

機関番号：3 2 5 1 1

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：2 1 7 9 0 1 2 7

研究課題名 (和文) ナノ粒子と薬物・化学物質の併用による安全性評価に関する研究

研究課題名 (英文) **Examination of nano-particles in mice with drugs or chemicals induced toxicity.**

研究代表者

磯田 勝広 (ISODA KATSUHIRO)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：6 0 4 2 3 1 1 7

研究成果の概要 (和文)：粒子径 100nm 以下のナノ粒子は化粧品、食料品に利用されていることから、薬物投与・化学物質暴露時の安全性評価は焦眉の急である。しかし、薬物投与・化学物質暴露時に対する安全性評価に関する研究は未だ十分に行われていない。本研究はナノ粒子と薬物・化学物質の投与や暴露による安全性を検討した。検討した結果、ナノシリカ粒子とナノポリスチレン粒子は、薬物相互作用があった。また、水溶性フラーレン粒子とナノ磁性デキストラン粒子には薬物相互作用はなかった。これらの結果から、薬物とナノマテリアルの相互作用をさらに検討する必要性のあることを示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Nanomaterials are used frequently in microelectronics, cosmetics and sunscreen, and research for the development of nanomaterial-based drug delivery systems is promising. Interactions between nano-size materials and drugs that have therapeutic potential need investigating. Here, we investigated whether nano-size materials affect drugs-induced toxicity using inert polystyrene particles, nano-silica and fullerene particles, which have been widely used in industrial materials, carbon tetrachloride, a popular anti-tumor agent, cisplatin, and a widely used herbicide, paraquat. The result, inert polystyrene particles and nano-silica particles induced liver injury by using together with the drugs. Our findings suggest that further evaluation on the interaction between nano-size materials and drugs is critical for the pharmaceutical application of nanotechnology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：薬学、薬理学、衛生、環境、有害物質

## 1. 研究開始当初の背景

周知のように、「ナノマテリアル」は21世紀の機能性・万能素材として注目されており、既に、情報通信技術、バイオテクノロジー

一、エネルギー工学、医療工学などの実用工学から物理学、化学、生物学、医学などの基礎科学にわたる広範な分野に利用されている。実際、化粧品中には美白成分・紫外線吸収素

材としてナノマテリアルは使用されており、人類は「未知の人工機能性素材、ナノマテリアル」に日常的に暴露されつつある。昨今、マクロレベルでは毒性を持たないフラーレンやカーボンナノチューブがナノレベルサイズになると、電子レベルの反応性が飛躍的に増大するために生体に対して傷害性を発揮することが報告された。例えば、工業的に利用されているカーボンナノチューブの吸気暴露により肺組織傷害が誘発される。また、紫外線吸収素材であるナノフラーレンは皮膚に塗布すると循環血を介して脳内に移行し傷害性を示すことが報告され、少なくともナノフラーレンは皮膚および血液脳関門などの生体バリアを透過する可能性がある。

現在、規制緩和により医薬部外品の許認可は大幅に緩和され、ナノ粒子を利用した化粧品開発が立ち止まる気配は全く無い。既に化粧品中には多様なナノ粒子が使用されており、今後ナノ粒子の利用がさらに進むことは明白であること、さらに最近の技術革新からドラッグデリバリーシステムの応用にナノ粒子が有効な素材であることが注目を集めている。今後、ナノ粒子を含むナノマテリアルを用いた薬品の開発が大きく進展することが予想されるが、ナノ粒子と薬物・化学物質を併用した際の安全性の評価は皆無である。本申請課題では、ROS を介した副作用のある薬物や肝臓に障害を与える化学物質を用いた動物モデルより、多種多様な物性を有する標準ナノ粒子の肝傷害および肝機能に対する影響を解析し、ナノ粒子の薬物・化学物質に対する安全性を検証する。

## 2. 研究の目的

ナノマテリアルは、医工学などのあらゆる分野において次世代の万能素材として注目されている。現在までのナノマテリアル研究は万能素材としての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傷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の必要性が認識され始めている。

