

該当なし

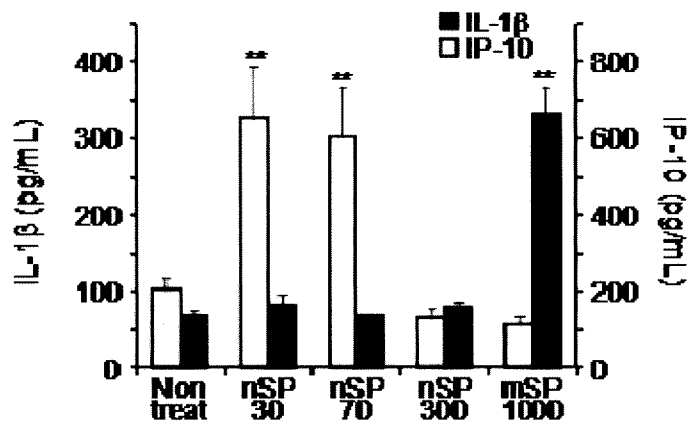
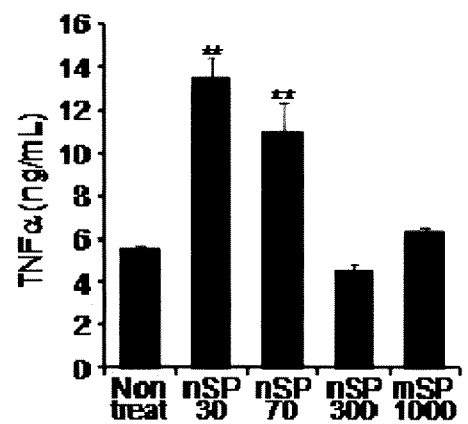
② 実用新案登録

該当なし

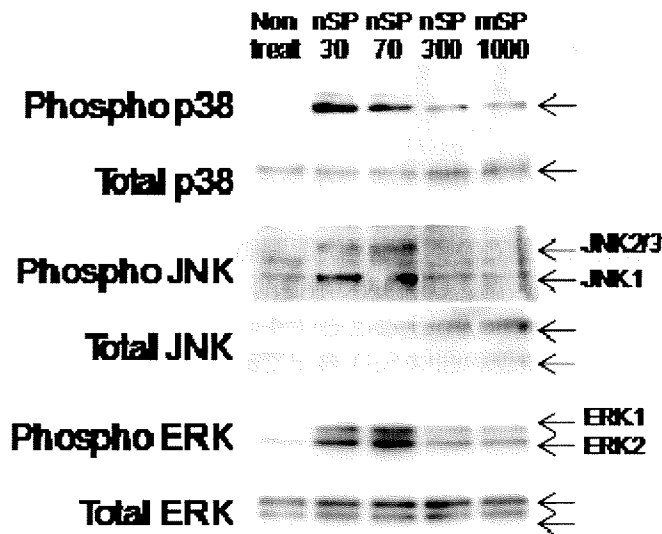
その他

研究協力者

森重智弘、稲倉裕、成松翔伍

(A)**(B)****Figure 1. in vitro**におけるシリカの粒子径と起炎性の連関

(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。

**Figure 2. 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。

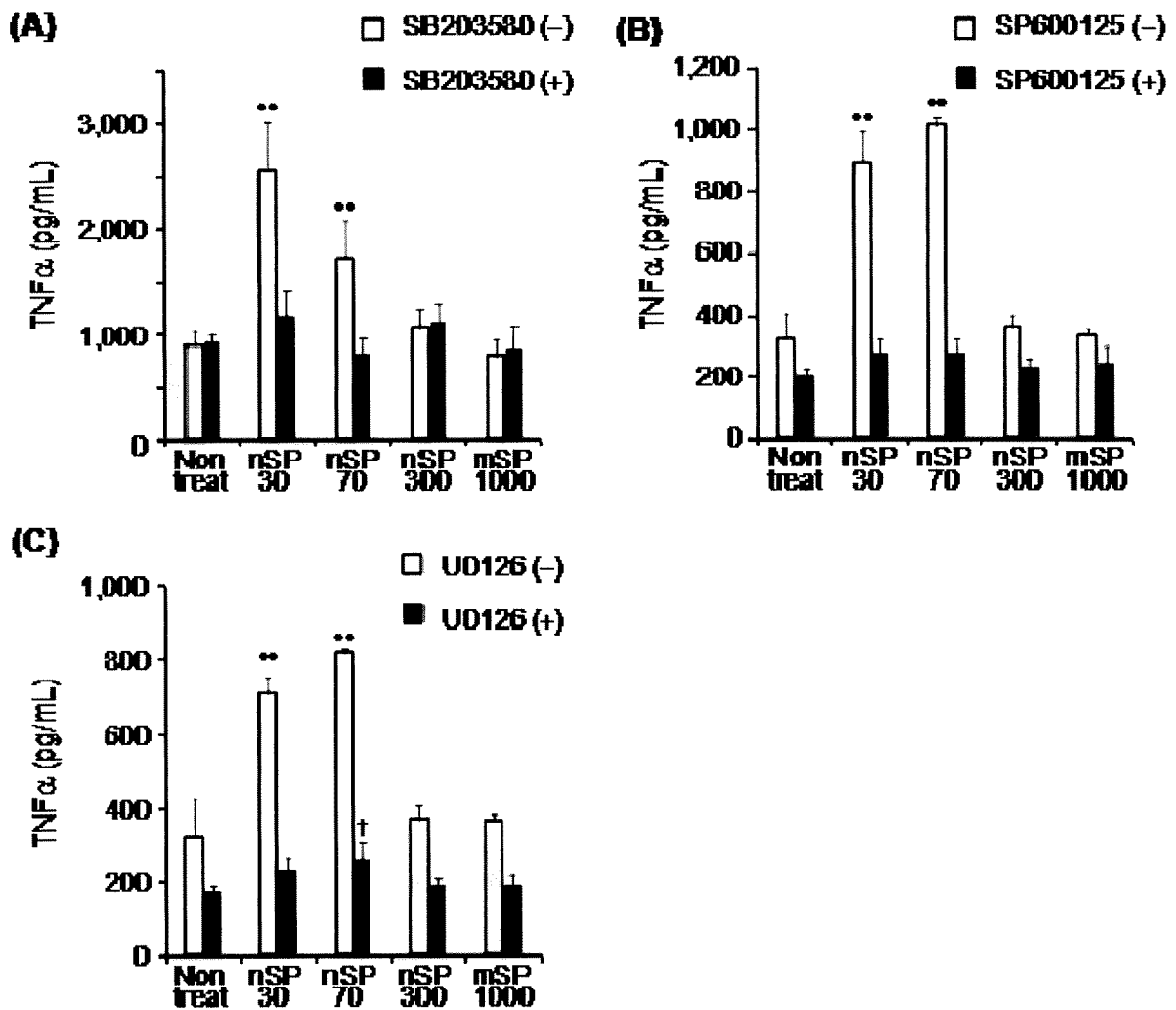


Figure 3. MAPK の阻害剤条件下での TNF α 産生能評価

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 α 産生量を評価した。誤差範囲は S.D. 表記である。

