

(27) ICRマウスにおける44nm¹⁴C標識シリカナノ粒子を用いた体内動態評価モデルの構築

今村治世¹・高倉誠人^{1*}・坂井伸光¹・中山亜紀¹
佐々木克典¹・真見一樹¹・三好弘一²・杉本実紀³・米田稔¹

¹京都大学工学研究科都市環境工学専攻 (〒615-8540 京都府京都市西京区京大学柱4)

²徳島大学アイソトープ総合センター (〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町3-18-15)

³京都大学農学研究科応用生物科学専攻 (〒606-8317 京都府京都市左京区吉田本町)

* E-mail: takakura@risk.env.kyoto-u.ac.jp

ナノマテリアルによる健康影響への懸念が高まっている。しかし、ナノマテリアルについては毒性機序のみならず、体内に吸収された後、どのように分配され、また標的臓器が何か、という基礎情報も不明である。そのため、本研究では日本で毎年9万トン以上生産されているシリカナノ粒子を対象として、生体内における挙動を調査すると共に、標的臓器を推定するためにPBPKモデルを構築した。¹⁴Cで標識された44nmのシリカ粒子を調整し、ICRマウスに尾静脈、または気管内から投与を行った。その結果、組織中のシリカ粒子の濃度は脾臓、肝臓の順で高くなった。このデータを基にして、マウスとヒトにおけるPBPKモデルを構築した。構築したヒトPBPKモデルより、脾臓と肺が標的臓器となる可能性が示唆された。

Key Words: PBPK model, silica particles, pharmacokinetics, nano particles

1. はじめに

ナノ粒子の市場規模は3兆円を超え、私たちの生活に欠かせないものとなっている。今後も私達の身近な所にナノ粒子を使用した製品が増加していけば、職業的にナノ粒子を使用している人のみならず、一般に生活している人でもナノ粒子に曝露される機会が増加することが予想される。このような背景に加え、ナノ粒子の健康影響を不安視する声が多く報告されている。衛生工学的な観点から、このような問題の解決は必須であり、ナノ粒子の健康影響のリスク評価が急務となっている。ナノ粒子の毒性に関する情報は蓄積されつつあるが、その健康影響を評価するためには、生体内での蓄積率や循環血液に移行した粒子が蓄積しやすい臓器・組織(標的臓器・組織)を把握する必要がある。本研究では広く工業に使用されているシリカ粒子を用いてリスク評価を行うことを目指した。現在シリカ粒子は粒径が100nm以下であるようなナノサイズのものからマイクロサイズのものまで、医薬品や化粧品を初めとした多くの製品に用いられている。そこで本研究では、粒径を44nmに調整したシリカ粒子をマウスに尾静脈投与する実験を行い、シリカ粒子の体内動態を実験的に把握した。同時に、シリカ粒子を気管内に投与す

る実験を行い、肺から血液への移行率を検討し、シリカ粒子の吸入曝露による体内動態推定の基礎データ収集を行った。さらに、外部曝露量と臓器・組織蓄積量の関係を把握するため、動物実験より得られたデータを用い、マウスの体内におけるシリカ粒子のモデルを構築し、ヒトに拡張することで、ヒトの体内におけるシリカ粒子のPBPK (Physiologically-based Pharmacokinetic)モデルを構築した。

2. マウスにおける投与実験

(1) 尾静脈投与実験

a) 投与粒子

投与粒子は¹⁴C標識シリカ粒子を使用した。シリカ粒子の標識については、ゾル-ゲル法を用いて¹⁴C標識化合物を使ってシリカ粒子に標識する方法で行った¹⁾。以下に、粒子の作成方法を述べる。

¹⁴C標識アデノシン5-ニリン酸三ナトリウム(PerkinElmer)30μLに、0.1vol%のシランカップリング試薬(Fluka)1μLを室温で混合した。この溶液に、テトラエチルオルソシリケート(Wako)2μL、エタノール(Wako)30μL、水酸化アンモニウム(Wako)10μLを添加して混合し、7日間、室温で重縮合反応させ、

^{14}C 標識アデノシン 5-二リン酸シリカ懸濁液を得た。その後、攪拌式限外ろ過装置(Millipore Model 8003 series)を使用して限外ろ過を行った。限外ろ過にあたっては、メンブレンフィルター(Millipore YM-100)を用いて圧力 0.4MPa 以下にてろ過を行い、反応液を 1.5mL 程度まで濃縮した。その後、濃縮した反応液に蒸留水を加え、再度限外ろ過を行った。この操作を 6 回繰り返して、溶液中のエタノールを水に置換するとともに、テトラエチルオルソシリケートと重合反応しなかったアデノシン 5-二リン酸三ナトリウムを取り除いた。今回は、この操作における最終的なろ過液を ^{14}C 標識シリカ粒子懸濁液のサンプルとして用いた。分散剤は使用しなかった。

なお、粒子懸濁液を作成した当日及びそれから 4 日後に粒度分布計(大塚電子 Particle Size Analyzer)を用いてサンプルの粒径分布を測定したところ、それぞれ $42.2 \pm 9.6\text{nm}$ 、 $43.9 \pm 11.1\text{nm}$ であった。このことから、粒径が時間の経過に対して安定していることが確認できた。また、検出されたピークは 1 つだけであったことも考慮するに、サンプル中の粒径の存在分布の幅による体内動態の差異に関しては無視できるものとし、 44nm 程度の均一な粒子が分散していると考えて以降の解析を行った。なお、本実験では 2 回目の測定の翌日に投与実験を行った。また、ICP-AES(サーモサイエンティフィック iCAP 6300)を用いて放射能濃度と粒子重量濃度の関係を算定し、作成したシリカ粒子 1g あたり 0.182Bq の放射能を持つことを確認した。

b) 供試動物

供試動物には ICR(Institute of Cancer Research)系マウス(雄、8 週齢、体重:実験開始時 32~37g)を用いた。

c) 方法

マウスにアバーチン麻酔を施した後、体重当たりの投与濃度が 0.073mg/kg となるように粒子懸濁液を尾静脈投与した。投与から 0.25、0.5、1、2、6、24 時間後に解剖し、臓器・組織を摘出、細断の後、溶解した。時間ごとの動物数は基本的に 3 とし、体内残存率の変化が大きいと考えられる 1 時間群と 2 時間群をそれぞれ 5 および 4 とした。

