

3. 組織中白金濃度 (ICP-MS 分析)

皮膚、肝臓および血液中の白金濃度を図 6 に示した。白金はナノ白金を投与した皮膚でのみ検出され、TP 処理により多く含有する傾向が認められた。肝臓および血液では検出限界 (0.05 ppm) 以下であった。なお、対照群ではいずれの組織においても検出限界以下であった。

4. ナノ白金粒子の皮膚局在(透過型電子顕微鏡観察)

透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により、TP 処理後の皮膚組織内におけるナノ白金粒子の局在を調べた (図 7)。0.1M リン酸緩衝 2%パラホルムアルデヒド・1.25%グルタルアルデヒド固定液に浸漬固定後、エポキシ系樹脂による樹脂包埋標本作製した。なお、ナノ粒子と生体内粒子を区別するために、四酸化オスミウムによる後固定および電子染色を実施せずに観察した。

その結果、ナノ白金粒子は角質最表層において 1 μ m 程度の深さまで観察されたが、それより深層では認められなかった。

5. 皮膚バリア破壊下での 24 時間ナノ白金経皮暴露による全身毒性

(1) 体重推移(図 8)

24 時間にわ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かった。

(2) 器官重量(図 9)

肝臓、腎臓、脾臓、副腎重量には、対照群と比較して、ナノ白金投与による影響は認められなかった。5nPt(TP+)群と 5nPt(TP-)群との間で比較すると、肝臓および副腎重量の減少が TP 処理群で観察されたが、病理組織学的検査では TP 処理あるいはナノ白金投与による影響は認められなかった(次項参照)。

(3) 病理組織学検査(図 10)

肝臓、腎臓、脾臓、副腎の病理組織学的検査の

結果、ナノ白金投与による変化はなかった。

6. ナノ白金経皮暴露による皮膚免疫応答(透過型電子顕微鏡観察)

これまでに実施した 28 日反復ナノ白金経皮毒性試験による結果から、皮膚病変が投与 2 週から発現し、LLNA 試験から弱い刺激性を伴うが感作性もあることが示唆されたことから、ナノ白金の皮膚免疫応答系への関与を微細形態学的に検討した。その結果、ナノ白金投与群では TP 処理の有無に関わらず、表皮角質層の樹状細胞 (ランゲルハンス細胞) は細胞突起を伸長し、バーベック顆粒も豊富な細胞が多く、ランゲルハンス細胞が活性化している像がみられた (図 11)。

E. 結論

表皮の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白金 (1 mg/mL) の 24 時間経皮投与により、ナノ白金は皮膚の角質層上層に限局して存在し、生体内にはほとんど浸透しないことが明らかになった。28 日反復経皮毒性試験で生体内に観察された白金は、皮膚の障害が真皮にまで波及したことに起因した結果と考えられた。

ナノ白金と皮膚免疫応答については観察例数を増やし精査を続ける必要があるが、形態観察像からは皮膚応答が活性化していることが示唆された。

急性毒性は誘発しないと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

【総説・その他】

なし

② 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 0 件】

【国内学会発表：合計1件】

第32回日本毒性病理学会総会および学術集会
(2016.01.高松)

【国際学会発表：合計0件】

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

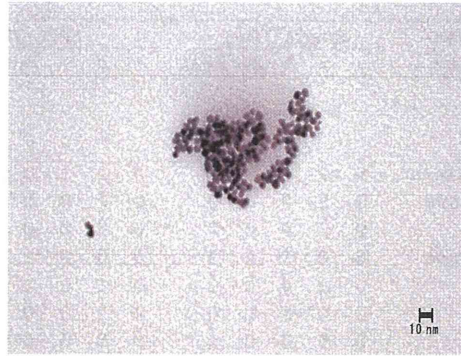
該当なし

その他

該当なし

研究協力者

斉藤義明、熊谷文明（一般財団法人食品薬品安全センター・秦野研究所）



Lot No. DAG2419 (4.6 ± 0.8 nm)

図 1. 本研究に用いたナノ白金粒子

入手した白金液を膜貼付メッシュに滴下し乾燥後、透過型電子顕微鏡にて観察した。

投与群	TP 処理	動物数	投与物質
対照群	ありCont (TP+)	5	2 m M クエン酸水溶液
5nPt群	あり5nPt (TP+)	5	5nPt
	なし5nPt (TP-)	5	5nPt

図 2. 群構成.

