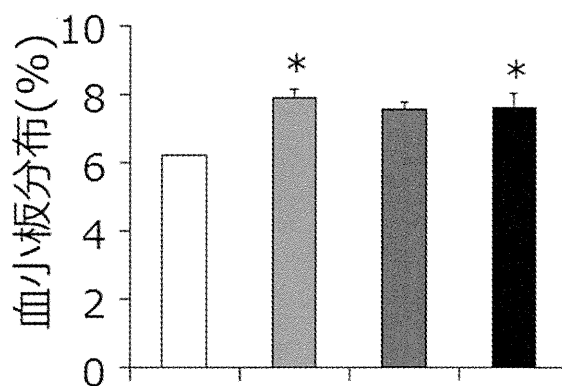
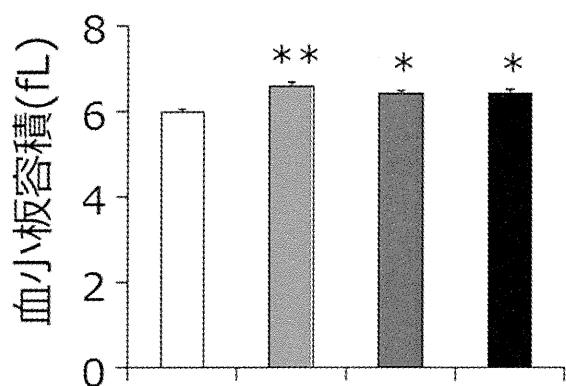
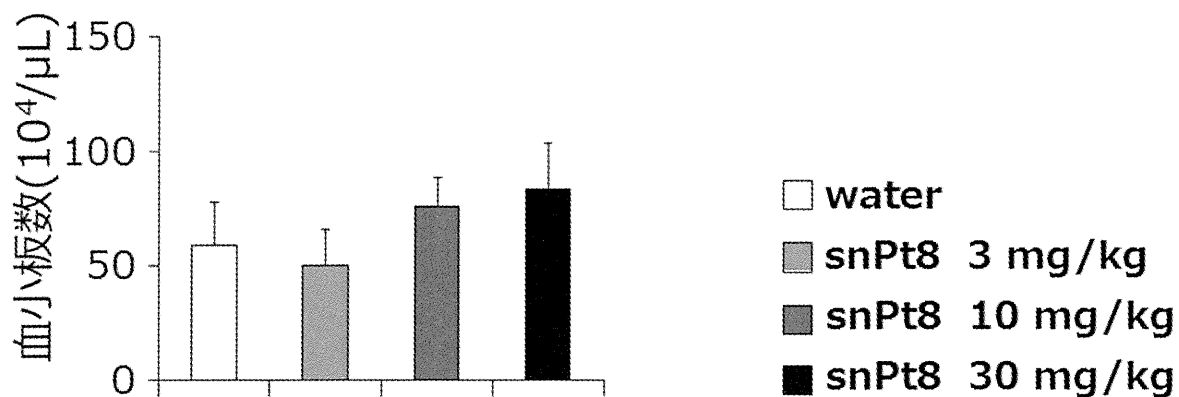


* $P < 0.05$ vs water

図 31. snPt8 を授乳期に 3 週間経口曝露したマウスの母体血球検査. 出産日から、30mg/kg、10mg/kg、3mg/kg の投与量の snPt8 を 1 日 1 回、1 週間に 5 回のペースで、3 週間連続経口投与した。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。Data are presented as mean \pm SE (n=4-5). *Represents significant difference from the saline by Scheffe ($p < 0.05$).



**p<0.01 vs water
*P<0.05 vs water

図 32. snPt8 を授乳期に 3 週間経口曝露したマウスの新生仔血球検査. 出産日から、30mg/kg、10mg/kg、3mg/kg の投与量の snPt8 を 1 日 1 回、1 週間に 5 回のペースで、3 週間連続経口投与した。解剖時に血液を回収し、血液検査を行った。Data are presented as mean ± SE (n=5-9). **Represents significant difference from the saline by Scheffe (p < 0.01). *Represents significant difference from the saline by Scheffe (p < 0.05).

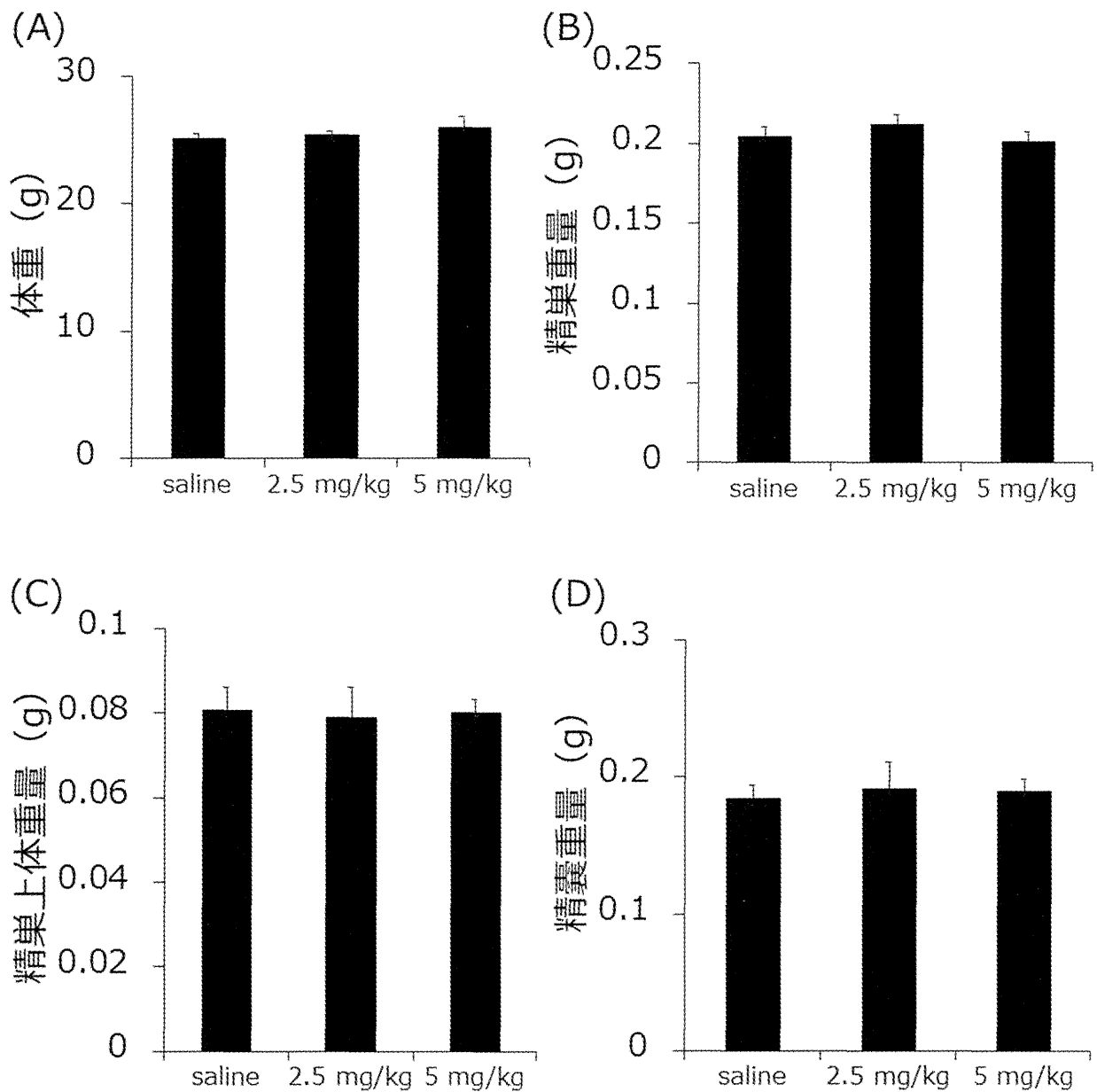
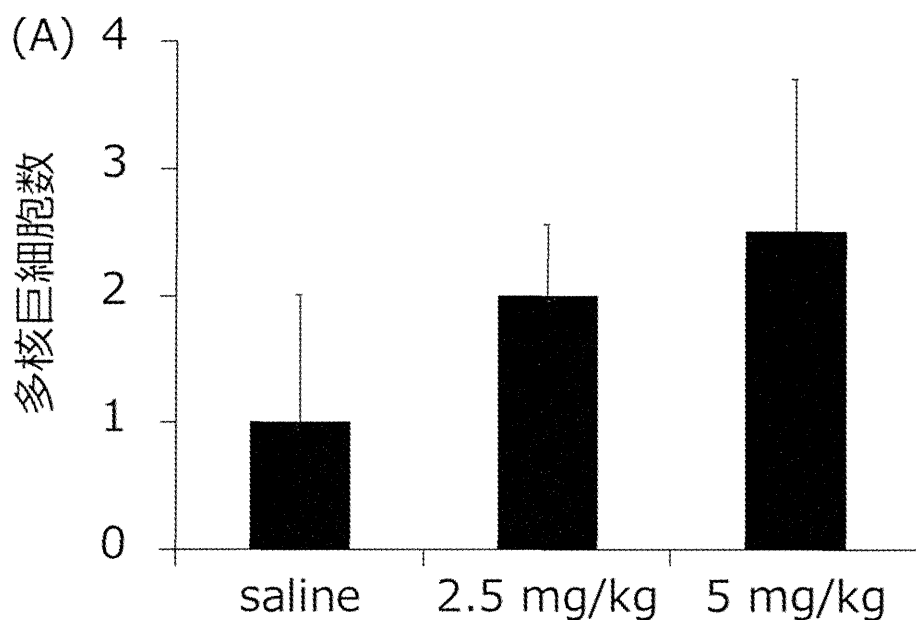


