

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 19-21 年度 総合研究報告書

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 19-21 年度 総合研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 22 (2010) 年 4 月

# 目次

<b>I. 総合研究報告書</b>	
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
<b>II. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	112
<b>IV. 研究成果の刊行物・別冊</b>	114

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」

総合研究報告書 (H19-H21)

## 「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。しかし世界的に見ても、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、非晶質シリカ (SP) 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、100 nm 以下のサイズの SP (nSP) は、従来までのサブミクロンサイズ以上の SP 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、肝障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、所属リンパ節にまで運搬され、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。さらに種々物性の nSP の毒性評価を実施したところ、100 nm 以下のサイズの nSP が、1) nSP によって生ずる DNA 損傷作用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、ナノ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、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。

## A. 研究目的

本邦のナノマテリアル (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 (nSP) やナノ酸化チタン、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 以上のマテリアル”は皮膚の細胞間を通過できないため、従来までの化粧品は基本的に、肌の表面で無害に留まっていた。しかし昨今、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

通過し、遺伝子が格納されている細胞核にまで侵入してしまうことも知られている。これら皮膚局所や全身組織に分布した 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連関評価を通して 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た。これらの背景を踏まえて、以下に、厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業 (平成 19~21 年) で得られた成果を年度ごとに記述する。

**略語：**

ナノマテリアル：NM

シリカ (ナノシリカを含む)：SP

ナノシリカ：nSP

## B. 研究方法

### 1. ナノシリカ (nSP)

本研究では、マイクロモッド社より販売されている粒径 70 nm、300 nm、1000 nm の Red-F (赤色蛍光色素) 標識 nSP、DY676 標識 nSP、FITC 標識 nSP および未標識の nSP を用いた。各粒径の SP の水溶液中での粒径は、動的光散乱法に基づいて ZetaSizer nano (Malvern Instruments) により計測した。また、同時に表面電位 (Z 電位) も測定した。

### 2. ヒト三次元培養皮膚 (LSE) を用いた皮膚透過実験

各 SP を 25 mg/ml に調製し、必要に応じてメリスチン酸イソプロピル (Nacalai Tesque Inc., JAPAN) を終濃度 5% となるように混合した。ドーナツ型のシリコンリング (TOYOBO, Co. Ltd., JAPAN) にシリコンを薄く塗り、シリコン塗布面を下にして LSE (TOYOBO, Co. Ltd., JAPAN) 中央部に接着させた。その後、6 穴アッセイトレイに 1.2 ml PBS を添加し、その上に LSE を載せたトランスウェル (TOYOBO, Co. Ltd., JAPAN) を移した。シリコンリング中央部へ各種 nSP を 100  $\mu$ L 添加し、37°C、飽和蒸気圧、5% 炭酸ガス気相下で 9 時間培養した。その後、LSE を載せたトランスウェルを 6 穴アッセイトレイからはずし、PBS で 3 回 wash することで LSE 表面に付着した SP を完全に取り除いた。SP 塗布部の LSE をトランスウェルから 8 mm $\phi$  バイオプシーパンチ (TOYOBO, Co. Ltd., JAPAN) を用いて回収した。そして SP の皮膚透過性を LSE、ならびにアッセイトレイに残存した PBS 溶液を用いて各 SP の透過量を測定した。

### 3. ブタを用いた血中移行性ならびに皮膚・生体毒性に関する検討

各 SP を 25 mg/mL に調製し、必要に応じてメリスチン酸イソプロピル (Nacalai Tesque Inc., JAPAN) を終濃度 5% となるように混合した。体重 35 kg 付近の系統間三元交雑豚 (LWD; IVTeC Co., Ltd, JAPAN) の耳の内側に各種 SP を 1 mL、

21 日間連続塗布した。その後、系統間三元交雑豚を「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に基づいて安楽死させた後、血清、耳、肝臓を回収した。その後、回収した臓器を用いて SP の皮膚透過性 (血中移行量の定量)、皮膚、肝臓切片の蛍光顕微鏡観察による SP の透過像観察を実施した。

### 4. nSP の細胞傷害性評価

HaCaT あるいはランゲルハンス細胞株 XS52 (Dr. Takashima, The University Toledo より分与) を 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し、24h 後に各濃度の各 SP を添加した。18h 後 [ $^3$ H]-thymidine を 1  $\mu$ Ci/well 添加し、さらに 6h 培養後、セルハーベスターにより細胞を回収し、放射活性をシンチレーションカウンター (TopCount NXT, PerkinElmer) により測定した。

