

フラーレンの子宮内膜症に対する効果についての研究

研究分担者 齋藤 滋 国立富山大学 産科婦人科研究室

研究要旨

子宮内膜症は、病理学的には良性疾患であるが疼痛や不妊の原因となること、また卵巣癌の発生源地になることから、女性の健康を著しく損なう疾患として注目されている。炎症性物質が病変中心に発現することから、子宮内膜症は炎症性疾患と捉えることができ、炎症の抑制が同疾患の治療になりうる可能性がある。

今年度、我々は抗炎症作用を有するナノマテリアルであるフラーレンを、子宮内膜症マウスモデルに投与した。フラーレンの生体への作用には至適濃度（0.19-1.67 mg/kg）が存在する可能性が示唆された。

A. 研究目的

子宮内膜症は、病理学的には良性疾患であるが疼痛や不妊の原因となること、また卵巣癌の発生源地になることから、女性の健康を著しく損なう疾患として注目されている。また、女性ホルモンであるエストロゲンは本疾患の増悪因子であることが知られている。そのため、生殖年齢女性に好発する疾患であり、罹患率は生殖年齢女性の10%と言われ、女性のライフスタイル向上のためには、是非とも制御すべき疾患と言える。これまで、子宮内膜症を「ホルモン依存性疾患」として捉えることで、女性ホルモンの制御が炎症制御に繋がるという概念の下、GnRH アナログ療法やピル等によるホルモン療法が主体であった。しかし、本疾患は生殖年齢女性に好発し、不妊症を合併することが多い。ホルモン療法は排卵を抑制することから、子宮内膜症治療と不妊治療は同時には成り立つことができない。そこで従来のホルモン療法とは違った視点から子宮内膜症を捉える必要がある。

近年、子宮内膜症は骨盤内における「慢性炎症性疾患」としても捉えられおり（文献1）、我々

は炎症の制御が子宮内膜症の治療に繋がることを示してきた(文献2)。具体的には、子宮内膜症マウスモデルに抗炎症作用を有する p38MAPK 阻害剤を投与することで、腹腔内の炎症性サイトカイン（IL-6）を減少させ、また子宮内膜症様病が縮小することを認めた（文献2）。

今年度、我々は抗炎症作用を有するナノマテリアルであるフラーレンをマウス子宮内膜症モデルに用い、フラーレンが子宮内膜症の治療薬になりうるかを検討した。

B. 研究方法

以下の実験は富山大学倫理委員会の承認下に、実験を行った。

ドナーマウスの子宮をレシピエントマウスに投与し子宮内膜症様病変を誘導する子宮内膜症モデルを使用して実験を行った。子宮内膜症の移植説を模した動物モデルであり、実験モデルとして確立したものである（図1）。

同マウスモデルに control（生食）、フラーレン、を子宮内膜投与前日より隔日で腹腔内投与し、3週間後に腹腔内にできた子宮内膜症様病変重量

を評価した。フラレン濃度は 0.19-5mg/kg とした。実験は 2 回施行した。

C. 研究結果

実験 1 回目

図 2 に示す通り、フラレンの 0.19 mg/kg、0.56 mg/kg、1.67 mg/kg 投与群ではマウス子宮内膜症様病変重量はコントロール（生食）投与群と比べて縮小傾向にあった。フラレン 5 mg/kg と高濃度では病変の縮小効果は見られない傾向にあった。コントロールのマウス数が N = 2 と減少してしまったため、統計学的検討は行うことができなかった。

実験 2 回目

実験 1 回目を参考に、フラレンの量を 0.02-1.67 mg/kg 投与に設定した。図 3 にしめすようにフラレン投与群とコントロール群との間に子宮内膜症様病変の重量差を認めなかった。

D. 考察

これまで我々は、子宮内膜症の発症および進展に影響を与える種々の因子について、正常マウスやノックアウトマウスを用いた子宮内膜症モデルを作成し、検討を行ってきた（文献 2）。ナノマテリアルであるフラレンは抗炎症作用を有することから、炎症性疾患等に対して応用できる可能性を有している。そこで、本年度は同マウスモデルにフラレンを用い、*in vivo* による検討を行った（図 2、3）。結果の再現性の問題があり、またサンプル数が少ないため、統計的な検討を行うことができなかったが、フラレンは低濃度では子宮内膜症様病変を縮小させる可能性が示唆された。フラレンは高濃度では逆に、炎症誘導に作用することが知られおり（大阪大薬理学 吉岡先生 personal communication）、今回の実験 1 回目の結果に合致するものであった。

今後、フラレンの子宮内膜症モデルに対する

効果に関して、再実験を行う必要がある。

<引用文献>

- 1) Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* 2001;75:1-10.
- 2) Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Ruimeng X, Na L, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. FR 167653, a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, suppresses the development of endometriosis in a murine model. *J Reprod Immunol.* 2006 Dec;72(1-2):85-93

E. 結論

フラレンは低濃度ではマウス子宮内膜症様病変を縮小させる可能性が示唆されたが、再現性に問題があり、更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

① 論文発表

1. Santoso EG., Yoshida K., Hirota Y., Aizawa M., Yoshino O., Kishida A., Osuga Y., Saito S., Ushida T., Furukawa KS. : Application of detergents or high hydrostatic pressure as decellularization processes in uterine tissues and their subsequent effects on *in vivo* uterine regeneration in murine models., *PLoS One.*, 9:e103201, 2014.
2. Urata Y., Koga K., Hirota Y., Akiyama I., Izumi G., Takamura M., Nagai M., Harada M., Hirata T., Yoshino O., Kawana K., Fujii T., Osuga Y. : IL-1 β increases expression of tryptophan 2,3-dioxygenase and stimulates

tryptophan catabolism in endometrioma stromal cells., Am J Reprod Immunol., 72:496-503, 2014.

3. Akiyama I., Yoshino O., Osuga Y., Shi J., Takamura M., Harada M., Koga K., Hirota Y., Hirata T., Fujii T., Saito S., Kozuma S. : The role of bone morphogenetic protein 6 in accumulation and regulation of neutrophils in the human ovary., Reprod Sci., 21:772-7, 2014.
4. Akiyama I., Yoshino O., Osuga Y., Shi J., Harada M., Koga K., Hirota Y., Hirata T., Fujii T., Saito S., Kozuma S. : Bone morphogenetic protein 7 increased vascular endothelial growth factor (VEGF)-a expression in human granulosa cells and VEGF receptor expression in endothelial cells., Reprod Sci., 21:477-82, 2014.
5. Ogura-Nose S., Yoshino O., Akiyama I., Hirota Y., Hirata T., Harada M., Hiroi H., Koga K., Saito S., Osuga Y., Fujii T. : Serum concentration of bone morphogenetic proteins (BMPs) is not linked to serum anti-mullerian hormone (AMH) level., Integrative Molecular Medicine, 1:26-8, 2014.
6. Ono Y., Yoshino O., Ito M., Soeda S., Shima T., and Saito S. : A first case report of torsion of the substituted small intestine 39 years after vaginoplasty using ileum segment., Med J Obstet Gynecol, 2:1041, 2014.