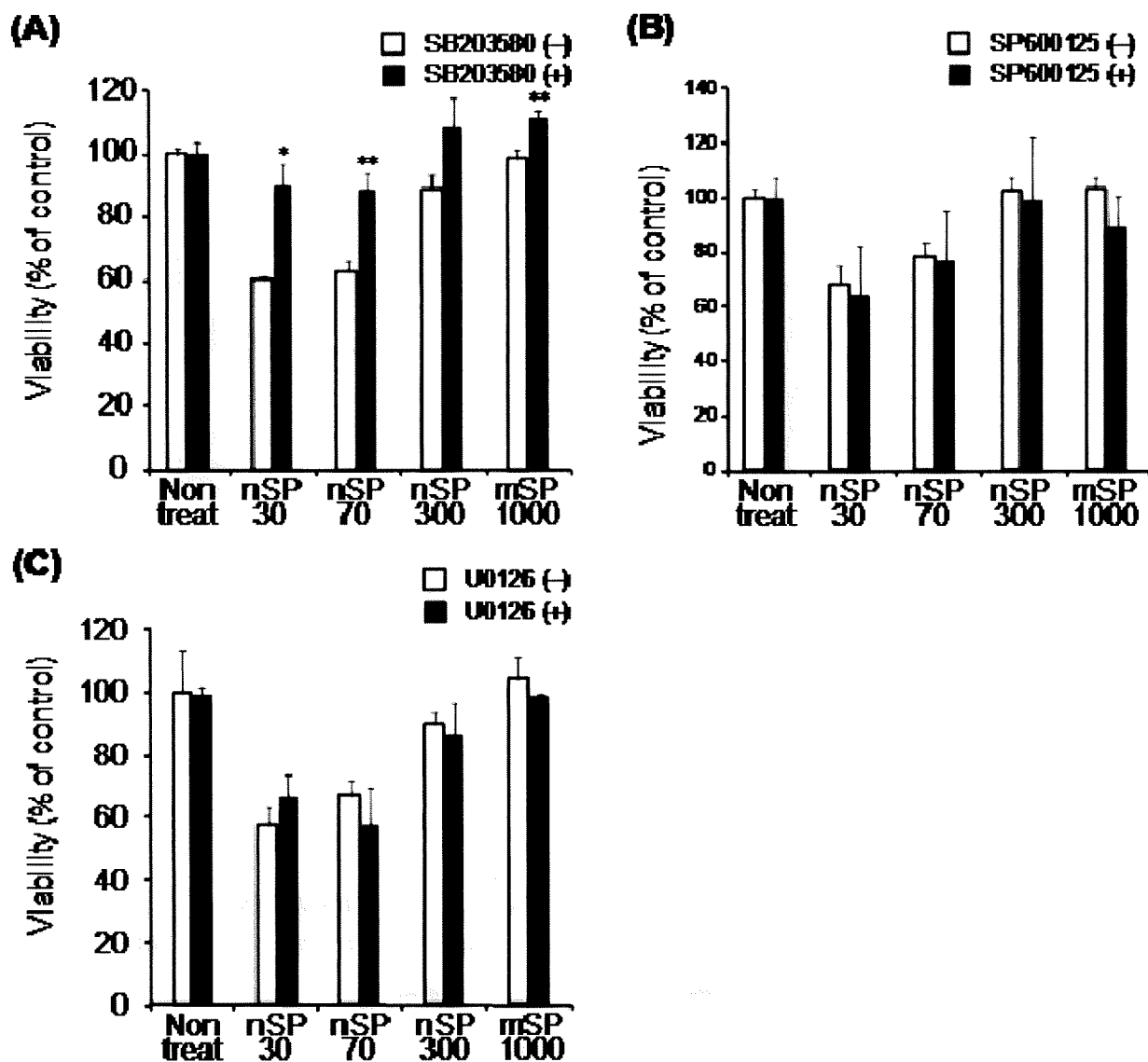


Figure 4. MAPK 阻害剤条件下での細胞傷害性評価

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。

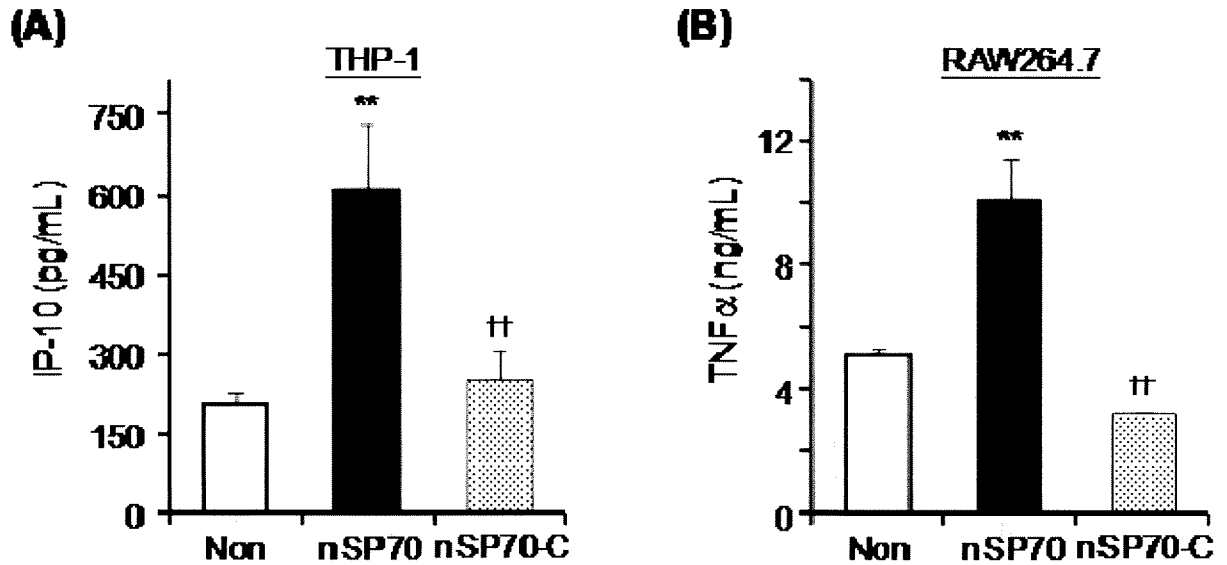


Figure 5. nSP70-C の起炎性評価

(A) THP-1 細胞、(B) RAW264.7 細胞を、nSP70、nSP70-C (100 μ g/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) TNF α の産生量を評価した。誤差範囲は S.D. 表記である。

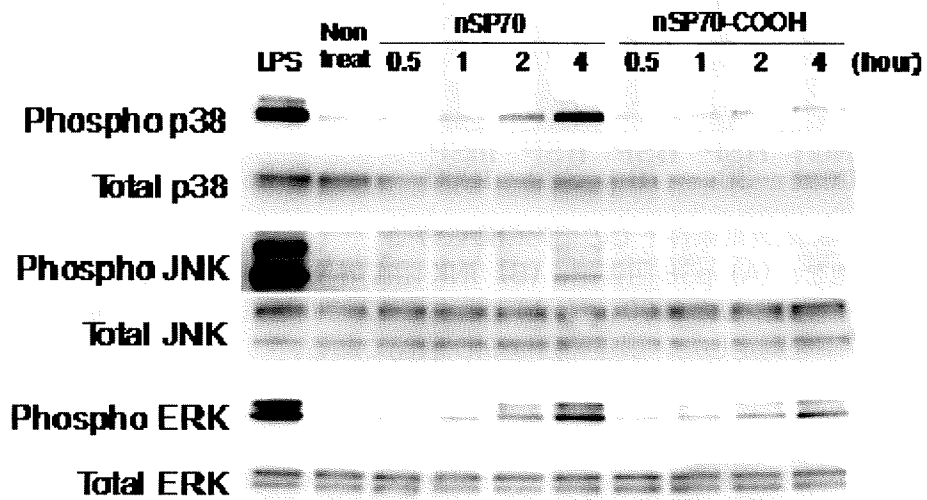


Figure 6. nSP70-C の MAPK 活性化能評価

RAW264.7 細胞を、nSP70、nSP70-C (100 μ g/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。

