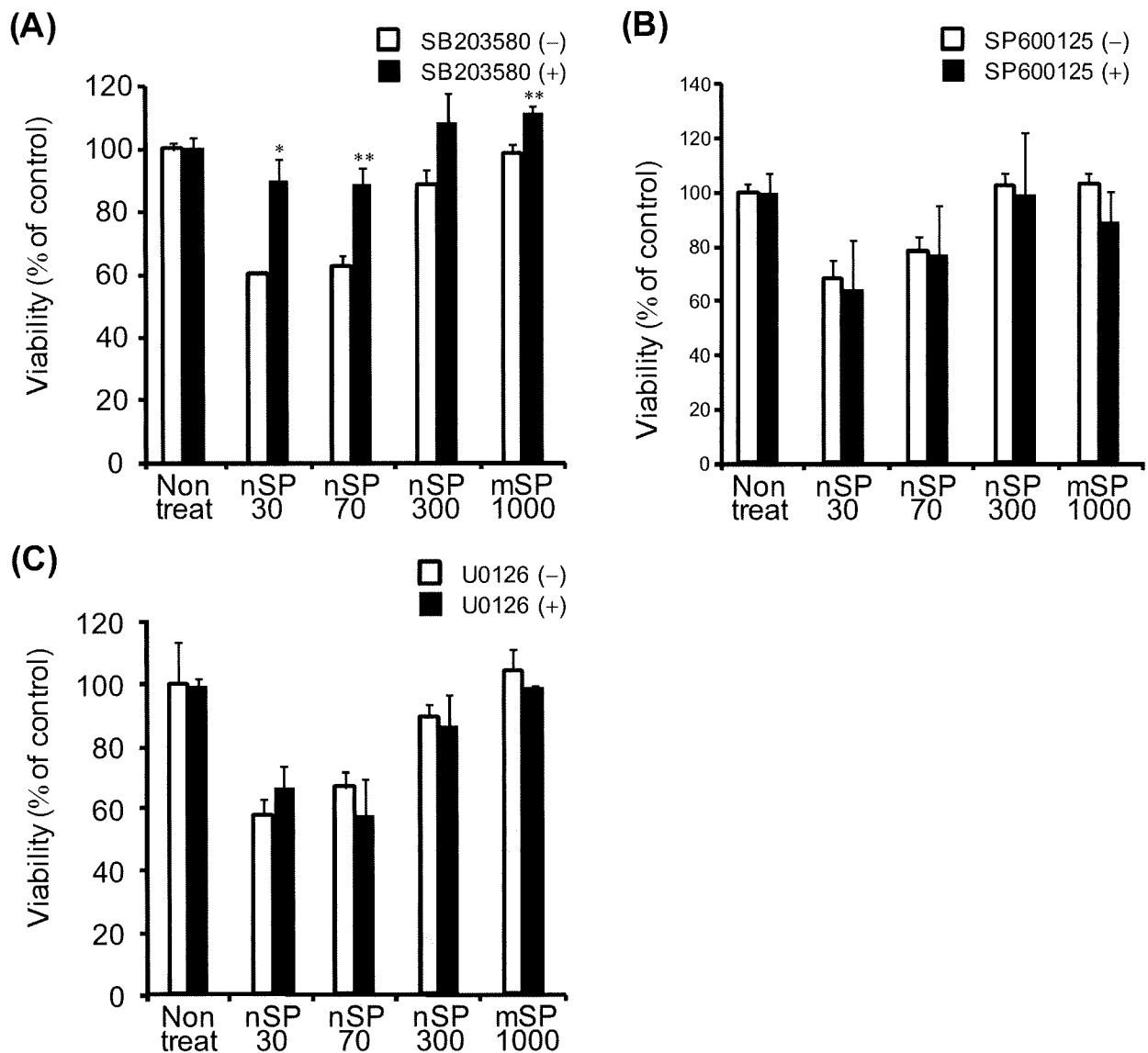


**図 19. MAPK の阻害剤条件下での TNF $\alpha$  産生能評価**

RAW264.7 細胞を、(A) p38 阻害剤、(B) JNK 阻害剤、(C) ERK1/2 阻害剤存在下で 2 時間培養した後に、各粒子径のシリカ (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) とともに 4 時間培養した。その後、上清を回収し、ELISA にて TNF $\alpha$  産生量を評価した。誤差範囲は S.D. 表記である。



**図 20. MAPK 阻害剤条件下での細胞傷害性評価**

RAW264.7 細胞を、(A) p38 阻害剤、(B) JNK 阻害剤、(C) ERK1/2 阻害剤存在下で 2 時間培養した後に、各粒子径のシリカ(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )とともに 12 時間培養した。その後、Methylene blue assay により細胞生存率を測定した。誤差範囲は S.D. 表記である。

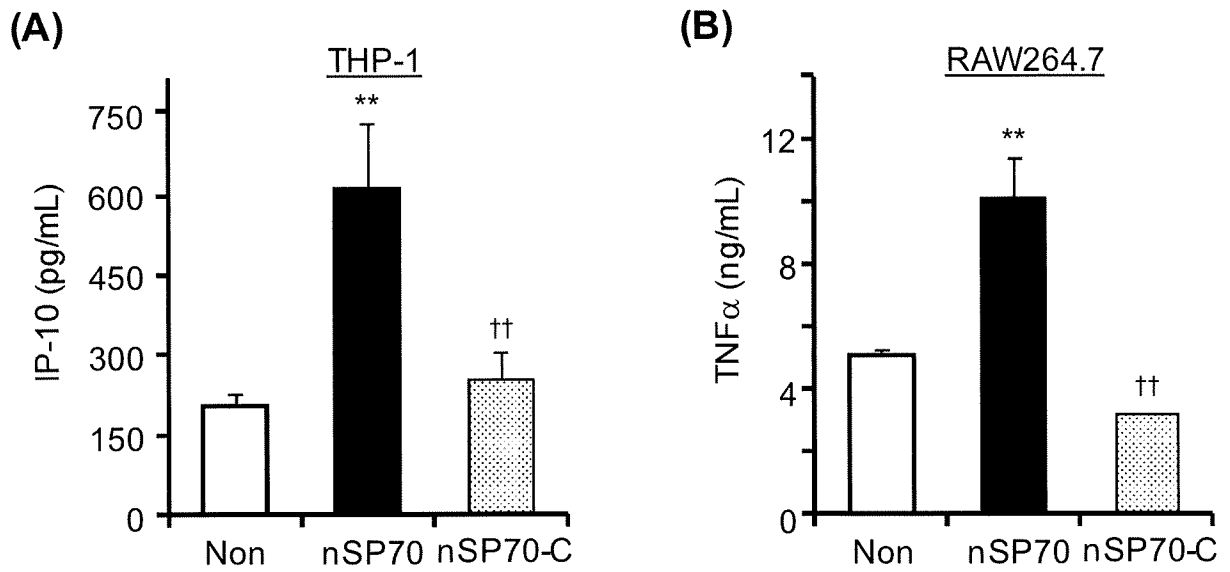


図 21. nSP70-C の起炎性評価

(A) THP-1 細胞、(B) RAW264.7 細胞を、nSP70、nSP70-C (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) IP-10 及び (B) TNFα の産生量を評価した。誤差範囲は S.D. 表記である。