【総説・その他】

1. 吉野 修, 齋藤 滋 : 治療を見据えた子宮筋腫の画像評価 MRI,特に動画MRIによる評価について, 臨床婦人科産科, 68(2),

202-8, 2014.

2. 吉野 修, 齋藤 滋 : 不妊症と子宮筋腫, 産婦人科の実際, 63(10), 1387-91, 2014.
3. 吉野 修, 齋藤 滋 : 特集CT、MRI戦略的活用ガイド, medicina, 51(11), 336-7, 2014.
4. 吉野 修, 齋藤 滋 : 子宮因子による不妊, 産婦人科の実際, 63(11), 1535-9, 2014.
5. 吉野 修, 高村将司, 甲賀かをり, 大須賀穰, 齋藤 滋 : 子宮内膜症治療の未来図 手術と薬物療法のコンビネーション, 臨床婦人科産科, 68(12), 1183-7, 2014.

② 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 1 件】

1. 吉野 修 : 不妊における諸問題 基礎的見地から卵巣生理・病理学における顆粒膜細胞と周辺細胞との関連についての検討., 第 29 回日本生殖免疫学会総会・学術集会シンポジウム, 2014 年 12 月.

【国内学会発表 : 合計 2 件】

1. 吉野 修, 秋山育美, 大須賀穰, 甲賀かをり, 原田美由紀, 齋藤 滋, 藤井知行 : 顆粒膜細胞から産生される Growth differentiation factor (GDF)-3 は bone morphogenetic protein (BMP) サイトカインにより誘導され、BMP による LH 受容体発現低下をキャンセルする., 第 66 回日本産婦人科学会総会., 2014 年 4 月.
2. 吉野 修, 能瀬さやか, 副田 翔, 西井 修, 河村寿宏, 齋藤 滋 : 40 歳以上の初回 IVF-ET 症例における血中 anti-Müllerian hormone (AMH) の意義に関する検討, 第 62 回北日本産科婦人科学会 総会・学術講演会., 2014 年 9 月.

【国際学会発表 : 合計 1 件】

1. Yoshino O., Ogura-Nose S., Akiyama I.,

Osuga Y., Fujii T., and Saito S. : AMH is induced by bone morphogenetic proteins (BMP) cytokines in human granulosa cells., 97th ENDO meeting, San Diego, 5-8 March, 2014.

② 実用新案登録
該当無し

その他
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

研究協力者
野本かおり

図 1

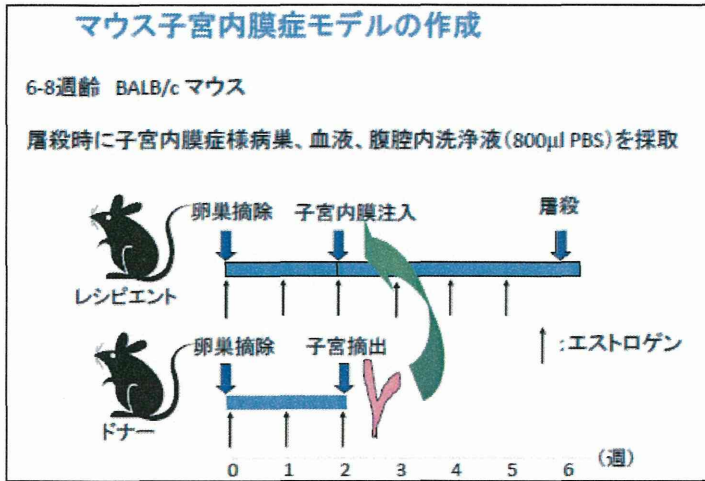


図 2

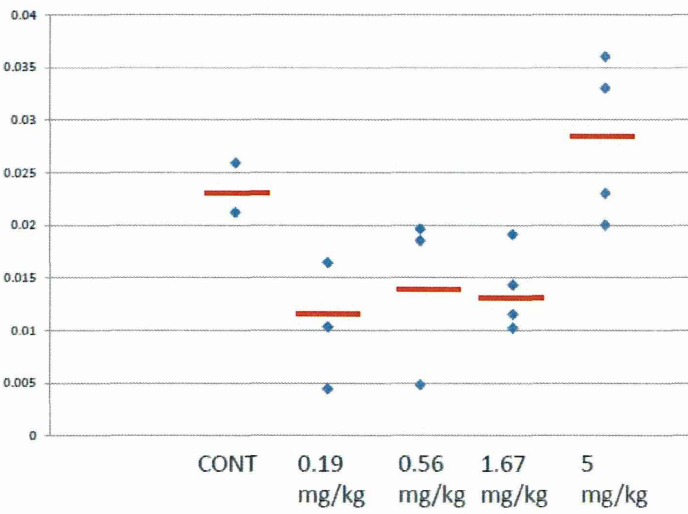
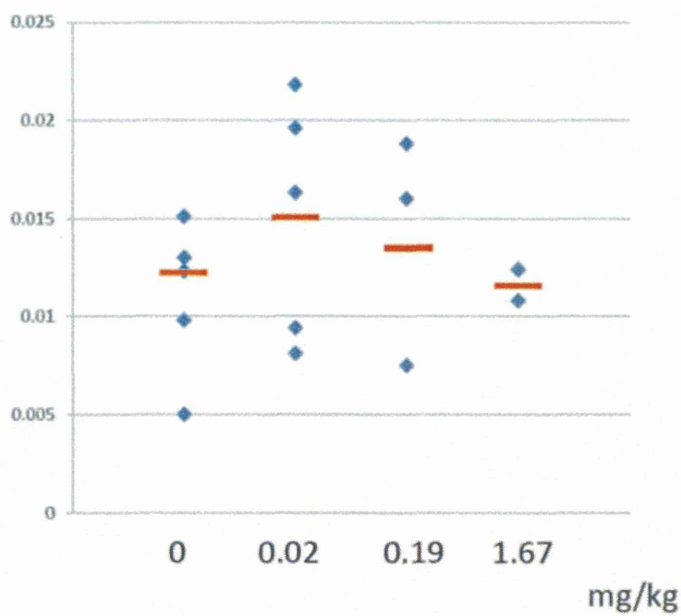


図 3



乳幼仔期および成体期のサブナノ素材曝露による 行動への影響に関する研究

研究分担者 宮川 剛 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 宮川剛研究室

研究要旨

近年、様々なナノ・サブナノ素材が生産され、一般消費者向けの製品に使用されている。これらの素材は皮膚や粘膜などから体内に吸収されると血液-脳関門を通過して脳に移行・蓄積することから、ナノ・サブナノ素材への曝露は脳の機能に何らかの影響を及ぼす可能性があることが指摘されてきた。しかしながら、脳神経系の発達に重要な乳幼児期をはじめ、成人期におけるナノ・サブナノ素材への曝露がその後の情動や認知機能などの脳機能にどのような影響を及ぼすのかについてはこれまで不明であった。そこで、本研究ではこれまでに実験動物であるマウスを用いて、母乳を介した乳幼仔期のサブナノ素材（直径 10nm のサブナノ銀あるいは銀イオン）曝露が脳機能に及ぼす影響を各種行動解析により評価した。前年度までに網羅的行動テストバッテリーで感覚・知覚、運動機能、不安様行動、うつ様行動等について評価を行っているが、今回、これまで実施していなかった認知機能や社会的行動についても解析を進めた。その結果、母乳を介して乳幼仔期にサブナノ銀および銀イオンに曝露されたマウスは、いずれの行動テストにおいても統計的に有意な行動変化が認められなかった。これらの結果は、今回研究に使用したサブナノ素材あるいはその摂取量が乳幼仔期の脳機能の発達に影響を与えるものではないことを示唆している。本研究では続いて、サブナノ銀あるいは銀イオンを経鼻投与すると脳に移行するという知見に基づいて、成体時のマウスにこれらの素材を 4 週間にわたって経鼻投与し、嗅覚機能への影響について解析した。その結果、サブナノ銀および銀イオンの曝露により嗅覚が過敏になる可能性が示された。今後は、今回検討していない行動項目についても解析を進めるとともに、摂取量や摂取方法を比較検討しながら、ナノ・サブナノ素材が脳機能に及ぼす影響を明らかにしていく必要がある。

