

	実銀		実白金	
溶媒	水	PBS	水	PBS
平均2次粒子径 (nm)	136.3 ± 4.5	73.9 ± 0.7	99.8 ± 1.9	498 ± 59.9

図 38. 実銀・実白金の物性情報（2 次粒子径）。

実銀サンプル・実白金サンプルをそれぞれ超純水、PBS に懸濁し、動的光散乱法を用いて 2 次粒子径を測定した。（n=3）

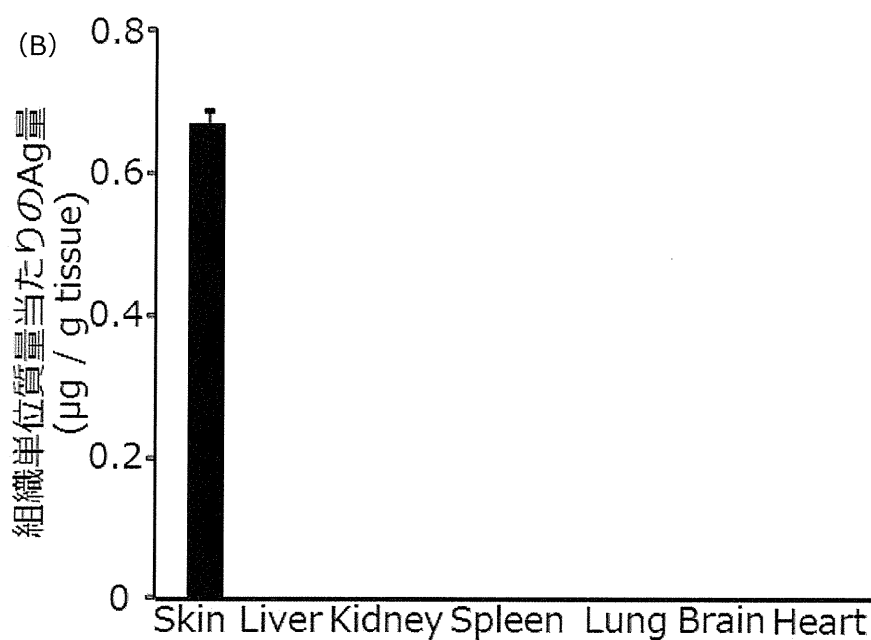
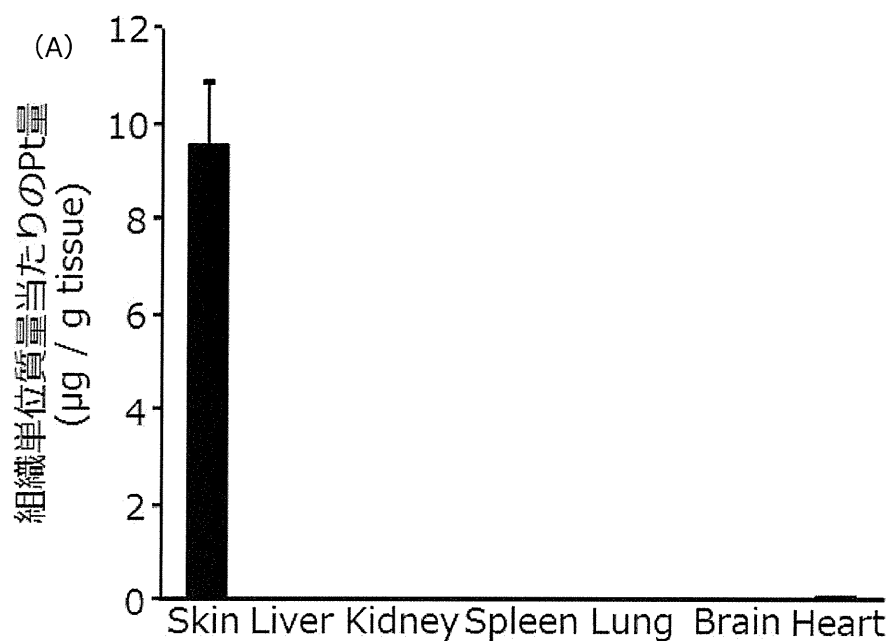


図 39. 実銀・実白金 7 日間経皮曝露後の体内移行性 (ICP-MS) BALB/ c マウス (6 週齢、雌性) の耳介に、実銀サンプルを 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 、実白金サンプルを 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で 7 日間連続塗布した。最終投与から 24 時間後に、各粒子を経皮塗布したマウスの耳介、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、ICP 質量分析により各組織の白金量 (A)、銀量 (B) を定量した。 (n=5)

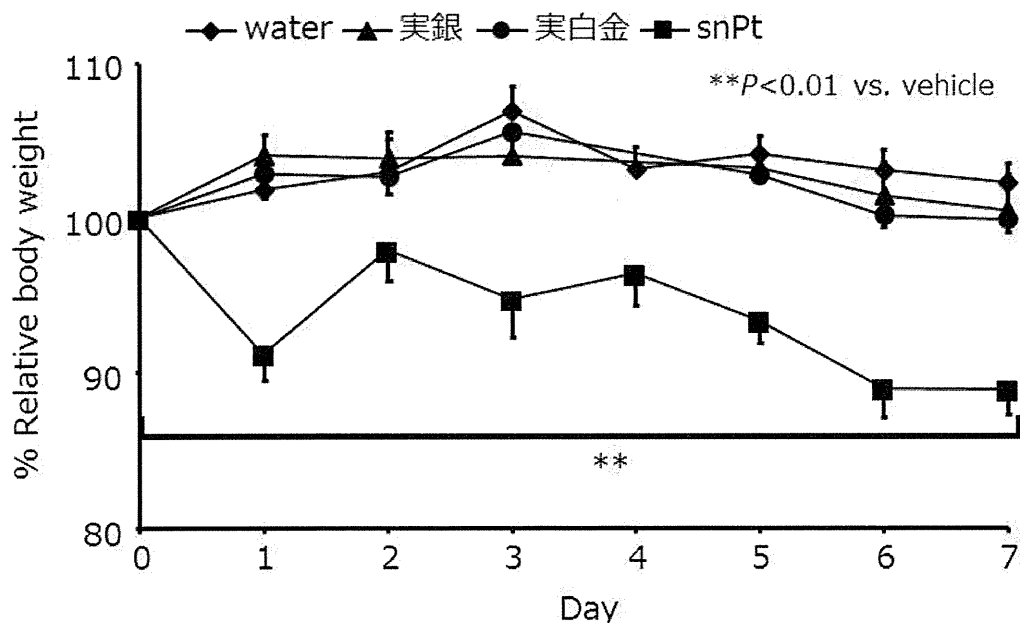


図 40. 実銀・実白金 7 日間経鼻曝露時の体重変化. BALB/c マウス (6 週齢、雌性) の耳介に、実銀サンプルを 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 、実白金サンプルを 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で 7 日間連続塗布し、経日的に体重を測定した。(n=5, $**p < 0.01$ versus value for vehicle-treated group by Dunnett's test)