微粒子のうち直径 100 ナノメートル以下のものをナノ粒子と呼ぶが、このように粒径が小さくなると、粒子の体積に対する表面積の比が急激に増大し、予期できない特性が出現する。ナノ粒子単独あるいは、ポリマー、

セラミックス、金属などとの複合体を総称したナノマテリアルは、現在、21 世紀の材料として大きく注目され、実用化が始まっている。とりわけ、ナノ粒子は ROS の活性を上昇させ、細胞傷害性を示すことが報告されており、ROS 及びラジカルを介した副作用と毒性が報告されている薬物・化学物質の投与や暴露による人体に影響が出ることが予想される。化粧品、食料品中には既にナノ粒子を含むナノマテリアルが利用されていることから、薬物投与・化学物質暴露時のナノ粒子の安全性評価は焦眉の急であると言える。しかしながら、ナノ粒子の安全性評価は緒についたばかりであり、薬物投与・化学物質暴露時に対する安全性評価に関する研究は未だ十分に行われていない。

生体に投与された薬物・化学物質は肝臓において代謝を受ける。このためナノ粒子の薬物投与・化学物質暴露時の安全性評価は「ナノ粒子の肝機能に及ぼす影響と肝傷害」に集約できる。本研究では、多種多様な標準ナノ粒子などを用いて、化学物質・薬物との併用により肝機能と肝傷害を検討することにより、ナノ粒子と薬物・化学物質の投与や暴露による安全性を検証する。

## 3. 研究の方法

(1) ナノポリスチレン粒子を用いた薬物・化学物質の相互作用

実験には 8 週齢雄性 BALB/c マウスを使用した。四塩化炭素 ( 0.005ml/kg b.w. ) ・パラコート ( 50mg/kg b.w. ) ・シスプラチン ( 100umol/ kg b.w. ) をそれぞれ腹腔内に投与し、同時に、粒子径 50, 200, 1000nm ナノポリスチレン ( NPP50, NPP200, NPP1000 ) を尾静脈に投与した。投与 24 時間後に心採血して、遠心分離により血清を採取した。採取した血清より、肝傷害マーカー ALT と AST を測定した。

(2) ナノシリカ粒子を用いた薬物・化学物質の相互作用

実験には 8 週齢雄性 BALB/c マウスを使用した。四塩化炭素 ( 0.005ml/kg b.w. ) ・パラコート ( 50mg/kg b.w. ) ・シスプラチン ( 100umol/ kg b.w. ) をそれぞれ腹腔内に投与し、同時に、粒子径 30, 50, 70, 1000nm ナノシリカ ( SP30, SP50, SP70, SP1000 ) を尾静脈に投与した。投与 24 時間後に心採血して、遠心分離により血清を採取した。採取した血清より、肝傷害マーカー ALT と AST を測定した。

(3) 水溶性フラーレンを用いた薬物・化学物質の相互作用

実験には 8 週齢雄性 BALB/c マウスを使用した。四塩化炭素 ( 0.005ml/kg b.w. )・パラコート ( 50mg/kg b.w. )・シスプラチン (100umol/ kg b.w. )をそれぞれ腹腔内に投与し、同時に、水溶性フラーレン化合物 (C60 Pyrrolidine tris-acid) を尾静脈に投与した。投与 24 時間後に心採血して、遠心分離により血清を採取した。採取した血清より、肝傷害マーカーALT と AST を測定した。

(4) ナノ磁性デキストラン粒子を用いた薬物・化学物質の相互作用

実験には 8 週齢雄性 BALB/c マウスを使用した。四塩化炭素 ( 0.005ml/kg b.w. )・パラコート ( 50mg/kg b.w. )・シスプラチン (100umol/ kg b.w. )をそれぞれ腹腔内に投与し、同時に、粒子径 50、130、500nm のナノ磁性デキストラン粒子を尾静脈に投与した。投与 24 時間後に心採血して、遠心分離により血清を採取した。採取した血清より、肝傷害マーカーALT と AST を測定した。

