

200941004A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの経皮毒性に関するトキシコキ  
ネティクスおよびトキシコプロテオミクス等の  
融合による有害性評価法・リスク予測法の開発

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 22 (2010) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの経皮毒性に関するトキシコキ  
ネティクスおよびトキシコプロテオミクス等の  
融合による有害性評価法・リスク予測法の開発

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 22 (2010) 年 4 月

## 目次

### I. 総括研究報告書

ナノマテリアルの経皮毒性に関するトキシコキネティクスおよびトキシコプロテオミクス等の融合による有害性評価法・リスク予測法の開発	1
大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野	研究代表者 堤 康央

### II. 分担研究報告書

1. 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 (独) 医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト (創薬プロテオミクスプロジェクト)	51
研究分担者	角田慎一
2. ナノマテリアルの経皮リスクに関する研究	67
大阪大学大学院薬学研究科 薬剤学分野	研究分担者 中川晋作
3. ナノマテリアルの肝臓に対する安全性に関する研究	71
大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野	研究分担者 八木清仁
4. 電子顕微鏡によるナノマテリアルの投与経路の相違における主要臓器の各細胞内への侵入性・局在性に関する研究 (独) 医薬基盤研究所 生物資源研究部 共用機器実験室	94
研究分担者	今澤孝喜
5. ナノマテリアルの免疫毒性評価	128
大阪大学臨床医工学融合研究教育センター	研究分担者 吉岡靖雄
6. トキシコキネティクスによるナノマテリアルの安全性評価 (独) 医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト (創薬プロテオミクスプロジェクト)	146
研究分担者	阿部康弘
5. ナノマテリアルと生体高分子の相互作用～NanoTox 解析における重要性～	154
大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野	研究分担者 吉川友章

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	168
---------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別冊	170
-----------------	-----

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

「ナノマテリアルの経皮毒性に関するトキシコキネティクスおよび  
トキシコプロテオミクス等の融合による有害性評価法・リスク予測法の開発」

総括研究報告書

## 「ナノマテリアルの経皮毒性に関するトキシコキネティクスおよび トキシコプロテオミクス等の融合による有害性評価法・リスク予測法の開発」

主任研究者 堤 康央

（独）医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト/大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

### 研究要旨

近年、産業利用を目的として開発・製造されるナノマテリアル（NM）および NM 利用製品の使用が多様化・加速化している。その一方で、昨今、NM 特有の物性に起因した革新的機能が、二面性を呈してしまい、予期しにくい毒性（ナノ毒性；NanoTox）を発現してしまうことが世界的に危惧されている。しかし世界的に観ても、NanoTox のハザード情報の集積でさえ未だ不十分であり、特に NM のリスク評価・管理に必須となる曝露情報（吸収→分布・蓄積・代謝→排泄といった細胞内・体内動態情報）に関しては皆無に等しい。このような背景の下、昨年度、経済協力開発機構（OECD）主導の下で展開されてきた NM 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 NM 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。しかし、このまま不十分な安全性情報に基づいた NM 規制を施行した場合、NM 利用製品の産業応用の阻害に繋がり、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、NM 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 NM 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（ハザード情報）を可能な限り集積し、一日最大摂取量や無作用量等の曝露実態解析といったリスク管理に必須となる定量的情報の必要性を科学的に検証する事が喫緊の最重要課題である。

本研究では、特に実用化が進んでいる NM 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(nSP)を標準 NM として用いると共に、実際に上市・利用されている NM に関して、物性と動態や安全性との関連評価を通して NM 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。100 nm 以下のサイズの nSP は、従来までのサブミクロンサイズ以上のものとは決定的に異なり、①経皮・経粘膜吸収され、全身血中にまで移行し得ること、②肝実質に移行し、肝傷害を引き起こし得ること、③皮内ランゲルハンス細胞に取り込まれ、所属リンパ節まで運搬され、免疫毒性を招き得ること、④血液-脳関門（BBB）を突破し、脳神経毒性を呈し得ること、⑤胎盤に集積した後、血液-胎盤関門を突破して胎子の脳や肝臓にまで移行すること等を初めて明らかとしている。さらに本年度（平成 21 年度）は種々物性のナノシリカの毒性評価を実施し、100 nm 以下のサイズの nSP が、1) nSP によって生ずる DNA 損傷効果が活性酸素種の産生によって生ずること、2) 血中に移行した際に播種性血管内凝固症候群（DIC）を誘発しうること、3) 胎盤に集積した後、胎盤関門を突破して胎子の脳や肝臓にまで移行し、胎子発育障害や流産、胎子血液毒性、胎子幹毒性を惹起し得ること、4) nSP を曝露した母体から出生した新生仔は成長後に免疫機能不全となり得ること、5) nSP 投与によって誘発される DIC や肝障害が、nSP の粒子表面をカルボキシル基や

アミノ基等の官能基で修飾することによって回避できること、などを見出した。また、OECD テストガイドライン作成における経皮反復投与毒性試験を担当し、フラーレンと多層カーボンナノチューブ（MWCNT）と単層カーボンナノチューブ（SWCNT）の限定試験を完了した。本試験の結果、これらの素材が適切に使用された場合、安全性に懸念がないと考えられるものの、血液検査において統計学的に有意な影響が散発的に見られたため、他国の検査結果と共に総合的に判断し、一日摂取許容量（ADI）等を設定する必要性について慎重に議論する必要があると評価した。

これらの結果は、非晶質 nSP を含有した経皮適用 NM 製品に関しては、曝露実態の定量的かつ詳細な評価やそれらを基盤とした摂取許容量や最大無影響量等の設定が必要になる可能性を強く示唆している。また、nSP をモデル NM とした本事業の成果によって、酸化チタンや白金ナノコロイド、ナノ銀といったその他の既実用化 NM や、今後、続々と開発されるであろう様々なナノ材料についても、物性情報と体内/細胞内動態特性、ハザードとの連関を詳細に把握し、リスク管理の必要性を科学的に検証する必要があることを裏付けるものである。将来的には、本事業で確立した物性-体内動態-ハザード連関解析を基盤として、ナノ材料の社会受容の促進やナノ材料産業の発展支援が実現することを期待している。

## A. 研究目的

本邦のナノ材料(NM)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 NM 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、NM 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。

経皮曝露された NM の安全性を、化粧品を一例に考えてみた場合、“250nm 以上の材料”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、NM 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、NM 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、NM 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 NM の場合、細胞膜を容易に

透過し、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 NM は、米国 NTP program の研究から、NM 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、NM 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 NM 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。しかし、このまま不十分な安全性情報に基づいた NM 規制を施行した場合、NM 利用製品の産業応用の阻害に繋がり、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、NM 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 NM 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（ハザード情報）を可能な限り集積し、一日最大摂取量や無作用量等の曝露実態解析といったリスク管理に必須となる定量的

情報の必要性を科学的に検証する事が喫緊の最重要課題である。

このような状況をふまえ、本研究では、特に実用化が進んでいる NM 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(nSP)を標準 NM として用いると共に、実際に上市・利用されている NM に関して、物性と動態や安全性との関連評価を通して NM 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。その結果、これまでに、100 nm 以下のサイズの nSP は、従来までのサブミクロンサイズ以上のものとは決定的に異なり、①経皮・経粘膜吸収され、全身血中にまで移行し得ること、②肝実質に移行し、肝傷害を引き起こし得ること、③皮内ランゲルハンス細胞に取り込まれ、所属リンパ節まで運搬され、免疫毒性を招き得ること、④血液-脳関門 (BBB) を突破し、脳神経毒性を呈し得ること、⑤胎盤に集積した後、血液-胎盤関門を突破して胎仔の脳や肝臓にまで移行すること、⑥細胞核にまで移行して DNA 傷害性を誘発し得ること、などを初めて明らかとしている。これらの知見を踏まえて、本年度 (平成 21 年度) は、nSP に関して急性致死毒性・肝毒性・DNA 傷害性誘発機構の解析を進めると共に、胎仔や新生仔に対する生体影響を精査した。さらに、当該グループが担当する OECD ガイドライン作製に向けた対応として、フラーレンや MWCNT、SWCNT の反復投与経皮毒性試験を実施した。

## B. 研究方法

### 1. ナノマテリアル(NM)

本研究では、Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany) より購入した表面未修飾 nSP (直径 70、100、300、1000 nm; それぞれ nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000) 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 nSP (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 nSP を実験に供した。また、