図 33. nSP30 を曝露した雄マウスの体重、精巣重量、精巣上体重量、精嚢重量. 10 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP30 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与 24 時間後に体重を測定すると共に (A)、精巣重量 (B)、精巣上体重量 (C)、精嚢重量 (D) を評価した。Data are presented as mean \pm SE (n = 4-5)



(B)

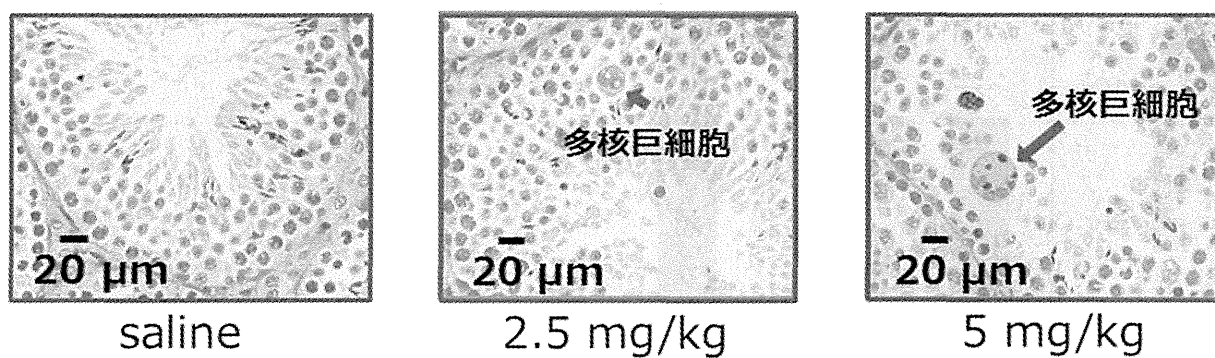


図 34. nSP30 を曝露した雄マウスの精巣の病理所見. 10 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP30 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与 24 時間後に精巣を回収し、多核巨細胞数を評価した (A、B)。Data are presented as mean ± SE (n = 4-5)

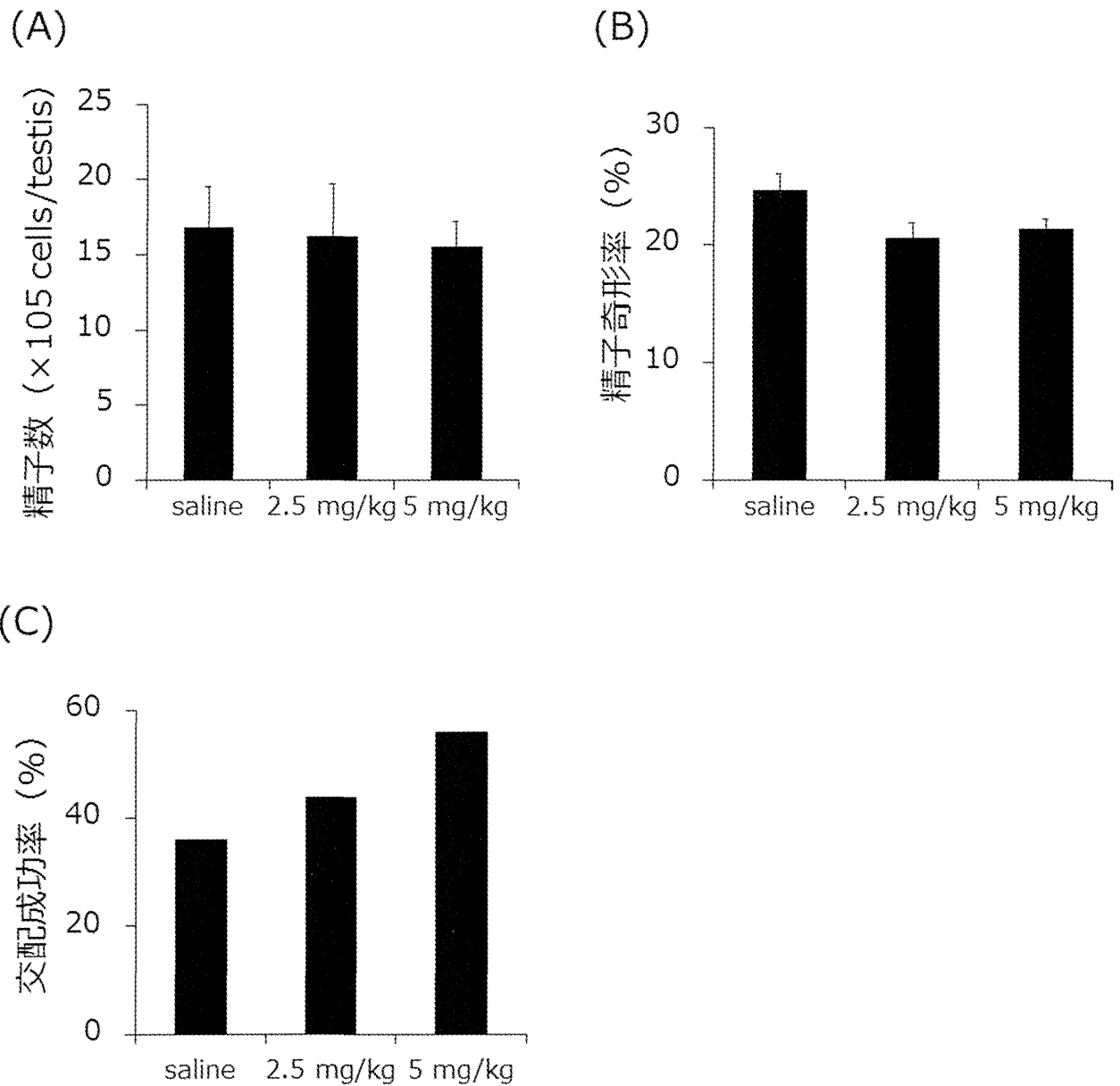


図 35. nSP30 を曝露した雄マウスの精子量、精子奇形率、交配成功率. 10 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP30 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与 24 時間後に精巢中の精子量 (A)、精子の奇形率 (B) を評価すると共に、最終投与日から 4 日間、無処置の雌マウスと同居させた際の交配成功率 (妊娠した雌マウスの数/交配させたマウスのペア数) を算出した (C)。Data are presented as mean \pm SE (n = 4-5、A-B)。

