

出するに当たっては、NM の定量解析法の開発が必要不可欠である。そこで本年度は、NM の定量解析法の確立を目指して、ICP-AES の有用性を検証した。ICP-AES は ICP によってサンプルを原子化・熱励起し、これが基底状態に戻る際の発光スペクトルから元素の同定・定量を行う方法である。特定の原子から発するスペクトルから目的原子の定量解析が可能であるため、NM の定量解析にも応用できるものと考えられた。本年度は、nSP70 を静脈内投与したマウスの肝臓を用いて予備検討を実施した (図 37)。その結果、投与した nSP70 の内 90%以上が肝臓に到達することが明らかとなった。また、本手法は検出感度の改善が必要であるものと考えられた。現在、本手法を適用して曝露量や体内吸収量の解析を進めると共に、検出感度の改善を進めている。

これら X 線元素分析法の感度向上方法として、X 線強度の増強が有力である。X 線強度を増強することによって、必然的に目的元素由来のシグナルが強くなるため、検出感度を向上出来るものと予想される。そこで、本年度は世界最高峰の放射光施設である SPring-8 の光源を利用した走査型 X 線顕微鏡解析を実施し、検出感度の増強が可能か否かを検証した。本検討では、酸化チタンを静脈内投与したマウスの肺および肝臓を使用した。これらのマウスの肺では酸化チタンの存在を位相差顕微鏡にて視覚的に確認出来る一方で、肝臓では確認することは出来ない。まず、酸化チタンを視認できる肺の走査型 X 線顕微鏡解析を実施したところ、位相差顕微鏡で黒い影として見えた物質が、確かに酸化チタンであることが確認出来た。また、酸化チタンの存在を視認できない肝臓を解析したところ、予想に反して所々に酸化チタン由来のシグナルが検出された。これらの結果は、走査型 X 線顕微鏡を適用することで酸化チタンの生体内局在をより高感度に解析できることを示唆している。現在、SPring-8 の放射光を利用した、NM の定量解析法の確立を進めている。

E. 結論

以上、本研究では直径 100 nm 以下の nSP が、

- 1) 活性酸素種の産生を増強し、これが一因で DNA 損傷作用を発揮する
- 2) 血中に移行した際に播種性血管内凝固症候群 (DIC) を誘発し得る
- 3) nSP が薬物との併用毒性を示し得る
- 4) 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
- 5) 母胎を介して胎子に曝露し、その新生仔は成長後に免疫機能不全となり得る

など、世界に先駆けて様々なハザードになり得ることを見出した。さらに、

- 6) nSP 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

を見出し、表面性状を適切に制御することによって有用機能のみを保持した安全な NM の設計が可能になることを見出した。また、

- 7) 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。

これらの結果は、非晶質 nSP を経皮的に使用する NM 利用製品に関しては、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 ADI や NOEL 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 NM に関しても、物性情報と体内/細胞内動態特性、ハザードとの関連を詳細に把握し、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-ハザード関連解析を基盤として、NMの社会受容の促進やNM産業の発展支援が実現することを期待している。

F. 健康危険情報

該当なし

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. : Silica nanoparticles as hepatotoxicants., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72(3):496-501, 2009.
2. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. : Influence of 70-nm silica particles in mice with cisplatin or paraquat-induced toxicity., *Pharmazie*, 64(6):395-7, 2009.
3. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. : Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72(3):626-9, 2009.
4. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells., *Pharmazie*, in press.
5. Morishige T., Yoshioka Y., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Titanium dioxide induces different levels of IL-1beta production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
6. Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties., *Pharmazie*, in press.
7. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Morishita Y., Yoshida T., Fujimura M., Kayamuro H., Nabeshi H., Yamashita T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Kawai Y., Mayumi T., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape., *Inflammation*, in press.
8. Yoshida T., Yoshioka Y., Fujimura M., Kayamuro H., Yamashita K., Higashisaka K., Nakanishi R., Morishita Y., Nabeshi H., Yamashita T., Muroi M., Tanamoto K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Yoshikawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Urban aerosol induce pro-inflammatory cytokine production in macrophages and cause airway inflammation in vivo., *Biol. Pharm. Bull.*, in press.

【総説・その他】

1. 吉川友章, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央:化

粧品ナノマテリアルの安全性評価の現状と技術的課題～安全なナノマテリアルの開発支援に向けて～., コスメティックステージ, Vol.4(4), 44-48, 2010.

2. Nabeshi H., Yoshikawa T., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of Biological Influence of Nano-materials using Toxicokinetics and Toxicoproteomics., Yakugaku Zasshi, in press.
3. 吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノ粒子の細胞内取り込みと経皮浸透., ナノ材料のリスク評価と安全性対策, フロンティア出版, in press.

② 学会発表

【シンポジウム等: 合計 7 件】

1. 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けた NanoTox 研究の最前線 (Overview) ., 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
 2. 角田慎一: ナノマテリアルの経皮吸収性・体内動態と急性毒性・肝毒性., 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
 3. 吉川友章: ナノマテリアルの相互作用解析と急性毒性・肝毒性機構の追求., 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
 4. 阿部康弘: ナノマテリアルの細胞内動態と遺伝毒性., 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
 5. 吉岡靖雄: ナノマテリアルの動態特性と免疫毒性., 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
 6. 長野一也: ナノマテリアルの動態特性と生殖発生毒性., 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
 7. 吉岡靖雄: ナノマテリアルの安全確保に向けた NanoTox 研究の最前線 (総括) ., 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
- 【国内学会発表: 合計 22 件】**
1. 鍋師裕美, 吉川友章, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 食品添加物としてのナノシリカの物性と生体影響の連関解析., 日本食品衛生学会第 97 回学術講演会, 中央区 (東京), 2009 年 5 月.
 2. 松山恵吾, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 化粧品素材としての非結晶性ナノシリカの皮膚細胞に対する遺伝毒性評価と安全確保に向けて., 第 34 回日本化粧品学会, 港区 (東京), 2009 年 6 月.
 3. 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 萱室裕之, 吉田徳幸, 阿部康弘, 吉川友章, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 非結晶性ナノシリカの生殖発生毒性に関する検討., 日本先天異常学会第 49 回学術集会, 鹿児島 (鹿児島), 2009 年 6 月.
 4. 鍋師裕美, 吉川友章, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 今澤孝喜, 吉岡靖雄, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: ナノシリカの in vitro 安全性評価における血清蛋白質の作用の解析., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手), 2009 年 7 月.
 5. 松山恵吾, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 非結晶性ナノシリカの皮膚細胞に対する遺伝毒性作用., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手), 2009 年 7 月.
 6. 仲里泰太郎, 吉川友章, 鍋師裕美, 松山恵吾, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 非結晶性ナノシリカの表面物性と有害性発現との連関評価., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手), 2009 年 7 月.

7. 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 萱室裕之, 吉田徳幸, 阿部康弘, 吉川友章, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 非結晶性ナノシリカの生殖発生毒性に関する検討., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手), 2009 年 7 月.
8. 吉田徳幸, 吉岡靖雄, 中西亮介, 山下浩平, 東阪和馬, 萱室裕之, 阿部康弘, 吉川友章, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 都市大気粉塵のアレルギー疾患誘発メカニズムの解析., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手), 2009 年 7 月.
9. 東阪和馬, 吉岡靖雄, 山下浩平, 萱室裕之, 吉田徳幸, 阿部康弘, 吉川友章, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: カーボンナノチューブの発癌リスクに関する基礎的検討., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手), 2009 年 7 月.
10. 今澤孝喜, 有森亮裕, 磯部将彰, 鍋師裕美, 物部容子, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルのマウスにおける細胞内局在性に関する研究., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手), 2009 年 7 月.
11. 角田慎一, 吉川友章, 鍋師裕美, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-1 ナノマテリアルの経皮吸収性・体内動態と急性毒性・肝毒性., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
12. 吉川友章, 鍋師裕美, 平井敏郎, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 角田慎一, 近藤昌夫, 八木清仁, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-2 ナノマテリアルの相互作用解析と急性毒性・肝毒性機構の追求., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
13. 阿部康弘, 吉川友章, 鍋師裕美, 松山恵吾, 近藤小百合, 長野一也, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-3 ナノマテリアルの細胞内動態と遺伝毒性., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
14. 吉岡靖雄, 森重智弘, 吉田徳幸, 稲倉 裕, 藤村真穂, 鍋師裕美, 阿部康弘, 長野一也, 吉川友章, 今澤孝喜, 角田慎一, 向 洋平, 岡田直貴, 堤 康央, 中川晋作: ナノマテリアルの安全確保に向けて-4 ナノマテリアルの動態特性と免疫毒性., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
15. 長野一也, 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 森下裕貴, 鍋師裕美, 阿部康弘, 吉川友章, 角田慎一, 齊藤 滋, 河合裕一, 眞弓忠範, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-5 ナノマテリアルの動態特性と生殖発生毒性., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
16. 鍋師裕美, 吉川友章, 仲里泰太郎, 栃木彩恵子, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-6 表面修飾ナノシリカの安全性評価と安全なナノマテリアルの開発支援., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
17. 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 栃木彩恵子, 近藤小百合, 平井敏郎, 伊藤徳夫, 堤 康央: 薬学領域におけるナノマテリアルの安全性確保研究 ~ナノマテリアルの体内相互作用解析と安全性との連関追求~, 第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 東大阪 (大阪), 2009 年 10 月.
18. Yoshida T., Yoshioka Y., Kayamuro H., Yamashita K., Higashisaka K., Fujimura M., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Urban aerosol directly