SWCNT、MWCNT は名城ナノカーボンより購入した。フラーレン、PVP-フラーレンはビタミン C60 バイオリサーチから提供いただいた。SWCNT、MWCNT、フラーレンはそれぞれ 1 mg/ml となるようにコーン油 (和光純薬) に懸濁し、PVP-フラーレンは 50 mg/ml となるように蒸留水に溶解して、実験に供した。コントロールサンプルとしては、コーン油、そして PVP-フラーレンの PVP はほとんどが遊離型であることを考慮し、PVP 溶液 (50 mg/ml) を用いた。

### 2. NM の経皮吸収性の評価

実験には NM として粒子径 70 nm の未修飾体 nSP (nSP70) および粒子径 30~40 nm の QD を、対照として超純水を用い、塗布方法は OECD ガイドライン (21/28 日間反復投与経皮毒性試験: TG410) に準拠した (投与回数は土日を除く計 20 回)。動物は 6 週齢の雌 BALB/C マウス 12 匹を日本エスエルシー (株) より購入し、馴化期間 3 日間とし、6 群に分け、各群 2 匹ずつとした。そのうちの 3 つの群には浸透性を高める目的で NM あるいは超純水の塗布前にアセトン/ジエチルエーテル (1 : 1) 混合液を脱脂綿に浸みこませて塗布部位を軽く 10 回程度拭き、その後 NM あるいは超純水をそれぞれ塗布した。残りの 3 つの群はアセトン/ジエチルエーテルを無処置とし、NM あるいは超純水をそれぞれ同様に塗布した。塗布量は、nSP70 は濃度 25 mg/ml ( $7 \times 10^{13}$  個/ml) の溶液を、QD は nSP70 と同じ粒子数になるように超純水で 17 倍に希釈した溶液をそれぞれ片側耳介に 10  $\mu$ l ずつ両側耳介に塗布し、総量 20  $\mu$ l の投与量とし、週 5 日間 4 週間、計 20 回塗布した。対照群には超純水を同様に両側耳介に塗布した。最終塗布から 24 時間後、フェノバルビタールで麻酔・安楽死後、皮膚組織、肝臓、大脳皮質、海馬および頸椎リンパ節を摘出し、直ちに冷 2.5 % グルタルアルデヒド溶液で 2 時

間前固定し、0.1 M リン酸緩衝溶液で洗浄後、1 % 四酸化オスmium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。尚、QD の局在は、以下に示すように、銀染色により増感した後に解析した。具体的には、作成した組織ブロックから超薄切を作成し、ニッケルグリッド上で組織中の QD の増感のために銀染色を実施した。銀染色は、AURION R-GENT SE-EM High Efficiency Silver Enhancement Reagents for Electron Microscopy (AURION) を用い、付属の説明書に従って実施した。パラフィルム上に染色液 (ENHANCER MIXTURE) を滴下し、組織切片を貼り付けたグリッドを浮かべ、室温で 30 分間増感させた。その後、試料を蒸留水中で 5 分間静置し、それを 3 回繰り返すことで洗浄を行った。その後試料を風乾させ、透過型電子顕微鏡で検鏡した。

### 3. 血液凝固系に着目した nSP の急性毒性誘発機構の解析-1 : 抗凝固剤ヘパリン前投与マウスを用いた生存率の評価

抗凝固剤ヘパリンを 100 IU/匹で腹腔内投与し、2 分後に各粒子サイズのシリカを 2 mg/匹で尾静脈内投与した。投与後、24 時間までの様子を 1 時間ごとに観察し、生存率を評価した。

### 4. 血液凝固系に着目した nSP の急性毒性誘発機構の解析-2 : 血液凝固検査

nSP 投与マウスから採取した血漿を用いて、プロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した。BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性, Japan SLC, Inc, Japan) に PBS で 20 mg/ml に調製した各粒子サイズのシリカ分散液を 100  $\mu$ l (2 mg/匹) ずつ尾静脈内投与した。シリカ投与 5 時間後に、ネンブータル麻酔下で心臓より採血を行った。抗凝固剤として 3.8% のクエン酸ナトリウム溶液を用いた。3.8% クエン酸ナトリウムと血液の比が

1 : 9 (v/v) となるように、3.8% クエン酸ナトリウムを混合した血液の一部を血球検査に用いた。このクエン酸ナトリウム混合血液を 1750  $\times$  g、15 分間、遠心分離して得られた血漿を用いた。PT は、組織トロンボプラスチンとカルシウムをクエン酸血漿に充分量加え、フィブリン析出までの時間を測定し、第 VII 因子、第 X 因子、第 V 因子、第 II 因子とフィブリノーゲンの量と質に影響を受ける外因系凝固反応を測定するものであり、ウサギ由来の脳トロンボプラスチンを含む PT 試薬 (Sysmex, Japan) を用いて測定した。APTT は、セファリン (リン脂質) と活性化剤を添加し、陰性荷電膜面による第 XII 因子の接触活性化からフィブリンの析出までの内因系凝固反応を測定するものであり、合成リン脂質および活性化剤であるエラグ酸を含む APTT 試薬 (Sysmex, Japan) を用いて測定した。測定装置は CLOTEK システム (Travenol Laboratories, Inc., Costa. Mesa, CA) を用い、フィブリン析出による反応液の濁度の上昇を終点として凝固時間を測定した。PT は、血漿検体 100  $\mu$ l を CLOTEK システム付属の小試験管に取り、37 $^{\circ}$ C で 3 分間加温後、あらかじめ別に 37 $^{\circ}$ C に加温した PT プラス液を 200  $\mu$ l 添加し、溶液が凝固するまでの時間を測定した。APTT は、CLOTEK システム付属の小試験管に APTT 試薬 200  $\mu$ l を取り、37 $^{\circ}$ C で 1 分間加温後、各血漿をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ加えて混合し、37 $^{\circ}$ C で 3 分間加温した。その後、あらかじめ加温した塩化カルシウムを 100  $\mu$ l 加え、凝固時間を測定した。

### 5. 血液凝固系に着目した nSP の急性毒性誘発機構の解析-3 : 血管透過性試験

BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性, Japan SLC, Inc, Japan) に PBS で 20 mg/ml に調製した各粒子サイズのシリカ分散液を 100  $\mu$ l (2 mg/匹) ずつ尾静脈内投与した。シリカ投与 1 時間後に、2% エバンスブルー溶液を 80  $\mu$ l/匹ずつ尾静脈内より投与し、30 分後に耳介の色調変化を撮影した。

### 6. 血液凝固系に着目した nSP の急性毒性誘発

#### 機構の解析-4 : nSP の血液凝固因子活性化能の評価

抗凝固剤として 3.8%クエン酸ナトリウムを用いて、健常ヒトボランティアから血液を採取した。3.8%クエン酸ナトリウムと血液の比が 1 : 9 (v/v) となるように、3.8%クエン酸ナトリウムを混合した血液を 1750 × g、15 分間、遠心分離して得られた血漿を凝固試験に用いた。

また、血液凝固第 XII 因子欠損血漿は、Haematologic Technoloties, Inc. (Essex Junction, VT) から購入した。血漿 100 $\mu$ l に対して各粒子サイズのシリカを 0.02 mg/ml の濃度でそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ混合した。37°C で 3 分間インキュベートした後、20 mM CaCl<sub>2</sub> を 100  $\mu$ l 添加して、フィブリン析出による反応液の濁度の上昇を終点として凝固時間を測定した。測定には CLOTEK システムを用いた。

#### 7. 血液凝固系に着目した nSP の急性毒性誘発機構の解析-5 : nSP の血液凝固第 XII 因子活性化能の評価

正常成人ヒトから採血を行い、1750 × g、15 分間、遠心分離して得られた血漿を測定に用いた。37°C に加温しておいた 1 ml の Buffer (pH8.0 Tris-HCl in 0.15 M NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/ml bovine serum albumin) に、血液第XIIa 因子基質 (PEPTIDE INSTITUTE, Inc, Japan) を 20  $\mu$ l 加えた。これとは別に 100  $\mu$ l のヒト血漿に各 nSP (25 mg/ml, 0.4 mg/ml) を 100  $\mu$ l を加え攪拌した。この血漿と nSP との混合液を、先程の Buffer と基質の混合液に加え、測定波長 380 nm、参照波長 440 nm で測定した。横軸に反応後の経過時間、縦軸に蛍光強度を取り、各サンプルのグラフが直線状態になる時間範囲について近似曲線を引くことで、その傾きから酵素活性化の初速度  $V_0$  を算出した。

#### 8. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討 -1 : 四塩化炭素による肝毒性に対する nSP の影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、四塩化炭素

を 0.005 ml/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて nSP70 (Lot : 14798 40H) を 30 mg/kg · nSP70-C (Lot : 06058 40-01) · nSP70-N (Lot : 07028 40-01) · nSP100 (Lot : 17898 40H) を 60 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に投与した。四塩化炭素はオリーブオイルを用いて希釈後、5 ml/kg b.w. の用量で投与し、四塩化炭素を投与しない群には、オリーブオイルのみ投与した。nSP は注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の用量で投与し、Control 群には注射用水のみ投与した。

