

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 6 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12350

研究課題名(和文)大腸炎モデルにおけるナノ銀の生体影響

研究課題名(英文)Biological effects of nanosilver in the colitis model mice

研究代表者

小川 久美子(Ogawa, Kumiko)

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター病理部・部長

研究者番号：70254282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：健常マウスと大腸炎誘発マウスに、粒径10、60及び100 nmのナノ銀を10 mg/kg体重で単回経口投与し肝臓中の銀濃度を測定した。健常マウスでは投与6時間後はいずれも約0.2 µg/gと非投与群より有意な高値を示し、24時間後には60及び100 nm群では減少し有意差はなかったが、10 nm群では減少したものの有意な高値が維持された。大腸炎群では、投与6時間後は10 nm投与群のみで有意な高値を示し、24時間後も減少はしたが有意な高値が維持された。60及び100 nm群でも検出されたものの有意差はなかった。ナノ銀粒子はサイズによって経口投与後の体内への取込及び排出が異なることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ナノ材料は様々な用途で用いられている。通常、化学物質の安全性評価においては、被験物質は化学構造式などで規定されており、粒子としてのサイズや形状は考慮されてこなかった。本研究の結果から、ナノ銀粒子はマウスへの経口投与によって体内に取りこまれ、肝臓内への取込及び排出がその粒子のサイズによって異なることが示された。この結果は、サイズによって生体内での蓄積及び影響期間が異なることを意味しており、毒性影響検討及び薬剤としての利用においては、粒子サイズを十分に考慮する必要があることが改めて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The silver concentration was measured in the liver of mice orally administered nanosilver with different sizes of 10, 60 and 100 nm to healthy mice and colitis-induced mice at 10 mg/kg body weight. In healthy mice, 6 hours after administration of nanosilver, the value in all size groups was about 0.2 µg/g, which was significantly higher than that in the non-treated group, and 24 hours after administration, it decreased in all groups and was not significant in the 60 and 100 nm groups, but the 10 nm group maintained a significantly higher value. In the colitis group, 6 hours after nanosilver administration, only the 10 nm group showed a significantly high value, and even after 24 hours, the significant high value was maintained although it decreased. It was also detected in the 60 and 100 nm groups, but not significant. It was shown that the nanosilver particles have different behaviors of uptake and excretion into the body after oral administration depending on the size.

研究分野：環境中化学物質の安全性評価

キーワード：ナノ材料 ナノ銀 経口 大腸炎 消化管 生体影響

1. 研究開始当初の背景

一般に、「少なくとも一次元が 100 nm 以下の素材」と定義されるナノ材料には、酸化チタン、ナノ銀、カーボンナノチューブ、シリカなど様々なものがあり、食品・食品容器包装、化粧品、電気電子製品、塗料、ドラッグデリバリーシステムなど多分野で応用が期待されている。これらは、粒子が小型化することによって比表面積が増大し、電子反応をはじめ、物性が変化することが知られている。ナノ材料の新素材としての有用性については認識されているところであるが、生物や環境に与える影響は不明な点も多く、その使用に関して議論も残っている。欧州では 2018 年 5 月にフランス議会が二酸化チタンのナノ粒子の食品添加物としての使用を禁止する条項を含む法案を採択するなど、ナノ材料の使用に慎重な姿勢がとられている(2021 年には欧州食品安全機関が二酸化チタン(E171)は食品添加物として安全とは言えないとの見解を公表した)。また、ニューヨーク州環境保護局においても、「ナノスケール材料が人の健康と環境に及ぼす影響はいまだ完全に理解されていない」としており、ナノスケール材料の表示を義務づけている。このように、現時点では、リスク評価に必要なデータは不十分と言わざるを得ない。