また、尾静脈投与したマウスの糞・尿を採取することで粒子の排泄経路を確認するために排泄試験を行った。室温 25°C で水、餌を自由に摂取できるように条件において代謝ケージ内でマウスを飼育した。投与後 8 時間および 7 日後まで 24 時間ごとに糞・尿を回収し、溶解した。摘出組織及び溶解条件は表 -1 に示す。これらの放射能を液体シンチレーションカウンター(Aloka LSC-5100)を用いて測定した。また放射能の測定値から粒子重量を算出した。

d) 結果と考察

各組織の組織重量あたりの移行率の経時変化を表 -2 に示す。ここで本実験では投与回ごとに投与粒子量が異なったため、組織重量あたりの移行率(投与した放射能に対する各組織の放射能の割合を、各組織の重量で割った値)を用いて評価することとした。図-1 においては縦軸を、測定対象臓器中シリカ粒子

の合計値の、投与量に対する割合(体内残存率)とし、横軸を投与後経過時間とした。図-2 においては縦軸を、排泄試験における糞・尿に含まれるシリカ粒子量の、投与量に対する割合の積算(排泄率)とし、横軸を投与後経過時間とした。

肝臓では投与 6 時間、24 時間後における値が他の組織と比べて高くなった。この理由として、脾臓、肝臓ではマクロファージによる粒子の取り込みの影響があると考えられる²⁾。

尾静脈投与実験の体内残存率は投与 15 分後から投与 24 時間後までの間に 98%から 9%と 87%減少したが、投与 1 日後における糞・尿の排泄率の合計は 33%であり、体内残存率の減少値と大きく異なった。この理由として以下の 3 点を挙げる。1 つ目は脾臓や膀胱、生殖器などの測定対象としていない臓器があることが挙げられる。粒子が、投与直後から未測定組織にも移行し始めているのであれば、その移行量だけ体内残存率の減少を招く。2 つ目はリンパ節や骨、筋肉といった体中に広く分布している組織を、一部少量の組織を採取し、これを全体の代表として測定していることが挙げられる。組織内の粒子の分布は必ずしも均一ではなく、局在している可能性もあり、一部の組織から全体の組織中の粒子量に換算した場合、正確な値を反映していない可能性がある。3 つ目は、代謝ケージに付着し回収できなかった糞や尿の分だけ、排泄率が減少したことが挙げられる。

(2) 気管内投与実験

a) 投与粒子

2 章 1 節 a 項の尾静脈投与実験に使用した粒子と同じサンプルを使用した。

b) 供試動物

尾静脈投与実験と同様に ICR(Institute of Cancer Research)系マウス(雄、8 週齢、体重:実験開始時 32~37g)を用いた。

c) 方法

はじめに気管ゾンデを装着したシリンジで空気を $600\mu\text{L}$ 入れ、その後既定量の粒子懸濁液を採った。これを気管にゆっくりと吐出することで、シリンジ内の粒子懸濁液を空気とともに気管内に投与した。投与から 0.5、2、6、24 時間後に、麻酔を施し、左心室より採血を行った。採血の後、開腹、開胸し、肺、肝臓、脾臓、胃、盲腸、小腸、大腸の各内容物を摘出した。時間ごとの動物数は、30 分群が 7 匹、その他の時間群が 2 匹ずつで、合計 13 匹のマウスを用いた。測定対象試料の作成方法は、2 章 1 節 c 項で示した通りである。

d) 結果と考察

気管内投与後の気管ゾンデを装着したシリンジを確認したところ、わずかに残った懸濁液が確認できた。そのため投与後のシリンジを洗浄し、その洗浄液の放射能を計測することで、投与後にシリンジに残る懸濁液の割合を確認した。その結果、投与量の 6.4%がシリンジ内に残ることが確認された。そのた

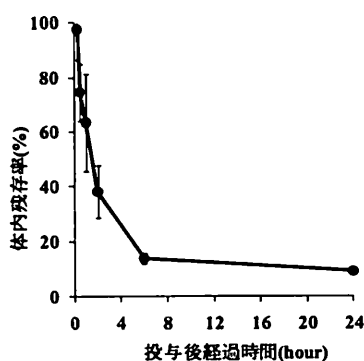


図-1 投与実験の体内残存率の経時的変化

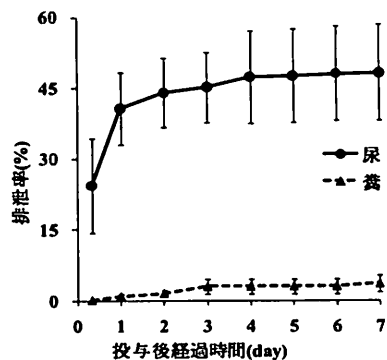


図-2 排泄試験の排泄率の経時的変化

表-1 組織溶解条件

組織	溶解剤	溶解条件
血液	soluene350 and isopropyl alcohol	50℃, 24 時間
骨	硝酸+過塩素酸	50℃, 1 時間
糞	水+soluene350	50℃, 溶けるまで
その他	soluene350	50℃, 溶けるまで