stimulates antigen presentation cells in vitro and cause airway inflammation in vivo., 第39回 日本免疫学会学術集会, 大阪 (大阪), 2009年12月.

19. 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 森下裕貴, 吉田徳幸, 藤村真穂, 鍋師裕美, 長野一也, 阿部康弘, 吉川友章, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 眞弓忠範, 角田慎一, 堤 康央: 安全確保に向けた非晶質ナノシリカの生殖発生毒性に関する検討., ファーマバイオフォーラム 2009, 名古屋 (愛知), 2009年11月.
20. 李 相儒, 渡利彰浩, 近藤昌夫, 堤 康央, 八木清仁: ナノシリカ粒子と薬物との併用によるナノマテリアルの安全性評価., 日本薬学会 第130年会, 岡山 (岡山), 2010年3月
21. 平井敏郎, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 栃木彩恵子, 近藤小百合, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 樹状細胞を標的としたナノシリカの経皮安全性評価., 日本薬学会 第130年会, 岡山 (岡山), 2010年3月.
22. 栃木彩恵子, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 平井敏郎, 近藤小百合, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 血液凝固系に着目した非晶質ナノシリカの安全性評価., 日本薬学会 第130年会, 岡山 (岡山), 2010年3月.

【国際学会発表: 合計9件】

1. Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : In vitro nanotoxicological study of silica nanoparticles using dermal cell lines., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
2. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
3. Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent intracellular distribution and genotoxicity of amorphous nanosilicas in human keratinocytes., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
4. Nakazato Y., Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Differential acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas: The role of surface physicochemical properties., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
5. Yoshida T., Yoshioka Y., Kayamuro H., Yamashita K., Higashisaka K., Nakanishi R., Abe Y., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Urban aerosol directly stimulates antigen presentation cells in vitro and cause airway inflammation in vivo., The

46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.

6. Yoshioka Y., Morishige T., Tanabe A., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Nanosilicas with different sizes and surface charges induce different profiles of cytokine production on macrophages., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
7. Yagi K., Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Hepatotoxicity of silica nanoparticles in mice., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
8. Yamashita K., Yoshioka Y., Kayamuro H., Yoshida T., Higashisaka K., Abe Y., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Cancer hazard of carbon nanotubes: size/shape-dependent induction of DNA damage and inflammation., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon (Portugal), 18-21 October, 2009.
9. Yoshioka Y., Morishige T., Inakura H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Inflammatory responses of titanium dioxide with different size and properties., 49th Annual Meeting & ToxExpo (SOT2010), Salt Lake City, (USA), 7-10 March, 2010.

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、橋野のぶよ、物部容子、向洋平、森重智弘、渡辺光、松尾一彦、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、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、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

H. 知的財産権の出願・登録状況

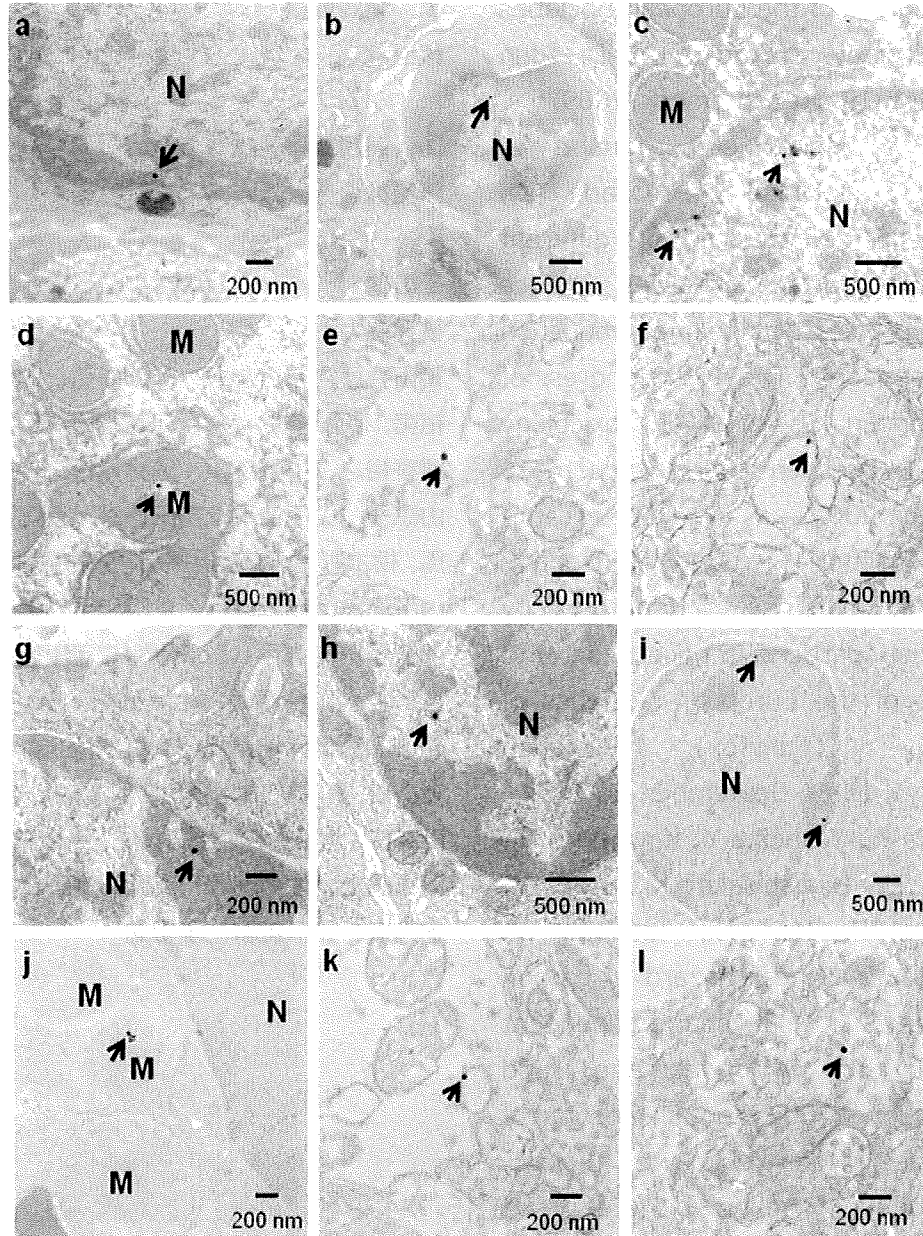


図 1. ナノマテリアルの経皮吸収性の評価

蒸留水で 7×10^{13} 個/ml に調製した nSP70 あるいは QD をそれぞれ 10 μ l ずつ左右の耳介に 1 日 1 回塗布した。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)。最終投与 24 時間後に適用部位の皮膚、所属リンパ節 (頸部リンパ節)、肝臓、脳を回収し、電子顕微鏡観察により nSP70 ならびに QD の局在を評価した。尚、QD の局在は銀染色により増感した後に解析した。

