

図 63. nSP70 とシスプラチン (CDDP) を併用したマウスの急性肝傷害

シスプラチン (CDDP; 50 μ mol/kg body weight) あるいは生理食塩水を腹腔内投与した BALB/c マウス (8~9 週齢、雄性) に対して、nSP70 を 1、3、10 mg/kg body weight の用量で尾静脈内に投与した。24 時間後に回収した血清中の AST、ALT、BUN の活性を測定し、これらの値を指標に併用毒性を評価した。**: $p < 0.01$ *: $p < 0.05$ vs. saline, only CDDP

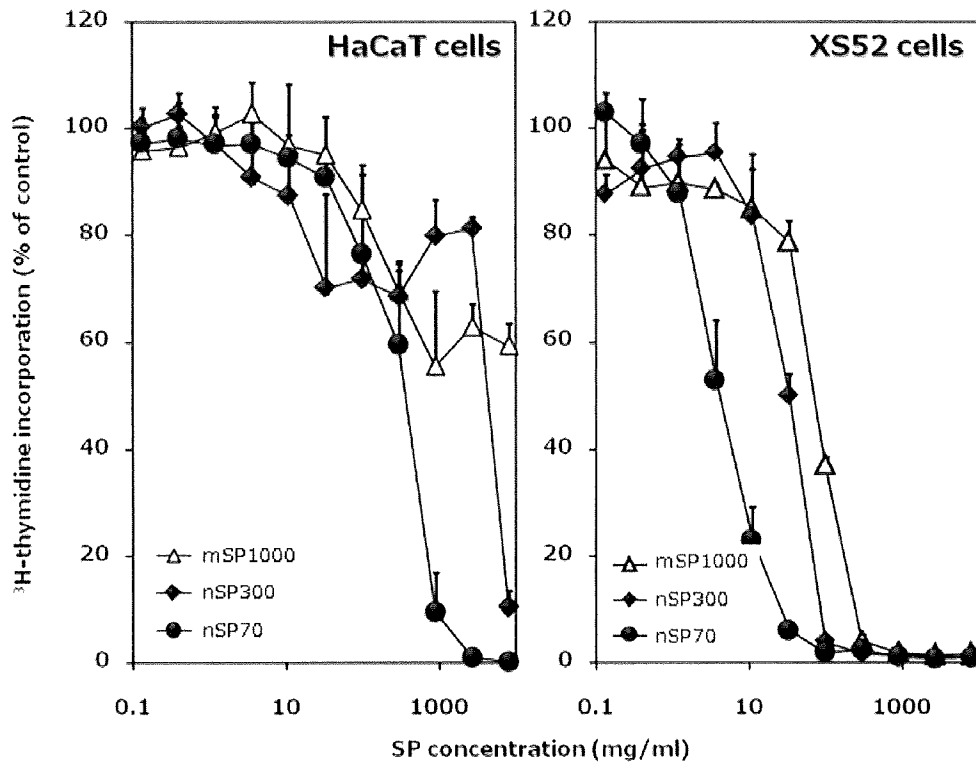


図 64. 粒子径の異なるナノシリカの細胞増殖阻害効果.

粒子径の異なるナノシリカを種々の濃度でヒト皮膚角化細胞株 (HaCaT) ならびにマウスランゲルハンス細胞株 (XS52) に添加し、24 時間インキュベートした。細胞増殖能は培養終了 6 時間前に添加したトリチウムラベル化チミジン (1 μ Ci) の取り込み量を指標に評価し、ナノシリカ非添加群の取り込み量を 100%として算出した。

