

Shinsaku Nakagawa: Nanosilicas with various surface potential induce the different profile of cytokine production on macrophage., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore, 15-19 March, 2009.

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

研究協力者

鎌田春彦、吉川友章、阿部康弘、山根美紀、鍋師裕美、伊藤徳夫、今井 直、野村鉄也、長野一也、萱室裕之、小野寺章、岡村賢孝、仲里泰太郎、松山恵吾、山下浩平、吉田徳幸、荻田郁弥、東阪和馬、栃木彩恵子、渡邊貴信、藤村真穂、有田修平、山下琢矢、赤瀬貴憲、東阪和馬、中西亮介、磯部将彰、有森亮裕、橋野のぶよ、物部容子、向洋平、岡田直貴、森重智弘、渡辺光、松尾一彦、田辺綾、石井裕美子、吉川舞、川合泰明、小島拓記、久保貴、瀬戸正志、津森優希、齋場 雄貴、免山智行、横田やよい、川端洋輝、姚 醒蕾、成松翔伍、稲倉裕、近藤昌夫、磯田勝広、長谷崎拓也、田中一成、角谷秀樹、吉田猛史、高橋梓、松久幸司、河原倫之、佐伯理恵、斎藤郁美子、松下恭平、山本芙美、鈴木英彦、李相儒

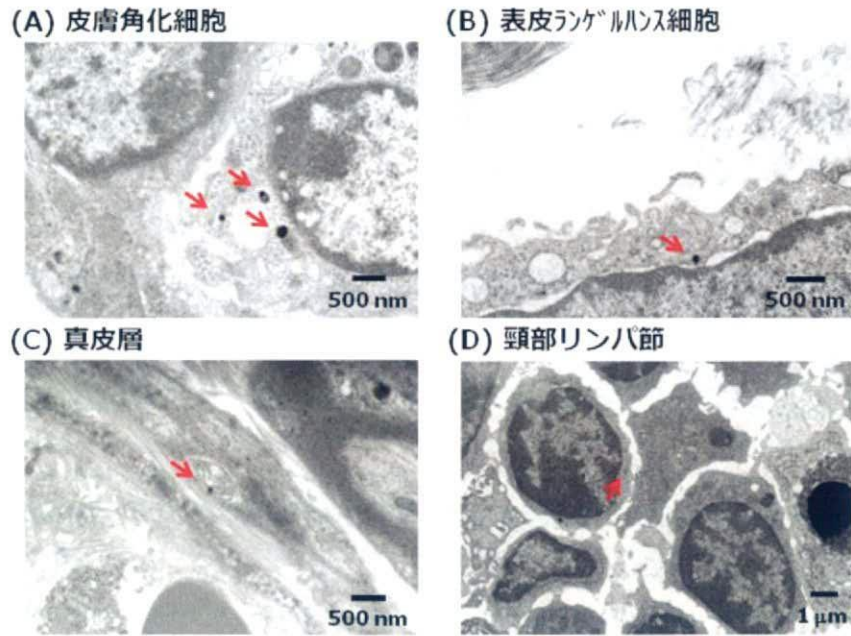


図1. ナノシリカの皮膚透過性評価。終濃度10%の化粧/医薬品用エステル油剤（ミリスチン酸イソプロピル：IPM）を含む溶液でSP70を懸濁し、このSP70懸濁液を2 mg/head (10 μ l) でBALB/cマウスの耳介に3日間連続投与した。最終投与24時間後にマウス耳介および頸部リンパ節を回収した。これらの組織から超薄切切片を作製し、透過型電子顕微鏡観察により表皮層（角化細胞；A, ランゲルハンス細胞；B）、真皮層（C）、頸部リンパ節（D）におけるSP70の局在を解析した。

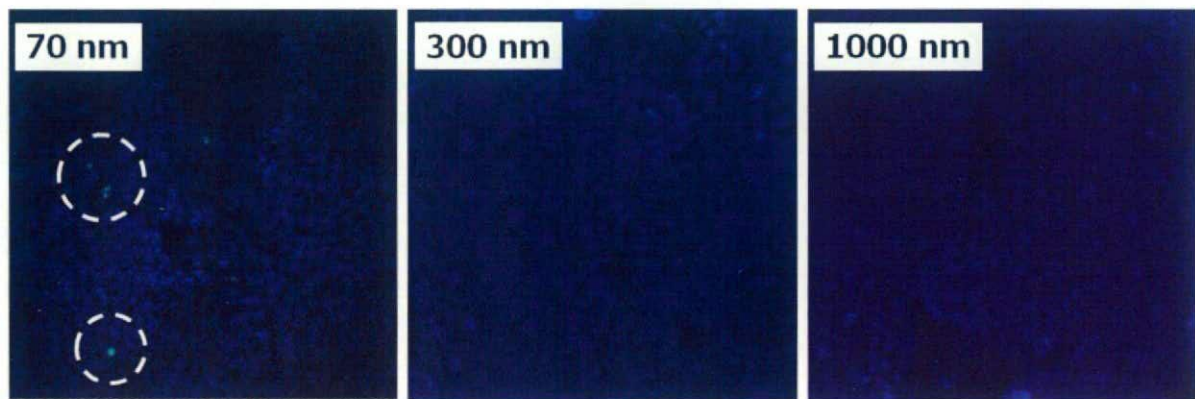


図2. シリカの*in vivo*皮膚透過性評価。ICRマウス（雌性、6週齢）の耳介皮膚に、アミノフルオレセイン標識SP70、SP300、SP1000を125 μ g/ear/dayで24時間間隔、3日間連続塗布した。最終塗布から24時間後に摘出したマウス耳介より表皮シートを作製し、細胞核をDAPI染色した後に各ナノシリカの局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。（緑：ナノシリカ、青：核）

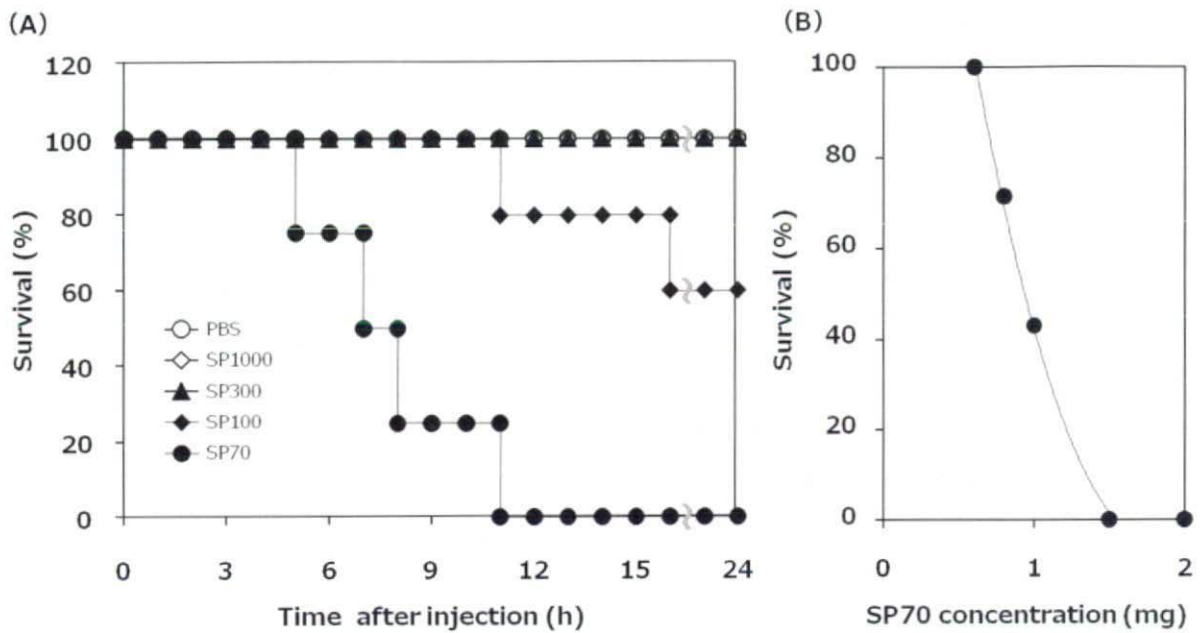


図3. ナノシリカの粒子径依存的な急性毒性。(A) 粒子径依存性: 各ナノシリカを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与し、生存率を経時的に評価した。(B) SP70濃度依存性: 種々濃度のSP70をBALB/cマウスの尾静脈内より投与してから24時間後の生存率を指標にSP70依存的な急性毒性の濃度依存性を確認した。

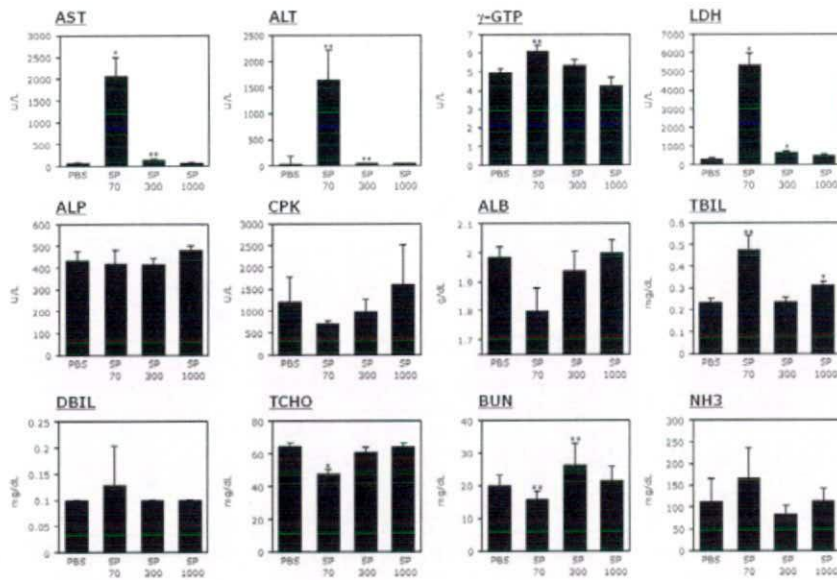


図4. ナノシリカ投与マウスの血液生化学検査-1. 粒子径の異なる各ナノシリカを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。6時間後に眼底から回収した血液を用いて血液生化学検査(アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、 γ -グルタミルトランスぺプチターゼ (γ -GTP)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、総ビリルビン (TBIL)、尿素窒素 (BUN)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、クレアチニンフォスフォキナーゼ (CPK)、アルブミン (ALB)、直接ビリルビン (DBIL)、総コレステロール (TCHO)、アンモニア (NH₃)) を実施した。