投与 24 時間後に心採血により血清を回収した。四塩化炭素の肝毒性に対する nSP 併用の影響を、肝傷害の指標である血清中の AST、ALT 活性を測定することにより検討した。

#### 9. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討 -2 : パラコートによる肝毒性に対する nSP の影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、パラコート (paraquat : PQ)を 50 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて nSP70 (Lot: 14798 40H) を 30 mg/kg · nSP70-C (Lot : 06058 40-01) · nSP70-N (Lot : 07028 40-01) · nSP100 (Lot : 17898 40H) を 60 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に投与した。パラコートは生理食塩水を用いて希釈後、20 ml/kg b.w. の用量で投与し、パラコートを投与しない群には、生理食塩水のみ投与した。nSP は注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の用量で投与し、Control 群には注射用水のみ投与した。投与 24 時間後に心採血により血清を回収した。パラコートの毒性に対する nSP 併用の影響を肝臓において評価するため、肝傷害の指標である血清中の AST、ALT 活性を測定した。

#### 10. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討 -3 : シスプラチンによる肝毒性に対する nSP70-C、nSP70-N、nSP100 の影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、シスプラチンを 50  $\mu$ mol/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて nSP70-C (Lot: 06058 40-01) · nSP70-N (Lot: 07028 40-01) · nSP100 (Lot: 17898 40H) を 10 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に投与した。Control 群には注射用水のみ投与した。



投与 24 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、血清を回収した。シスプラチンの副作用に対する nSP 併用の影響を肝臓において評価するため、肝傷害の指標として血清中の AST、ALT 活性の測定を行った。

### 11. 急性肝障害の発現に対する表面修飾 nSP の作用

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスにシクロホスファミド (CPA) を 300 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に投与した。CPA 投与 24 時間後に、nSP70 (Lot : 14798 40H) を 30 mg/kg・nSP70-C (Lot : 06058 40-01)・nSP70-N (Lot : 07028 40-01)・nSP100 (Lot:17898 40H) を 60 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。CPA は注射用水を用いて希釈後、30 mL/kg b.w.の投与量で投与し、Control 群には注射用水のみ投与した。

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、各 nSP を投与する 30 時間前と 6 時間前に肝クッパー細胞阻害剤ガドリニウムクロライドを 10 mg/kg b.w. の用量で静脈内に投与した。ガドリニウムクロライド前投与後、nSP70 (Lot : 14798 40H) を 30 mg/kg・nSP70-C (Lot : 06058 40-01)・nSP70-N (Lot : 07028 40-01)・nSP100 (Lot : 17898 40H) を 60 mg/kg b.w の用量で尾静脈内に単回投与した。ガドリニウムクロライドは生理食塩水を用いて希釈後、2.5 ml/kg b.w.の用量で投与し、Control 群には生理食塩水のみ投与した。Control 群には注射用水のみ投与した。nSP 投与 24 時間後に心採血により血清を回収した。その後、肝傷害の指標である血清中の AST、ALT 活性の測定を行った。

### 12. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討

#### -4: アセトアミノフェンによる肝毒性に対する nSP の影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、アセトアミノフェン (acetaminophen : AA) を 500 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて nSP70 (Lot : 14798 40H) を 30 mg/kg・nSP70-C (Lot : 06058 40-01)・nSP70-N (Lot : 07028 40-01)・nSP100 (Lot:17898 40H) を 60 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に投与した。アセトアミノ

フェンは 3.5% DMSO 生理食塩水を用いて希釈後、20 ml/kg b.w. の用量で投与し、アセトアミノフェンを投与しない群には、3.5 % DMSO 生理食塩水のみ投与した。nSP は注射用水を用いて希釈後、4 ml/kg b.w. の投与量で投与し、Control 群には注射用水のみ投与した。投与 24 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、血清を回収した。アセトアミノフェンの毒性に対する nSP 併用の影響を肝臓において評価するため、肝傷害の指標である血清中の AST、ALT 活性を測定した。

### 13. 表面修飾 nSP 頻回投与における肝臓への影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP70 (Lot : 14798 40H) を 30 mg/kg b.w. nSP70-C (Lot : 06058 40-01)・nSP70-N (Lot : 07028 40-01) を 40、60 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に週 2 回、4 週間連続 (計 8 回) 投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。最終投与 1 日後に心採血により血液サンプルを採取し、60 分間室温で放置後、4 °C, 6000 rpm, 10 min で遠心分離を行い、血清として回収した。また、心臓灌流により脱血後、肝臓を採取し、HE 染色を行い組織レベルでの慢性傷害の観察を行った。また、肝臓及び腎臓に対する慢性毒性を評価するため、肝傷害の指標として血清中の AST、ALT 活性の測定を、腎傷害の指標として BUN 値の測定を行った。さらに、肝臓における線維化の程度を検討するため AZAN 染色及び Hydroxyproline (HYP)量の測定を行った。

### 14. nSP の in vitro サイトカイン産生誘導能の評価

96 穴プレートに THP-1 あるいは RAW264.7 細胞を播種した。THP-1 は 0.5 μM PMA 存在下で 24 時間培養することで、マクロファージ様細胞に分化させた。各シリカ (100 μg/ml) を添加し、6 時間後、培養上清中の Interleukin (IL) -1β、IP-10 を含むその他サイトカイン濃度を Bio-Plex Suspension Array System (Bio-Rad) にて測定した。RAW264.7 細胞は 12 時間培養後、各シリ

カ (100 µg/ml) を 100 µl 添加し、12 時間後、培養上清中の Tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  を enzyme-linked immunoSorbent assay (ELISA) にて測定した。

#### 15. 非晶質 nSP のリン酸化シグナル誘導能の解析 (Western Blot)

12 穴プレートに RAW264.7 細胞を播種し、37°C で 12 時間培養した。その後、各シリカ (100 µg/mL) を添加した。各時間培養後に氷冷 PBS で細胞を洗浄し、Halt™ Protease Inhibitor Cocktail Kit 及びホスファターゼ阻害剤カクテルを添加した細胞溶解液で細胞を破碎した。各 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) の検出には Mammalian Protein Extraction Reagent を用いて細胞全画を回収した。総蛋白質量 1 - 5 µg の各サンプルをポリアクリルアミドゲルを用いて SDS 電気泳動した後、メンブレンへ転写した。メンブレンをブッキングした後、各 1 次抗体を 4°C、オーバーナイトで反応させた。その後、HRP 標識 2 次抗体を室温で 1 時間反応させた後、Super Signal® West Femto Maximum sensitivity Substrate によってシグナルを検出した。

#### 16. 各種阻害剤存在下でのサイトカイン測定

96 穴プレートに RAW264.7 細胞を播種し、12 時間培養した。その後、p38 阻害剤 SB203580、Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) 阻害剤 U0126 または c-jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤 SP600125 を添加した。2 時間後、各シリカ (100 µg/mL) を加え、4 時間後、培養上清中の TNF $\alpha$  濃度を ELISA にて測定した。

#### 17. 各 SP の *in vivo* 炎症誘導能評価

BALB/c マウス (8 週齢、雌性) に対して各粒子径のシリカを 1 mg/200 µl/mouse で腹腔内に投与した。24 時間後、4 ml の PBS を腹腔内へと投与し、腹腔洗浄液を回収した。その後、NucleoCounter を用いて生細胞数を測定した。

#### 18. 妊娠マウスにおける nSP の体内動態解析

妊娠 13 日目の BALB/c マウス (8-10 週齢、雌性、Japan SLC) を日本 S L C より購入した。妊娠 16 日目に生理食塩水で 8 mg/ml に調製した DY676 (励起波長; 674 nm、蛍光波長; 699 nm) で蛍光標識された nSP70、nSP300 および mSP1000 を 0.8 mg/匹で尾静脈内投与した。シリカ投与 24 時間後に、イソフルラン (Abbott Japan) で吸入麻酔をかけ、IVIS 100 imaging system (Xenogen corp、Alameda) を用いて、シリカ粒子の体内動態を蛍光観察した。

さらに、nSP の妊娠時における動態解析にあたり、尾静脈内投与後における体内動態を透過型電子顕微鏡 (TEM) により評価した。妊娠 16 日目の BALB/c マウス (8-10 週齢、雌性、Japan SLC) に生理食塩水で 8 mg/ml に調製した nSP70、nSP300 および mSP1000 を 0.8 mg/匹で尾静脈内投与した。2 日間連続投与し、最終投与から 24 時間後に、帝王切開により子宮を摘出した。子宮、胎盤、胎仔肝臓、胎仔脳を摘出し、およそ 1 mm 角に切断した後、氷冷した 2.5% グルタルアルデヒド中で 2 時間前固定した。固定液を廃棄し、冷 0.1 M リン酸緩衝液を加えた後、氷冷しながら 10 分間の洗浄作業を 3 回繰り返した。その後、冷 1% 四酸化オスミウム液を加え、1 時間氷冷しながら振盪し、後固定した。続いて、濃度の異なるエタノール中で脱水した後、酸化プロピレンで置換し、Epon-812 樹脂 (TAAB laboratories) で包埋した。作成したサンプルブロックをダイヤモンドナイフで薄切し、およそ 60 nm の超薄切片を作製した。この超薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色後、透過型電子顕微鏡 (H-7650、HITACHI) で観察した。また、酢酸ウラニルとクエン酸鉛での染色を行わない状態でも超薄切片を観察した。

#### 19. nSP 曝露の出生後における影響評価

妊娠 16 日目の BALB/c マウス (8-10 週齢、雌性、Japan SLC) に生理食塩水で 8 mg/ml に調製した各粒子サイズのシリカ分散液を 100 µl (0.8 mg/匹) ずつ 2 日間連続で尾静脈投与し、妊娠

19-20 日目に自然分娩を確認した。出産後生まれてきた新生仔をあらかじめ出産させておいた ICR マウス (8-10 週齢、雌性、Japan SLC) が飼育した。経時的に体重を測定するとともに、6 週齢時に解剖し、心臓採血により血球数を評価した。

## 20. In vitro における DNA 酸化修飾の検出

100 mm dish で 24 時間培養した HaCaT 細胞に対して、様々な濃度の nSP70, nSP300, mSP1000, 三酸化ヒ素 (As) を添加した。各サンプルを添加して 3 時間後、DNeasy tissue kit (QIAGEN, Germany) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を、DNA の加水分解処理した後、ELISA kit (8-OHdG check, Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan) を用いて、8-OHdG の含有量を測定した。

## 21. 細胞内活性酸素種 (ROS) 量の測定

細胞内活性酸素種 (ROS) 量は蛍光プローブである 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH-DA) を用いて測定した。DCFH-DA は、細胞内において、ROS と反応し DCFH となり、蛍光を発する。 $3 \times 10^4$  cells となるように 96 穴プレートに予め播種しておいた HaCaT 細胞に対して、様々な濃度の nSP70, nSP300, mSP1000, 過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を添加した。nSP を添加して 3 時間後、フェノールレッドを含まない細胞培養液で 3 回洗浄し、DCFH-DA (10  $\mu$ M) を含有した同培養液を添加してインキュベートした (37°C, 30 分)。その後、蛍光プレートリーダー (蛍光フィルター : Ex/Em=485 nm/530 nm) を用いて蛍光強度を測定した。

## 22. 蛍光プローブを用いた活性酸素種の同定

ヒドロキシラジカル (OH)、次亜塩素酸 (OCI) の検出には蛍光プローブである Hydroxyphenyl Fluorescein (HPF ; 積水メディカル) を用いた。 $3 \times 10^4$  cells となるように 96 穴プレートに予め播種しておいた HaCaT 細胞に対して、様々な濃度の nSP70, nSP300, mSP1000,  $H_2O_2$  を添加した。nSP を添加して 3 時間後、フェノールレッドを含まない細胞培養液で 3 回洗浄し、各プローブ

(10  $\mu$ M) を含有した同培養液を添加してインキュベートした (37°C, 30 分)。インキュベート終了後、蛍光プレートリーダー (蛍光フィルター : Ex/Em=485 nm/530 nm) を用いて蛍光強度を測定した。

## 23. 抗酸化剤存在下における nSP の in vitro DNA 損傷作用の評価

$1 \times 10^5$  cells/well となるように 6 穴プレートに予め播種しておいた HaCaT 細胞に対して、N-アセチルシステイン (NAC ; 終濃度 2 mM) を添加して 30 分間インキュベートした。その後、NAC (終濃度 2 mM) 共存下で nSP70 (90  $\mu$ g/ml) を細胞に処置した。nSP70 を添加して 3 時間後の DNA 損傷性をコメットアッセイを用いて評価した。

## 24. カーボンナノチューブおよびフラーレンの 21/28 日反復経皮投与毒性試験 (Repeated Dose Dermal Toxicity (TG410) 限定試験)

Wistar クリーンラット (9 週齢、体重 180~200 g) の背部皮膚 ( $2 \times 2$  cm<sup>2</sup>) を剃毛し、その部位に各濃度に調製した NM サンプル、コントロールサンプルを 200  $\mu$ l/site で塗布した。多層および単層カーボンナノチューブ (それぞれ MWCNT、SWCNT) と表面未修飾フラーレン (FL) は、1 mg CNT/ml になるようにコーンオイルに懸濁し、超音波式ホモジナイザーを用いて 1-2 分間処理したものを使用した。また、PVP 修飾フラーレン (PVP-FL) ならびに PVP はそれぞれ 50 mg/ml になるように蒸留水に懸濁したものを使用した。塗布した部位を医療用ガーゼで覆い、保護テープで固定した。6 時間後、保護テープならびにガーゼをはずし、塗布部位に付着しているサンプルを洗い流した。各 NM サンプルの塗布期間中ラットの体重測定を行い、その推移を指標に NM の生体への影響を調べた。また NM サンプルの最終塗布から 24 時間後に塗布局所の皮膚を観察し、Draize 判定基準に従って NM の皮膚刺激性について評価した。さらに、各組織への NM の移行性ならびに傷害性を検討する目的に、血液、皮膚、

脳、肺、肝臓、腎臓、鼠頸部リンパ節を回収した。血液は3.8%クエン酸ナトリウム水溶液と1:9の割合で混合し、遠心操作により血漿サンプルと血餅サンプルとに分離した。また、皮膚は3等分して1つは液体窒素にて急速凍結、1つは病理組織観察用に10%中性ホルマリン緩衝液に、もう1つは電子顕微鏡観察用サンプルとして氷冷した2.5%グルタルアルデヒド溶液に浸漬して固定処理を行った。脳、肺、肝臓、腎臓については摘出後、重量を測定し、2つに分けて、片方を10%中性ホルマリン緩衝液に浸漬して固定処理を行い、もう一方を急速凍結処理した。病理検査（パラフィンブロックの作成、ヘマトキシリン-エオジン染色、所見の作成）はアプライドメディカルリサーチ（Japan）に依頼した。また、回収した血液を用いて、血漿中の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）、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）、乳酸脱水素酵素（LDH）、アルブミン（ALB）、総コレステロール（TCHO）、総ビリルビン（TBIL）、アンモニア（NH<sub>3</sub>）、血中尿素窒素（BUN）を比色法にて測定した。ATLおよびAST活性は、それぞれの基質であるL-アラニンおよびL-アスパラギン酸と $\alpha$ -ケトグルタル酸のアミノ転位反応によって生じたピルビン酸が、ピルビン酸オキシダーゼと反応することで生じる過酸化水素とジアリールイミダゾールロイコ色素の反応によって生成した青色色素を測定した。GGT活性は、基質であるL- $\gamma$ -グルタル-p-ニトロアニリドとグリシルグリシンとのアミノ転位反応によって生じたp-ニトロアニリンを測定した。LDH活性は、基質である乳酸と補酵素酸化型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドの反応によって生成した還元型補酵素がジアホラーゼの触媒作用によってニトロテトラゾリウムブルーを還元することで生じたホルマザン色素を測定した。ALBは、ブロムクレゾールグリーンとの反応により生じた青色色素を測定した。TCHOは、コレステロールオキシダーゼの働きで生成した過酸化

水素とジアリールイミダゾールロイコ色素の反応によって生じた青色色素を測定した。TBILは、2,4-ジクロロベンゼンジアゾニウム塩によってジアゾ化反応を受けて生成したジアゾ色素を測定した。NH<sub>3</sub>は、ブロモフェノールブルーとの反応によって生成した青色色素を測定した。BUNは、ウレアーゼの作用によって生成したアンモニアとブロムクレゾールグリーンとの反応によって生じた緑色色素を測定した。測定には、生化学分析装置FUJI DRICHEM 7000(FUJIFILM, Japan)を用いた。