A. 研究目的

脳神経系は胎生期から乳幼児期にかけて急速に発達するが、この時期に母体を介して間接的に脳内に流入する物質は脳神経系に作用し、脳機能に長期的な影響を及ぼす可能性がある。近年、様々なナノ・サブナノ素材が生産され、一般消費者向けの製品に利用される機会が拡大している。そのような微小な物質は、皮膚や粘膜などから吸収され、脳に移行することが知られている。しかし、脳神経系の発達に重要な胎生期・乳幼児期をはじめ、成人期でのナノ・サブナノ素材への曝露が脳の機能にどのような影響を及ぼしているの

か検討した研究はほとんどない。そこで、我々はこれまでに、実験動物のマウスを用いて、母胎を介した胎生期のナノ・サブナノ素材（非晶質ナノシリカである nSP70、あるいはサブナノ白金である snPt1、snPt8）曝露が次世代の脳機能の発達に及ぼす影響について網羅的行動テストバッテリーを用いて評価した。その結果、胎生期の非晶質ナノシリカあるいはサブナノ白金曝露が成長後の不安様行動やうつ様行動、社会的行動などに影響を及ぼすことを明らかにした。しかしながら、母乳を介した乳幼仔期のサブナノ銀（nAg10）あるいは銀イオン（Ag⁺）の曝露についてはこれま

で十分な検討が行われてきていなかった。前年度までに母乳を介してサブナノ銀 (nAg10) あるいは銀イオン (Ag⁺) の曝露した個体について、成育後に網羅的行動テストバッテリーで解析を行ったところ、感覚・知覚、運動機能、不安様行動やうつ様行動、痛覚感受性などには曝露の影響は見られなかった。本年度はさらに追加で、乳幼仔期のサブナノ銀あるいは銀イオンの母乳を介した曝露が認知機能および社会的行動に及ぼす影響について評価することを目的として、恐怖条件づけテストおよびホームケージ内社会的行動テストを実施した。さらに、成体期におけるサブナノ銀曝露あるいは銀イオン曝露がその後の行動にどのような影響を及ぼすのか検討するため、経鼻からの曝露を試みた。経鼻曝露は嗅覚機能に影響を及ぼす可能性があることから、本研究ではまず埋没餌探索テスト (Buried food test) を実施し、嗅覚機能の評価を行った。

B. 研究方法

1. 被験体

乳幼仔期における母乳を介した曝露実験では、BALB/c 系統の授乳中の母親マウスとその仔である雄マウスを使用した。成体期における経鼻による曝露実験では、8 週齢の C57BL/6J 系統の雄マウスを使用した。

2. サブナノ素材への曝露

乳幼仔期の曝露実験では、曝露群の授乳中マウスに直径 10nm のサブナノ銀 (nAg10) あるいは銀イオン (Ag⁺) 溶解液を水瓶から自由に摂取させ、母乳を介して乳幼仔期のマウスに曝露した。授乳中マウスの摂取量は、1 日あたり 0.1 mg/kg あるいは 0.5 mg/kg になるように調整し、産後 21 日目まで摂取させた。統制群の授乳中マウスには、通常の飲用水を与えた。雄の仔は、21 日齢で離乳した後、1 ケージあたり 4 匹で集団飼育した。仔マウスは 10 週齢以降に、網羅的行動テストバッテリーによって行動特性を評価され、そ

の後さらに恐怖条件づけテストとホームケージ内社会的行動テストによってそれぞれの行動を評価された。

成体期の曝露実験では、曝露群の成体の雄マウスの鼻粘膜に nAg10 あるいは Ag⁺溶解液を 4 週間にわたって毎日投与した (5 µg/mouse/day)。統制群のマウスの鼻粘膜には溶媒液を投与した。各群のマウスは、投与 29 日目に埋没餌探索テストを受けた。

3. 行動の評価

行動実験開始 30 分前までにマウスの入ったケージを飼育室から行動実験用防音室に移し、被験体を実験室環境に馴化させた。その後、以下の行動テストを実施した。

3-1. 恐怖条件づけテスト

マウスを四角箱に入れ、条件刺激としてホワイトノイズ (55 dB) を 30 秒間呈示し、最後の 2 秒間に無条件刺激として床の金属製グリッドから電気ショック (0.3 mA) を与えた。この条件刺激-無条件刺激を計 3 回、マウスに対呈示した (条件づけ)。その 24 時間後、マウスを同じ四角箱に 5 分間入れ、すくみ反応の時間を測定した (文脈記憶テスト)。さらにその後、マウスを三角箱に入れてから 3 分後、条件刺激のホワイトノイズを 3 分間呈示し、すくみ反応時間を測定した (手がかり記憶テスト)。条件づけから約 1 ヶ月後、同様に文脈記憶テストと手がかり記憶テストを実施した。

3-2. ホームケージ内社会的行動テスト

別々のケージに飼育されていた同群のマウス 2 匹をペアにして、ホームケージ内に入れ、1 週間の間、24 時間にわたってホームケージ内での 2 個体による社会的行動と活動量を測定した。

3-3. 埋没餌探索テスト (Buried food test)

経鼻投与 24-27 日目に、マウスにテスト用の餌を

与え、その餌に馴化させた。投与 28 日目に、餌を取り出し、マウスを絶食させた。およそ 24 時間後、ケージ内の床敷に餌を埋め、マウスがその餌を発見するまでの時間を測定することにより嗅覚機能を評価した。

C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

D. 考察

乳幼仔期に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオンに曝露された雄の仔は、通常の飲用水により飼育された母親マウスに授乳された統制群の仔と比較して、恐怖条件づけテストにおけるすくみ反応の時間に有意な差は認められず、文脈記憶ならびに手がかり記憶には両群間に違いがないことが示唆された（図 1A-C）。また、その 1 ヶ月後に再テストしたところ、同様に群間に有意な差は見られず、文脈記憶および手がかり記憶の長期的な保持機能にも違いがないことが示唆された。なお、両群間には電気ショックに対する反応にも統計的に有意な差はなく、痛覚感受性にも違いがないことが示唆された（図 1D）。さらに、ホームケージ内での社会的行動や活動量を測定した結果、いずれの指標にも群間に有意な差は認められなかった。これらの結果から、BALB/c 系統の雄マウスにおいて、生後 3 週齢までの乳幼仔期に 1 日あたり 0.1 mg/kg あるいは 0.5 mg/kg のサブナノ銀あるいは銀イオンへの曝露は行動レベルでの脳機能に影響を及ぼすものではないことを示唆している。