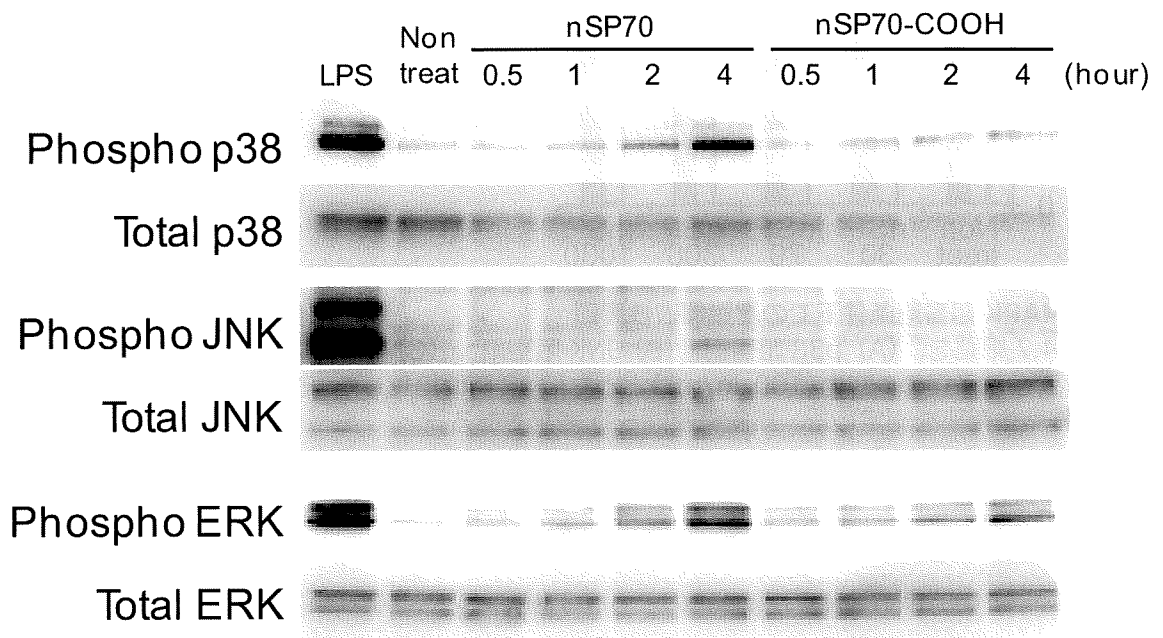


図 22. nSP70-C の MAPK 活性化能評価

RAW264.7 細胞を、nSP70、nSP70-C (100 μg/mL) 存在下で 4 時間培養した。その後、細胞破砕液を回収し、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。

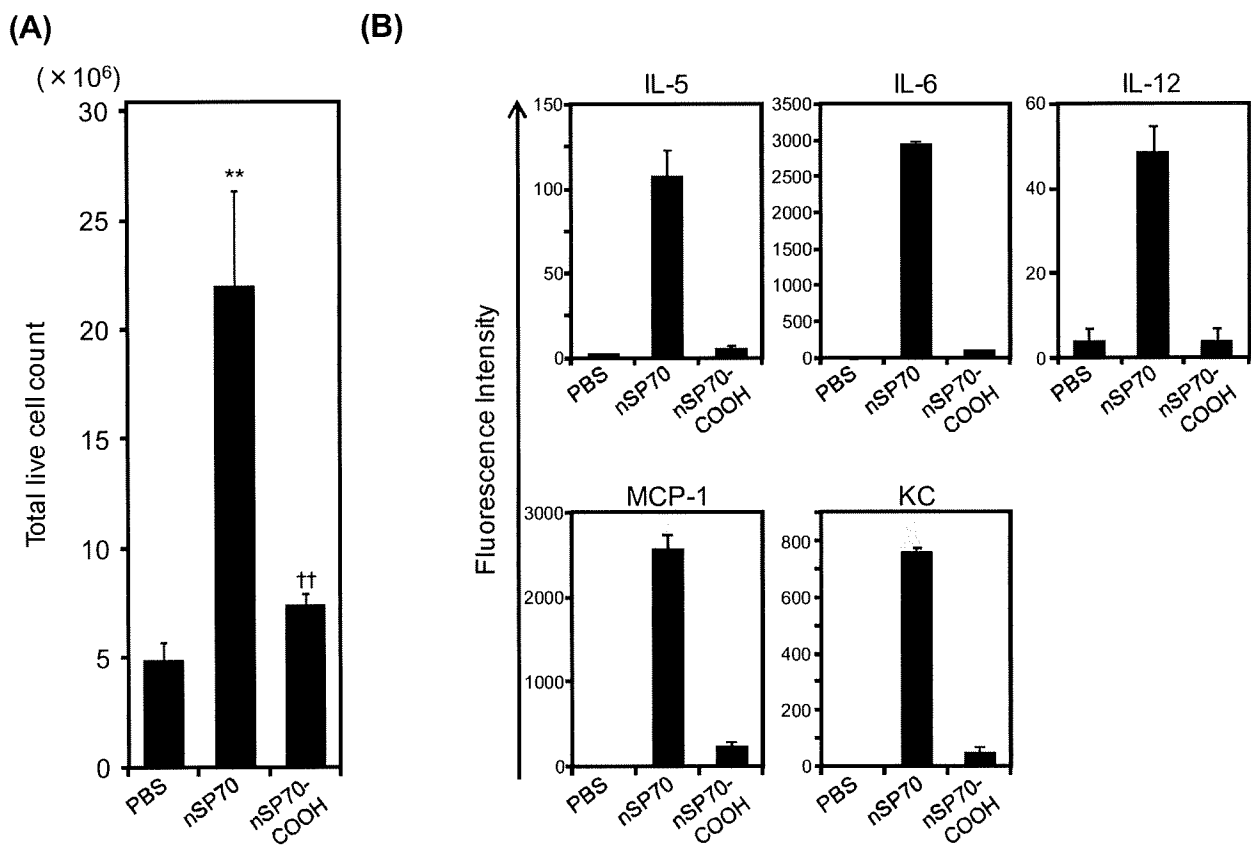


図 23. nSP70-C の in vivo における起炎性評価

BALB/c マウスに nSP70 または nSP70-C を 1 mg 腹腔内投与した。(A) 投与 24 時間後に腹腔内洗浄液を回収し、総細胞数を測定した。(B) 投与 2 時間後の腹腔内洗浄液を回収し、Bio-Plex Suspension Array System にてサイトカインの産生量を評価した。誤差範囲は S.D. 表記である。