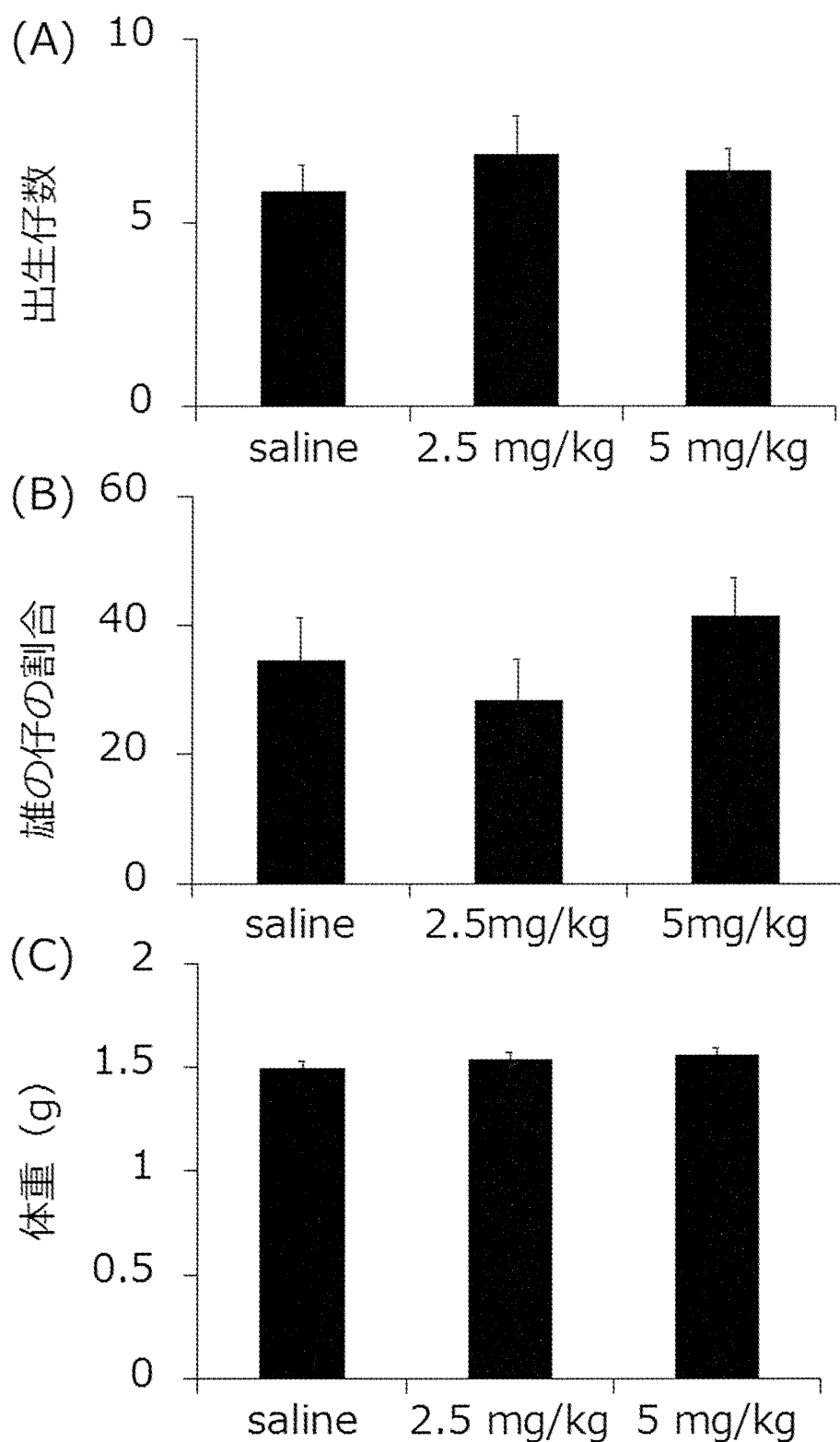
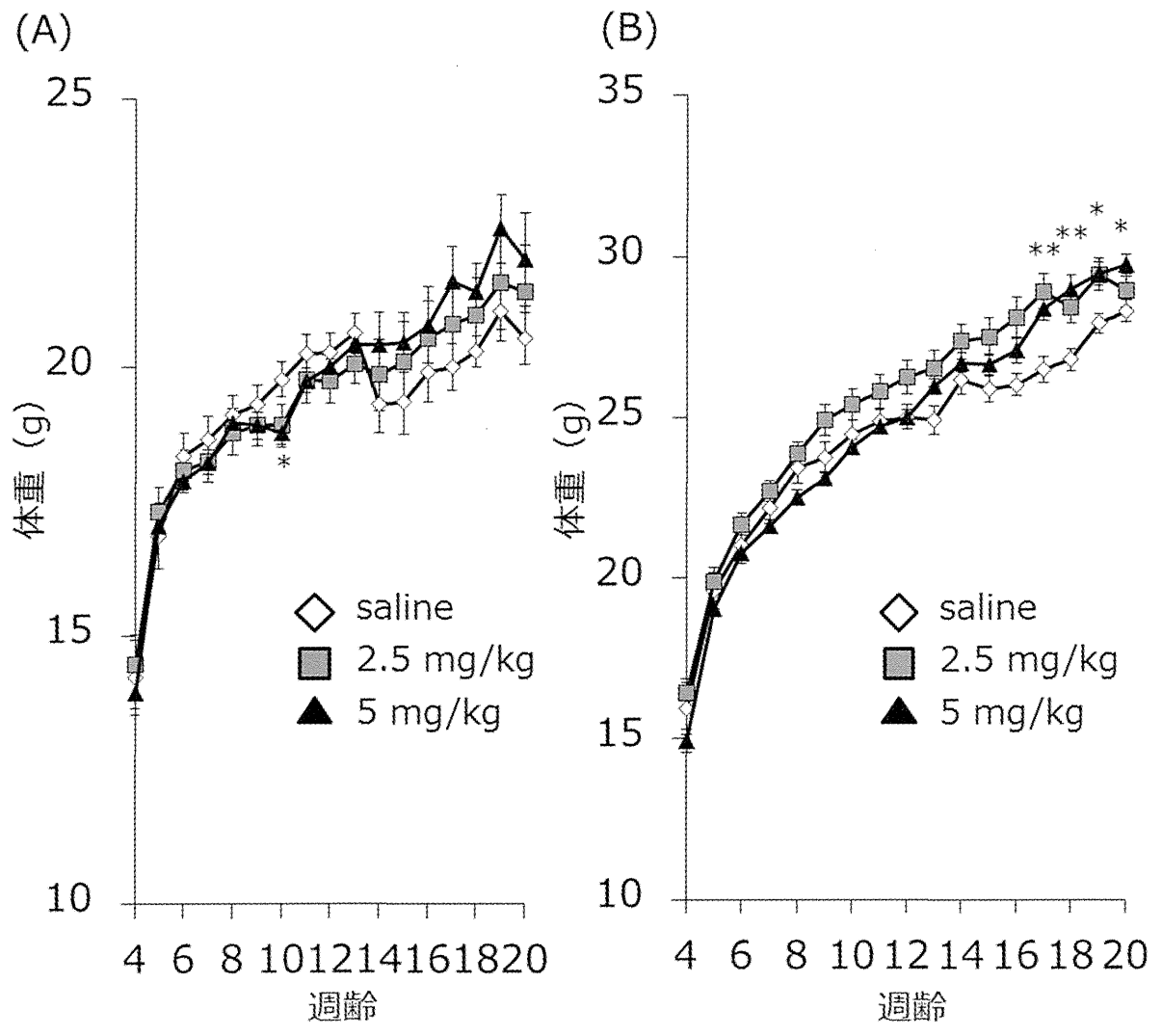


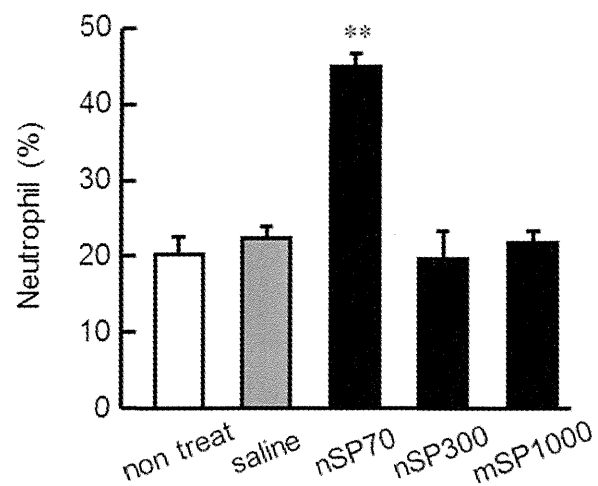
図 36. nSP30 を曝露した雄親の仔の出生仔数、雌雄比、出生時体重. 10 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP30 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与日の夜から、9 週齢の雌性 BALB/c マウスと交配させた。出生仔数 (A)、出生仔の雌雄比 (B)、出生仔の出生時体重 (C) を評価した。Data are presented as mean \pm SE (n = 41-77)



*:p < 0.05 vs Control **:p < 0.01 vs Control

図 37. nSP30 を曝露した雄親の仔の体重推移. 10 週齢の雄性 BALB/ c マウスに、nSP30 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与日の夜から、9 週齢の雌性 BALB/ c マウスと交配させた。出生後の体重を継続的に測定し、実測値(A)、対照群を 100% とした時の割合 (B) で評価した。Data are presented as mean ± SE (n = 21-31; *p < 0.05 , **p < 0.01 versus value for control group by one-way ANOVA followed by Scheffe's post hoc test)

(A)



(B)