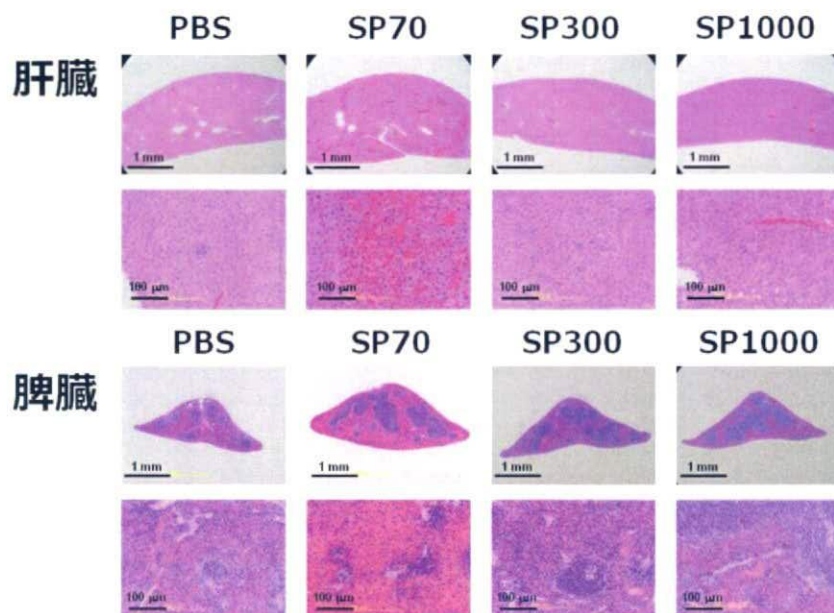


図5. 肝臓および脾臓の病理組織学的検査. 粒子径の異なる各ナノシリカを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。投与6時間後に回収した肝臓および脾臓を病理組織学的検査に供した。

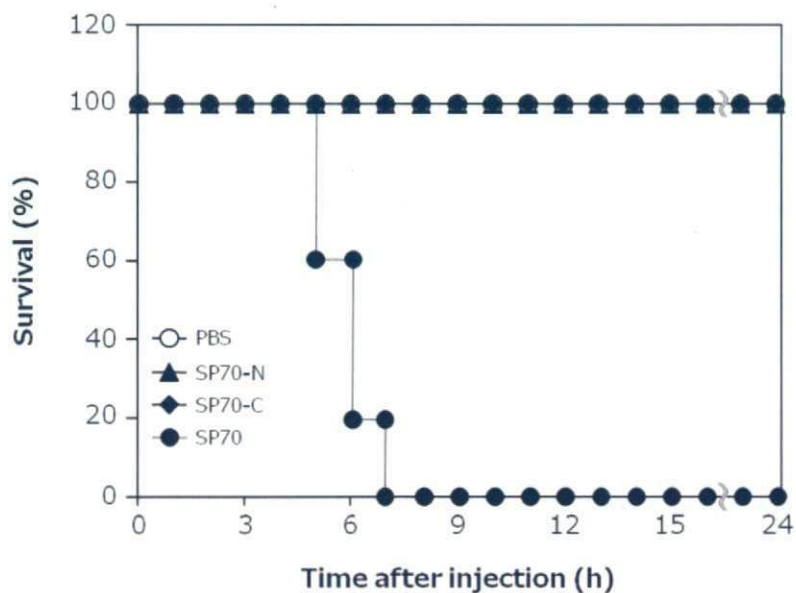
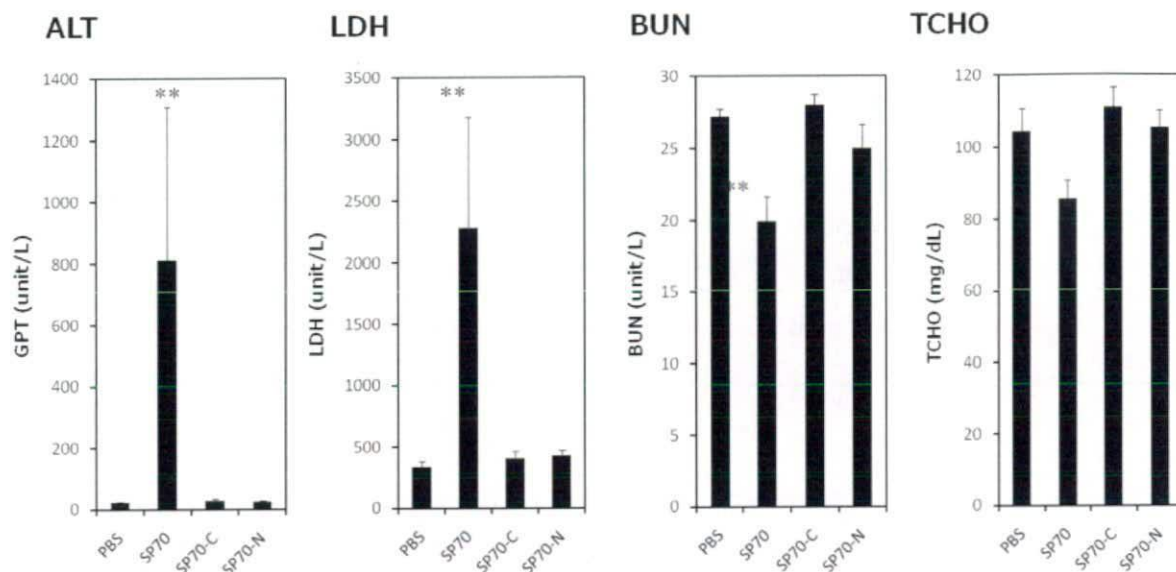


図6. SP70の急性毒性発現における粒子表面性状の影響. SP70 (表面未修飾)、粒子表面をカルボキシル基あるいはアミノ基で修飾した直径70 nmのナノシリカ (SP70-C, SP70-N) を2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与し、経時的に生存率を評価した。

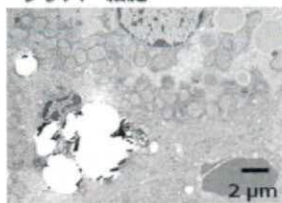


** : p<0.01, *p<0.05, by Student's t-test, n=??

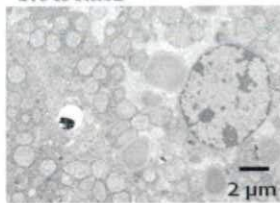
図7. 血液生化学検査-2. SP70 (表面未修飾)、粒子表面をカルボキシル基あるいはアミノ基で修飾した直径70 nm のナノシリカ (SP70-C, SP70-N) を2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。6時間後に眼底から回収した血液を用いて血液生化学検査 (アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、尿素窒素 (BUN)、総コレステロール (TCHO)) を実施した。

SP1000

クッパー細胞

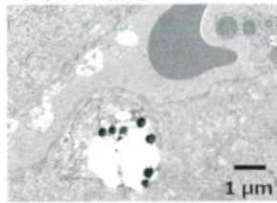


肝実質細胞

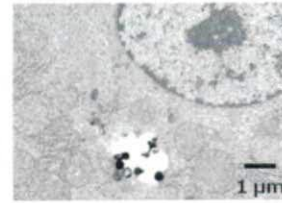


SP300

クッパー細胞

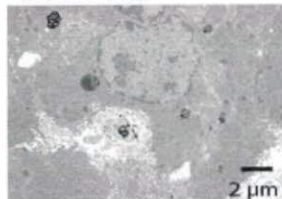


肝実質細胞

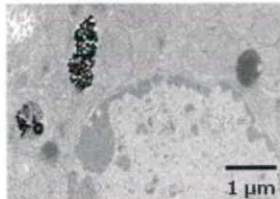


SP70

クッパー細胞



肝実質細胞



肝実質細胞核内

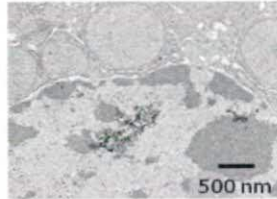


図8. 粒子径の異なるナノシリカの肝組織内動態. 粒子径の異なる種々のナノシリカを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。投与6時間後に回収した肝臓から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察によりナノシリカの局在を解析した。

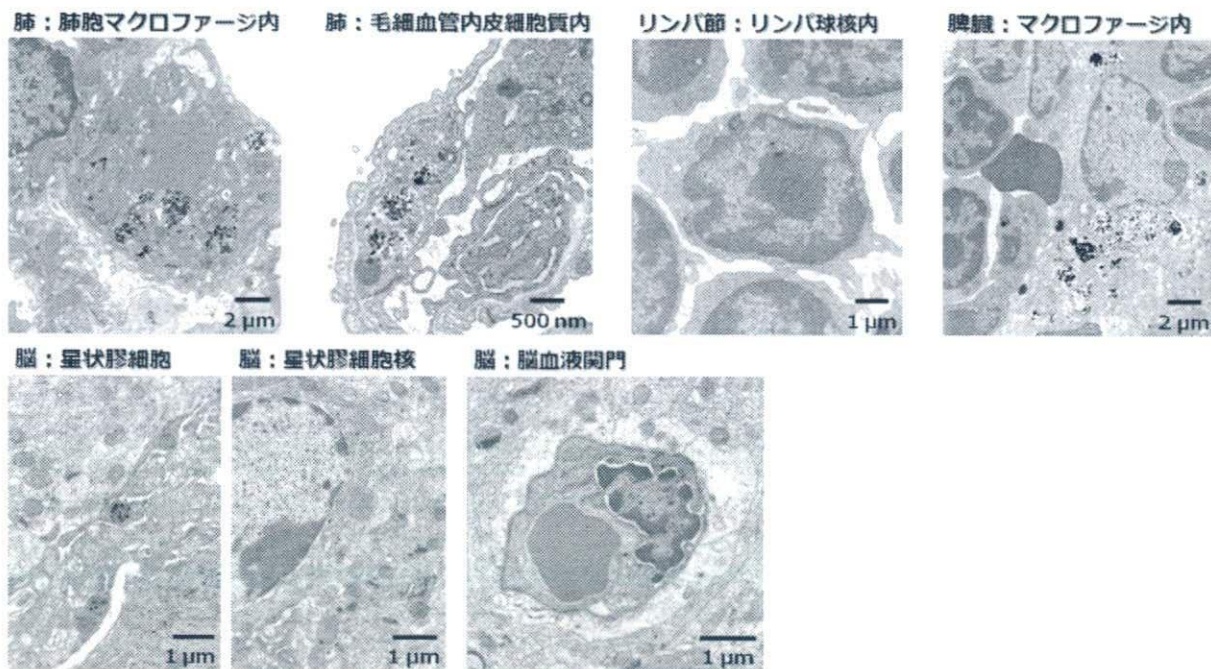


図9. SP70の生体内動態. SP70を2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。投与6時間後に回収した肝臓、リンパ節、脾臓、脳から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察によりSP70の局在を解析した。

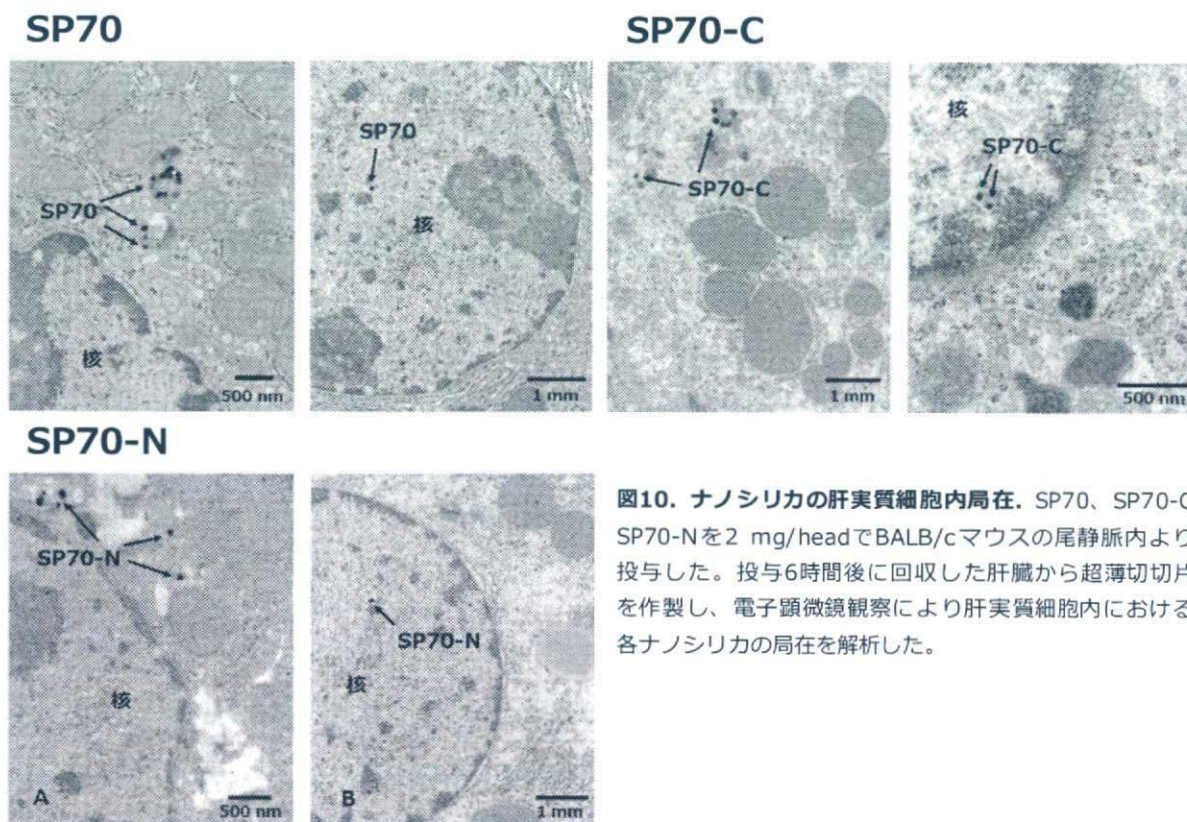
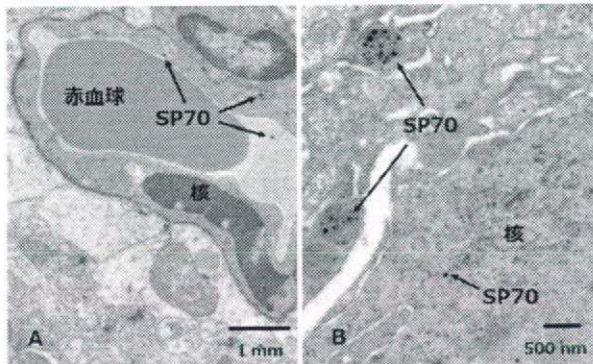
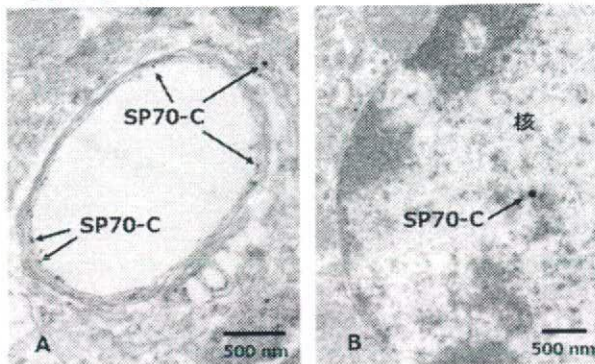


図10. ナノシリカの肝実質細胞内局在. SP70、SP70-C、SP70-Nを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。投与6時間後に回収した肝臓から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察により肝実質細胞内における各ナノシリカの局在を解析した。

SP70



SP70-C



SP70-N

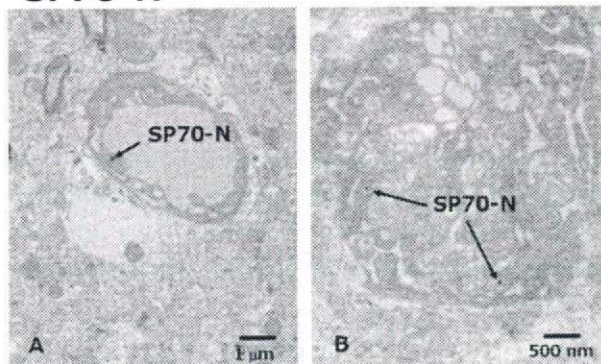


図11. ナノシリカの脳内局在. SP70、SP70-C、SP70-Nを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。投与6時間後に回収した肝臓から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察により脳内における各ナノシリカの局在を解析した。(A:毛細血管周辺、B:アストロサイト周辺)

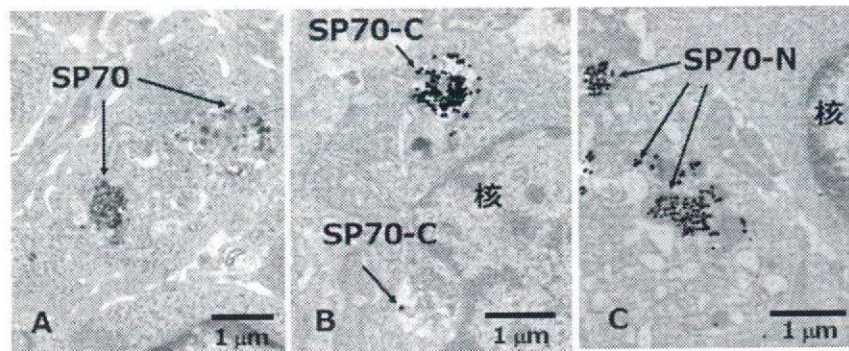


図12. ナノシリカの肺組織内局在. SP70、SP70-C、SP70-Nを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。投与6時間後に回収した肝臓から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察により肺組織内における各ナノシリカの局在を解析した。(A: SP70、B: SP70-C、C: SP70-N)

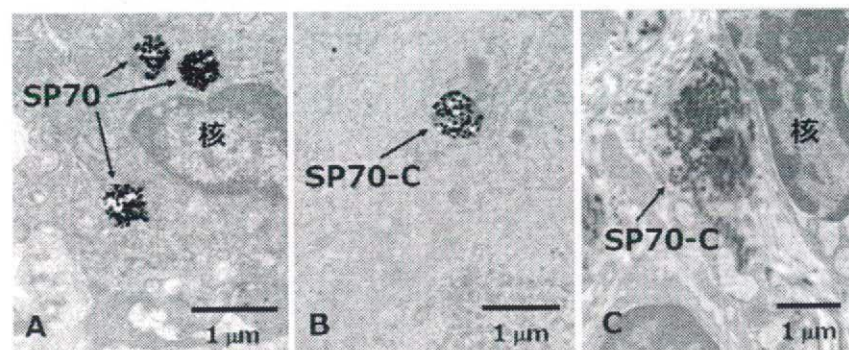


図13. ナノシリカのリンパ節内局在. SP70、SP70-C、SP70-Nを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。投与6時間後に回収した肝臓から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察によりリンパ節内における各ナノシリカの局在を解析した。(A: SP70、B: SP70-C、C: SP70-N)

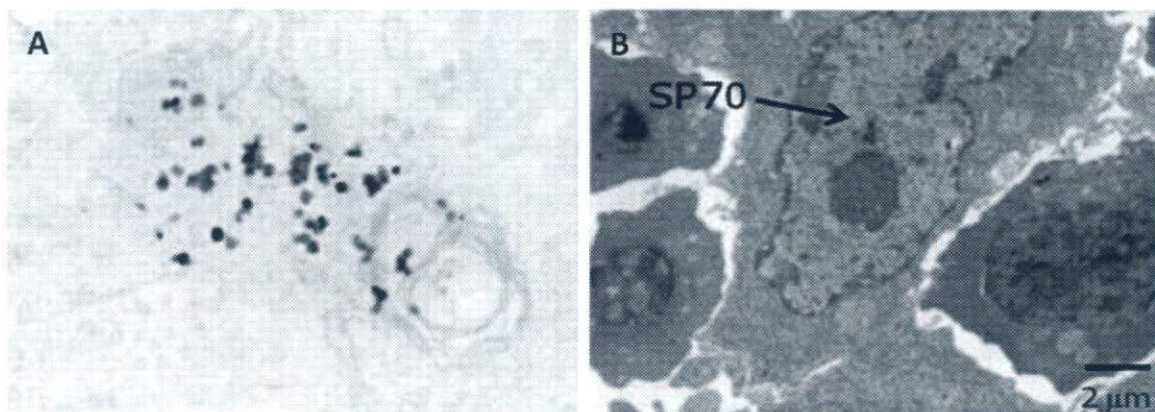


図14 電子顕微鏡を用いた、シリカの胎児・胎盤への移行性評価。シリカを妊娠マウスに投与後、胎盤および胎児を回収した。その後、電子顕微鏡を用いて、胎盤(A)および胎児(B)へのシリカの移行を評価した。

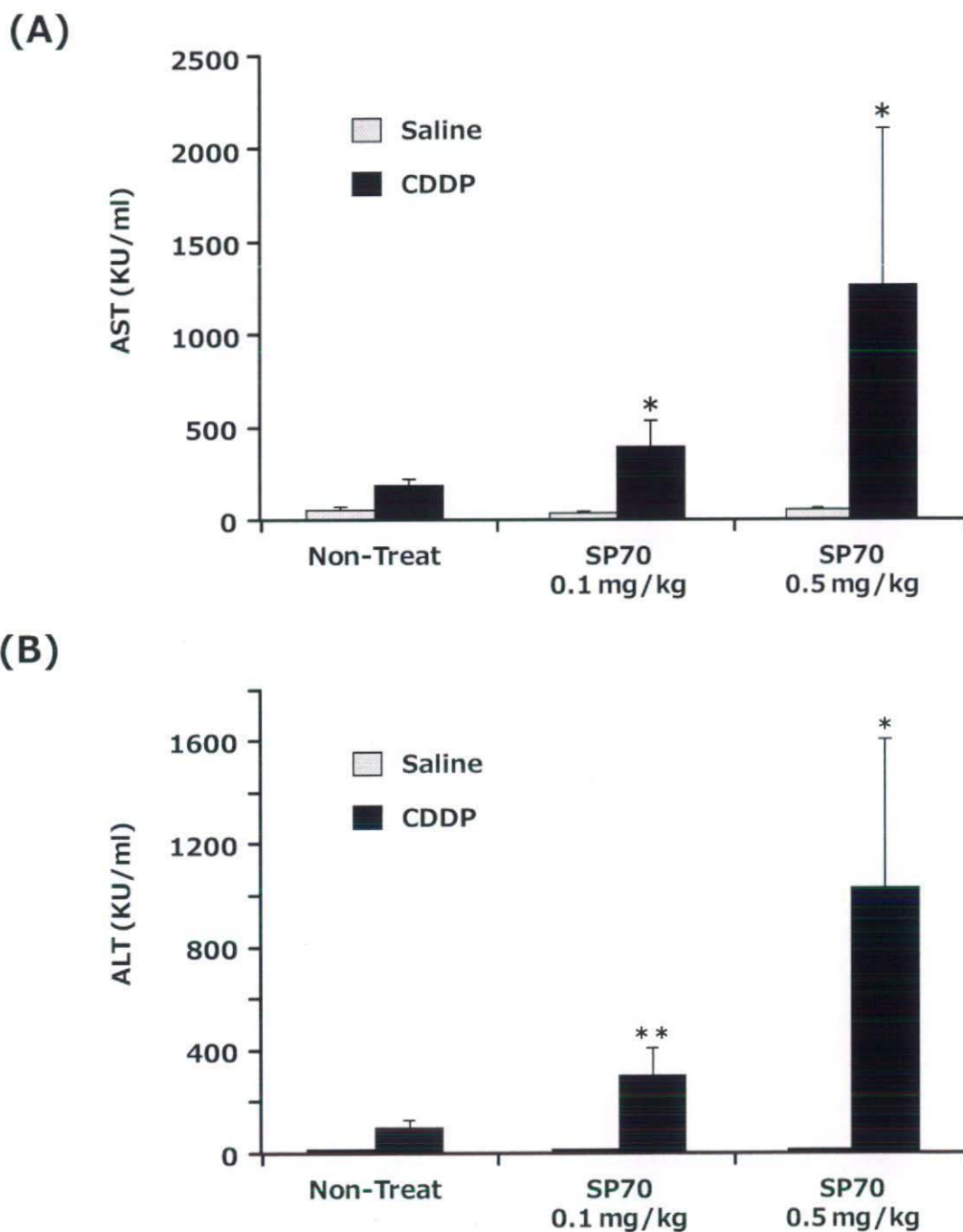


図15. SP70とシスプラチン (CDDP) を併用したマウスの急性肝傷害. シスプラチン (CDDP; 50 μ mol/kg body weight) あるいは生理食塩水を腹腔内投与したBALB/cマウス (8~9週齢、雄性) に対して、SP70を1、3、10 mg/kg body weightの用量で尾静脈内に投与した。24時間後に回収した血清中のAST、ALT、BUNの活性を測定し、これらの値を指標に併用毒性を評価した。**: $p < 0.01$ *: $p < 0.05$ vs. saline, only CDDP

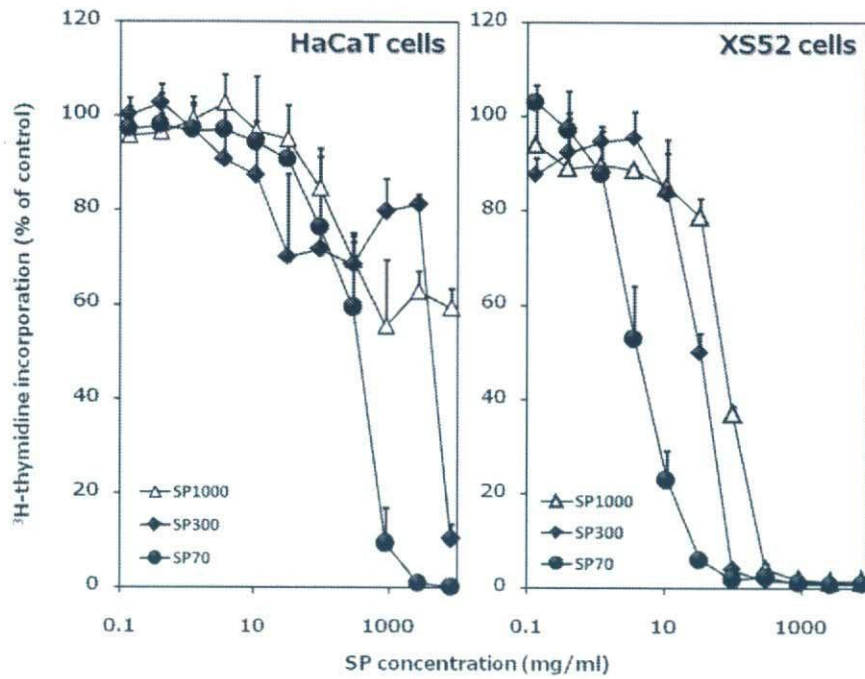


図16. 粒子径の異なるナノシリカの細胞増殖阻害効果. 粒子径の異なるナノシリカを種々の濃度でヒト皮膚角化細胞株 (HaCaT) ならびにマウスランゲルハンス細胞株 (XS52) に添加し、24時間インキュベートした。細胞増殖能は培養終了6時間前に添加したトリチウムラベル化チミジン (1 μ Ci) の取り込み量を指標に評価し、ナノシリカ非添加群の取り込み量を100%として算出した。