4. 研究成果

(1) ナノポリスチレン粒子を用いた薬物・化学物質の相互作用

各種粒径のポリスチレン粒子と四塩化炭素、パラコート、シスプラチンを併用し、検討を行った。結果、NPP50 と四塩化炭素、パラコート、シスプラチンとの併用投与に伴い、それぞれの単独投与群に比べて、AST 値・ALT 値の増大が観察された。NPP200 および NPP1000 では併用投与した際に AST 値・ALT 値の上昇は認められなかった。Fig.1 にはナノポリスチレンとシスプラチンの併用した時に ALT 値と AST 値の結果を示した。NPP50 のみ相互作用を示し、ALT/AST 値が増大していた。以上のことより、ナノポリスチレン粒子は、薬物・化学物質と相互作用を起こし、肝障害を惹起する知見が得られた。

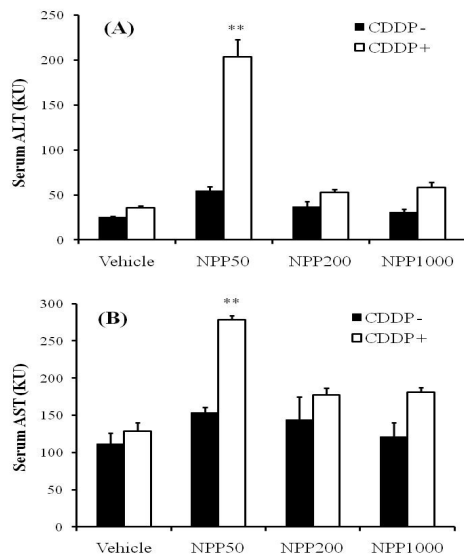


Fig.1 ナノポリスチレンとシスプラチンの相互作用 (A) ALT 値、(B) AST 値。N = 4 (mean ± S.E.) \*\*P < 0.01 v.s.without CDDP

(2) ナノシリカ粒子を用いた薬物・化学物質の相互作用

各種粒径のシリカ粒子と四塩化炭素、パラコート、シスプラチンを併用し、検討を行った。SP30、SP50 と SP70 を各々、四塩化炭素、パラコート、シスプラチンとの併用投与した際、相互作用があり、ALT/AST 値が増大し、さらにナノシリカ粒子の中では SP30 の肝毒性が最も大きかった。Fig.2 には各種粒径のナノシリカ粒子を用量 15mg/kg でマウス尾静脈に投与し、腹腔にパラコートを投与した際の ALT 値と AST 値の結果を示した。SP30 のみ相互作用を示し、ALT/AST 値が増大していた。これらのことより、ナノシリカは粒子径サイズが小さくなるほど相互作用が増大し、肝障害が強くなることが示唆された。

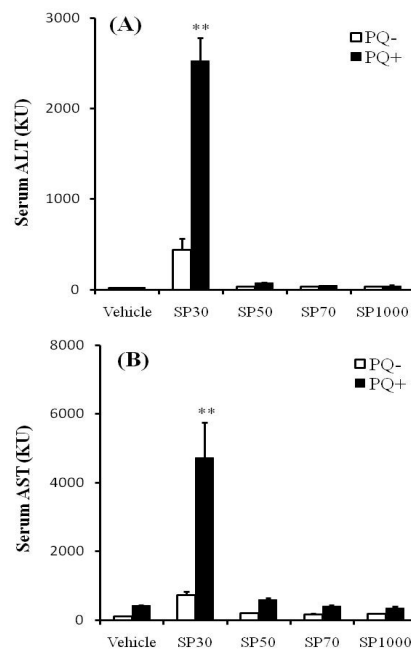


Fig.2 ナノシリカとパラコートの相互作用 (A) ALT 値、(B) AST 値。N = 4 (mean ± S.E.) \*\*P < 0.01 v.s.without PQ

(3) 水溶性フラーレンを用いた薬物・化学物質の相互作用

水溶性フラーレンと四塩化炭素、パラコート、シスプラチンを併用し、検討を行った。水溶性フラーレンは単独投与においては、肝傷害また、腎障害を示さなかった。四塩化炭素、パラコート、シスプラチンと水溶性フラーレンを併用し、相互作用を検討した結果、ALT/AST 値の有意な増大は観察されなかった。Fig.3 には水溶性フラーレンと四塩化炭素の併用した時に ALT 値と AST 値の結果を示した。水溶性フラーレンによる ALT/AST 値の有意な増大は観察されなかった。これらのことは、水溶性フラーレンは薬物・化学物質との相互作用を起こさないことが示唆された。