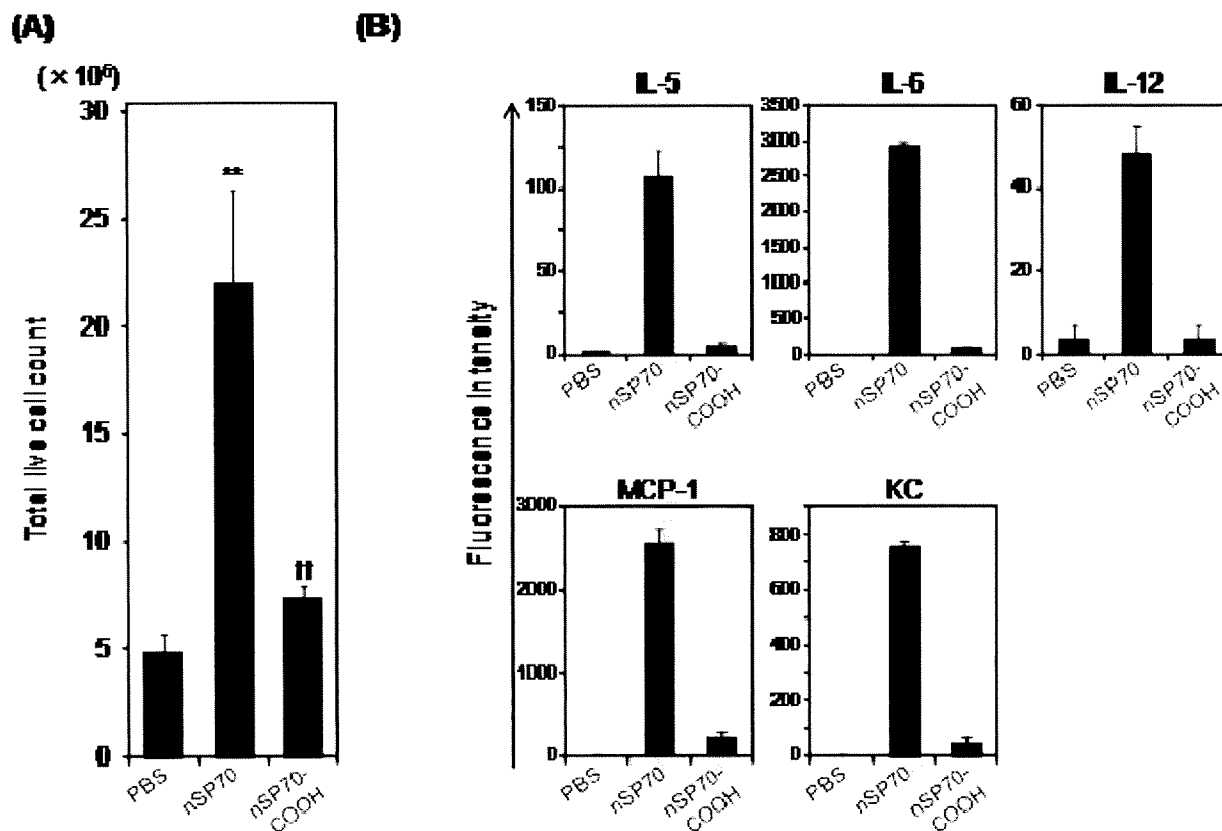


Figure 7. nSP70-C の in vivo における起炎性評価

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。

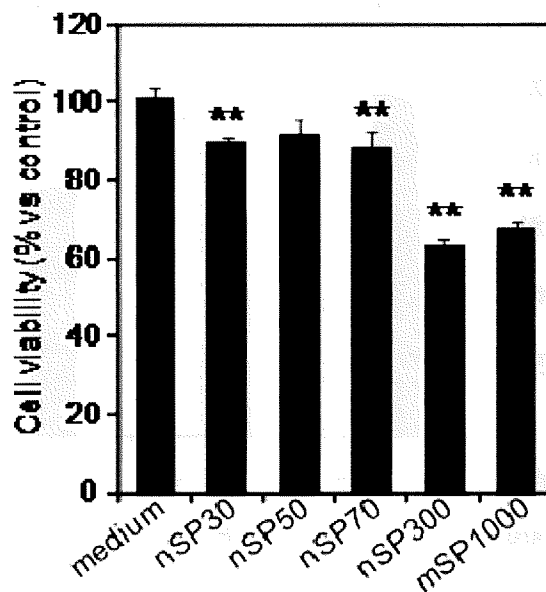


Figure 8. シリカの細胞傷害性評価

THP-1 細胞を各粒子径のシリカ (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 存在下で 24 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。

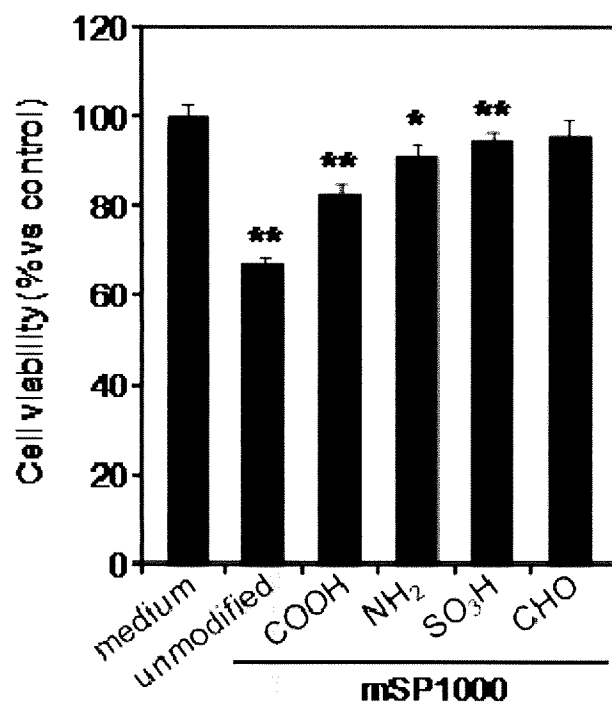


Figure 9. 表面修飾 mSP1000 の細胞傷害性評価

THP-1 細胞を表面修飾を施した各 mSP1000 (100 µg/mL) 存在下で 24 時間培養した後、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。