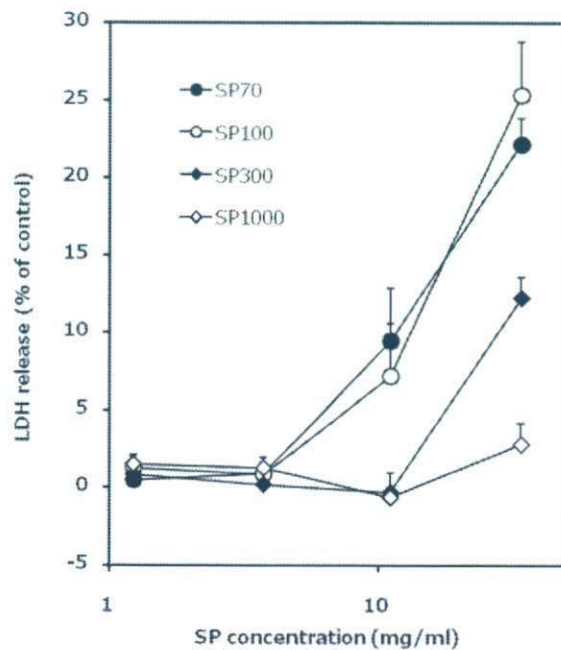


図17. 粒子径の異なるナノシリカの細胞膜傷害性. 粒子径の異なるナノシリカを種々の濃度でマウスランゲルハンス細胞株 (XS52) に添加し、24時間インキュベートした。各ナノシリカの細胞膜に対する傷害性は培養後に、上清中に逸脱した乳酸脱水素酵素の量を指標に評価し、ナノシリカ非添加群における培養上清中へのLDH逸脱量を100%として算出した。

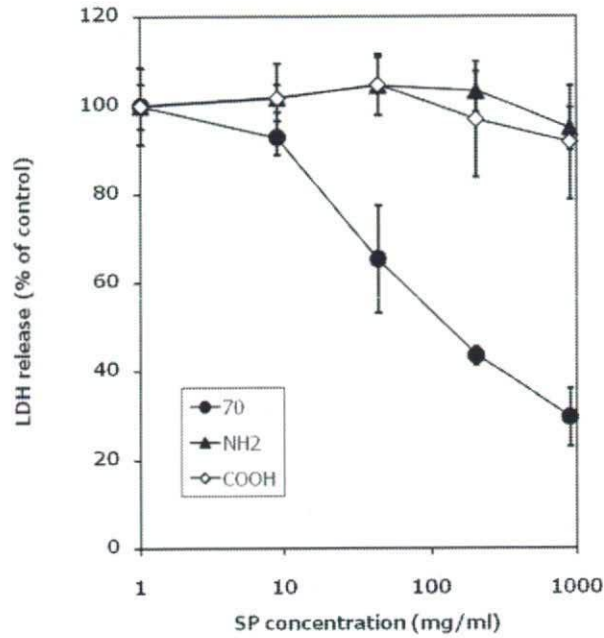


図18. 表面性状の異なるナノシリカの細胞増殖阻害効果. SP70, SP70-C, SP70-Nを種々の濃度でマウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) に添加し、24時間インキュベートした。細胞増殖能は培養終了6時間前に添加したトリチウムラベル化チミジン (1 μ Ci) の取り込み量を指標に評価し、ナノシリカ非添加群の取り込み量を100%として算出した。

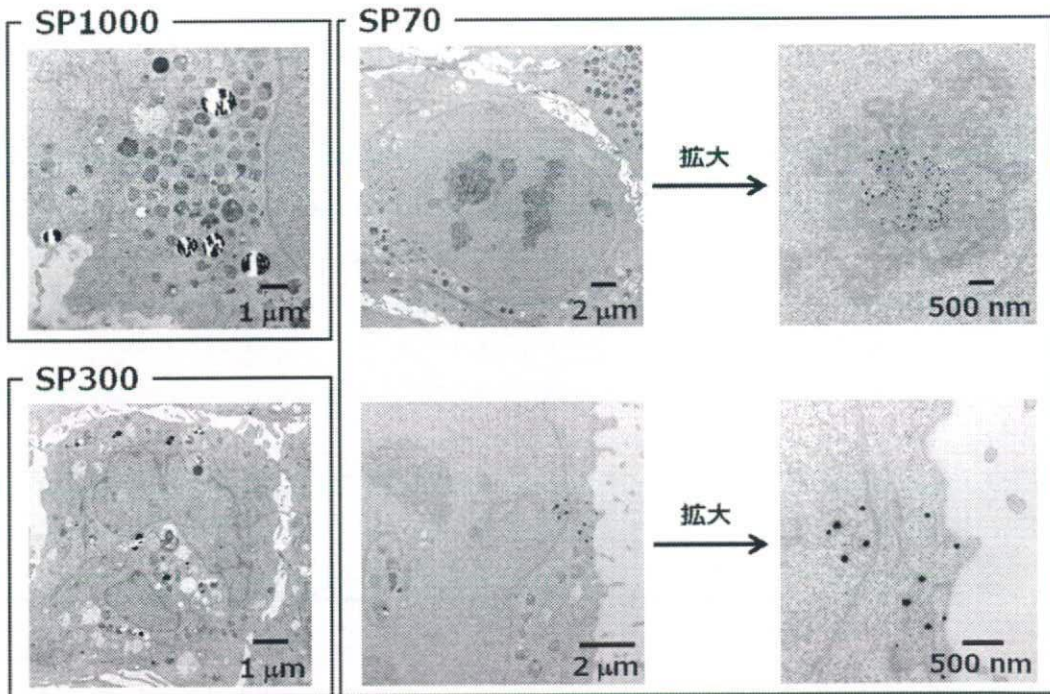


図19. HaCaT細胞内におけるナノシリカの局在. 粒子径の異なるナノシリカ (終濃度: 100 μ g/ml) をHaCaTに添加し、24時間インキュベートした。培養後のサンプルを用いて超薄切片を作製し、電子顕微鏡を用いてナノシリカの細胞内局在を解析した。

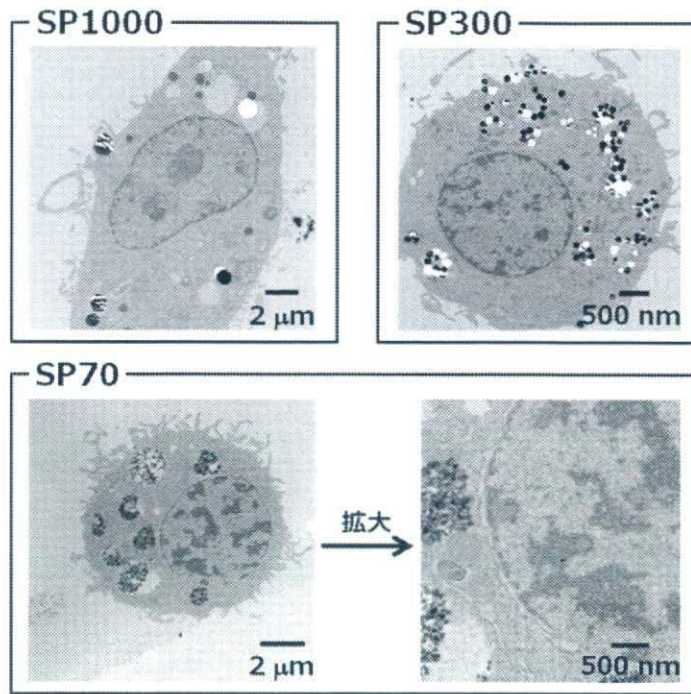


図20. X52細胞内におけるナノシリカの局在。粒子径の異なるナノシリカ（終濃度：100 μg/ml）をHaCaTに添加し、24時間インキュベートした。培養後のサンプルを用いて超薄切切片を作製し、電子顕微鏡を用いてナノシリカの細胞内局在を解析した。