## 25. エネルギー分散型 X 線検出器付き透過型電子顕微鏡 (EDX-TEM) を用いた nSP の体内局在解析

BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性, Japan SLC, Inc, Japan) に PBS で 20 mg/ml に調製した nSP70 分散液を 100  $\mu$ l (2 mg/ 匹) ずつ尾静脈内投与した。シリカ投与 6 時間後に肝臓を摘出し、およそ 1 mm 角にカットした後、氷冷した 2.5% グルタルアルデヒド中で 2 時間前固定した。固定液を廃棄し、冷 0.1 M リン酸緩衝液を加えた後、氷冷しながら 10 分間の洗浄作業を 3 回繰り返した。その後、冷 1% 四酸化オスミウム液を加えて氷冷しながら 1 時間振盪し、後固定を行った。続いて、濃度の異なるエタノール中で脱水した後、酸化プロピレンで置換し、Epon-812 樹脂 (TAAB laboratories, UK) で包埋した。作成したサンプルブロックをダイヤモンドナイフで薄切し、およそ 60 nm の超薄切片を作成した。この超薄切切片を、エネルギー分散型 X 線装置 (EDX) を装着した透過型電子顕微鏡 (TEM; 日立ハイテクノロジーズ) を用いて解析した。

## 26. 誘導結合高周波プラズマ発光分光解析 (ICP-AES) を用いた nSP の体内動態追跡

BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性, Japan SLC, Inc, Japan) に nSP70 を 2 mg/ 匹で尾静脈内投与した。シリカ投与 5 時間後に、ネンブータル深麻酔下で脱血死させ、肺と肝臓を摘出した。この肝を ICP-AES (Varian 735-ES) 解析に供した。尚、

ICP-AES 解析は (財) 食品分析センターに委託した。

### C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

#### D. 考 察

##### 1. NM の経皮吸収性の評価

代表的な NM である nSP70 と QD を耳介から経皮投与し、各臓器および各細胞への浸透性について検討した (図 1)。nSP70 塗布群における皮膚組織では角化細胞および角化細胞の核内に粒子が観察された。肝臓では肝細胞内に粒子の侵入が観察された。しかし、クッパー細胞に貪食された粒子はほとんど観察されなかった。リンパ節ではリンパ球およびリンパ球の核内に粒子の侵入が観察された。大脳皮質ではグリア細胞および神経網内に粒子の侵入像が観察された。海馬では神経網、神経細胞の前シナプスおよび後シナプス内に粒子の侵入が観察された。

一方で、QD 塗布群における皮膚組織では角化細胞内、棘細胞核内に粒子が観察された。肝臓では肝細胞のミトコンドリアおよびミトコンドリア内に粒子の侵入が観察された。クッパー細胞に貪食された粒子はほとんど観察されなかった。リンパ節ではリンパ球内およびリンパ球の核内に粒子の侵入が観察された。大脳皮質ではグリア細胞内、希突起膠細胞内、樹状突起内、後シナプス内に粒子の侵入像が観察された。海馬ではグリア細胞内、前シナプスおよび後シナプス内に粒子の侵入が観察された。

これらの結果は、経皮適用した直径 100 nm 以下の NM が、体内に吸収された後に血液循環を介して全身に分布することを実証するものである。特に、これらの NM が血液-脳関門を突破して脳細胞内に侵入すること、細胞内のミトコンドリアや核といったオルガネラに侵入するという事実は世界初の知見である。これらの結果から、NM

のリスクを評価するに当たっては、適用部位である皮膚のみならず全身のあらゆる臓器を対象としたハザード評価が必要不可欠であることを示している。

##### 2. 血液凝固系に着目した nSP の急性毒性発現機構の解析

これまでに我々のグループでは、nSP70 をマウス尾静脈内より投与した際に、急性肝障害・致死毒性を誘発することを見出している。特に、これらのマウスにおいては肝臓や脾臓に顕著な鬱血を認めており、血液凝固系がかく乱される可能性が考えられる。これらの結果を踏まえて本検討では、主要な血中蛋白質の一つである血液凝固因子と nSP との相互作用に着目して、nSP70 によって誘発される急性致死毒性発現機構の解析を試みた。一般に、血液凝固経路には、傷害を受けた組織に発現する組織因子 (Tissue Factor : TF) を起点とする外因性凝固経路と、コラーゲンやガラスといった異物表面と XII 因子との相互作用や活性化血小板由来のリン脂質によって活性化される内因性凝固経路の二つが存在することが知られている。周知の通り、こういった血液凝固系は生体恒常性維持に必須の役割を果たす重要な生体システムであるが、一度破綻すると血栓性疾患や血友病のような様々な病態の発症に繋がる。特に、血液凝固系が全身のかつ持続的に活性化されることによって生ずる播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation : DIC) のような病態は微小血栓の多発や消費性血液凝固障害を呈し、短時間で死に至る重篤な病態に繋がるということが知られている。我々は、①nSP70 投与マウスにおいて、脾臓や肝臓のうっ血、組織からの出血症状などの血液凝固異常の所見が認められたこと、②nSP70 投与マウスが投与後短時間で死に至ること、さらに、③シリカがガラスと同様に血液凝固経路の活性化因子であること、等の情報を総合的に考察し、nSP のサイズ減少による比表面積の増大やその他の機能変化が血液凝固因子との相互作用を促進し、これが起点となっ

て DIC 様の症状が誘発されることが、nSP の粒子径依存的急性致死毒性に繋がったものと考えた。そこでまず、非晶質 nSP の急性致死毒性の発現における粒子サイズと血液凝固の関係を調べるために、抗凝固剤（ヘパリン）を前投与したマウスを用いて急性毒性試験を行った（図 2）。その結果、ヘパリンの前投与によって nSP70 誘発急性致死毒性が完全に阻害されることが明らかになった。続いて、nSP70 投与マウスを用いて典型的な DIC 症状である消費性凝固障害（血小板数減少、血液凝固遅延等）や血管透過性の亢進の有無を評価した（図 3, 4）。その結果、直径 300 nm 以上の nSP を投与したマウスにおいては消費性凝固障害が認められなかったのに対して、nSP70 投与マウスでは血中血小板数の著しい減少や血液凝固時間の有意な延長が認められた。さらに、エバンスブルーの血管外漏出を指標に nSP70 投与マウスの血管透過性を評価したところ、100 nm 以下の nSP を投与したマウスにおいてのみ、四肢・耳・鼻の劇的な青変が認められた。先述した通り、ガラスやコラーゲンと言った異物表面は、血液凝固第 XII 因子を活性化することが知られており、nSP70 の血中への侵入によって第 XII 因子を起点とする血液凝固カスケードの促進が生じた可能性が考えられた。そこでこの点を解析するために、各粒子径のシリカの精製ヒト第 XII 因子活性化能を評価した（図 5）。いずれのシリカを適用した場合においても第 XII 因子の活性化が認められたもの、その効果は nSP70 適用群において最も強かった。以上の結果は、nSP70 投与による急性致死毒性が DIC 様症状の誘発によるものであることを示唆すること、これらの現象が 100 nm 以下の nSP に特徴的なものであることが示している。現在、nSP の比表面積と血液凝固活性化との相関を調べると共に、nSP と血液凝固因子との結合性の解析を進めている。

続いて、血液凝固系の活性化と非晶質 nSP の表面物性との連関を追求した。まず、表面修飾 nSP の急性毒性ならびに APTT を評価した（図 6, 7）。

その結果、表面未修飾の nSP70 投与マウスは前年度までの結果と同様に投与後 12 時間以内に死亡した。その一方で、nSP70-C あるいは nSP70-N を投与したマウスにおいては急性致死毒性や APTT の延長が全く認められなかった。さらに、これらのマウスの PT や APTT を測定したところ、nSP70-C あるいは nSP70-N において血液凝固の活性化が緩和されることが明らかとなった。以上の結果から、nSP70 の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血液凝固系の活性化を緩和でき、それを反映して急性致死毒性をも回避できることが明らかとなった。表面修飾非晶質 nSP の急性致死毒性回避効果が、粒子表面と第 XII 因子との相互作用の低減によるものであると考え、各 nSP の第 XII 因子活性化能を解析した（図 8）。その結果、予想に反して、表面修飾の有無にかかわらず、第 XII 因子が同程度に活性化されることが明らかとなった。すなわち、表面修飾 nSP の急性致死毒性回避効果には、第 XII 因子との相互作用以外の要因が関与している可能性が考えられた。一般に、第 X 因子、プレカリクレイン、高分子キニノゲンといった第 XII 因子以外の血液凝固因子が異物表面との接触を介して活性化されることが知られている。今回は、第 XII 因子活性化能のみを対象として解析したが、今後はその他の凝固因子の活性化についても nSP の表面物性との関連を精査する必要があると思われる。また、研究分担者の角田・八木らが明らかにしているように、nSP70 の血中への侵入が急性肝組織障害を誘発することにも留意する必要があるだろう。傷害された組織からは、一般に組織因子（Tissue factor）と呼ばれる血液凝固因子が発現することが知られている。つまり、nSP70 によって傷害された肝組織の類洞血管表面に組織因子が発現した可能性が強く示唆されるため、これが起点となって血液凝固が促進されたものと考えられることもできる。現在、①粒子表面と血液凝固因子との接触、②組織障害等を起点とする血液凝固カスケードの活性化と急性毒性の発現との連関解析を進めており、これらの知見を有効活用することで、生体にとって有害な作用を及ぼさない安全かつ有効な非晶質 nSP の創製が実現するものと考え