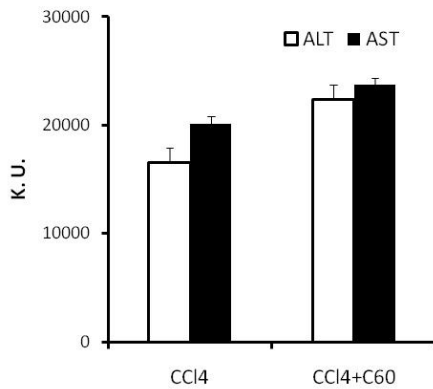


Fig.3 水溶性フラーレンと四塩化炭素の相互作用

(4) ナノ磁性デキストラン粒子を用いた薬物・化学物質の相互作用

各種粒径のナノ磁性デキストラン粒子と四塩化炭素、パラコート、シスプラチンを併用し、検討を行った。ナノ磁性デキストラン粒子は単独投与においては、肝傷害また、腎障害を示さなかった。四塩化炭素、パラコート、シスプラチンとナノ磁性デキストラン粒子を併用し、相互作用を検討した結果、ALT/AST値の有意な増大は観察されなかった。以上の結果より、ナノ磁性デキストラン粒子は水溶性フラーレンと同様に薬物・化学物質との相互作用を起こさないことが示唆された。

(5) 総括

ナノポリスチレン粒子は、薬物・化学物質と相互作用を起こし、肝障害を惹起する知見が得られた。さらにナノシリカはサイズが小さくなるほど相互作用が増大し、肝障害が強くなった。また、水溶性フラーレンとナノ磁性デキストラン粒子は薬物相互作用を引き起こさなかった。本研究は、マイクロサイズの粒子は、薬物・化学物質と相互作用を起こさないが、ナノサイズ化により相互作用がおこることが示された、世界で初めての知見である。さらにナノマテリアルの種類により相互作用の誘起は起こることが示された。今後、多種類のナノマテリアルに関して薬物・化学物質の相互作用を検討する必要があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Nishimori H., Kondoh M., **Isoda K.**, Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K., Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72, 626-629, 2009. 査読有
2. Nishimori H., Kondoh M., **Isoda K.**, Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K., Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J.*

*Pharm. Biopharm.*, 72, 496-501, 2009. 査読有

3. Nishimori H., Kondoh M., **Isoda K.**, Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K., Influence of 70 nm silica particles in mice with cisplatin or paraquat-induced toxicity., *Pharmazie*, 64, 395-397. 2009. 査読有
4. 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., *Pharmazie*, 66, 282-286. 2011. 査読有
5. **Isoda K.**, Hasezaki T., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K., Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury. *Pharmazie*, 66.278-181. 2011. 査読有
6. Hasezaki T., **Isoda K.**, Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K., Influence of silica nanoparticles with a diameter 100nm induced liver injury *Pharmazie*, 2011. in press. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. 清水芳実、磯田勝広、永井優子、油布朋子、大野まき、手塚雅勝、石田功：ナノポリスチレン粒子と薬物・化学物質の相互作用に関する検討.、フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー、東京、2010年9月9日。
2. 清水芳実、磯田勝広、手塚絵梨子、羽澤一雄、林利彦、守隆夫、手塚雅勝、石田功：粒径によるナノポリスチレンの薬物相互作用の解析、日本薬学会 第131年会、静岡、2011年3月30日。
3. 手塚絵梨子、磯田勝広、清水芳実、羽澤一雄、矢野真吾、土屋静子、手塚雅勝、石田功：粒子径 30nm と 50nm のナノシリカの化学物質・薬物相互作用に関する検討.、日本薬学会 第131年会、静岡、2011年3月30日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯田 勝広 (ISODA KATSUHIRO)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：60423117

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし