

図22. ナノシリカを7日間経鼻投与したマウスの血液凝固時間の測定

各シリカ(mSP1000、nSP300、nSP100、nSP70、nSP30)あるいは蒸留水を7日間連続経鼻投与した。最終投与から24時間後、Duke法を用いて出血時間を測定した。マウスの耳にメスで2 mmの切創をつくり、自然に流出する血液をろ紙で30秒毎に吸い取り、ろ紙に血液がつかなくなるまでの時間を出血時間とした。Results are expressed as mean  $\pm$  S.E. (n=4-5). \*Represents significant difference from the control by Dunnett ( $p < 0.01$ ).

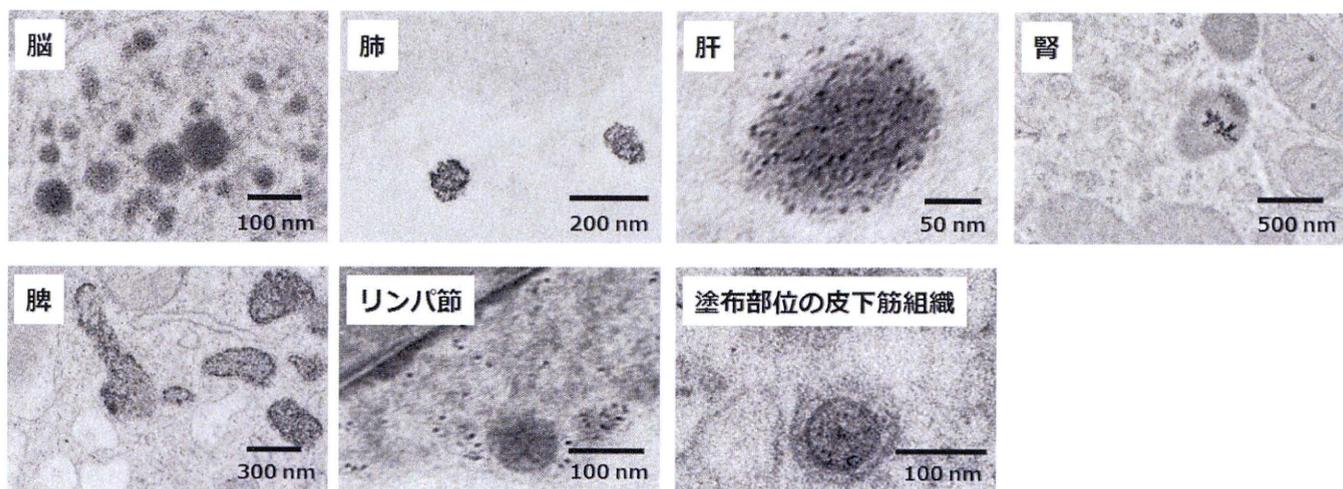


図23. サブナノ白金の経皮吸収性の評価 (電子顕微鏡観察)

蒸留水に懸濁した1次粒子径1 nmの試薬グレードのsnPt (5 mg/ml) を、BALB/cマウスの耳介に50  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{ear}$ で両耳に7日間連続で塗布した。最終投与24時間後に各種臓器 (耳介、脳、肺、肝臓、腎臓、頸部リンパ節など) を回収した。これらの臓器を用いてTEMによるナノシリカおよびsnPtの局在を観察した。

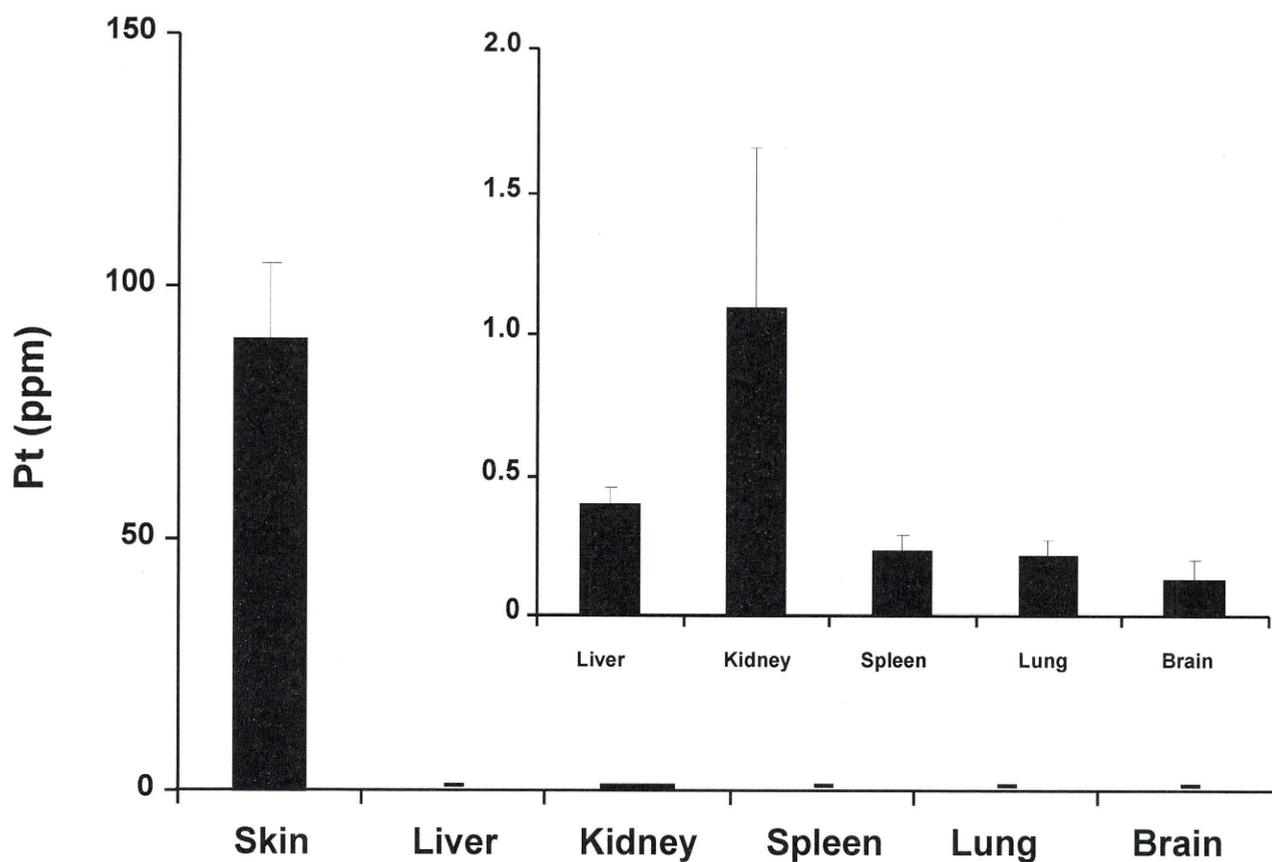


図24. サブナノ白金の経皮吸収性の評価 (ICP-MS分析) .