ている。

### 3. 各種 nSP による急性肝障害のメカニズムの検討

各種 nSP 投与による肝障害のメカニズムを解明するために、肝非実質細胞であり異物貪食能をもつ肝クッパー細胞、及び肝臓内の有窓血管を形成する類洞内皮細胞の関与について検討した。シクロフォスファミド (CPA) は類洞内皮細胞の働きを抑える阻害剤として使用されている。そこで、nSP と CPA を併用投与した時の肝障害について検討した。図 9 に示すように、いずれの nSP を用いた場合でも CPA 併用によって有意に AST 及び ALT 活性が減少した。前年度に行った nSP70 における検討から、類洞内皮細胞が nSP による肝毒性に関与することが示されている。よって、表面修飾 nSP 及び粒子径 100nm の nSP における急性肝障害においても類洞内皮細胞が関与している可能性が示唆された。

続いてガドリニウムクロライド (GdCl) との併用による検討を行った。GdCl はクッパー細胞の働きを抑える阻害剤として使用されている。そこで、nSP と GdCl を併用投与した時の肝障害について検討した。図 10 に示すように、nSP70 及び nSP100 では GdCl との併用により AST 及び ALT 活性の上昇が観察された。一方、nSP70-N 及び nSP70-C では AST 及び ALT 活性の上昇が観察されなかった。昨年度の検討から、クッパー細胞が nSP70 を取り込むことが明らかとなっている。そのため、nSP100 も同様に取り込まれている可能性が考えられる。逆に、表面修飾体ではその取り込みが無くなった可能性が推察される。しかし、GdCl と各種 nSP の急性肝障害に関する詳細は不明であり、今後の検討が必要である。

### 4. 表面修飾 nSP 頻回投与における肝臓への影響

NM は急速な技術発展により、粒子表面を改質し、粒子の物性を様々に変化させることが可能となっている。そのため、表面を改質した NM が今後増加するものと考えられる。そこで、同一粒子径の NM の表面にアミノ基 (-NH<sub>2</sub>) やカルボキシル基 (-COOH) を修飾した nSP (nSP70-C、nSP70-N) を用いて、表面修飾 nSP の肝臓に対

する安全性評価を行った。昨年度の検討により、単回投与では表面修飾 nSP (nSP70-N 及び nSP70-C) は未修飾の nSP70 に比べ肝臓への障害性が低いことが明らかとなった。そこで今年度は表面修飾 nSP 頻回投与における肝臓への影響を検討した。表面修飾 nSP である nSP70-N 及び nSP70-C と未修飾 nSP である nSP70 とを頻回投与した後、肝障害の指標として AST、ALT 活性を測定した。AST 活性において、nSP70 はコントロールに比べ顕著な上昇が観察されたが、nSP70-N、nSP70-C は共にコントロール群と同程度の活性を示した (図 11A)。一方、ALT 活性は nSP70 に比べ低い活性を示したものの、nSP70-N 及び nSP70-C 共に高用量投与群において有意な上昇が観察された。(図 11B) また、腎障害を検討するため BUN の測定を行ったところ、いずれの群においても有意な差は観察されなかった。(図 11C) 次に、肝臓の線維化を検討するため、肝臓における HYP 含量の測定と AZAN 染色を行った。コントロール群と比較し nSP70 では顕著な HYP 値の上昇が観察されたが、nSP70-N、nSP70-C 低用量投与群では共にコントロールと同程度の値を示した。一方、高用量投与群では nSP70-C において HYP 値の有意な上昇が観察された (図 12A)。そこで、AZAN 染色を行い組織像から評価したところ、nSP70-C 高用量投与群においても肝線維化は観察されなかった (図 12E)。以上の結果から、表面修飾 nSP の頻回投与における肝障害性は単回投与における場合と同様に、未修飾 nSP よりも低いことが明らかとなった。また、障害性の強さは nSP70-C に比べ nSP70-N の方が低いことが分かった。従って、nSP の表面を適切に修飾することで、安全な nSP の利用・開発が可能になると考えられる。

### 5. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討 -1: 四塩化炭素による肝毒性に対する nSP の影響

四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) は、肝細胞のチトクロム P-450 により代謝され、トリクロロメチルラジカル (・CHCl<sub>3</sub>) となり肝毒性を発現する。このトリクロロメチルラジカルの化学反応が肝実質細胞に傷害を与え、肝傷害が誘導される。前年度まで

に  $\text{CCl}_4$  と nSP の併用投与により肝障害が相加的に上昇することを明らかにした。そこで、今年度は各種 nSP との併用投与が  $\text{CCl}_4$  による肝障害作用にどのような影響を及ぼすかを検討した。

AST 活性を検討した結果、nSP70 及び nSP70-C において  $\text{CCl}_4$  との併用により AST 活性が上昇することが確認された。これに対し、nSP70-N 及び nSP100 ではコントロール群と同程度の活性を示した (図 13A)。次に ALT 活性を検討した結果、nSP70-N を除き全ての nSP において  $\text{CCl}_4$  との併用により ALT 活性が上昇した。特に nSP70-C 及び nSP100 については大きく値が上昇した (図 13B)。今回の検討により、nSP70-N を除き、nSP と四塩化炭素による相乗的な肝障害の憎悪化が観察された。AST 及び ALT 活性上昇の詳細な原因は今後の検討課題であるが、nSP70 は nSP300 と比べ ROS 産生能が高いため  $\text{CCl}_4$  のラジカル誘導作用と協調的に働き急性肝障害を憎悪したと推察される。また、nSP 表面修飾の違いにより肝障害作用が異なることから、適切な修飾方法を選択することが安全性確保に重要であることが示された。

## 6. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討 -2 : パラコートによる肝毒性に対する nSP の影響

パラコートは、除草剤などの農薬として使用され、本邦においては中毒死者数が年間 200 人に上る。パラコートは細胞内でラジカルを発生し、酸化ストレスが生じる。酸化ストレス時の活性酸素が肝実質細胞に対し、細胞傷害を示す。前年度までに、nSP との併用投与で肝障害が相加的に上昇することが明らかとなっている。そこで、今年度は各種 nSP との併用による肝臓への影響を検討した。図 14 に示すように、多くの nSP 粒子においてパラコートとの併用により AST・ALT 活性が有意に上昇した。この結果から、表面修飾に関わらず、nSP と薬剤との併用時には肝障害が上昇することが示唆された。

## 7. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討 -3 : シスプラチンによる肝毒性に対する nSP70-C、nSP70-N、nSP100 の影響

シスプラチンは、DNA に結合し細胞周期を休止

状態に導く作用を持つ抗癌剤として臨床で用いられており、精巣癌、卵巣癌、子宮癌、肺癌等幅広い適応を持つ。しかし、シスプラチンは ROS と関連し、神経障害などの副作用があり、また肝障害作用として ALT 及び AST 活性が上昇することが報告されている。前年度までに報告したように、抗がん剤として使用されているシスプラチンは、nSP との併用投与により強い毒性を示すことが分かっている。そこで今年度は、シスプラチンと各種 nSP との併用時における肝臓への影響を検討した。図 15 に示すように、nSP70-N ではシスプラチン単独投与と同様な AST 及び ALT 活性を示したが、nSP70-C、nSP100 では AST 及び ALT 活性が著しく上昇した。しかし、nSP70 ではこの用量で AST 活性が 4000 程度まで上昇しているのに対し、nSP70-C、nSP100 では 1500 程度と半分以下であるため、相乗効果の程度は nSP 粒子自体の傷害性の違いに依存するものと推察される。

## 8. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討 -4 : アセトアミノフェンによる肝毒性に対する nSP の影響

アセトアミノフェンは解熱鎮痛剤として広く使用されている薬剤である。そこで、nSP がアセトアミノフェンによる肝臓への毒性に影響を及ぼすかを検討した。図 16 に示すように、これまでに検討を行った薬物とは異なり、アセトアミノフェンでは nSP70・nSP100 において相乗効果が観察されたのに対し、nSP70-N・nSP70-C では相乗効果が観察されなかった。詳細な原因については検討課題であるが、表面修飾 nSP と未修飾 nSP では、アセトアミノフェンに関連する代謝経路が異なっているため今回のような結果になった可能性が想定される。また、nSP の表面を適切に修飾することで、安全な nSP の利用が可能となると考えられる。

