

シリカ、銀及び酸化亜鉛のナノ分散液の *in vitro* 及び *in vivo* 毒性学的評価

松岡厚子[#], 児玉幸夫, 吉田緑, 伊佐間和郎^{*1}, 中嶋富士雄,
井上薫, 河上強志, 松田良枝^{*2}, 五十嵐良明

***In vitro* and *in vivo* toxicological studies of silica, silver,
and zinc oxide nano-suspensions**

Atsuko Matsuoka[#], Yukio Kodama, Midori Yoshida, Kazuo Isama^{*1}, Fujio Nakajima,
Kaoru Inoue, Tsuyoshi Kawakami, Yoshie Matsuda^{*2}, Yoshiaki Ikarashi

Nanomaterials (NMs) have useful industrial and medical applications; however, NMs are associated with several toxicological concerns. The causes of NM toxicity are not clearly understood. We have therefore been investigating a screening test battery for the safety evaluation of NMs.

In the present study, we investigated the possibility of using the following: an *in vitro* cytotoxicity test, *in vitro* chromosome aberration test, and *in vivo* 13-week repeated dose test (intratracheal spraying administration, once a week) in rats, as a screening test battery for silica, silver, and zinc oxide nano-suspensions.

The mean diameters of the silica, silver, and zinc oxide nanoparticles were 54.2, 159.2, and 183.8 nm, respectively, and their 50% growth inhibitory concentrations were 153.5, less than 1.25, and 12.0 µg/mL, respectively, in the cytotoxicity test. Zinc oxide induced structural chromosome aberrations, while silica and silver did not. In addition, only zinc oxide inhibited the normal increase in mean body weight in the 13-week repeated dose test. In the *in vivo* study, granulomatous inflammation, with foamy cells in the alveoli or surrounding the bronchioles, as well as perivascular cell infiltration were the common lesions detected in rats treated with any of the three test suspensions. The nano-suspensions caused a dose-dependent increase in the incidence of the lesions, which were distributed throughout the lobes. Microgranulomas and aggregations of foamy cells were found in the mediastinal lymph nodes at higher doses of silica and silver. This indicated that macrophages that had phagocytosed NMs moved to the lymph node through the lymphatic vessels. At two high doses of zinc oxide, proliferation and fibrosis of both the alveolar/bronchial epithelium and the mucinous cells in the bronchi were markedly induced. NOAEL of the silica, silver, and zinc oxide nano-suspensions were less than 0.06, 0.004, and less than 0.0312 mg/kg, respectively.

The results obtained from the study suggest that the three proposed tests could form a suitable battery of primary screening tests, which can be used for the safety evaluation of NMs. Further confirmation studies are warranted.

Keywords: nano-suspension, silica, silver, zinc oxide, pulmonary examination

[#] To whom correspondence should be addressed:

Atsuko Matsuoka: Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; (Present E-mail: matsuoka-atsuko@pmda.go.jp)

^{*1} Presently, Faculty of Pharmaceutical Science, Teikyo Heisei University

^{*2} Formerly, Division of Medical Devices

1. 緒言

近年、ナノテクノロジーの発展により様々なナノ材料が製造され、多方面に応用されている。家庭用品も例外ではなく、例えば、銀ナノ粒子を配合した抗菌・消臭剤あるいはシリカナノ粒子を配合した衣料用手入れ剤や花粉附着防止剤などのスプレー製品が市販されている。また、酸化亜鉛ナノ粒子は透明性、紫外線遮蔽性及び抗菌性を有するため、化粧品、制汗剤、防臭剤等に応用され

ている。しかし、これらの製品に配合されている材料は超微粒子であるため、大きな比表面積を有するなどバルク材料とは異なる物理化学的特性を有し、ヒトへの有害性も未知の部分が多いことから、その安全性が懸念されている。家庭用品に使われているナノ材料は総量としては微量であるが、我々の生活環境で繁用されヒトへの暴露の割合が高いことから、その安全性を確認する必要がある。

家庭用品からヒトへのナノ材料の暴露経路は、吸入暴露と経皮暴露が考えられる。本研究では、家庭用スプレー製品からのナノ材料の吸入暴露を想定し、*in vitro* 及び *in vivo* 毒性学的試験を実施し、その安全性評価を行った。まず、*in vitro* 試験では吸入に伴う粘膜系への刺激性などを評価する目的で細胞毒性試験を実施した。また、*in vivo* 試験では、ナノ材料の肺への影響を直接評価する方法としてラット気管内噴霧投与¹⁻⁶⁾を実施した。ナノ材料の生体影響は急性影響と慢性影響とが考えられるが、今回は投与後短期間に観察される肺の炎症性反応を中心に観察し、これらの試験法がナノ材料の安全性評価法となりうるかを検討した。

2. 材料及び方法

2.1 シリカ

日産化学工業株式会社よりスノーテックスAK (Lot No. 200811) を入手した。添付されていた製品安全データシートの内容は、化学名 (コロイダルシリカ：表面電荷がカチオンの中粒子径シリカゾル)、組成 (水 78-80%、アモルファスシリカ 17-19%、アルミニウム水溶性塩 4%以下)、粒子径 (10-20 nm) であった。入手ロットの検査報告書の測定値は、比重 (1.144: 20°C)、pH (4.3: 20°C)、粘度 (3.9 mPa·s: 25°C)、SiO₂ (17.8%)、Al₂O₃ (2.1%) であった。

本研究では、シリカの濃度はSiO₂としての濃度で示す。*In vitro* 試験では、原液を培地で希釈後添加した。*In vivo* 試験では、原液を蒸留水で希釈後、ラット1匹あたり0.2 mLの希釈液を気管内に直接噴霧投与した。陰性対照として蒸留水を、溶媒対照として0.05 mM塩酸 (pH 4.3) を用いた。粒子径分布はレーザ回折/散乱式粒子径分布測定装置 (HORIBA LA-950) で測定した。