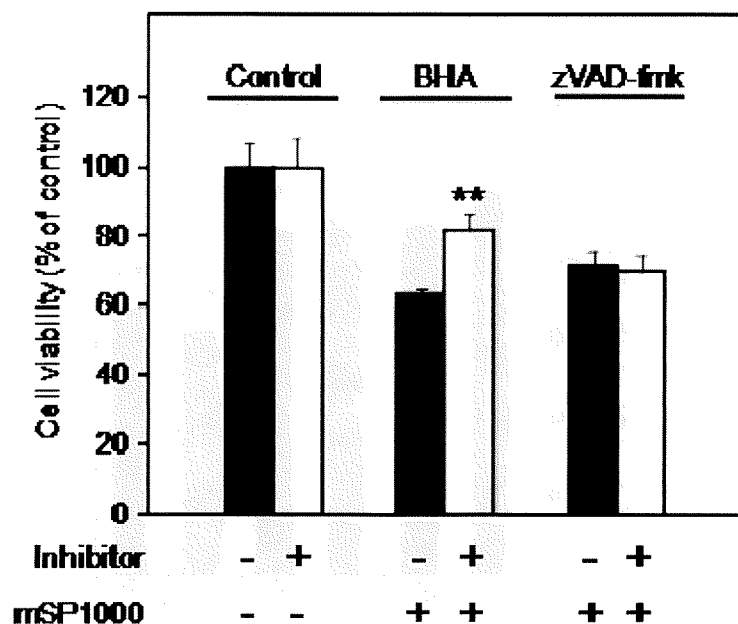


Figure 10. mSP1000 により誘導される細胞死の ROS 及び caspase 依存性

THP-1 細胞を、BHA または zVAD-fmk 存在・非存在条件下で mSP1000 (100 µg/mL) とともに、24 時間作用させた。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。

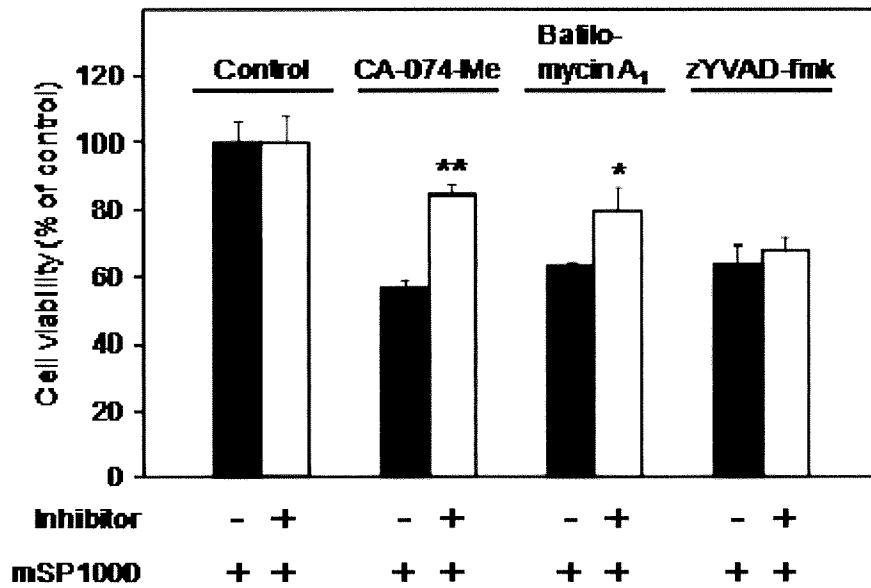


Figure 11. mSP1000 により誘導される細胞死と cathepsin B 及び caspase-1 との連関
 THP-1 細胞を、CA-074-Me、bafilomycin A₁ または zYVAD-fmk の存在・非存在条件下で mSP1000 (100 μg/mL) とともに 24 時間作用させた。その後、Methylene blue assay により細胞生存率を測定した。誤差範囲は S.D. 表記である。

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

分担研究者 阿部 康弘 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

近年、ナノマテリアル特有の革新的機能が二面性を呈し、予期せぬ毒性を発現してしまうこと (NanoTox) に対する懸念が高まっている。例えば食品・化粧品として摂取されたNMは、消化管粘膜面や皮膚から吸収され、全身血流に移行し、消化管粘膜・皮膚局所のみならず、脳や肝臓といった全身に分布する危険性が危惧されている。今後NM市場の拡大が続き、様々な健康状態の老若男女が長期間に渡って曝露されることを考慮すると、早急にNanoTox研究を進めることが必要である。しかし、NanoToxに関する研究は世界的にも開始されたばかりであり、曝露されたNMがどの程度体内に吸収され、どこに分布・蓄積し、どのような毒性を発現するかなど、そのリスク評価研究は十分に行われていない。その点、当研究グループでは、100 nm以下の非晶質ナノシリカが、経皮吸収され、全身に分布しうることを世界に先駆けて明らかにすると共に、遺伝毒性や肝毒性などを誘発する可能性を報告してきた。以上の結果は、非晶質ナノシリカ (nSP) に曝露されることで、体内へと侵入したnSPが、生殖器官や胎児へ移行した場合には、予期せぬ生殖発生毒性を発現し得る可能性をも示唆している。胎児や乳幼児は、血液脳関門や免疫系といった生体防御機構が未発達であるため、成人では影響が見られない量の曝露であっても大きな影響が及ぶ可能性がある。そこで本研究では、ナノマテリアルが生体に侵入した後の生殖発生毒性を評価することを目的とし、nSPの胎盤・胎児への移行性の検討を試みた。

A. 研究目的

ナノマテリアルは、組織浸透性・電気/熱伝導性・強度などの点で、従来のマイクロサイズ素材とは異なった画期的機能を発揮することから、種々の産業にパラダイムシフトを起こすものと期待されている。近年、ナノシリカやナノ酸化チタン、フラーレンをはじめとする種々のナノマテリアルが開発され、医薬品や化粧品、食品といった人体に直接適用する分野での実用化が進展しており、既に多くのナノ製品が上市されている。

一方で近年、欧米各国を中心として、ナノマテリアル特有の革新的機能が、二面性を呈してしまい、予期せぬ毒性を発現してしまうこと (NanoTox) に対する懸念が高まっている。例え

ば食品・化粧品として摂取されたナノマテリアルは、消化管粘膜面や皮膚から吸収され、全身血流に移行し、消化管粘膜・皮膚局所のみならず、脳や肝臓といった全身に分布してしまう危険性が危惧されている。今後もナノマテリアル市場の拡大が続き、様々な健康状態の老若男女が長期間に渡って曝露されることを考慮すると、早急に詳細な NanoTox 研究を実施することが必要である。しかし、NanoTox に関する研究は世界的にも開始されたばかりであり、曝露されたナノマテリアルがどの程度体内に吸収され、どこに分布・蓄積し、どのような毒性を発現するかなど、そのリスク評価研究は十分に行われていない。非晶質ナノシリカを食品・化粧品などに添加す

ると食感、使用感が向上することから、近年汎用されつつあり、食品中に最大 2%、化粧品には最大 20%配合されている。この使用基準は、マイクロサイズの新晶質シリカは、経皮・経口投与により体内に移行しないという、過去の知見に基づいて定められている。しかし、ナノマテリアルは優れた組織浸透性から、皮膚バリア・粘膜バリアなど強固な生体バリアを容易に通過することが報告されつつある。さらに胎児や新生児は、血液脳関門や免疫系といった生体防御機構が未発達であることから、ナノマテリアルの体内侵入性・体内動態が成人とは大きく異なることも予想される。従って、非晶質ナノシリカの安全性評価においては、シリカという組成に基づいた安全性評価だけではなく、粒子径や表面電荷といった物性情報を考慮した、動態と安全性との連関解析が必要である。そこで、本研究では、非晶質ナノシリカの物性-動態-生殖発生毒性の連関解析における基盤情報の集積を目的に、粒子径の異なる 3 種の非晶質ナノシリカを用いて、妊娠マウスに投与した場合の体内動態と胎仔に及ぼす影響を評価した。

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 (直径約 70、100、300、1000 nm ; それぞれ nSP70、SP100、nSP300、mSP1000) 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。全ての検討において、使用直前に各粒子を 5 分間超音波処理し、更に 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後、粒子分散液を調製した。

2. 体内動態解析 (in vivo imaging)

妊娠 13 日目の BALB/c マウス (8-10 週齢、雌性、Japan SLC) を使用した。妊娠 16 日目に生理食塩水で 8 mg/ml に調製した nSP70 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。

3. 電子顕微鏡によるナノシリカの動態解析

ナノシリカ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 に調整した 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て氷冷しながら 1 時間振盪し、後固定した。続いて、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。作製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サンプルも観察した。

4. 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 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 1 日 100 μ l (0.8 mg/匹) ずつ 2 日間尾静脈投与し、妊娠 19-20 日目に自然分娩させた。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) を里親として哺育させた。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。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

当研究室ではこれまでに、皮膚に塗布した非晶質ナノシリカが、角質層を通過し、表皮層にまで到達するとともに、全身血流に移行しうることを明らかとしている。そこで、非晶質ナノシリカが血中に移行した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 1)。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たことから、nSP70 は胎盤に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 と同様に非晶質ナノシリカ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仔を回収し、観察した (図 2)。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 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。胎盤は胎仔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、胎仔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、胎仔へも移行するかを検討するために、胎仔の脳と肝臓組織を TEM により観察した (Fig 2)。その結果、nSP300 や mSP1000 は胎仔への移行が観察され