蒸留水に懸濁した1次粒子径1 nmの試薬グレードのsnPt (5 mg/ml) を、BALB/cマウスの耳介に50  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}/\text{ear}$ で両耳に7日間連続で塗布した。最終投与24時間後に各種臓器 (耳介、肝臓、腎臓、脾臓、肺、脳) を回収した。これらの臓器を用いてICP-MS分析を実施した。

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・吸入曝露実態の解析基盤および経皮・吸入毒性評価基盤の確立  
とヒト健康影響情報の集積に関する研究」

研究報告書

## ナノマテリアルの肝内動態解析と一般毒性・肝毒性・ 若年性メタボリック症候群評価に関する研究

分担研究者 八木 清仁 大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野

### 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おける様々な臓器での安全性評価が行われ、その情報は蓄積されてきているものの、様々な利用状況に即した形での安全性評価等、残された課題は多い。特に、ナノマテリアルが体内に侵入した際に集積すると思われる肝臓での安全性評価は、重要事項であるにも関わらず未だ十分とはいえないのが現状である。そこで本研究では、主に肝臓に対するナノマテリアルの安全性評価を中心に検討を行った。ナノシリカと薬物（5-アミノサリチル酸、テトラサイクリン、トラゾドン）の併用時における肝臓・腎臓への影響を検討した結果、テトラサイクリンのように、肝障害の増悪化、腎機能の変化という両臓器への影響が観察されたものがある一方、トラゾドンのように、肝臓、腎臓共に影響が表れなかったものがあった。また、5-アミノサリチル酸のように、肝障害の増悪化が観察されたものの、腎障害は引き起こさないものもあった。続いて、高脂肪食摂取マウスに対するナノシリカの影響を検討した。これまでの検討から、高脂肪食摂取マウスにナノシリカを投与すると正常マウスでは見られない体重減少が観察されている。この原因として、ナノシリカによる脂肪組織の溶解が原因の1つであることが明らかとなった。また、この脂肪溶解はナノシリカにより惹起された炎症性サイトカインが促進しているのではないかと推察された。さらに、サブナノ白金およびサブナノ銀の生体への影響について検討した結果、サブナノ白金は、高容量において致死性の毒性、用量依存的な急性肝障害及び急性腎障害性、炎症誘発作用が確認された。サブナノ銀は、急性肝障害または急性腎障害性および炎症誘導作用は確認されなかったものの、高容量において致死性の毒性が確認された。以上、薬物とナノシリカの併用による障害性の誘発は薬物によって異なることが示されたことから、ナノマテリアルと薬物を併用して使用する際には、個々の薬物との安全性評価が必要となることが示唆された。また、ナノシリカは生体状況において異なった作用をもたらすことが明らかとなったため、他の病態下におけるナノシリカの安全性も検討する必要があると考えられる。サブナノ白金、サブナノ銀に関しては一部毒性が示されたものの、毒性作用の原因および持続投与時での検討等、更なる調査が必要である。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ることから、

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ものの、未だに十分とはいえないのが現状である。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、粒子径 70nm のナノシリカを用い、各種薬剤との併用による肝臓への影響、さらにメタボリックシンドローム病態マウスに対するナノシリカの影響について検討を行った。また、新たなナノマテリアルとして、サブナノ白金およびサブナノ銀の肝臓に対する毒性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. ナノマテリアル

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 70 nm を用いた。ナノシリカは、粒径測定装置（Zetasizer）を用い、平均粒径を確認した後、実験に用いた。本報告書では、未修飾体の粒径 70 nm ナノシリカを nSP70、サブナノサイズの白金、銀を snPt、snAg とそれぞれ表記した。

### 2. 5-アミノサリチル酸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、5-アミノサリチル酸（5-ASA）を 500 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて nSP70（Lot: 12408 40-02）を 30、50 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。5-アミノサリチル酸は 1% CMC を用いて希釈後、20 ml/kg b.w. の用量で投与し、5-アミノサリチル酸を投与しない群には、1% CMC 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。

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、上清を血清サンプルとして回収した。5-アミノサリチル酸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、肝傷害の指標として血清中の ALT、AST 濃度、腎臓において評価するため、腎傷害の指標として血清中の BUN 濃度の測定を行った。

### 3. テトラサイクリ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、テトラサイクリン（Tet）を 100 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて nSP70（Lot: 12408 40-02）を 30、50 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。テトラサイクリン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、テトラサイクリ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。

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、上清を血清サンプルとして回収した。テトラサイクリ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、肝傷害の指標として血清中の ALT、AST 濃度、腎臓において評価するため、腎傷害の指標として血清中の BUN 濃度の測定を行った。

#### 4. トラゾド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、トラゾドン (Tra) を 100 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて nSP70 (Lot: 12408 40-02) を 30、50 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。トラゾドン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、トラゾド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. の投与量で投与し、control 群には注射用水のみ等量投与した。

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、上清を血清サンプルとして回収した。トラゾド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、肝傷害の指標として血清中の ALT、AST 濃度、腎臓において評価するため、腎傷害の指標として血清中の BUN 濃度の測定を行った。

#### 5. 高脂肪食摂取マウスの脂肪組織に対する ナノシリカの影響

8 週齢の雄性の C57BL/6 マウスに常食 RD (10% of calories as fat) 及び高脂肪食 HFD (45% of calories as fat) を 8 週間摂取させ、肥満モデルマウスを作成した。このマウスに nSP70 (Lot: 12408 40-02) 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。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を投与した。毎回投与前に体重を測定した。

最終投与 3 日後、マウスを解剖し、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、上清を血清サンプルとして回収した。この血清サンプルから遊離脂肪酸 (FFA) の量を測定した。また、辜丸周囲脂肪組織及び腎臓周囲脂肪組織を採取し、脂肪重量を測定した。採取した辜丸周囲脂肪組織において、HE 染色による組織像の観察を行った。

#### 6. ナノシリカによる高脂肪食摂取マウスのサイトカイン産生への影響

8 週齢の雄性の C57BL/6 マウスに常食 RD (10% of calories as fat) 及び高脂肪食 HFD (45% of calories as fat) を 8 週間摂取させ、肥満モデルマウスを作成した。このマウスに nSP70 (Lot: 12408 40-02) 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。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。

最終投与 3 日後、マウスを解剖し、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、上清を血清サンプルとして回収し、TNF- $\alpha$ 、IL-6、レプチンの量を測定した。

#### 7. サブナノ白金単回投与による肝臓・腎臓に対する影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (Lot: 10062801) を 5、10、15、20 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。snPt は注射用水を用いて希釈後、4 ml/kg b.w. の用量で投与した。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、上清を血清サンプルとして回収した。snPt 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 ALT 及び AST 値の測定を行った。また腎傷害のマーカーとして血清中の BUN 値の測定を行った。

#### 8. サブナノ銀単回投与による肝臓・腎臓に対する影響

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snAg (Lot : 10070501) を 1、2、3、4 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。snAg は注射用水を用いて希釈後、4 ml/kg b.w. の用量で投与した。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℃, 6000 rpm, 10 min で遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。snAg 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 ALT 及び AST 値の測定を行った。また腎傷害のマーカーとして血清中の BUN 値の測定を行った。

### 9. サブナノ白金単回投与による炎症性サイトカインの発現

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (Lot : 10062801) を 5、10、15、20 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。snPt は注射用水を用いて希釈後、4 ml/kg b.w. の用量で投与した。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℃, 6000 rpm, 10 min で遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。snPt による炎症誘発性を評価するため、血清中の TNF- $\alpha$ 、IL-6 の測定を行った。

### 10. サブナノ銀単回投与による炎症性サイトカインの発現

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snAg (Lot : 10070501) を 1、2、3、4 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。snAg は注射用水を用いて希釈後、4 ml/kg b.w. の用量で投与した。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℃, 6000 rpm, 10 min で遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。snAg による炎症誘発性を評価するため、血清中の TNF- $\alpha$ 、IL-6 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. 5-アミノサリチル酸による肝毒性に対するナノシリカの影響

5-アミノサリチル酸は、炎症性腸疾患での基本となる治療薬であり、*in vitro* における検討において、初代培養肝細胞に ROS の発生を誘発し、ミトコンドリアへダメージを与えることが確認されたことから、肝毒性があるのではないかと考えられている。

5-アミノサリチル酸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、肝障害の指標である血中 ALT と AST 値を測定したところ、ナノシリカと 5-アミノサリチル酸との併用により ALT、AST 値の上昇傾向が観察された (図 1A, B)。従って、5-アミノサリチル酸とナノシリカの併用では、肝障害が増悪化することが分かった。ALT 値に関して、30 mg/kg b.w. の用量で有意な上昇が観察されたが、50 mg/kg b.w. の用量では 30 mg/kg の投与時と比較して変化が観察されなかった (図 1A)。一方、AST 値は 50 mg/kg b.w. の用量でも上昇が確認された。この原因として、肝障害ではなく、心障害が引き起こされた可能性が考えられる。また、図 1C に示すように、ナノシリカとの併用では血中 BUN 値に変化は観察されなかった。従って、5-アミノサリチル酸とナノシリカの併用では、腎臓に影響を及ぼさないことが示唆された。