### 5. nSP の急性毒性の評価

種々の濃度の nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000、nSP70-N、nSP70-C を BALB/c マウス (雌性、8 週齢) の尾静脈内より投与し、生存率および形態・行動変化を経時的に観察した。また、投与 6 あるいは 24 時間後に各マウスから眼底採血により血液を回収し、血液生化学検査 (AST/ALT 値、 $\gamma$ -GTP 値、乳酸デヒドロゲナーゼ値、アルカリフォスファターゼ値、クレアチニンフォスフォキナーゼ値、アルブミン量、総ビリルビン量、総コレステロール量、血液尿素窒素値、アンモニア値) を実施した。さらに、各粒子を投与したマウスから肝臓・腎臓・脾臓・肺・脳をはじめとする主要臓器を回収し、これらの組織は病理学的検査に供した。

### 6. nSP のトキシコプロテオーム解析

HaCaT 細胞を 150 $\phi$  ディッシュに播種し、各粒径の SP を 100  $\mu$ g/ml となるように添加し、24h 共培養した。その後細胞をセルスクレイパーで回収し、2D-DIGE 細胞溶解液に懸濁、さらに超音波処理を行うことで蛋白質を抽出した。2D-Quant Kit により蛋白質量を定量し、無処理、SP 処理群について 2 次元ディファレンシャル電

気泳動(2D-DIGE)解析 (pIレンジ 3-10, 12.5% SDS) によりプロテオームの変動を比較した。また、核を単離して、オルガネラレベルでのプロテオームの変動も同様に 2D-DIGE により解析した。

## 7. In vivo imaging による nSP の体内動態挙動解析

各 SP の in vivo 動態のトレースには、生体透過性の高い波長の蛍光を発する DY676 標識 SP (SP-DY) を用いた。アルファルファ・フリーの飼料で飼育したヘアレスマウス (HR-1) に各 SP を  $7 \times 10^{10}$  particle/head で静脈内投与し、イソフルラン麻酔下で経時的に in vivo imaging system (IVIS 200, Xenogen Inc.) で解析した。

## 8. マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 における細胞傷害性評価

RAW264.7 細胞は 10%ウシ胎児血清 (FCS) 及び抗生物質を含む DMEM にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells の RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、各 SP を 0.8、4、20、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (最終濃度) で作用させた。24 時間または 72 時間培養を行った後、メチレンブルーあるいは WST 法をもちいて細胞生存率を測定した。

## 9. RAW264.7 細胞における SP の取り込み

96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells の RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、各 SP を 20、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (最終濃度) で作用させた。24 時間培養後、蛍光顕微鏡 (BZ-8000、KEYENCE) により細胞を観察した。

## 10. SP 作用により誘導されるオートファジーに関する検討 (MDC 染色)

96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells の RAW264.7 細胞を播種し、37°C 飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、各 SP を 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (最終濃度) で作用させた。8 時間培養後に MDC (Sigma) を 12  $\mu\text{M}$  (最終

濃度)、10 分間、37°C 作用させた。溶液を除去後、3% paraformaldehyde で 30 分固定、洗浄した後、蛍光顕微鏡 (BZ-8000、KEYENCE) により細胞を観察した。また、ポジティブコントロールとして RAW264.7 細胞にオートファジーを誘導することが報告されている、LPS (Sigma) (100 ng/ml) と ZVAD (Calbiochem) (50  $\mu\text{M}$ ) を併用した群についても同様に検討した。

## 11. SP 作用により誘導されるオートファジーに関する検討 (GFP-LC3)

96 穴プレートに  $1 \times 10^4$  cells の RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、OPTI-MEM (Sigma) 中で Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い pEGFP-LC3 (大阪大学微生物学病研究所吉森先生より供与頂いた) を 200 ng/well で細胞へトランスフェクションした。24 時間培養後に培地を除去し各 SP を 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (final 濃度) で作用させた。12 時間後に蛍光顕微鏡により細胞を観察した。また、ポジティブコントロールとして RAW264.7 細胞にオートファジーを誘導することが報告されている、LPS (100 ng/ml) と ZVAD (50  $\mu\text{M}$ ) を併用した群についても同様に検討した。