なかった一方で、nSP70 は胎仔の脳や肝臓において観察された。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ことが知られており、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、胎児が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、母マウスの哺育能力や母乳からのナノシリカの影響を除外するために、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 3)、nSP70 投与群で、コントロール群と比較して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 4)、コントロール群と nSP70 投与群で赤血球数、血小板量には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。以上の結果は、母体に非晶質ナノシリカを投与することで、IUGR が誘発される可能性に加え、出生後の免疫機能にも影響を及ぼし、アレルギー性疾患等の発症に関与する可能性を

示唆している。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も調査する予定である。

E. 結論

ナノマテリアルは画期的機能を発揮する一方で、予期せぬ NanoTox を発現しうる可能性が危惧される。しかし、NanoTox に関する知見はまだまだ不十分であり、とりわけ生殖発生に関する知見は皆無である。胎児や乳幼児は、血液脳関門や免疫系といった生体防御機構が未発達であり、長期曝露により生殖発生毒性を生じうることから、ナノマテリアルの生殖発生毒性評価は重要と考えられる。

本観点から我々は、安全なナノマテリアルの開発支援と科学的根拠に基づいた利用指針の作成を目標とし、非晶質ナノシリカの物性-生体内動態-生殖発生毒性の三者連関の解明を推進した。本検討により、非晶質ナノシリカがサブミクロンサイズ以上のシリカとは異なる動態特性を有することを明らかとした。さらに、動態の変化に伴い、生殖派生毒性を惹起しうる可能性を明らかとした。従って、非晶質ナノシリカを安全に使用していくためにも、無作用量や無影響量を決定するとともに、実際に非晶質ナノシリカが曝露される経皮や経口投与による安全性評価を早急に進める必要がある。また今回の検討で、非晶質ナノシリカが、胎盤関門を通過することが示唆されたことから、血液-精巣関門等、他の生殖器官に影響を及ぼすことをも視野に入れた検討が求められる。

現在、非晶質ナノシリカを用い、同じ粒子径でも表面電荷を変化させることで、生殖発生毒性を軽減可能であることを見出すとともに、他のナノマテリアルの生殖発生毒性に関しても検討中である。今後、より詳細に物性-生体内動態-生殖発生毒性の三者連関を解析することで、例えば「この物性のナノマテリアルは、こういった動態を示すため安全である」といった、安全なナノマテ

リルの開発に有用な情報を提供することが可能となり、科学的根拠に基づいたリスク管理やナノマテリアルの社会受容の促進に貢献できるものと期待している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

該当なし

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 1 件】

1. 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(岡山), 2010 年 3 月.

【国内学会発表：合計 11 件】

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 森下裕貴, 吉田徳幸, 藤村真穂, 長野一也, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 吉川友章, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 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., 日本薬学会 第 130 年会, 岡山 (岡山), 2010 年 3 月.
 11. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 吉田徳幸, 藤村真穂, 長野一也, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 吉川友章, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの次世代影響に関する基礎的検討., 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 2 件】**
1. 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.
 2. 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.

3.

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

該当なし

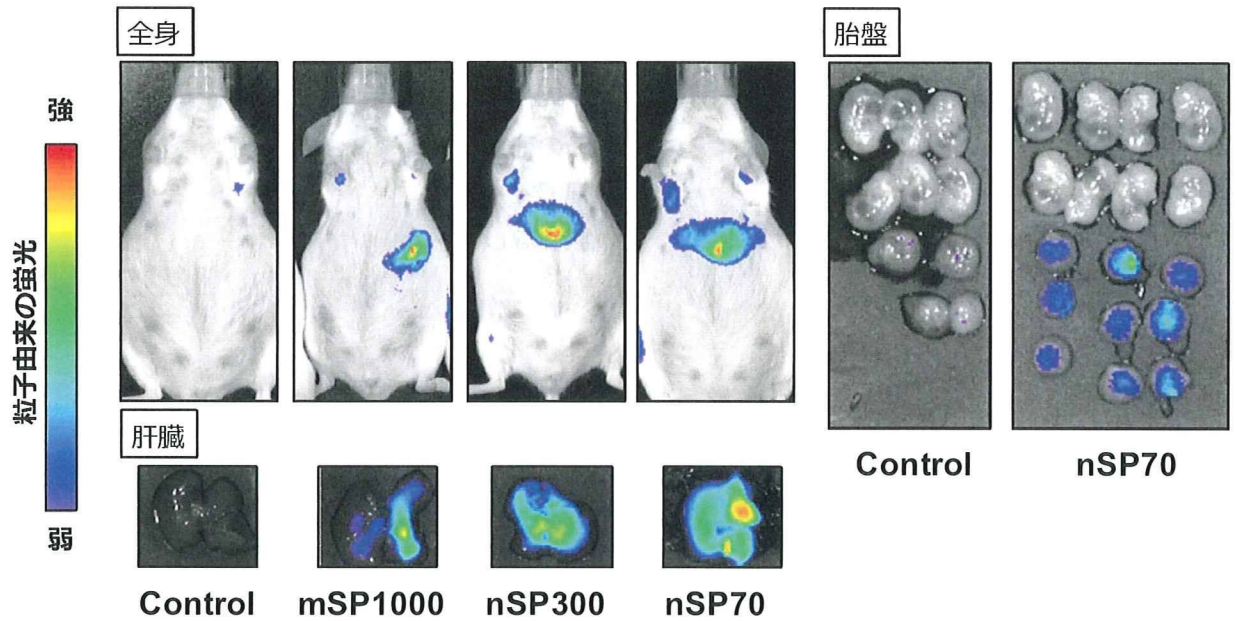


図1 | 妊娠マウスにおけるナノシリカの体内動態(in vivo imaging)

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。

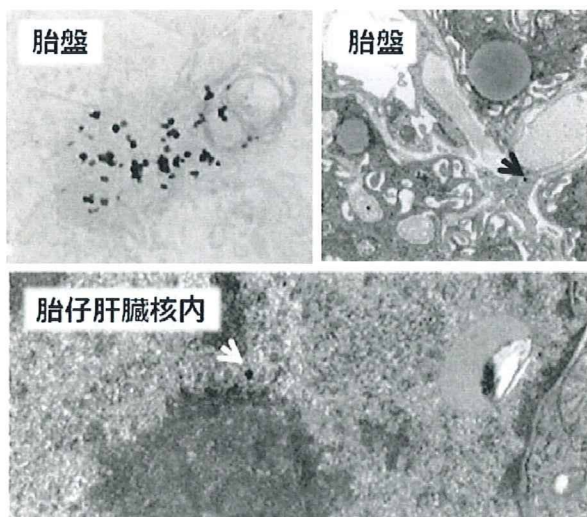


図2 | 妊娠マウスにおけるナノシリカの体内動態

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 は胎盤や胎児にまで到達していた。興味深いことに、nSP70 は胎児肝細胞の核内にまで侵入していた。