2.2 銀

銀粉末は、Sigma-Aldrich (カタログ番号576832) より購入した。添付データの主な内容は、純度 (99.5% metals basis)、形状 (nanopowder)、抵抗率 (1.59 μΩ·cm, 20°C)、粒子径 (<100 nm)、表面積 (5.0 m²/g) であった。

銀分散液は以下の手順で調製した。銀 (粉末) を秤量し2 mg/mLの蒸留水懸濁液を調製し、200 W投入型

超音波発生装置 (トミー精工 UR-200P) で氷冷下5分間分散し、ろ紙 (Advantec TOYO, 5A) でろ過後、そのろ液をさらに0.45 μmポアサイズのフィルター (Millipore, MILLEX[®]-HV, PVDF) でろ過した。ろ液をSpeed Vac[®] Plus SC110A (Savant) で真空低速室温遠心濃縮後、その液を試験分散液として使用した。試験分散液の正確な濃度はキャピラリー電気泳動装置 (大塚電子 CAPI-3300) で定量した。粒子径分布はHORIBA LA-950で測定した。調製した銀分散液を*in vitro* 試験では培地で、*in vivo* 試験では蒸留水でそれぞれ希釈して投与した。

2.3 酸化亜鉛

酸化亜鉛はAlfa Aesar社 (ドイツ) より市販されている酸化亜鉛40%水懸濁液 (NanoTek[®] ZH1121W, Lot No. B14T027) を入手した。粒子径分布は動的光散乱光度計 (大塚電子DLS-7000) で測定した。

In vitro 試験では、原液を培地で希釈後添加した。*In vivo* 試験では、原液を日本薬局方注射用水 (大塚化学) で希釈後、ラット1匹あたり0.2 mLの希釈液を気管内に直接噴霧投与した。陰性対照として無処置群及び溶媒対照群 (蒸留水) を設定した。

2.4 細胞

当研究室で維持している、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株 (CHL) を用いた^{7,8)}。細胞は10%牛胎児血清 (Intergen Company, N.Y. USA) 添加MEM培地 (GIBCO 11095-080) で、5%炭酸ガス、飽湿37°C条件下で培養した。CHL細胞の倍加時間は約13時間、染色体モード数は25本である。

2.5 細胞毒性試験 (コロニー法)

24-wellプレートに50細胞/wellのCHL細胞を播種し、翌日ナノ分散液を最終濃度がシリカは100, 250, 500, 750及び1000 μg/mL、銀は1.25, 2.5, 5, 10及び20 μg/mL、酸化亜鉛は5, 7.5, 10, 12.5及び15 μg/mLとなるように添加した。そのままさらに6日間培養を続け、形成されたコロニーをメタノールで固定、ギムザ染色を行なった後カウントした。コントロール群のコロニー数を100%とした時の、処理群の相対コロニー数 (Survival %, 平均値±SD, n=4) で細胞毒性を表示した。50%細胞増殖抑制濃度 (IC₅₀) はプロビット法で算定した。

2.6 染色体異常試験

直径60 mmのプラスチックシャーレに1 x 10⁵/plateの細胞を播種し、翌日ナノ分散液を最終濃度がシリカは500, 1000及び1500 μg/mL、銀は12.5, 25, 50及び

75 µg/mL、酸化亜鉛は2.5, 5, 10及び20 µg/mLとなるように添加した。24時間又は48時間処理後に染色体標本を作製した⁹⁾。ギムザ染色後、広がりの良い分裂中期細胞100個を観察し、染色体構造異常と数的異常(倍数体及び核内倍加)を記録した。背景データに基づき、構造異常を有する細胞又は数的異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性と判定した⁹⁾。陰性対照として溶媒処理群を設定した。実験は少なくとも2回実施し、代表的なデータを示した。

2. 7 ラット13週間反復投与毒性試験

8週齢(酸化亜鉛)又は10週齢(シリカ及び銀)のWistar Hannover IGS系ラット(SPF)雄を日本チャールス・リバー社(神奈川)より購入し、基礎飼料(CRF1固形飼料, オリエンタル酵母工業)と塩素・塩酸添加水(残留塩素濃度10 ppm, 塩酸によりpH 3.0に調整)で1週間馴化飼育後、無作為に群分けし、試験に供した。シリカ及び銀投与試験では対照群を含め各群7匹の動物を割り付け、酸化亜鉛投与試験では無処置対照群5匹、溶媒対照群及び被験物質投与群には各群6匹を割り付けた。

動物の飼育はバリエーションシステムの飼育室にて、室温24 ± 1°C, 湿度55 ± 5%, 換気回数18回/時(オールフレッシュ), 12時間蛍光灯照明, 12時間消灯の条件下で行った。動物は透明なポリカーボネート製ケージ(幅26 cm, 長さ42 cm, 高さ17 cm)に3匹ずつ収容し、床敷は三協ラボサービス社(東京)のソフトチップを用い、週2回ケージ交換を行った。飼料(CRF1)と飲水は試験期間中自由に摂取させた。

調製したナノ分散液を0.2 mL/ラット, 週1回13週間、専用のゾンデ(19 G DIMS型経気道ゾンデ, 株式会社コクゴ)を用いて、イソフルラン(大日本住友製薬)吸入麻酔下、気管内噴霧投与を行った。用量は予備試験の結果を参考に、公比5又は4で設定した。シリカは0.06, 0.3及び1.5 mg/kg, 銀は0.004, 0.02, 0.1及び0.5 mg/kg, 酸化亜鉛は0.0312, 0.125, 0.5及び2 mg/kg投与した。

一般状態及び死亡の有無は毎日観察し、体重は毎週1回測定した。生存全例は最終投与1週後に、イソフルラン吸入による深麻酔下後大静脈より採血後安楽死させた。剖検後、脳, 肺, 肝臓, 腎臓, 脾臓及び精巣を摘出した。臓器重量を測定後、気管, 縦隔リンパ節及び肺並びに他の臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。常法により、パラフィン包埋, 薄切, ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施し、病理組織学的検査を行った。血液は白血球百分比を測定し、血液学的検査は血液細胞自動分析装置(シスメックス, MICROX HEG-50S)を用いて行った。

肺は、病変の分布を比較するために、左葉, 右前・中葉, 右後葉及び副葉に分けて検索した。また肺の一部についてはオスミック酸で後固定後エポン包埋した。1 µmの準超薄切片をトルイジンブルー染色し、細胞集簇等病変のある部位を選んで超薄した。超薄切片に酢酸ウランと鉛で二重染色を施した後、透過型電子顕微鏡(日本電子JEOL1400)で観察した。さらに電子線で物体を走査した際に発生する特性X線を検出し、X線から得られるエネルギーの分布から物体の構成元素を分析するエネルギー分散型X線分析装置(Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), 日本電子)を用いて、肺内の銀及び亜鉛の局在を検索した。

当該動物実験は当研究所動物実験委員会の審査, 承認を得て実施した(シリカ及び銀:承認番号179, 酸化亜鉛:承認番号231)。

2. 8 統計学的解析

ラット13週間反復投与毒性試験における体重, 相対臓器重量及び血液学的検査データは一元配置分散分析により群間比較を行い、有意水準5%で有意な項目については、さらに溶媒対照群との比較をDunnettの検定を用いて有意水準5%及び1%で実施した。観察された病理組織学的所見の頻度及び程度についての統計学的解析は実施しなかった。

3. 研究結果

3. 1 ナノ分散液の粒子径分布

ナノ分散液の外観をFig. 1に、その粒子径分布をFig.

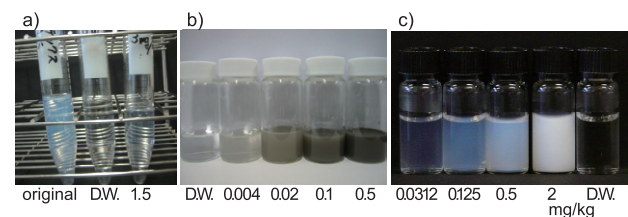


Fig. 1. Appearance of nano-suspensions tested

A silica sol (amorphous SiO₂ 17.8%, particle size 10-20 nm, pH4.3, viscosity 3.9 mPa·s (25 °C)) was diluted with water. Silver powder (Sigma-Aldrich 576832, particle size <100 nm, surface area 5.0 m²/g) was suspended in water by ultrasonics, filtered through a 0.45-µm PVDF filter, and then the concentration of silver in the filtrate was determined by capillary electrophoresis. 40% Zinc oxide suspension in water (NanoTek[®] ZH1121W, Lot No. B14T027, colloidal dispersion, Alfa Aesar, Germany) was diluted with water. The appearance of nano-suspensions of silica, silver and zinc oxide is shown in a), b) and c), respectively. D.W. indicates distilled water. The numbers in mg/kg indicate doses for the 13-week repeated dose test. 0.2 mL of the suspension was intratracheally administered to a rat to give the corresponding dose.

2に示す。Fig. 1a) 左端は、シリカの市販原液である。他は、表示の用量のラット気管内投与用分散液を示している。シリカ、銀及び酸化亜鉛の分散液は単分散の粒子径分布を示し、平均粒子径は、それぞれ54.2 nm, 159.2 nm及び183.8 nmであった。

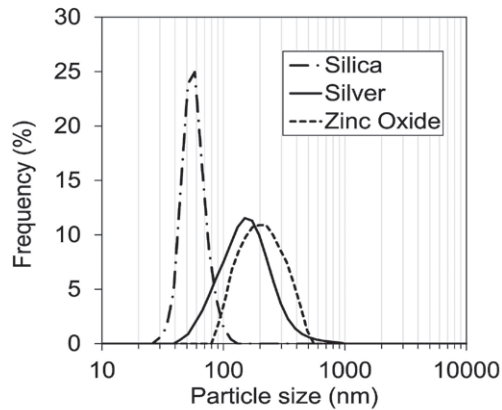


Fig. 2. Distribution of particle size in nano-suspensions

Size distribution analysis was performed by the laser diffraction/scattering method with a Horiba LA-950 for silica and silver and by the dynamic light scattering method with a model Otsuka DLS-7000 for zinc oxide. Mean diameter of particles in each suspension of silica, silver and zinc oxide was 54.2, 159.2 and 183.8 nm, respectively.

3. 2 *In vitro* 毒性試験結果

細胞毒性試験の結果をFig. 3に示す。IC₅₀は、シリカが153.5 µg/mL、銀が1.25 µg/mL未満及び酸化亜鉛が12.0 µg/mLであった。染色体異常試験では、シリカは1500 µg/mLまで、銀は75 µg/mLまで試験を実施したが、染色体の構造異常も数的異常も誘発しなかった (Table 1)。

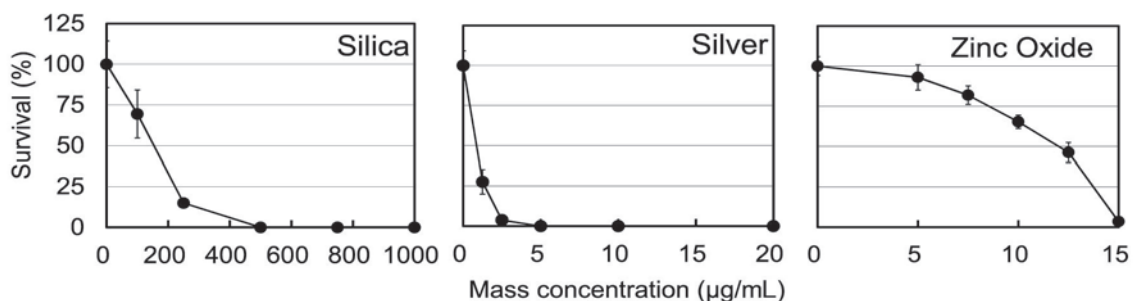


Fig. 3. Cytotoxicity of nano-suspensions in CHL cells

The colony formation assay was performed. Cells were seeded at 50/well in 24-well plates. After 24-h incubation, a suspension was added to the culture and incubated for further six days. The colonies formed were fixed with methanol and stained with Giemsa solution. The number of colonies on each well was counted, and the survival (%) was calculated as the ratio of the number of colonies in the test group to that in control (n=4). The cytotoxic potential was expressed as the concentration at which the survival was 50% of control (IC₅₀). The IC₅₀ value was calculated by the probit method. IC₅₀ of silica, silver and zinc oxide was 153.5, less than 1.25 and 12.0 µg/mL, respectively.