表-2 各組織の組織重量あたりの移行率の経時変化

組織	採取重量 (mg) (n=21) (Mean±SD)	組織重量あたりの移行率(-/mg tissue)					
		15 分後 (n=3)	30 分後 (n=3)	1 時間後 (n=5)	2 時間後 (n=4)	6 時間後 (n=3)	24 時間後 (n=3)
		(Mean±SD) × 10 ⁻⁵					
肺	194±13	24±1.7	10±8.4	12±12	3.8±3.6	<0.093	<0.28
血液	3021±137	17±2.4	6.8±7.2	7.4±6.4	1.5±1.0	0.20±0.10	0.10±0
脾臓	146±45	15±3.6	19±2.5	14±2.7	19±14	6.3±2.5	6.3±2.0
腎臓	597±46	7.5±4.2	5.2±0.50	4.7±2.1	1.3±0.20	0.50±0.20	0.50±0.10
心臓	165±12	6.7±2.6	2.9±1.7	3.2±2.3	1.3±0.60	<0.28	<0.28
肝臓	2056±219	6.6±0.40	8.0±1.4	5.7±0.90	5.4±1.9	3.9±1.0	2.6±0.40
内容物 (大腸)	387±137	5.1±3.6	1.7±0.90	3.3±2.4	<0.17	<0.19	1.4±0.90
頸部 リンパ	8±2	3.7±6.2	0.40±0.70	3.0±2.1	4.3±3.0	1.3±1.7	2.4±1.7
胃	307±46	2.6±1.6	1.9±1.4	1.6±1.5	0.40±0.10	<0.15	<0.14
顎下 リンパ	8±3	2.6±4.6	0.80±1.5	2.0±2.9	4.8±3.5	2.1±1.7	2.2±1.4
大腸 内容物 (胃)	384±50	2.2±0.90	1.5±0.40	1.4±0.70	1.0±0.40	<0.12	<0.12
内容物 (盲腸)	732±400	1.8±3.1	0.90±0.90	0.40±0.50	0.40±0.80	<0.63	0.30±0.20
盲腸	345±158	1.7±1.3	1.8±1.1	<0.086	<0.10	<0.12	<0.12
小腸	186±33	1.4±0.90	0.50±0.30	0.50±0.40	0.30±0.40	<0.24	<0.24
内容物 (小腸)	1614±193	1.0±0.50	1.7±0.50	1.4±0.40	0.60±0.10	<0.28	<0.28
筋肉	238±103	<0.27	1.2±1.3	0.60±0.50	1.2±1.0	<0.13	<0.13
皮膚	13234±2167	0.60±0.30	0.90±0.40	0.80±0.90	0.90±0.20	<0.033	<0.033
脳	6203±1558	0.50±0.70	1.6±0.80	0.80±0.40	0.50±0.30	<0.022	<0.022
骨	486±29	0.50±0.40	0.50±0.10	0.50±0.20	0.90±0.90	<0.028	<0.028
	3780±252	0.50±0.20	0.10±0.10	0.20±0.20	<0.010	<0.036	<0.035

表-3 移行率の経時変化(%)

組織	30 分後 (n=7)	2 時間後 (n=2)	6 時間後 (n=2)	24 時間後 (n=2)
肺	27±2.1	13±2.0	8.0±2.4	7.5±2.4
血液	3.0±2.2	1.9±0.21	0.44±0.030	0.65±0.33
肝臓	1.3±2.5	1.3±0.99	<0.15	<0.14
内容物(胃)	<0.068	4.0±5.5	<0.15	<0.14
内容物(大腸)	<0.068	<0.15	<0.15	<0.14
内容物(盲腸)	<0.068	<0.15	0.29±0.37	<0.14
内容物(小腸)	0.19±0.43	0.30±0.060	<0.15	<0.14
脾臓	<0.068	<0.15	<0.15	<0.14
体内残存率 (肺以外の組織)	4.5±1.0	7.4±2.2	0.73±0.17	0.65
体内残存率 (肺を含む)	31±0.95	20±2.0	8.7±1.0	8.2±1.0

め、設定した投与量の 93.6%が実際に気管内に投与されたものとして以下の解析を行った。

各組織の移行率の経時変化を表-3 に示す。肺においては投与 30 分後に 27%で最大値となり、その後経時的に減少し、投与 24 時間後には 7.5%となった。一方、血液も投与 30 分後に 3%で最大値となり、投与 24 時間後に 0.65%となった。肝臓や脾臓は目立った粒子の移行が見られなかった。気管内投与実験では、投与した粒子を吐き戻した後、嚥下して胃腸管に侵入する恐れがあったため、内容物に粒子が混入しているかを確認した。その結果、胃や小腸の内容物から粒子が検出されたものの、その量は極僅かであり、吐き戻しによる胃腸管への侵入は無視できるものとした。次に、肺-血液移行係数を算出した。ここで肺-血液移行係数とは、肺に沈着した粒子のうち、血液中に移行した粒子の割合とする。具体的には、肺以外の組織から回収した粒子の量を肺を含めた組織から回収した粒子の量で除することで算出した。肺-血液移行係数は投与 30 分後で 0.14、投与 2 時間後で 0.37 となり、それ以降は減少し、投与 6 時間後で 0.084、投与 24 時間後で 0.080 となった。

体内残存率は、最高値を示した投与 30 分後で約 30%と、尾静脈投与実験に比べて低い値となった。この原因としては、解析対象とした臓器が少なかったことが挙げられる。また、肺泡クリアランスによるリンパ節への移行などの可能性も考えられる³⁾。

3. マウス PBPK モデルの構築

(1) PBPK モデルの構築

本研究で扱う PBPK モデルは、Mahboubeh らのモデルを参考に構築した⁴⁾。このモデルは生体内を動脈血、静脈血、肺、心臓などのコンパートメントに分け、コンパートメント間を血流で結んだものである。その際、肺から出て各組織に向かう血液を動脈

血とし、各組織から出て肺に向かう血液を静脈血としている。本モデルにおいては、生体内を動脈血、静脈血、肺、脳、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、その他の組織の 9 のコンパートメントに分けた。

脾臓と肝臓は投与実験の結果から、粒子の移行・蓄積の傾向が他の組織と異なったため、membrane-limited model を応用した⁴⁾。このモデルは、1 つの組織を inner tissue と extra tissue の 2 つのサブコンパートメントで構成することで、血液中と異なる挙動の再現を可能にしている。なお、その他の臓器は 1 つのコンパートメントで構成した。

(2) 支配方程式

それぞれのコンパートメントにおいて質量保存則を適用することにより、物質収支を式(1a)~(1m)の微分方程式群で表現した。

(3) パラメータ設定

臓器容積は、2 章 1 節で行った尾静脈投与実験で用いた 15 匹のマウスの臓器・組織の重量の平均値を用い、臓器・組織の密度が 1g/mL であるとして平均臓器・組織重量から平均臓器・組織体積を決定した。血流量は、文献値を用いた⁵⁾⁶⁾。組織/血液分配係数と排泄係数に関しては川本らの測定法を参考に、実験より求めた⁷⁾。具体的な作業内容を以下に示す。ICR マウス(雄、8 週齢)から血液、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、脳を摘出した。各臓器は細かく刻み、50mg ずつ 2 本のバイアル瓶に入れた。それぞれのバイアル瓶に 2 章 1 節で行った尾静脈投与実験で使った粒子と同じサンプルを 150μL 添加し、室温で 24 時間振とうした。振とう後、0.22μm フィルター(IWAKI)を用いて上澄み液を分離した。上澄み液にシンチレータとしてハイオニックフロー(PerkinElmer)を 5mL 添加し、放射能を液体シンチレーションカウンターにて定量した。得られた放射能から組織分配率を求めた。

肺

$$V_{Lu} \frac{dC_{Lu}}{dt} = Q_{Lu} (C_{Ve} - \frac{C_{Lu}}{P_{Lu}}) \quad (1a)$$

脳

$$V_{Br} \frac{dC_{Br}}{dt} = Q_{Br} (C_{Ar} - \frac{C_{Br}}{P_{Br}}) \quad (1b)$$

心臓

$$V_{He} \frac{dC_{He}}{dt} = Q_{He} (C_{Ar} - \frac{C_{He}}{P_{He}}) \quad (1c)$$

脾臓 (extra tissue)

$$V_{Sp-ex} \frac{dC_{Sp-ex}}{dt} = \left(Q_{Sp} C_{Ar} - Q_{Sp} \frac{C_{Sp-ex}}{P_{Sp}} \right) - k_{Sp} (C_{Sp-ex} - C_{Sp-in}) \quad (1d)$$

脾臓 (inner tissue)

$$V_{Sp-in} \frac{dC_{Sp-in}}{dt} = k_{Sp} (C_{Sp-ex} - C_{Sp-in}) \quad (1e)$$

脾臓

$$C_{Sp} = \frac{C_{Sp-ex} \cdot V_{Sp-ex} + C_{Sp-in} \cdot V_{Sp-in}}{V_{Sp}} \quad (1f)$$

肝臓 (extra tissue)

$$V_{Li-ex} \frac{dC_{Li-ex}}{dt} = \left\{ (Q_{Li} - Q_{Sp}) C_{Ar} + Q_{Sp} \frac{C_{Sp-ex}}{P_{Sp}} \right\} - Q_{Li} \frac{C_{Li-ex}}{P_{Li}} - k_{Li} (C_{Li-ex} - C_{Li-in}) - R_{fe} C_{Li-ex} \quad (1g)$$

肝臓 (inner tissue)

$$V_{Li-in} \frac{dC_{Li-in}}{dt} = k_{Li} (C_{Li-ex} - C_{Li-in}) - R_{fe} C_{Li-in} \quad (1h)$$

肝臓

$$C_{Li} = \frac{C_{Li-ex} \cdot V_{Li-ex} + C_{Li-in} \cdot V_{Li-in}}{V_{Li}} \quad (1i)$$

腎臓

$$V_{Ki} \frac{dC_{Ki}}{dt} = Q_{Ki} (C_{Ar} - \frac{C_{Ki}}{P_{Ki}}) - R_{Ur} Q_{Ki} C_{Ar} \quad (1j)$$

その他

$$V_{Ot} \frac{dC_{Ot}}{dt} = Q_{Ot} (C_{Ar} - \frac{C_{Ot}}{P_{Ot}}) \quad (1k)$$

動脈血

$$V_{Ar} \frac{dC_{Ar}}{dt} = Q_{Lu} \left(\frac{C_{Lu}}{P_{Lu}} - C_{Ar} \right) \quad (1l)$$

静脈血

$$V_{Ve} \frac{dC_{Ve}}{dt} = \sum Q_i \left(\frac{C_i}{P_i} - C_{Ve} \right) \quad (1m)$$

(i = Br, He, Li, Ki, Ot)

V_i : 組織 i の体積(L)

C_i : 組織 i のシリカ粒子濃度(mg/L)

Q_i : 組織 i へ流入する血液流量(L/min)

P_i : 組織 i の組織/血液分配係数(-)

R_{Fe} : 糞中排泄速度定数(L/min)

R_{Ur} : 尿中排泄速度定数(-)

k_{Li} : 肝臓における膜透過係数(L/min)

k_{Sp} : 脾臓における膜透過係数(L/min)

Lu : 肺に関する係数を示す添字

Br : 脳に関する係数を示す添字

He : 心臓に関する係数を示す添字

$Sp-in$: 脾臓(inner tissue)に関する係数を示す添字

$Sp-ex$: 脾臓(extra tissue)に関する係数を示す添字

Sp : 脾臓全体に関する係数を示す添字

$Li-in$: 肝臓(inner tissue)に関する係数を示す添字

$Li-ex$: 肝臓(extra tissue)に関する係数を示す添字

Li : 肝臓全体に関する係数を示す添字

Ki : 腎臓に関する係数を示す添字

Ot : その他の臓器に関する係数を示す添字

Ar : 動脈血に関する係数を示す添字

Ve : 静脈血に関する係数を示す添字

$$P_i = \frac{R_T}{R_B} = \frac{(R_A - R_{Ts})}{(R_A - R_{As})} \quad (2)$$

P_i : 組織/血液分配係数(-)

R_T : 組織中に含まれる放射能(Bq)

R_B : 血液中に含まれる放射能(Bq)

R_A : 添加したシリカ粒子懸濁液に含まれる放射能(Bq)

R_{Ts} : 組織の上澄み液に含まれる放射能(Bq)

R_{As} : 血液の上澄み液に含まれる放射能(Bq)

上記の式(2)で算出した組織分配率を血液分配率で割ることによって、組織/血液分配係数を求めた。

この手法を用いて推定した分配率を基に、目視によってフィッティングを行い、実験結果を良好に説明できる数値を導出した。

マウス PBPK モデルに使用したパラメータを付録に示した。

(4) シミュレーション設定

1期あたりの時間単位を 0.01 分とし、投与から 24 時間後(144000 期)までのシミュレーションを行った。シリカ粒子は時間 0 において全量が動脈血に存在するものとした。使用言語は Excel Visual Basic for Applications を使用した。

(5) シミュレーション結果

構築した PBPK モデルによって 2 章 1 節で行った尾静脈投与実験で得られた実測データの再現を試みた。以下の図-3-5 に血中濃度、体内残存率、各臓器中濃度の PBPK モデルによるシミュレーション結果を示す。なお、肝臓と脾臓はそれぞれ支配方程式における C_{Li} (肝臓全体における濃度)と C_{Sp} (脾臓全体における濃度)の計算結果を示している。これらの図

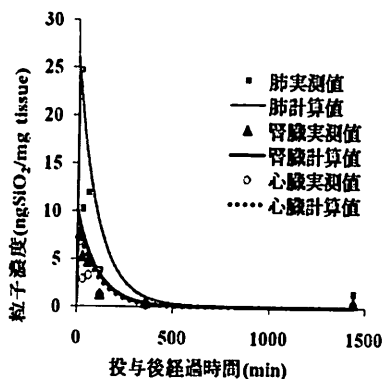


図-3 シミュレーション結果(肺, 腎臓, 心臓)

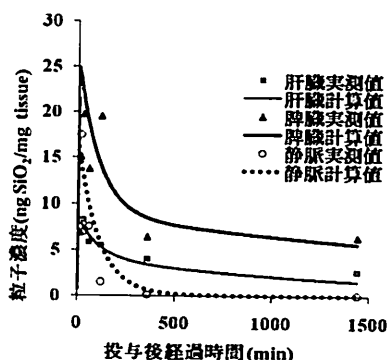


図-4 シミュレーション結果(肝臓, 脾臓, 静脈血)

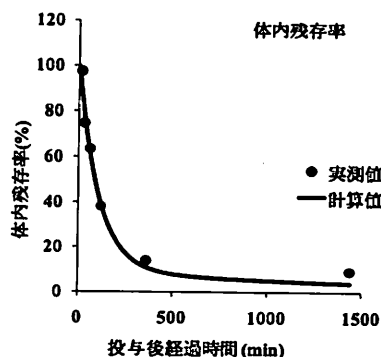


図-5 シミュレーション結果(体内残存率)

において、実線及び破線が PBPK モデルによる計算値を、点が実測値を示している。肺、腎臓、心臓におけるシミュレーション結果はおおむね実測値を再現できた。また、membrane-limited model を応用した肝臓、脾臓についてもシミュレーション結果はおおむね実測値を再現できた。これらの臓器は、2 章 1 節の尾静脈投与の実験結果において、投与から 6 時間、24 時間経過後の臓器中粒子濃度が他の組織中濃度よりも高く、他の組織と異なる挙動を取って

いたが、今回の結果はその再現にも成功していることから、構築したモデルは妥当であったと考えられる。

4. ヒト PBPK モデルの構築

(1) PBPK モデルの構造

3 章で構築したマウス PBPK モデルが妥当であることが確認されたので、これをヒト型モデルに改良し、ヒトにおけるシリカ粒子の体内動態を評価することを試みた。

ここでは、シリカ粒子の吸入曝露による体内動態を評価するモデルを構築した。構造や支配方程式は 3 章で構築したものをそのまま用いた。

(2) シリカ粒子曝露量及び血中移行量

a) 曝露シナリオ

大気中含まれる単位体積あたりのシリカ粒子の重量は $3.5 \times 10^{-2} \mu\text{gSiO}_2/\text{L}$ とした。これは大気汚染に係る環境基準のうち、微小粒子状物質の 1 日平均の環境基準値を参考にした。曝露経路は単回経気曝露としてシミュレーションを行った。投与条件の詳細を以下の表-4 に示す。また大気中粒子濃度と肺に沈着する粒子の関係を、以下の式(3)で定義する。

$$I_{\text{Lung}} = C_{\text{Air}} \times B \times A \quad (3)$$

I_{Lung} : 肺に沈着する粒子重量(μgSiO_2)

C_{Air} : 大気中シリカ粒子濃度($\mu\text{gSiO}_2/\text{L}$)

B : 1 回呼吸量(L)

A : 肺胞沈着率(-)

b) 大気から肺への粒子の沈着率

気道から吸入曝露されるシリカ粒子のうち肺へ沈着する粒子の割合の評価には ICRP(International Commission on Radiological Protection)の呼吸気道モデルを用いた。使用したパラメータを以下の表-4 に示す⁸⁾。

c) 肺から血液への移行率

肺に沈着した粒子のうち、血液に移行して体内を循環する粒子の割合は、2 章 2 節で行った気管内投与実験より求めた肺-血液移行係数を用いた。表-4 に用いた値を示す。肺-血液移行係数は粒子が投与されてから経過時間とともに変化する可能性があるが、2 章 2 節で行った実験では投与から 1 日後までのデータしかなく、1 日後以降における値は把握できない。また、2 章 2 節で行った気管内投与実験では解析対象とした組織が少なく、排泄物に関しても解析を行っていない。そのため、今回のヒト PBPK モデルの構築においては、それらの影響が最も少ないと考えられる値として、投与からの経過時間が最も短い 30 分後における値を代表値として使用した。今回は肺から血液への移行に関して、以下の条件を考えた。

表-4 シリカ粒子の曝露シナリオ

曝露形態	経気曝露
大気中粒子濃度($\mu\text{gSiO}_2/\text{L}$)	3.5×10^{-2}
1回呼吸量(L)	0.70
肺胞における粒子の沈着率(-)	0.30
肺-血液移行係数(-)	0.14

[血液-肺移行シナリオ] 1度の呼吸で肺に沈着した粒子は、経時的に肺から血液へ移行するとする。その割合は常に一定であり、その値としては表-4に示した肺-血液移行係数を使用した。肺に沈着した粒子が全て血液に移行するまでこの状況が続くとした。ここで、PBPKモデルで評価する肺は、肺の組織とそこに含まれる血管を表現しており、大気から肺組織表面に沈着した粒子については肺へのインプットに含めないものとした。

(3) パラメータ設定

a) 生理学的パラメータ

ヒトの臓器容積のデータに関しては、ICRPで報告されている成人の平均的な値⁹⁾を用い、血流量に関してはBrownらの文献の値¹⁰⁾を用いた。本章で用いたパラメータを以下の表-5に示す。

b) 排泄係数

Ramseyらは各臓器における生化学的なパラメータは臓器の表面積と関係があるとしている。この考えに基づき、ラットの生化学的なパラメータにラットとヒトの各臓器の表面積の比を乗じることで、ヒトの生化学的なパラメータを算出している¹¹⁾。本研究ではこの方法を採用し、ヒトの排泄係数を推測した。具体的には、表面積比は体積比の0.7乗となるので、体重の比の0.7乗をラットの排泄係数に乗じた。尿中排泄速度係数及び糞中排泄速度係数の計算式を以下に示す。

$$r_{Fe} = R_{Fe} \times \left(\frac{V_{Li}}{V_{Li}} \right)^{0.7} \quad (4a)$$

$$r_{Ur} = R_{Ur} \times \frac{Q_{Ki}}{q_{Ki}} \times \left(\frac{V_{Ki}}{V_{Ki}} \right)^{0.7} \quad (4b)$$

r_{Fe} : ヒトの糞中排泄速度係数(L/min)

r_{Ur} : ヒトの尿中排泄速度係数(-)

q_{Ki} : ヒトの腎臓へ流入する血液流量(L/min)

V_{Li} : ヒトの肝臓の体積(L)

V_{Ki} : ヒトの腎臓の体積(L)

R_{Fe} : マウスの糞中排泄速度係数(L/min)

R_{Ur} : マウスの尿中排泄速度係数(-)

Q_{Ki} : マウスの腎臓へ流入する血液流量(L/min)

V_{Li} : マウスの肝臓の体積(L)

V_{Ki} : マウスの腎臓の体積(L)

c) その他のパラメータ

組織血液分配係数及び肝臓と脾臓における inner

表-5 ヒトに固有のパラメータ

組織体積(L)		
肺	V_{Lu}	1.2
肝臓	V_{Li}	1.8
肝臓(inner)	V_{Li-in}	1.6
肝臓(extra)	V_{Li-ex}	0.18
腎臓	V_{Ki}	0.31
心臓	V_{He}	0.84
脾臓	V_{Sp}	0.15
脾臓(inner)	V_{Sp-in}	0.14
脾臓(extra)	V_{Sp-ex}	0.015
脳	V_{Br}	1.5
その他の組織	V_{Ot}	59
動脈血	V_{Ar}	2.7
静脈血	V_{Ve}	2.7
組織血流量(L/min)		
肺	Q_{Lu}	6.5
肝臓	Q_{Li}	1.6
腎臓	Q_{Ki}	1.2
心臓	Q_{He}	0.26
脾臓	Q_{Sp}	0.39
脳	Q_{Br}	0.78
その他の組織	Q_{Ot}	2.6
体重(kg)	BW	70
血流量(L/min)	Q	6.5

tissue と extra tissue の割合、膜透過係数はマウスのパラメータと同じ値を用いた。

(4) シミュレーション結果

前述の血液-肺移行シナリオを想定し、1期あたりの時間単位を0.01分とし、投与1週間後までシミュレーションを行った。各組織におけるシミュレーション結果を図-6,7に示す。また、尿、糞の排泄の累積量に関して投与10日後までシミュレーション結果を行った。結果を図-8,9に示す。

44nmシリカ粒子を用いた場合は、投与3時間30分後に全ての組織において粒子濃度が最大値をとり、その後経時的に減少した。臓器別にみると、脾臓と肺が他の臓器に比べて高い値を示した。曝露から1週間後には全ての組織で粒子濃度は0に近い値を取った。また、排泄は投与から9日を過ぎると0となった。尿中から排泄される粒子量は糞中から排泄される粒子量より100倍以上高い値を取った。