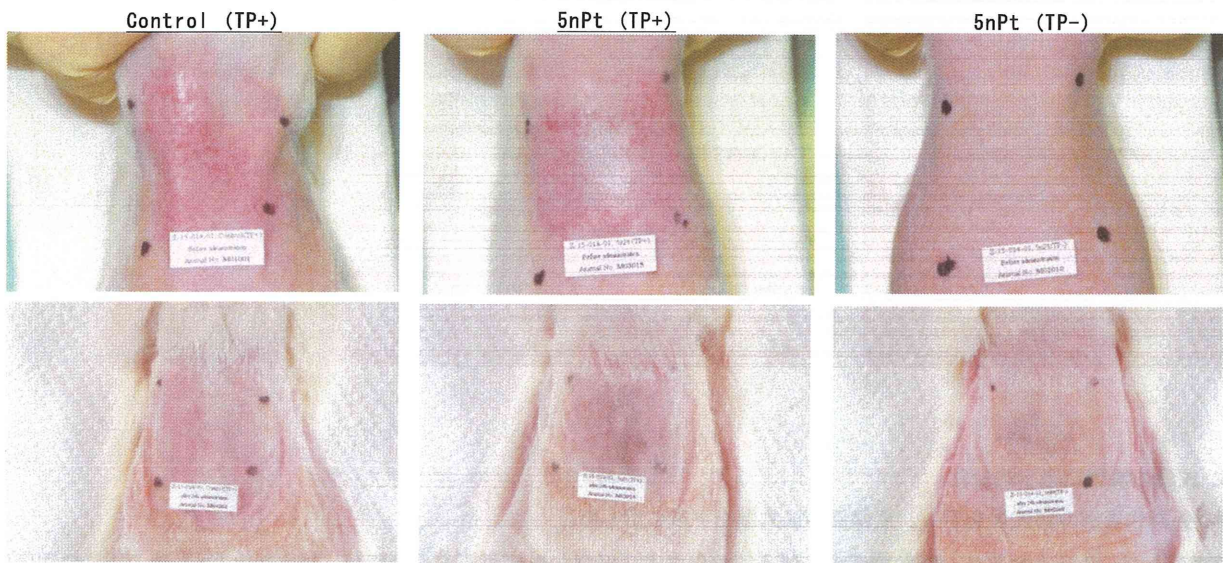


図 3. 投与皮膚部位の肉眼的変化.

上段は各群代表例の投与直前 (TP 処理後) を、下段は投与 2 日 (解剖日) の背部皮膚領域を示す。

TP 処理直後の皮膚には赤色点が認められたが、24 時間後には TP 処理による肉眼的変化は回復していた。また、5nPt 投与部位は黒色化を呈していた。その他、5nPt 投与による投与部位の肉眼的変化は認められない。