## 9. 様々な粒子径のシリカが有する起炎性の解析

約 30 nm - 1000 nm の粒子径の異なるシリカを用いることで、シリカの粒子径とマクロファージに対する起炎性との関連を解析した (図 17)。



各シリカを THP-1 細胞へと添加した際の、サイトカイン・ケモカイン産生誘導能を評価した (図 17A)。その結果、IL-1 $\beta$ に関しては、mSP1000 が 300 nm 以下のシリカと比較して高い産生誘導能を示すことが判明した。一方で、nSP30、nSP70 作用群においては、従来型シリカである nSP300、mSP1000 作用群では全く観察されなかったケモカイン IP-10 の産生が有意に亢進していた。すなわち、シリカは粒子サイズに応じて全く異なる機序で起炎性を示す可能性が見出された。次に、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用い、各シリカの TNF $\alpha$ 産生誘導能を解析した (図 17B)。その結果、RAW264.7 細胞においては、従来型シリカの nSP300、mSP1000 作用群では TNF $\alpha$ 産生の亢進は全く認められなかったのに対し、nSP を作用させた場合、有意な TNF $\alpha$ 産生が認められた。一方で、THP-1 細胞において観察された IL-1 $\beta$ 、IP-10 の産生は全く観察されなかった。同様の結果が、マウスマクロファージ細胞株である J774.1 細胞でも認められている (data not shown)。以上の結果より、シリカは、粒子径に応じて異なる機序・レベルで起炎性を示す可能性が示されると共に、ヒト、マウスマクロファージに対して異なるサイトカイン産生パターンを誘導することが示唆された。

次に、シリカによる TNF $\alpha$ の産生誘導メカニズムを RAW264.7 細胞を用いて解析した。細胞が外部からのストレスやサイトカイン刺激を受けると、MAPK ファミリーである p38、JNK 及び ERK1/2 がリン酸化を受けて活性化し、炎症応答や細胞分化、細胞死等、多様な細胞応答に関わるシグナルを伝達することが知られている。そこで、RAW264.7 細胞に各粒子径のシリカを作用させた際のリン酸化 MAPK を Western Blot 法により半定量的に評価することで、MAPK 活性化を評価した (図 18)。その結果、従来型シリカである nSP300、mSP1000 作用群の各 MAPK は、未処理群と比較してほとんどリン酸化体のバンド強度に変化が認められず、活性化されていないこと

が示された。一方で、nSP30、nSP70 作用群では、いずれの MAPK においても顕著にリン酸化体が増加しており、nSP を作用させたことにより MAPK が活性化されることが判明した。以上の結果より、nSP は各 MAPK の活性化を介して TNF $\alpha$  の産生を誘導している可能性が考えられた。

そこで、各 MAPK 阻害剤存在下で、各粒子径のシリカを RAW264.7 細胞に添加し、TNF $\alpha$ の産生量を ELISA により評価した (図 19)。その結果、シリカ単独で作用させた場合、nSP30、nSP70 作用群で有意な TNF $\alpha$ の産生上昇が認められたのに対し、p38 阻害剤 (SB203580)、JNK 阻害剤 (SP600125) 及び ERK1/2 阻害剤 (U0126) いずれの作用条件下においても、nSP による TNF $\alpha$ の産生は未処理群と同程度にまで抑制された。本結果より、nSP は、p38、JNK、ERK1/2 全ての活性化を介して TNF $\alpha$ の産生を誘導することが明らかとなった。なお、JNK 及び ERK1/2 の阻害条件下で nSP300、mSP1000 作用群の TNF $\alpha$ の産生量が抑制されているが、未処理群においても同様に抑制されていることから、恒常的な TNF $\alpha$ の産生が抑制されたものと考えられる。更に、シリカによる MAPK の活性化と細胞傷害性との連関について阻害剤を用いて検討した (図 20)。その結果、シリカによる細胞傷害性は、JNK 及び ERK1/2 阻害条件において変化が認められなかったのに対し、p38 阻害条件では nSP30、nSP70 作用群で認められた細胞傷害性が有意に低減した。従って、nSP による細胞傷害性には、p38 の活性化が重要であることが示された。以上の結果より、nSP は p38、JNK、ERK1/2 を介して TNF $\alpha$  産生を、p38 を介して細胞傷害性を誘導することが明らかとなった。

## 10. 表面特性の異なる nSP の起炎性評価

近年、表面修飾を施した nSP も、化粧品・食品分野を中心に流通し始めている。従って、表面修飾を施した nSP が、細胞・生体に与える影響について検討する必要がある。そこで、nSP70-C を用いて、表面修飾と起炎性との連関について評価

した。まず、THP-1 細胞に nSP70、nSP70-C をそれぞれ添加し、IP-10 の産生量を評価した (図 21A)。その結果、nSP70 は IP-10 の産生を有意に亢進した一方で、nSP70-C 作用群では IP-10 の産生はほとんど認められなかった。さらに、RAW264.7 細胞に対する TNF $\alpha$ 産生誘導能を同様に評価した結果、nSP70-C 作用群においては、nSP70 作用群で認められた TNF $\alpha$ 産生が、ほとんど観察されなかった (図 21B)。すなわち、官能基による表面修飾が、その起炎性を大きく低減し、免疫毒性の低い安全な nSP を創製可能であることが示唆された。

これまで明らかとしたように、nSP70 は p38、JNK、ERK1/2 全ての MAPK を活性化することで TNF $\alpha$ の産生を誘導する。そこで、nSP70-C が MAPK 活性化に及ぼす影響を評価した (図 22)。RAW264.7 細胞に nSP70 及び nSP70-C を作用させ、リン酸化 MAPK を Western Blot 法により半定量的に評価した。その結果、nSP70 作用群では p38、JNK 及び ERK1/2 いずれの MAPK もリン酸化され活性化されていたのに対して、nSP70-C 作用群では p38、JNK のリン酸化はほとんど認められなかった。一方で、ERK1/2 のリン酸化レベルについては、nSP70 作用群と比較して抑えられているものの、依然としてリン酸化が認められた。従って、nSP70 はカルボキシル基修飾によって、p38、JNK の活性化が強く抑えられた結果、TNF $\alpha$ の産生が大幅に減弱した可能性が示された。

そこで、各 nSP70 の、*in vivo* における起炎性を評価した (図 23)。nSP70、nSP70-C を BALB/c マウス腹腔内へと投与し、24 時間後の腹腔内における総細胞数を評価した。その結果、nSP70-C 投与群においては、nSP70 投与群で認められた顕著な細胞浸潤が、ほぼ完全に抑制されることが判明した。さらに、投与 2 時間後における腹腔内のサイトカイン産生パターンを解析した結果、nSP70-C 投与群においては、nSP70 投与群で認められた全てのサイトカイン・ケモカイン産生の

亢進が、ほぼ完全に消失することが判明した。すなわち、nSP70-C は、nSP70 と比較して細胞浸潤、サイトカイン産生のいずれの観点からも、起炎性が劇的に低減されていることが確認された。以上の結果より、官能基による nSP の表面修飾は、その起炎性を低減し得ることが示された。

#### 11. 妊娠マウスにおける nSP の体内動態追跡

当研究室ではこれまでに、皮膚に塗布した非晶質 nSP が、角質層を通過し、表皮層にまで到達するとともに、全身血流にまで移行することを明らかにしている。そこで、非晶質 nSP が血中に侵入後の妊娠マウスにおける体内動態を評価した。蛍光修飾された各粒子径の非晶質シリカを、胎盤が形成され安定期に入った妊娠 16 日目のマウスに尾静脈内投与し、*in vivo* imaging により体内動態を観察した (図 24)。その結果、すべての粒子において、肝臓で強い蛍光が観察され、肝臓への集積が認められた。一方で、nSP70 においてのみ、未処理群と比較して胎盤で強い蛍光が観察され、nSP70 は胎盤にまで移行することが示唆された。

次に、より詳細な体内動態を解析するため、TEM を用いてシリカの局在を評価した。*in vivo* imaging と同様に非晶質 nSP を妊娠後期のマウスに尾静脈内投与し、出生直前に帝王切開により胎盤と胎子を回収し、胎盤への移行を観察した (図 25)。その結果、nSP300 や mSP1000 は胎盤細胞への移行が認められなかったのに対して、nSP70 投与群においてのみ、胎盤の栄養膜層や迷宮層部分において黒いドット状の nSP70 が確認された。また、幾つかの粒子が集団で凝集して存在する様子も観察された。胎盤は胎子の発育に重要な役割を担う組織であるため、nSP70 が胎盤へと移行することにより、胎子へ影響が及ぶ可能性が示唆された。

