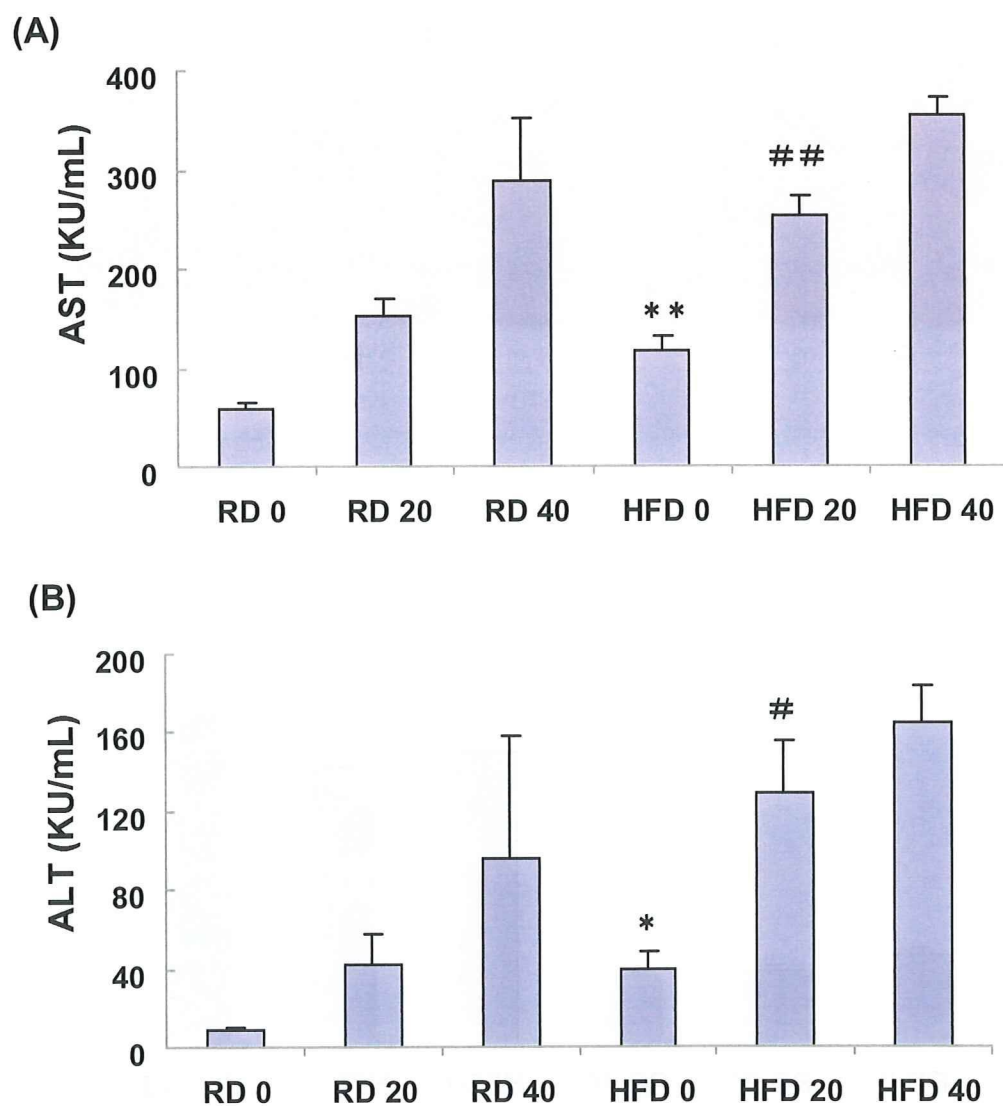


図 13 ナノシリカを頻回投与した脂肪肝モデルマウスの慢性肝障害。
 正常マウス(RD)、脂肪肝モデルマウス(HFD)にナノシリカを尾静脈内に週2回、
 4週連続(計8回)投与した。最終投与後、血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。
 *: $p < 0.05$ vs. RD, #: $p < 0.05$ vs. RD 20
 **: $p < 0.01$ vs. RD, ##: $p < 0.05$ vs. RD 20