Findings	Group Grade	Control (TP+)					5nPt (TP+)					5nPt (TP-)						
		-	±	+	2+	3+	-	±	+	2+	3+	-	±	+	2+	3+		
Application site																		
Epidermis																		
Attachment, black pigment, surface of stratum corneum		5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	**	##	1	4	0	0	0
Cellular infiltration, inflammatory		0	5	0	0	0	0	2	3	0	0			5	0	0	0	0
Crust, focal		0	5	0	0	0	0	5	0	0	0			5	0	0	0	0
Decrease, keratohyaline granule		0	0	0	2	3	0	0	0	1	4			5	0	0	0	0
Edema, intercellular		0	1	4	0	0	0	1	3	1	0			5	0	0	0	0
Parakeratosis		0	0	5	0	0	0	2	3	0	0			5	0	0	0	0
Thickening		0	5	0	0	0	0	5	0	0	0			5	0	0	0	0
Dermis																		
Cellular infiltration, inflammatory, subepidermal		0	2	3	0	0	0	0	5	0	0			5	0	0	0	0
Edema, subepidermal		2	3	0	0	0	2	2	1	0	0			5	0	0	0	0
Hemorrhage, subepidermal		4	1	0	0	0	4	1	0	0	0			5	0	0	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<0.01 : Significantly different from control(Fisher's exact test).

図 4. 皮膚の病理組織学的観察所見

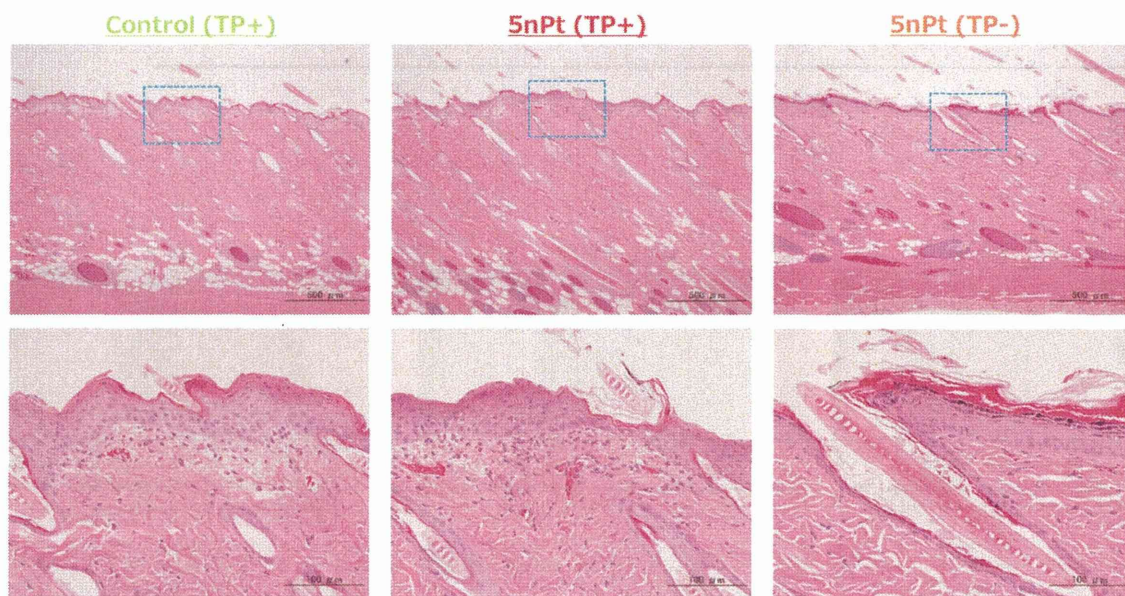


図 5. 皮膚の病理組織学的変化

上段は各群代表例の弱拡大像を示し、点線部の拡大像を下段に示した。

TP 処理により、ケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化および軽度な炎症が認められたが、対照群と 5nPt 群 (TP+) の程度に差はなかった。

5nPt 群では、TP+ 群および TP- 群ともに角質層表面に黒色の付着物(被験物質由来)がみられ、TP 処理群の方が顕著であった。

Group	Platinum concentration (ppm)		
	Skin	Liver	Blood
Control (TP+)	< 0.05	< 0.05	< 0.05
5nPt (TP+)	29.3	< 0.05	< 0.05
5nPt (TP-)	25.0	< 0.05	< 0.05

Each value shows mean.

The lower limits of Pt detection : 0.05 ppm .