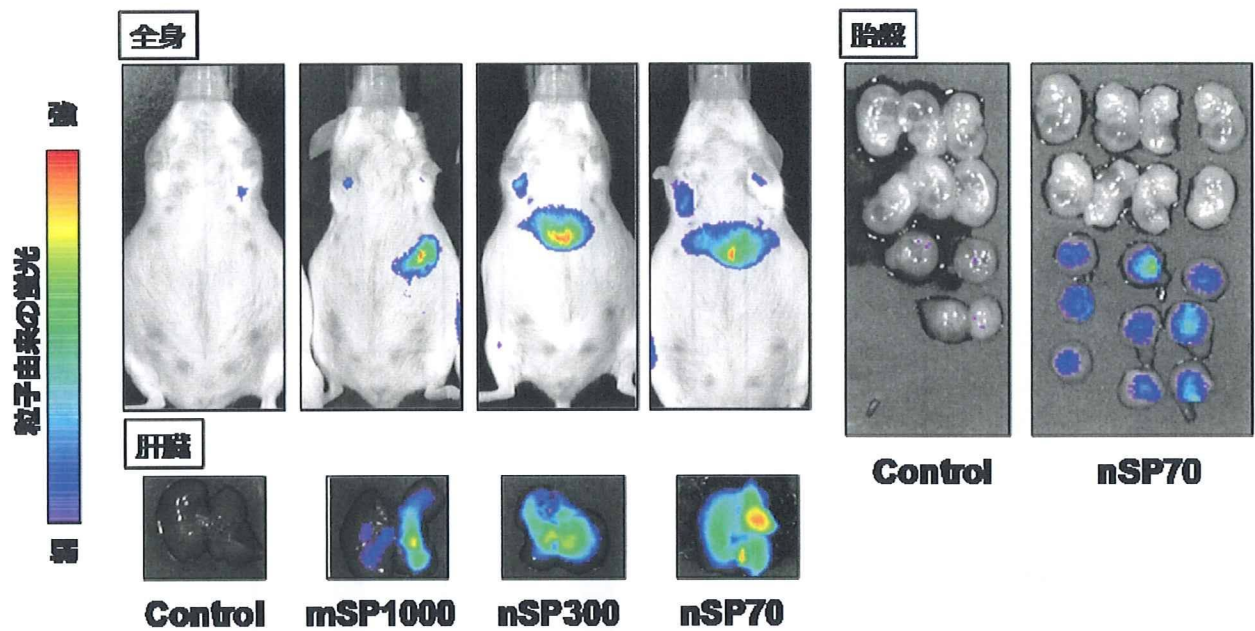


図24. 妊娠マウスにおけるナノシリカの体内動態(in vivo imaging)

蛍光修飾された各粒子径の非晶質シリカを、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。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。

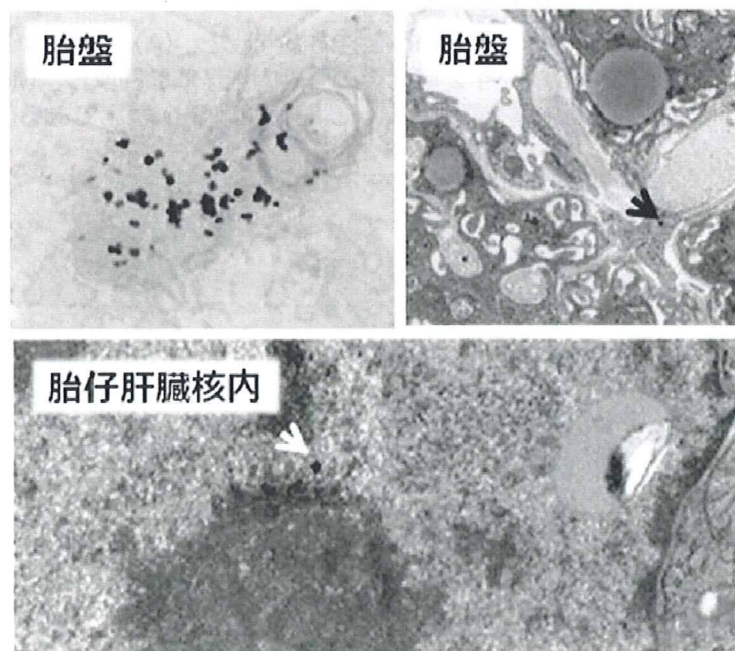


図25. 妊娠マウスにおけるナノシリカの体内動態

直径 70 nm のナノシリカ (nSP70) を妊娠マウスに尾静脈内より投与した際の体内分布を評価した。その結果、nSP70 は胎盤や胎仔にまで到達していた。興味深いことに、nSP70 は胎仔肝細胞の核内にまで侵入していた。

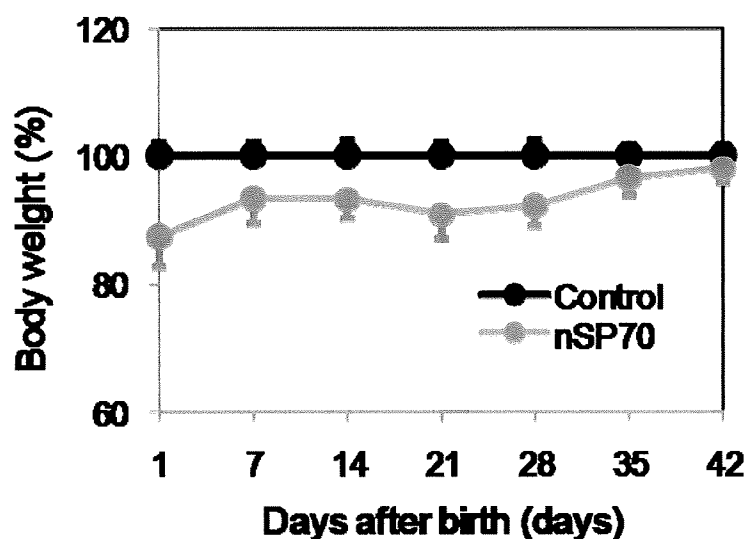


図26. ナノシリカ曝露の出生後における新生仔の体重変化

妊娠 16 日目のマウスに nSP70 を投与し、出産後、新生仔の体重を経日的に測定した。その結果、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。