シリカは1500 µg/mLでは、染色体標本にゼリー状に残存しているほどであったが、48時間までの処理では明らかな細胞毒性は観察されなかった。酸化亜鉛は、30 µg/mLまで試験を実施したが、最高濃度では間期細胞のみが観察され、分裂中期の細胞はほとんどなく染色

Table 1. Chromosome aberrations induced by silica, silver, and zinc oxide nano-suspensions in CHL cells

Treatment Time (h)	Mass conc. (µg/mL)	Poly-ploidy (%)	Frequency of cells with structural ab. (%)*					total		
			ctg	ctb	cte	csb	cse			
Silica	24	0	1	2	0	1	0	4		
		500	0	0	0	0	0	1		
		1000	0	2	0	0	1	3		
		1500	0	1	0	0	0	1		
	48	0	0	1	0	0	0	1		
		500	0	0	0	0	0	0		
		1000	0	1	0	0	0	1		
		1500	0	2	0	0	0	2		
		Silver	24	0	1	2	0	1	0	4
				12.5	0	0	0	0	0	1
25	2			0	0	0	0	0		
50								Tox		
75								Tox		
48	0		0	1	0	0	0	1		
	12.5		2	1	0	0	0	1		
	25		4	0	0	0	0	0		
	50							Tox		
	75							Tox		
Zinc Oxide	24	0	1	0	1	0	0	1		
		2.5	2	0	1	0	0	1		
		5	1	1	0	0	0	1		
		10	1	2	1	5	0	7		
		20	1	3	14**	32**	0	38**		
	48	0	0	0	0	0	0	0		
		2.5	1	0	0	0	1	1		
		5	3	0	0	0	0	0		
		10	2	0	0	0	1	1		
		20	5	4	9	7	0	17**		

Cells were seeded on day 0, treated with the suspension on day 1, and then chromosome preparations were made after 24- or 48-h treatment. Structural and numerical aberrations were observed on the Giemsa-stained preparations.

*The structural aberrations were classified as follows; ctg, chromatid and chromosome gaps; ctb, chromatid breaks; cte, chromatid exchanges; csb, chromosome breaks; cse, chromosome exchanges.

Tox indicates where cells were killed.

**The frequency indicates a positive response.

体の解析はできなかつた。染色体観察が可能であった最高濃度 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では 24 時間及び 48 時間いずれの処理時間でも染色体の構造異常が観察された。数的異常は誘発されなかつた。

3. 3 *In vivo* 毒性試験結果

3. 3. 1 一般状態、生存率及び体重変化など

いずれの投与群においても一般状態の変化は認められなかつた。シリカの 0.3 及び 1.5 mg/kg 群、銀の対照群及び 0.004 mg/kg 群の各 1 例が投与過誤により投与期間中に死亡した。そのほか投与に関連した死亡は認められなかつた。体重は、シリカ及び銀投与群については対照

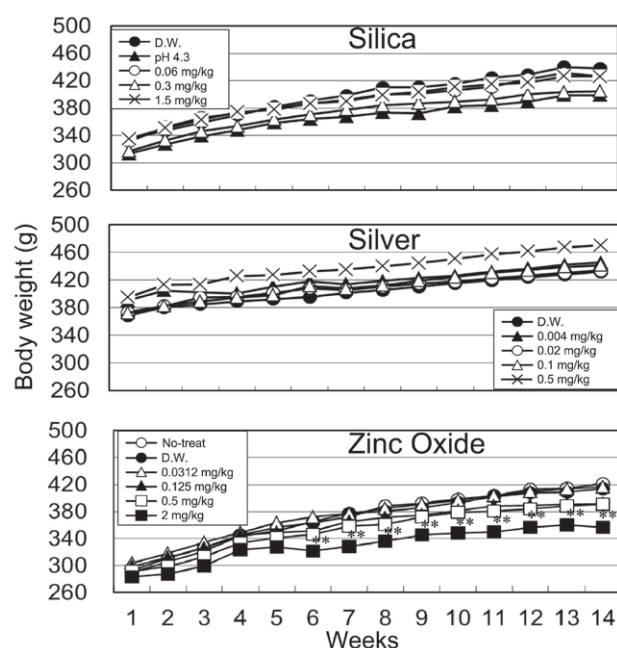


Fig. 4. The mean body weight curve of rats administered with silica, silver or zinc oxide nano-suspensions in the 13-week repeated dose test

Seven or six male rats per group were intratracheally sprayed in a 0.2 mL/rat portion of nano-suspensions once a week for 13 weeks. Body weight was measured once a week. Normal increase of the body weight was not inhibited during the experiment, except for at the highest dose of zinc oxide (** $P < 0.01$, $n = 6$).

群と同様の値で推移したが、酸化亜鉛投与群の 2 mg/kg 群では統計学的に有意な平均体重増加抑制が、0.125 及び 0.5 mg/kg 群では抑制傾向が認められた (Fig. 4).