一方、成体期にサブナノ銀あるいは銀イオンを経鼻曝露された C57BL/6J のマウスでは、埋没餌探索テストの結果、床敷きに埋められた餌を見つけるまでの時間が有意に短く、嗅覚機能がコントロール群に比べて敏感になっていることが示唆された。これらの結果は、サブナノ銀あるいは銀イオンが投与時期あるいは投与経路などに応じて脳機能に異なる影響を及ぼすことを示している。

E. 結論

本研究では、これまでナノ・サブナノ素材の安全性評価研究において手つかずであった乳幼仔期および成体期でのナノ・サブナノ素材曝露が情動・認知機能・社会的行動などに及ぼす影響について評価した。今回、サブナノ素材の 1 つであるサブナノ銀あるいは銀イオンを乳幼仔期のマウスに曝露したが、そのマウスの行動はいずれの評価項目においても曝露による影響が認められず、母乳を介したサブナノ銀あるいは銀イオンの曝露は成長後の脳機能に影響しないことが示唆された。しかしながら、今回の結果は、サブナノ素材の摂取量が行動変化を引き起こすには十分ではなかった可能性や、元々不安傾向が高く、学習・記憶機能が低い BALB/c 系統を用いて毒性評価を行うことによって効果が検出されなかった可能性があるという点を考慮する必要がある。今後は、曝露量や被験体の系統、実験手続きなどを考慮し、ナノ・サブナノ素材曝露が行動に影響を及ぼす影響について検討する必要があると考えられる。一方で、成体期の経鼻曝露が嗅覚機能に影響するという結果を得ることができた。今後は、同様の方法を用いて、嗅覚機能以外の各種脳機能に対する曝露の影響について検討する予定である。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

① 論文発表

該当無し

【総説・その他】

該当無し

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 0 件】

該当無し

【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

自然科学研究機構 生理学研究所 行動代謝分子解析センター 行動様式解析室（職員 2 名）：
高雄啓三特任准教授、腰高由美恵特任専門員

藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 システム医科学研究部門（職員 3 名）：昌子浩孝研究員、服部聡子助教、高宮義博研究補助員

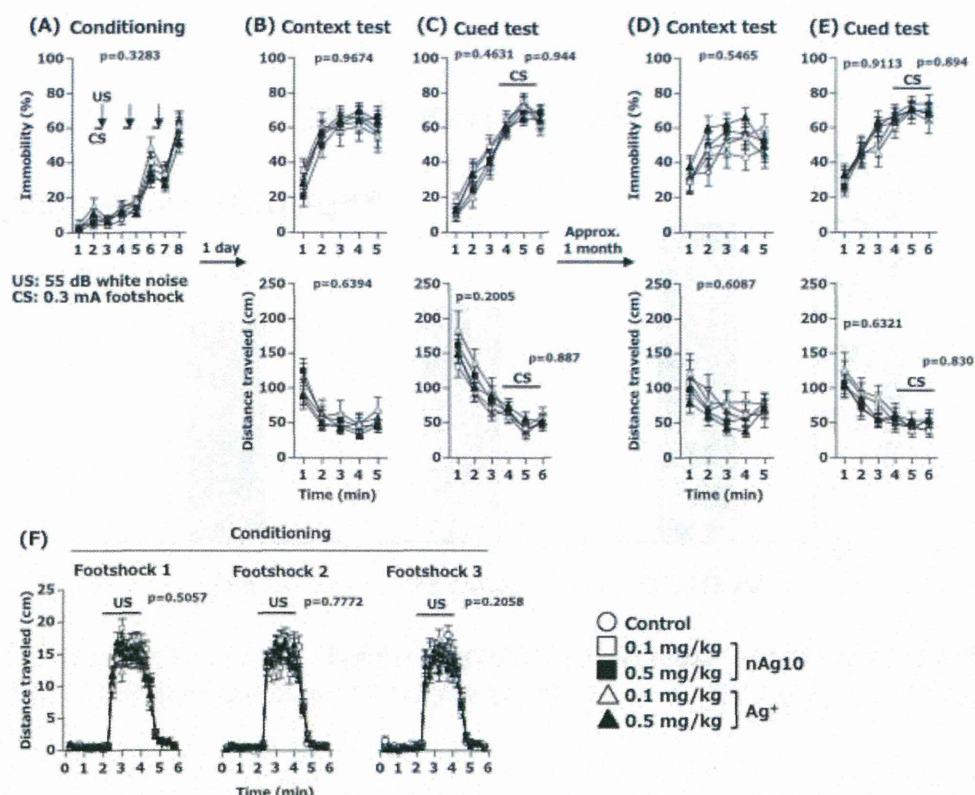


図1. 母乳を介したサブナノ銀あるいは銀イオン曝露の記憶への影響。 サブナノ銀あるいは銀イオンをBALB/c系の授乳中マウスに経口投与し、母乳を介して仔マウスに曝露し、その後、恐怖条件づけテストを行った。(A) 恐怖条件づけ：マウスを四角箱に入れた後、条件刺激（ホワイトノイズ、55dB）と無条件刺激（電気ショック、0.3mA、2秒間）を対呈示し、それらの刺激に対する恐怖記憶を形成させた。(B) 文脈記憶テスト：24時間後に四角箱に入れ、すくみ反応を指標に文脈記憶を評価した。(C) 手がかり記憶テスト：三角箱に入れて条件刺激を呈示し、すくみ反応を指標に手がかり記憶を評価した。(D-E) 保持テスト：1ヶ月後に文脈記憶・手がかり記憶テストを再実施し、恐怖記憶の保持の程度を評価した。(F) 痛覚感受性の評価：電気ショック負荷中の移動活動量を元に痛覚感受性を評価した。

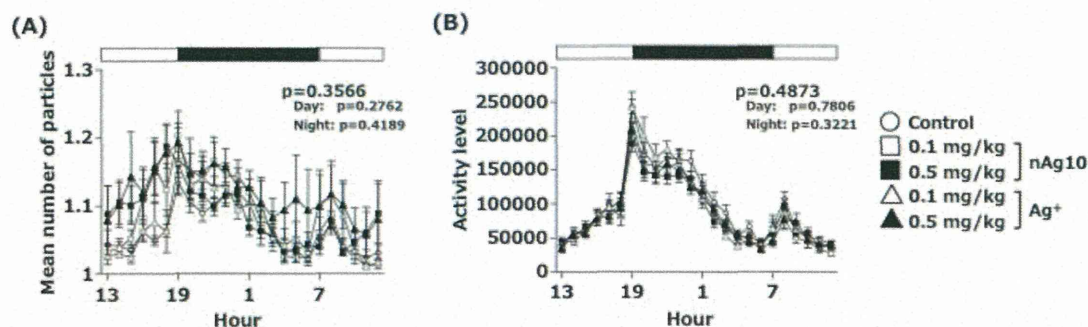


図2. 母乳を介したサブナノ銀あるいは銀イオン曝露のホームケージ内社会的行動への影響。 サブナノ銀あるいは銀イオンをBALB/c系の授乳中マウスに経口投与し、母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオンに曝露された仔マウスの成長後のホームケージ内社会的行動を評価した。同群の2匹をペアにしてホームケージの中に入れ、24時間にわたり連続1週間行動をモニタリングした。図は最終3日間のデータを平均したものである。(A) 社会的行動：2個体が接触している場合は「1」、接触していない場合は「2」と評定した。(B) 移動活動量：2個体の活動量を測定した。