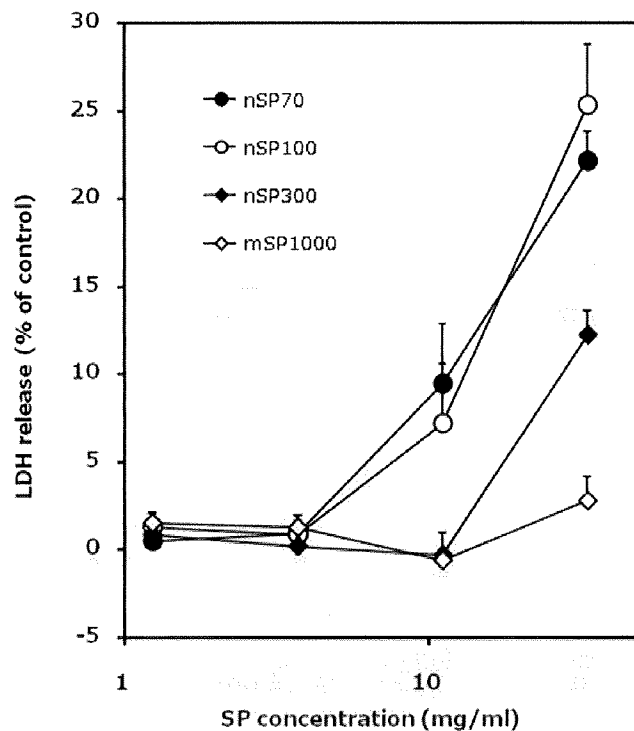


図 65. 粒子径の異なるナノシリカの細胞膜傷害性.

粒子径の異なるナノシリカを種々の濃度でマウスランゲルハンス細胞株 (XS52) に添加し、24 時間インキュベートした。各ナノシリカの細胞膜に対する傷害性は培養後に、上清中に逸脱した乳酸脱水素酵素の量を指標に評価し、ナノシリカ非添加群における培養上清中への LDH 逸脱量を 100%として算出した。

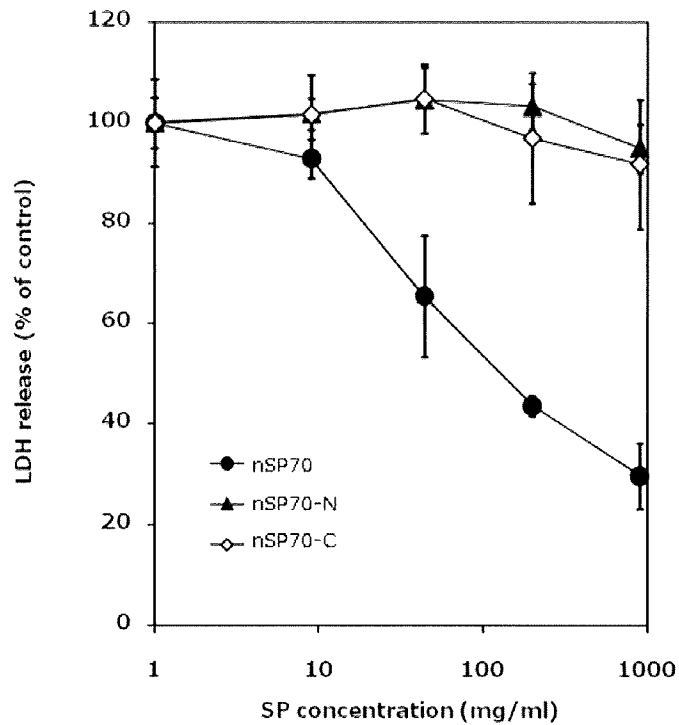


図 66. 表面性状の異なるナノシリカの細胞増殖阻害効果.

nSP70、nSP70-C、nSP70-N を種々の濃度でマウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) に添加し、24 時間インキュベートした。細胞増殖能は培養終了 6 時間前に添加したトリチウムラベル化チミジン (1 μ Ci) の取り込み量を指標に評価し、ナノシリカ非添加群の取り込み量を 100 \cdot として算出した。

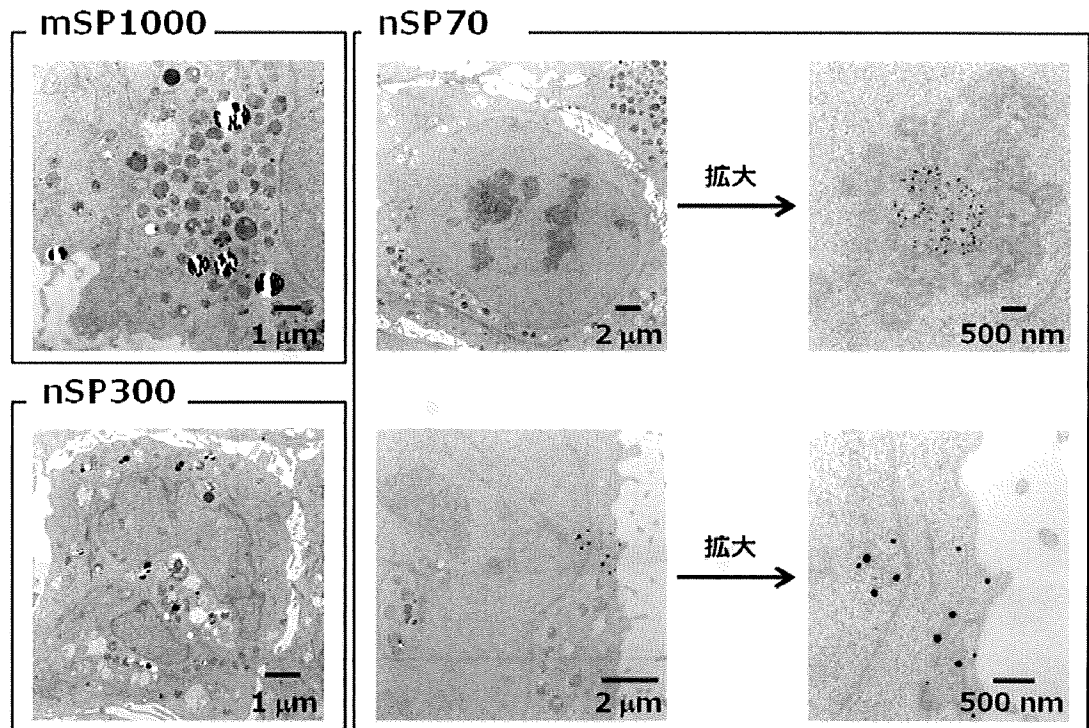


図 67. HaCaT 細胞内におけるナノシリカの局在.

粒子径の異なるナノシリカ (終濃度: 100 μ g/ml) を HaCaT に添加し、24 時間インキュベートした。培養後のサンプルを用いて超薄切片を作製し、電子顕微鏡を用いてナノシリカの細胞内局在を解析した。

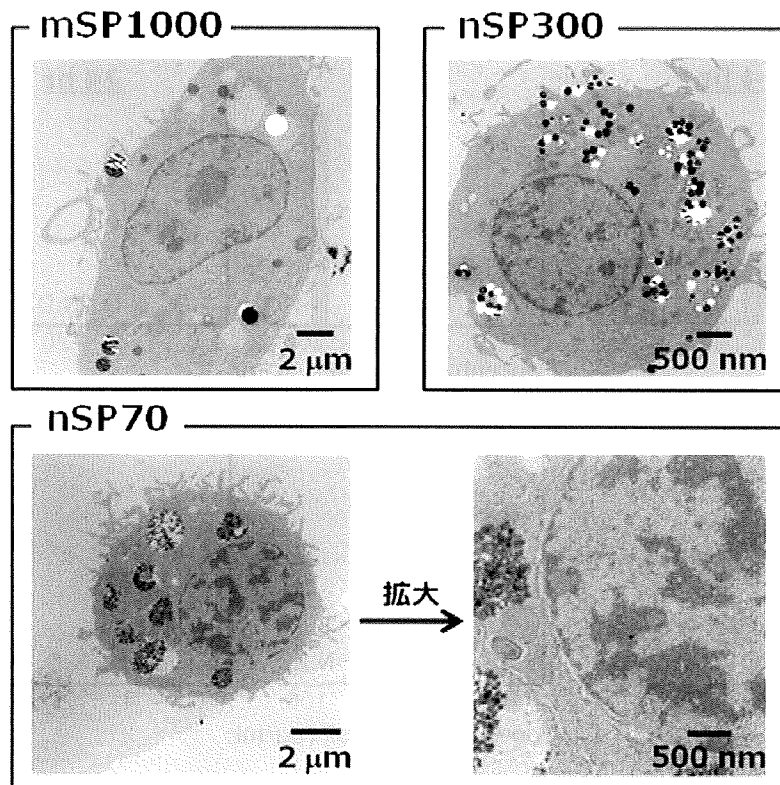


図 68. XS52 細胞内におけるナノシリカの局在。

粒子径の異なるナノシリカ（終濃度：100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を HaCaT に添加し、24 時間インキュベートした。培養後のサンプルを用いて超薄切切片を作製し、電子顕微鏡を用いてナノシリカの細胞内局在を解析した。