## 12. 神経幹細胞における細胞傷害性並びに取り込みに関する検討

神経幹細胞は DMEM/F12 (GIBCO/BRL) を基本培地とし、EGF、bFGF 等の各種添加剤を加えて継代培養に用い、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96 穴プレートに  $2 \times 10^4$  cells の神経幹細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、各 SP を 20、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (最終濃度) で作用させた。24 時間または 72 時間培養を行った後、WST-1 を 20  $\mu\text{l}/\text{well}$  で添加し、6 時間 37°C で培養後、吸光度 (455-600 nm) を測定した。また、各 SP 作用後 24 時間後の細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

## 13. 血管内皮細胞における細胞傷害性並びに取



### り込みに関する検討

ヒト脳血管内皮細胞 (HuBME)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HuVEC)、ヒト皮膚血管内皮細胞 (HuADM)、ヒト肺血管内皮細胞 (HuLME) は、抗生物質を含む CS-C 培地にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。なお、細胞培養にはコラーゲンコートされた器材を使用している。96 穴プレートに  $5 \times 10^3$  cells の HuBME、HuVEC、HuADM、HuLME 細胞を播種し、37°C あるいは 4°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、各 SP を 0.8、4、20、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (final 濃度) で作用させた。24 時間または 72 時間培養を行った後、25%グルタルアルデヒドにて細胞を固定した。洗浄後 0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色し、96 穴プレートを洗浄・風乾した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度 (655-415 nm) を測定し、比活性を評価した。また、各 SP 作用後 24 時間後の細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

### 14. 血管内皮細胞の IL-8 産生に関する検討

96 穴プレートに  $5 \times 10^3$  cells の HuBME、HuVEC、HuADM 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、各 SP を 20、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (最終濃度) で作用させた。24 時間培養した後、培養上清を回収、200 倍に希釈して IL-8 ELISA kit (R&D Systems)にて IL-8 量を測定した。なお、ポジティブコントロールとしてリコンビナント human TNF- $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ : 10 ng/ml)、LPS (30、300 ng/ml) 作用群も測定した。

### 15. SP の細胞内動態解析

各 SP を培養液中にそれぞれ 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  および 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の割合でスライドグラス上に培養した HaCaT 細胞に処置した。対照は無処置とした。培養細胞は処置 24 時間後、冷 2.5% グルタルアルデヒド液で 1 時間固定後、0.1 M リン酸緩衝液で洗浄し、1%四酸化オスミウムで 30 分間後固定し、上昇エチルアルコールで脱水した。常法

に従い、エポキシ樹脂で包埋し、熱重合により硬化させた。

### 16. 電子顕微鏡を用いた SP の生体内動態解析

nSP は注射用水あるいはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁し、投与量 2 mg/mouse (ほぼ 100 mg/kg に相当)、対照として注射用水 (あるいは PBS) のみをそれぞれ雌 BALB/c マウス各 1 匹に尾静脈内から投与した。但し、nSP70 を 2 mg/mouse 投与すると十数時間以内にマウスが死亡するため、この群のみ 0.6 mg/mouse (ほぼ 30 mg/kg に相当) の投与量とした。投与 24 時間後、フェノバルビタールで麻酔・屠殺後、肝臓、肺臓、大脳 (皮質)、腎臓 (皮質)、心臓、脾臓、鼠頸リンパ節を摘出し、直ちに冷 2.5% グルタルアルデヒド溶液で 2 時間固定し、0.1 M リン酸緩衝溶液で洗浄後、1% 四酸化オスミウム溶液で 1 時間後固定し、上昇エタノールで脱水した。常法に従いエポキシ樹脂で包埋し、熱重合で硬化させた。標本はダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛の二重電子染色後、電顕で観察した。但し、直径が 70 nm の nSP は、染色することにより確認が困難になるため無染色での観察も行った。なお、nSP の胎児、胎盤への移行性は、妊娠 16 日目の妊娠マウスに 70 nm の nSP を尾静脈より単回投与し、24 時間後に胎児、胎盤を回収することで評価した。これらの組織から常法に従って超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察に供した。