血液学的検査では、シリカ及び銀投与群とも対照群との間に差は認められなかつたが、酸化亜鉛投与群では 2 mg/kg 群で白血球及び血小板数が統計学的に有意に増加した。その程度は溶媒対照群と比較し、白血球数で約 50%、血小板数で約 30% の増加であった。

臓器相対重量では、酸化亜鉛投与群では 0.125 mg/kg 群以上で用量依存性に肺相対重量が増加した (Table 2)。また、解剖時の検査において酸化亜鉛投与群では 0.5 mg/kg 群以上で肺の表面が粗糙で淡褐色の変色域が観察された。

3. 3. 2 病理組織学的検査成績

観察された主な病理組織所見 (Fig. 5 及び Fig. 6) と共に、病理組織学的検査で観察された病変の分布及びその発生动物数について模式的に Fig. 7 に示す。

シリカ、銀、酸化亜鉛いずれの対照群 (溶媒群及び無処置群を含む) においても、軽度かつ低頻度ながら泡沫様細胞質を呈する肺泡マクロファージの肺胞内集簇巣や、血管周囲にリンパ球や好中球が集簇する血管周囲性炎症細胞集簇が散見された (Fig. 5A)。

以下各投与群で観察された所見を被験物質ごとに記載する。

シリカ投与群では、泡沫状肺泡マクロファージの局所的集簇あるいは慢性の分布、血管周囲性炎症性細胞集簇が対照群より増悪化しただけでなく (Fig. 5B)、炎症の進展あるいは炎症の持続に伴い観察される肉芽腫性炎症が用量依存性に頻度及び程度ともに増強して認められた。また同変化には一部肺胞上皮/気管支上皮の過形成 (増生) を伴っていた。これらの病変は各葉にほぼ均一に分布しており、0.3 mg/kg 以上の群で顕著であった (Fig. 7)。また、リンパ装置の所見として、肺の気管支粘膜下のリンパ装置 (BALT) の軽度な小肉芽腫が 0.3 mg/kg 以上群で観察され、縦隔リンパ節の肉芽腫は全例に認められた。1 例ではあるが、軽度な BALT 内の小

Table 2. The final body weight and lung weight in rats treated with zinc oxide

	Control		Zinc Oxide (mg/kg)			
	intact	D.W.	0.0312	0.125	0.5	2
No. of rats examined	5	6	6	6	6	6
Body weight (g)	421.1 \pm 26.4	413.9 \pm 28.4	416.5 \pm 29.0	391.9 \pm 18.0	390.6 \pm 31.3	356.7 \pm 13.9**
Lungs weight (g)	1.34 \pm 0.117	1.45 \pm 0.189	1.49 \pm 0.166	2.14 \pm 0.280**	2.87 \pm 0.392**	3.11 \pm 0.366**
% of body weight	0.32 \pm 0.037	0.35 \pm 0.028	0.36 \pm 0.028	0.54 \pm 0.064	0.73 \pm 0.058*	0.87 \pm 0.106**

Figures indicate the mean value \pm SD. *, **: Statistically significant difference from control (D.W.) at 5% or 1%, respectively.

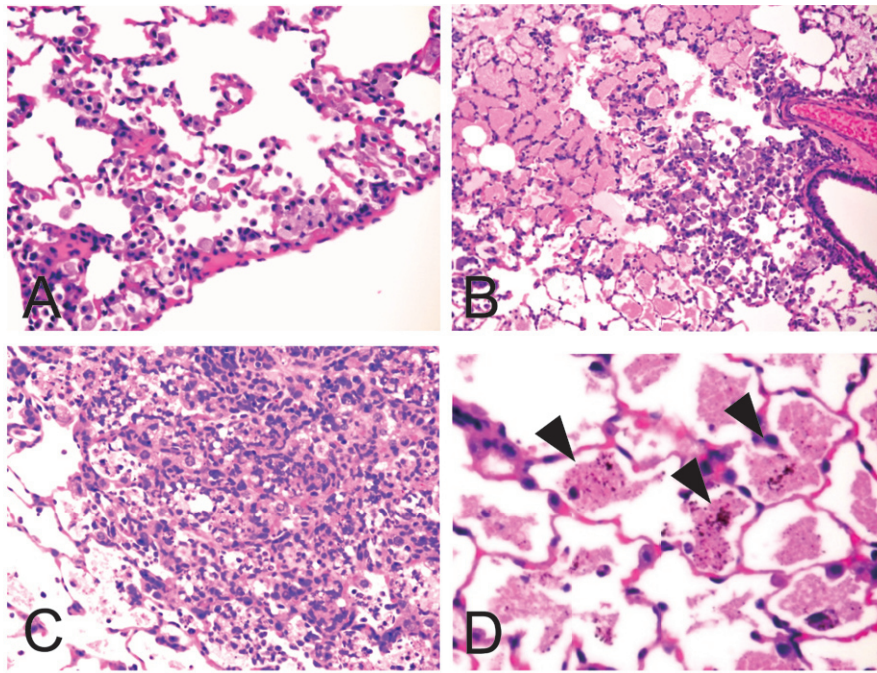


Fig. 5. Typical histopathological findings observed in the silica (A, B) or silver (C, D) study

A: The control (distilled water) group. Localized foamy cells in alveoli. x 20. B: 1.5 mg/kg group of silica. Granulomatous inflammation with foamy cells. x 20. C: The 0.5 mg/kg group of silver. Silver treatment also induced granulomatous inflammation with foamy cells; however, the intensity was more serious compared to that in the silica group. x 20. D: The 0.5 mg/kg group of silver. Silver particles were morphologically identified as black particles in the cytoplasm of foamy cells (arrowheads). x 80. A-D, HE staining.