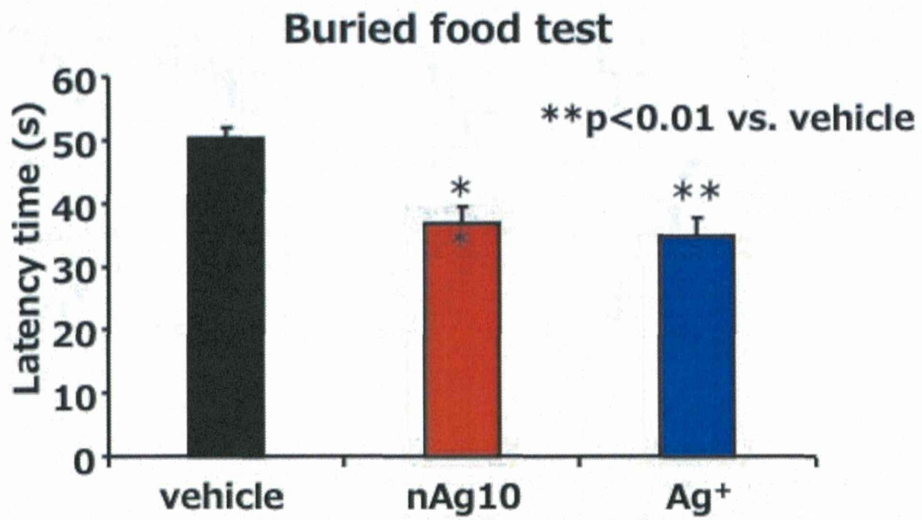


図3. 成育後のサブナノ銀あるいは銀イオン曝露の嗅覚機能への影響。サブナノ銀あるいは銀イオンを成体期のC57BL/6J系マウスに28日間経鼻投与し、その後、埋没餌探索テスト (Buried food test) により嗅覚機能の評価した。

角質バリア除去後のナノ銀を用いた ラット急性経皮投与毒性試験に関する研究

研究分担者 桑形 麻樹子 一般財団食品薬品安全センター秦野研究所 毒性部病理学研究室

研究要旨

これまでに我々は粒子径 10-50 nm の表面未修飾のナノ銀 (1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 28 日間経皮投与 (6 時間/日)、あるいは粒子径 5-10 nm の表面がクエン酸修飾されたナノ銀 (1 mg/mL) を 24 時間連続貼付し、ナノ銀の体内分布を調べてきた。その結果、いずれの粒径のナノ銀においても、投与部位である皮膚にのみにナノ銀は検出され、一般毒性的な影響も認められないことを明らかにしている。

今年度は、皮膚表面バリアを破壊したときに、ナノ銀の皮膚透過性がどう変わるかを検討した。ラット皮膚背部をテープストリッピング (TP) あるいはアセトン清拭 (AC) により皮膚バリアを変化させた後に、粒子径 5 nm の表面がクエン酸修飾されたナノ銀 (1 mg/mL) を 24 時間連続貼付し、ナノ銀の生体内動態 (皮膚、肝臓、血液) を投与翌日 (1 日)、2 日、5 日に ICP-MS 分析により検討した。その結果、TP あるいは AC 処理により皮膚バリアを破壊しても、ナノ銀は皮膚にのみ検出され、血液および肝臓中では検出限界以下であった。しかし、陽性対照として設置した銀イオン群では、TP 処理により皮膚以外に肝臓に僅かであるが銀が確認された。なお、肝臓での銀も経時的に消失傾向を示した。血液中には銀は検出されなかった。一般状態、体重推移、器官重量、血液学検査、血液生化学検査、病理組織学検査にはナノ銀投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。

以上の結果から、クエン酸修飾した粒径 5 nm のナノ素材の銀を 24 時間ラット背部に経皮投与した結果、皮膚バリアを破壊してもナノ銀は生体内には移行しないことが確認された。イオン化したナノ銀は皮膚バリアが正常ではない場合に皮膚を透過し生体内に分布する可能性が示唆されたが、急性毒性を示唆する結果は認められなかった。

A. 研究目的

皮膚バリアが破壊された時の経皮投与によるナノ銀の生体内分布を検討するために、皮膚バリアを 2 つの手法により破壊し、粒径 5 nm のナノ銀を 24 時間ラット背部皮膚に貼付し、皮膚、肝臓および血液内のナノ銀の分布および皮膚の形態学的変化を調べた。

B. 研究方法

1. 被験物質および投与方法

被験物質は nanoComposix 社から購入した 5 nm 径 (Citrate Biopure™ Silver, 1 mg/mL 、Lot no. MGM2206) のクエン酸表面修飾したナノ素材の銀を用いた。また、対照群として被験物質の溶媒である 2 mM クエン酸水を、陽性対照群として銀イオン液 (0.1M 硝酸銀溶液を日局注射用水で希釈して、銀イオン濃度として 1 mg/mL に調製) を設定した。

ナノ銀の投与量は、入手検体をそのまま用いて 1 mg/mL とした。ナノ銀は投与直前まで 4℃にて

保管し、ボルテックスミキサー（KMC-1300V、Vision Scientific.Co.LTD.）で 30 秒撹拌した後、直ちに投与に用いた。

2. 皮膚バリアの破壊

皮膚バリアの破壊にはテープストリッピング（TP）法およびアセトンによる皮脂除去（AC）法を用いた。即ち、バリカンおよびシェイバーにて背部皮膚を剃毛し、セロハンテープにて 20 回、背部皮膚表面を剥離させる処理を投与直前に 1 回実施した（TP）TP 処理群と、剃毛後にアセトン清拭を 1 日 1 回、連続 4 日間実施した AC 処理群を設けた。

3. 投与方法

TP 処理群および AC 処理群に、溶媒投与群（2 mM クエン酸溶液、対照群）、ナノ銀投与群（5 nm Ag, 1 mg/mL）および銀イオン投与群（AgNO₃, 1 mg/kg）の 3 群に設定した。加えて、TP 処理群では、TP 処理を施さないナノ銀投与群（TP-）も設けた。

投与は、化粧品、塗装、剥離した物質として経皮的に吸収された場合の毒性を検討するために背部に閉塞貼付した（経皮投与）。テガダーム（非吸収性フィルム）に 3x3 cm のリント布を置き、リント布上に被験物質を滴下（2 mL/kg 体重）した後、皮膚にリント布およびテガダームを貼付し、プラスチックラップを巻いて被覆固定した。その上に粘着フォームパットおよび伸縮性粘着包帯を巻き、固定した。