ナノ銀は太陽電池や工学デバイス、抗菌性コーティング材及び消臭・殺菌剤として広く利用されているが、サイズ及びコーティングに様々な種類が存在する。これまでの検討において、ラットを用いた <20 nm 非コーティング-ナノ銀、及び <15 nm ポリビニルピロリドンコーティング-ナノ銀の 28 日間の経口投与(90 mg/kg 体重/日)(van der Zanda, M et al., ACS Nano, 6: 7427-42, 2012) 及び平均サイズ 20-30 nm ポリビニルピロリドンコーティング-ナノ銀の 90 日間の経口投与(50, 100, 200 mg/kg 体重/日)(Garcia T et al., Food Chem Tox, 92: 177-187, 2016)では、諸臓器への分布はわずかにみられるものの、重篤な毒性は報告されていない。一方で、我々が実施した検討において、雌性 BALB/c 系マウスに直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm とサイズの異なる クエン酸コートしたナノ銀(AgNP)を等量単回腹腔内投与(0.2 mg/マウス)したところ、AgNP 10 nm を投与した動物のみが 24 時間以内に死亡又は瀕死状態となった。現在の所、死亡原因は明らかではないが、投与後 6 時間の動物において、肝臓逸脱酵素の上昇を伴い、うっ血、単細胞壊死、細胞内封入体等の病理所見が観察された(Cho, YM et al., J Toxicol Pathol, 31: 73-80, 2018)。また、これらのサイズの異なるナノ銀を、表面積の合計を一致させた用量(AgNP 10 nm:0.2mg/mouse, AgNP 60 nm:1.2mg/mouse, AgNP 100 nm: 2 mg/mouse)で単回投与したところ、AgNP 10 nm を投与した動物のみにおいて、投与 6 時間後の肝臓に同様の所見が認められた。この時、ICP-MS で検討した肝臓組織中の銀濃度は、AgNP 60 nm は投与 6 時間及び 24 時間後、AgNP 100 nm は投与 24 時間後に各々の vehicle 投与群ならびに AgNP 10 nm 投与群と比べて有意に高値を示し、血中の銀濃度は、全サイズの AgNP については投与 6 時間後、さらに AgNP 60 nm は投与 24 時間後に vehicle 投与群に比べて有意に高濃度であった。すなわち、投与重量が少ない AgNP 10nm は肝臓組織内の濃度が低値であり、AgNP の毒性強度と組織内濃度に相関は見られなかった。このことは、投与重量及び表面積に依らず、10 nm の AgNP は、60 あるいは 100 nm の AgNP とは明らかに異なる生体反応及び毒性プロファイルを示すことを示唆していた。

これまでの健常動物を用いた van der Zanda, M. 等および Garcia, T. 等の検討からは、経口摂取によるナノ銀の毒性影響は限定的と考えられる。また、通常、消化管粘膜は粘液によって保護されており、腸管内のナノ銀が粒子状態で直接細胞に接する量は少ないと考えられる。しかし、ヒト

においては消化管に炎症が見られることは稀ではなく、慢性胃炎や潰瘍性大腸炎など恒常的に炎症性疾患に罹患することもある。そのような粘膜バリアが破綻した条件下では、腹腔内投与の検討と同様に特定のサイズのナノ銀が直接腸管上皮細胞や間質細胞に接することとなり、異なる生体反応及び細胞内挙動を示すことによって、重篤な毒性影響を誘導する懸念がある。この懸念を解決するには、*in vivo* の大腸炎モデルにおいてナノ銀暴露が及ぼす影響の有無について詳細に検討する必要があると考えられた。

2．研究の目的

本研究では、BALB/c マウスを用いて、dextran sulfate sodium salt (DSS) の飲料水投与で誘発した大腸炎によって粘膜バリアが破綻した動物における、ナノ銀の経口投与による毒性影響の検討を目的とした。特に、これまでに実施した我々の腹腔内投与による研究において、生体反応及び毒性プロファイルが大きく異なることを明らかとしている 粒径 10 nm のナノ銀と 60 nm 及び 100 nm のナノ銀の経口投与による臓器への移行の有無、全身状態への影響および経時的変化について比較検討した。