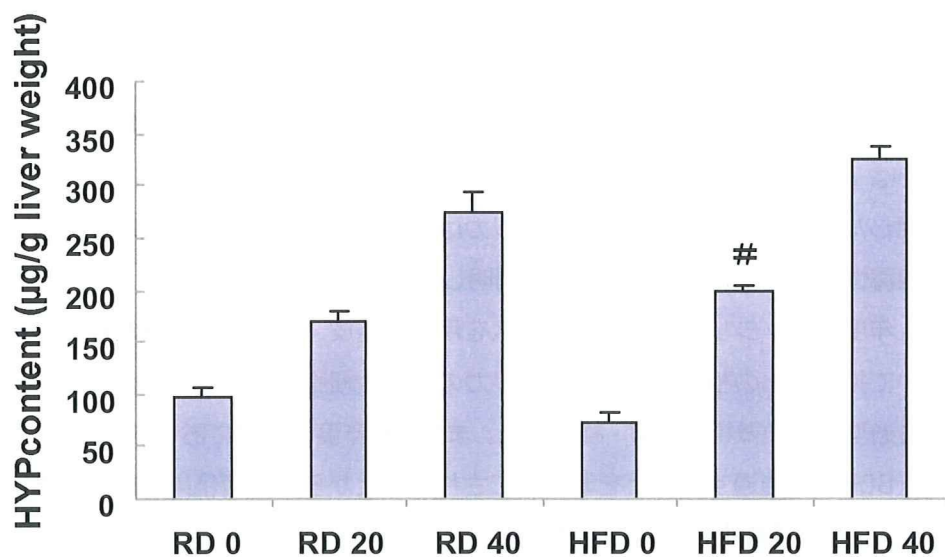


図 14 ナノシリカを頻回投与した脂肪肝モデルマウスの慢性肝障害。
 正常マウス(RD)、脂肪肝モデルマウス(HFD)にナノシリカを尾静脈内に週2回、
 4週連続(計8回)投与した。最終投与後、HYP を測定した。
 #: $p < 0.05$ vs. RD 20

電子顕微鏡によるナノマテリアルの投与経路の相違における主要臓器の各細胞内への侵入性・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20年度はマウスに各種サイズの未修飾体ナノシリカおよび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。特に70 nm ナノシリカは未修飾体、修飾体にかかわらず肝細胞、肝細胞核内に粒子が侵入すること、また300 nm ナノシリカでも肝細胞内に侵入することを明らかにした。肺組織においては70 nm 未修飾体ナノシリカのみが毛細管血内皮細胞内および肺胞上皮細胞内に粒子が侵入することを明らかにした。さらに、大脳皮質では70 nm ナノシリカの未修飾体、修飾体にかかわらず、血液脳関門（BBB）を通過することが判明した。一方、修飾されたナノシリカは未修飾のナノシリカと比較して細胞内への侵入あるいは細胞毒性の発現が減弱されることが判明した。

最終年の平成21年度はナノシリカを中心にマウスを用いた経皮、経鼻および強制経口の投与方法で各種臓器について投与経路の相違によるナノシリカの組織や細胞での局在性・侵入性などの差異や特性について透過型電子顕微鏡で観察・検討した。また、昨年度の結果において70 nm ナノシリカが血液脳関門（BBB）を通過することを明らかにされたことから、血液精巣関門（BTB）についても70 nm ナノシリカの通過性について検討した。

マウス経皮曝露実験ではNMのnSP70およびQDは皮膚組織では角化細胞、棘細胞および膠原線維内、肝臓では肝細胞およびディッセ腔内、リンパ節ではリンパ球および細網細胞内、大脳皮質ではグリア細胞、希突起膠細胞、神経網、前シナプスおよび後シナプス内、海馬ではグリア細胞、希突起膠細胞、神経網、前シナプスおよび後シナプス内に侵入が観察された。QDは肝細胞でゴルジ装置やミトコンドリア内に、大脳皮質ではシナプス内に侵入し、nSP70と比較して局在性が異なった。

マウス経鼻投与実験①ではNMのnSP50およびnSP70は鼻粘膜では嗅細胞および支持細胞内、嗅球では神経線維および神経細胞のミトコンドリア内、大脳皮質ではグリア細胞、神経網、前シナプスおよび後シナプス内、大脳髄質ではグリア細胞、ミエリンおよび後シナプス内、海馬では希突起膠細胞、樹状突起および神経網内、小脳では神経膠細胞および無髄神経線維内、下垂体では前葉の塩基性細胞内の各細胞に侵入が観察された。nSP50とnSP70の細胞内への侵入性・局在性はほぼ同様の傾向を示した。

マウス経鼻投与実験②ではNMのnSP30およびnSP70は肺では肺胞中隔の間質、円柱上皮細胞、

肺胞上皮 I 型および肺胞上皮 II 型細胞内、脾臓では脾洞細網線維、リンパ球およびリンパ球核内、肝臓では肝細胞および肝細胞核内の各細胞に侵入が観察された。nSP30 は nSP70 と比較して肺の肺胞中隔の間質や円柱上皮細胞まで肺組織の深部に侵入することが明らかになった。

マウス強制経口投与実験では NM の nSP70 は胃では主細胞、壁細胞および壁細胞のミトコンドリア内、小腸では吸収上皮細胞、大腸では杯細胞、吸収上皮細胞および粘膜筋板内、肝臓では肝細胞内の各細胞に侵入が観察された。nSP300 は胃では前胃の扁平上皮細胞内、小腸および大腸では吸収上皮細胞内、肝臓では肝細胞内の各細胞に侵入が観察された。nSP70 は nSP300 と比較して侵入範囲が広く局在性も異なった。以上のように NM は皮膚、鼻腔、消化管などのように異なる投与経路によって曝露されても全身性に拡散する可能性が高いことが判明した。

また、雄マウス尾静脈内投与による BTB に関する実験では nSP70 が BTB を通過し、セルトリ細胞、精母細胞、精子細胞、精子内に侵入した粒子が観察され、生殖細胞への影響として精子の減少や精子形成の異常が懸念される。

研究目的

ナノマテリアル (NM) 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、美白、栄養強化等の目的であるが、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。我々がこれまでに実施してきたナノシリカのマウスを用いた静脈内投与による実験結果では、粒子径 70 nm のナノシリカが肝細胞内および肺胞上皮細胞内に侵入し、肝細胞では細胞毒性も誘発することが確認された。さらに、大脳皮質においては血液脳関門 (BBB) である毛細血管内皮細胞からナノシリカが通過し、グリア細胞内に侵入することが判明した。本年度は前年度の結果を踏まえ、NM のより詳細な生体影響・健康影響評価として NM が曝露される可能性の高い経皮、経鼻および経口の方法でナノシリカあるいは光デバイスや蛍光色素として利用されている人工の導電性結晶である量子ドット (QD) をマウスに投与した。これら NM の投与経路の差異による臓器や細胞での局在性・侵入性などの特徴を透過型電子顕微鏡で観察し、比較・検討した。さらに、昨年度の研究結果において粒子径 70 nm のナノシリカが BBB を通過することを明らかにされたことから、BTB につ

いてもナノシリカの通過性を検討した。

研究方法

本年度は NM がヒトに曝露する可能性の高い経路を中心にマウスに投与し、組織内および細胞内への侵入性あるいは局在性の差異について超微形態学的観察を目的として以下に示した動物実験を実施した。

実験 1：経皮（塗布）曝露実験

実験には NM として粒子径 70 nm の未修飾体ナノシリカ (nSP70) および粒子径 30~40 nm の QD を、対照として超純水を用いた。

動物は 6 週齢の雌 BALB/C マウス 12 匹を日本エスエルシー (株) より購入し、馴化期間 3 日間とし、6 群に分け、各群 2 匹ずつとした。そのうちの 3 つの群には浸透性を高める目的で NM あるいは超純水の塗布前にアセトン/ジエチルエーテル (1:1) 混合液を脱脂綿に浸みこませて塗布部位を軽く 10 回程度拭い、その後 NM あるいは超純水をそれぞれ塗布した。残りの 3 つの群はアセトン/ジエチルエーテルを無処置とし、NM あるいは超純水をそれぞれ同様に塗布した。

塗布量は、nSP70 は濃度 25 mg/ml (7×10^{13} 個/ml) の溶液を、QD は nSP70 と同じ粒子数に

なるように超純水で 17 倍に希釈した溶液をそれぞれ片側耳介に 10 μ l ずつ両側耳介に塗布し、総量 20 μ l の投与量とし、週 5 日間 4 週間、計 20 回塗布した。対照群には超純水を同様に両側耳介に塗布した。

最終塗布から 24 時間後、フェノバルビタールで麻酔・屠殺後、皮膚組織、肝臓、大脳皮質、海馬および頸椎リンパ節を摘出し、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 リン酸緩衝容液で洗浄後、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。

実験 2：経鼻投与実験①

実験には NM として粒子径 50 nm および 70 nm の未修飾体ナノシリカ (nSP50、nSP70) を、対照として超純水を用いた。動物は 3 週齢の幼若雌 BALB/C マウス 6 匹を日本エスエルシー (株) より購入し、馴化期間 3 日間とし、3 群に分け、各群 2 匹ずつとした。投与方法は、nSP50 および nSP70 は濃度 25mg/ml の溶液を片側鼻から 10 μ l ずつ両側鼻に滴下し、総量 20 μ l 投与量とし、5 日間連続投与した。対照群には超純水を同様に両側鼻に滴下した。最終投与から 24 時間後、フェノバルビタールで麻酔・屠殺後、嗅上皮 (鼻粘膜)、嗅球、大脳皮質、大脳髄質、海馬、小脳および下垂体を摘出し、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 リン酸緩衝容液で洗浄後、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。

実験 3：経鼻投与実験②

実験には NM として粒子径 30 nm および 70

nm の未修飾体ナノシリカ (nSP30、nSP70) を、対照として超純水を用いた。動物は 6 週齢の雌 BALB/C マウス 6 匹を日本エスエルシー (株) より購入し、馴化期間 3 日間とし、3 群に分け、各群 2 匹ずつとした。投与方法は、nSP30 および nSP70 は濃度 25mg/ml の溶液を片側鼻から 10 μ l ずつ両側鼻に滴下し、総量 20 μ l を単回投与量した。対照群には超純水を同様に両側鼻に滴下した。投与 24 時間後、フェノバルビタールで麻酔・屠殺後、肝、肺、脾を摘出し、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 リン酸緩衝容液で洗浄後、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。