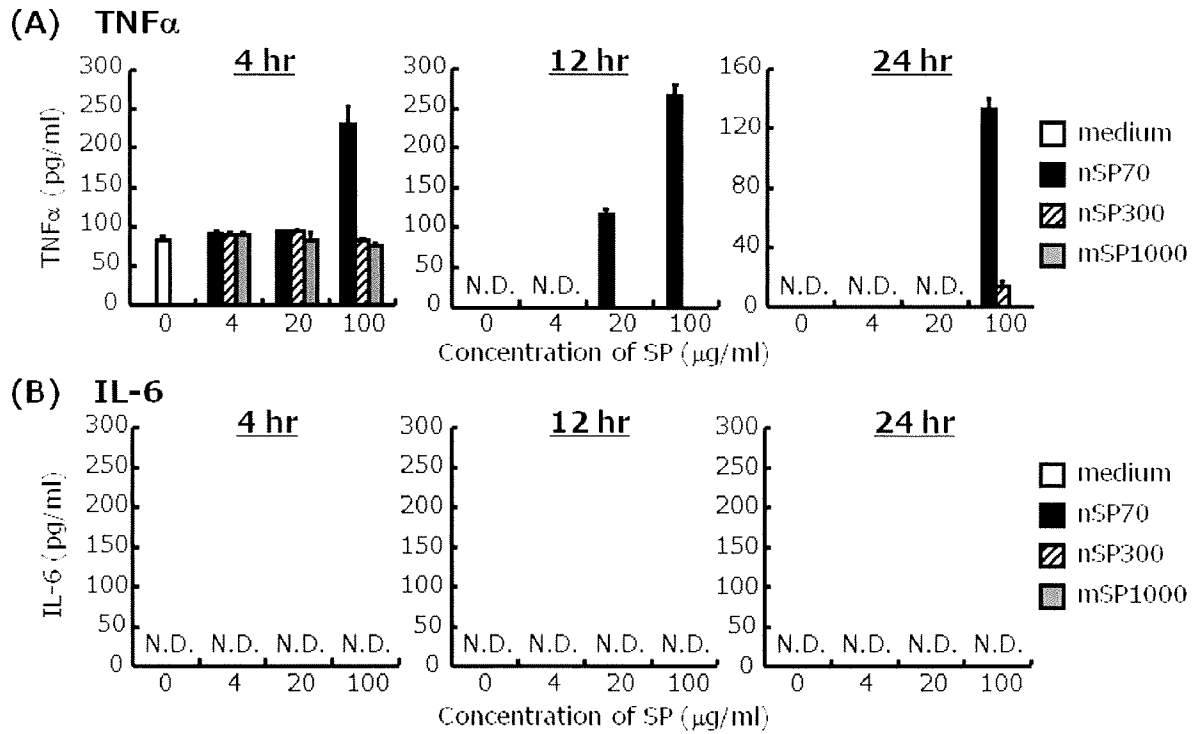


図 69. 粒子径の異なるシリカ粒子の RAW264.7 細胞に対するサイトカイン産生誘導能評価。RAW264.7 細胞に対して種々の濃度の nSP70、nSP300、mSP1000 を作用させた。4、12、24 時間後に回収した培養上清中の TNF α (A) および IL-6 (B) の量を ELISA を用いて測定した。(N.D.; not detected)