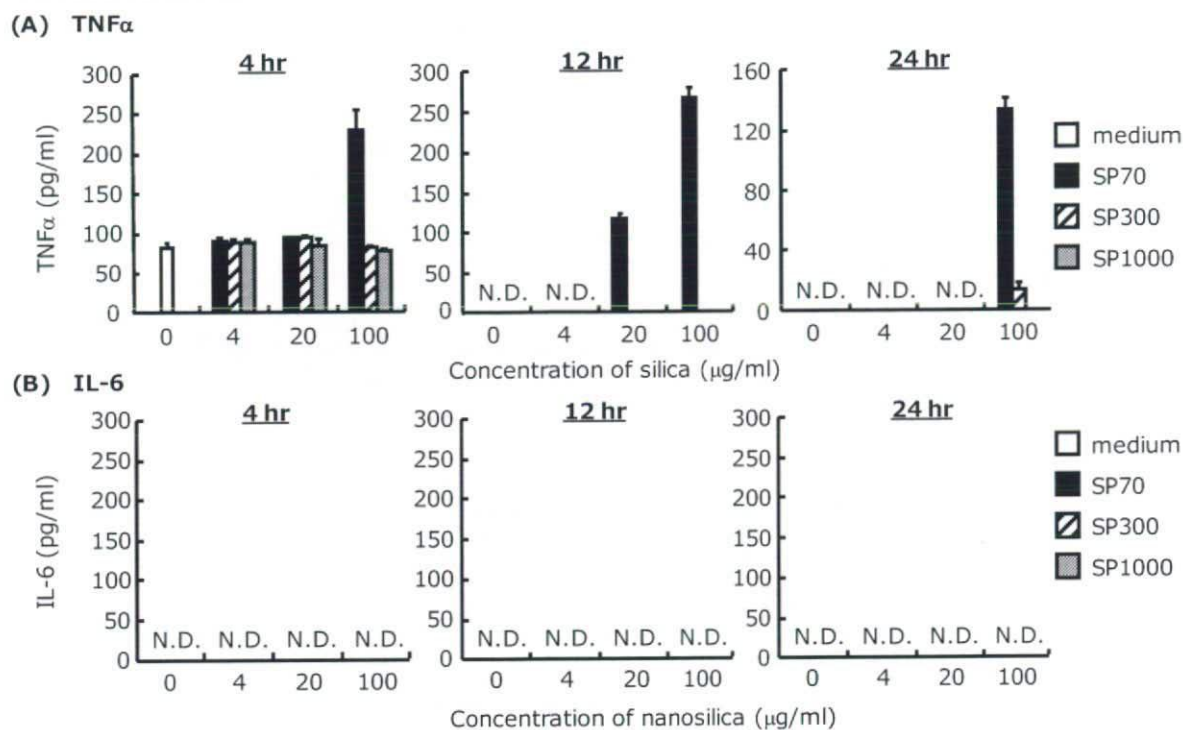


図21. 粒子径の異なるシリカ粒子のRAW264.7細胞に対するサイトカイン産生誘導能評価. RAW264.7細胞に対して種々の濃度のSP70、SP300、SP1000を作用させた。4、12、24時間後に回収した培養上清中のTNF α (A) およびIL-6 (B) の量をELISAを用いて測定した。(N.D.; not detected)

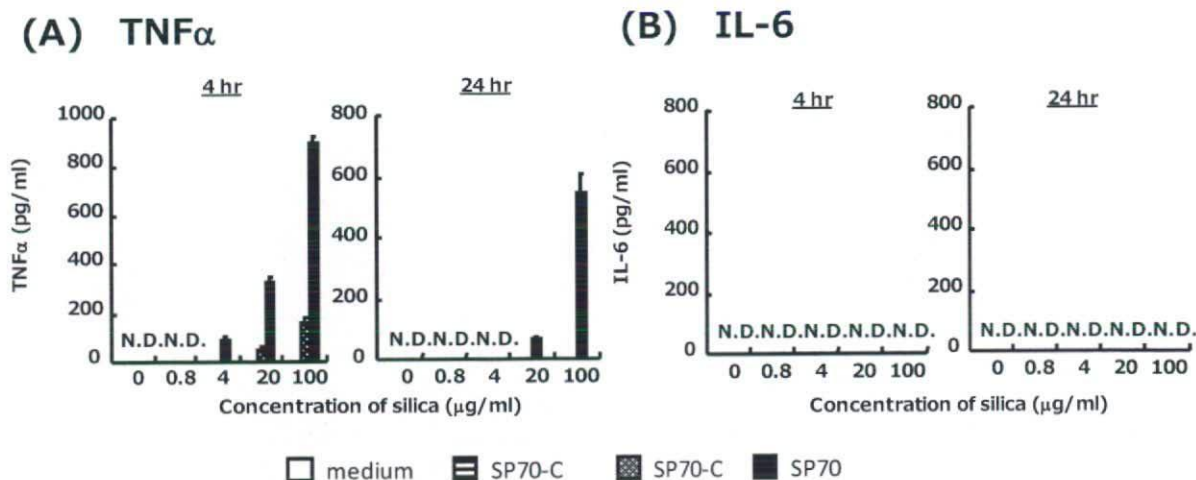


図22. 表面電荷の異なるシリカ粒子のRAW264.7細胞に対するサイトカイン産生誘導能評価. RAW264.7細胞に対して種々の濃度のSP70、SP300、SP1000を作用させた。4、12、24時間後に回収した培養上清中のTNF α (A) およびIL-6 (B) の量をELISAを用いて測定した。(N.D.; not detected)

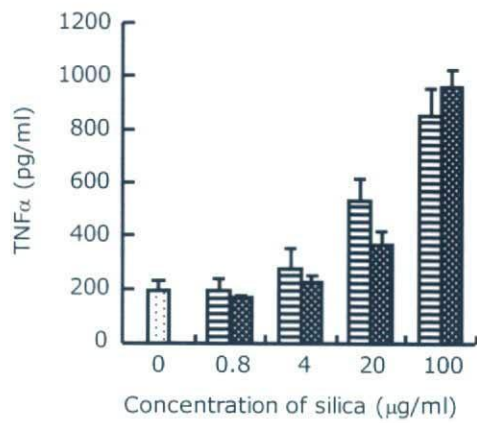
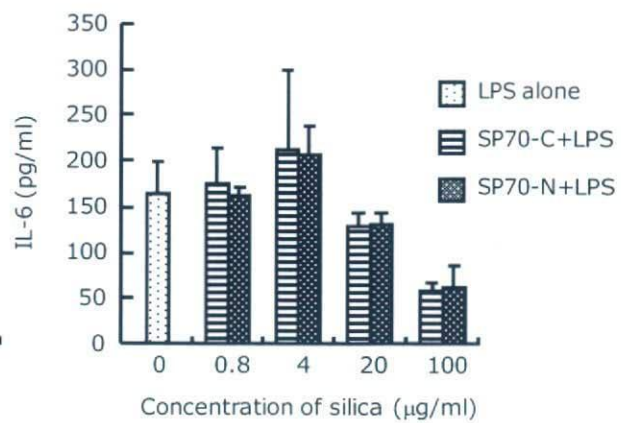
(A) TNF α **(B) IL-6**

図23. 表面修飾ナノ粒子の免疫抑制効果. RAW264.7を種々の濃度のナノシリカと1.25 $\mu\text{g/ml}$ のLPSとの共存下で24時間培養した。培養上清中のTNF α (A)、IL-6 (B) の濃度をELISA法により測定した。

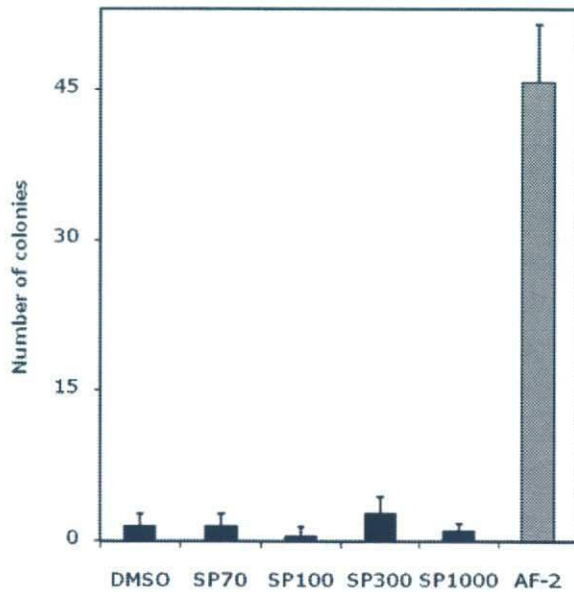
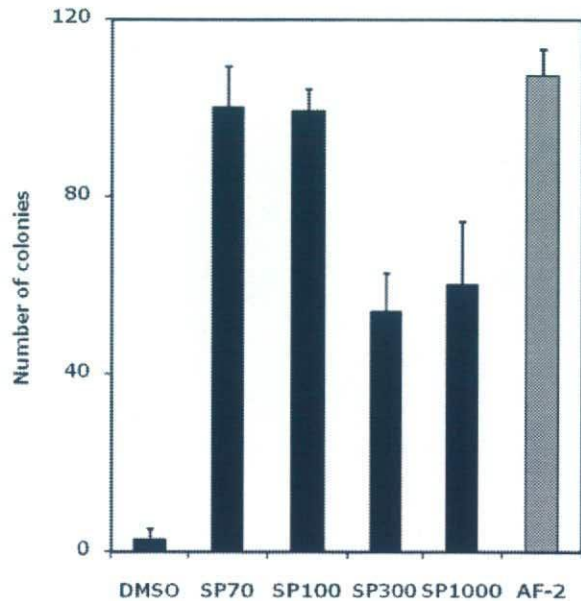
TA98**TA100**

図24. ナノシリカの催変異原性 (Ames試験). SP70 (25 $\mu\text{g/ml}$)、SP100、SP300、SP1000 (50 $\mu\text{g/ml}$) を作用させたTA98あるいはTA100株をヒスチジンを含まない寒天培地にプレーティングした。37°Cで48時間静置培養した後のコロニー数を計数した。