- a, nSP70 を塗布した皮膚 (核内に侵入)
- b, nSP70 塗布マウスの頸部リンパ節
- c, nSP70 塗布マウスの肝臓-1 (肝実質細胞に侵入)
- d, nSP70 塗布マウスの肝臓-2 (肝実質細胞内のミトコンドリアに侵入)
- e, nSP70 塗布マウスの脳-1 (大脳皮質のグリア細胞および神経網内に侵入)
- f, nSP70 塗布マウスの脳-2 (海馬の神経網、前シナプスおよび後シナプス内に侵入)
- g, QD を塗布した皮膚 (核内に侵入)
- h, QD 塗布マウスの頸部リンパ節 (肝実質細胞に侵入)
- i, QD 塗布マウスの肝臓-1 (肝実質細胞に侵入)
- j, QD 塗布マウスの肝臓-2 (肝実質細胞内のミトコンドリアに侵入)
- k, QD 塗布マウスの脳-1 (大脳皮質内に侵入)
- l, QD 塗布マウスの脳-2 (海馬内に侵入)

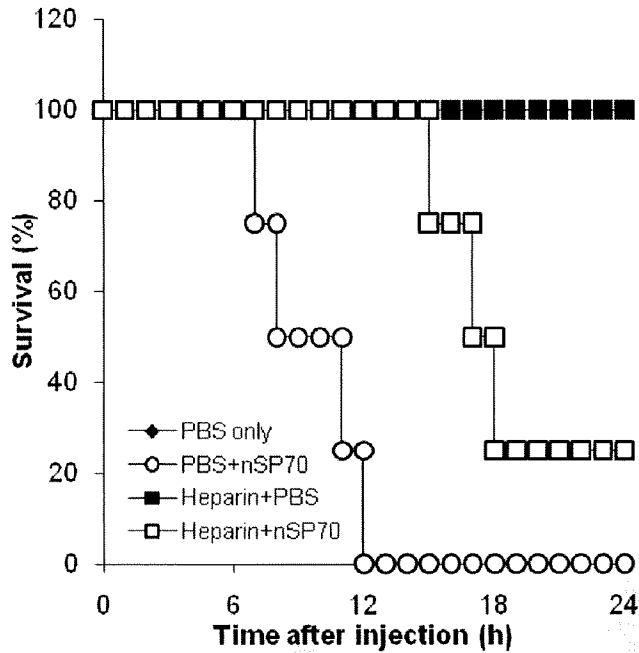


図 2. 抗凝固剤ヘパリン前投与マウスを用いた生存率の評価

BALB/c マウスに 100 IU/匹のヘパリン溶液あるいは PBS を尾静脈内より投与し、2 分後に nSP70 (2 mg/匹) を尾静脈内投与した際の生存率を経時的に 24 時間まで評価した。

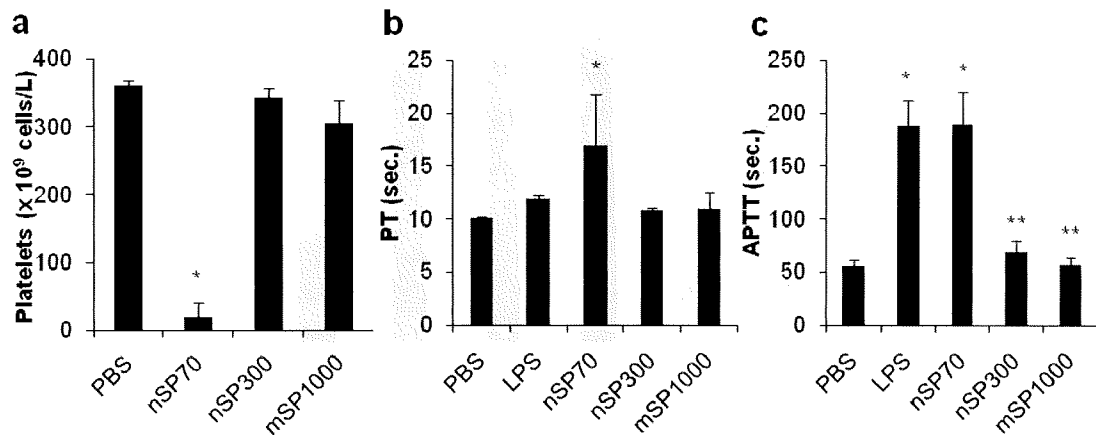


図 3. ナノシリカ投与マウスの血液凝固検査

各粒子サイズのシリカを 2 mg/匹で尾静脈内投与し、5 時間後に血液を回収した。全血の一部を用いて血小板数を計測した(a)。残りの血液を 1750 × g、15 分間、遠心分離して得られた血漿を用いてプロトロンビン時間 (PT, b) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT, c) を測定した。*P<0.01 vs PBS, **P<0.01 vs nSP70 (Bonferroni)

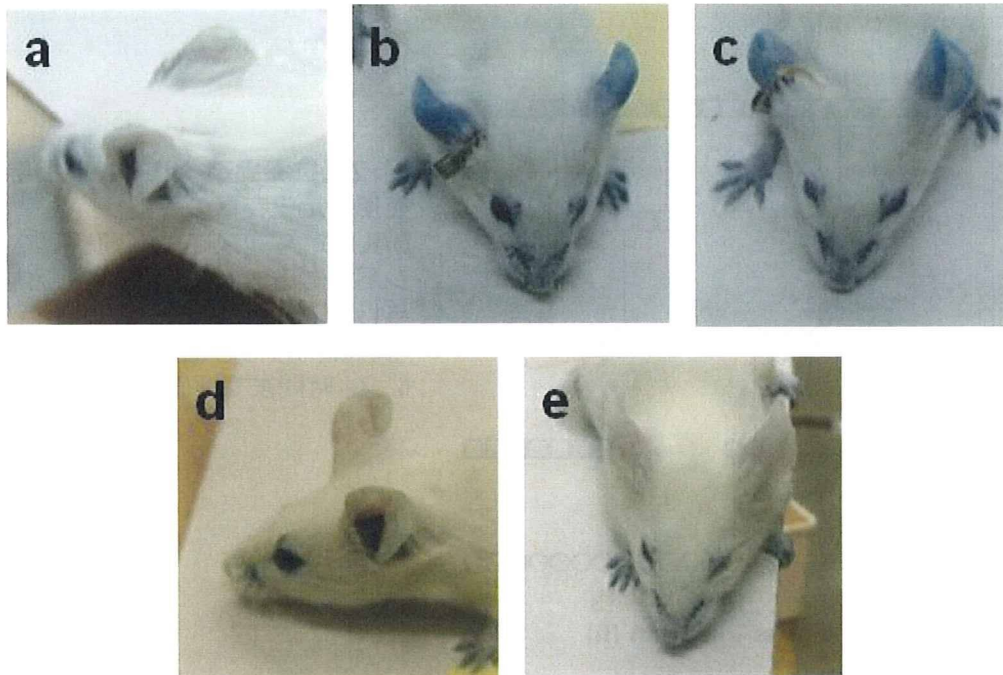


図 4. ナノシリカ投与マウスの血管透過性試験

BALB/c マウスに PBS (a) あるいは、nSP70 (b)、nSP100 (c)、nSP300 (d)、mSP1000 (e) をそれぞれ 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 μ 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。

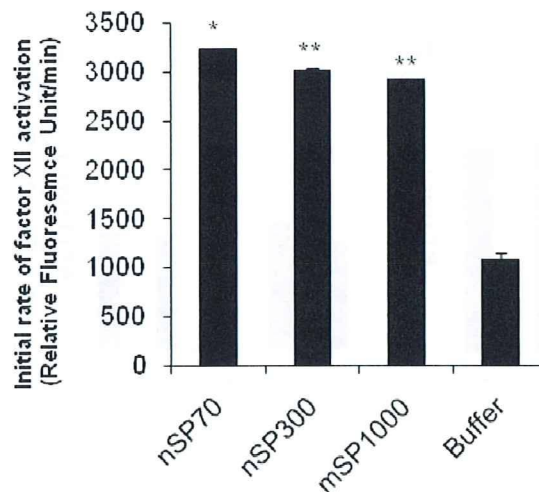


図 5. ナノシリカの血液凝固第 XII 因子活性化能の評価

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 CaCl₂, 0.1 mg/ml bovine serum albumin) に、血液第 XIIa 因子基質 (PEPTIDE INSTITUTE, Inc, Japan) を 20 μ l 加えた。これとは別に 100 μ l のヒト血漿に各 nSP (25 mg/ml, 0.4 mg/ml) を 100 μ 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。* $P < 0.01$ vs PBS, ** $P < 0.01$ vs nSP70