投与時間は 24 時間とした。なお、投与日の朝に前処理を実施した後、体重を測定し、体重値を基に投与液量を算出して午後から投与した。

陽性対照群である銀イオン（Ag⁺）群は、ナノ銀群と同様に投与した。

群構成は図 1 に示す。

4. 動物および飼育条件

動物は 6 週齢の雄 SD 系ラット（CrI:CD(SD)SPF）

を購入し、温度（21.0～25.0℃）および湿度（40.0～75%）、換気回数（約 15 回/時間）、明暗サイクル（7 時～19 時まで点灯）が統御された飼育室に金属製金網床ケージ（SD 系ラット）にて個別に飼育し、固型飼料（CE-2、日本クレア株）および水道水を自由に摂取させた。約 1 週間の検疫・馴化期間の後、検疫終了時の体重を基に 7 群に群分けした。投与開始時週齢は 7 週齢である。

5. 観察

TP 処理群および AC 処理群の実験スケジュールは図 1 に示した。

体重測定を行うとともに、TP 処理群ではナノ銀暴露後、経時的に解剖をして、皮膚、肝臓、血液を採取し、組織中銀測定、病理組織学検査および血液生化学検査を実施した。また、投与 5 日の解剖前日に絶食を施し、器官重量、血液学および血液生化学検査も合わせて行った。AC 処理群では、24 時間の投与終了後（投与 2 日）に剖検し、組織中の銀測定および病理組織学検査を行った。組織中の銀測定は ICP-MS 分析にて検出限界 0.05 ppm で行った（日本食品分析センターにて実施）。

C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

D. 考察

1. 皮膚バリア破壊による皮膚の変化

TP 処理および AC 処理直後の皮膚変化を図 2 に示す。TP 処理により、角質層はほぼ除去され、角化細胞の変性も観察された。AC 処理により、表皮は軽度に肥厚したが角質層は菲薄化し、ケラトヒアリン顆粒は減少、細胞核を失わない不完全角化（錯角化）が観察された。

TP 処理と AC 処理を病理組織学的に比較すると、AC 処理の皮膚変化の方が、TP 処理と比較して軽度であった。

2. 皮膚バリア破壊によるナノ銀の皮膚への影響

(1) TP 処理

TP 処理後にナノ銀あるいは Ag+ を 24 時間貼付後(投与 2 日)、投与 3 日、投与 5 日の背部皮膚肉眼写真(各群代表例)を **図 3** に示した。投与 2 および 3 日にはナノ銀投与群には TP 処理の有無に関係なく皮膚の黒色化が観察された。投与 5 日には、いずれの群の貼付皮膚部位に肉眼的変化に差はみられなかった。

TP 処理後のナノ銀投与皮膚病理学検査 (**図 7**) および組織写真(各群代表例、**図 4**)を示した。投与 2 および 3 日では、TP 処理により、表皮ではケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化、痂皮、表皮の肥厚、細胞間の水腫が軽度であるが観察された。真皮では炎症細胞浸潤、線維芽細胞の増生、出血がごく軽度であるが観察された。また、ナノ銀および銀イオン投与により、表皮表面に褐色色素の付着がみられた。投与 5 日では、TP 処理による変化はほぼ回復し、褐色色素の付着もみられなかった。各群間の回復性に差は認められなかった。

(2) AC 処理

AC 処理後にナノ銀あるいは Ag+ を 24 時間貼付後(投与 2 日)の背部皮膚肉眼写真(各群代表例)を **図 5** に示した。AC 処理後のナノ銀投与皮膚病理学検査 (**図 8**) および組織写真(各群代表例、**図 6**)を示した。

投与 2 日の銀イオン投与群の皮膚で皮膚の黒色化が肉眼的に観察された。

組織学的には褐色色素の付着がナノ銀および銀イオン投与群でみられた。また、全投与群でケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化がみられたが、限局的であり、群間にも差はなかった。

3. 組織中銀濃度 (ICP-MS 分析)

皮膚、肝臓および血液中の銀濃度を **図 9** に示した。

皮膚では対照群を除くすべての群で銀が検出された。肝臓では、TP 処理をした銀イオン投与群のみで銀が検出された。血液ではいずれの投与

群においても検出限界 (0.05 ppm) 以下であった。また、TP 処理群で投与 2 日と 5 日を比較すると、いずれの投与群も投与 2 日よりも投与 5 日のほうが銀濃度は低値を示した。

4. 皮膚バリア破壊下でのナノ銀暴露による全身毒性

(1) 体重推移(**図 10**)

TP および AC 処理群ともに 24 時間にあたる閉塞貼付により、対照群を含む全ての群において体重が減少した。しかし、体重の減少の程度に群間に差はなく、解剖時での体重値にも群間に差はなかった。

(2) 血液学検査 (TP 処理群、投与 5 日)

TP 処理群の投与 5 日に実施した血液学検査の結果を **図 11** に示した。TP 処理したナノ銀投与群および銀イオン投与群の MCV および MCH が高値を示したが、その変化は僅かであること、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値には差はないことから、ナノ銀あるいは銀イオン投与による変化ではないと判断した。

(3) 血液生化学検査 (TP 処理群)

TP 処理群の投与 2 日、3 日および 5 日に実施した血液生化学検査の結果を **図 12** に示した。投与 2 および 3 日にはナノ銀あるいは銀イオン投与による影響は認められなかった。投与 5 日では銀イオン投与群においてグルコース濃度の有意な減少がみられた。しかし、体重推移、肝臓の病理組織学検査に対照群との間に差はなかった。本実験では、銀の試料汚染を防ぐために銀イオン群の解剖が最後になったことから、対照群の解剖実施時間との差が 2 時間あった。したがって、銀イオンによる影響ではなく、絶食時間の差に起因した変化と推察された。

(4) 血液生化学検査 (AC 処理群)

AC 処理群の投与 2 日に実施した血液生化学検

査の結果を図 13 に示した。ナノ銀および銀イオン投与群においてグルコース濃度が減少したが、その程度は僅かであり、病理組織学検査において肝臓に投与による変化は認められなかったことから、ナノ銀および銀イオンによる変化ではないと判断した。

(5) 器官重量 (TP 処理群)

TP 処理群の投与 2 日、投与 3 日、投与 5 日に実施した解剖時の器官重量を図 14 に示した。投与 2 および 3 日の肝臓重量にはナノ銀あるいは銀イオン投与による影響は認められなかった。投与 5 日の腎臓比体重値がナノ銀および銀イオン群で有意に低値を示したが、病理学組織検査には変化はなく、血液生化学検査においても腎障害を示唆する変化は認められていないことから、ナノ銀あるいは銀イオン投与による影響ではなく、わずかに解剖時体重の高値に起因した変化と考えられた。

(6) 器官重量 (AC 処理群)

AC 処理群の投与 2 に実施した解剖時の器官重量を図 15 に示した。AC 処理群では肝臓重量にナノ銀あるいは銀イオン投与による影響はなかった。

(7) 病理組織学検査 (TP 処理群)

TP 処理群の投与 2 日、投与 3 日、投与 5 日に実施した病理組織学検査の結果を図 16 に示した。肝臓、腎臓、脾臓、副腎にはナノ銀あるいは銀イオン投与による変化はなかった。

(8) 病理組織学検査 (AC 処理群)

AC 処理群の投与 2 日に実施した肝臓の病理組織学検査では変化はなかった(図 17)。

E. 結論

皮膚バリアを破壊した本条件下では、5 nm のクエン酸表面修飾系のナノ銀 (100 mg/mL) の

24 時間経皮投与により、ナノ銀は生体内にはほとんど浸透せず (検出限界以下)、皮膚に残留していることが明らかになった。しかし、ナノ銀がイオン化した場合には皮膚を通過し、生体内に分布する可能性が示唆されたが、その量は少なく蓄積性はなく、急性毒性も誘発しないと考えられた。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

① 論文発表

該当無し

【総説・その他】

該当無し

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 0 件】

該当無し

【国内学会発表：合計 1 件】

1. 第 31 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 千葉, 2015 年 1 月.