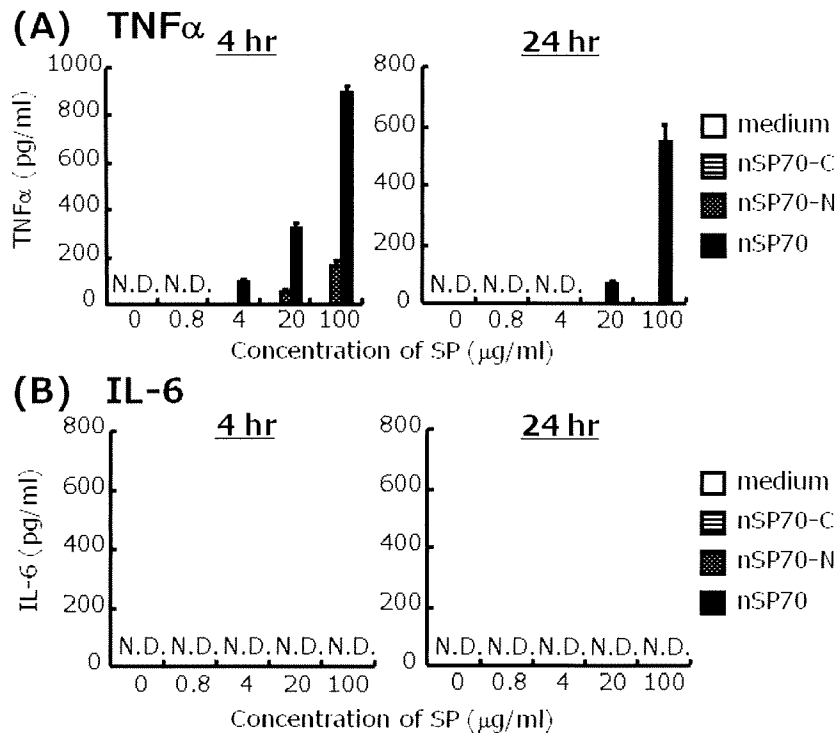


図 70. 表面電荷の異なるシリカ粒子の RAW264.7 細胞に対するサイトカイン産生誘導能評価。RAW264.7 細胞に対して種々の濃度の nSP70、nSP70-C、nSP70-N を作用させた。4、24 時間後に回収した培養上清中の TNF α (A) および IL-6 (B) の量を ELISA を用いて測定した。(N.D.; not detected)

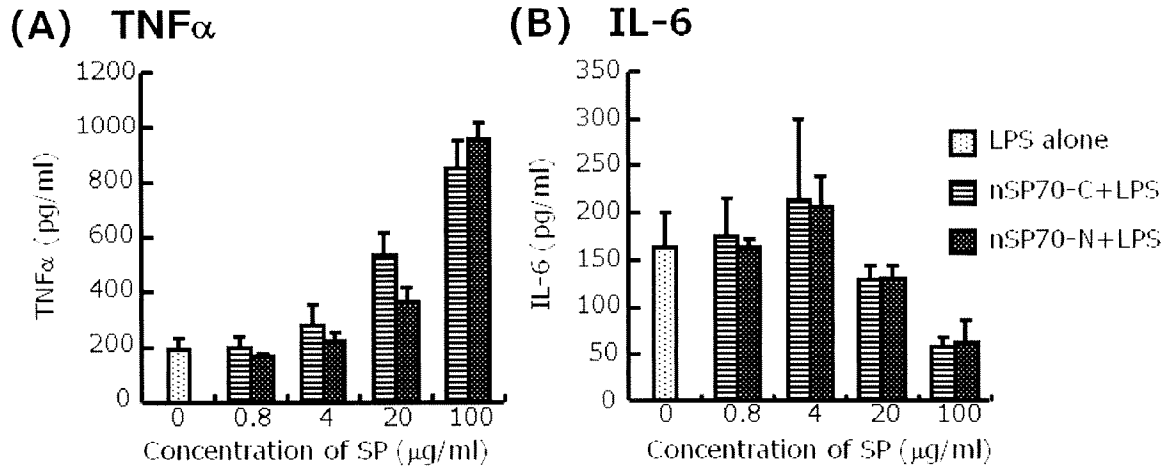


図 71. 表面修飾ナノ粒子の免疫抑制効果.

RAW264.7 を種々の濃度のナノシリカと LPS (1.25 $\mu\text{g/ml}$) との共存下で 24 時間培養した。培養上清中の TNF α (A)、IL-6 (B) の濃度を ELISA 法により測定した。

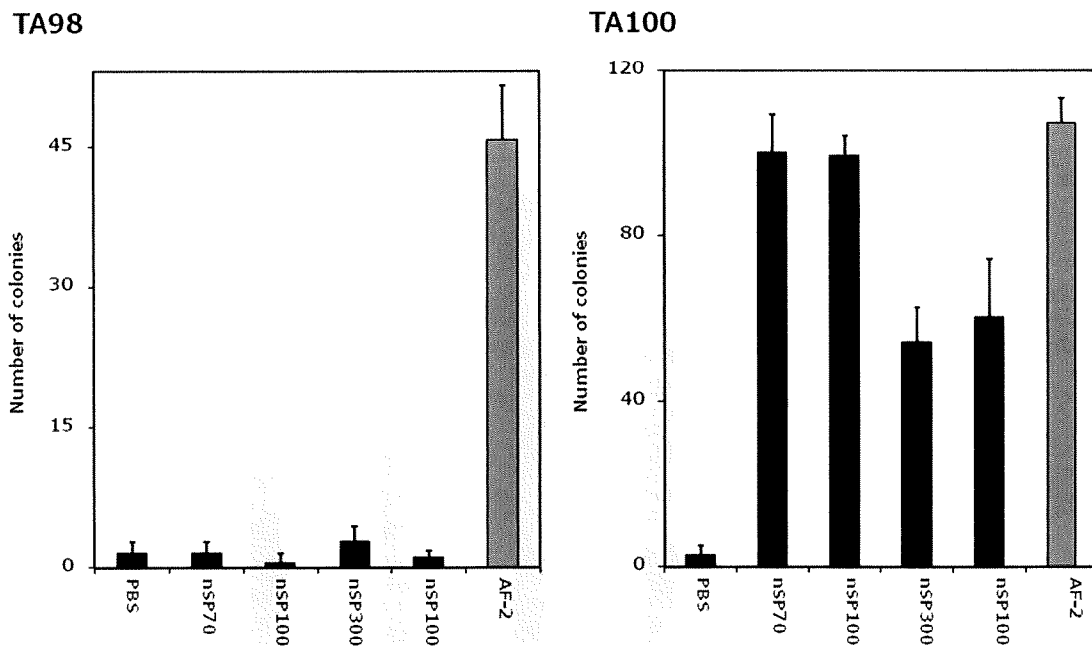


図 72. ナノシリカの催変異原性 (Ames 試験) .

nSP70 (25 $\mu\text{g/ml}$)、nSP100、nSP300、mSP1000 (50 $\mu\text{g/ml}$) を作用させた TA98 あるいは TA100 株をヒスチジンを含まない寒天培地にプレーティングした。37°C で 48 時間静置培養した後のコロニー数を計数した。

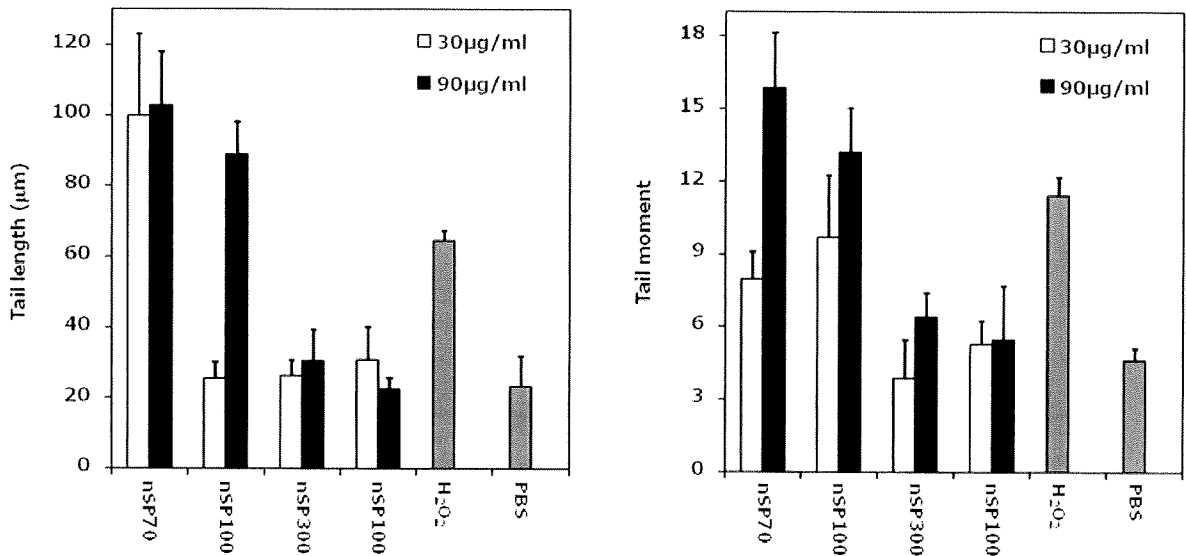


図 73. 哺乳動物細胞におけるナノシリカの DNA 損傷性.