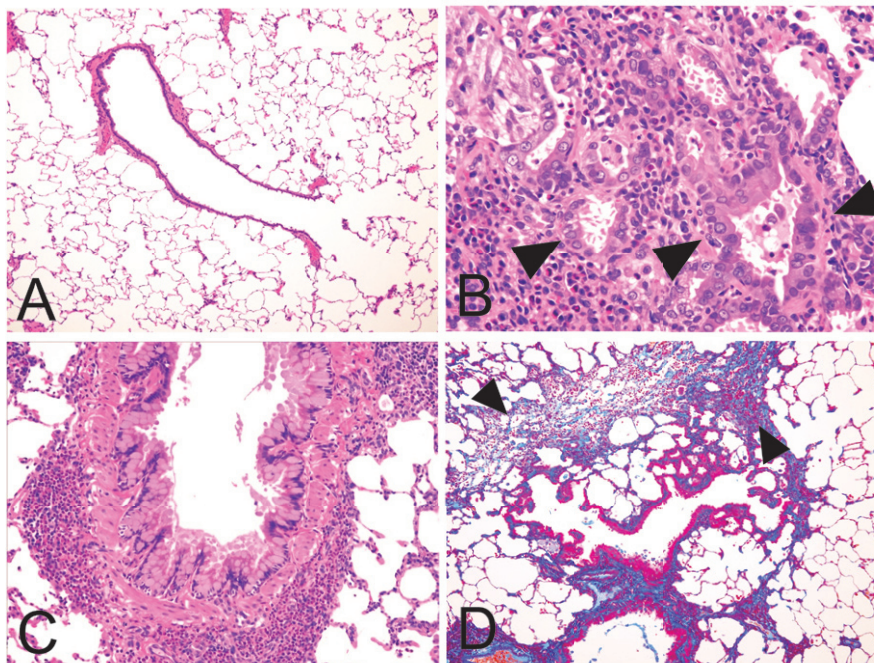


Fig. 6. Typical histopathological findings observed in the zinc oxide study

A: The control (distilled water) group. No abnormality was detected in both alveolar and bronchiolar areas. x 10. B: The 2 mg/kg group. Severe granulomatous inflammation with hyperplasia of bronchiolar/alveolar epithelium (arrowheads). x 40. C: Increased mucus secretion in the bronchus was surrounded by inflammatory cells. x 20. D: The 2 mg/kg group. An increase in fibrous tissues in alveolar and/or bronchiolar area, which was found as thickened blue area (arrowheads). x 20. A-C, HE staining; D, Masson trichrome staining.

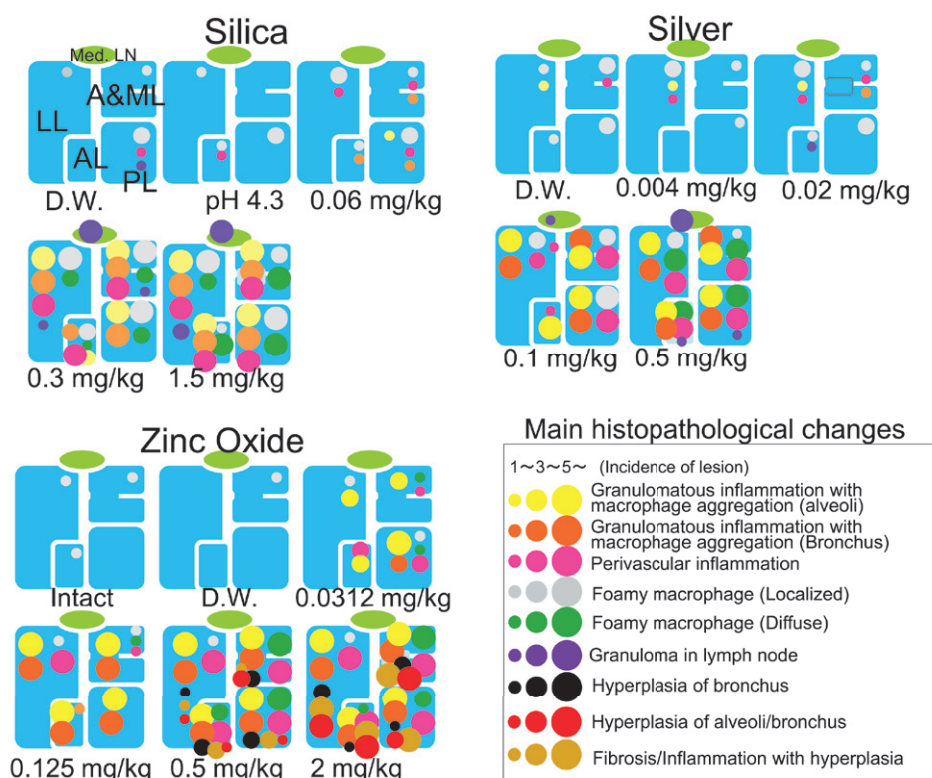


Fig. 7. Distribution of pulmonary lesions induced by silica, silver or zinc oxide nano-suspensions in each lobe

LL, left lobe; A&M RL, anterior and middle right lobes; PL, posterior right lobe; AL, accessory lobe; Med. LN, mediastinal lymph node. D.W. indicates distilled water. One week after the last administration of the 13-week repeated dose test, rats were subjected to the autopsy.