## 2. テトラサイクリンによる肝毒性に対するナノシリカの影響

テトラサイクリンは、広域スペクトラム抗生物質の一種として使用されている。しかし、低用量の投与では体内 ROS の産生を促進し、さらに高用量では急性脂肪肝を誘導するなど肝臓への影響が知られている

テトラサイクリ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、肝傷害の指標として血清中の ALT、AST 濃度を測定した結果、ナノシリカとテトラサイクリンの併用により ALT、AST 値共に顕著な上昇が見られた (図 2A, B)。従って、テトラサイクリンとナノシリカの併用では、肝障害が増悪化することが明らかとなった。また、ナノシリカのいずれの投与群でも、

テトラサイクリンとの併用によりマウスの死亡が確認されたことから、詳細は不明であるがナノシリカとテトラサイクリンの併用時には、致死的な毒性が観察されることも分かった。

一方、BUN 値を測定したところ、ナノシリカとの併用による腎障害の増悪化は観察されなかったが、予想と反してナノシリカ高用量時において BUN 値の低下が観察された (図 2C)。BUN は蛋白質の終末代謝産物であり、肝臓で合成され、腎臓から排泄される。高用量時に見られる BUN 減少の原因について詳細は不明だが、肝臓での尿素合成機能、または腎機能になんらかの影響を及ぼした可能性が考えられる。

### 3. トラゾドンによる肝毒性に対する

#### ナノシリカの影響

トラゾドンは抗うつ薬として用いられる有機化合物の一種である。5-アミノサリチル酸と同様に、*in vitro* における検討で、初代培養肝細胞への ROS を介した障害性などが確認されたことから、肝毒性を引き起こすことが予想されている。

トラゾド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、肝傷害の指標として血清中の ALT、AST 濃度を測定した結果、ナノシリカとトラゾドンを併用投与時には、ナノシリカ単独が誘導する ALT、AST 値とほぼ同等の値が観察された (図 3 A, B)。*in vitro* での検討では、トラゾドンは肝細胞に ROS の産生を誘導するとの報告があるが、今回の *in vivo* での検討では、マウスの肝臓には影響が見られなかった。従って、ナノシリカとトラゾドンの併用による肝障害の増悪化は観察されなかった。また、図 3C に示すように、血中 BUN 値の変化も観察されなかったことから、トラゾドンとナノシリカの併用では、腎臓への影響も観察されなかった。

### 4. 高脂肪食摂取マウスの脂肪組織に対する

#### ナノシリカの影響

前回の報告において、ナノシリカの投与により、高脂肪食摂取マウスの体重が減少したことが見出された (図 4)。高脂肪食摂取マウスの体重増加は脂肪の増加が主なものなので、体重減少の原因

としてまず、ナノシリカの脂肪組織への影響を検討した。検討する脂肪組織として、肥満の際に蓄積しやすい内臓脂肪である睾丸周囲脂肪及び腎臓周囲脂肪に着目し、これらの重量を測定した。図 5A, B に示すように、正常マウスにナノシリカを投与すると、睾丸周囲脂肪重量及び腎臓周囲脂肪重量は変化しないのに対し、高脂肪食摂取マウスに投与すると、ナノシリカ投与量依存的な脂肪組織重量の減少が見られた。従って、ナノシリカ投与により高脂肪食摂取マウスの脂肪組織が減少していることが明らかとなった。

次に、脂肪細胞へのナノシリカの影響に関して検討を行った。脂肪組織の HE 染色の結果から、高脂肪食摂取マウスにナノシリカを投与すると、脂肪細胞のサイズ縮小が観察された (図 6D~F)。一方、正常マウスでは、脂肪細胞のサイズに変化は見られなかった (図 6A~C)。図 6G に示すように、各群の脂肪細胞のサイズを定量化した結果からも、高脂肪食摂取マウスのナノシリカ投与群において脂肪細胞のサイズ縮小が確認された。従って、ナノシリカは高脂肪食摂取マウスにおいてのみ、脂肪細胞のサイズ減少を誘導することが明らかとなった。

脂肪組織重量の減少、及び脂肪細胞のサイズ縮小から、ナノシリカ投与により脂質の溶解が起きているのではないかと推察された。脂肪細胞にはトリグリセリド (TG) が蓄積されており、脂質溶解が起こると、トリグリセリドは FFA とグリセリンに分解され、血液中に入る。そこで、ナノシリカによる脂質溶解作用の可能性を検討するため、血清中の FFA 量を測定した。図 7 に示すように、高脂肪食摂取マウスでは、肥満の症状として血中 FFA 濃度の上昇が確認された。ナノシリカを投与すると、この血中 FFA 濃度がさらに上昇することが観察されたことから、ナノシリカにより脂質の溶解が促進されたことが分かった。一方、正常マウスにおいて、ナノシリカ投与による血清中の FFA 量の変動は観察されなかった。従って、ナノシリカ投与により、高脂肪食摂取マウスの脂肪細胞の溶解が促進されていることが示唆された。

以上、ナノシリカの投与により高脂肪食摂取マウスの脂肪細胞における脂質の溶解が引き起こ

されたため、体重減少が起こったのではないかと考えられた。

## 5. 高脂肪食摂取マウスのサイトカインに対する ナノシリカの影響

現在までの検討から、ナノシリカの単回投与により、TNF- $\alpha$  及び IL-6 など炎症性サイトカインの血中濃度が上昇することが分かっている。しかし、ナノシリカの頻回投与や高脂肪食摂取マウスにおける検討は未だに行われていない。図 8 A, B に示すように、ナノシリカを頻回投与すると、正常マウスと同様に高脂肪食摂取マウスにおいても血中の TNF- $\alpha$  及び IL-6 濃度の上昇が観察された。これまでの報告により、TNF- $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインは脂肪細胞の脂質溶解を引き起こすことが知られている。従って、脂肪組織において脂質溶解が促進された原因の1つとして、ナノシリカ投与による炎症性サイトカインの増加が推測された。正常マウスと高脂肪食摂取マウスにおいて、ナノシリカが誘導する炎症性サイトカインのレベルは同程度であったにも関わらず、高脂肪食摂取マウスにおいてのみ脂質溶解が誘導された要因として、正常マウスと高脂肪食摂取マウスにおける脂肪組織の炎症状態の違いが予想される。肥満脂肪組織では、正常の脂肪組織と比較して既に軽度の炎症状態であることが知られている。そのため、ナノシリカにより更なる炎症が惹起された高脂肪食摂取マウスの脂肪組織では、脂質の溶解が引き起こされたのではないかと推測される。

次に、血中レプチン濃度の測定を行った。レプチンは脂肪組織において産生されるホルモンであり、脳の視床下部に作用することによって、食欲抑制作用やエネルギー消費の亢進を惹起することが知られている。肥満状態においては血中レプチン濃度が増大するのに伴い、レプチン抵抗性が起こっている。実際、図 9 に示すように正常マウスと比べて高脂肪食摂取マウスにおいて血中レプチン濃度の上昇が確認された。今回、ナノシリカが血中レプチン量に影響を及ぼすかに関して検討を行った結果、正常マウス及び高脂肪食摂取マウスどちらにおいても、ナノシリカ投与によ

り血中レプチン量の減少が確認された。ここで、高脂肪食摂取マウスのほうが顕著にレプチン量の減少が確認されたが、これはレプチンを産生する脂肪組織が減少したため、もしくはナノシリカが生体内において脂肪細胞のレプチン分泌機能を阻害したためだと考えられる。また、レプチンの変動が観察されているにも関わらず、摂食量に関しては変動が確認されなかったことから、レプチン量の変動と体重変化に関しては今後更なる検討が必要であると考えられる。