【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

一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 (職員 2 名) : 斉藤義明、熊谷文明

(1) TP group

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
	↑ TP			↑ Fasting	
	24hr exposure				
Number of animals					
Control TP+	[11]	4	2		5
5 nm Ag TP+	[11]	4	2		5
TP-	[7]	2			5
AgNO ₃ TP+	[11]	4	2		5
Autopsy (ICP-MS analysis)		○	○		○
Systemic toxicity evaluation					○

TP: Tape stripping, Control: 2 mM citric acid solution
Day 1 = 5 nm Ag exposure day

(2) AC group

	T1	T2	T3	T4 (Day 1)	Day 2
	↑ AC	↑ AC	↑ AC	↑ AC	
	24hr exposure				
Number of animals					
Control AC+	[4]				4
5 nm Ag AC+	[4]				4
AgNO ₃ AC+	[4]				4
Autopsy (ICP-MS analysis)					○

AC: Acetone wiping, Control: 2 mM citric acid solution
T1 - T4: AC treatment days
Day 1 = 5 nm Ag exposure day

図 1. 試験デザイン. TP 処理群では、TP 処理後に被験物質を 24 時間閉塞経皮貼付し、経時的(Day 2, 3, 5)に採材した。AC 処理群では、4 回(1 回/日)の AC 処理後に被験物質を 24 時間閉塞経皮貼付し、採材した。

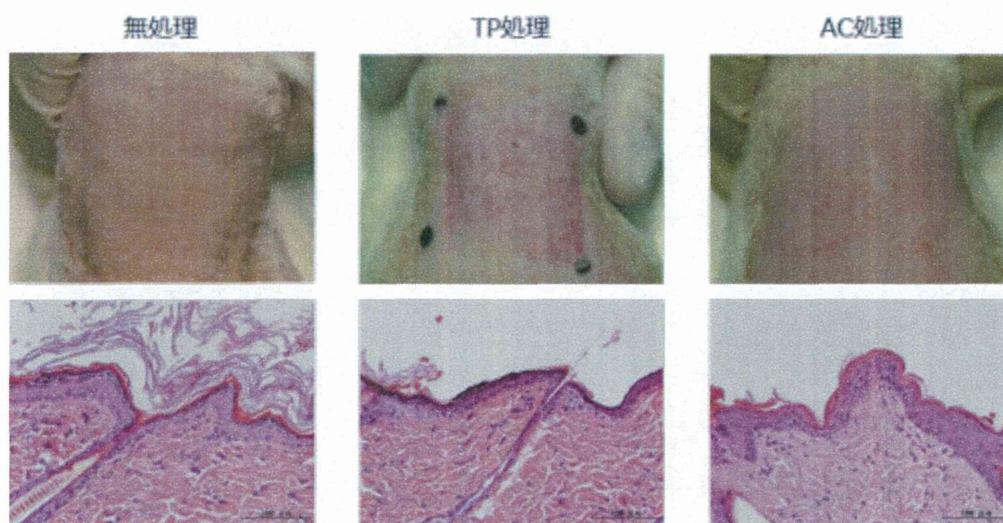
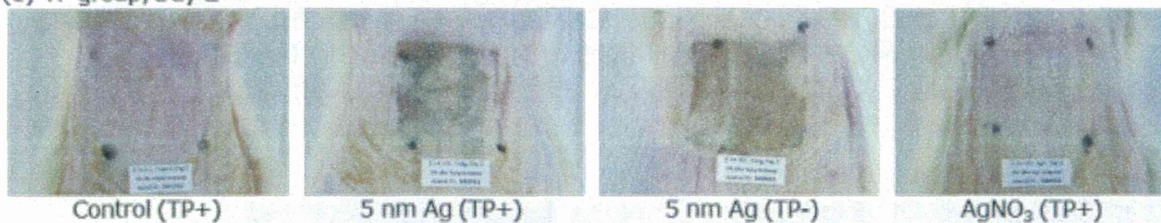


図 2. 皮膚バリア除去後(投与直前)の皮膚の肉眼および組織写真.

TP 処理：角質層はほぼ除去され、一部では角化細胞の変性がみられる。

AC 処理：角質層は菲薄化し、一部では錯角化がみられる。

(1) TP group, Day 2



(2) TP group, Day 3



(3) TP group, Day 5

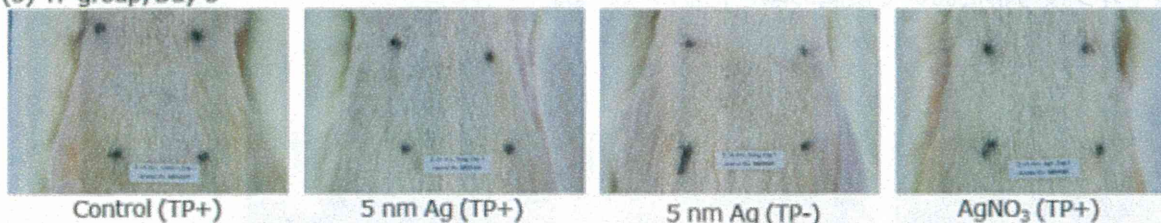
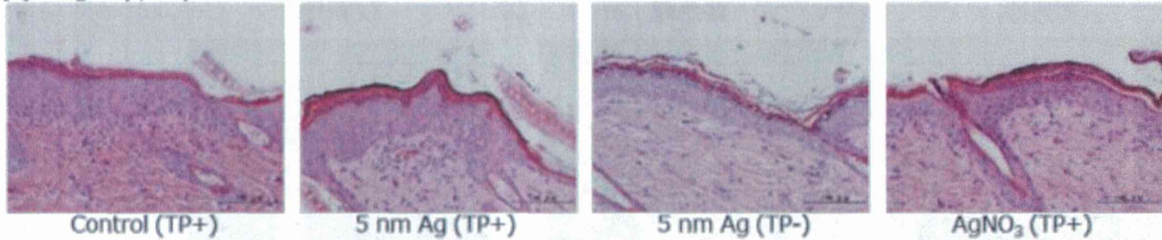


図 3. TP 処理後にナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付した貼付部位皮膚の肉眼写真.
投与 2 日(24 時間貼付後)および 3 日にはナノ銀貼付による皮膚の黒色化がみられたほか、貼付による肉眼的変化は観察されなかった。TP 処理による変化は時間経過と共に回復する傾向がみられ、投与群間の回復性に差は認められなかった。