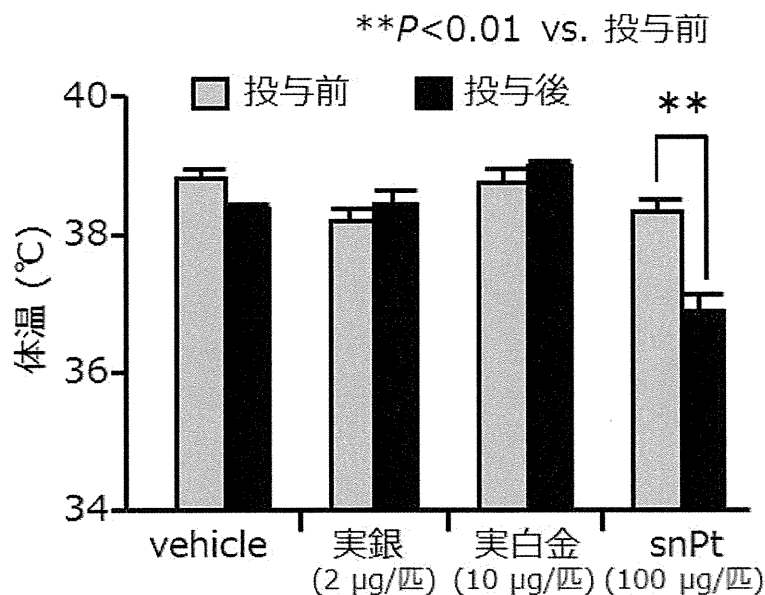


図 41. 実銀・実白金 7 日間経鼻曝露時の体温変化 (投与 6 日目). BALB/c マウス (6 週齢、雌性) の耳介に、実銀サンプルを 2 $\mu\text{g}/\text{body}$ 、実白金サンプルを 10 $\mu\text{g}/\text{body}$ で 7 日間連続塗布した。投与 6 日目に、投与前と投与後で体温を測定した。Data are presented as means $\pm$ S.E. ($**p < 0.01$ versus 投与前 by Dunnett's test) (n=5)

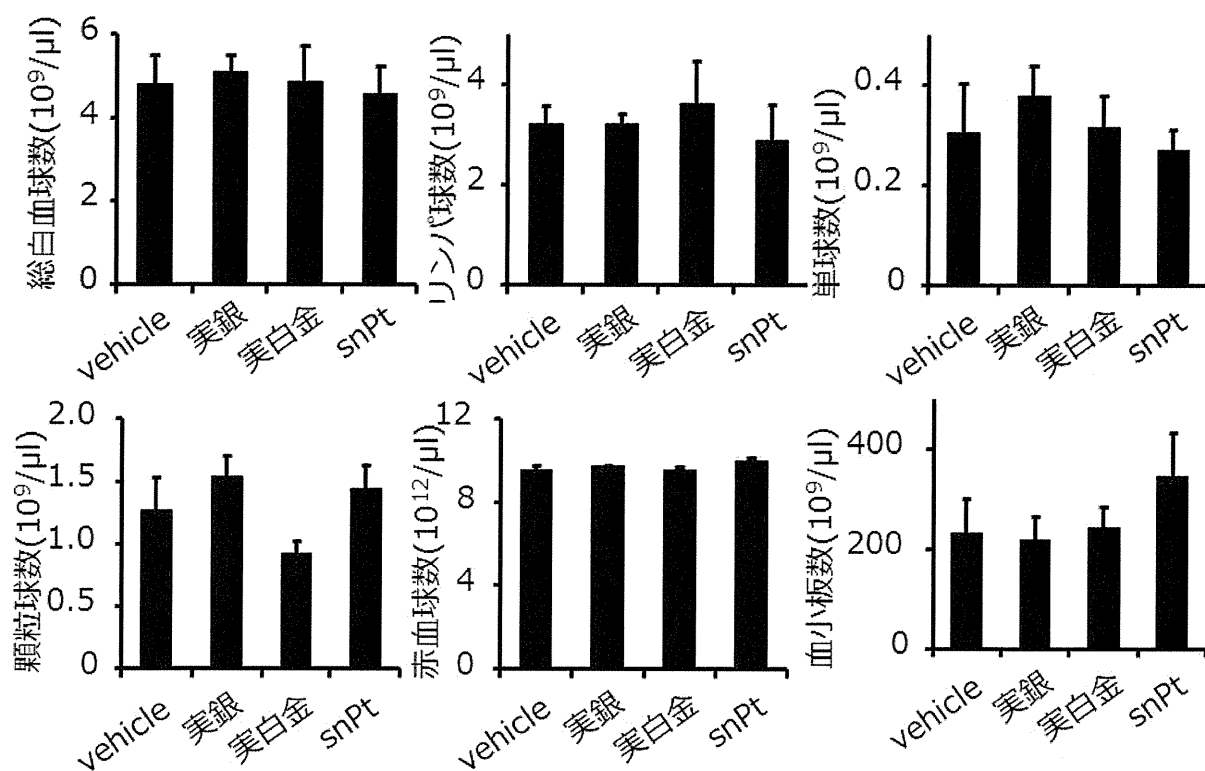


図 42. 実銀・実白金 7 日間経鼻曝露後の血球検査. BALB/c マウス (6 週齢、雌性) の耳介に、実銀サンプルを 2 $\mu\text{g}/\text{body}$ 、実白金サンプルを 10 $\mu\text{g}/\text{body}$ で 7 日間連続塗布した。最終投与から 24 時間後に血液を回収し、血液検査を行った。(n=5)