粒子径の異なるナノシリカを種々の終濃度で HaCaT に作用させ、24 時間インキュベートした。ナノシリカ処理細胞における DNA 損傷の度合いをコメットアッセイにより検出・定量した。

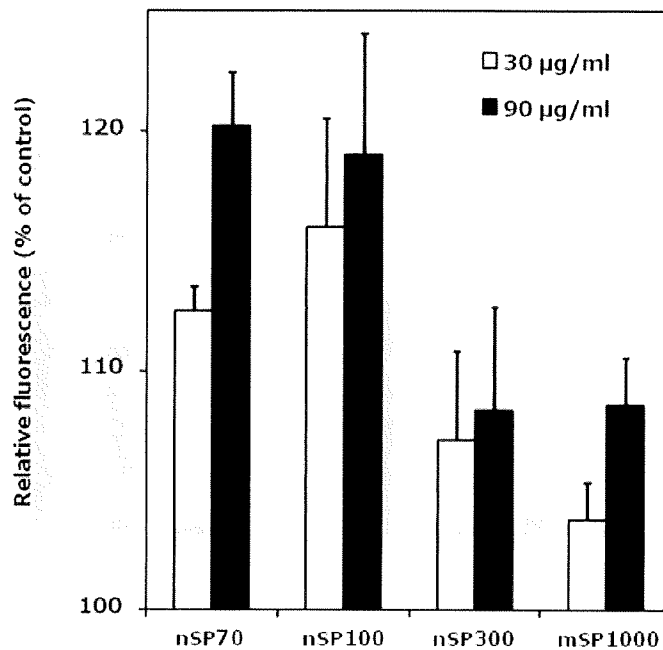


図 74. 細胞内活性酸素種の検出 (DCFH-DA 法) .

種々の濃度のナノシリカを 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。細胞を十分に洗浄した後に、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。