### 17. nSP の急性毒性

種々の濃度の nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000、nSP70-N、nSP70-C を BALB/c マウス (雌性、8 週齢) の尾静脈内より投与し、生存率および形態・行動変化を経時的に観察した。また、投与 6 あるいは 24 時間後に各マウスから眼底採血により血液を回収し、血液生化学検査 (AST/ALT 値、 $\gamma$ -GTP 値、乳酸デヒドロゲナーゼ値、アルカリフォスファターゼ値、クレアチニンフォスフォキナーゼ値、アルブミン量、総ビリルビン量、総コレステロール量、血液尿素窒素値、

アンモニア値) を実施した。さらに、各粒子を投与したマウスから肝臓・腎臓・脾臓・肺・脳をはじめとする主要臓器を回収し、これらの組織は病理学的検査に供した。

#### 18. SP 依存的肝傷害の用量依存性に関する検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、各 SP を 0~60 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。SP は注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。投与 12 時間後に心採血により血清を回収した。また、脱血後、肝臓を採取した。SP の肝臓への影響を評価するため、肝傷害の指標として血清中の ALT 値の測定を行った。加えて、血清中の炎症性サイトカインである IL-6、TNF- $\alpha$ 濃度、また BUN 値を測定し、さらに肝臓の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、組織傷害を観察した。

#### 19. 腎・肺・脾臓の組織傷害の観察

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、各 SP を種々の用量で尾静脈内に単回投与した。SP は注射用水を用いて希釈し、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。投与 24 時間後に脱血後、腎臓、肺、脾臓また肝臓を採取し、HE 染色を行い、組織レベルでの傷害を解析した。

#### 20. SP 投与による炎症性サイトカインの発現

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、各 SP を種々の要領で尾静脈内に単回投与した。SP は注射用水を用いて希釈し、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には同量の注射用水を投与した。投与 3、6 時間後に心採血により血清を回収した。SP の肝臓への影響を評価するため、血清中 IL-6、TNF- $\alpha$ 濃度の測定を行った。

#### 21. 四塩化炭素の肝毒性に対する SP 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、続いて各 SP を種々の用量で尾静脈内に投与した。SP 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 群には同量の

注射用水を投与した。投与 24 時間後に心採血により血清を回収した。肝傷害の指標として血清中の AST、ALT 活性の測定を行った。

#### 22. パラコート・シスプラチンと nSP70 の併用毒性

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、パラコートを 50 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて SP を種々の用量で尾静脈内に投与した。また、シスプラチンは 100  $\mu$ mol/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて各 SP を種々の用量で尾静脈内に投与した。SP 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 群には同量の注射用水を投与した。投与 24 時間後に血清を回収し、ALT 活性の測定を行った。

#### 23. 肝実質細胞に対する SP の影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウス (雄、8W) より肝実質細胞をコラゲナーゼ灌流法により採取した。96 穴プレート (FALCON) に肝細胞 ( $5 \times 10^3$  cells/well) を播種し、細胞播種 6 時間後に粒径 70・300・1000 nm の SP を濃度 0.1、1.0、10.0、50.0、100  $\mu$ g/ml を添加した。添加の際の培養液は William's Medium E を用いた。粒子添加 24、48 時間後に WST 法により生存細胞数を測定した。

#### 24. Tight junction (TJ) に対する nSP の影響

96 穴プレート (FALCON) に Caco2 細胞 ( $1 \times 10^4$  cells/well) を播種し、細胞播種 24 時間後に粒径 70・300・1000 nm の SP を濃度 0.1、1.0、10.0、50.0、100  $\mu$ g/ml を添加した。添加の際の培養液は DMEM を用いた。nSP 添加 24、72 時間後に WST 法により生存細胞数を測定した。さらに、Caco2 細胞を Transwell (Corning) に播種し、TER 値を安定後、粒径 70・300・1000 nm の SP を 100  $\mu$ g/ml を添加し、添加 6、12、18、24 時間後の TER 値を測定した。

#### 25. nSP の経皮投与後の体内動態追跡

nSP は注射用水あるいはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁し、投与量 2 mg/mouse (ほぼ 100 mg/kg に相当)、対照として注射用水 (あるいは PBS) のみをそれぞれ雌 BALB/c マウス各