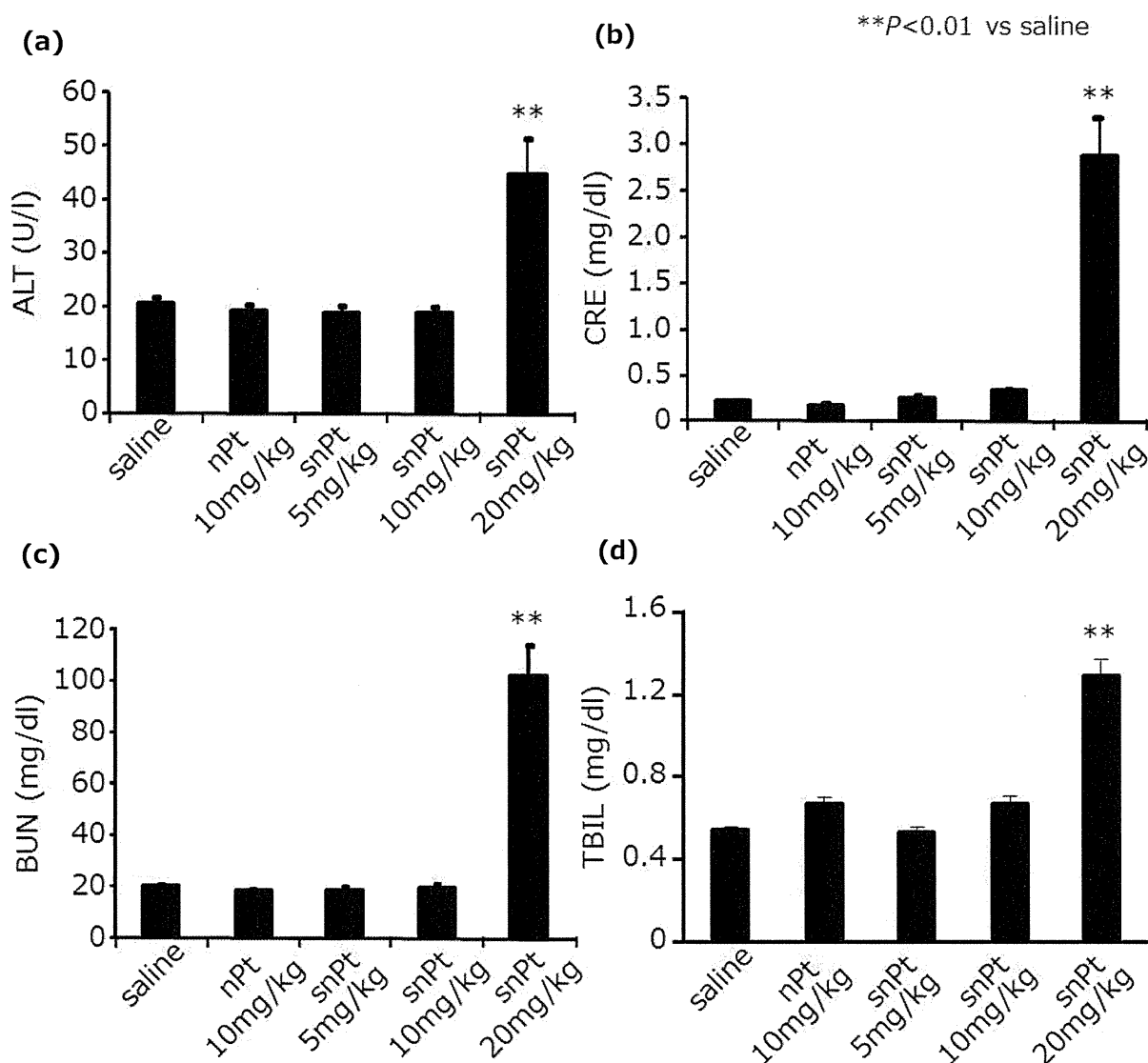


図 43. nPt, snPt を曝露した妊娠マウスの血液生化学検査.妊娠 16 日目の BALB/c マウスに nPt(10 mg/kg)、snPt (5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg) を尾静脈内より 2 日間連続で投与した。最終投与 24 時間後に血清を回収し、血液生化学検査を実施した (ALT (a) 、CRE (b) 、BUN (c) 、TBIL (d)) 。 Data are presented as mean $\pm$ SE (n=5-24). **Represents significant difference from the saline by Scheffe ($p < 0.01$).

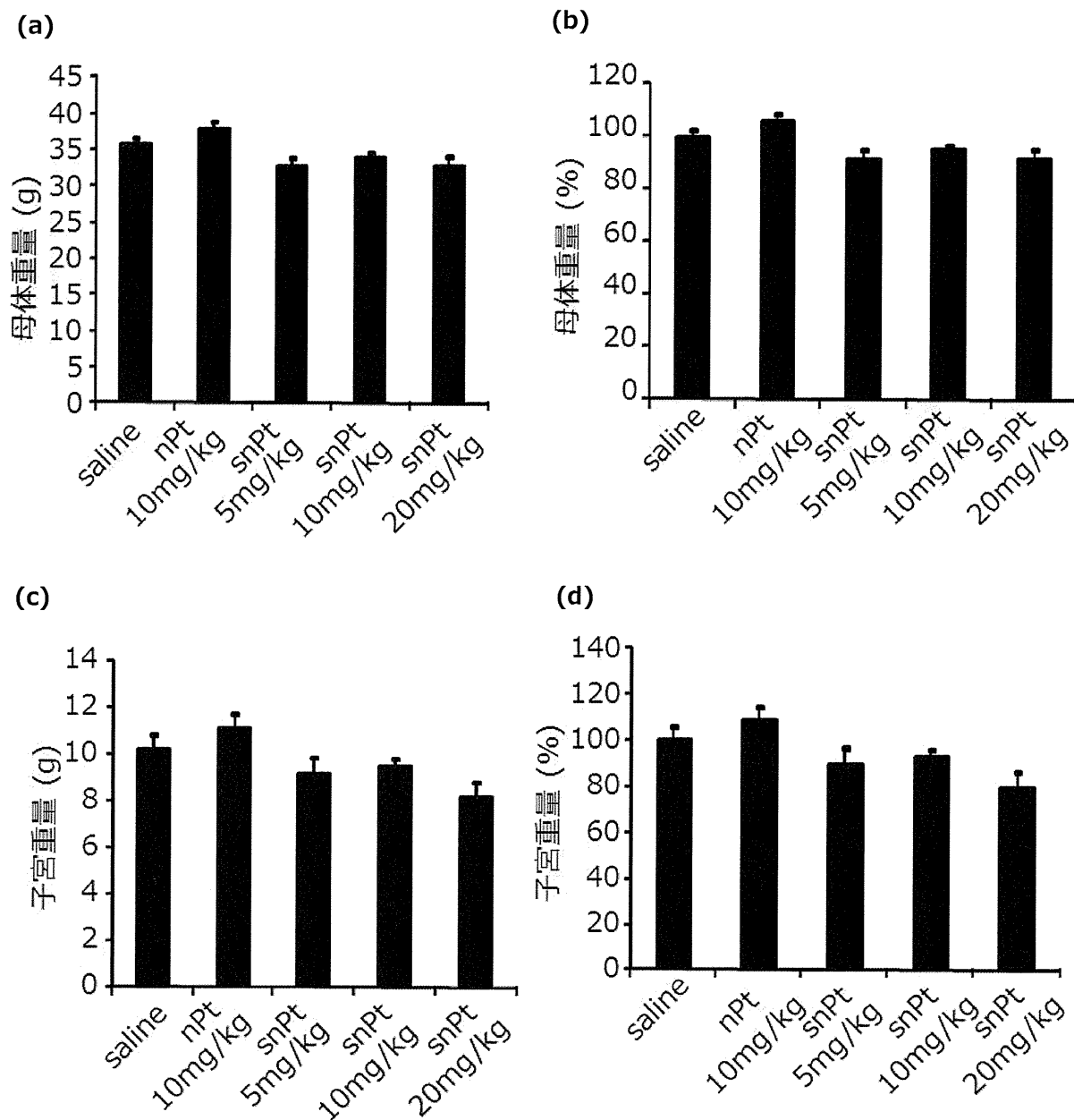


図 44. nPt、snPt を曝露した妊娠マウスの母体重量・子宮重量。 妊娠 16 日目の BALB/c マウスに nPt (10 mg/kg)、snPt (5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg) を尾静脈内より 2 日間連続で投与した。妊娠 18 日目の母体重量を測定した (a、b) 。最終投与から 24 時間後に子宮を回収し、重量を測定した (c、d) 。Data are presented as mean $\pm$ SE (n=10-26).