3．研究の方法

雌の BALB/c マウスに DSS を 7 日間飲料水に混じて投与し、大腸炎を発生させた。DSS 投与終了後に直径 10、60、100 nm のクエン酸コートしたナノ銀を単回強制経口投与し、ナノ銀投与 6 及び 24 時間後にイソフルラン吸入麻酔下で採血致死させ、血液生化学検査とともに全身諸臓器の臓器重量、病理組織学的検査を実施し、ナノ銀の非投与群及び DSS の非投与群（健常マウス）との比較を行った。また、肝臓の凍結サンプルについて ICP-MS を用いて銀濃度を測定した。

初年度はマウス大腸炎モデルの条件設定をおこなった。DSS 誘発大腸炎モデルに関しては複数の報告（Chassaing B, et al., Curr Protoc, 104:Unit 15.25, 2014, Okayasu I, et al., Biomed Res Int, 2016）があるが、分子量等に幅があるため、投与濃度にも大きな違いがあることが知られている。適切なロットを入手し DSS 投与の条件設定による大腸炎誘発モデル系の確立を行った。1、2 及び 3% DSS を 1 週間飲水投与し、大腸について病理組織学的に検討し、ヒトへの外挿性が想定可能な大腸炎を誘発する DSS の投与量と投与期間を確定した。

2 年度目は、前年度に得られた結果に基づき、6 週齢の雌性 Balb/c マウスに 3% DSS（MP Biomedicals 社、分子量 36-50kDa）を 7 日間飲水投与後、2 mM クエン酸三ナトリウム二水和物に懸濁された直径 10、60 または 100 nm のナノ銀（ナノコンポジックス社）を 10 mg/kg 体重で単回強制経口投与した。ナノ銀を投与しない DSS + クエン酸群及び、健常動物群として DSS 投与を行わないで各サイズのナノ銀またはクエン酸を単独投与した群も設定した。ナノ銀投与の 6 及び 24 時間後に各群 5 匹についてイソフルラン吸入麻酔下にて血液生化学検査のため下大静脈から全量採血した。肝臓、腎臓、脾臓を採取して臓器重量を測定後、一部を ICP-MS による銀濃度の測定のため、凍結保存した。結腸から直腸は摘出後、腸間膜に沿って切開し、全長の病理標本が作製できるように 2 つ折りの濾紙に貼付し、緩衝ホルマリン液で固定した。肝臓、腎臓、脾臓の凍結以外の組織及び腸間膜リンパ節等も緩衝ホルマリン液にて固定し、病理標本作製に供した。

3 年度目は、2 年目に得られた検体の解析を行った。大腸をはじめとする全身諸臓器の病理組織学的検討及び肝臓の銀濃度の解析し、経口投与による取込を分析した。

4．研究成果

初年度は、雌の BALB/c マウスに 1, 2 及び 3% DSS を 1 週間飲水投与し、大腸について病理組織学的に検討した。期間中の体重に群間の差はなく 3% まで忍容性を示した。大腸の病理組織学的検討では 1% 群から用量依存的に胚細胞の減少、粘膜層への好中球浸潤が観察され、2% 群から大腸中部に軽度のびらんが観察されたことから、3% の投与がモデル系として適切と考えられた (Figure 1)。