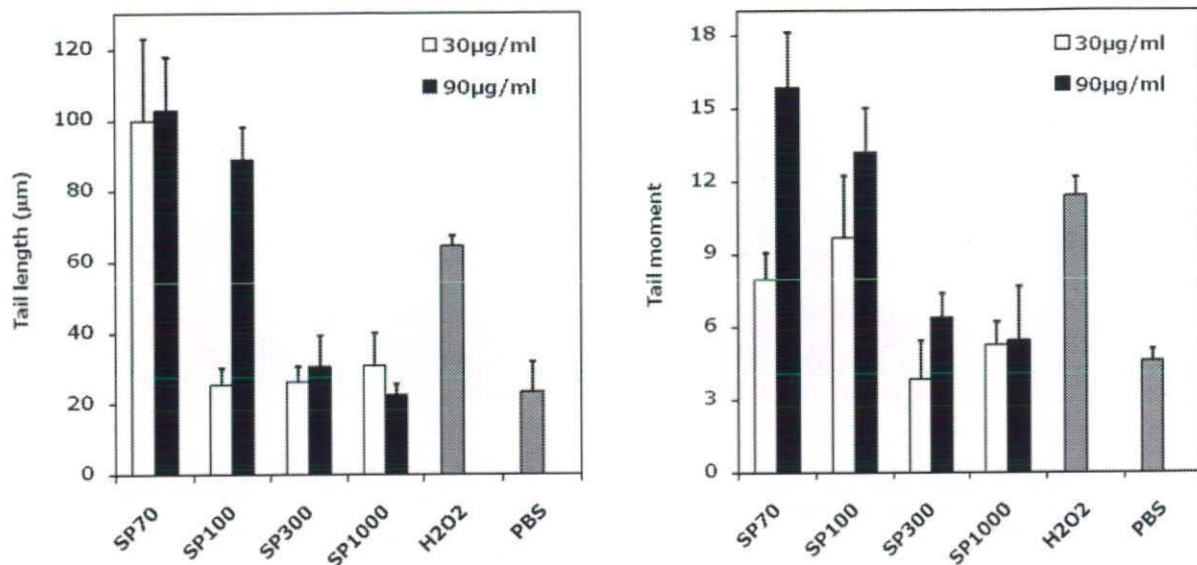


図25. 哺乳動物細胞におけるナノシリカのDNA損傷性. 粒子径の異なるナノシリカを種々の終濃度でHaCaTに作用させ、24時間インキュベートした。ナノシリカ処理細胞におけるDNA損傷の度合いをコメットアッセイにより検出・定量した。

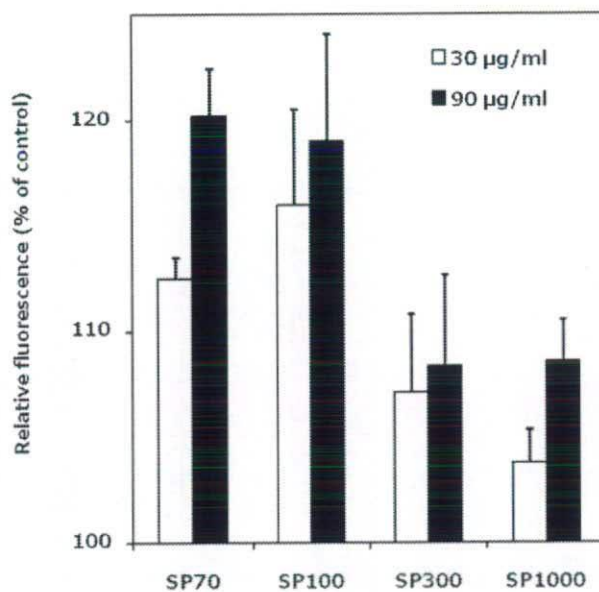


図26. ナノシリカ処理細胞におけるROS産生. 種々の濃度のナノシリカをHaCaT細胞に作用させ、3時間インキュベートした。これらの細胞を回収・洗浄した後に細胞膜透過性ROS特異的のプロープであるDCFH-DAを添加して30分間反応させた。細胞を十分に洗浄した後に、DCFH由来の蛍光（励起波長：485 nm、蛍光波長：530 nm）を蛍光プレートリーダーを用いて測定した。

素材名	物性	実用途
酸化チタン	直径20, 35 nmのルチル型およびアナターゼ型	
酸化亜鉛	直径20 nmの表面未修飾および表面（ジメチコン/メチコン）コポリマー修飾体	全て歯粧品用途の実サンプル
白金ナノコロイド	-（未計測）	
フラーレン	表面未修飾およびポリビニルピロリドン修飾体	

図27. 平成21年度に解析予定のナノマテリアル一覧。

サンプル	OECDガイドライン (No.)
単層カーボンナノチューブ	
多層カーボンナノチューブ	Acute Dermal Toxicity (TCG402)
フラーレン	Repeated Dose Dermal Toxicity (TCG410&411)

図28. OECDスポンサープログラムへの情報提供に向けた検討項目。

トキシコキネティクス解析によるナノマテリアルの安全性評価

研究分担者 角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト

研究要旨

本年、OECD 主導の下で展開されてきたナノマテリアルの安全性調査に関するスポンサーシッププログラムにおいて本邦のマイルストーンが決定し、我が国は本プログラムにおいて今後四年半以内にフラーレン・カーボンナノチューブを筆頭に国内産業で主要な位置を占めるナノマテリアルについて可能な限り多くの安全性情報を提示する計画となっている。このような情勢を受けて我が国の NanoTox 研究には、一層の推進が求められているものの、未だ十分とは言い難いのが現状である。このままでは不十分な安全性情報に基づいた闇雲なナノマテリアル規制が施行されてしまい、将来的にナノテクノロジーに立脚した我が国の産業競争力を喪失させかねない。従って、厚生労働行政においては、ナノマテリアルの社会受容の促進や国民の健康確保の観点からも、経皮曝露等によるナノマテリアルのヒト健康への影響を評価・予測できる新たな試験法の開発に加えて、数多くの実サンプルに関して安全性情報を可能な限り集積することが喫緊の最重要課題である。

そこで本研究では、特に実用化が進んでいるナノマテリアルを経皮適用する領域での安全性情報の集積を目的に、ナノシリカを標準ナノマテリアルとして用いると共に、実際に上市・利用されているナノマテリアルに関して、物性と動態や毒性との関連評価を通してナノマテリアルの物性から動態と毒性を予測できるシステム開発を進めてきた。我々のグループはこの点、平成 19 年度までにナノシリカを皮膚に塗布することで角質層などを容易に通過し、血中に移行することを初めて明らかとしたうえで、血中移行後は、肝臓をはじめとする様々な組織に集積し、DNA 損傷をはじめとする種々遺伝毒性を惹起しうることを見いだしている。さらに本年度（平成 20 年度）は種々物性のナノシリカの毒性評価を実施し、直径 70 nm の表面未修飾ナノシリカ（SP70）が、①表皮層を透過してリンパ管や血管が豊富に存在する真皮にまで到達すること、②全身血中に移行した場合に肝臓を中心とした種々臓器に対する傷害・機能低下とそれらを反映した急性致死毒性を誘発すること、③細胞増殖阻害効果を発揮すること、④催変異原性を発揮する危険性があること、を明らかとした。また、in vitro ならびに in vivo におけるトキシコキネティクス解析から、SP70 が肝クッパー細胞のみならず肝実質細胞にまで到達して細胞内の核膜を透過して核内に侵入するなど、サブミクロンサイズ（直径 100 nm 以上）のシリカでは見られない特徴的な動態特性を持つことを世界に先駆けて明らかとした。また、粒子表面をカルボキシル基やアミノ基で修飾することで①～④の毒性が軽減できることを示した。

以上の結果は、ナノシリカの急性毒性は粒子径や表面性状といった物性に起因する特徴的な体内/細胞内動態特性を反映したものであることを示している。すなわち、これらの結果は、今後、続々と開発されるであろう様々なナノマテリアルの有害性予測/回避法を確立して安全性を確保するにあたっては、物性情報と体内/細胞内動態特性を詳細に把握し、これらの情報を毒性情報と関連させることが極めて重要であることを示している。

A. 研究目的

本邦のナノマテリアル研究は、開発・実用化の点で世界をリードしており、ナノシリカや酸化チタン、フラーレンなどが化粧品や医薬品、食品として上市されている。しかし、欧米各国ではナノマテリアルの革新的機能を反映した毒性 (NanoTox) が懸念され、ナノ製品の使用が規制されようとしている。OECD 等でも、ナノマテリアルのヒトにおける動態解析や毒性、安全性評価、社会的・倫理的な管理策の確立など、NanoTox のリスクマネジメントに向けた国際基準づくりを開始した。

経皮暴露されたナノマテリアルの安全性を、化粧品を一例に考えてみた場合、“250nm 以上のマテリアル”は皮膚の細胞間を通過できないため、従来までの化粧品は基本的に、肌の表面で無害に留まっていた。しかし昨今、ナノマテリアル化することで、肌の細胞間をすり抜け、皮膚の奥底や細胞内にまで浸透させることが可能となったため、ナノマテリアルの機能を活用した様々な有用性化粧品の開発が進展し、製品化されるに至っている。この反面、ナノマテリアルは経皮吸収され、全身血流に移行し、皮膚局所のみならず、全身分布してしまうこと、特に数 10nm 以下のサイズになると、皮膚を効率よく透過し、脳など、全身組織に分布することが報告されている。また皮膚沈着してしまったナノマテリアルの場合、細胞膜を容易に通過し、遺伝子が格納されている細胞核にまで侵入してしまうことも知られている。これら皮膚局所や全身組織に分布したナノマテリアルは、米国 NTP program の研究から、ナノマテリアルの発する遠赤外線や放電、光反応性・熱反応性による遺伝子・蛋白質変性などにより、アレルギーなどの未知毒性が誘発され得ることが指摘されている。そのうえナノフラーレンが体外から体内に侵入し、循環血中を介して脳組織に移行し、傷害性を示すことなどが判明しており、厚生労働行政においては、ナノマテリアルの社会受容の促進や国民の健康と福祉の向上の観点から、経皮曝

露されたナノマテリアルの健康への影響を評価出来る新たな試験法の開発やその有害性発現メカニズムの解明が緊急課題となっている。

このような状況をふまえ、本研究では、ナノマテリアルを経皮適用する領域でのリスクマネジメント手法の開発を目的に、食塩やベーキングパウダー、プロセスチーズなどの食品添加物や化粧品基材等に既に実用化されているシリカに関して、1) 物性と経皮曝露後の体内・細胞内挙動の連関をトキシコキネティクス解析すると共に、2) これら組織・細胞での安全性を種々毒性試験等を用いて解析することにより、ナノシリカの物性-動態-毒性の連関の解明を試みた。