(1) TP group, Day 2



(2) TP group, Day 3



(3) TP group, Day 5

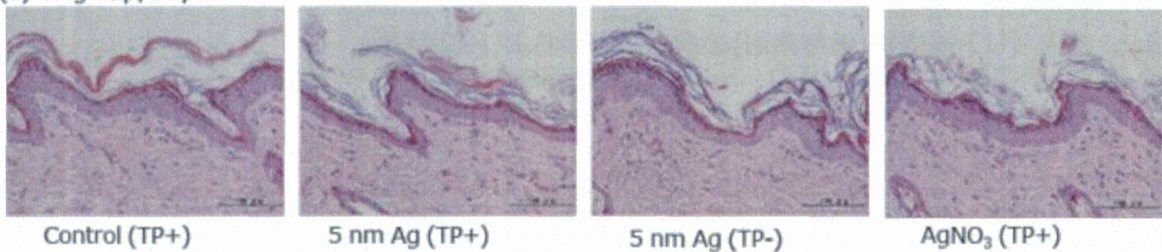


図 4. TP 処理後にナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付した貼付部位皮膚の組織写真.
貼付後 2 日および 3 日(TP+) : ケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化等が全投与群においてみられる。褐色色素の付着がナノ銀および銀イオン投与群においてみられる。
貼付後 5 日 : TP 処理による変化はほぼ回復し、投与群間の回復性に差は認められない。

AC group, Day 2



図 5. AC 処理後にナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付した貼付部位皮膚の肉眼写真.
銀イオン投与群において皮膚の黒色化がみられる。

AC group, Day 2

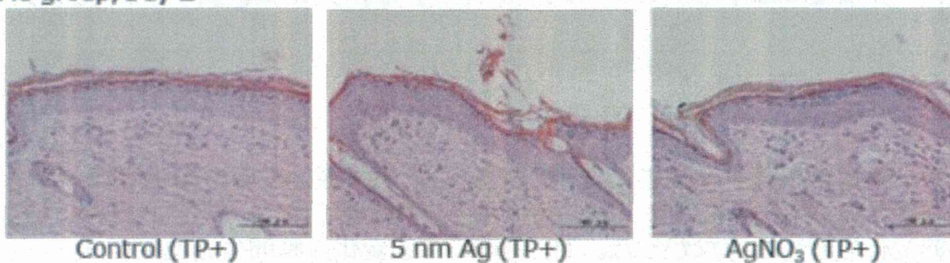


図 6. AC 処理後にナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付した貼付部位皮膚の組織写真.
褐色色素の付着がナノ銀および銀イオン投与群においてみられる。

(1) TP group, Day 2

Findings	Group Pretreatment Grade	Vehicle control				5 nm Ag (1 mg/mL)				AgNO ₃ (1 mg/mL)							
		TP				TP				-							
		-	±	+	2+ 3+	-	±	+	2+ 3+	-	±	+	2+ 3+	-	±	+	2+ 3+
Epidemis																	
Parakeratosis		1	1	2	0 0	0	1	3	0 0	2	0	0	0 0	0	2	2	0 0
Decrease, keratohyaline granule		1	0	1	2 0	0	1	1	2 0	2	0	0	0 0	0	1	1	2 0
Attachment, brown pigment		4	0	0	0 0	0	0	4	0 0	**,#	1	1	0 0	0	1	3	0 0
Crust, focal		1	2	1	0 0	1	2	1	0 0	2	0	0	0 0	0	0	2	1 1
Thickening		0	4	0	0 0	0	4	0	0 0	2	0	0	0 0	0	1	3	0 0
Edema, intercellular		1	3	0	0 0	1	3	0	0 0	2	0	0	0 0	0	1	3	0 0
Dermis																	
Cellular infiltration, inflammatory		1	3	0	0 0	1	2	1	0 0	2	0	0	0 0	0	1	1	2 0
Proliferation, fibroblast		0	4	0	0 0	0	4	0	0 0	2	0	0	0 0	0	0	4	0 0
Hemorrhage		3	1	0	0 0	2	2	0	0 0	2	0	0	0 0	0	2	2	0 0

Notes) -: No abnormal changes ±: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked
 Numerals represent the number of animals.
 **P<0.01: Significantly different from control (Mann-Whitney U test).
 #P<0.05: Significantly different from control (Fisher's exact test).
 Vehicle control: 2 mM citric acid solution
 TP: Tape stripping

(2) TP group, Day 3

Findings	Group Pretreatment Grade	Vehicle control				5 nm Ag (1 mg/mL)				AgNO ₃ (1 mg/mL)			
		TP				TP				TP			
		-	±	+	2+ 3+	-	±	+	2+ 3+	-	±	+	2+ 3+
Epidemis													
Parakeratosis		0	0	1	1 0	0	1	0	1 0	0	0	2	0 0
Decrease, keratohyaline granule		1	1	0	0 0	1	1	0	0 0	1	1	0	0 0
Attachment, brown pigment		2	0	0	0 0	0	1	1	0 0	0	0	2	0 0
Crust, focal		0	0	2	0 0	0	2	0	0 0	0	2	0	0 0
Thickening		0	2	0	0 0	0	2	0	0 0	0	2	0	0 0
Dermis													
Cellular infiltration, inflammatory		1	1	0	0 0	2	0	0	0 0	2	0	0	0 0
Proliferation, fibroblast		0	2	0	0 0	1	1	0	0 0	0	2	0	0 0

Notes) -: No abnormal changes ±: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked
 Numerals represent the number of animals.
 Not significantly different from control.
 Vehicle control: 2 mM citric acid solution
 TP: Tape stripping

(3) TP group, Day 5

Findings	Group Pretreatment Grade	Vehicle control				5 nm Ag (1 mg/mL)				AgNO ₃ (1 mg/mL)							
		TP				TP				-							
		-	±	+	2+ 3+	-	±	+	2+ 3+	-	±	+	2+ 3+	-	±	+	2+ 3+
Epidemis																	
Parakeratosis, focal		1	4	0	0 0	4	1	0	0 0	5	0	0	0 0	#	2	3	0 0
Decrease, keratohyaline granule, focal		5	0	0	0 0	5	0	0	0 0	5	0	0	0 0	0	4	1	0 0
Crust, focal		2	3	0	0 0	4	1	0	0 0	4	1	0	0 0	0	4	1	0 0
Thickening, focal		3	2	0	0 0	5	0	0	0 0	4	1	0	0 0	0	4	1	0 0
Dermis																	
Cellular infiltration, inflammatory, focal		4	1	0	0 0	5	0	0	0 0	5	0	0	0 0	0	5	0	0 0
Proliferation, fibroblast, focal		4	1	0	0 0	5	0	0	0 0	5	0	0	0 0	0	3	2	0 0

Notes) -: No abnormal changes ±: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked
 Numerals represent the number of animals.
 #P<0.05: Significantly different from control (Fisher's exact test).
 Vehicle control: 2 mM citric acid solution
 TP: Tape stripping

図 7. TP 処理群の貼付部位皮膚の病理組織学的変化。貼付後 2 および 3 日では、ケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化等が全投与群においてみられた。その他、褐色色素の付着がナノ銀および銀イオン投与群においてみられた。貼付後 5 日では、錯角化等の TP 処理による変化は限局的となりほぼ回復していた。また、投与群間の回復性に差は認められなかった。