1匹に尾静脈内から投与した。但し、nSP70を2 mg/mouse 投与すると十数時間以内にマウスが死亡するため、この群のみ 0.6 mg/mouse (ほぼ 30 mg/kg に相当) の投与量とした。投与 24 時間後、フェノバルビタールで麻酔・屠殺後、肝臓、肺臓、大脳 (皮質)、腎臓 (皮質)、心臓、脾臓、鼠頸リンパ節を摘出し、直ちに冷 2.5% グルタルアルデヒド溶液で 2 時間固定し、0.1 M リン酸緩衝溶液で洗浄後、1% 四酸化オスミウム溶液で 1 時間後固定し、上昇エタノールで脱水した。常法に従いエポキシ樹脂で包埋し、熱重合で硬化させた。標本はダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛の二重電子染色後、電顕で観察した。但し、直径が 70 nm の nSP は、染色することにより確認が困難になるため無染色での観察も行った。なお、nSP の胎児、胎盤への移行性は、妊娠 16 日目の妊娠マウスに 70 nm の nSP を尾静脈より単回投与し、24 時間後に胎児、胎盤を回収することで評価した。これらの組織から常法に従って超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察に供した。

#### 26. nSP の急性毒性に与える表面性状の影響

種々の濃度の nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000、nSP70-N、nSP70-C を BALB/c マウス (雌性、8 週齢) の尾静脈内より投与し、生存率および形態・行動変化を経時的に観察した。また、投与 6 あるいは 24 時間後に各マウスから眼底採血により血液を回収し、血液生化学検査 (AST/ALT 値、 $\gamma$ -GTP 値、乳酸デヒドロゲナーゼ値、アルカリフォスファターゼ値、クレアチニンフォスフォキナーゼ値、アルブミン量、総ビリルビン量、総コレステロール量、血液尿素窒素値、アンモニア値) を実施した。さらに、各粒子を投与したマウスから肝臓・腎臓・脾臓・肺・脳をはじめとする主要臓器を回収し、これらの組織は病理学的検査に供した。

#### 27. nSP の細胞膜障害性

nSP の細胞膜傷害性は、96 穴プレートに予め播種した XS52 細胞 ( $10^4$  個) に対して、種々の

濃度の nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000、nSP70-N、nSP70-C を添加して共培養した。24 時間に回収した培養上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) の量を LDH release assay kit (Wako purechemical co. Ltd.) を用いて定量した。

#### 28. サイトカイン産生能の評価

96 穴プレートに  $1.5 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ l/well でマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 12 時間培養を行った後、これらの細胞に対して 10% FBS 含有 DMEM で希釈した各濃度の nSP を、単独あるいは LPS や *S. aureus* 由来の lipoteichoic acids (LTA-SA) と共に添加した。さらに 4、12、24 時間後、培養上清中の TNF- $\alpha$ 、IL-6 量を BD OptEIA ELISA KIT のプロトコールに準じて測定した。

#### 29. Ames 試験

本試験においては、ヒスチジン要求性ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) である TA100 株および TA98 株を用いた。種々の濃度の nSP と対数増殖期にある TA98 あるいは TA100 株とを混合し、37°C で 20 分間インキュベートした。この溶液に対して 45°C で保温しておいた 10 倍容量の軟寒天培地を添加・混合し、ヒスチジンを含まない寒天培地に播種した。37°C で 48 時間培養した後に、寒天培地上に形成したコロニー数を計数した。

#### 30. DNA 傷害性の評価 (コメットアッセイ)

100 $\phi$ ディッシュに予め播種しておいた HaCaT 細胞に対して、種々の濃度の nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000 を添加し、3 時間インキュベートした。セルスクレイパーを用いて細胞を剥離し、250  $\times$  g で 5 分間遠心した。この細胞をカルシウムならびにマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で再懸濁し、250  $\times$  g で遠心することにより洗浄した。同様の操作で 3 回洗浄した HaCaT 細胞を  $10^5$  cells/ml になるように PBS に懸濁した。これらの細胞懸濁液と PBS で終濃度 1% に調製したアガロース溶液を 1:10

の比率で混合し、Comet Slide (TREVIGEN 社) にプレーティングした。4°C で 10 分間静置することにより、アガロースを固化させた後に細胞を溶解し、25V で 10 分間電気泳動した。この標本に SYBR Green I (Molecular probe) を 50  $\mu$ l 加えて DNA を染色し、蛍光顕微鏡を用いて撮像した (励起波長 : 494 nm、蛍光波長 : 521 nm)。Tail moment ならびに Tail length の算出にはコメットアナライザ (YOUWORKS Co. Ltd.) を使用した。