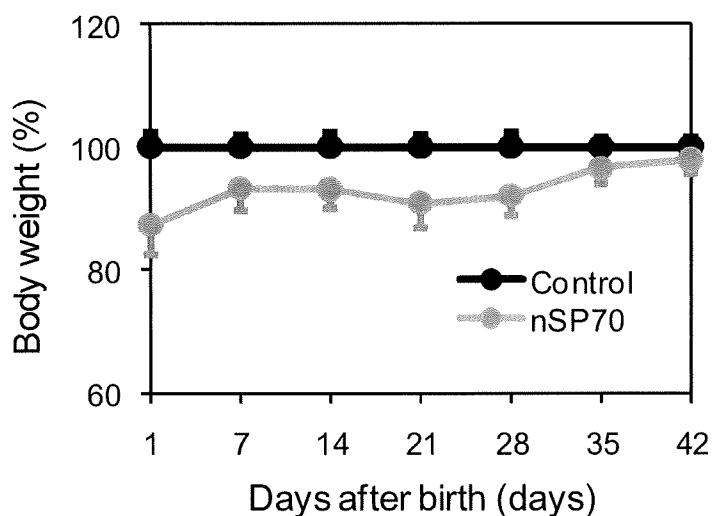


図3 | ナノシリカ曝露の出生後における新生仔の体重変化

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。

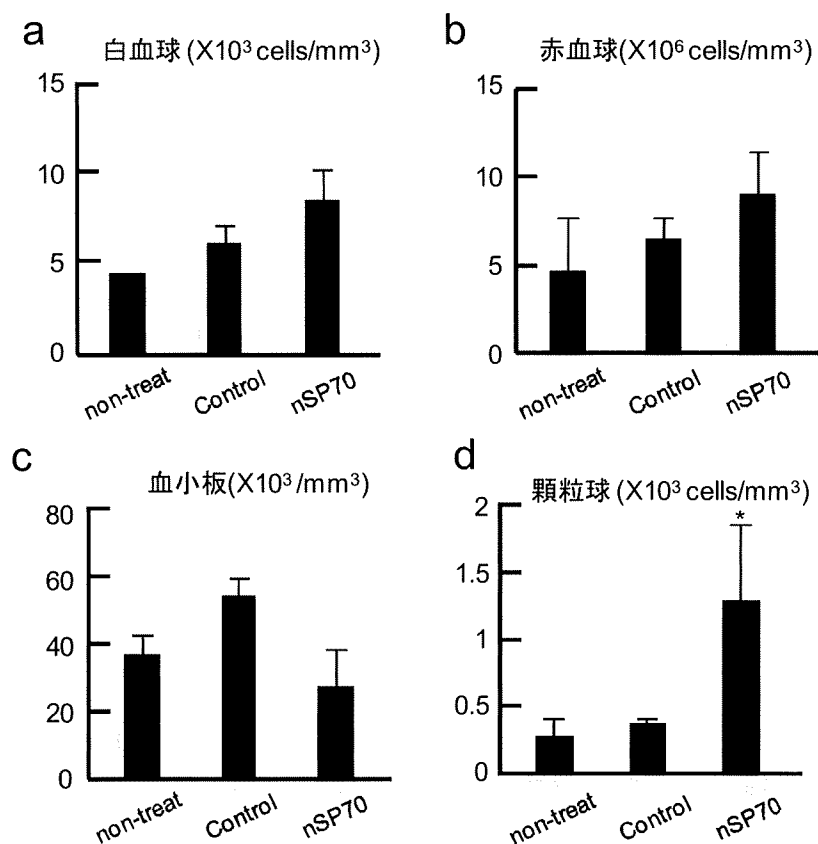


図4 | ナノシリカ曝露の出生後における影響評価

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。

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～

分担研究者 吉川 友章 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

研究要旨

これまでに当研究グループでは、微小な非晶質ナノシリカ（nSP）が物性によっては体内の深部にまで侵入する可能性があり、過度に曝露した場合には、血中に移行した nSP が急性致死毒性を誘発していることを見出している。これらの結果を踏まえると、ナノマテリアル(NM)の物性と体内動態、安全性の三者連関を解析することは NanoTox 解析において極めて重要な課題となる。特に、経皮適用された NM の体内吸収量や、体内曝露した NM の無作用量・無毒性量・一日最大許容量等を算出することは、NM のリスクを評価・管理する上で必要不可欠である。しかしながら、NM の体内動態を定性・定量する手法が未熟な点がボトルネックとなり、現状の NanoTox 研究はハザード評価のみに偏重しているのが現状である。その一方で、体内に侵入した NM は、第一に血液・粘液・胃液・汗/皮脂といった体液中に豊富に存在する蛋白質や脂質、糖質、遺伝子のような生体高分子に接触するものと考えられる。細胞内外の高分子と NM との相互作用は、NM の体内侵入性や滞留性、生体内/細胞内動態、シグナル伝達や細胞分化といった生体恒常性に影響し、NanoTox の起点となり得る非常に重要な現象であると考えられる。従って、NM と生体高分子との相互作用を解析することは、NanoTox を発現しない安全な NM を設計するための指針の抽出に繋がる可能性がある。

以上の観点から、本研究では NM の物性-動態-安全性の三者に加え、NM と生体高分子間相互作用の視点も含めた新たな観点から NanoTox を解析すると共に、走査型 X 線分光顕微鏡による蛍光 X 線イメージングや蛍光 X 線分析による微量元素分析、エネルギー分散型 X 線検出器付き透過型電子顕微鏡解析、誘導結合高周波プラズマ発光分光解析；ICP-AES、などを駆使した NanoTox の曝露閾値の理解に向けたパイロットスタディを実施した。今回は、化粧品 NM として汎用されている nSP を用いて、NanoTox 解析における NM と生体高分子間相互作用の重要性を検証すると共に、主要な血中蛋白質の一つである血液凝固因子と NM との相互作用の視点から nSP の粒子径依存的急性致死毒性発現機構を解析した。