図 6. ICP-MS 分析結果

5nPt 投与群では TP 処理群、未処理群ともに皮膚にナノ粒子が確認された。肝臓および血液中は検出限界以下であった。

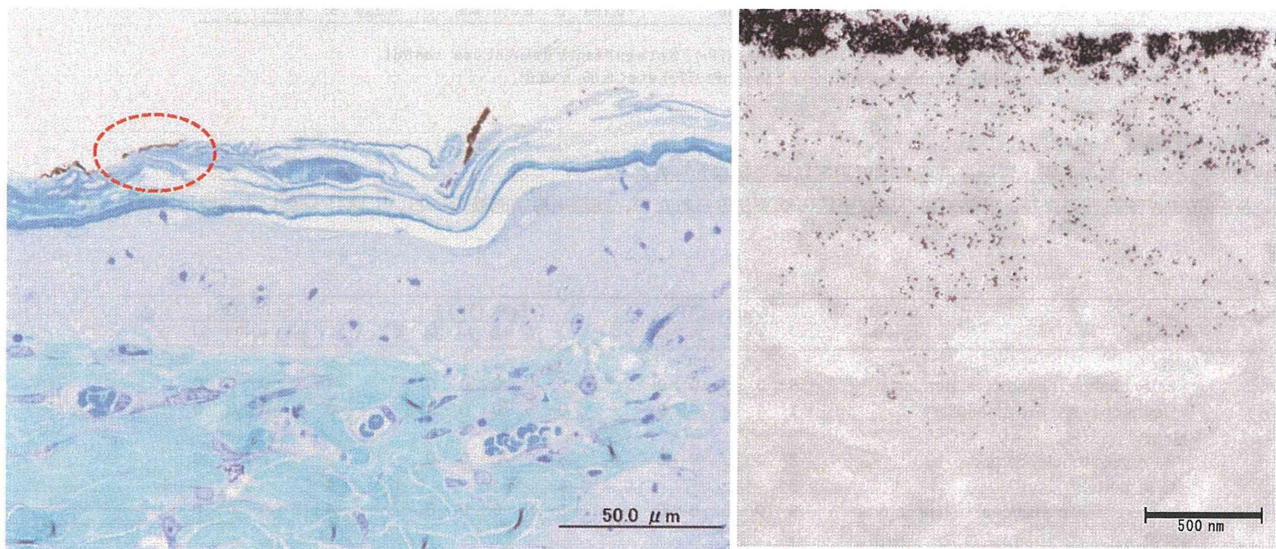


図 7. 皮膚の TEM 観察像

左写真は 5nPt (TP+) 群における投与皮膚領域の樹脂包埋トルイジンブルー染色（四酸化オスmium未処理切片）組織像を示す。点線領域の TEM 観察像を右側写真に示す。5nPt 粒子は角質最表層において 1μm 程度の深さにまでみられたが、それより下層では観察されなかった。

Group	Control (TP+)	5nPt (TP+)	5nPt (TP-)
Number of animals	5	5	5
Days of administration			
1	226.6 ± 5.9	225.1 ± 5.3	225.2 ± 6.4
2	209.6 ± 9.1	207.0 ± 5.3	206.0 ± 4.7

Each value shows mean (g) ± S.D.