### 31. 細胞内活性酸素種の検出 (DCFH-DA 法)

100 $\phi$ ディッシュに予め播種しておいた HaCaT 細胞に対して、種々の濃度の nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000 を添加した。3 時間インキュベートしたこれらの細胞を回収・洗浄した後に、DMSO に溶解した DCFH-DA を終濃度 10  $\mu$ M 含有した Phenol Red Free の MEM 培地を添加した。30 分間インキュベートした後に、PBS で細胞を洗浄し、蛍光プレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した (励起波長 : 485 nm、蛍光波長 : 530 nm)。

### 32. NM の経皮吸収性の評価 (28 日塗布試験)

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 回程度拭い、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 リン酸緩衝容液で洗浄後、1 % 四酸化オスミウム溶液で 1 時間後固定し、上昇エタノールで脱水した。常法に従いエポキシ樹脂で包埋し、熱重合で硬化させた。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、透過型電顕で検鏡した。

### 33. 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 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。

### 34. 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 SP 分散液を 100  $\mu$ l (2 mg/ 匹) ずつ尾静脈内投与した。SP 投与 5 時間後に、ネンブター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。

### 35. 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 SP 分散液を 100  $\mu$ l (2 mg/ 匹)

ずつ尾静脈内投与した。SP 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。

### 36. 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  $\times$  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 $\mu$ 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  $\mu$ 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 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。

### 37. 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  $\times$  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 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。

### 38. 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。

### 39. 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。

### 40. 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。

### 41. 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。

### 42. 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。

#### 43. 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。

#### 44. 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 SP (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 SP (100 µg/ml) を 100 µl 添加し、12 時間後、培養上清中の Tumor necrosis factor (TNF) α を enzyme-linked immunoSorbent assay (ELISA) にて測定した。

#### 45. 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 SP (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。メンブレンをブロッキングした後、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。

#### 46. 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 SP (100 µg/mL) を加え、4 時間後、培養上清中の TNFα濃度を ELISA にて測定した。

#### 47. 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 SP 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。

#### 48. 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 SLC 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。SP 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、SP 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。

#### 49. 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 SP 分散液を 100  $\mu$ l (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。

#### 50. 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。

#### 51. 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<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, 過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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。

#### 52. 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<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。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 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℃、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。

### 53. 抗酸化剤存在下における nSP の in vitro 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 損傷性をコメットアッセイを用いて評価した。

### 54. 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 NM サンプル、コントロールサンプルを 200 μl/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) はアブ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)、γ-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。ALT 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 α-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-γ-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ゼン色素を測定した。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、プ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。

#### 55. 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。SP 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。

#### 56. 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。SP 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。この肝臓を 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

以下の D の項に結果および考察として記載。

### D. 考 察

#### 1. ヒト三次元培養皮膚 (LSE) を用いた nSP の皮膚透過実験

ヒト三次元培養皮膚 (LSE) に対する皮膚透過試験は、70 nm、300 nm、1000 nm の SP を LSE 上に添加し、以下の 3 項目について、評価を行った。① LSE の凍結切片を作製し、皮膚内部に含まれる蛍光標識 SP を蛍光顕微鏡により観察する。② LSE を組織溶解剤で溶かし、単細胞を単離した後、細胞内に含まれる蛍光標識 SP をフローサイトメトリーにより検出する。③ LSE 下部へ透過した蛍光標識 SP の量を、PBS 中の蛍光強度を測定することにより概算する。なお、本実験では、化粧品基剤として用いられ、皮膚への化粧品の浸透性を高めるとされる、ミリスチン酸イソプロピル (IPM) を併用した群を取り、その影響についても評価した。回収した LSE の凍結切片を作製し、顕微鏡により観察した (図 1)。その結果、IPM 非適用群では 70 nm、300 nm、1000 nm 全ての群で、SP の透過像は観察されなかった。一方 IPM 適用群では、全ての群にて蛍光が観察された。これは、IPM が経皮吸収促進効果を示したものと考えられた。粒子径の違いによる局在の変化については、1000 nm、300 nm の群では、主に蛍光は角質に留まり、皮膚深部まで到達したものは比較的少量であった。一方、70 nm の nSP を作用させた群では、角質にほとんど蛍光は観察されず、主に皮膚深部に観察された。この実験に使用した SP の単位重量あたりの蛍光強度は、70 nm : 300 nm : 1000 nm = 1 : 4 : 12 であったことから、