肉芽腫が蒸留水群に認められた。リンパ節ではさらにリンパ球の増加が認められた。

銀投与群では、シリカ群と同様の組織変化が認められ0.1 mg/kg群以上で顕著であった。シリカ群と異なる点として終末細気管支から続く肺胞道周囲において肺胞上皮過形成を伴う肉芽腫性炎が0.1 mg/kg群以上でほぼ全例に認められ、その程度もシリカ投与群より強かった (Fig. 5C)。また泡沫状マクロファージの細胞質内に黒褐色の粒子が0.1 mg/kg群以上で認められた (Fig. 5D)。

酸化亜鉛投与群では最低用量の0.0312 mg/kg群より投与による影響が認められ、シリカ及び銀両投与群で認められた所見が用量依存性に増悪化して観察された。0.5及び2 mg/kg群では病変の重篤化に加え、肉芽腫性炎症部の気管支過形成 (気管支上皮化) 及び肺胞上皮過形成が明らかで (Fig. 6B)、さらに粘液を容れる気管支上皮過形成も認められた (Fig. 6C)。特記すべき所見として0.5 mg/kgの一部及び2 mg/kg群の全例で肉芽腫性炎症部及び病変部間に線維化 (マッソントリクローム染色で確認, Fig. 6D) が用量依存性に認められたことが挙げられる。

電子顕微鏡学的検査では、肺胞内マクロファージ内のライソゾームの一部で電子密度の高い部位が観察された

(Fig. 8, insert)。このマクロファージ全体についてEDS解析を実施したところ、銀Agの局在を示すピークが認められた (Fig. 8)。この値は染色で使用した元素 (オスミウムOs, 鉛Pb, あるいはウランU) より高い値であった。シリカについては確認できなかった。酸化亜鉛について泡沫状を示すマクロファージは認められたが、EDS解析において亜鉛Znのピークは認められなかった。

肺の病理組織学的検査より、経気道暴露による肺病変のNOAELはシリカが0.06 mg/kg未満、銀が0.004 mg/kg、酸化亜鉛が0.0312 mg/kg未満と推定された (Fig. 7)。

4. 考察

In vitro 試験では、銀が最も強い細胞毒性を示し、次いで酸化亜鉛、シリカの順となり、各被験物質間で大きな差が認められた。染色体異常試験では、シリカ及び銀は陰性であったが、酸化亜鉛は染色体構造異常を誘発し陽性であった。細胞毒性試験は被験物質の基本的な生物毒性を知るために、染色体異常試験は遺伝毒性の一つの指標として染色体の構造的及び数的異常 (倍数体) の誘発を確認するためにそれぞれ実施した。アスベストが倍数体を誘発^{10,11)}することはよく知られており、また、これまでに高率に倍数体を誘発するナノ材料としてカーボ

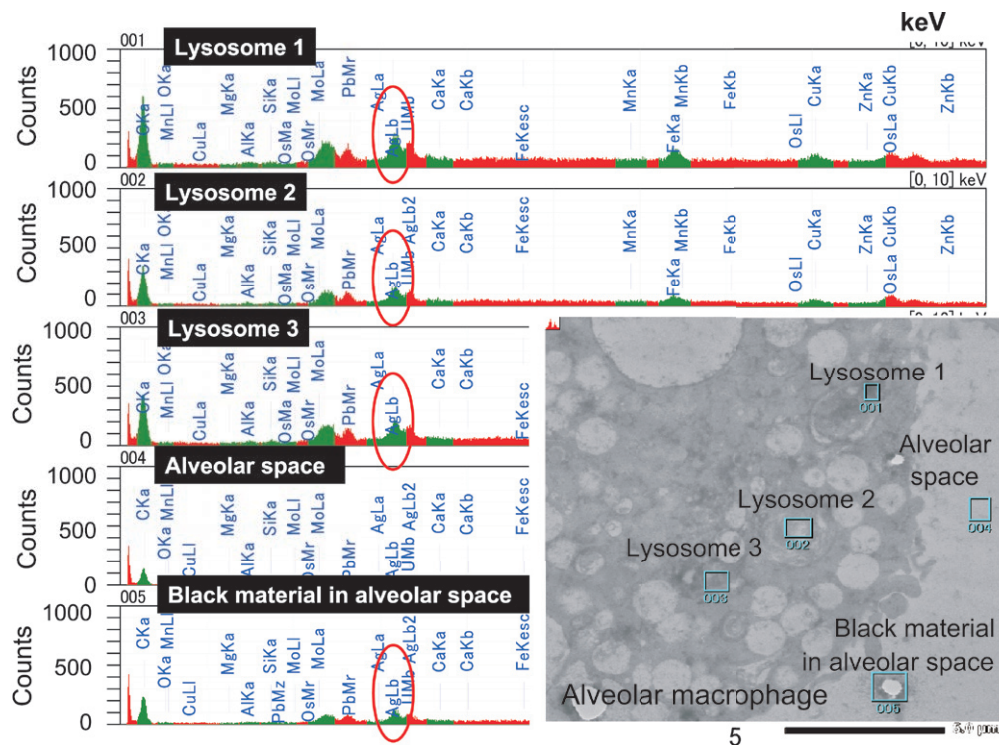


Fig. 8. EDS analysis in a foamy macrophage in the silver group at 0.5 mg/kg

Ag (red circles) was increased in captured areas in lysosomes 1, 2 and 3, and black particle (005). Insert: Electron microscopic image of the foamy macrophage. This finding suggests that phagocytosis of silver particles in lysosome of macrophage.

ンナノチューブ（ただし、長さは μm サイズ）が報告¹¹⁾されており、倍数体誘発はナノ材料の毒性指標の一つとなると考えている。

In vivo 試験では、体重、臓器相対重量、血液学的検査等複数の指標による結果を得たが、病理組織学的検査のみが、酸化亜鉛投与群で示されているように、最低用量0.0312 mg/kg群から陰性対照群との有意差を示しており、最も感受性が高かった。肺相対重量の増加及び肺肉眼所見とも一致していた。酸化亜鉛投与により有意な体重増加抑制が観察され、用量依存性に重篤化した肺線維化が認められた。肺線維化は肺の炎症が慢性化して起きる場合もあり、呼吸ができずに個体を死に至らしめる場合も考えられ、ヒトでも肺線維化は治癒しにくい病変であり重篤な毒性と考えられる。さらに、3種の被験物質に共通に観察される炎症性反応についても、酸化亜鉛はシリカ及び銀と比較して強い反応が観察されており、気管支粘液細胞の増生が用量依存性に観察されたのは、3種の被験物質のうちでは酸化亜鉛だけであった。肺傷害は、用いた3種の被験物質のうちでは酸化亜鉛が最も強かったが、EDS解析の結果亜鉛のピークは確認されず、酸化亜鉛そのものが投与部位に残って炎症作用を引き起こしているのではない可能性が示唆された。経気道暴露した酸化亜鉛は投与部位に長期間とどまることはなく投与後1週間以内に肺から消失している可能性が考えられ