(5) 考察

シミュレーションの結果より、肺や脾臓といった組織で粒子濃度が高くなったことからシリカ粒子曝露の標的臓器となる可能性がある。また、いずれの臓器に関しても曝露から1週間後には0に近い値を取った。このことから今回の曝露シナリオにおいては、曝露開始から長時間経過後にシリカ粒子が体内に残存する可能性は低いことが示唆された。尿中か

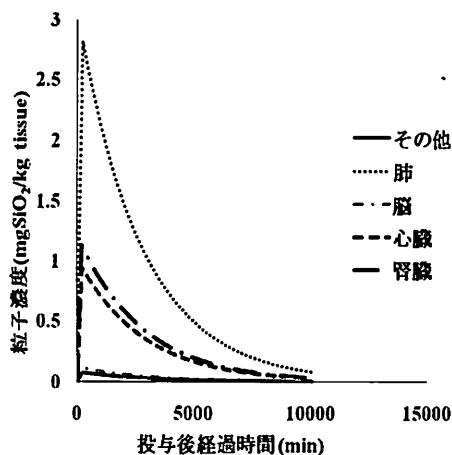


図-6 シミュレーション結果(肺, 腎臓, 心臓, 脳, その他の組織)

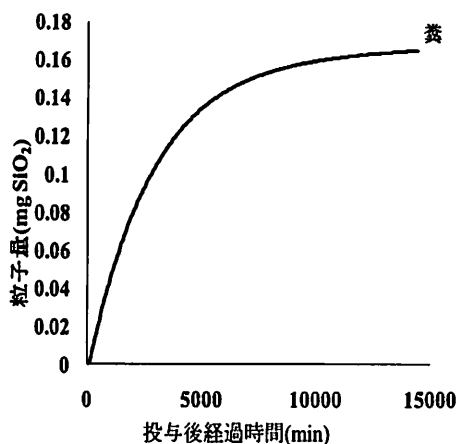


図-9 シミュレーション結果(糞)

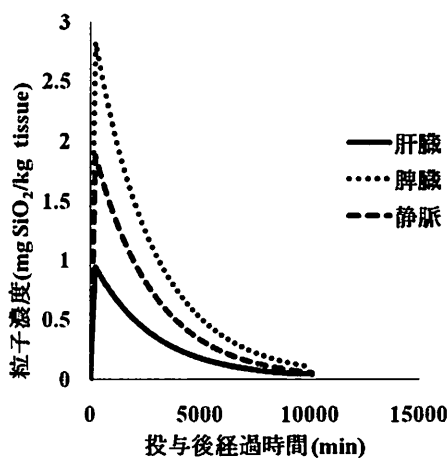


図-7 シミュレーション結果(肝臓, 脾臓, 静脈)

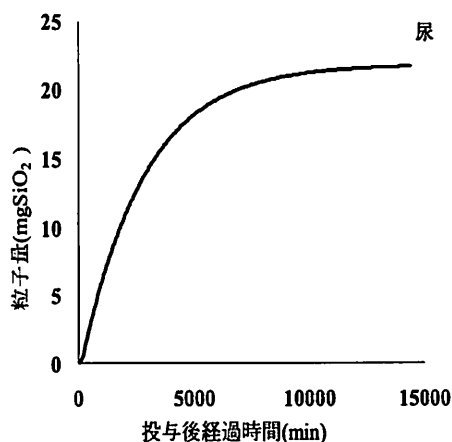


図-8 シミュレーション結果(尿)

ら排泄される粒子量が糞中からのそれよりも極めて多かったことから、粒子は主に尿中から排泄される可能性が示唆された。

今後の課題としては、血液-肺移行シナリオの改善が挙げられる。肺胞に沈着した粒子は肺胞マクロファージによる排泄の影響を受けるため、今後はそれらの影響を考慮して、粒子の血液中への移行量を評価することが必要である。

5. 結論

本研究では、粒径 44nm の ^{14}C 標識シリカ粒子を用いてマウスに対する投与実験を行い、種々の臓器における経時的な濃度変化を追跡し、詳細な体内動態を解析した。その結果、投与したシリカ粒子は、投与 15 分後にはその 98% が体内から回収できたが、投与 24 時間後にはその回収率が 9% 程度まで減少しており、粒子は血液中から速やかに他臓器へ移行し、排泄されることが確認された。組織別にみると、脾臓と肝臓で他の組織と比べてシリカ粒子濃度が高くなった。

また、マウス PBPK モデルを構築し、投与実験結果の再現を試みた。その結果、心臓、腎臓、肺においてシミュレーション結果は実測値をおおむね再現することができた。また、membrane-limited model を応用することで脾臓と肝臓といった組織中の粒子濃度の挙動が他の組織と異なる臓器に関しても再現することができた。このことから、モデルの妥当性が確認できたので、ヒト PBPK モデルへの拡張を試みた。

ヒト PBPK モデルでは肺や脾臓で粒子濃度が高くなったことから、シリカ粒子曝露の標的臓器となる可能性が示唆された。また、曝露から 1 週間後には全ての組織でシリカ粒子の濃度は 0 に近い値となった。尿中から排泄される粒子量が糞中のそれよりも極めて高くなったことから、シリカ粒子は主に尿中

から排泄される可能性が示唆された。

今後の研究の課題として、一般環境におけるシリカ粒子の曝露量の評価、及び血液-肺移行シナリオの改善が挙げられる。これらの結果を応用し、一般環境におけるシリカ粒子のヒトにおける体内動態評価を行うことを最終的な目標とする。