A. 研究目的

近年のナノサイエンス・ナノテクノロジーの発展も相俟って、ナノマテリアル（NM）を配合した化粧品や食品、医薬品などの開発が隆盛を極めている。NM は、サイズ減少効果によって、サブミクロン以上の従来素材とは異なる物性（組織浸透性、電氣的・磁氣的・光学的特性など）を発揮するため、NM の創出・応用を基盤とするナノ産業は技術立国を目指す本邦にとって世界的産業

競争を勝ち抜くための切り札として位置づけられている。しかしながら、近年、NM の革新的な機能が逆に、ヒトの健康に悪影響（NanoTox）を及ぼす可能性が懸念され始めている。従って、NM 配合製品の開発・利用を促進し、産業界が NM の恩恵を最大限に享受するためには、NM が有する二面性を十分に理解した上で、精度や客観性に優れた NM の生体影響評価手法を開発し、NM 配合製品の安全性を迅速に実証・確保していく必要が

ある。本観点から、当該研究事業においては、NanoTox に関する安全性情報の収集と、これを有効活用した安全な NM の設計指針の発信を目的に化粧品基材として汎用されている非晶質ナノシリカ(nSP)の物性と、それを反映した体内動態や安全性との連関解析を推進してきた。

これまでに当研究グループでは、微小な nSP が物性によっては体内の深部にまで侵入する可能性があり、血中に移行した nSP が急性致死毒性を誘発する可能性があることを見出している。これら nSP の検討結果を踏まえると、NM の物性と体内動態、安全性の三者連関を解析することは、NanoTox 解析において極めて重要な課題となる。特に、経皮適用された NM の体内吸収量や、体内曝露した NM の無作用量・無毒性量・一日最大許容量などを算出することは、NM のリスクを評価・管理する上で必要不可欠である。しかしながら、NM の体内動態を定性・定量する手法が未熟な点がボトルネックとなり、現状の NanoTox 研究はハザード評価のみに偏重しているのが現状である。その一方で、体内に侵入した NM は、第一に血液・粘液・胃液・汗/皮脂といった体液中に豊富に存在する蛋白質や脂質、糖質、遺伝子のような生体高分子に接触するものと考えられる。例えば、血液中にはアルブミン (Alb) やイムノグロブリン (IgG)、血液凝固因子、サイトカイン、脂質や糖質といった種々の生体高分子が存在しており、血液中に侵入した NM はこれらの分子と相互作用する可能性が高い。さらに、NM は受容体や細胞膜脂質/糖鎖といった細胞膜上の高分子、核内受容体や細胞内輸送関連分子、遺伝子といった細胞内の高分子に対しても特異的あるいは非特異的に相互作用する可能性がある。細胞内外の高分子と NM との相互作用は、NM の体内侵入性や滞留性、生体内/細胞内動態、シグナル伝達や細胞分化といった生体恒常性に影響し、NanoTox の起点となり得る非常に重要な現象であると考えられる。従って、NM と生体高分子との相互作用を解析することは、NanoTox を発現しない安

全な NM を設計するための指針の抽出に繋がる可能性が考えられる。

以上の観点から、本研究では NM の物性-動態-安全性の三者に加え、NM と生体高分子間相互作用の視点も含めた新たな観点から NanoTox を解析すると共に、走査型 X 線分光顕微鏡による蛍光 X 線イメージングや蛍光 X 線分析による微量元素分析、エネルギー分散型 X 線検出器付き透過型電子顕微鏡解析、誘導結合高周波プラズマ発光分光解析；ICP-AES、などを駆使した NanoTox の曝露閾値の理解に向けたパイロットスタディを実施した。今回は、化粧品 NM として汎用されている nSP を用いて、NanoTox 解析における NM と生体高分子間相互作用の重要性を検証すると共に、主要な血中蛋白質の一つである血液凝固因子と NM との相互作用の視点から nSP の粒子径依存的急性致死毒性発現機構を解析した。

B. 研究方法

1. 非晶質シリカ(SP)

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 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) で標識した SP を実験に供した。

2. 抗凝固剤ヘパリン前投与によるマウス生存率の評価

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 SP 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。

3. 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 に調整した各粒子サイズの SP 分散液を 100 μ l (2 mg/匹) ずつ尾静脈内投与した。投与 5 時間後に、ネンブター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 μ 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 μ 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 μ l を取り、37 $^{\circ}$ C で 1 分間加温後、各血漿をそれぞれ 100 μ 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 μ l 加え、凝固時間を測定した。

4. 血管透過性試験

BALB/c マウスに PBS で 20 mg/ml に調整した各粒子サイズの SP 分散液を 100 μ l (2 mg/匹) ずつ尾静脈内投与した。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、その 30 分後に耳介の色調変化を撮影した。

5. ナノシリカ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回収した。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 \times 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 μ l に対して各粒子サイズの SP を 0.02 mg/ml の濃度でそれぞれ 100 μ l ずつ混合した。37 $^{\circ}$ C で 3 分間インキュベートした後、20 mM CaCl₂ を 100 μ 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 CLOTEK システムにより測定した。

6. ナノシリカの血液凝固第 XII 因子活性化能の評価

健常ヒトから採血を行い、1750 \times g、15 分間、遠心分離して得られた血漿を測定に用いた。37 $^{\circ}$ 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、上記の 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。

7. 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 PBS で 20 mg/ml に調整した nSP70 分散液を 100 μ l (2 mg/匹) ずつ尾静脈内投与した。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 時間振盪した後、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, UK) で包埋した。作製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、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。

9. 誘導結合高周波プラズマ発光分光解析 (ICP-AES) を用いたナノシリカの体内動態追跡

BALB/c マウスに nSP70 を 2 mg/匹で尾静脈内投与した。投与 5 時間後に、ネンブタール麻酔下で脱血死させ、肺及び肝臓を摘出した。この肝臓サンプルを 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. ナノシリカ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うっ血を認めており、血液凝固システムの破綻が可能性として考えられる。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、ハーゲマン因子と呼ばれる XII 因子やフレッチャー因子と呼ばれるプレカリクレイン等の接触因子の活性化が発端となる内因性凝固経路の二つが知られている。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、血液凝固系が全身的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、③SP 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、など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、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 1)。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