た。ナノ材料の毒性機構解明のためには、材料の体内動態に関する研究が必要であると考えられる。

気管内反復投与試験では、ナノ材料という異物を肺に直接投与しているため生体反応としてマクロファージの遊走化という急性の炎症反応が誘発されることは容易に推察される。それに加えて材料のサイズ、化学組成により、それぞれの特徴的な病変が誘発されるのではないかと推察される。シリカ及び銀で観察された縦隔リンパ節の小肉芽腫、酸化亜鉛で観察された肺線維化がそれである。しかし、酸化亜鉛投与による肺以外の臓器への影響は、光学顕微鏡レベルでは病理組織学的には認められず、全身へ移行し傷害を引き起こしている可能性は低いと考えられた。

IARC（国際がん研究機関）の発がん性分類は、発がん性のリスクではなくヒトでの発がん性のハザードを示すものであるが、アモルファスシリカはグループ3（ヒトに対する発がん性について分類できない）に分類されている¹²⁾。本研究で用いているシリカもアモルファスであるが、IARCが調査した当時の試験では、ナノサイズを想定していなかったと考えられる。14週間という短期試験であることから、本研究で発がん性の予測はできないが、ナノというサイズの被験物質が誘発した肺での炎症が将来発がんに結びつくものか否かを識別できる指標があればと考えている。

本研究では、3種の被験物質のナノ分散液の試験を実施したが、手技の安定性、また、それぞれに特徴的な結果を得ることができたことから、本研究で使用した*in vitro*及び*in vivo*毒性試験法はナノ材料の安全性評価のためのスクリーニング試験法として有用ではないかと考えている。まずは、基本的な手法、細胞を標準化した方法で各種ナノ材料の毒性スクリーニングを開始し、比較可能なデータを蓄積することがナノ材料安全性評価につながると考えている。

近年、OECD、ISO/TC 229などの国際機関及び各国規制当局がナノ材料及び試験法の標準化を始めてはいるが、試験法が定まらず、各者各様の方法で実施しているため、データの比較ができない状況が続いている。また、試験液（ナノ分散液）の分散状態を示す指標（例：粒子径分布）の提示も重要である。ナノ材料は形状について、針状、粒状、ロッド状などがあり、その他に様々な特性（結晶型、純度、サイズ）を有していることから、材料工学の専門家の参加のもとに、ナノ材料の物理化学的特性及びその分散液の粒子径分布の情報を付した標準材料の供給があれば、ナノ材料の安全性評価が飛躍的に進むことが期待される。理想的にはアスベスト供給におけるUICC（International Union Against Cancer、国際対がん連合）のような機関の存在がナノ材料についても望まれる。

また、実際の家庭用品について安全性を評価するためには、ハザード評価と暴露評価を元にしたリスク評価が必要であり、今回の試験ではハザード評価に資する情報を得ることができた。今後、実際の製品について、スプレーの対象製品への付着率や噴霧粒子径サイズなどを考慮した暴露評価が実施され、最終的に市販の家庭用品中のナノ粒子に対するリスク評価が実施されることが望ましい。

5. 結論

市販の家庭用品にナノサイズで使用されているシリカ、銀及び酸化亜鉛について、*in vitro*及び*in vivo*毒性学的試験を実施した。その結果、酸化亜鉛のみが*in vitro*染

色体異常試験で陽性結果を示し、ラット13週間気管内反復投与試験では、最高用量で平均体重の増加抑制、病理組織学的検査では肺の線維化が観察された。経気道暴露による肺病変のNOAELは、シリカが0.06 mg/kg未満、銀が0.004 mg/kg、酸化亜鉛が0.0312 mg/kg未満であった。本研究で使用した3種の試験法は、従来から化学物質等の安全性評価で使用されてきた安定した試験法であるが、今回の3種の被験物質のナノ分散液について、それぞれ特徴的な結果を示した。より詳細な検討が必要であるが、ナノ材料の安全性評価の第一次スクリーニング試験法候補として、有望であると考えられる。

引用文献

- 1) Hirano S, Higo S, Tsukamoto N, Kobayashi E, Suzuki KT: *Arch Toxicol*. 1989;63:336-42.
- 2) Chen Y, Chen J, Dong J, Jin Y: *Toxicol Ind Health*. 2004;20:21-7.
- 3) Warheit DB, Webb TR, Colvin VL, Reed KL, Sayes CM: *Toxicol Sci*. 2007;95:270-80.
- 4) Sayes CM, Reed KL, Warheit DB: *Toxicol Sci*. 2007;97:163-80.
- 5) Miyawaki J, Yudasaka M, Azami T, Kubo Y, Iijima S: *ACS Nano*. 2008;2:213-26.
- 6) Aiso S, Yamazaki K, Umeda Y, Asakura M, Kasai T, Takaya M, Toya T, Koda S, Nagano K, Arito H, Fukushima S: *Ind Health*. 2010;48:783-95.
- 7) Koyama H, Utakoji T, Ono T: *Gann*. 1970;61:161-167.
- 8) Ishidate M Jr, Odashima S: *Mutat Res*. 1977;48:337-54.
- 9) Matsuoka A, Sofuni T, Miyata N, Ishidate M Jr: *Mutat Res*. 1991;259:103-10.
- 10) Koshi K, Kohyama N, Myojo T, Fukuda K: *Ind Health*. 1991;29:37-56.
- 11) Asakura M, Sasaki T, Sugiyama T, Takaya M, Koda S, Nagano K, Arito H, Fukushima S: *J Occup Health*. 2010;52:155-66.
- 12) IARC Monographs: vol.68, 1997