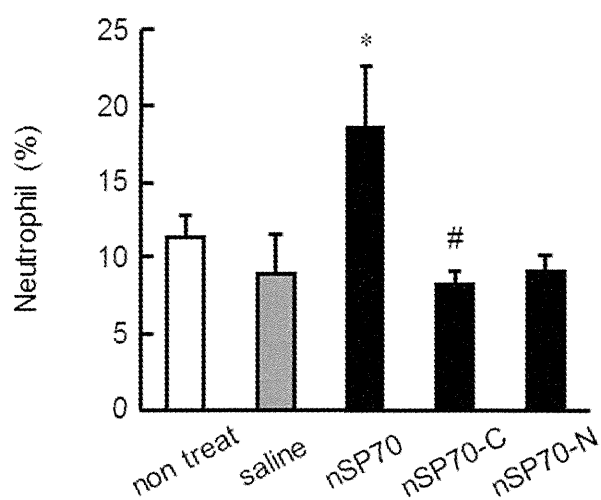


図 38. 末梢血好中球画分の割合変動解析

(A) BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における末梢血好中球画分の割合を Flow cytometry により解析した。(B) BALB/c マウスに nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における末梢血好中球画分の割合を Flow cytometry により解析した。Data are presented as mean \pm SEM (n=5-6). **p < 0.01 versus value for saline group or #p < 0.05 versus value for nSP70-treated group by Bonferroni test

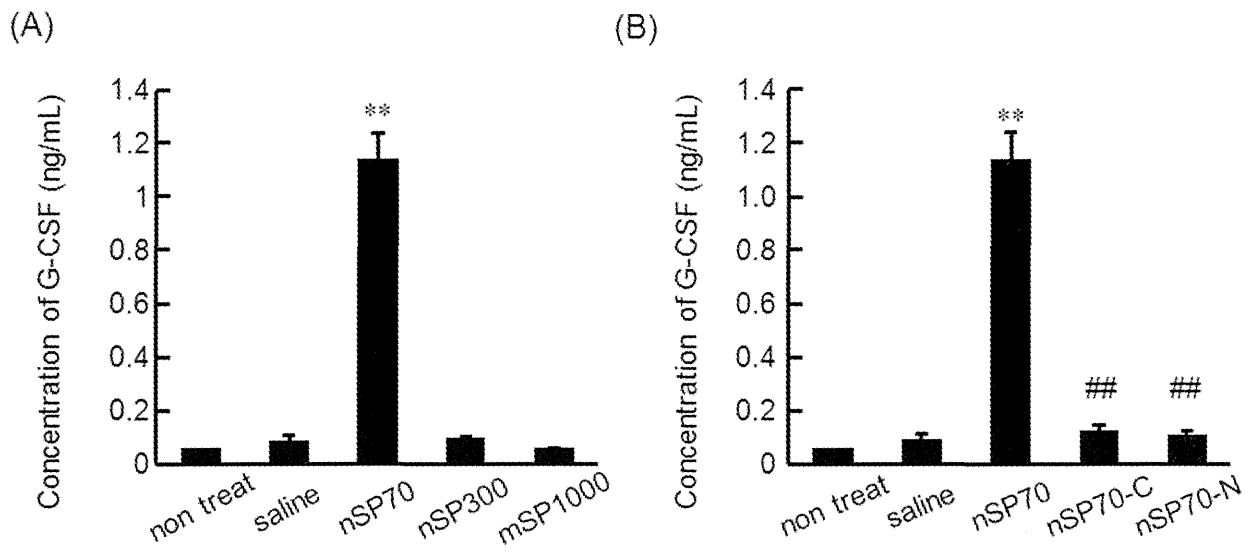


図 39. 血中 G-CSF 量の定量的解析

(A) BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 G-CSF 量を ELISA により測定した。(B) BALB/c マウスに nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 G-CSF 量を ELISA により測定した。Data are presented as mean \pm SEM (n=5-6). **p < 0.01 versus value for saline group or ##p < 0.01, #p < 0.05 versus value for nSP70-treated group by Bonferroni test

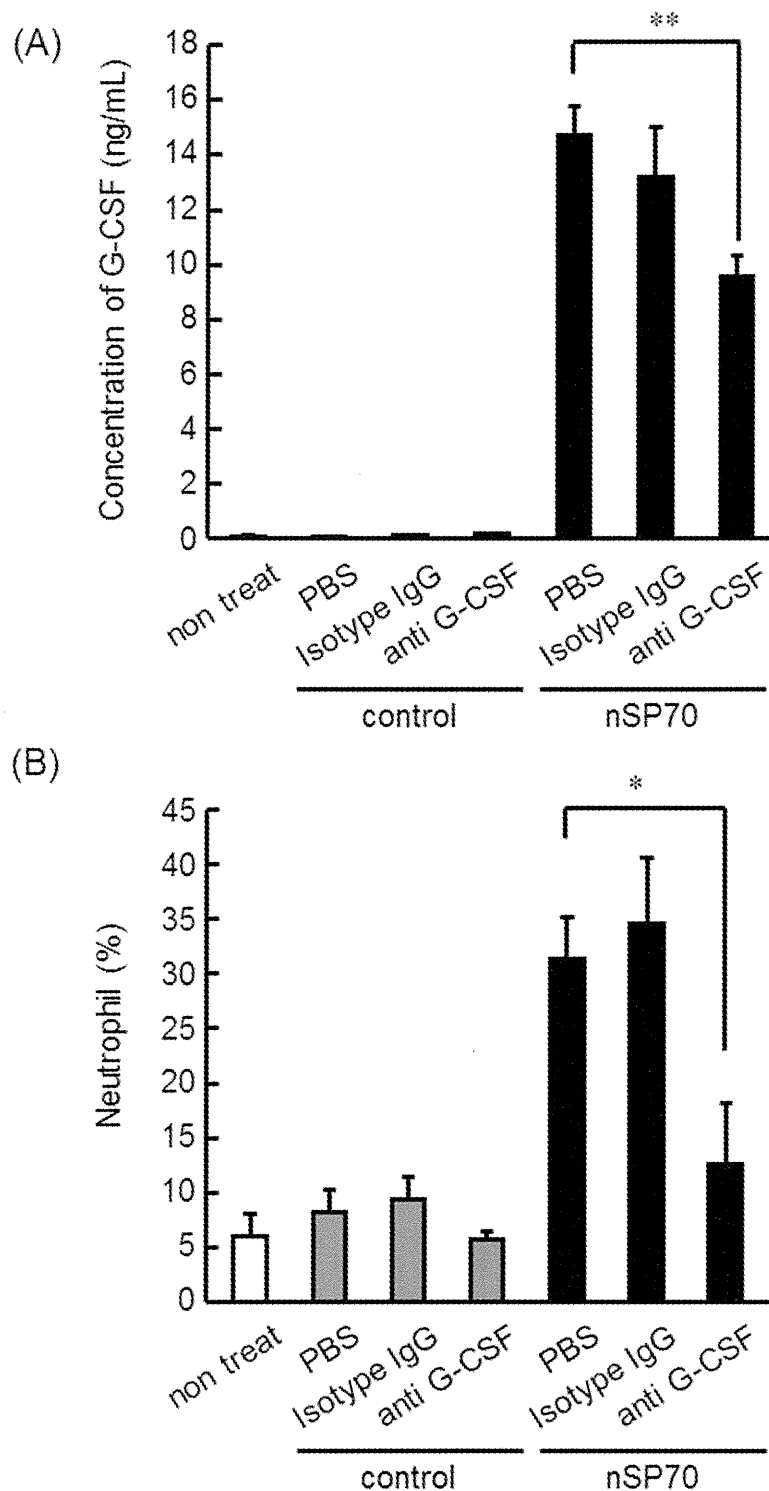


図 40. 抗 G-CSF 抗体処置時の末梢血好中球画分の割合解析

BALB/c マウスに G-CSF の中和抗体である抗 G-CSF 抗体を 30 μ g/mouse で腹腔内に投与した。中和抗体前処置から 4 時間後に、saline で 20 mg/mL に調整した nSP70 を 100 μ l ずつ (2.0 mg/mouse) 尾静脈投与した。投与後 5 時間において血液を回収し、(A) ELISA により血中 G-CSF 量を、(B) Flow cytometry により末梢血中の好中球画分を解析した。Data are presented as mean \pm SEM (n=5-6). **p < 0.01 versus value for saline group