図 8. 体重推移

24 時間の閉塞貼付により体重減少がみられたが、その程度は 3 群間に差はなかった。

Group		Control (TP+)			5nPt (TP+)			5nPt (TP-)		
Number of animals		5			5			5		
Body weight	(g)	209.6	±	9.1	207.0	±	5.3	206.0	±	4.7
Liver	(m g)	8502.0	±	758.8	7954.4	±	421.3	8467.3	±	499.2
	(m g/g)	40.518	±	2.212	38.425	±	1.512 #	41.095	±	1.811
Kidney (R)	(m g)	925.2	±	62.9	861.9	±	67.3	924.5	±	61.1
	(m g/g)	4.413	±	0.152	4.164	±	0.287	4.487	±	0.243
Kidney (L)	(m g)	906.8	±	36.4	869.4	±	76.6	946.2	±	72.5
	(m g/g)	4.328	±	0.062	4.199	±	0.325	4.595	±	0.341
Kidneys	(m g)	1832.0	±	98.9	1731.3	±	143.4	1870.8	±	129.5
	(m g/g)	8.740	±	0.195	8.363	±	0.607	9.082	±	0.568
Spleen	(m g)	626.6	±	73.8	749.6	±	400.4	545.7	±	57.1
	(m g/g)	2.992	±	0.341	3.650	±	2.045	2.649	±	0.269
Adrenal gland (R)	(m g)	21.8	±	4.4	20.4	±	2.6	22.5	±	0.9
	(m g/g)	0.105	±	0.023	0.098	±	0.012	0.110	±	0.004
Adrenal gland (L)	(m g)	22.0	±	3.2	20.8	±	2.3	24.9	±	1.9
	(m g/g)	0.106	±	0.019	0.100	±	0.010	0.121	±	0.007
Adrenal glands	(m g)	43.9	±	6.5	41.2	±	3.8 ##	47.5	±	2.6
	(m g/g)	0.210	±	0.038	0.199	±	0.016 ##	0.230	±	0.011

Each value shows mean ± S.D.

Control (TP+) vs 5nPt (TP+), or Control (TP+) vs 5nPt (TP-) : Not significantly different from control

#, ## : Significantly different between 5nPt (TP+) and 5nPt (TP-) at p < 0.05, p < 0.01.

図9. 器官重量

対照群と各nPt群の肝臓、腎臓、脾臓、副腎重量には差はなかった。

5nPt群ではTP処理により、肝臓および副腎重量の低下がみられたが、病理組織学的検査においてはTP処理による変化はなかった。

Findings	Group Grade	Control (TP+)						5nPt (TP+)						5nPt (TP-)						
		-	±	+	2+	3+	P	-	±	+	2+	3+	P	-	±	+	2+	3+	P	
<u>Liver</u>																				
Fatty change, hepatocyte, periportal		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0				
Hematopoiesis, extramedullary		1	4	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0				
<u>Kidney</u>																				
Basophilic tubule, cortex		3	2	0	0	0	3	2	0	0	0	2	3	0	0	0				
Cyst, cortex		5				0	4				1	4				1				
Hyperplasia, transitional cell, unilateral		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0				
<u>Spleen</u>																				
Hematopoiesis, extramedullary		0	0	0	1	4	0	0	0	2	3	0	0	0	1	4				
<u>Adrenal gland</u>																				
		5					5					5								

Notes) - : No abnormal changes ±: Very slight + : Slight 2+: Moderate 3+: Marked P : Non-graded change

Numerals represent the number of animals.

Not significantly different from control.