さらに、非晶質シリカが胎盤を通過し、胎子へも移行するかを検討するために、胎子の脳と肝臓組織を TEM により観察した (Fig. 2)。その結果、nSP300 や mSP1000 は胎子への移行が観察されなかった一方で、胎子の脳や肝臓において nSP70

が観察された。このことより、nSP70 は血液胎盤関門を通過し、胎仔にまで移行することが示唆された。一般に血液胎盤関門は分子量 1000 以上の物質を受動的に通過させないため、nSP70 の胎仔への移行には何らかの能動的な機構が関与していると考えられる。今後は、血中から胎盤や胎仔に移行する nSP70 の量を定量的に測定するとともに、移行した nSP70 の蓄積量・期間を詳細に検討する必要がある。

ヒトとマウスは非常に類似した胎盤構造を形成している。妊娠後期の胎盤では、母体側にある脱落膜層へと子宮筋層から母体血管が進出し、母体血管から胎盤の栄養膜層へ血液が流入する。流入した血液は迷宮層に移行し、胎児側から伸びる索状の臍帯血管網を通じて栄養と老廃物を交換する。これら一連の流れにより、母体と胎児の血液は入り混じることなく、胎児は母体と物質交換をする。この胎盤の恒常性が崩壊し、胎盤機能が低下した場合、胎児は子宮内胎児発育遅延 (IUGR) や胎生致死といった深刻な影響を受けることが知られている。これまでの検討と同様に、妊娠後期のマウスに nSP70 を投与し、出産後、新生仔の飼育・観察を続けた。本検討では、母親の育仔能力や母乳からの nSP の影響を除外するために、里親として広く使用されている ICR マウスを里親として使用した。出産時における新生仔の体重を測定したところ (図 26)、nSP70 投与群で、コントロール群と比較して新生児体重の著しい低下が観察された。出生後は、コントロール群と nSP70 投与群は同等の体重増加を示し、6 週齢の時点ではほぼ同じ体重であった。一方で、6 週齢時に血球数を比較した結果 (図 27)、コントロール群と nSP70 投与群で赤血球数、血小板量に顕著な変化が認められなかったのに対して、白血球数や顆粒球数が nSP70 投与群で顕著に増加していた。以上の結果から、母体に非晶質 nSP を投与することで、IUGR が誘発されるだけでなく、出生後の免疫機能にも影響を及ぼし、アトピーや花粉症といったアレルギー性疾患の発症に関与

する可能性が示唆された。今後は、糖尿病や、肥満といったメタボリックシンドロームとの関連を調査する必要があると考えられる。

## 12. ROS 産生に着目した非晶質 nSP の DNA 傷害誘発メカニズムの解明

8-OHdG は遺伝子 DNA 中のグアニン塩基が活性酸素種 (ROS) の作用により酸化損傷を受けることによって生成されることが知られており、ROS による DNA 損傷のバイオマーカーとして知られている。そこでまず、nSP の DNA 酸化修飾誘発能を検討する目的で、nSP70, nSP300, mSP1000 を HaCaT に様々な濃度で作用させ、8-OHdG の定量を行った。その結果、コメットアッセイと同様に、nSP70 添加群のみにおいて 8-OHdG 含量が PBS 添加群と比べて有意に増加していることが示された (図 28)。これらの結果より、非晶質 nSP は従来型シリカとは異なる変異原性や DNA 酸化修飾の発現を誘導することが明らかとなった。つまり、100 nm 以下の新素材である非晶質 nSP は、従来までのサブミクロンサイズ以上のシリカとは異なる細胞内局在-安全性を示すことが明らかとなった。

そこで次に、非晶質 nSP の安全性確保を目指して、ROS 産生の観点から HaCaT 細胞の DNA 損傷の発現メカニズムの解明を試みた。まず、HaCaT 細胞を用いて非晶質シリカ処理による ROS 産生の有無を検証した。nSP70, nSP300, mSP1000 を HaCaT 細胞に添加して 3 時間後の細胞内における ROS 量を DCFH-DA の蛍光量を指標に測定した。その結果、すべてのサイズの非晶質シリカを添加した群において ROS の産生が認められたが、特に nSP70 添加群において最も顕著な ROS 産生が認められた (図 29)。更に、蛍光プローブである HPF78 を用いて、ROS の中でも特に反応性の高い次亜塩素酸とヒドロキシラジカルの産生を解析したところ、先ほどの結果と同様に、nSP70 添加群において最も顕著なラジカルの産生が認められた (図 30)。ラジカルの中でも DNA と相互作用を起こすのは、このような

反応性の高い ROS のみであることが知られており、nSP70 による DNA 損傷発現に ROS が関与していることが強く示唆された。そこで、nSP70 による ROS 産生と DNA 損傷発現メカニズムとの関連について精査するために、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) 存在下における nSP70 の ROS 産生能を評価した。NAC を前処理した HaCaT 細胞に対して、30 分後に nSP70 を添加した。粒子添加 3 時間後に ROS 産生量を定量したところ、NAC を前処理した群では、PBS 添加群と同等の値にまで Tail Length の値の減少が認められた (図 31)。抗酸化剤共存下で nSP70 依存的 DNA 損傷作用の抑制が認められたことから、nSP70 による DNA 損傷が ROS を介して生ずることが裏付けられた。これまでも、フラーレンを用いた検討により ROS が細胞傷害性に関与する例や、酸化チタンが産生する ROS が p53 発現を誘導し最終的に DNA 損傷に関与する例が報告されており、これらの結果からも、nSP70 による DNA 損傷発現メカニズムには ROS が強く関与していることが示唆された。すなわち、nSP70 の ROS 産生や細胞内局在を制御することで、NanoTox を誘導しない安全な NM の創製が実現するものと考えられた。

### 13. カーボンナノチューブおよびフラーレンの 21/28 日反復経皮投与毒性試験

OECD スポンサーシッププログラムへの対応に向けてカーボンナノチューブ (CNT) とフラーレン (C60) の反復投与経皮毒性試験を実施した。ラット (各群雄 5 匹) に各サンプルを 28 日間経皮塗布した結果、いずれの群においても体重測定や死亡率評価、剖検時の肉眼的検査 (ドレイズ試験) において、顕著な影響は見られなかった (図 32 及び表 1)。投与部位の病理学的検査においても、サンプル投与による影響は認められなかった (データは示さず)。さらに、各動物から回収した血液を用いて、各種血液検査を実施した。血液学的検査及び血液生化学的検査の結果、MWCNT あるいは SWCNT を塗布した群のクレアチニン

値、総ビリルビン値、カリウム量、塩化物イオン量、FL を作用させた総ビリルビン値、カリウム量、塩化物イオン量、において統計学的な有意差が散発的に認められた (図 33、34、35)。この変化が、被験物質投与に関連した生物学的意義のある変化か否かは、他国のグループによって提出される検査結果と重ね合わせて総合的に判断し、必要であれば被験物質の濃度依存性を検定する必要がある。以上、CNT やフラーレンに関して、これらの素材が適切に使用される場合、安全性に懸念がないと考えられるものの、血液検査の結果に関しては他国の検査結果と共に総合的に判断し、ADI を特定する必要性について慎重に議論する必要があると評価した。

### 14. NanoTox 解析の新技術

これまでに我々は、透過型電子顕微鏡を用いて nSP の体内動態追跡を進めている。電顕解析においては、形状やサイズを指標に nSP の局在を解析することが可能であるが、生体中に存在する微粒子 (カルシウムなど) や染色によって生ずる不純物としての微粒子との区別が付きにくいなどの課題を抱えている。そこで筆者らは、X線元素分析装置付き電子顕微鏡 (EDX-TEM) を用いて、生体中 nSP の同定を試みた。本装置を用いることで、nSP 由来のケイ素原子シグナルを検出することが可能であり、視覚的な局在観察と同時に nSP の同定を実施できる。nSP70 を静脈内投与したマウスの肝臓を用いて EDX-TEM 解析を実施した (図 36)。その結果、肝臓中の組織切片中に認められた黒いドットからケイ素由来のシグナルを検出することが出来た。この結果から、静脈内投与した nSP70 が確かに肝臓中に到達することが裏付けられた。以上、X線分析装置を併用することで nSP、ひいては NM の生体内細胞内局在を極めて詳細に追跡できる基盤技術の確立に成功した。

一方で、EDX-TEM を解析では、NM の生体内動態を定量的に解析する事は不可能である。NM の曝露量や体内吸収量、閾値、無作用量などを算