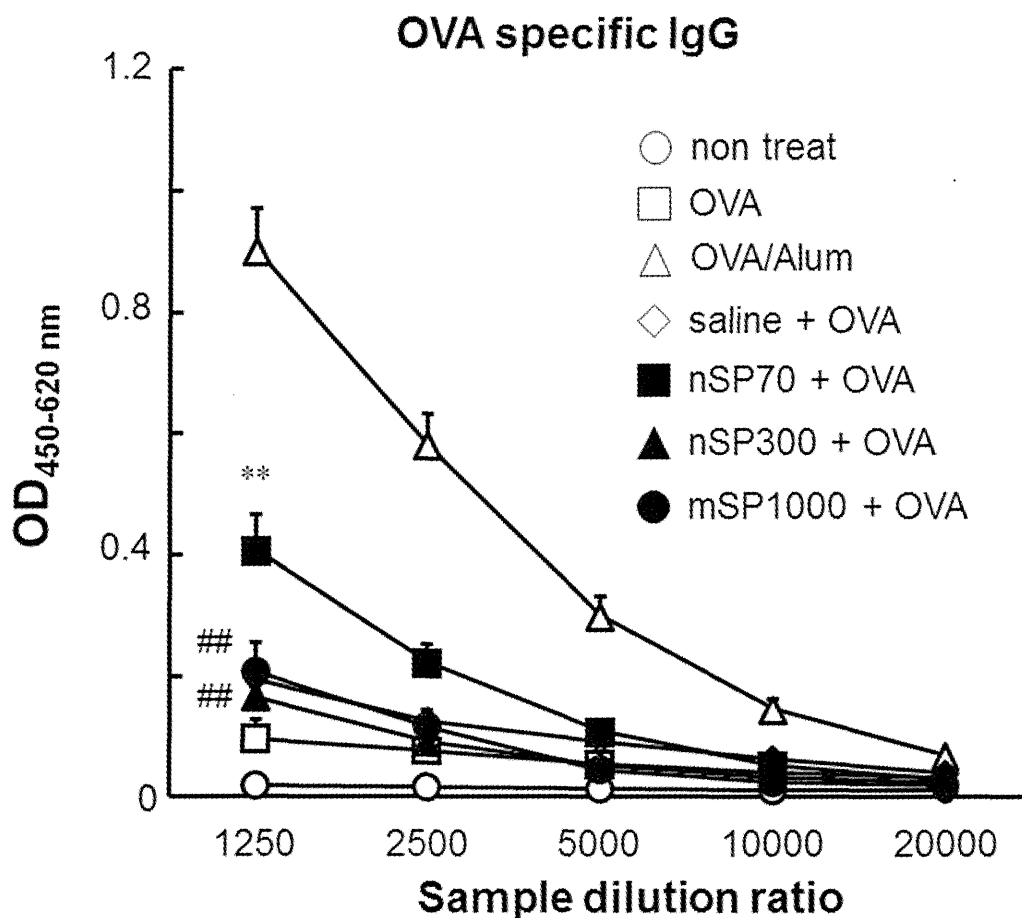


図 41. 非晶質ナノシリカの免疫応答に対する影響評価

BALB/ c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ尾静脈より投与し (0.8 mg/mouse)、投与 24 時間後に外来性抗原のモデルとしてニワトリ卵白アルブミン (OVA) を腹腔内に投与した (50 μ g/mouse)。最終投与 2 週間後に血液を回収し、OVA 特異的 IgG 価を ELISA により測定した。Data are presented as mean \pm SEM (n=5-6). **p <0.01, *p <0.05 versus value for saline group or ##p <0.01, #p <0.05 versus value for nSP70-treated group by Bonferroni test

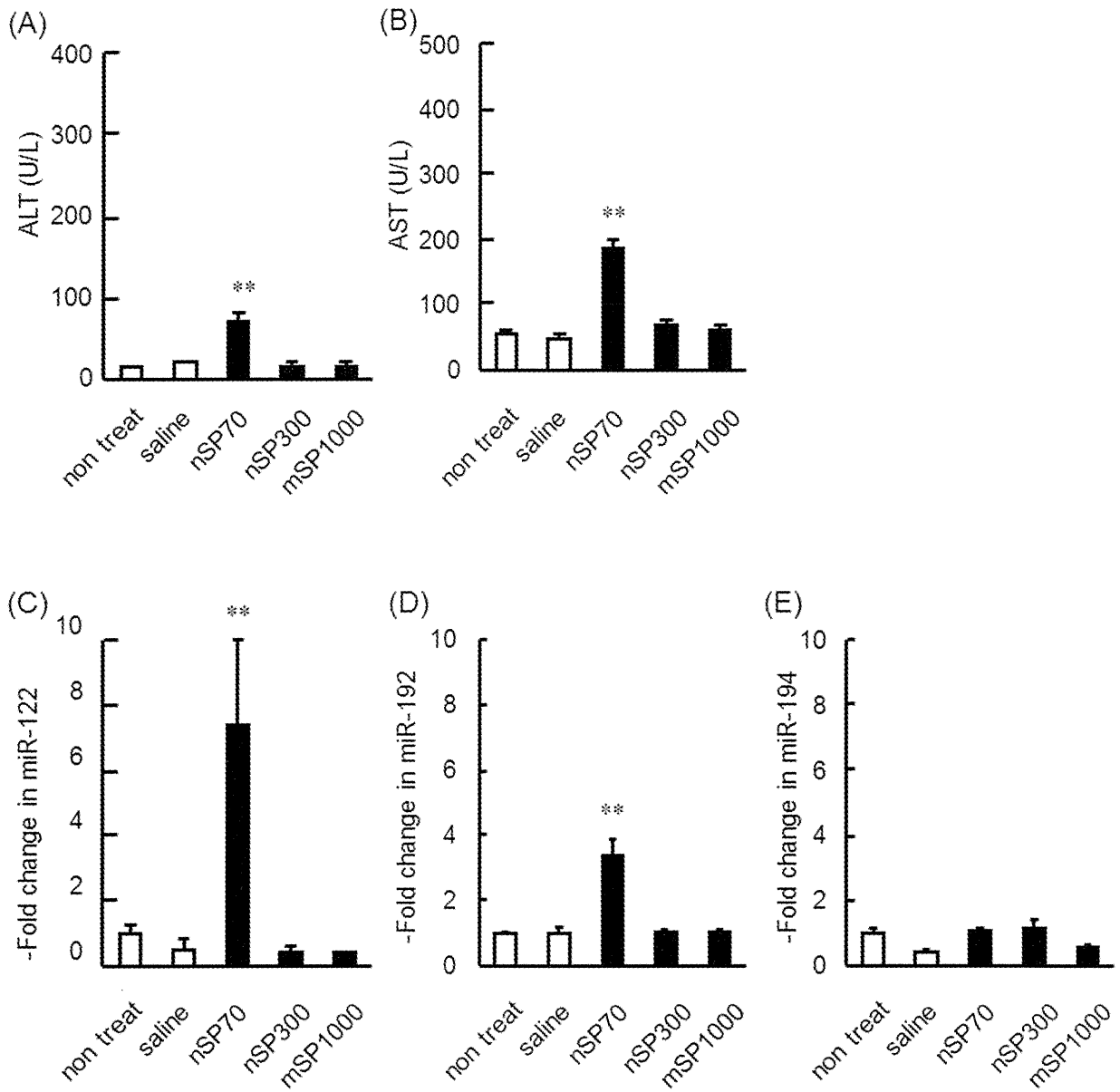


図 42. 非晶質ナノシリカ投与後の miR-122、miR-192、miR-194 の発現変動解析

BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 を 40 mg/kg で尾静脈より投与し、投与後 8 時間における血液を回収した。従来の肝障害マーカーである (A) ALT、(B) AST は生化学検査により、(C) miR-122、(D) miR-192、(E) miR-194 はリアルタイム PCR により解析した。Bonferroni 法により有意差検定を行った。(** $P < 0.01$ vs non-treated group)