謝辞：本研究を行うにあたって実験をお手伝いいただいた皆様に、この場を借りて御礼申し上げます。

付録

3章のマウス PBPK モデルに使用したパラメータを付録として下記の表に記載する。

マウス PBPK モデルパラメータ

組織体積 (L)		
肺	V_{Lu}	2.0×10^{-4}
脳	V_{Br}	4.5×10^{-4}
心臓	V_{He}	1.9×10^{-4}
脾臓(inner)	V_{Sp-in}	1.3×10^{-5}
脾臓(extra)	V_{Sp-ex}	1.3×10^{-4}
肝臓(inner)	V_{Li-in}	1.8×10^{-3}
肝臓(extra)	V_{Li-ex}	2.0×10^{-4}
腎臓	V_{Ki}	5.7×10^{-4}
その他の組織	V_{Ot}	2.8×10^{-2}
動脈血	V_{Ar}	1.4×10^{-3}
静脈血	V_{Ve}	1.4×10^{-3}
組織血流量 (L/min)		
肺	Q_{Lu}	2.2×10^{-2}
脳	Q_{Br}	7.2×10^{-4}
心臓	Q_{He}	1.4×10^{-3}
脾臓	Q_{Sp}	3.3×10^{-4}
肝臓	Q_{Li}	3.5×10^{-3}
腎臓	Q_{Ki}	2.0×10^{-3}
その他の組織	Q_{Ot}	1.4×10^{-2}
体重(kg)	BW	3.4×10^{-2}
血流量(L/min)	Q	$0.28 \times BW^{0.75}$
組織/血液分配係数(-)		
肺	P_{Lu}	1.5×10^1
脳	P_{Br}	6.0×10^{-2}
心臓	P_{He}	5.0×10^{-1}
脾臓	P_{Sp}	1.5×10^1
肝臓	P_{Li}	5.0×10^1
腎臓	P_{Ki}	6.0×10^{-1}
その他の組織	P_{Ot}	4.0×10^{-2}
糞中排泄速度係数(L/min)		
糞	R_{Fe}	5.0×10^{-7}
尿中排泄速度係数(-/min)		
尿	R_{Ur}	2.5×10^{-2}
膜透過係数(L/min)		
脾臓	k_{Sp}	4.0×10^{-8}
肝臓	k_{Li}	8.0×10^{-7}

参考文献

- 1) Miyoshi H., Kazumori Y and Nakayama S.: Preparatin of 3H-ATP-Incorporated Silica Nanoparticles and Its Diffusive Release, *Journal of Non-Crystalline Solids* to be accepted.
- 2) Cho M., Cho W., Choi M., Kim J., Han B., Kim S., Kim H., Sheen Y and Jeong J.: The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles, *Toxicol Lett*, 189(3), pp. 177-83, 2009.
- 3) 環境省：ディーゼル排気微粒子リスク評価検討会平成13年度報告書・ディーゼル排気微粒子リスク評価検討会編, pp.18-19, 2001.
- 4) Mahboubeh H.Y and Andrew J.M.: Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Terbinafine in Rats and Humans, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 2219-2228, 2002.
- 5) Brown R.P., Delp M.D., Lindstedt S.L., Rhomberg L.R and Beliles R.P.: Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models, *Toxicol and Health*, 13(4), pp. 407-84, 1997.
- 6) Ping W., Zheng F.B.A., Joseph B and Irshad H. C.: Trauma-hemorrhage and resuscitation in the mouse effects on cardiac output and organ blood flow, *Am J Physiol*, 264(4 Pt 2), pp. 1166-73, 1993.
- 7) Kawamoto Y., Matsuyama W., Wada M., Hishikawa J., Chan M.P., Nakayama A and Morisawa S.: Development of a physiologically based pharmacokinetic model for bisphenol A in pregnant mice, *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 224, pp. 182-191, 2007.
- 8) ICRP.: Limits for Intakes of Radionuclides by Workers Index, *ICRP Publication 30*, 1979.
- 9) ICRP.: Basic Anatomical and Physiological Data for Use in Radiological Protection, Reference Values, *ICRP Publication 89*, 2003.
- 10) Brown R., Delp M., Lindsted S., Rhomberg L and Beliles R.: Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models, *Toxicology and Industrial Health*, vol13, pp. 407-484, 1997.
- 11) John C.R and Melvin E.A.: A Physiologically Based Description of the Inhalation Pharmacokinetics of Styrene in Rats and Humans, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol73, pp. 159-175, 1984.

(2011.5.30 受付)

Development of 44nm ^{14}C -labeled silicanano particles PBPK Model for ICR Mice

Harutoshi IMAMURA¹, Masato TAKAKURA¹, Nobumitsu SAKAI¹,
Aki NAKAYAMA¹, Katsunori SASAKI¹, Kazuki MANAMI³,
Hirokazu MIYOSHI², Miki SUGIMOTO³ and Minoru YONEDA¹

¹Dept. of Environmental Engineering, Graduates School of Engineering, Kyoto University

²Radioisotope Research Center, Tokushima University

³Dept. of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

Although public concerns increase over nano-materials, we have not yet acquired the knowledge on not only toxic mechanism, but also absorption, distribution and target organs. For that reason we targeted silicananoparticles, of which annual production is over 90 thousands metric tonnes in Japan, and studied the pharmacokinetics developed PBPK (Physiologically-based Pharmacokinetic) model to estimate the target organs. Forty- four nm ^{14}C -labeled silica particles were prepared and injected to ICR mice (male, 8 weeks old) by vein or intratracheal administration. The result showed that the concentration of the silica particles was the highest in spleen, followed by liver for 44nm. Based on these experiments, we developed Physiologically-based Pharmacokinetic (PBPK) model for mice and humans. The PBPK model for humans predict that the target organs would be spleen and lung.