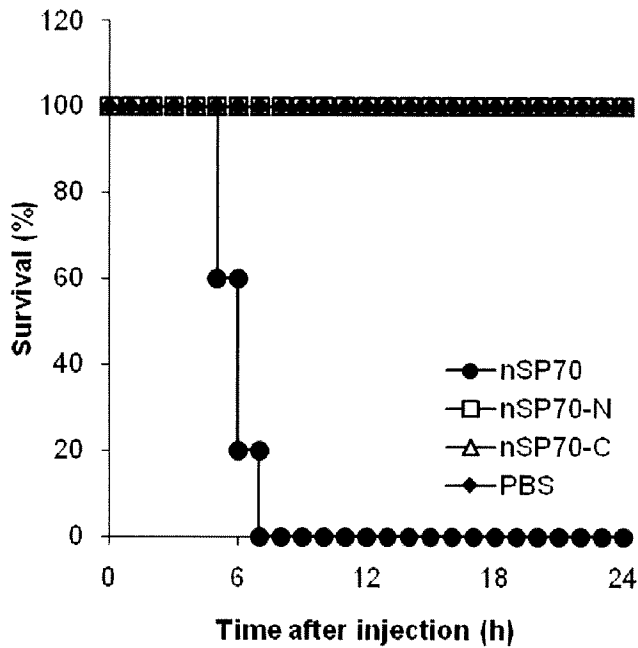


図 6. 表面修飾ナノシリカ投与マウスの生存率評価

BALB/c マウスに nSP70、nSP70-N、nSP70-C をそれぞれ 2 mg/匹で尾静脈内投与し、1 時間ごとに 24 時間後までの生存率を評価した。

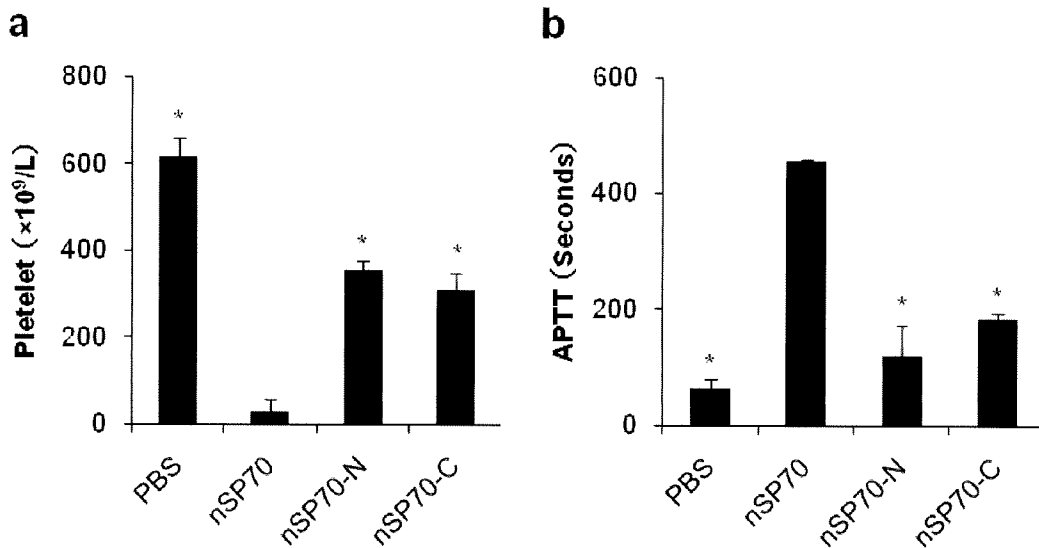


図 7. 表面修飾ナノシリカ投与マウスの血液凝固検査

各粒子サイズのシリカを 2 mg/匹で尾静脈内投与し、5 時間後に血液を回収した。全血の一部を用いて血小板数を計測した(a)。残りの血液を 1750 × g、15 分間、遠心分離して得られた血漿を用いて活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT, b) を測定した。* $P < 0.01$ vs PBS, * $P < 0.01$ vs nSP70 (Fisher's PLSD)

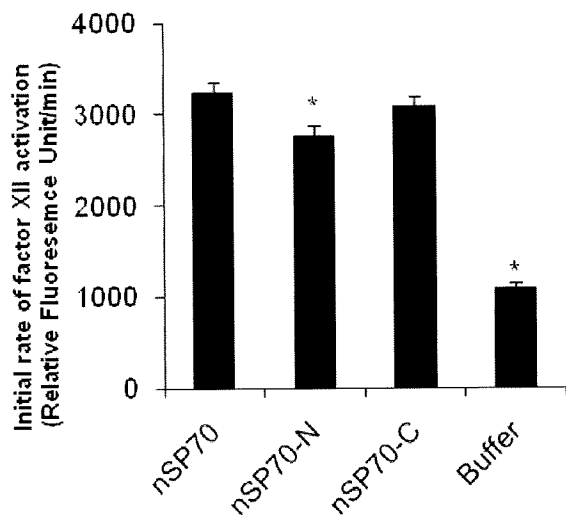


図 8. 表面修飾ナノシリカの血液凝固第 XII 因子活性化能の評価

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 CaCl₂, 0.1 mg/ml bovine serum albumin) に、血液第 XIIa 因子基質 (PEPTIDE INSTITUTE, Inc, Japan) を 20 μl 加えた。これとは別に 100 μl のヒト血漿に各 nSP (25 mg/ml, 0.4 mg/ml) を 100 μl 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 V₀ を算出した。*P<0.001 vs nSP70 (Fisher's PLSD)