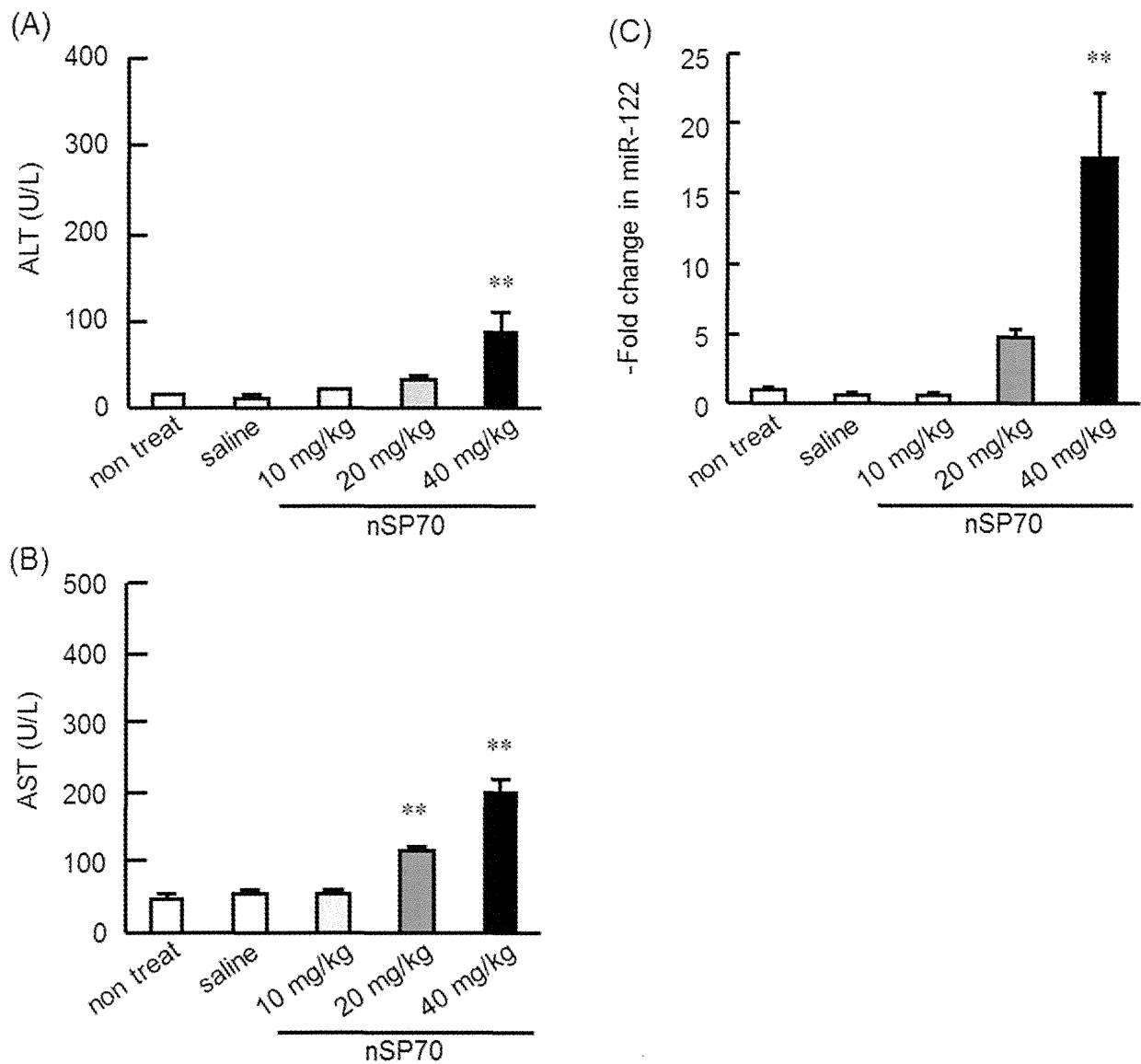


図 43. nSP70 の miR-122 の発現変動に対する投与量依存性の解析

BALB/c マウスに nSP70 を 10、20、40 mg/kg で尾静脈より投与し、投与後 8 時間における血液を回収した。従来の肝障害マーカーである (A) ALT、(B) AST は生化学検査により、(C) miR-122 はリアルタイム PCR により解析した。Bonferroni 法により有意差検定を行った。 (** $P < 0.01$ vs non-treated group)

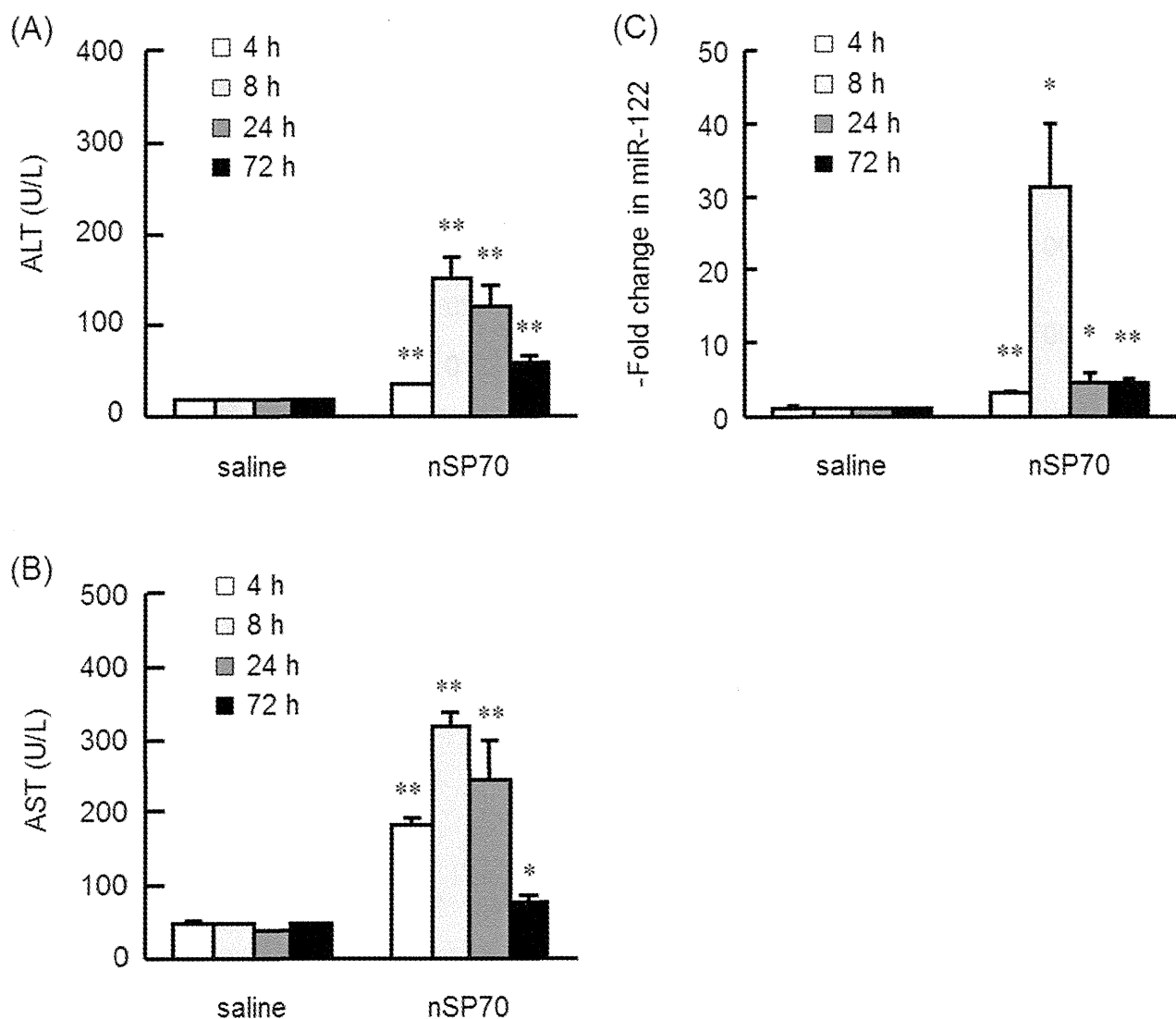


図 44. miR-122 の経時的な発現変動解析

BALB/c マウスに nSP70 を 40 mg/kg で尾静脈より投与し、投与後 4、8、24、72 時間における血液を回収した。従来の肝障害マーカーである (A) ALT、(B) AST は生化学検査により、(C) miR-122 はリアルタイム PCR により解析した。Bonferroni 法により有意差検定を行った。(** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs saline-treated group)