図10. 病理組織学的検査

肝臓、腎臓、脾臓、副腎の病理組織学的検査では、5nPt投与(TP+ and TP-)に起因した変化は認められなかった。

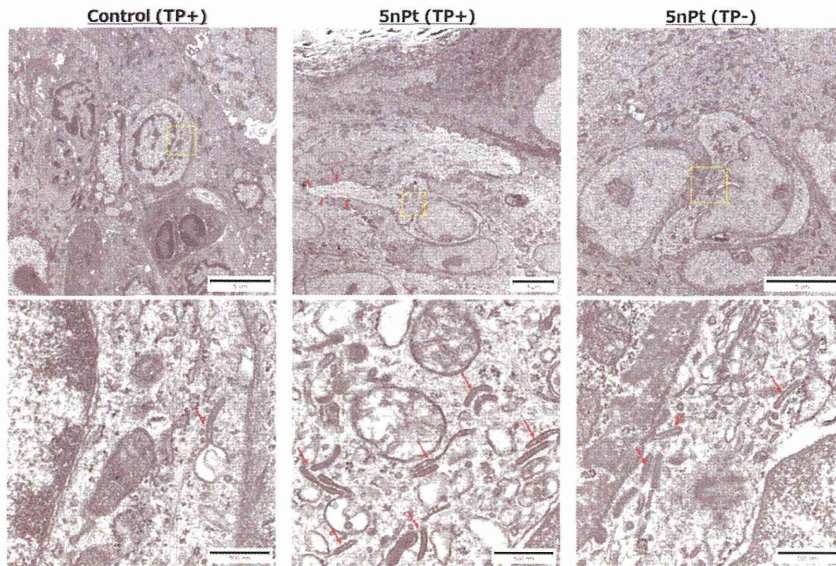
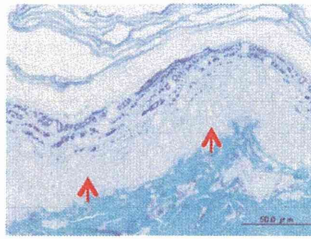


図11. 皮膚角質層のTEM観察像(染色：酢酸ウラニル・佐藤の鉛液)

最上部写真：トルイジンブルー染色標本中の矢印は樹状細胞を示す。

電顕写真の上段は各群代表例の表皮角質層領域、下段は上段の点線領域拡大像を示す。

5nPt群では細胞突起(矢頭)を慎重しているランゲルハンス細胞や、パーベック顆粒(矢印)が豊富な細胞が多く観察され、活性化を示唆するような組織像であった。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Hirai T., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Potential hazards of skin exposure to nanoparticles.	Takemi Otsuki, Yasou Yoshioka, Andrij Holian	Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances	Springer	日本	2015	123-35
Morishita Y., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Reproductive and developmental effects of nanomaterials.	Takemi Otsuki, Yasou Yoshioka, Andrij Holian	Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances	Springer	日本	2015	77-101
Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Biocompatibility of nanomaterials.	Zheng-Rong Lu, Shinji Sakuma	Nanomaterials in Pharmacology.	Springer	日本	2015	185-99

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
Yoshida T., Yoshioka Y., Morishita Y., Aoyama M., Tochigi S., Hirai T., Tanaka K., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Protein corona changes mediated by surface modification of amorphous silica nanoparticles suppress acute toxicity and activation of intrinsic coagulation cascade in mice.	Nanotechnology.	26	245101	2015

Hirai T., Yoshioka Y., Takahashi H., Ichihashi K., Udaka A., Mori T., Nishijima N., Yoshida T., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Takagi T., Ishii K., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Cutaneous exposure to agglomerates of silica nanoparticles and allergen results in IgE-biased immune response and increased sensitivity to anaphylaxis in mice.	Part. Fibre. Toxicol.	12	16	2015
Wakimoto T., Uchida K., Mimura K., Kanagawa T., Mehandjiev TR., Aoshima H., Kokubo K., Mitsuda N., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Kimura T., Yanagihara I.	Hydroxylated Fullerene: a potential anti-inflammatory and anti-oxidant agent for preventing mouse preterm birth.	Am. J. Obstet. Gynecol.	213	708	2015
堤 康央	ナノマテリアルの安全性評価 (2) .	MEDCHEM NEWS.	25	109-10	2015
Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Applications and safety of nanomaterials used in the food industry.	Food Safety.	3	39-47	2015
堤 康央	ナノマテリアルの安全性評価 (最終回) .	MEDCHEM NEWS.	25	158-59	2015
堤 康央	「安全と安心」を強みにした、付加価値の高い香粧品への期待.	日本香粧品学40周年記念誌 (寄稿) .	39	76-8	2015
東阪和馬	ナノ医薬の安全性確保に向けたナノ安全科学研究の推進	Drug Delivery System.	31	168-9	2016

Current Topics in
Environmental Health and Preventive Medicine

Takemi Otsuki
Yasuo Yoshioka
Andrij Holian
Editors

Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances



 Springer