B. 研究方法

1. ナノシリカ

本研究では、Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany) より購入した表面未修飾ナノシリカ (直径 70、100、300、1000 nm ; それぞれ SP70、SP100、SP300、SP1000) と、粒子表面をアミノ基あるいはカルボキシル基で修飾した直径 70 nm のナノシリカ (それぞれ SP70-N、SP70-C) を使用した。尚、特記しない限り、赤色蛍光色素 (RedF) で標識したナノシリカを実験に供した。

2. ナノシリカの皮膚透過性評価

ナノシリカの経皮透過性は、ナノシリカ適用皮膚ならびに投与部位所属リンパ節から作製した超薄切切片を電子顕微鏡観察することにより評価した。なお、ナノシリカ溶液は、既に医薬品や化粧品用のエステル油剤として実用化されているミリスチン酸イソプロピル (Isopropyl miristate ; IPM) を含む蒸留水 (終濃度 10%) で懸濁することにより調製した。このナノシリカ溶液を 2 mg/head でマウス耳介皮膚に 3 日間連続塗布し、最終投与 24 時間後にマウス耳介および所属リンパ節を回収した。これらの組織から常法に従って超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察に供した。

3. ナノシリカの急性毒性

種々の濃度の SP70、SP100、SP300、SP1000、SP70-N、SP70-C を Balb/c マウス（雌性、8 週齢）の尾静脈内より投与し、生存率および形態・行動変化を経時的に観察した。また、投与 6 あるいは 24 時間に各マウスから眼底採血により血液を回収し、血液生化学検査（AST/ALT 値、 γ -GTP 値、乳酸デヒドロゲナーゼ値、アルカリフォスファターゼ値、クレアチニンフォスフォキナーゼ値、アルブミン量、総ビリルビン量、総コレステロール量、血液尿素窒素値、アンモニア値）を実施した。さらに、各粒子を投与したマウスから肝臓・腎臓・脾臓・肺・脳をはじめとする主要臓器を回収し、これらの組織は病理学的検査に供した。

4. ナノシリカの体内動態追跡

ナノシリカは注射用水あるいはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に懸濁し、投与量 2 mg/mouse（ほぼ 100 mg/kg に相当）、対照として注射用水（あるいは PBS）のみをそれぞれ雌 BALB/c マウス各 1 匹に尾静脈内から投与した。但し、SP70 を 2 mg/mouse 投与すると十数時間以内にマウスが死亡するため、この群のみ 0.6 mg/mouse（ほぼ 30 mg/kg に相当）の投与量とした。投与 24 時間後、フェノバルビタールで麻酔・屠殺後、肝臓、肺臓、大脳（皮質）、腎臓（皮質）、心臓、脾臓、鼠頸リンパ節を摘出し、直ちに冷 2.5 % グルタルアルデヒド溶液で 2 時間固定し、0.1 M リン酸緩衝溶液で洗浄後、1 % 四酸化オスミウム溶液で 1 時間後固定し、上昇エタノールで脱水した。常法に従いエポキシ樹脂で包埋し、熱重合で硬化させた。標本はダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛の二重電子染色後、電顕で観察した。但し、直径が 70 nm のナノシリカは、染色することにより確認が困難になるため無染色での観察も行った。

5. ナノシリカの細胞増殖阻害効果

96 穴プレートに 10^4 個のヒト不死化ケラチノサイト細胞株（HaCaT）、マウスランゲルハンス細胞株（XS52）、あるいはマウスマクロファージ

細胞株（RAW264.7）を播種し、種々の濃度の SP70、SP100、SP300、SP1000、SP70-N、SP70-C を添加した。18 時間後にトリチウム化チミジン（1 μ Ci）を添加してさらに 6 時間培養した。各粒子を添加して 24 時間後にセルハーベスターを用いて細胞を回収し、細胞内に取り込まれたトリチウム化チミジンの量を液体シンチレーションカウンター（TopCount NXT；PerkinElmer）により測定した。

6. ナノシリカの細胞膜障害性

ナノシリカの細胞膜傷害性は、96 穴プレートに予め播種した XS52 細胞（ 10^4 個）に対して、種々の濃度の SP70、SP100、SP300、SP1000、SP70-N、SP70-C を添加して共培養した。24 時間に回収した培養上清中の乳酸脱水素酵素（LDH）の量を LDH release assay kit（Wako purechemical co. Ltd.）を用いて定量した。

7. ナノシリカの細胞内動態

8 穴チャンバースライドに予め播種しておいた HaCaT 細胞あるいは XS52 細胞（ 10^4 個）に対して、終濃度が 100 μ g/ml になるように SP70、SP100、SP300、SP1000 を添加した。ナノシリカを添加して 24 時間共培養した各細胞を PBS で洗浄した後に氷冷した 2.5 % グルタルアルデヒド液で 1 時間固定した。次いで、0.1 M リン酸緩衝液で洗浄した後に 1% 四酸化オスミウムで 30 分間後固定し、さらに上昇エチルアルコールで脱水した。常法に従ってこれらの標本をエポキシ樹脂で包埋し、熱重合により硬化させた。この標本からダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作製し、無染色あるいは酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛の二重電子染色を施した後に、透過電子顕微鏡（TEM）を用いて観察した。

8. Ames 試験

本試験においては、ヒスチジン要求性ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）である TA100 株および TA98 株を用いた。種々の濃度のナノシリカと対数増殖期にある TA98 あるいは TA100 株とを混合し、37°C で 20 分間インキュ

ベートした。この溶液に対して 45°C で保温しておいた 10 倍容量の軟寒天培地を添加・混合し、ヒスチジンを含まない寒天培地に播種した。37°C で 48 時間培養した後に、寒天培地上に形成したコロニー数を計数した。

9. DNA 傷害性の評価 (コメットアッセイ)

100 ϕ ディッシュに予め播種しておいた HaCaT 細胞に対して、種々の濃度の SP70、SP100、SP300、SP1000 を添加し、3 時間インキュベートした。セルスクレイパーを用いて細胞を剥離し、250 × g で 5 分間遠心した。この細胞をカルシウムならびにマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(Ca/Mg free)) で再懸濁し、250 × g で遠心することにより洗浄した。同様の操作で三回洗浄した HaCaT 細胞を 10⁵ cells/ml になるように PBS(Ca/Mg free) に懸濁した。これらの細胞懸濁液と PBS で終濃度 1% に調製したアガロース溶液を 1:10 の比率で混合し、Comet Slide (TREVIGEN 社) にプレーティングした。4°C で 10 分間静置することにより、アガロースを固化させた後に細胞を溶解し、25V で 10 分間電気泳動した。この標本に SYBR Green I (Molecular probe) を 50 μ l 加えて DNA を染色し、蛍光顕微鏡を用いて撮像した (励起波長: 494 nm、蛍光波長: 521 nm)。Tail moment ならびに Tail length の算出にはコメットアナライザ (YOUWORKS Co. Ltd.) を使用した。

10. 細胞内活性酸素種の検出 (DCFH-DA 法)

100 ϕ ディッシュに予め播種しておいた HaCaT 細胞に対して、種々の濃度の SP70、SP100、SP300、SP1000 を添加した。3 時間インキュベートしたこれらの細胞を回収・洗浄した後に、DMSO に溶解した DCFH-DA を終濃度 10 μ M 含有した Phenol Red Free の MEM 培地を添加した。30 分間インキュベートした後に、PBS で細胞を洗浄し、蛍光プレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した (励起波長: 485 nm、蛍光波長: 530 nm)。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. ナノシリカの皮膚透過性評価

まず、SP70 溶液を 3 日間連続塗布したマウスの皮膚を電子顕微鏡にて観察した。その結果、SP70 は表皮層に存在する角化細胞やランゲルハンス細胞のみならず、表皮層の下層に存在する真皮層の細胞内にまで到達していた (図 1)。また、投与部位近傍の所属リンパ節を観察したところ、リンパ球細胞内で SP70 の存在を確認できた。このように、SP70 が表皮層を透過して真皮層にまで到達したという事実は、真皮層内で発達した血管やリンパ管を介して全身に分布する可能性を示唆している。事実、ごくわずかではあるが投与部位の所属リンパ節内に SP70 が到達した像が認められたことから、リンパ行性あるいは血行性に全身分布する可能性は十分に考えられる。以上の結果から、SP70 の安全性を担保するにあたっては、ナノシリカの全身毒性ならびに生体内動態を精査する必要があると考えられた。

2. ナノシリカの急性毒性評価

ナノシリカの全身毒性を評価するために、粒子径の異なるナノシリカをマウス尾静脈内より投与した際の急性毒性を評価した。SP1000、SP300 を投与したマウスにおいては、マウスの生存率や形態的な変化は全く認められなかった (図 2A)。それに対して、SP100 投与群では約 40% のマウスが死亡し、さらに驚くべきことに SP70 投与群では投与後 12 時間以内に全てのマウスが死亡した。また、SP70 投与による致死毒性は、粒子濃度に依存して増大し、50% 致死濃度 (IC₅₀) は 0.9 mg/head であること、0.5 mg/head 以上の濃度で致死毒性が誘発されることを明らかとした (図 2B)。さらに、各ナノシリカを 2 mg/head で投与したマウスから 6 時間後に血液を回収し、血液生化学検査を実施した (図 3)。その結果、SP70 投与マウスにおいて、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、 γ -グルタミルトランスペプチ