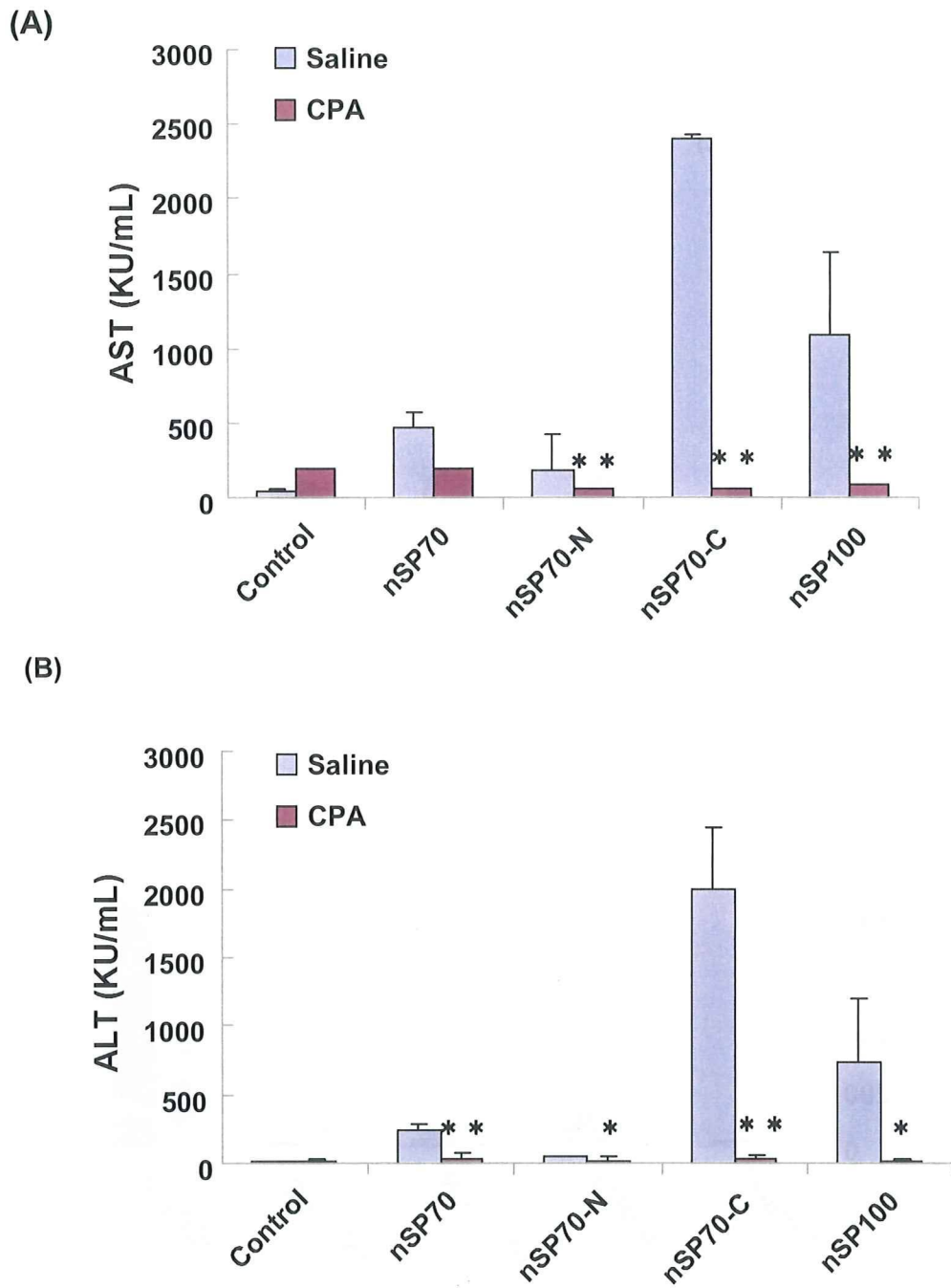
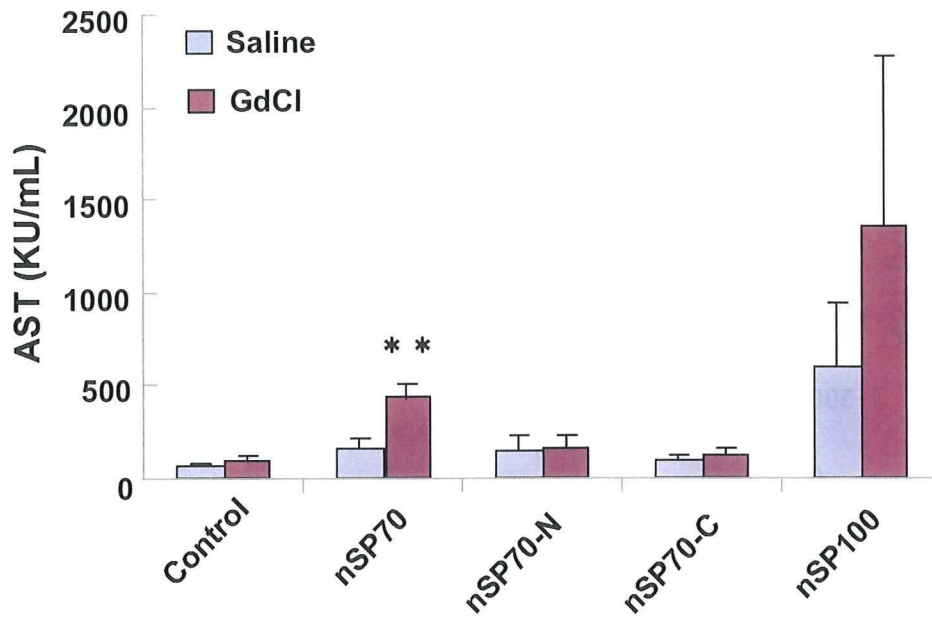


図9 シクロfosファミド (CPA) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害
シクロfosファミドは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の
(A) AST, (B) ALT を測定した。
** : $p < 0.01$ vs. Control

(A)



(B)

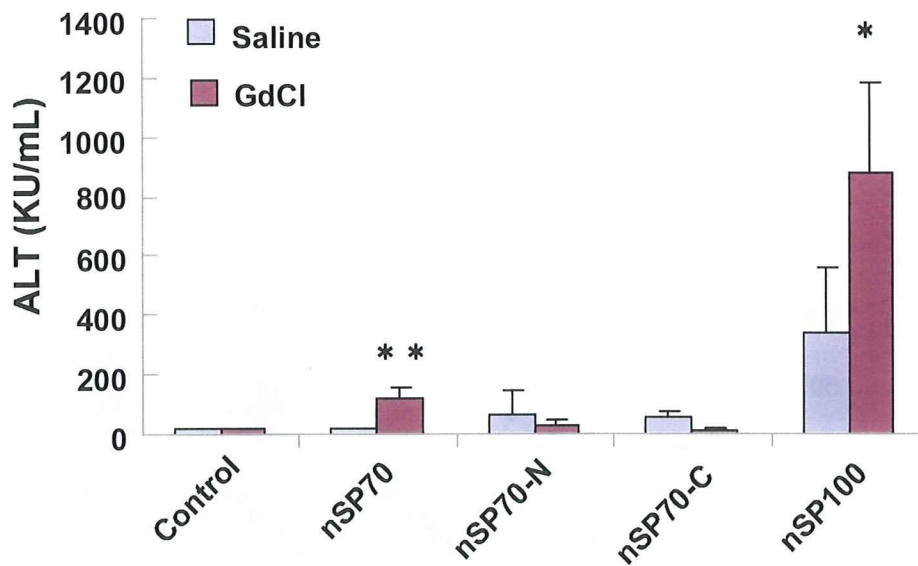


図 10 ガドリニウムクロライド (GdCl) と各種ナノシリカを併用投与した

マウスにおける急性肝障害。ガドリニウムクロライドは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。

** : $p < 0.01$ vs. Control

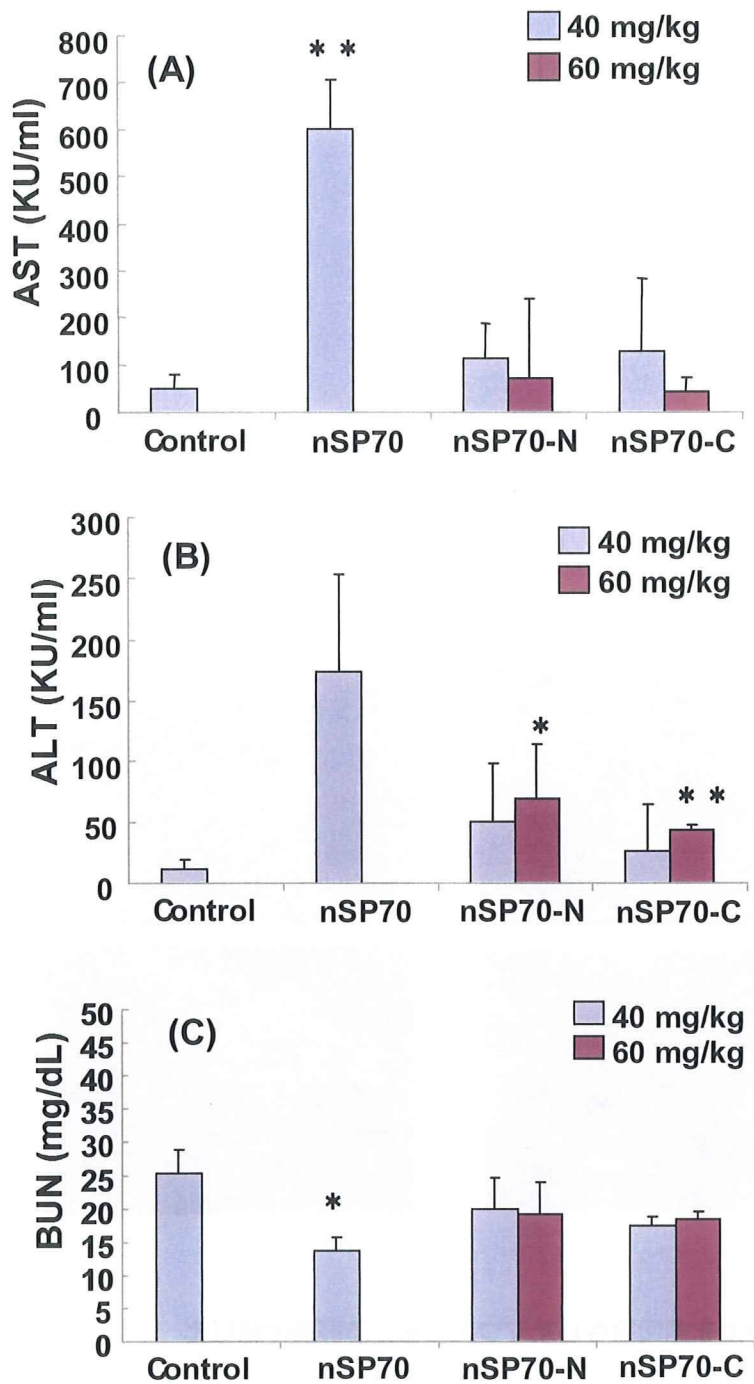


図 11. 表面修飾ナノシリカを頻回投与したマウスにおける慢性肝障害。

未修飾ナノシリカ (nSP70)、修飾ナノシリカ (nSP70-N, nSP70-C) を尾静脈内に週 2 回、4 週間 (計 8 回) 投与した。最終投与 1 日後に、血清中の (A) AST, (B) ALT, (C) BUN を測定した。