実験 4：強制経口投与実験

実験には NM として粒子径 70 nm および 300 nm の未修飾体ナノシリカ (nSP70、nSP300) を、対照として PBS を用いた。動物は 6 週齢の雌 BALB/C マウスを 6 匹を日本エスエルシー (株) より購入し、馴化期間 3 日間とし、3 群に分け、各群 2 匹ずつとした。ナノシリカの投与量は 250 mg/kg とし、7 日間連続強制経口投与した。対照群には PBS を同様に強制経口投与した。最終投与から 24 時間後、フェノバルビタールで麻酔・屠殺後、胃、小腸、大腸および肝臓を摘出し、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 リン酸緩衝容液で洗浄後、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。

実験 5：血液精巣関門通過性の実験

実験には NM として粒子径 70 nm の未修飾体ナノシリカ (nSP70) を、対照として注射用水を

用いた。動物は6週齢の雄マウス4匹を日本エスエルシー(株)より購入し、馴化期間3日間とし、2群に分け、各群2匹ずつとした。nSP70の投与量は40 mg/kgとし、尾静脈内に単回投与した。対照群には注射用水を同様に投与した。投与24時間後、精巢を摘出し、直ちに冷2.5%グルタルアルデヒド溶液で2時間固定し、0.1Mリン酸緩衝容液で洗浄後、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。

各実験で得られた標本はダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡で観察した。ただし、NMの場合、染色することにより確認が困難になること、また人工産物(アーティファクト)を避けるため無染色で観察した。

C. 研究結果

実験1: 経皮(塗布)投与実験の結果

NMのnSP70とQDを耳介から経皮投与し、各臓器および各細胞への浸透性について検討した。

アセトン/ジエチルエーテル無処置のnSP70塗布群における皮膚組織では角化細胞および角化細胞の核内に粒子が観察された(写真1A、1B)。肝臓では肝細胞内に粒子の侵入(写真1-C、1-D)が観察された。しかし、クッパー細胞に貪食された粒子はほとんど観察されなかった。リンパ節ではリンパ球およびリンパ球の核内に粒子の侵入が観察された(写真2-A)。大脳皮質ではグリア細胞および神経網内に粒子の侵入像が観察された(写真2-B)。海馬では神経網、神経細胞の前シナプスおよび後シナプス内に粒子の侵入が観察された(写真2-C、2-D)。

アセトン/ジエチルエーテル処置のnSP70塗布群における皮膚組織では角化細胞内に粒子が観察された(写真3-A、3-B)。肝臓ではディッセ腔

に数個の凝集した粒子および肝細胞内に粒子の侵入が観察された(写真3-C、3-D)。クッパー細胞に貪食された粒子はほとんど観察されなかった。リンパ節では細網細胞内に粒子の侵入が観察された(写真4-A)。大脳皮質では神経網内に粒子の侵入像が観察された(写真4-B)。海馬では希突起膠細胞、樹状突起および後シナプス内に粒子の侵入が観察された(写真4-C、4-D)。

アセトン/ジエチルエーテル無処置のQD塗布群における皮膚組織では角化細胞内、棘細胞核内に粒子が観察された(写真5-A、5-B)。肝臓では肝細胞のミトコンドリアおよびミトコンドリア内に粒子の侵入が観察された(写真5-C、5-D)。クッパー細胞に貪食された粒子はほとんど観察されなかった。リンパ節ではリンパ球内およびリンパ球の核内に粒子の侵入が観察された(写真6-A)大脳皮質ではグリア細胞内、希突起膠細胞内、樹状突起内、後シナプス内に粒子の侵入像が観察された(写真6-B)。海馬ではグリア細胞内、前シナプスおよび後シナプス内に粒子の侵入が観察された(写真6-C、6-D)。

アセトン/ジエチルエーテル処置のQD塗布群における皮膚組織では角化細胞内および角化細胞核内に粒子が観察された(写真7-A、7-B)。肝臓では肝細胞内、粗面小胞体内に粒子の侵入が観察された(写真7-C、7-D)。クッパー細胞に貪食された粒子はほとんど観察されなかった。リンパ節ではリンパ球の核内に粒子の侵入が観察された(写真8-A)。大脳皮質では神経網内、前シナプス内に粒子が観察された(写真8-B)。海馬では神経網内、後シナプス内に粒子の侵入が観察された(写真8-C、8-D)。

以上の結果は表1にまとめた。

実験2: 経鼻投与実験①の結果

nSP50およびnSP70をそれぞれマウスに経鼻