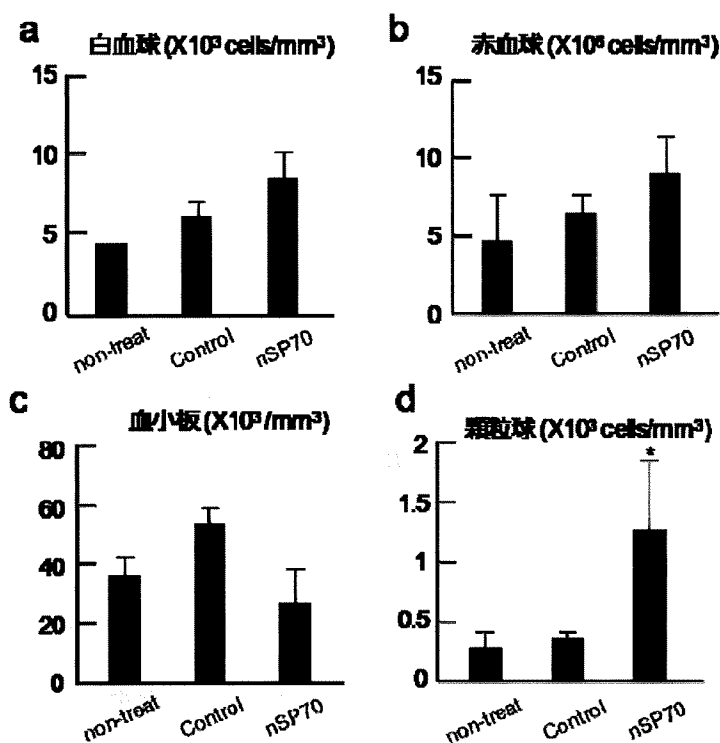


図27. ナノシリカ曝露の出生後における影響評価

妊娠16日目のマウスにnSP70を投与し、出産後、新生仔の6週齢時に解剖し、血球数を評価した。その結果、nSP70投与群で赤血球数、血小板量に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。

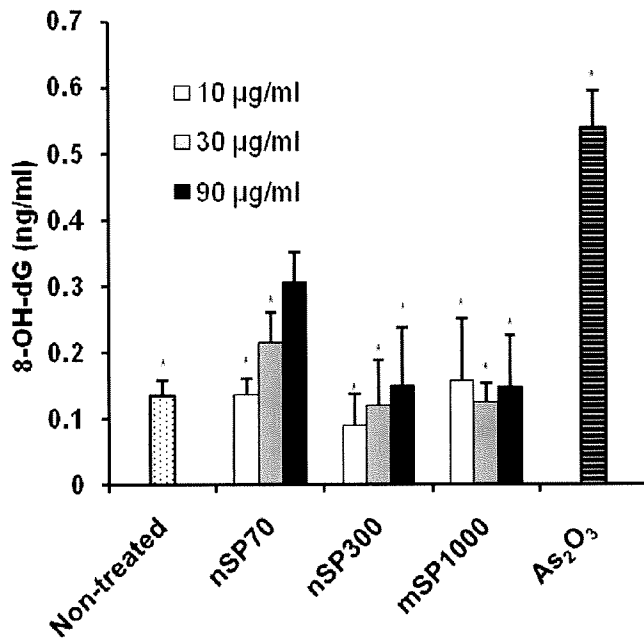


図 28. ナノシリカ処置 HaCaT 細胞における DNA の酸化的損傷の検出

種々の濃度のシリカ、あるいはポジティブコントロールとして三酸化ヒ素(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)を HaCaT 細胞に作用させ、3 時間インキュベートした。その後、DNA を抽出・加水分解処理した後、ELISA 方を用いて 8-OHdG の含有量を測定した。\*P < 0.01 vs nSP70 (90 µg/ml)。

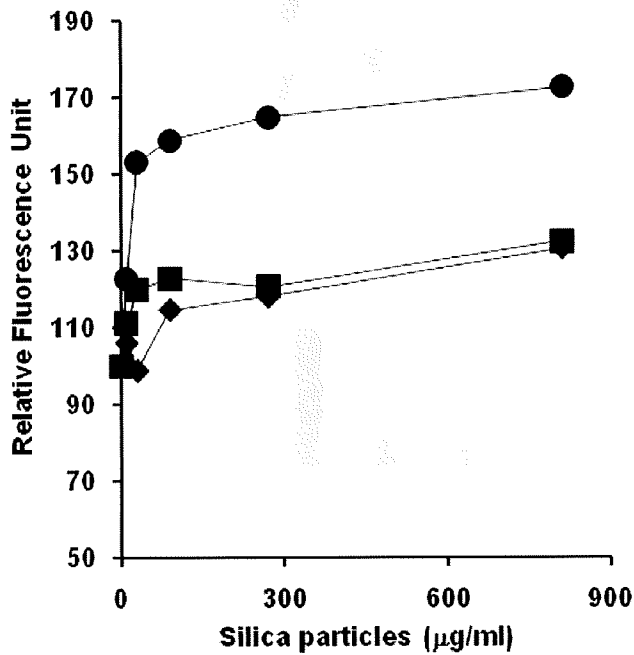
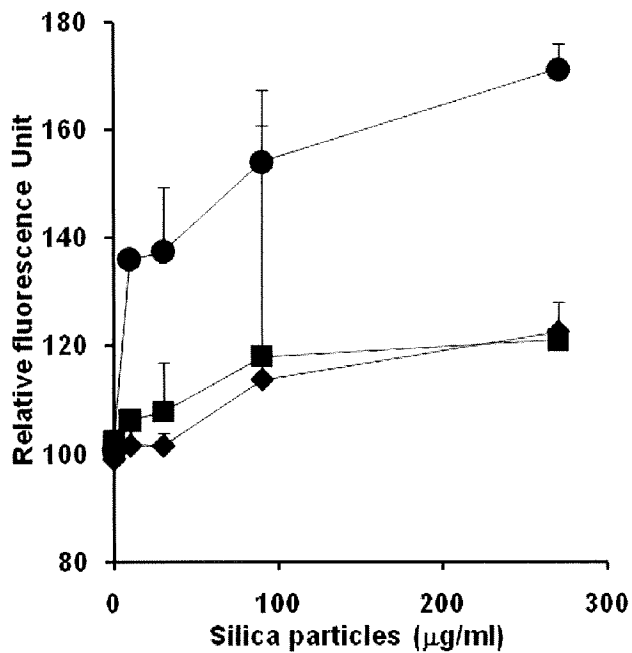


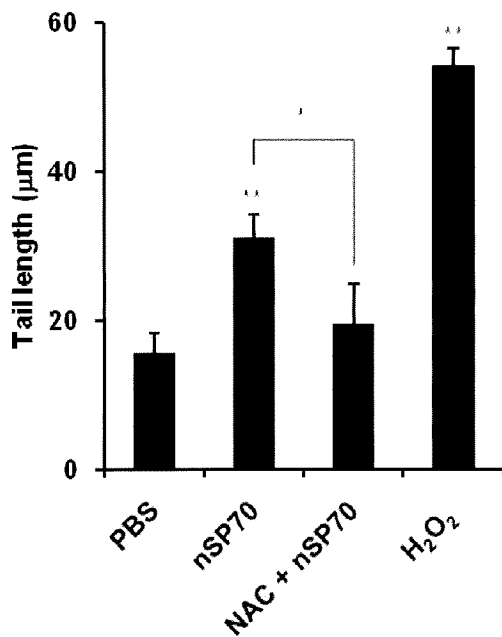
図 29. ナノシリカ処置 HaCaT 細胞における ROS の産生

種々の濃度のシリカを 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 特異的プローブである DCFH-DA を添加して 30 分間反応させた。細胞を洗浄した後 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。