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$ vs. Control

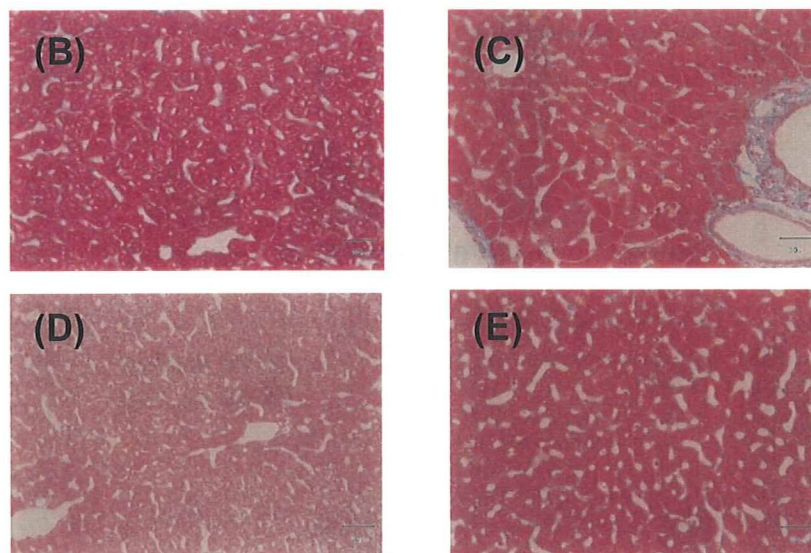
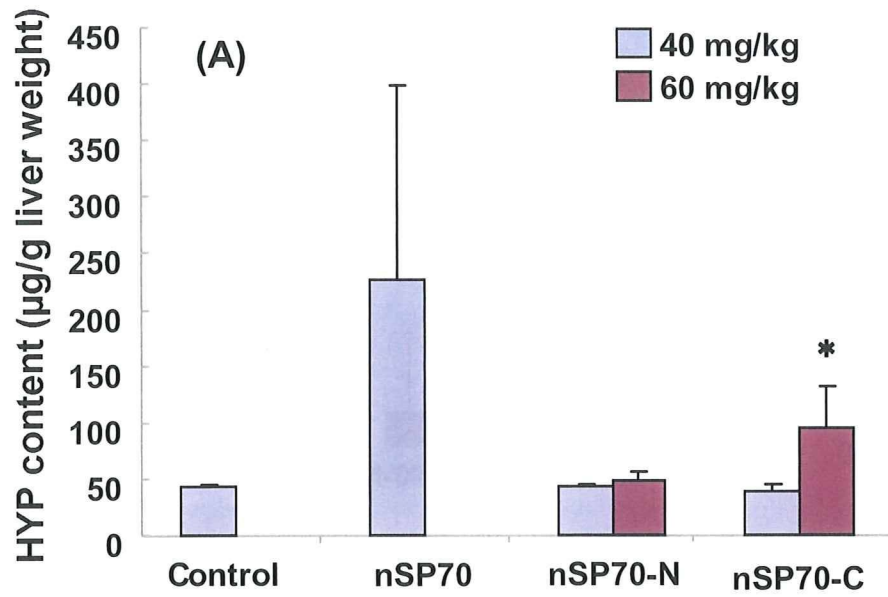


図 12. 表面修飾ナノシリカを頻回投与したマウスにおける肝臓の線維化

未修飾ナノシリカ (nSP70)、修飾ナノシリカ (nSP70-N, nSP70-C) を尾静脈内に週 2 回、4 週間連続 (計 8 回) 投与した。最終投与 1 日後に、HYP を測定した (A)。* : $p < 0.05$ vs. Control
 AZAN 染色による肝臓の組織像。(B) コントロール, (C) nSP70, (D) nSP70-N, (E) nSP70-C (X400)

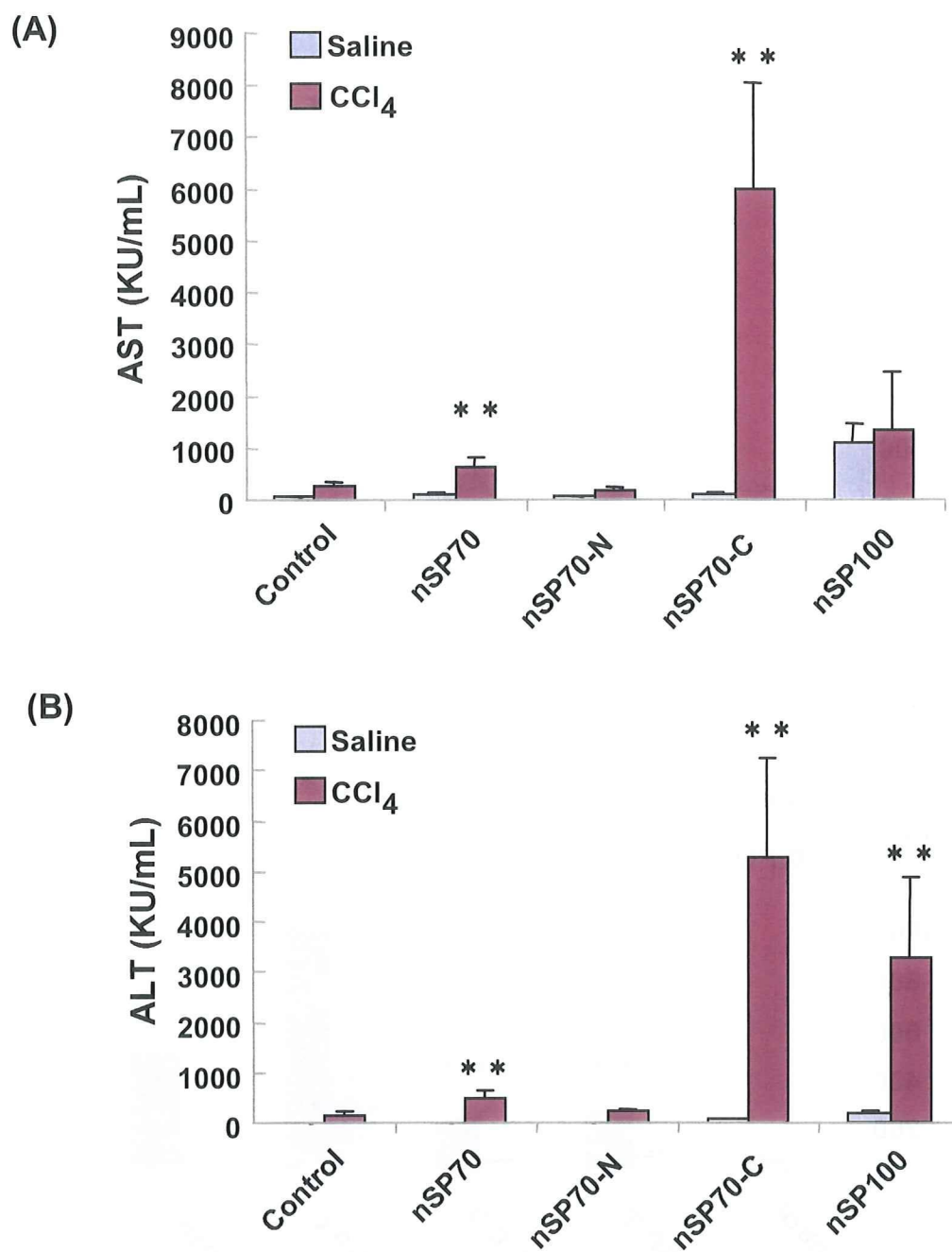
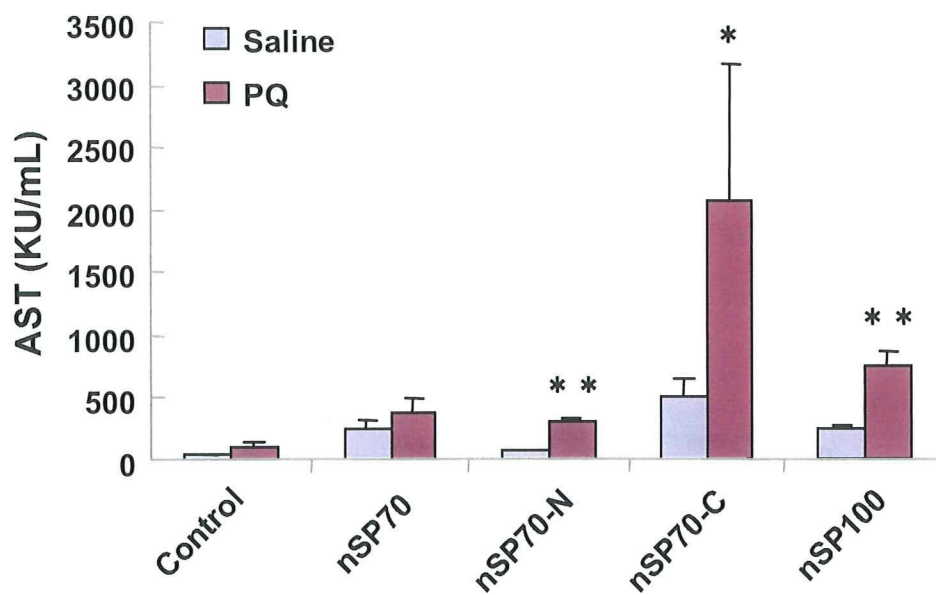