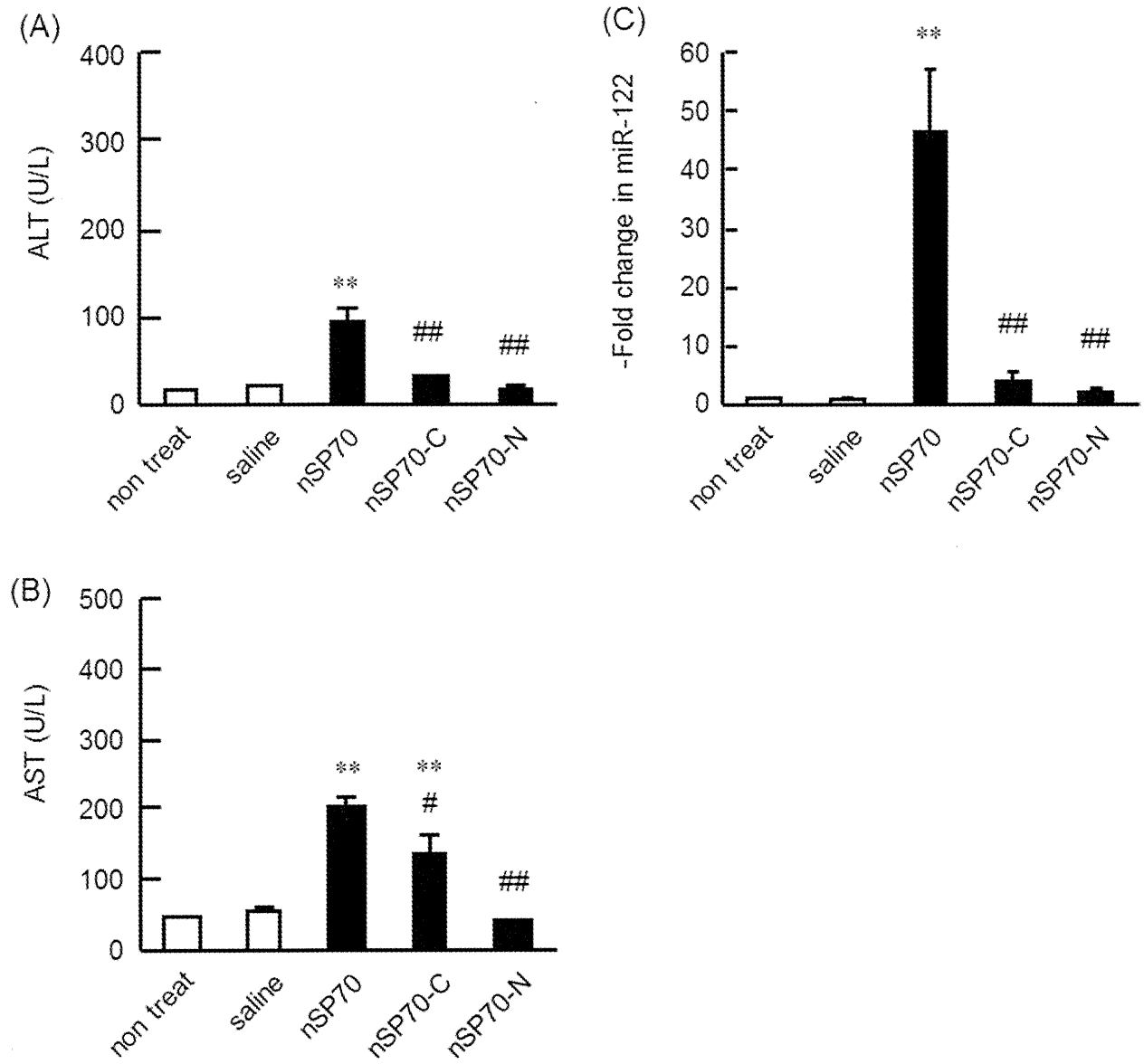


図 45. 表面修飾を施した nSP70 投与による miR-122 の発現変動解析

BALB/c マウスに nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 40 mg/kg で尾静脈より投与し、投与後 8 時間における血液を回収した。従来の肝障害マーカーである (A) ALT、(B) AST は生化学検査により、(C) miR-122 はリアルタイム PCR により解析した。Bonferroni 法により有意差検定を行った。(** $P < 0.01$ vs non-treated group, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs nSP70-treated group)

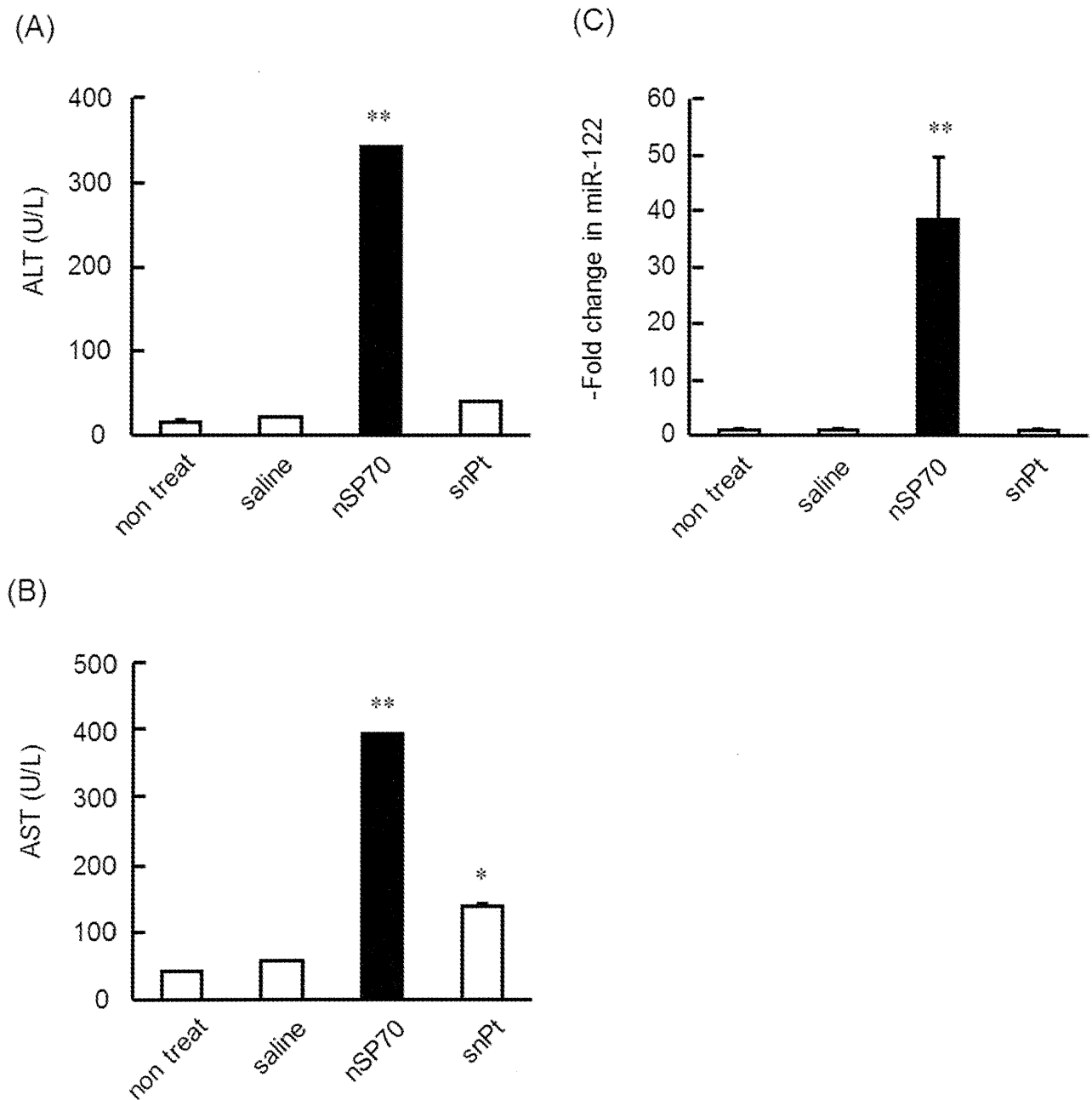


図 46. サブナノ白金投与による肝障害に対する血中 miR-122 の発現変動解析

BALB/c マウスに snPt を 20 mg/kg で尾静脈より投与し、投与後 8 時間における血液を回収した。従来の肝障害マーカーである (A) ALT、(B) AST は生化学検査により、(C) miR-122 はリアルタイム PCR により解析した。Bonferroni 法により有意差検定を行った。(** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs non-treated group)

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

近年、ナノテクノロジーは、今世紀における重要案件である地球温暖化、生物多様性保持などの環境・エネルギー問題、また高齢化社会で必要とされる医薬品分野の他、食品分野、化粧品分野へ向けて技術革新に資する大きな期待が寄せられている。

このように、あらゆる分野で利用されているナノテクノロジーにおいて中核を成しているのがナノマテリアルである。ナノマテリアルは ISO (国際標準化委員会) により、「少なくとも 1 次元の大きさが 100 nm 以下に人工的に制御された素材」として定義され、従来までのサブミクロンサイズの素材に比して、粒子径の微小化に伴う組織浸透性や表面積の劇的増加により、電気・磁気・光学的特性や組織浸透性などが飛躍的に向上する。そのため、これら特有の機能を活かし既に食品・医薬品・化粧品などの領域で様々な改善が施された製品が流通し、ナノマテリアルの使用量・利用範囲共に世界的に広がり続けている。

しかし現在、様々な状況の様々な状態の人々が曝露される可能性がある中で、一般的な状態とは異なる状態に対するナノマテリアルの安全性研究はほとんど行われておらず、多様な状態の人々をターゲットにした研究報告は極めて少ないのが現状である。