## 6. サブナノ白金単回投与による肝臓・腎臓に対する影響

サブナノ白金 (snPt) を尾静脈内注射した際の肝臓および腎臓への影響を検討した。まず、肝臓への影響を検討した。図 10 A, B に示すように、snPt を投与 24 時間後、control 群と比べ snPt 用量依存的な ALT、AST 値の増加が見られた。従って、snPt は肝障害を引き起こすことが分かった。高容量の 20 mg/kg 投与群では、投与の直後に 5 匹中 3 匹のマウスにおいて死亡が確認されたため、snPt には致死的な毒性を有することも明らかとなった。今回、20 mg/kg 投与群では生存していた 2 匹のマウスから血液サンプルを回収し測定を行った。

続いて、腎臓への影響を検討した。図 10C に示すように、snPt を投与 24 時間後、control 群と比べ snPt 用量依存的な BUN 値の増加が見られた。従って、snPt は腎障害を引き起こすことが分かった。

snPt 投与後の致死性の毒性に関しては今後の検討が必要である。

## 7. サブナノ銀単回投与による肝臓・腎臓に対する検討

サブナノ銀 (snAg) を尾静脈内注射した際の肝臓および腎臓への影響を検討した。snAg を 2 mg/kg 投与直後、マウスにおいて痙攣が観察され、その後すぐに死亡した。1 mg/kg の投与群では、投与直後にマウスに痙攣が観察されたが、死亡は確認されなかった。以上、snAg は高容量において致死的な毒性を有することが明らかと

なった。今回の肝臓・腎臓への影響に関する検討では、投与量 1 mg/kg 以下での検討を行った。その結果、図 11A, B に示すように snAg を投与 24 時間後、ALT、AST 値はいずれも、control 群と同程度の値を示した。従って、snAg は肝障害を引き起こさないことが示唆された。また、BUN 値を測定したところ、ALT、AST と同様に snAg 投与による影響が見られなかった (図 11C)。従って、snAg は腎障害も引き起こさないことが示唆された。snAg 投与直後の致死性の毒性に関しては今後の検討が必要である。

## 8. サブナノ白金単回投与による炎症性サイトカイン産生への影響

snPt を投与 24 時間後に、血中 TNF- $\alpha$ および IL-6 を測定したところ、図 12A, B に示すように、いずれの炎症性サイトカインにおいても、高用量の投与群で血中濃度の増加が確認された。従って、snPt は炎症誘導作用を有することが示された。snPt 低容量時では炎症性サイトカインの値が上昇していないことから、低用量投与時に確認される肝障害および腎障害は炎症性サイトカイン以外の要因が関与するのではないかと考えられる。

## 9. サブナノ銀単回投与による炎症性サイトカイン産生への影響

snAg を投与 24 時間後に、血中 TNF- $\alpha$ および IL-6 を測定したところ、IL-6 に関しては、snAg 投与による血中濃度の増加は確認されなかった (図 13B)。従って、snAg には炎症誘発作用がないことが示唆された。一方、TNF- $\alpha$ に関しては、snAg 投与による血中濃度の減少傾向が観察された (図 13A)。snAg は抗菌作用を有することが報告されているため、炎症誘発物に作用することで、炎症性サイトカインの産生を抑制したのではないかと推察された。

## E. 結論

1. 薬物とナノシリカの併用により、一部の薬物において肝障害の増悪化が観察されるものの、影響が現れない薬物もあることから、各薬物においてナノシリカと併用した際の安全性評価が必要

であることが示めされた。

2. ナノシリカ投与により引き起こされた高脂肪食摂取マウスでの体重減少は、ナノシリカによる脂肪組織の溶解が原因の 1 つであることが明らかとなった。

3. サブナノ白金は、高容量において致死性の毒性、用量依存的な急性肝障害及び急性腎障害性、炎症誘発作用が確認された。

4. サブナノ銀は、急性肝障害または急性腎障害性および炎症誘導作用は確認されなかったものの、高容量において致死性の毒性が確認された。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ① 論文発表

1. Li X., Kondoh M., Watari A., Hasezaki T., Isoda K., Tsutsumi Y., Yagi K.: Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice. *Die Pharmazie*, in press.
2. Isoda K., Hasezaki T., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K. Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury. *Die Pharmazie*, in press.
3. Isoda K., Hasezaki T., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K. Hepatotoxicity of silica nanoparticles with a diameter of 100 nm., submitted.
4. 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 2 件】

1. 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
2. 李相儒、渡利彰浩、近藤昌夫、堤康央、八木清仁：脂肪肝マウスに対するナノシリカの影響.,日本薬学会第 131 年会,静岡,2011 年 3 月 (予定)

#### 【国際学会発表：合計 1 件】

1. Li X. Watari A., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K.: The safety assessment of nano-silica particles in vivo. 組織的な大学院教育改革推進プログラム 第 2 回国際シンポジウム「食と環境の安全・安心に向けたリスクマネージメント」、2010 年 10 月 (大阪)

#### 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

該当なし

#### 研究協力者

近藤昌夫、渡利彰浩、李相儒、磯田勝広、吉田孟史、高橋梓、松久幸司、松下恭平、山本芙美、鈴木英彦、早田祐也

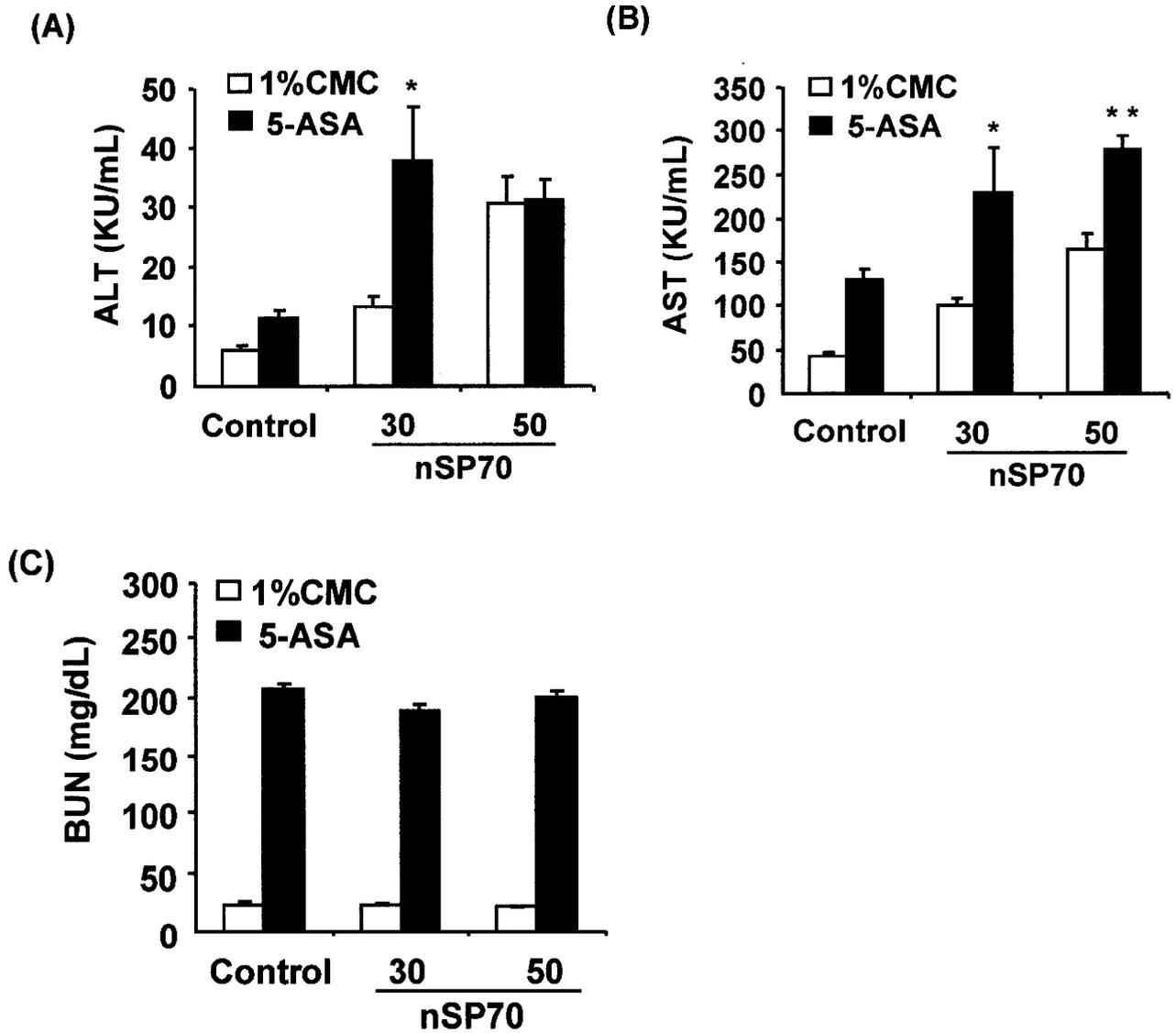


図1 5-アミノサリチル酸 (5-ASA) と nSP70 を併用投与したマウスにおける急性肝障害。  
 5-アミノサリチル酸は腹腔内に、nSP70 は尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) ALT、(B) AST、(C) BUN を測定した。\* :  $p < 0.05$  vs. 1% CMC; \*\* :  $p < 0.01$  vs. 1% CMC

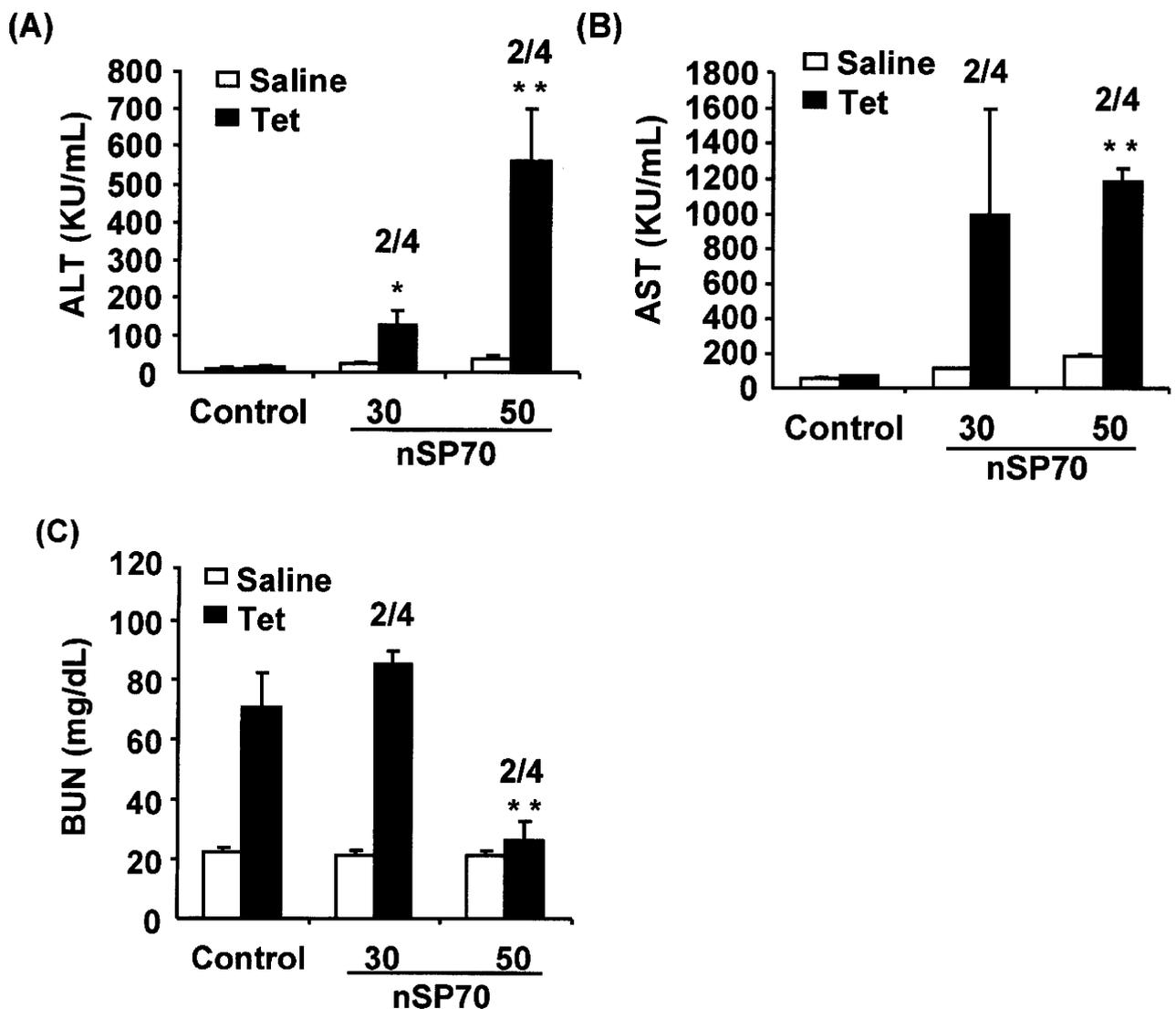


図2 テトラサイクリン (Tet) と nSP70 を併用投与したマウスにおける急性肝障害。

テトラサイクリンは腹腔内に、nSP70 は尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) ALT、(B) AST、(C) BUN を測定した。A、B : \* :  $p < 0.05$  vs. Saline; \*\* :  $p < 0.01$  vs. Saline; C : \*\* :  $p < 0.01$  vs. Control

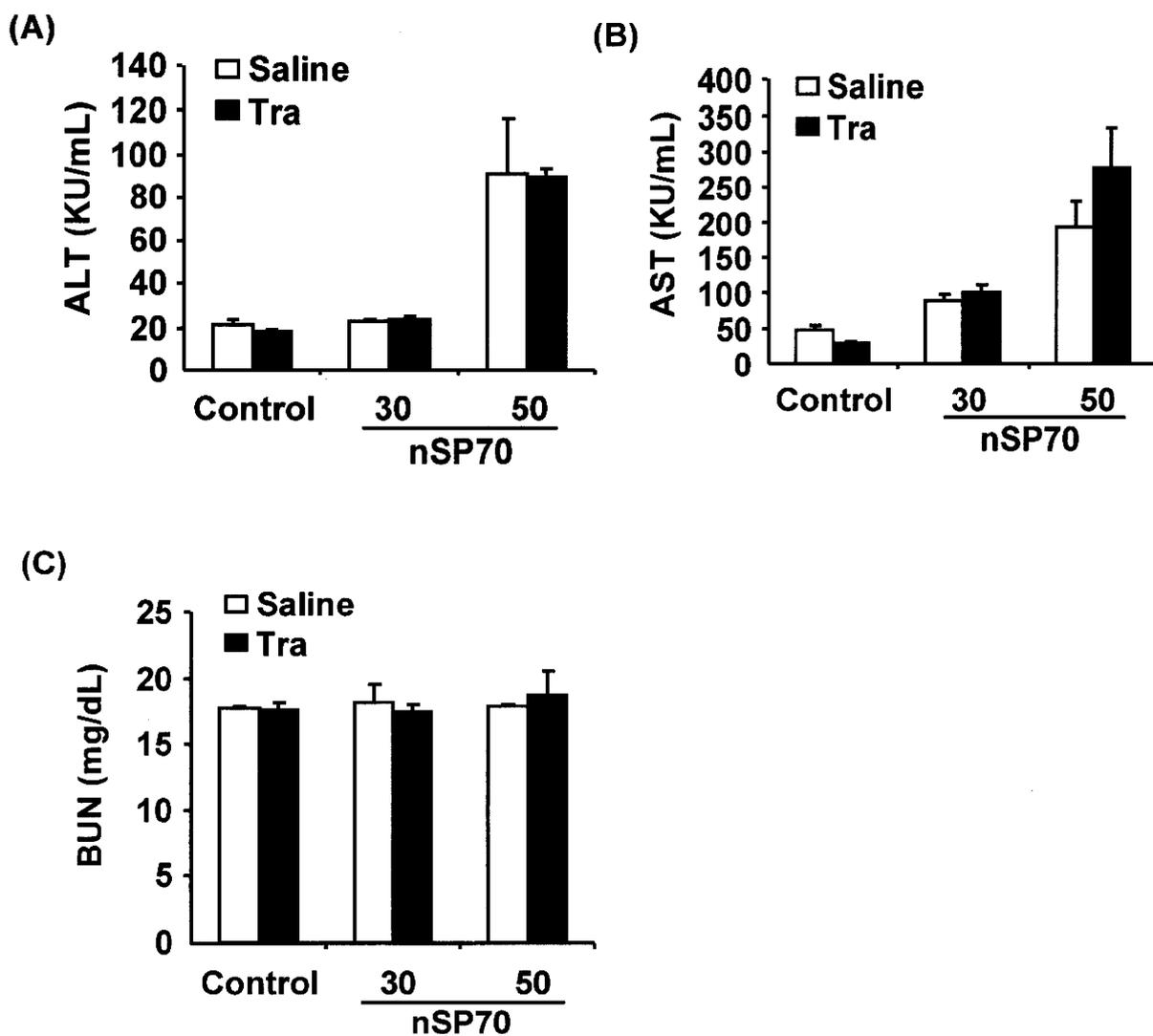


図3 トラゾドン (Tra) と nSP70 を併用投与したマウスにおける急性肝障害。  
 トラゾドンは腹腔内に、nSP70 は尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) ALT、  
 (B) AST、(C) BUN を測定した。

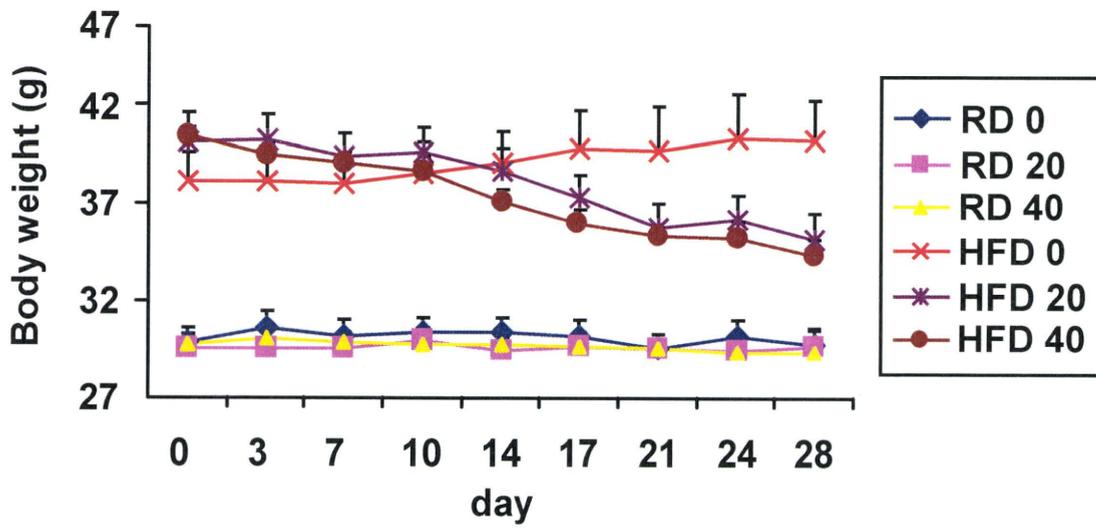


図4 ナノシリカを頻回投与した脂肪肝モデルマウスの体重変動。

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。

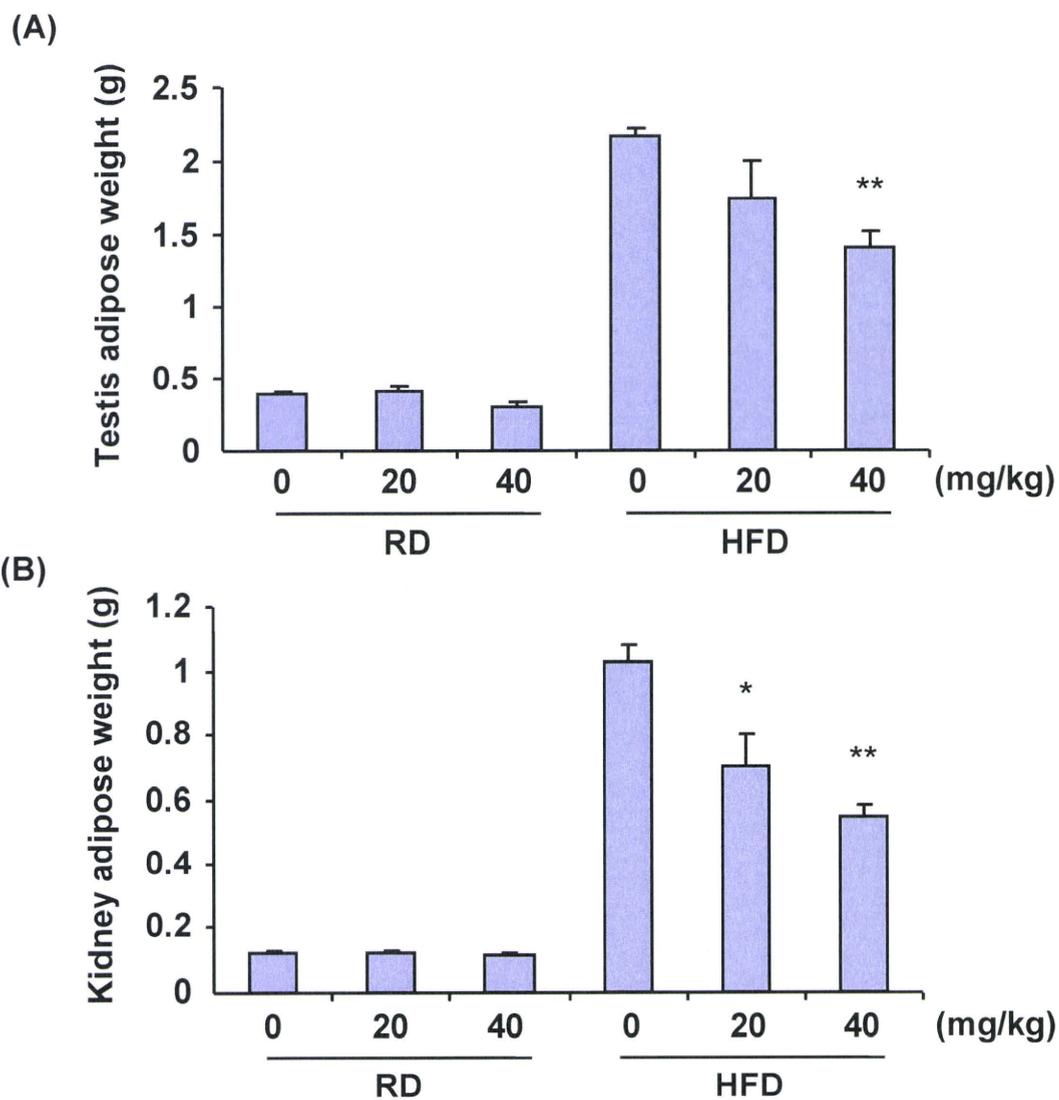


図5 ナノシリカの頻回投与による脂肪組織の重量変動。

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。最終投与3日後、睾丸周囲脂肪重量 (A) 及び腎臓周囲脂肪重量 (B) を測定した。\*:  $p < 0.05$  vs. HFD; \*\*:  $p < 0.01$  vs. HFD

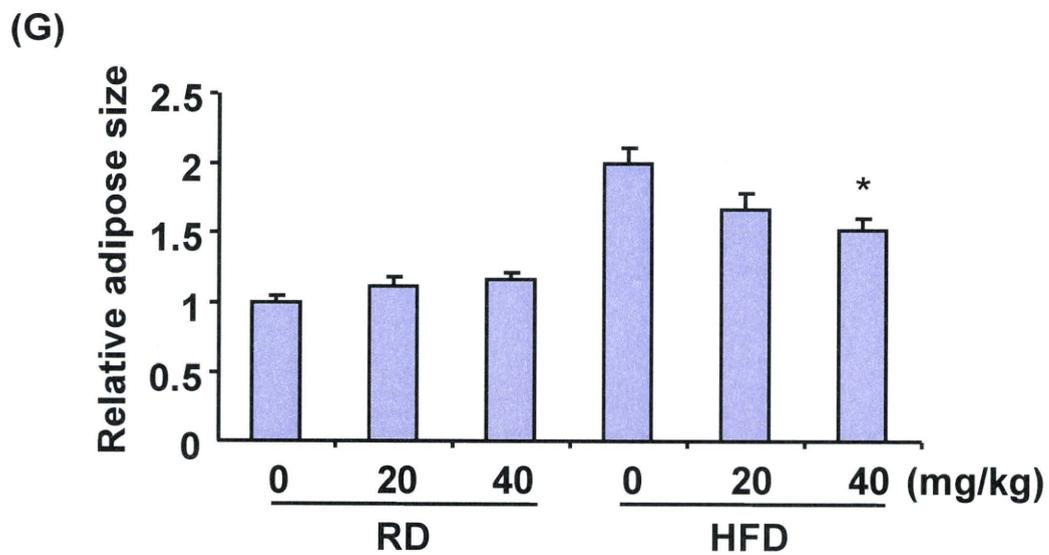
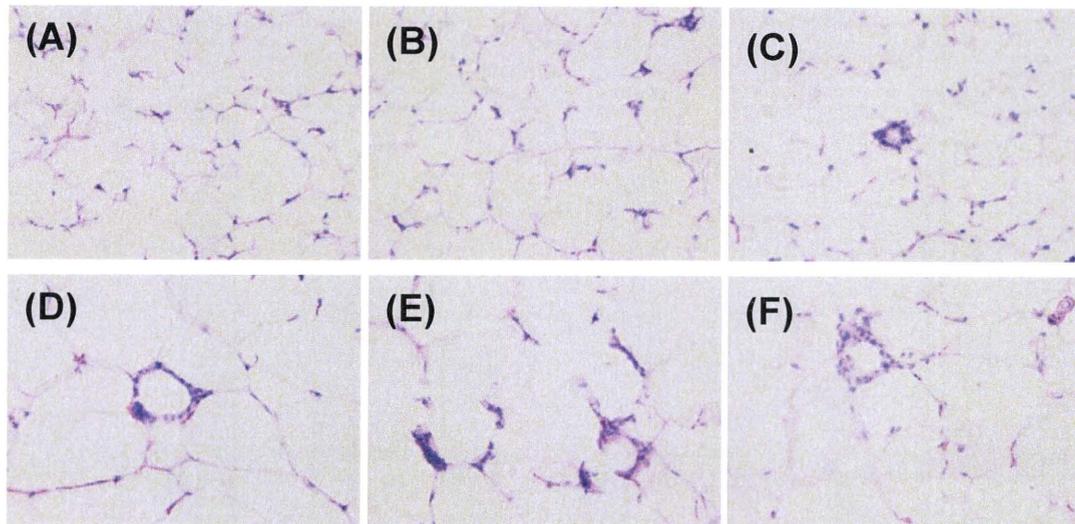


図6 ナノシリカの頻回投与による脂肪細胞サイズの変動。

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。最終投与3日後、睪丸周囲脂肪組織のHE染色 (A~F) を行い、脂肪細胞のサイズ (G) を計測した。\*:  $p < 0.05$  vs. HFD 0

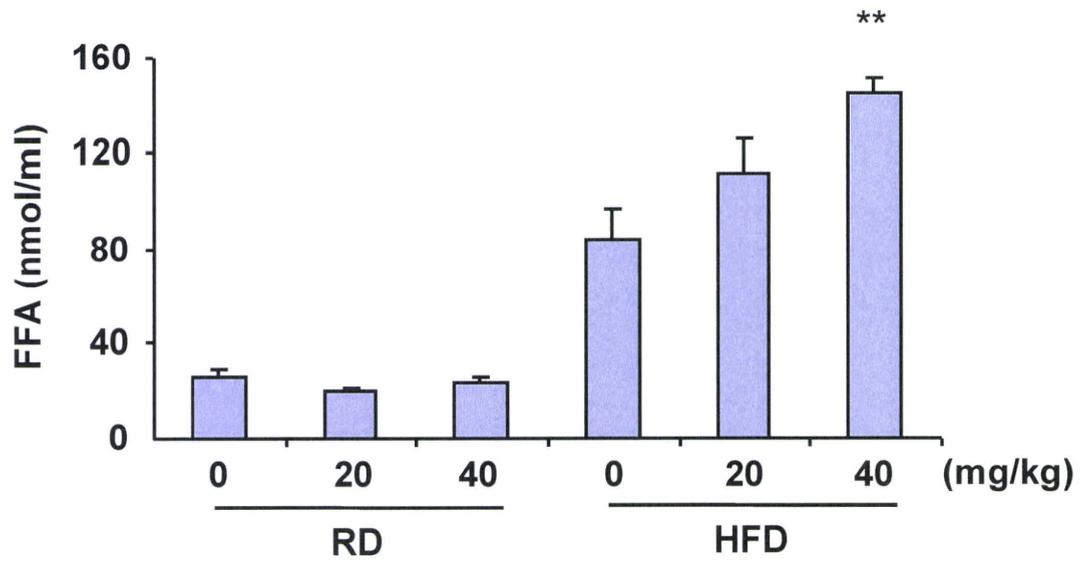
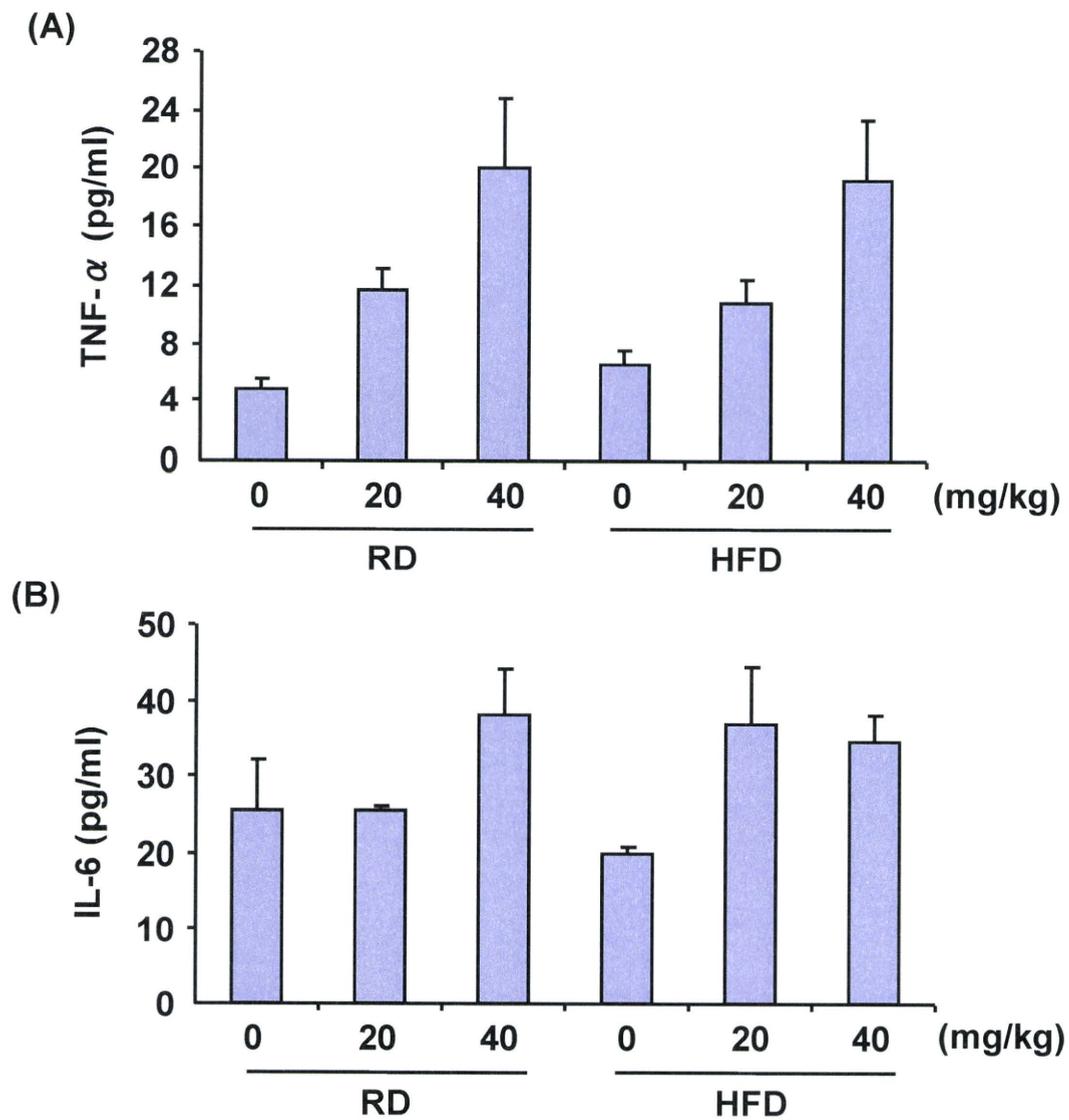