**図 30. ナノシリカ処置 HaCaT 細胞におけるヒドロキシルラジカルの産生**

種々の濃度のシリカを 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ヒドロキシルラジカル(OH)あるいは次亜塩素酸(OCI)の特異的プローブである HPF を添加して 30 分間反応させた。細胞を洗浄した後 HPF 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。



**図 31. ナノシリカによる HaCaT 細胞の DNA 損傷発現に対する ROS 阻害剤の影響**

HaCaT 細胞を 2 mM の N-アセチルシステイン(NAC)で 30 分間前処置した後に、90 μg/ml の nSP70 を添加し、3 時間後に細胞を回収した。ポジティブコントロールとして 0.2 mM の過酸化水素を用いた。ナノシリカ処置細胞の DNA 損傷の度合いをコメットアッセイにより検出し定量した。  
\*\* $P < 0.01$  vs PBS, \* $P < 0.01$  vs nSP70.



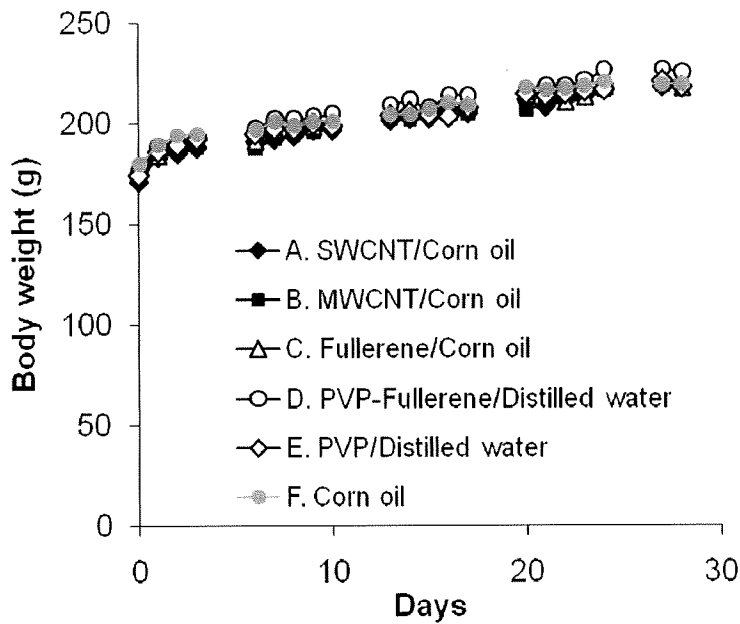


図 32. 反復投与経皮毒性 (28日) 試験 (OECD TG410) におけるラットの体重変化.

A, SWCNT/Corn oil ( 200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$  )、B, MWCNT/Corn oil ( 200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$  )、C, Fullerene/Corn oil ( 200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$  )、D, PVP-Fullerene/Distilled water ( 10  $\text{mg}/\text{mouse}/\text{days}$  )、E, Corn oil ( 200  $\mu\text{l}/\text{mouse}/\text{days}$  )、F, PVP/Distilled water ( 10  $\text{mg}/\text{mouse}/\text{days}$  ) をラット (Wistar 系) の背部に 28 日間反復塗布し、塗布期間中の体重を測定した。

表1. 反復投与経皮毒性 (28日) 試験 (OECD TG410) における塗布局所の所見.

	Day 0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A. SWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. MWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Fullerene/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D. PVP-Fullerene/ Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. PVP/Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Day 15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
A. SWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. MWCNT/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Fullerene/Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D. PVP-Fullerene/ Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. PVP/Distilled water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Corn oil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : 異常なし