このような状況を鑑みて、本研究では、「肥満」の状態に着目することとした。肥満は、全身の脂肪組織における慢性炎症状態を引き起こし、2 型糖尿病、循環器系疾患、非アルコール性肝疾患、がん、といった様々な疾患の罹患率の増加や増悪に関与することが知られている。従って、肥満に対するナノマテリアル曝露の影響を精査していくことは、今後のナノマテリアル安全性研究の進展において重要な情報を提供できるものと考えられる。

上記の背景から本研究においては、食品、医薬品、化粧品分野において利用頻度が最も高いナノマテリアルの一つであるナノシリカ (nano silica: nSP)、最近、比較的利用頻度が高く未だハザード情報が乏しいサブナノ白金 (sub-nano platinum: snPt) に着目し、これらのナノマテリアルが肥満状態においてどの様な影響を与えるのかを肥満モデルマウスとして高脂肪食摂取マウスを用いて検討を行った。

その結果、粒子サイズの異なるナノシリカを投与したところ、粒子径の減少により、体重減少、総脂肪重量の減少作用が増強されることが確認された。さらに肥満モデルマウスにおいては、その作用が顕著に現れることが確認された。

サブナノ白金による障害性は、肝臓、および腎臓で確認された。また、障害性マーカーは約 24 時間で最高値を示し、投与量依存的な障害性が確認された。さらに、粒子サイズの異なるサブナノ白金を投与したところ、粒子径の減少により、肝臓、腎臓への障害性が増強された。また、培養細胞を用いた検討により、肝臓、腎臓への障害性は細胞に対する直接的な障害であることが確認された。さらに、細胞への直接的な影響だけでなく、炎症性サイトカインの誘導、および腎臓に対する炎症性細胞の浸潤が確認されたことから、炎症反応による障害性発現の可能性も確認された。また、肥満モデルマウスにサブナノ白金を投与したところ、肝臓への障害性が増強され、致死的な毒性と共に強力な炎症反応が確認された。

以上より、ナノシリカ、およびサブナノ白金共にサイズの減少により障害性が增強されることが確認された。従って、使用用途によって、有効性と障害性を考慮し、適切なサイズを見出していくことが必要であると考えられる。

肥満状態においては、ナノシリカでは顕著な体重減少、脂肪重量サイズの減少が確認された。また、サブナノ白金では肝障害の増強に加え、強力な炎症反応、および致死毒性が認められた。よって、肥満状態においてナノマテリアルの障害性が増悪することが確認された。

以上、本研究において得られた結果は、ハザード情報の取得であるものの、「肥満」という一般的な状態とは異なる状態を扱ったものであり、ナノマテリアルの安全性研究において新たな知見を与え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、 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、これまでの、工業的利用の観点から推進される安全性研究から、食品、医薬品、化粧品等の直接口に運ばれ、肌に塗布される製品に使用されるナノマテリアルに対する研究にシフトしてきている。しかしながら、これらの研究は、あくまで一般的な状態を対象としており、様々な状況の様々な状態を想定した研究はほぼ皆無であるのが現状である。そのため、本研究においては、様々な状況の様々な状態の中から、「肥満」の状態に着目することとした。

従って、今年度は、粒子径 70nm のナノシリカ (nSP70) と 300 nm のナノシリカ (nSP300) 用い、肥満モデルマウスとして、高脂肪食摂取

マウス (HFD マウス) に対するサイズ依存的な影響について検討を行った。

また、サブナノ白金の障害性についての intra lab における再検討を行った。

さらに、HFD マウスにおけるサブナノ白金の影響についても新たに検討を行い、「肥満」と「ナノマテリアル」の相互作用についての新知見を見出すべく検討を行った。

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、または、300 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、粒径 70 nm のナノシリカを nSP70、300 nm を nSP300 と表記した。また、サブナノサイズ (0.1-10 nm) の白金 (サブナノ白金) を用いた。粒子径約 1 nm のサブナノ白金を snPt1、約 8 nm のものを snPt8 とそれぞれ表記した。

1. nSP のサイズ依存的な影響 (体重についての検討)

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製した。

作製したマウスに対し、ナノシリカのサイズ依存的な作用を確認するために nSP70 (Lot: 06412 43-02)、および nSP300 (Lot: 10410

43-01) の 2 種類を 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。毎回投与前にマウスの体重を測定した。また、最終投与 3 日後にマウスの体重を測定した。

2. nSP のサイズ依存的な影響 (脂肪重量についての検討)

8 週齢の雄性の C57BL/6 マウスに RD、及び HFD を 8 週間摂取させ、肥満モデルマウスを作製した。

作製したマウスに対し、ナノシリカのサイズ依存的な作用を確認するために nSP70 (Lot: 06412 43-02)、および nSP300 (Lot: 12408 40-02) の 2 種類を 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。最終投与 3 日後にマウスの腎臓、および睾丸周囲の脂肪組織を採取し、脂肪重量を測定した。

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 (intra lab)

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt1 (Lot : 11080401) を 20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。Vehicle 群には注射用水のみ等量投与した。投与 0、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 分間室温で静置後、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 による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 活性の測定を行った。

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 (intra lab)

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt1 (Lot : 11080401) を 20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。Vehicle 群には注射用水のみ等量投与した。投与 0、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 分間室温で静置後、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 による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。

5. snPt1 の投与量依存的な肝臓への障害 (intra lab)

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt1 (Lot : 11080401) を 0、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、snPt の投与量依存的な肝臓への影響を評価するため、肝障害マーカーとして血清中の ALT 及び AST 活性の測定を行った。

6. snPt1 の投与量依存的な腎臓への障害 (intra lab)

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt1 (Lot : 11080401) を 0、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、snPt の投与量依存的な腎臓への影響を評価するため、腎障害マーカーとして血清中の BUN 値の測定を行った。

7. snPt のサイズ依存的な肝臓への障害についての検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt1 (Lot : 11080401) 及び、snPt8 (Lot : 11062901) を 0、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、snPt のサイズ依存的な肝臓への影響を評価するため、肝障害マーカーとして血清中の ALT 及び AST 活性の測定を行った。

8. snPt のサイズ依存的な腎臓への障害についての検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt1 (Lot :

11080401) 及び、snPt8 (Lot : 11062901) を 0、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、snPt のサイズ依存的な腎臓への影響を評価するため、腎障害マーカーとして血清中の BUN 値の測定を行った。

9. snPt1 による細胞への直接的な影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスから初代培養肝細胞を 1×10^4 cells/well で 96 well plate に播種後、24 時間培養した。その後、snPt1 (Lot : 11080401) を 0、0.1、1、10、50、100 μ g/ml を作用させて 24 時間後に WST assay を行った。

腎細胞株である MDCK 細胞を 2×10^4 cells/well で 96 well plate に播種して 24 時間後に snPt1 (Lot : 11080401) を 0、10、20、40、60 μ g/ml を作用させて 24 時間後に WST assay を行った。

10. snPt1 による炎症反応の誘導

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt1 及び、snPt8 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 による炎症反応誘導の指標として血清中の炎症性サイトカインである IL-6 値の測定を行った。

8~9 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに、snPt1 及び、snPt8 を 10 mg/kg b.w.の用量で週 2 回、4 週間、腹腔内投与した。投与 72 時間後に腎臓を採取し、HE 染色を行った。

11. 高脂肪食摂取マウスへの snPt 投与による肝障害への影響

8 週齢の雄性の C57BL/6 マウスに RD、及び HFD 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 snPt1 (Lot : 11080401)

及び、snPt8 (Lot : 11062901) を 10 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に単回投与した。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、肝障害の指標として血清中の ALT、および AST 活性の測定を行った。また、投与 24 時間後に肝臓を採取し、HE 染色を行った。

12. 高脂肪食摂取マウスへの snPt 投与による腎障害への影響

8 週齢の雄性の C57BL/6 マウスに常食 RD、及び HFD 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 snPt1 (Lot : 11080401) 及び、snPt8 (Lot : 11062901) を 10 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に単回投与した。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、腎障害の指標として血清中の BUN 値の測定を行った。また、投与 24 時間後に肝臓を採取し、HE 染色を行った。

13. 高脂肪食摂取マウスへの snPt 投与による致死毒性

RD、および HFD マウスに対し、snPt1 (Lot : 11080401) 及び、snPt8 (Lot : 11062901) を 0、7.5、10 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に週 2 回、4 週間投与して、生存率を確認した。

RD、および HFD マウスに対し、snPt1、および snPt8 を 10 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に投与した。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 による炎症反応誘導の指標として血清中の炎症性サイトカインである IL-6 値の測定を行った。

C. 研究結果 (結果は D 項にまとめて記載)