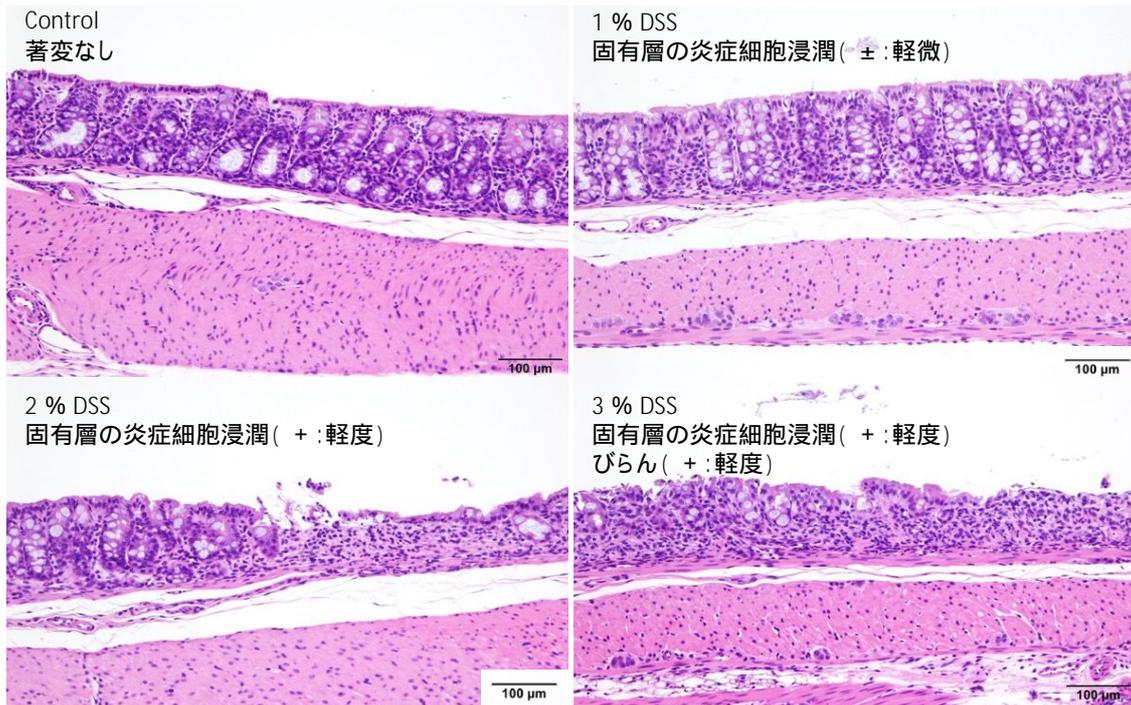


Figure 1. dextran sulfate sodium salt (DSS) の1週間飲料水投与1日後後のマウス結腸病理組織像

2 年度目の本試験において、DSS 投与群、非投与群を設定し、3% DSS を 1 週間飲水投与後、粒径 10, 60 及び 100 nm のナノ銀を 10 mg/kg 体重で単回強制経口投与した。3% DSS 投与期間中、DSS 投与群では軟便がみられたが、体重増加抑制は明らかではなかった。解剖時の体重、相対肝重量、腎重量及び脾重量には有意な差異は見られなかった。血液生化学検査の結果では、大腸炎モデル動物の 60 nm ナノ銀投与 6 時間後の AST 及び ALT の有意な増加、大腸炎モデル動物の 100 nm ナノ銀投与 24 時間後の BUN 及び Cre の有意な増加並びに健常マウス群の全ナノ銀投与 24 時間後の ALP の有意な増加など、それぞれのナノ銀非投与群との間に有意な変動が散見されたもののその意義については明らかではなかった。病理組織標本上、DSS 投与群ではびらん、粘膜上皮の幼若化、好中球浸潤など、想定程度の炎症像が誘発されていることが確認され、試験系としては成立していると考えられた。

3 年度目に ICP-MS を用いて肝臓中の銀濃度を解析した。直径 10, 60 及び 100 nm のナノ銀粒子を 10 mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与したマウスにおいて調整水投与の健常マウス群では投与 6 時間後はいずれも約 0.2 µg/g と非投与群より有意な高値を示し、24 時間後には 60 及び 100 nm 群では減少し有意差は認めなかったが、10 nm 群では減少したものの有意な高値が維持された (Figure 2)。DSS 水投与の大腸炎モデル動物では、投与 6 時間後は 10 nm 投与群のみで有意な高値を示し、24 時間後も減少はしたが有意な高値が維持された。60 及び 100 nm 群でも検出されたものの有意差は認めなかった (Figure 3)。