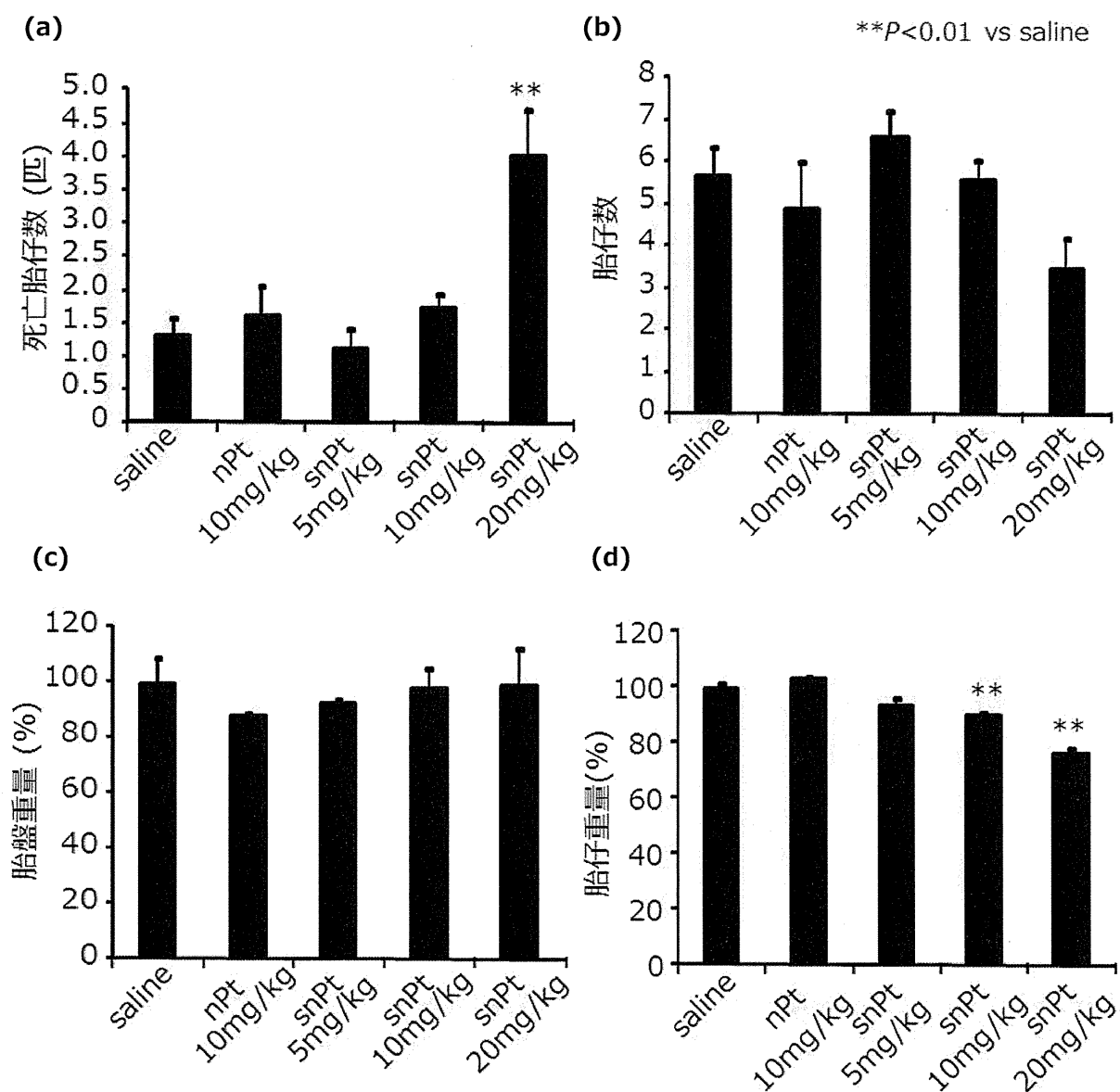


図 45. nPt、snPt を曝露した妊娠マウスの胎仔重量・胎仔数・死亡胎仔数・胎盤重量. 妊娠 16 日目の BALB/c マウスに nPt (10 mg/kg)、snPt (5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg) を尾静脈内より 2 日間連続で投与した。最終投与 24 時間後に胎仔・胎盤を回収し、死亡胎仔数 (a) 、胎仔数 (b) 、胎盤重量 (c) 、胎仔重量 (d) を測定した。Data are presented as mean ± SE (n=41-183). **Represents significant difference from the saline by Scheffe ($p < 0.01$).

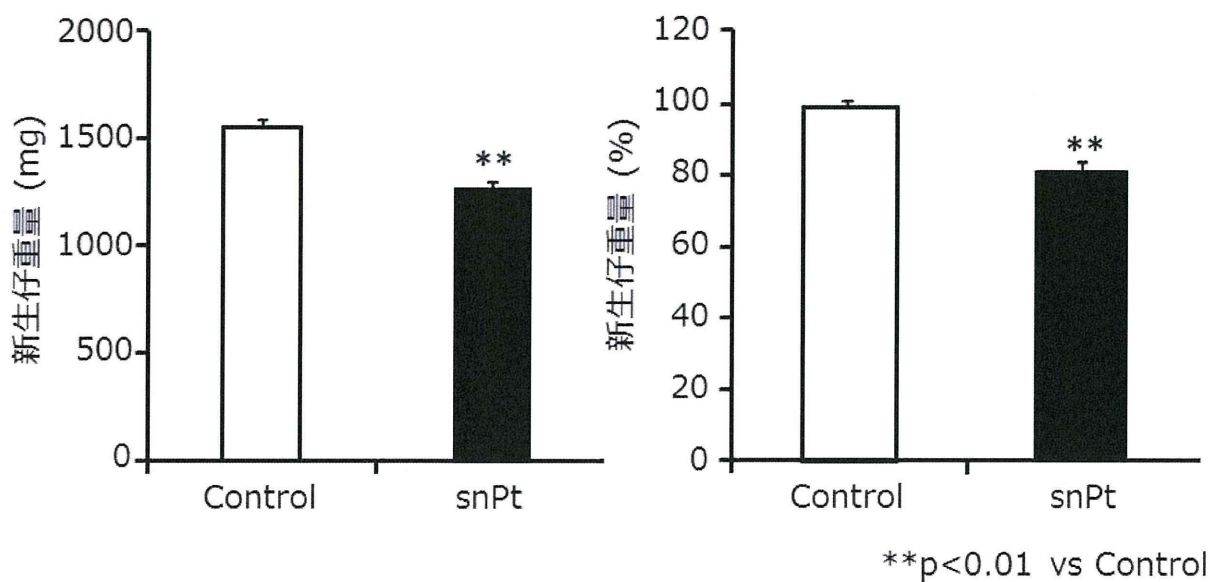


図 46. nPt、snPt を胎仔期曝露したマウスの新生仔重量。 妊娠 16 日目の BALB/c マウスに snPt を 10mg/kg で尾静脈内より 2 日間連続で投与した。出産日に新生仔重量を測定した (a、b) 。 Data are presented as mean $\pm$ SE (n=10-26). **Represents significant difference from control group by student's t-test ($p < 0.01$).

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」
分担研究報告書

**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**

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既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。しかし近年、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報告され、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。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。また、ナノマテリアルとしては、ナノシリカ、及びナノ白金、ナノ銀に対して以下に記す検討を行った。

これまでに当グループが報告してきた、高脂肪食摂取マウスに対するナノシリカの影響について正確な知見を得るために intra-lab におけるバリデーションを実施した。その結果、これまでと同様に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た。また、脂肪溶解と思われる脂肪重量の低下も認められることが再確認された。

サブナノ白金については、高容量において致死性の毒性、用量依存的な急性肝、腎障害性、及び炎症誘発作用がこれまでに当グループにより確認されている。今回は、サブナノ白金の単回投与における各種臓器への障害を組織学的染色にて評価した。その結果、サブナノ白金の肝臓と腎臓において明確な障害が認められた。また、単回投与における肝臓、腎臓の障害マーカー、及びサイトカインの経時的変化についても検討したところ、肝障害、腎障害を示す変動が認められた。

続いて、サブナノサイズ (≤ 1 nm)、及びナノサイズ (15 nm) の白金をマウスに投与することでサブナノサイズとナノサイズにおける影響の差異についても検討を行った。その結果、サブナノ白金で認められた障害性が、同濃度範囲のナノ白金では認められなかった。

また、サブナノ白金を頻回投与した際の生体への影響を検討した。尾静脈からの頻回投与が困難であったため、週 2 回、4 週間、腹腔内に頻回投与を行った。ナノシリカでは同様の投与で肝線維化が観察されたが、サブナノ白金の頻回投与では肝線維化は惹起されなかった。

一方、サブナノ銀は、2mg/kg 以上で致死的な毒性が見られたため、1 mg/kg の用量で静脈内に単回投与を行った結果、明確な急性肝、腎障害性、炎症誘導作用は確認されなかった。また、サブナノ銀の単回投与における各種臓器への障害を組織学的染色にて評価したところ、明確な臓器障害は認められなかった。