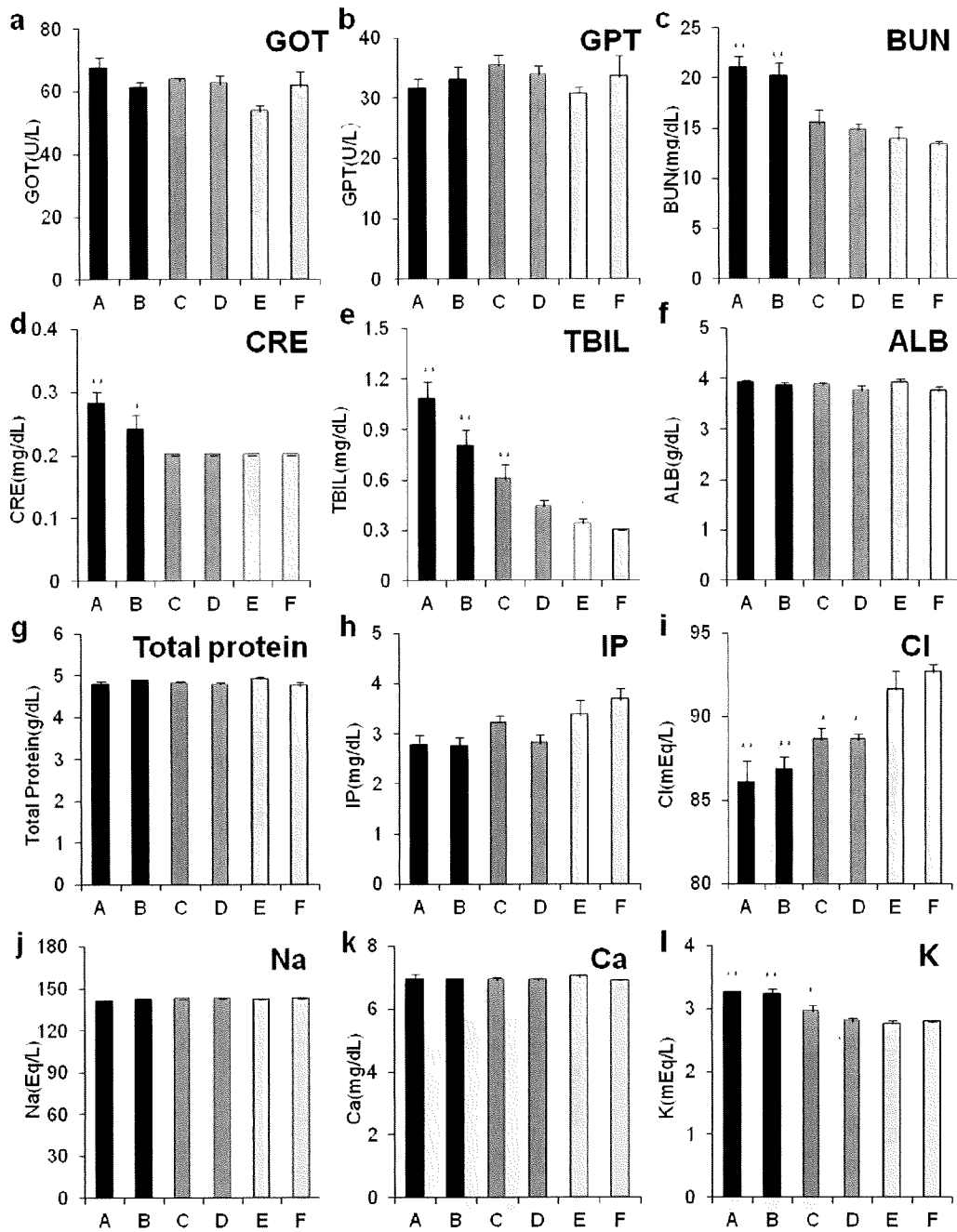


図 33. 反復投与経皮毒性 (28 日) 試験 (OECD TG410) における血液生化学検査

A, SWCNT/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、B, MWCNT/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、C, Fullerene/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、D, PVP-Fullerene/Distilled water (10  $\text{mg}/\text{mouse}/\text{days}$ )、E, Corn oil (200  $\mu\text{l}/\text{mouse}/\text{days}$ )、F, PVP/Distilled water (10  $\text{mg}/\text{mouse}/\text{days}$ ) をラット (Wistar 系) の背部に 28 日間反復塗布した。最終塗布から 24 時間後に心臓から回収した血液を用いて血液生化学検査 (グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミラーゼ (GPT)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、血清ビリルビン (TBIL)、アルブミン (ALB)、総タンパク量 (Total protein)、無機リン (IP)、塩素 (Cl)、ナトリウム (Na)、カルシウム (Ca)、カリウム (K)) を実施した。\*\* $P < 0.01$  vs E, \* $P < 0.01$  vs F

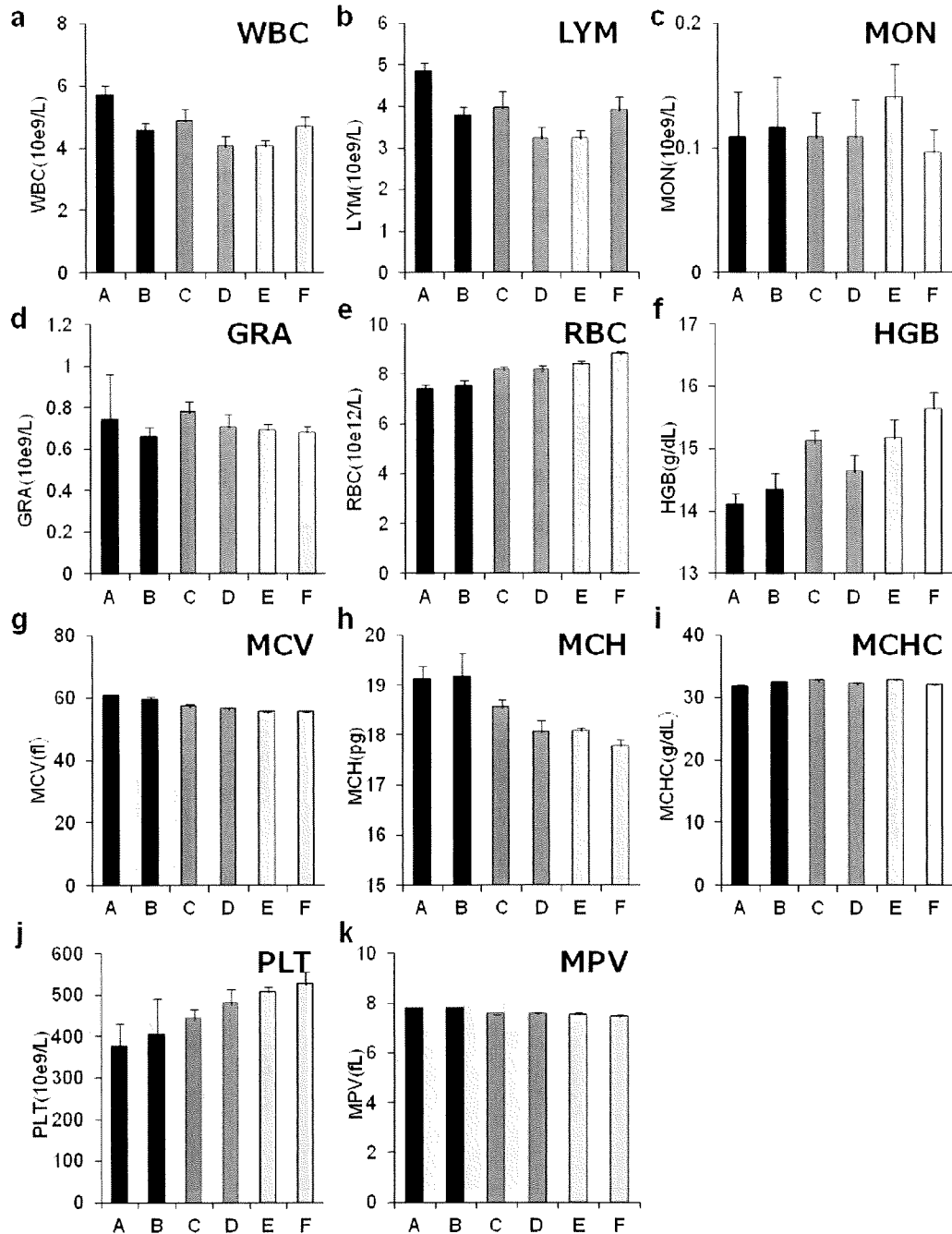


図 34. 反復投与経皮毒性（28 日）試験（OECD TG410）における血液血球検査

A, SWCNT/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、B, MWCNT/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、C, Fullerene/Corn oil (200  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{days}$ )、D, PVP-Fullerene/Distilled water (10  $\text{mg}/\text{mouse}/\text{days}$ )、E, Corn oil (200  $\mu\text{l}/\text{mouse}/\text{days}$ )、F, PVP/Distilled water (10  $\text{mg}/\text{mouse}/\text{days}$ ) をラット (Wistar 系) の背部に 28 日間反復塗布した。最終塗布から 24 時間後に心臓から回収した血液を用いて血液血球検査 (総白血球数 (WBC)、リンパ球数 (LYM)、単球数 (MON)、顆粒球数 (GRA)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン (HGB)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球 HGB 量 (MCH)、平均赤血球 HGB 濃 (MCHC)、血小板パーセント (PLT)、平均血小板容積 (MPV)) を実施した。