図7 ナノシリカの頻回投与による血中遊離脂肪酸（FFA）の変動。

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。最終投与3日後、心採血により血清を取り、FFAを測定した。\*\*： $p < 0.01$  vs. HFD 0



**図 8 ナノシリカの頻回投与による血中炎症性サイトカインの変動。**  
 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。最終投与 3 日後、心採血により血清を取り、TNF- $\alpha$  (A) 及び IL-6 (B) を測定した。

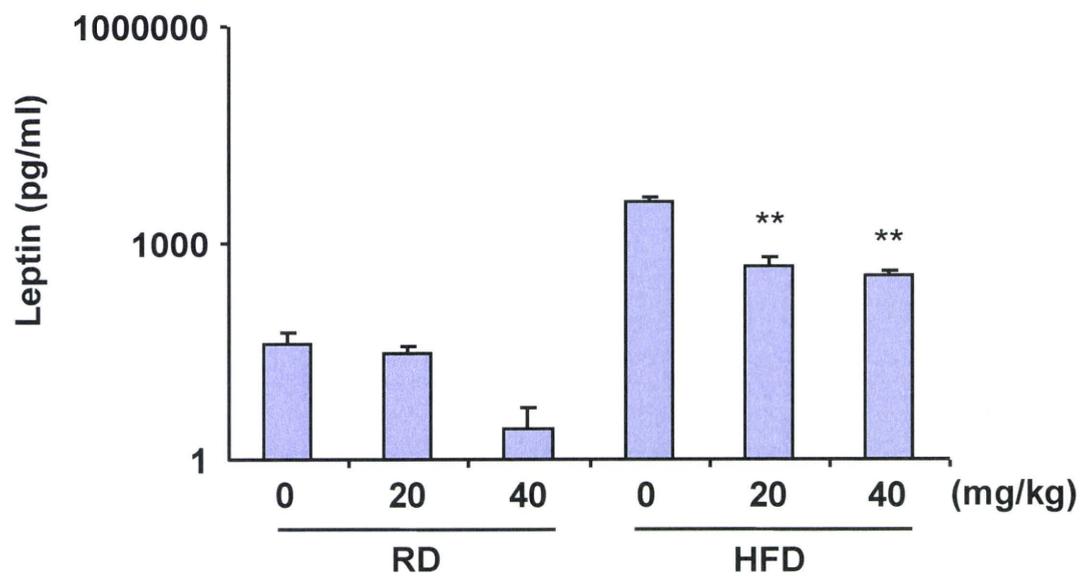


図9 ナノシリカの頻回投与による血中レプチンの変動。

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。最終投与3日後、心採血により血清を取り、レプチンを測定した。\*\* :  $p < 0.01$  vs. HFD 0

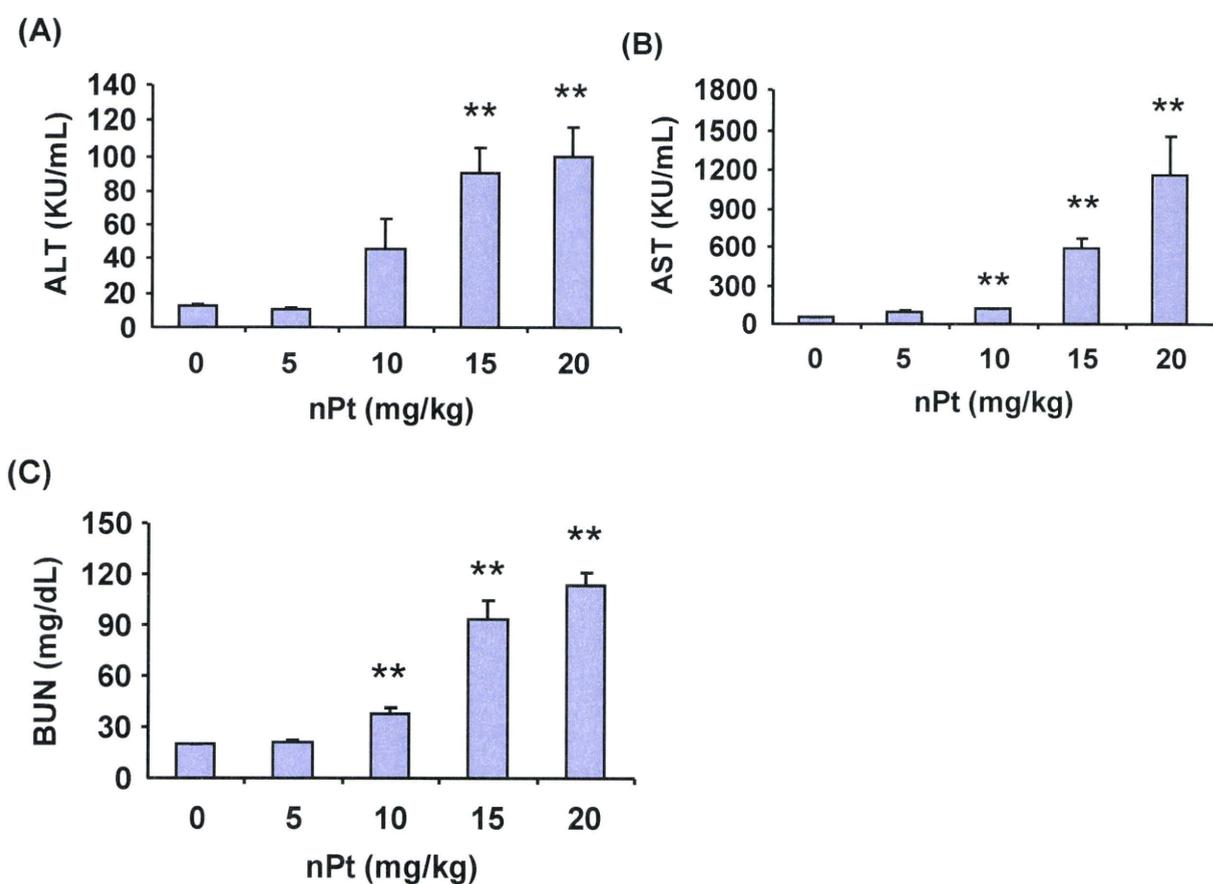


図 10 サブナノ白金を単回投与したマウスにおける急性肝障害および急性腎障害。

サブナノ白金を 0、5、10、15、20 mg/kg の用量で尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) ALT、(B) AST、(C) BUN を測定した。\*\* :  $p < 0.01$  vs. 0