nSP70 は効率よく皮膚を透過する可能性が示唆された。

## 2. 皮膚モデル中の SP の検出 (FCM)

回収した LSE をコラゲナーゼ処理により溶解し、単細胞とした。その後、その細胞をフローサイトメトリーにより解析した結果、IPM 作用群、未作用群ともに、十分な蛍光を観察することはできなかった。これは、Red-F 標識 nSP70 の蛍光強度が弱く、十分な感度を得られなかったこと、あるいは、細胞内に取り込まれた nSP70 は微量である可能性が考えられた。いずれにせよ、現段階では、nSP の皮膚透過性をフローサイトメトリーで評価するのは、困難であると考えられた。

## 3. SP の in vitro 皮膚透過量測定

LSE を透過した SP は、下部のウェル内の PBS 中に移行する。そこで、PBS 中の蛍光強度を測定することで、透過量を算出した(図 2)。その結果、IPM の有無に関わらず、nSP70 での LSE の透過が観察された。一方、nSP300、mSP1000 では、全く透過は観察されなかった。今回の検討では、n=3 で行ったものの、nSP70 でも透過するものとし、異なる 2 パターンに別れた。これは、LSE のロットのばらつきによるものと考えられるが、少なくとも、300 nm, 1000 nm のもので透過が観察されなかったことを加味すると、nSP70 は皮膚を透過する能力があるものと示唆される。なお、IPM の効果に関しては、今回の検討のみでは議論することができない。今後は、より n 数を増やした実験を行うことによって信頼性の高いデータを蓄積する。

## 4. ブタを用いた血中移行性、ならびに皮膚・生体毒性に関する検討

ヒトの皮膚と構造が類似すると考えられているブタの皮膚を用い、各 SP の in vivo 皮膚透過性を評価するため、ブタの耳に対し、21 日間に渡り、1 日 1 回の連続塗布を行った。21 日後の塗布が完了したブタを解剖し、耳、血清、ならびに肝臓を回収し、以降の実験に供した。回収した血清を希釈し、その蛍光強度を測定することで、皮膚へ

塗布した FITC 標識 SP の血中への移行性を評価した(図 3)。nSP300、mSP1000 を塗布したブタ血清からは、蛍光は検出されず、これらの SP は血中まで到達できなかった可能性が示唆された。一方、nSP70 を塗布したブタ血清には、投与量の実に 1.7%が残存していることが明らかとなった。今回の実験では、21 日間連続塗布の後の血清を回収しているため、他の臓器への分布や生体からの排泄に関する情報は得られなかったが、少なくとも、皮膚に塗布された nSP70 は、血中へ高い割合で移行することが明らかとなった。今後は、経日的に血清を回収するなどの実験を行うことにより、その nSP70 の血中への移行、残存率などの詳細を評価する予定である。

また、回収した耳、ならびに肝臓の組織切片を作製し、nSP の局在を観察した。プレリミナリーな結果ではあるが、耳の切片では、nSP70 塗布群で強い蛍光が観察された。また、LSE の検討と一致して、皮膚深部まで到達していることが明らかとなった(Data not shown)。今後は、肝臓等の切片を詳細に観察することで、血中への移行後の、臓器分布、生体への影響を検討する予定である。

## 5. SP の細胞傷害性評価

化粧品添加物としての SP の細胞障害性を評価する目的で、まず粒子径 70、300、1000 nm の SP 存在下で培養した際の HaCaT に対する細胞傷害性を [<sup>3</sup>H]-thymidine の取り込みで評価した。その結果、RedF 標識 SP、DY676 標識 SP のいずれの粒子を作用させた細胞においても濃度依存的に細胞増殖の阻害が認められた(図 4)。また、粒子径による明確な違いは認められなかった。次に、皮膚ランゲルハンス細胞株 XS52 に対する影響を検討したところ、粒子径に依存した細胞増殖抑制効果を示し、70 nm 径の粒子が XS52 に対して最も高い細胞毒性を示した(図 5)。XS52 細胞での IC50 値は 70 nm: 4.2 µg/ml, 300 nm: 32.6 µg/ml, 1000 nm: 75.0 µg/ml であった。