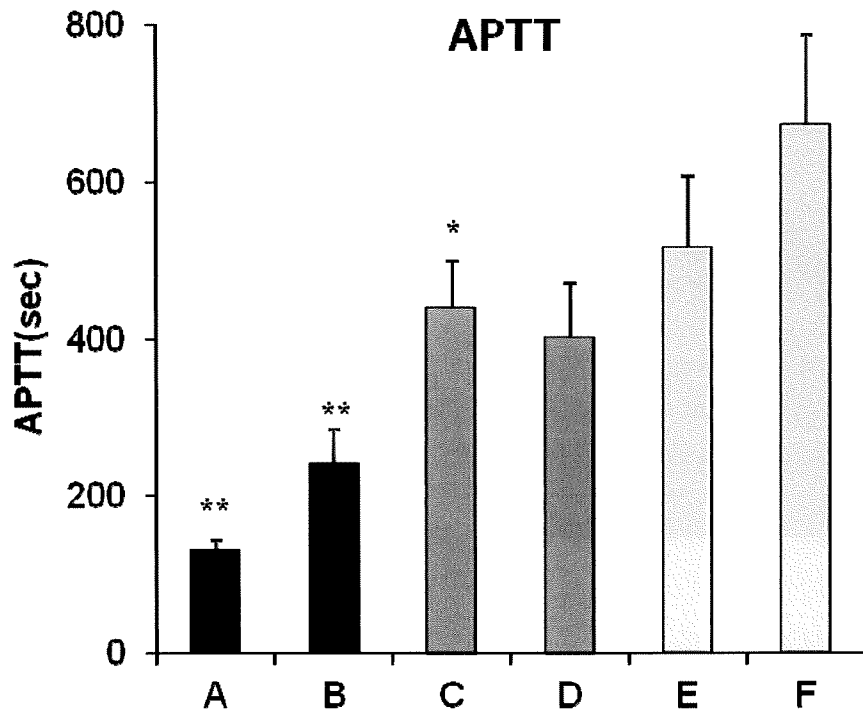
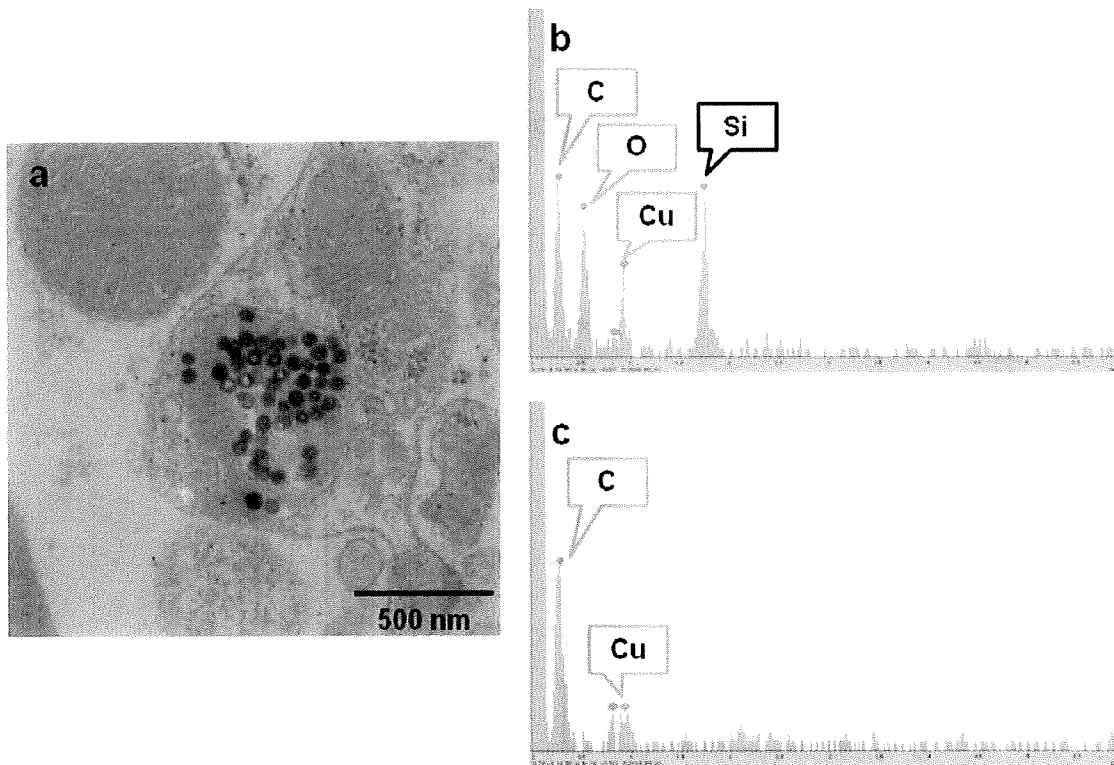


図 35. 反復投与経皮毒性試験 (OECD TG410) における活性化部分トロンボプラスチン時間

A, SWCNT/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、B, MWCNT/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、C, Fullerene/Corn oil (200  $\mu$ g/mouse/days)、D, PVP-Fullerene/Distilled water (10 mg/mouse/days)、E, Corn oil (200  $\mu$ l/mouse/days)、F, PVP/Distilled water (10 mg/mouse/days) をラット (Wistar 系) の背部に 28 日間反復塗布した。最終塗布から 24 時間後に心臓から回収した血液を用いて活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した。\*\* $P < 0.01$  vs E, \* $P < 0.01$  vs F



**図 36. 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) を用いたナノシリカの体内局在解析**

BALB/c マウスに nSP70 を 2 mg/匹で尾静脈内投与し、5 時間後に肝臓を摘出し、2.5%グルタルアルデヒドで固定した。その後、洗浄・脱水・樹脂置換し、Epon-812 で包埋した。この組織ブロックを薄切し、得られた超薄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。a, 肝クッパー細胞の透過型電子顕微鏡像、b, 粒子部分 (a の黒点部分) の EDX 分析スペクトル、c, バックグラウンドの EDX 分析スペクトル。C : 炭素、O : 酸素、Cu : 銅、Si : ケイ素。

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」  
分担研究報告書

## 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

分担研究者 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

OECD 主導の下で展開されているナノマテリアルの安全性情報収集プログラムの例に見られるように、ナノマテリアルの安全性確保は世界的な緊急課題である。このような情勢を受け、我が国における NanoTox の研究においては、ナノマテリアルの適切なリスク管理に向けて、より一層の推進が求められている。しかし、現在のところ NanoTox に関する検討は未だ十分に行われておらず、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、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、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、そし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課題である。このような背景のもと、本研究では、化粧品基材として既に実用化されているナノシリカを標準ナノマテリアルとして用い、生体内/細胞内動態情報の収集と、それらを基盤とした経皮安全性評価を進めると共に、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いる。我々のグループは、平成 19 年度までに、皮膚に塗布したナノシリカが角質層などを通過し、血中に移行することを明らかとしたうえで、血中移行後は、肝臓を中心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ていることを見いだしている。さらに、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 (nSP70) 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障害・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。また血中に投与した nSP70 が肝クッパー細胞のみならず肝実質細胞にまで到達し、さらに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以上（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先駆けて明らかとした。さらに、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。そこで本年度は、ナノシリカの DNA 傷害誘発メカニズムの解明を試みた。さらに、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。その結果、nSP70 による遺伝子損傷発現には活性酸素種の産生増大が関与していること、CNT や C60 は経皮毒性を殆ど示さないことが明らかとなった。これらの結果は、直径 100 nm 以下の素材に関しては体内吸収性等を個々に精査する必要があることを裏付けると共に、ナノマテリアルの世界共通の安全性評価ガイドラインの策定に資する情報を提供するものである。