図 13. 四塩化炭素 (CCl₄) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害
 四塩化炭素は腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。

** : $p < 0.01$ vs. Control

(A)



(B)

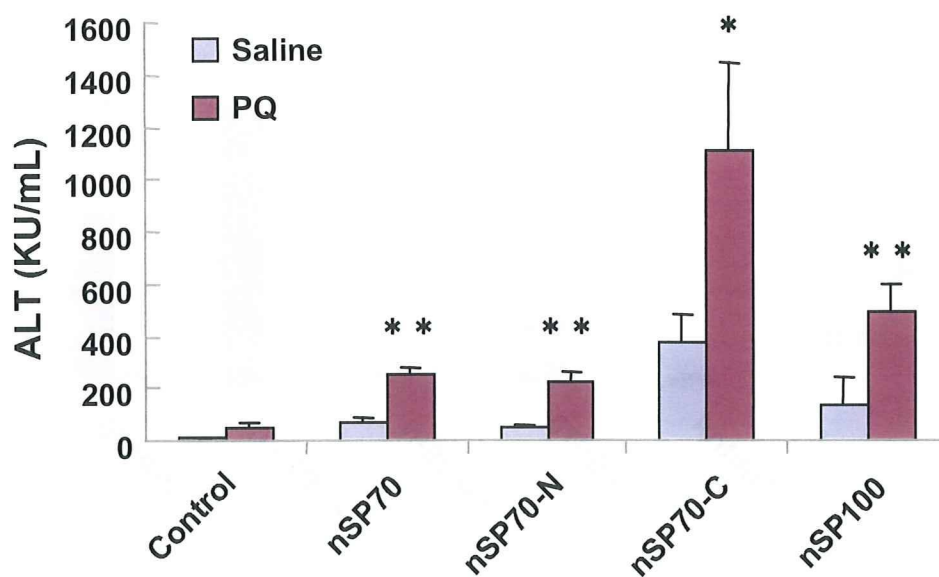


図 14. パラコート (PQ) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害

パラコートは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。

** : $p < 0.01$ vs. Control

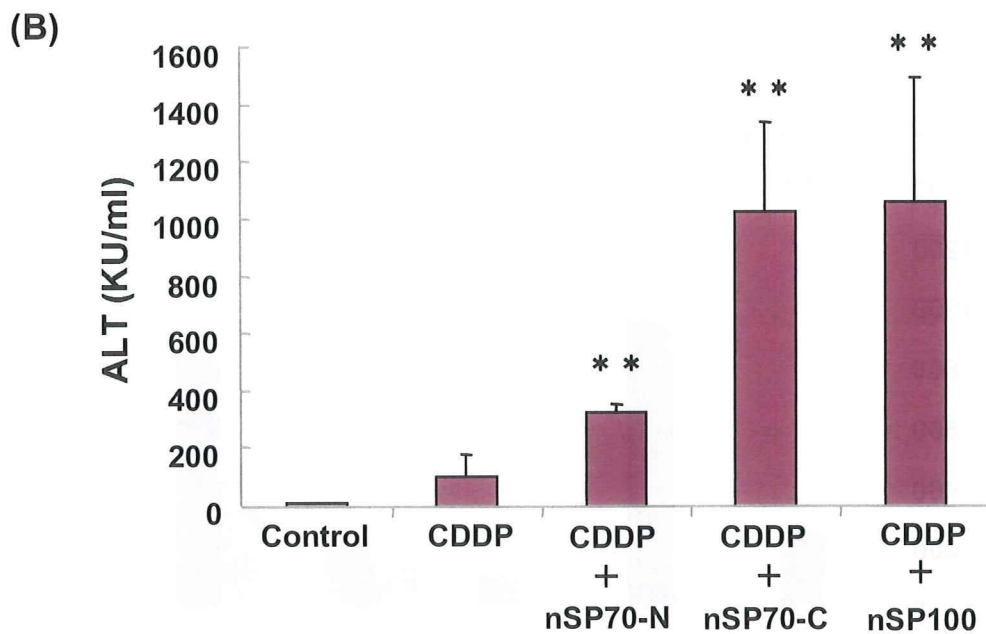
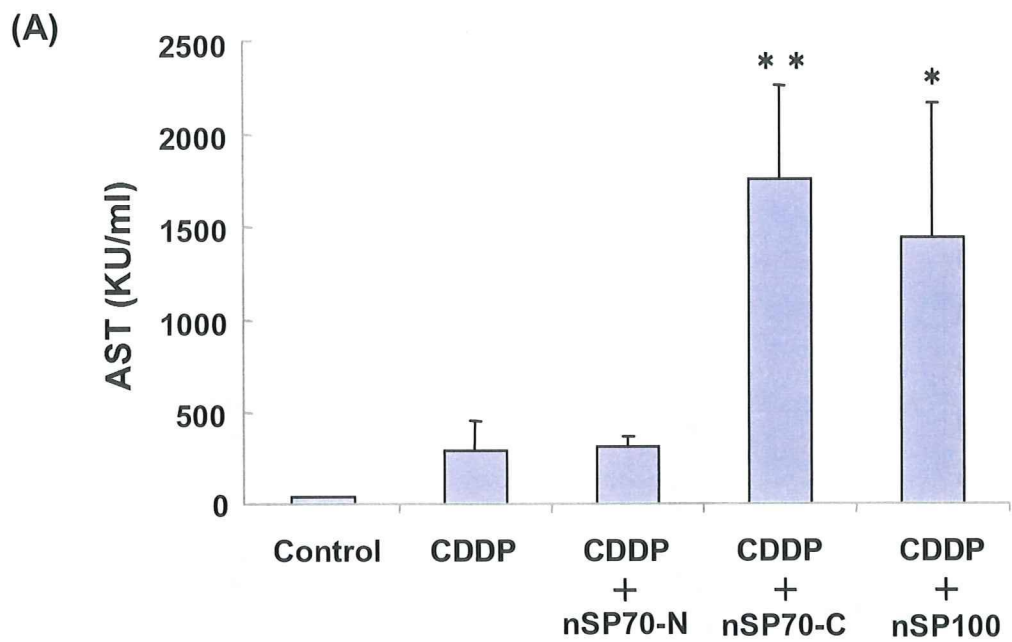
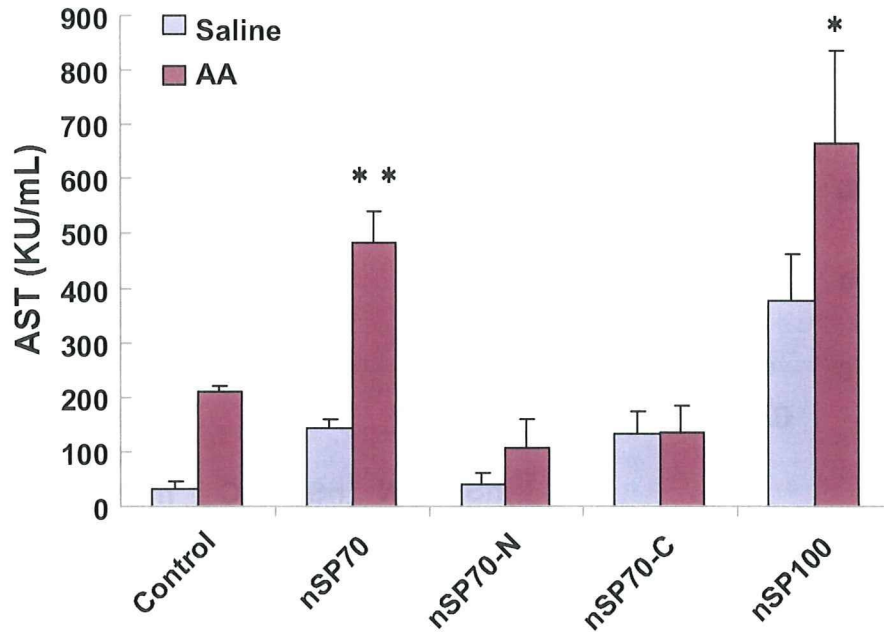