## 6. nSP の in vivo 急性毒性の評価

SP の in vivo 急性毒性を評価するため、マウス

に RedF 標識した各 SP を静脈内投与し、その後の生死を観察した。その結果、mSP1000、nSP300 を 2 mg/head 投与しても死亡例は認められなかったが、nSP70 投与群では 18 時間までに 3 例中 3 例が死亡した (図 6)。

### 7. SP のトキシプロテオーム解析

各粒子径の SP の細胞に及ぼす影響を詳細に解析するために、SP を作用させた HaCaT 細胞のプロテオーム変化を 2D-DIGE 法により解析した。無処理細胞と 70 nm、1000 nm 径の SP を作用させた細胞で whole cell プロテオームを比較した結果、nSP70、mSP1000 作用により発現上昇が認められた蛋白質スポットがそれぞれ 25 個、17 個、発現減少が認められたスポットが 8 個、6 個検出された(図 7)。また、nSP70 作用細胞で mSP1000 作用細胞よりも発現上昇していたスポットが 23 個、減少していたスポットが 10 個検出された。さらに、細胞内動態観察によって nSP70 が核に移行することが示唆されたことから、核を単離してオルガネラレベルでのプロテオームを解析した。その結果、nSP70、mSP1000 作用により発現上昇が認められた蛋白質スポットがそれぞれ 147 個、119 個、発現減少が認められたスポットがいずれも 50 個検出された(図 7)。また、nSP70 作用細胞で mSP1000 作用細胞よりも発現上昇していたスポットが 4 個、減少していたスポットが 3 個検出された (図 8)。これら蛋白質スポットについて、質量分析法による同定を進めている。

### 8. In vivo imaging による SP の体内動態挙動解析

経皮適用された NM が皮膚を透過すると全身循環に入ることになる。そこで、SP が静脈内投与した場合の体内挙動の解析を行った。生きたマウスでの経時的な観察を可能とするよう、蛍光色素 Dy676 標識 SP を用いて in vivo imaging system (IVIS 200, Xenogen Inc.) により計測を行った。その結果、いずれの粒子も静注後 3 時間には肝臓に集積する傾向が観察され、その後 6 時

間、24 時間でも同様であった (図 9)。さらに詳細な解析のために 24 時間後に安楽死させ、開腹して臓器分布を評価したところ、肝臓および、特に胆嚢で強い蛍光が観察され、糞便中にも蛍光が認められた (図 10)。

### 9. SP の粒子径測定

Zeta-sizer を用いて動的光散乱法による SP の物理化学的特性の評価を試みたところ、粒子径はほぼカタログ値に近い値として計測された (図 11)。製品ロット間、あるいは蛍光標識の種類によっても、粒子径の値に差が認められた。Z 電位はいずれの粒子でも大差は認められなかった。

### 10. SP が抗原提示細胞株に与える影響

ナノ粒子はあらゆる経路で生体内に取り込まれる可能性がある。化粧品や医薬品として使用される場合は経皮・静脈内経路で、大気汚染物質としてのナノ粒子は、経鼻・経肺経路などで取り込まれるものと考えられる。どの経路で取り込まれた場合にも、各組織に存在するマクロファージ様細胞に貪食されることが予想される。そこでまず、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞に各濃度の SP を 24 時間または 72 時間作用させた際の細胞傷害性についてメチレンブルーアッセイにて検討した (図 12)。その結果、24 時間、72 時間共に各粒子径の SP において、濃度依存的な細胞死が誘導されることが判明した。特に nSP70 において顕著な細胞死が観察された。また、各粒子の細胞傷害性に関して、ミトコンドリアの酵素活性を指標とした WST-1 assay 並びに DNA 合成を指標とした BrdU assay にて同様に検討した (図 13)。その結果、WST-1 assay ではメチレンブルーアッセイと同様に、濃度依存的な細胞傷害性が観察された。一方、BrdU assay においては nSP300、mSP1000 作用群で傷害性は見られなかったものの、nSP70 作用群では強い傷害性が観察された。また、各 SP を作用後 24 時間における細胞を蛍光顕微鏡にて観察した結果、蛍光強度の強い nSP300 及び mSP1000 において、細胞内に取り込まれたと考えられるドット