## A. 研究目的

ナノマテリアルはサイズや形状を 100 nm 以下で精密製造された素材であり、組織浸透性や電子反応性、光学的特性、強度等の点において、サブミクロンサイズ以上の従来型素材とは異なる機能を発揮することが知られている。これらの特性は、医薬・食品・化粧品・電子部品・IT 産業等、様々な産業において多大な恩恵をもたらすものと期待されており、本邦では、ナノシリカや酸化チタン、フラーレン等が化粧品や医薬品、食品として上市されている。しかし、近年、ナノマテリアルの革新的機能が逆に予期せぬ生体影響 (NanoTox) を誘発する可能性が報告されている。これらの情勢を受けて、OECD 等の主導の下、ナノマテリアルのヒトにおける安全性評価、社会的・倫理的な管理策の確立等、NanoTox のリスクマネジメントに向けた国際基準づくりが開始されている。

経皮曝露されたナノマテリアルの安全性を、シリカや酸化チタン等の化粧品材料を一例に考えてみた場合、“250 nm 以上のマテリアル”は皮膚を通過できず、肌の表面で留まるため無害と考えられる。しかし昨今、これら素材をナノマテリアル化することで、皮膚浸透性を向上させること等が可能となったため、ナノマテリアルを活用した様々な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うること、また、皮膚局所や全身組織に分布したナノマテリアルが、遠赤外線や放電、光反応性・熱反応性を呈し、遺伝子・蛋白質変性、アレルギー等の未知毒性を誘発しうることが米国 NTP program の研究等により指摘されている。さらに、ナノフラーレンが体内に吸収されると、循環血中を介して脳組織に移行し、傷害性を示すことも報告されている。そのため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、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。

我々のグループは、平成 19 年度までに、皮膚に塗布したナノシリカが角質層を通過し、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、肝臓を中心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、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 (nSP70) 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は肝臓を中心とした種々臓器に対する障害・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。また血中に投与した nSP70 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以上 (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。さらに、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。そこで本年度は、ナノシリカの DNA 傷害誘発メカニズムの解明を試みるとともに、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。

## B. 研究方法

### 1. ナノマテリアル

本研究では、Micromod Partikeltechnologie 社より購入した直径の異なる表面未修飾ナノシリカ (直径約 70、100、300、1000 nm ; それぞれ nSP70、SP100、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 のナノシリカ (それぞれ nSP70-N、nSP70-C) を使用した。尚、特記しない限り、赤色蛍光色素 (RedF) で標識されたナ

ノシリカを実験に供した。また、単層カーボンナノチューブ (SWCNT)、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は名城ナノカーボン社より購入した。フラーレン、PVP-フラーレンはビタミン C60 バイオリサーチ社から提供された。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、および PVP 溶液 (50 mg/ml) を用いた。

## 2. 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) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を加水分解処理した後、ELISA kit (8-OHdG check, Japan Institute for the Control of Aging) を用いて、8-OHdG の含有量を測定した。

## 3. 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 diacetate (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 × 10<sup>4</sup> cells/well 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を添加した。ナノシリカを添加して 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 μM) 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 (Ex/Em=485 nm/530 nm) を用いて蛍光強度を測定した。

## 4. 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 × 10<sup>4</sup> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加した。ナノシリカを添加して 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 μM) 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。

## 5. 抗酸化剤存在下におけるナノシリカの DNA 損傷作用の評価

1 × 10<sup>5</sup> 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 μg/ml) を細胞に処置した。nSP70 を添加して 3 時間後の DNA 鎖切断をコメットアッセイにより評価した。

## 6. 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 × 2 cm<sup>2</sup>) を剃毛し、その部位に各濃度に調製したナノマテリアルサンプル、コントロールサンプルを 200 μl/site で塗布した。MWCNT、SWCNT と表面未修飾フラーレン (FL) は、1 mg/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。各ナノマテリアルサンプルの塗布期間中ラットの体重測定を行い、その推移を指標にナノマテリアルの生体への影響



を調べた。またナノマテリアル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 判定基準に従ってナノマテリアルの皮膚刺激性について評価した。さらに、各組織へのナノマテリアル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 3.13%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と血球とに分離した。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、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製、ヘマトキシリン-エオジン染色、所見の評価）は病理検査会社に依頼した。また、回収した血液を用いて、血漿中のアラニ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。測定には、生化学分析装置 FUJIDRICHEM 7000 (FUJIFILM) を用いた。

## C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

### D. 考察

#### 1. ROS 産生に着目した非晶質ナノシリカの 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、非晶質ナノシリカの DNA 酸化修飾誘発能を検討する目的で、nSP70、

nSP300, mSP1000 を様々の濃度で作用させた HaCaT を用いて 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 1)。これらの結果より、非晶質ナノシリカ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ナノシリカは、従来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判明した。

そこで次に、非晶質ナノシリカ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、nSP70, nSP300, mSP1000 を HaCaT 細胞に添加した 3 時間後の細胞内における ROS 量を DCFH 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 2)。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 3)。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、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 時間後にコメットアッセイを実施したところ、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 4)。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。これまでに、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ナノマテリアルの創製が実現するものと考えられた。

## 2. カーボンナノチューブおよびフラーレンの 21/28 日間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 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変化や死亡、肉眼的変化 (ドレイズ試験) は認められなかった (図 5、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。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成績において、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、活性化部分トロンボプラスチン時間の測定において統計学的な有意差が散発的に認められた (図 6、7、8)。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だろう。以上、CNT やフラーレンに関して、これらの素材が適切に経皮使用される場合、安全性に大きな懸念は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、一日最大摂取量 (ADI) を特定する必要があるものと

考えられた。

## E. 結論

以上、本年度は nSP70 による遺伝子損傷発現には活性酸素種の産生が関与していること、CNT や C60 が経皮毒性を殆ど示さないことを明らかとした。現在、これらの情報・手法を基盤として、酸化チタン、酸化亜鉛、白金ナノコロイド、フラーレン、カーボンナノチューブ等のサンプルに関して各々の素材の物性と有害性や体内動態との関連を解析すると共に、ROS 産生を誘導しない安全なナノマテリアルの設計を目指して、ナノシリカの表面性状と遺伝子損傷発現との関連について解析を進めている。尚、OECD スポンサーシッププログラムへの対応に向けて、本項で得た結果を提出する予定にしている。

## 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 1 件】**
1. 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(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