図 15. シスプラチン (CDDP) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害
シスプラチンは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) AST,
(B) ALT を測定した。
** : $p < 0.01$ vs. Control

(A)



(B)

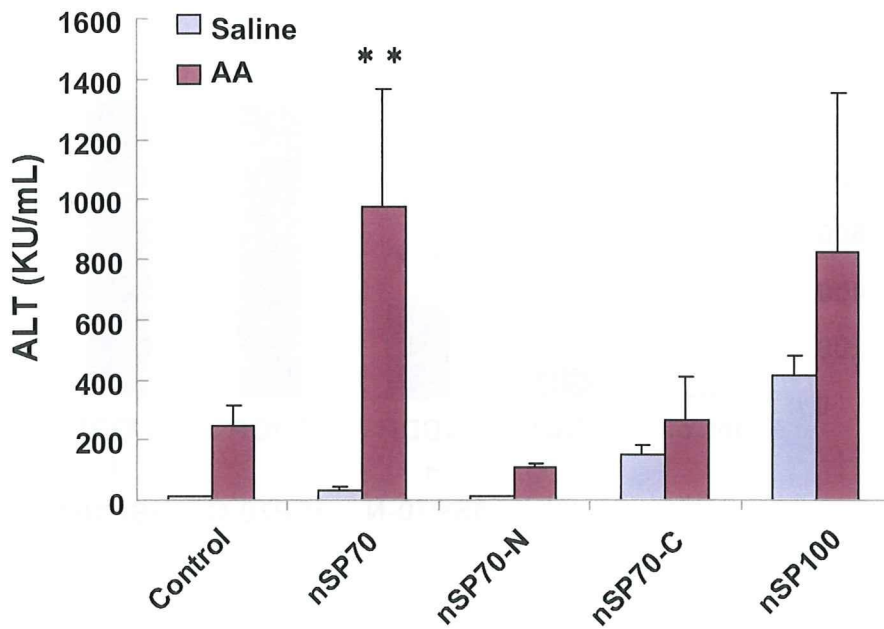
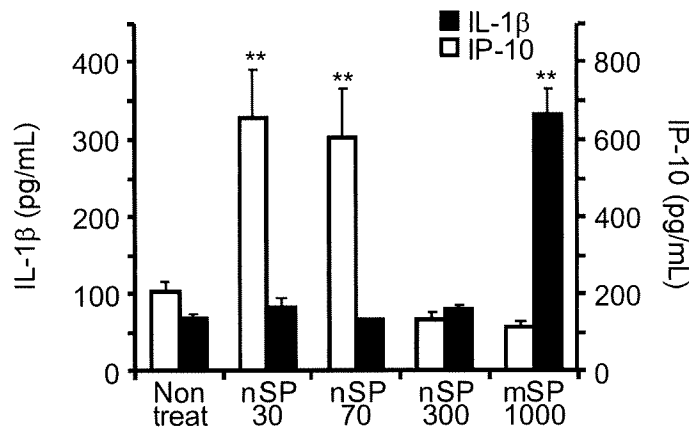


図 16. アセトアミノフェン (AA) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害
アセトアミノフェンは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A)
AST, (B) ALT を測定した。

** : $p < 0.01$ vs. Control

(A)



(B)

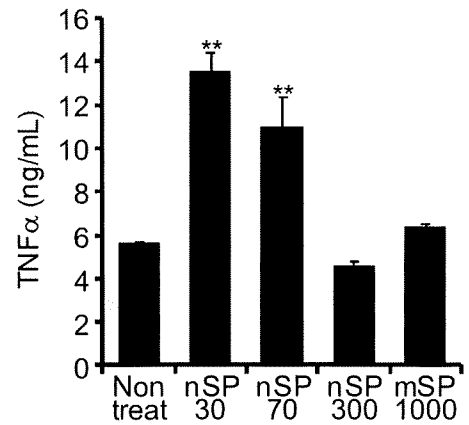


図 17. in vitro におけるシリカの粒子径と起炎性の関連

(A) THP-1 細胞、(B) RAW264.7 細胞を、粒子径 30、70、300、1000 nm のシリカ (100 μg/mL) 存在下で培養した。その後、上清を回収し、ELISA または Bio-Plex Suspension Array System にて、(A) IL-1β 及び IP-10、(B) TNFα の産生量を評価した。誤差範囲は S.D. 表記である。

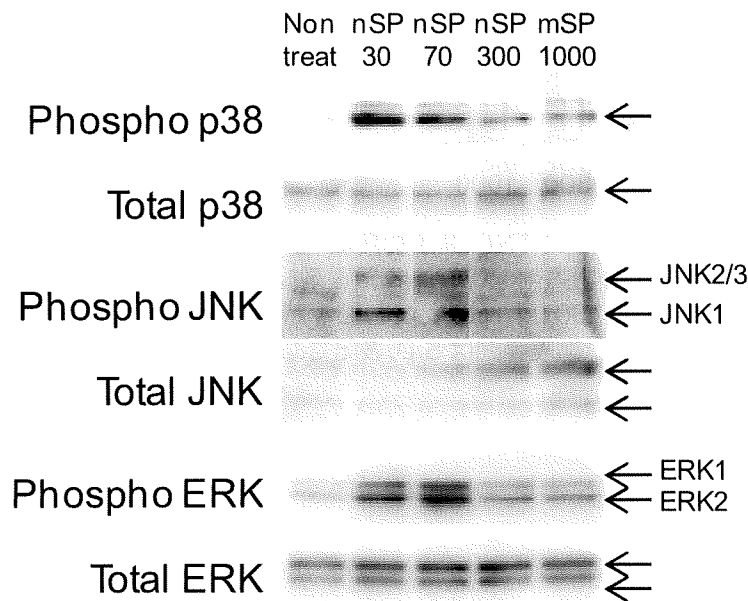


図 18. 粒子径の異なるシリカの MAPK 活性化能評価

RAW264.7 細胞を、粒子径 30、70、300、1000 nm のシリカ (100 μg/mL) 存在下で 4 時間培養した。その後、細胞破碎液を回収し、p38、JNK、ERK1/2 の総量及びリン酸化体量を Western Blot により半定量的に評価した。