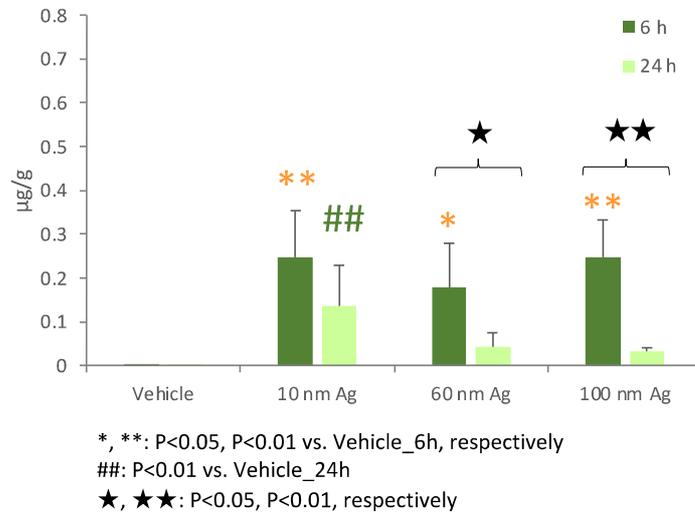


Figure 2. 調整水投与健全動物群のナノ銀投与後肝臓中銀濃度

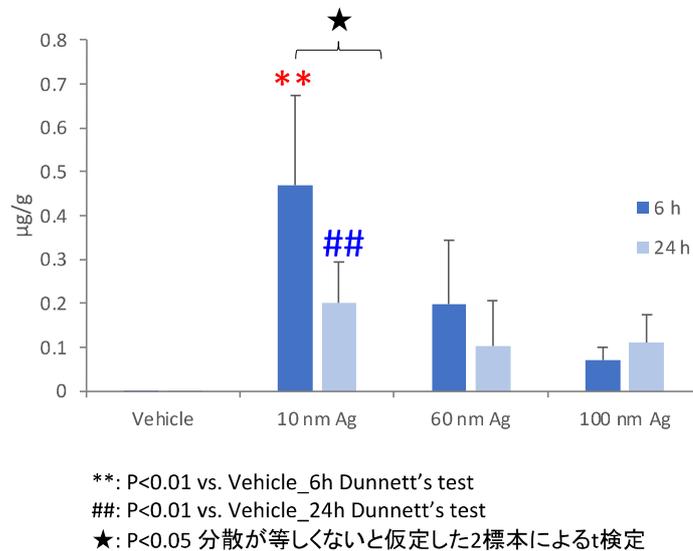


Figure 3. DSS水投与大腸炎モデル群のナノ銀投与後の肝臓中銀濃度

本研究から、1) 10–100 nm のナノ銀粒子は大腸炎の有無に関わらず、経口投与によって吸収され肝臓内にとりこまれること、2) 10 nm のナノ銀は 60 及び 100 nm のナノ銀よりも肝臓内に長く留まることが示された。また、大腸炎が存在する場合は、10 nm のナノ銀は 60 及び 100 nm のナノ銀よりも肝臓内に取りこまれる銀が多い可能性が示唆された。以上より、ナノ銀粒子は、サイズによって生体内での蓄積及び影響期間が異なる事が示され、毒性影響検討及び薬剤としての利用においては、粒子サイズを十分に考慮する必要があることが改めて明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水田保子、曹 永晩、赤木純一、井手鉄哉、小川久美子
2. 発表標題 マウス腹腔内投与におけるポリビニルピロリドンでコートされた銀ナノ球と銀ナノプレートの急性毒性の差異
3. 学会等名 第38回日本毒性病理学会総会及び学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	チョウ ヨンマン (Cho Yong-Man) (00370940)	国立医薬品食品衛生研究所・病理部・室長 (82601)	
研究分担者	井手 鉄哉 (Ide Tetsuya) (60837607)	国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官 (82601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	水田 保子 (Mizuta Yasuko)	国立医薬品食品衛生研究所・病理部 (82601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------