以上、ナノシリカは健康状態によって体重減少など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。サブナノ白金は、単回投与において生化学的、組織学的に肝臓、及び腎臓において顕著な障害性が認められた。サブナノ銀は、1 mg/kg の単回投与において生化学的、組織学的な影響は認められていないが、一

定量を超えると明確に致死性を表すため、今後詳細な検討が必要であると考えられる。以上の結果は、今後さらに開発が進むナノマテリアルの安全性の確認、毒性回避法の開発、及び病態との関連性について有用な知見を提供するものと考えられる。

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、特徴的な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、 dendrimer、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・検討を行った。今年度は、粒子径 70nm のナノシリカを用い、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の intra lab における再検討を行った。また、サブナノ白金およびサブナノ銀の肝臓に対する毒性についての新たな検討を行った。

B. 研究方法

ナノマテリアル

本研究で使用したナノシリカ（商品名；sicastar[®]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。

1. nSP70 の投与についての検討 (intra-lab)

8 週齢の雄性の C57B/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製した。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、4mL/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℃、6000 rpm、10 min で遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして用いて ALT 及び AST 値の測定を行った。また、睪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。

2. snPt 単回投与による各種臓器（心臓、肺、脾臓、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: 1006281) を 15 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 時間後に心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓を採取し、4%パラフォルムアルデヒド (PFA) にて固定した。固定後、HE 染色を行うことにより、各種臓器における障害性を評価した。

3. snPt 投与時における肝障害マーカーの経時的変化についての検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (Lot: 1006281) を 15 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 3、6、12、24、48 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。その後、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。

4. snPt 投与時における腎障害マーカーの経時的変化についての検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (Lot: 1006281) を 15 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 3、6、12、24、48 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 の腎臓への影響を評価するため、腎傷害マーカーとして血清中の BUN、及び Creatinine 値の測定を行った。

5. snPt 投与時におけるサイトカイン誘導の経時的変化についての検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (Lot: 1006281) を 15 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 3、6、12、24、48 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 の免疫系に与える影響を評価するため、サイトカインとして TNF- α 、及び IL-6 値の測定を行った。

6. snPt と nPt 投与時における肝傷害に与える影響についての検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (Lot: 1006281、 ≤ 1 nm) 及び、nPt (Lot: 11062901、15 nm) を 5、10、15、20 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。Pt 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。その後、Pt 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。

7. snPt と nPt 投与時における腎傷害に与える影響についての検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (Lot: 1006281、 ≤ 1 nm) 及び、nPt (Lot: 11062901、15 nm) を 5、10、15、20 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。Pt 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。Pt の腎臓への影響を評価するため、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. snPt の腹腔内投与時における肝傷害について の検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (Lot: 1006281) を 5、10、15、20 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に単回投与した。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 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。

9. snPt の腹腔内投与時における腎傷害について の検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (Lot: 1006281) を 5、10、15、20 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。Pt 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 の腎臓への影響を評価するため、腎傷害のマーカーとして血清中の BUN 値の測定を行った。

10. snPt の腹腔内投与時におけるサイトカイン 誘導についての検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (Lot: 1006281、 ≤ 1 nm) を 5、10、15、20 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。Pt 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 の免疫系への影響を評価するため、TNF- α 、及び IL-6 値の測定を行った。

11. snPt の頻回投与時における肝傷害について

の検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (Lot: 1006281) を 5、10、15、20 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に週 2 回、4 週間 (計 8 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。最終投与 3 日後に肝臓を摘出し、肝線維化の指標として肝臓中のヒドロキシプロリン (HYP) 量を測定することで肝線維化を評価した。

12. snAg 単回投与による各種臓器 (心臓、肺、 脾臓、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 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 時間後に心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓を採取し、4%パラフォルムアルデヒド (PFA) にて固定した。固定後、HE 染色を行うことにより、各種臓器における障害性を評価した。

C. 研究結果 (結果は D 項にまとめて記載)

D. 考 察

1. nSP70 の投与についての検討 (intra-lab)

これまでの報告と同様に、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 (**Fig. 1A**)。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であるため、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ところ、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認められた (**Fig. 1B, C, D**)。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前年度の検討と同様に明らかとなった。

以上、これまでと同様にナノシリカの投与により高脂肪食摂取マウスにおける脂質の減少が引き起こされ、体重低下が生じることが示された。従って、intra-lab におけるバリデーションがとれたものと考えられる。

2. snPt 単回投与による各種臓器 (心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓) に対する影響

これまでにサブナノ白金 (snPt) を尾静脈内注射した際の 24 時間後の肝臓への影響を検討した結果、control 群と比べ snPt 用量依存的な ALT、AST 値の増加が見られた。今回、その際に顕著な測定値の上昇が認められた高容量、15 mg/kg を投与し 24 時間後の各種臓器 (心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓) を摘出し、HE 染色をおこなうことで組織学的に snPt による障害性を評価した。

その結果、心臓、肺、脾臓において障害性は確認されなかった。一方、肝臓、及び腎臓においては種々の障害を示す像が確認された。肝臓においては、肝細胞の細胞質に空胞が生じる空胞変性が認められた。腎臓においては、尿細管中で種々の物質の異常濃縮により生じる尿細管円柱の集積が認められた。また、尿細管上皮細胞の壊死変性が認められた (Fig. 2)。

この結果は、これまでに得られた肝臓障害性マーカーである ALT・AST 値の上昇、及び腎臓障害性マーカーである BUN、Creatinine 値の上昇と相関する結果となる。従って、snPt は肝臓、及び腎臓に生化学的・組織学的に障害を及ぼすことが明らかとなった。

3. snPt 投与時における肝障害マーカーの経時的变化についての検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt 15 mg/kg b.w.を投与後 3、6、12、24、48 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、血清中の ALT・AST 値の測定を行った。その結果、ALT は投与後 12、24 時間後に、AST は 6、12、24、48 時間後に control と比較して有意に高い値を

示し、両値とも 12、24 時間後をピークに減少傾向を示した (Fig. 3)。

このことから、ALT・AST 値のピークは 12~24 時間にあるものと考えられる。

4. snPt 投与時における腎障害マーカーの経時的变化についての検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt 15 mg/kg b.w.を投与後 3、6、12、24、48 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、血清中の BUN、及び Creatinine 値の測定を行った。その結果、BUN は投与後 12、48 時間後に control と比較して有意に高い値を示し、Creatinine は投与後 12、48 時間後に control と比較して有意に高い値を示した。両値共に経時的に上昇傾向を示した (Fig. 4)。

従って、BUN、Creatinine 値のピークは 48 時間後、及びそれ以降であることが考えられる。

5. snPt 投与時におけるサイトカイン誘導の経時的变化についての検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt 15 mg/kg b.w.を投与後 3、6、12、24、48 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、血清中の TNF- α 、及び IL-6 値の測定を行った。その結果、TNF- α は投与後 12、24、48 時間後に control と比較して有意に高い値を示し、IL-6 は投与後 3、6、12、24 時間後に control と比較して有意に高い値を示した。TNF- α は 12 時間後をピークに経時的に減少傾向を示し、IL-6 は 3 時間後をピークに経時的に減少傾向を示した (Fig. 5)。

従って、サイトカインの誘導は TNF- α と IL-6 双方の誘導されるタイミングが異なるため、それぞれのサイトカインは生体において別々の作用を誘発する可能性が考えられる。

6. snPt と nPt 投与時における肝傷害に与える影響についての検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (≤ 1 nm) 及び、nPt (15 nm) を 5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。24 時間後に心採血により血液サンプルを回収し、肝傷害

の指標として血清中の ALT・AST 値の測定を行った。その結果、15、20 mg/kg において snPt と比較して nPt の ALT・AST 値は有意に低い値を示した (Fig. 6)。

従って、当検討における濃度範囲において、nPt は肝臓に明確な障害性を示さないことが明らかとなった。また、Pt は、サブナノサイズとナノサイズにおいて異なる障害性を示すことが明らかとなった。

7. snPt と nPt 投与時における腎傷害に与える影響についての検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt (≤ 1 nm) 及び、nPt (15 nm) を 5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。24 時間後に心採血により血液サンプルを回収し、腎傷害の指標として血清中の BUN 値の測定を行った。その結果、15、20 mg/kg において snPt と比較して nPt の BUN 値は有意に低い値を示した (Fig. 7)。

従って、当検討における濃度範囲において、nPt は腎臓に明確な障害性を示さないことが明らかとなった。また、Pt は、サブナノサイズとナノサイズにおいて異なる障害性を示すことが明らかとなった。

8. snPt の腹腔内投与時における肝傷害についての検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt 5、10、15、20 mg/kg b.w.を腹腔内に投与後 24 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、血清中の ALT・AST 値の測定を行った。その結果、尾静脈内投与時と同様に 15、20 mg/kg において ALT・AST 値は control と比較して有意に高い値を示した (Fig. 8)。

従って、腹腔内投与においても尾静脈内投与と同様の肝臓障害性を示すことが示された。

9. snPt の腹腔内投与時における腎傷害についての検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt 5、10、15、20 mg/kg b.w.を腹腔内に投与後 24

時間後に心採血により血液サンプルを採取し、血清中の BUN 値の測定を行った。その結果、尾静脈内投与時と同様に 15、20 mg/kg において BUN 値は control と比較して有意に高い値を示した (Fig. 9)。

従って、腹腔内投与においても尾静脈内投与と同様の腎臓障害性を示すことが示された。

10. snPt の腹腔内投与時におけるサイトカイン誘導についての検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt 5、10、15、20 mg/kg b.w.を腹腔内に投与後 24 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、血清中の IL-6、TNF- α 値の測定を行った。その結果、尾静脈内投与時と同様に 15、20 mg/kg において IL-6、TNF- α 値は control と比較して有意に高い値を示した (Fig. 10)。

従って、腹腔内投与においても尾静脈内投与と同様の免疫誘導を示すことが示された。

11. snPt の頻回投与時における肝傷害についての検討

8～9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt を 5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に週 2 回、4 週間 (計 8 回) 投与し、最終投与 3 日後に肝臓組織を採取し、肝臓中のヒドロキシプロリン (HYP) 量を測定することで肝線維化を評価した。

その結果、肝臓組織中における HYP 含有量は control と変わらない含有量を示した (Fig. 11)。

つまり、HYP 含有量に変化が認められなかったことから肝臓の線維化は生じていないことが考えられる。

従って、今回の条件における頻回投与においては肝臓に明確な障害性は認められないことが示された。しかし、単回投与における肝障害性マーカーやサイトカインの値を鑑みるに、24 時間以降は各値が減少傾向にあるため、今回の投与頻度では単回投与による影響が完全に消失してから再度投与を行っているため、単回投与が繰り返されただけの結果である可能性を否定できない。よって今後、投与頻度を変えて検討を行う必要が挙

げられる。

12. snAg 単回投与による各種臓器（心臓、肺、脾臓、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 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 時間後に心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓を採取し、4%パラフォルムアルデヒド（PFA）にて固定した。固定後、HE 染色を行うことにより、各種臓器における障害性を評価した。

これまでにサブナノ銀（snAg）を尾静脈内注射した際の 24 時間後の肝臓への影響を検討した結果、2 mg/kg において致死性の障害が認められた。従って今回、致死性を示さない snAg 1 mg/kg を投与し 24 時間後の各種臓器（心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓）を摘出し、HE 染色をおこなうことで組織学的に snAg による障害性を評価した。その結果、今回検証を行った全ての臓器において障害性は確認されなかった（Fig. 12）。この結果は、これまでに得られた肝臓障害性マーカーである ALT・AST 値の上昇、及び腎臓障害性マーカーである BUN、Creatinine 値の上昇と関連する結果となる。従って、1mg/kg 以下の snAg は生化学的・組織学的に障害を及ぼさないことが明らかとなった。しかし、2 mg/kg で致死性の障害性を示すことから、snAg の障害性発現の濃度範囲は極めて狭い可能性が予測される。そのため、今後の詳細な検討が必要であると考えられる。

E. 結論

1. 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、及び脂肪組織の溶解の知見について intra-lab においてバリデーションが完了した。
2. サブナノ白金は、高容量（20 mg/kg 以上）において致死性の毒性、20mg/kg 以下で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。

3. サブナノ銀は、2mg/kg の用量において致死的な毒性が確認された。1mg/kg 以下の用量において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。

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*, 66:282-286, 2011.
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*, 66:278-281, 2011.
3. Hasezaki, T, Isoda K., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K. Hepatotoxicity of silica nanoparticles with a diameter of 100nm. *Die Pharmazie*, 66:698-703, 2011.
4. Li, X, Kondoh M., Yamagishi, Y., Watari, A., Tsutsumi Y., Yagi K. Physiologic influence of silica nanoparticles in mice fed high-fat diet. submitted.
5. Isoda, K., Nishimori, H., Kondoh, M., Imazawa, T., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., and Yagi, K. Transmission electron microscopic observation of liver cells in mice with silica nanoparticle-induced hepatic injury. submitted.
6. Hayata, Y., Watari, A., Yamagishi, Y., Li, X, Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K.,

Hepatotoxicity of sub-nanoscale platinum particles in mice. in preparation.

7. Hayata, Y., Watari, A., Yamagishi, Y., Li, X, Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K., Nephrotoxicity of sub-nanoscale platinum particles in mice. in preparation.

② 学会発表

【国内学会発表：合計 0 件】

該当無し

【国際学会発表：合計 0 件】

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当無し

② 実用新案登録

該当無し

その他

該当無し

研究協力者

近藤昌夫、渡利彰浩、山岸喜彰、李相儒、早田裕也

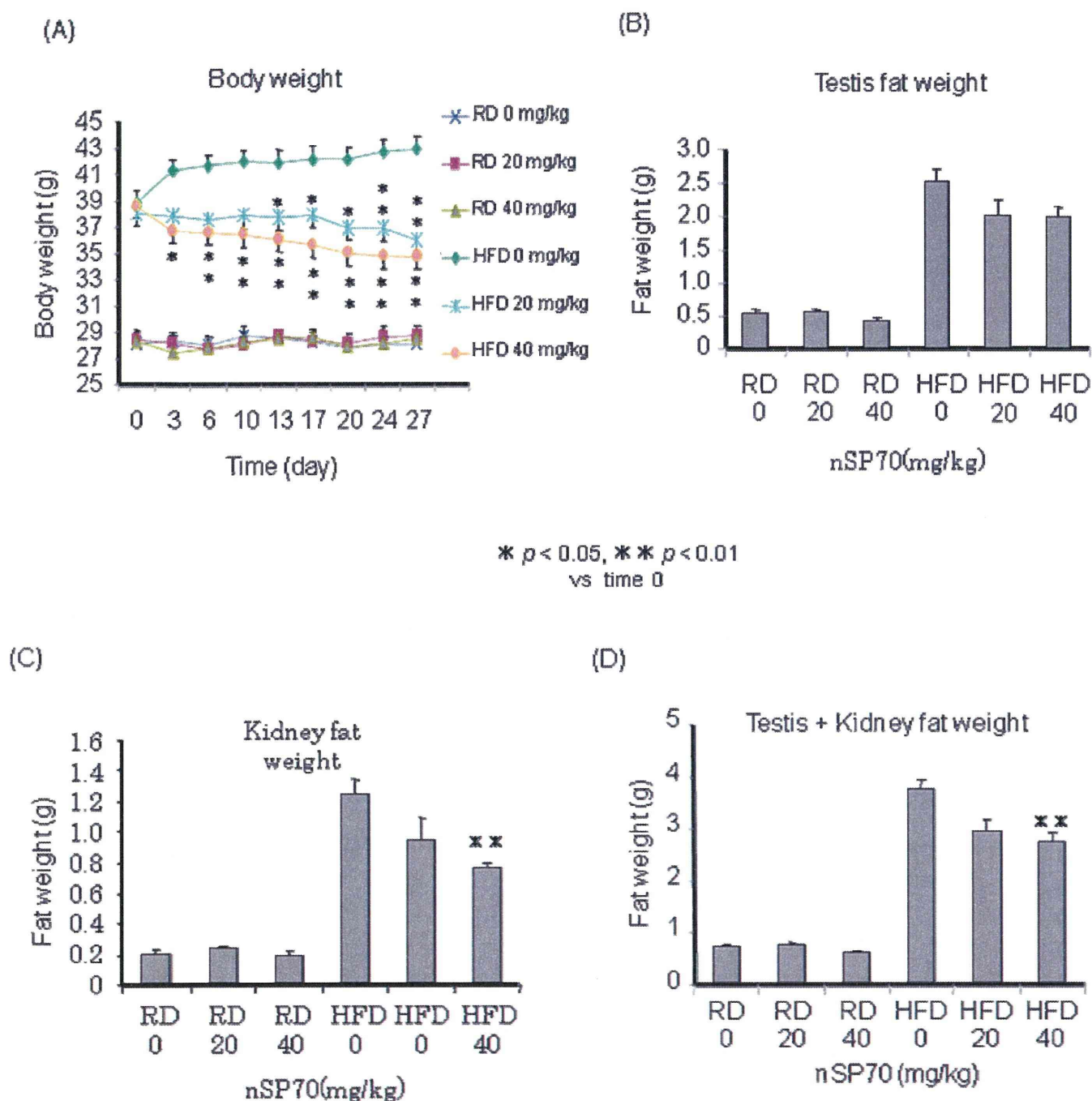


Fig. 1

8週齢の雄性的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 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。(A) 毎回投与前に体重を測定した。(B) 最終投与3日後に辜丸周囲脂肪組織を回収し、重量を測定した。(C) 最終投与3日後に腎臓周囲脂肪組織を回収し、重量を測定した。(D) 辜丸周囲、及び腎臓周囲脂肪組織の総重量。

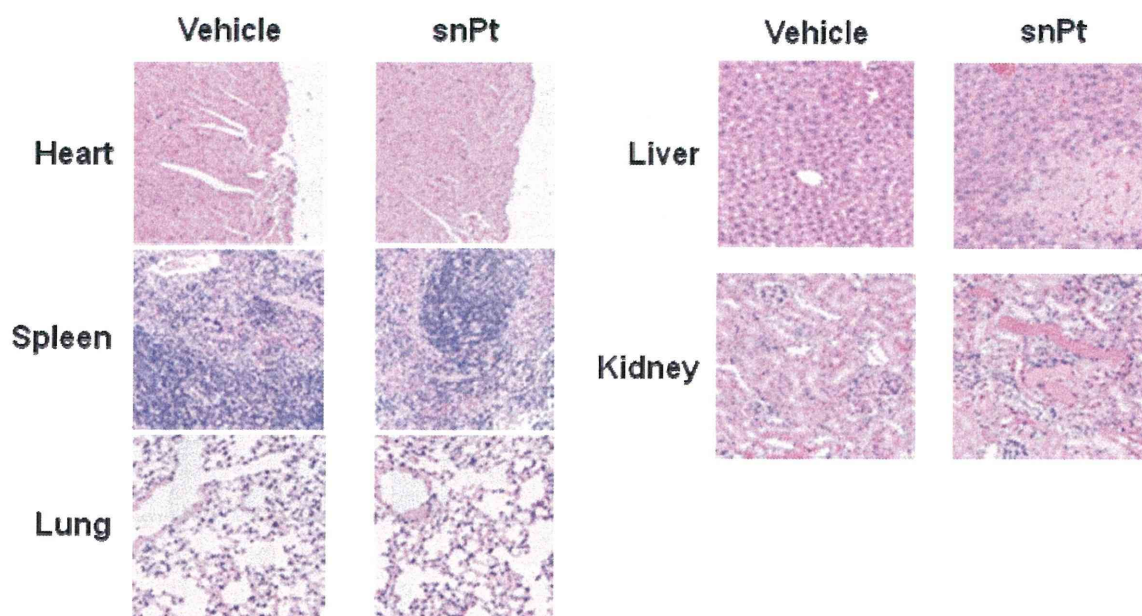


Fig. 2

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt 15 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与24時間後に心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓を採取し、4%パラフォルムアルデヒド (PFA) にて固定した。固定後、HE染色を行うことにより、各種臓器における障害性を評価した。

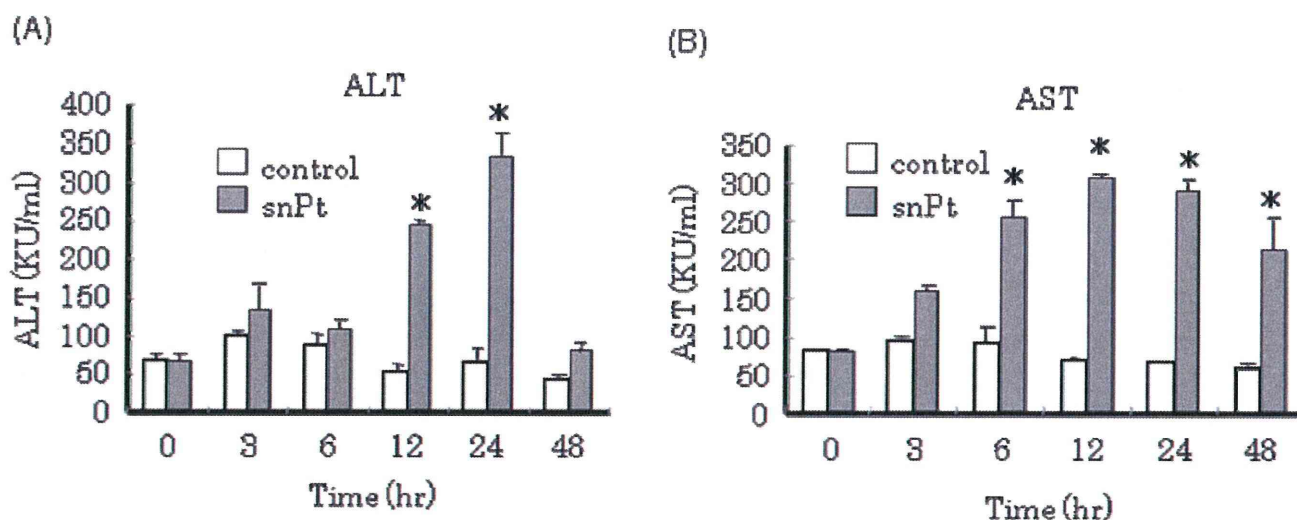


Fig. 3

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt 15 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与3、6、12、24、48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。その後、snPtの肝臓への影響を評価するため、肝障害の指標として血清中の (A) ALT及び (B) AST値の測定を行った。* $p < 0.05$ vs time 0

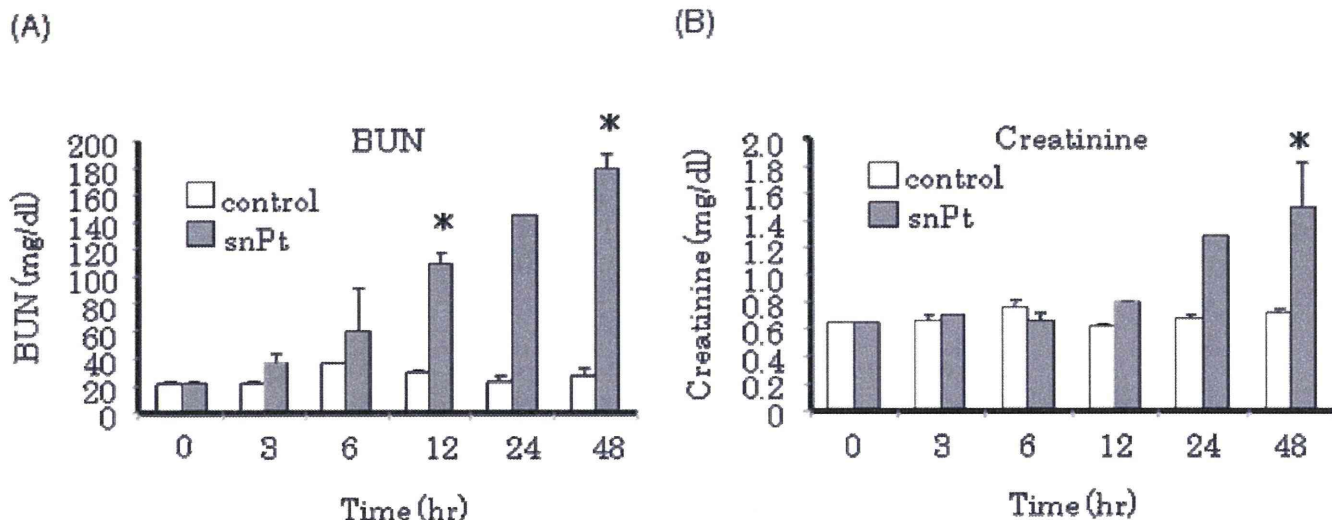


Fig. 4

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt 15 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与3、6、12、24、48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。その後、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 (A) BUN及び (B) Creatinine値の測定を行った。* $p < 0.05$ vs time 0

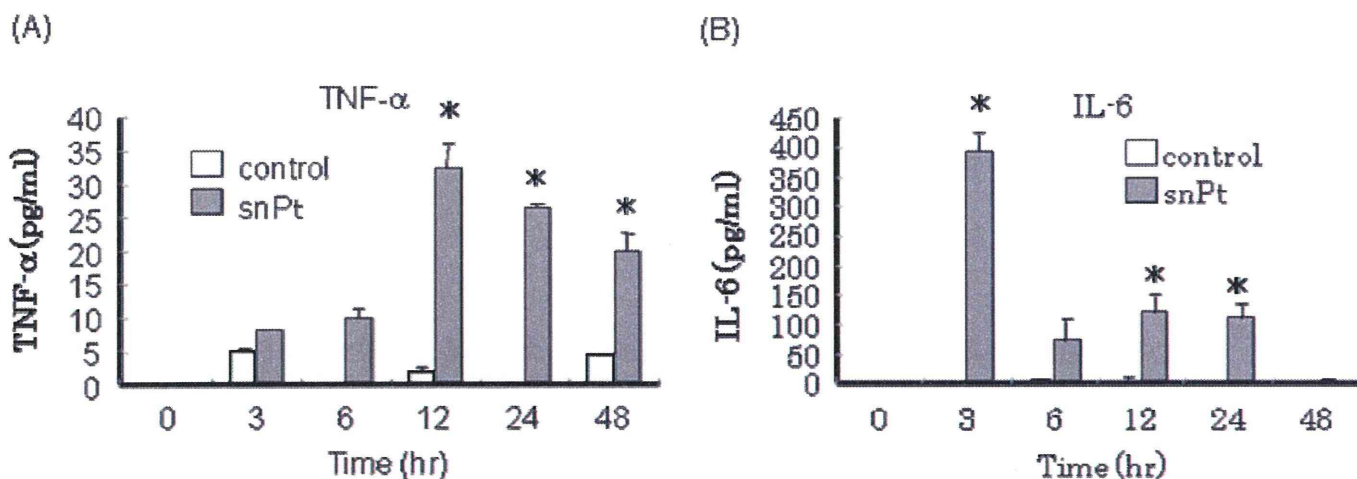
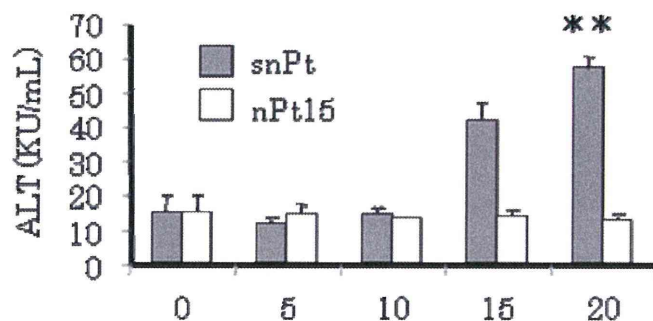


Fig. 5

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt 15 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与3、6、12、24、48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。その後、snPtの免疫系に与える影響を評価するため、サイトカインとして (A) TNF-α、及び (B) IL-6値の測定を行った。* $p < 0.05$ vs time 0

(A)



(B)

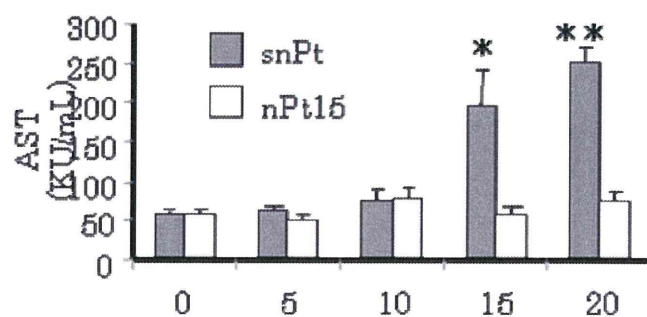


Fig. 6

Pt (mg/kg)

Pt (mg/kg)

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt (≦1 nm) 及び nPt (15 nm) を5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。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。その後、Pt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 (A) ALT及び (B) AST値の測定を行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Pt 0

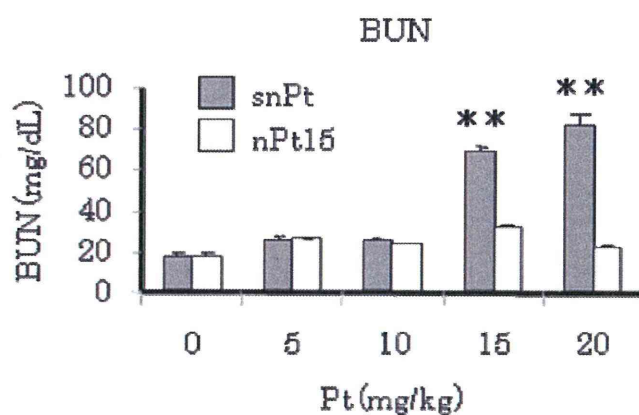


Fig. 7

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt (≦1 nm) 及び nPt (15 nm) を5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。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。その後、Ptの腎臓への影響を評価するため、腎傷害の指標として血清中のBUN値の測定を行った。** $p < 0.01$ vs Pt 0