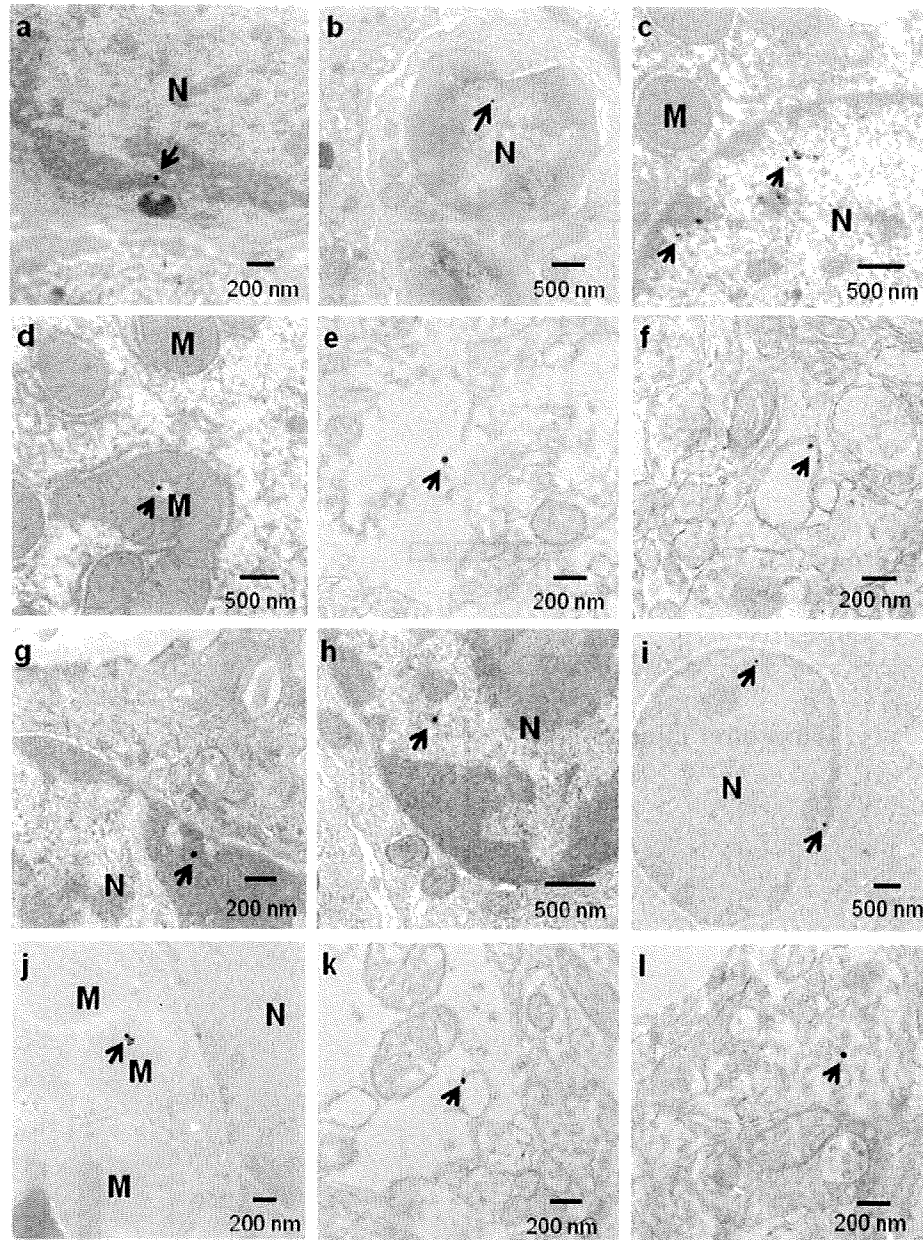


図 75. ナノマテリアルの経皮吸収性の評価

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)

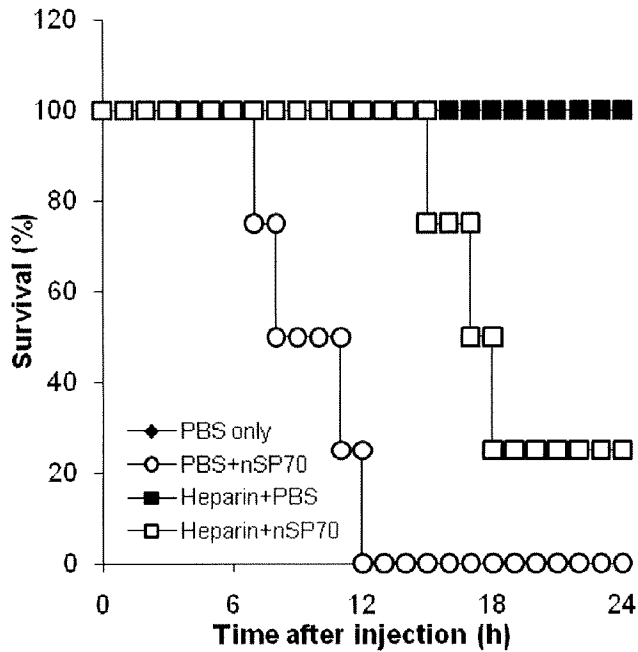


図 76. 抗凝固剤ヘパリン前投与とマウスを用いた生存率の評価
BALB/c マウスに 100 IU/匹のヘパリン溶液あるいは PBS を尾静脈内より投与し、2 分後に nSP70 (2 mg/匹) を尾静脈内投与した際の生存率を経時的に 24 時間まで評価した。

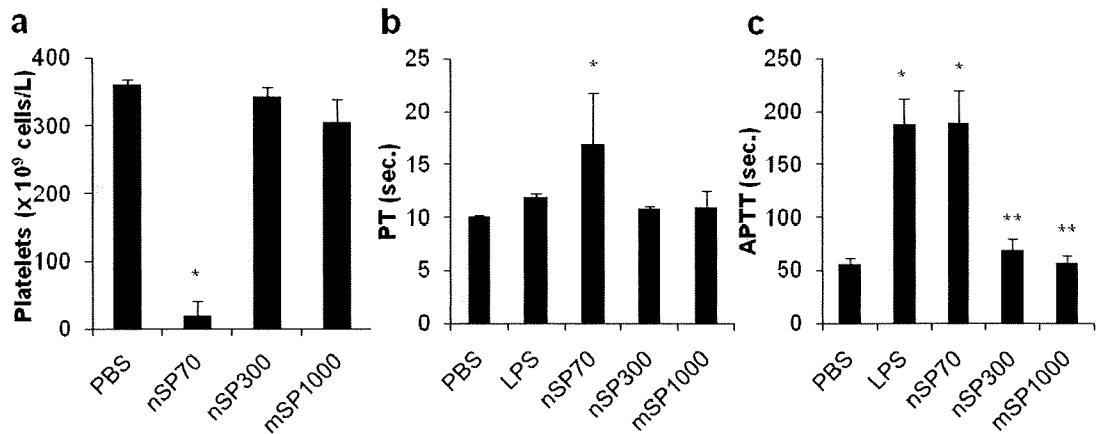


図 77. ナノシリカ投与マウスの血液凝固検査

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)

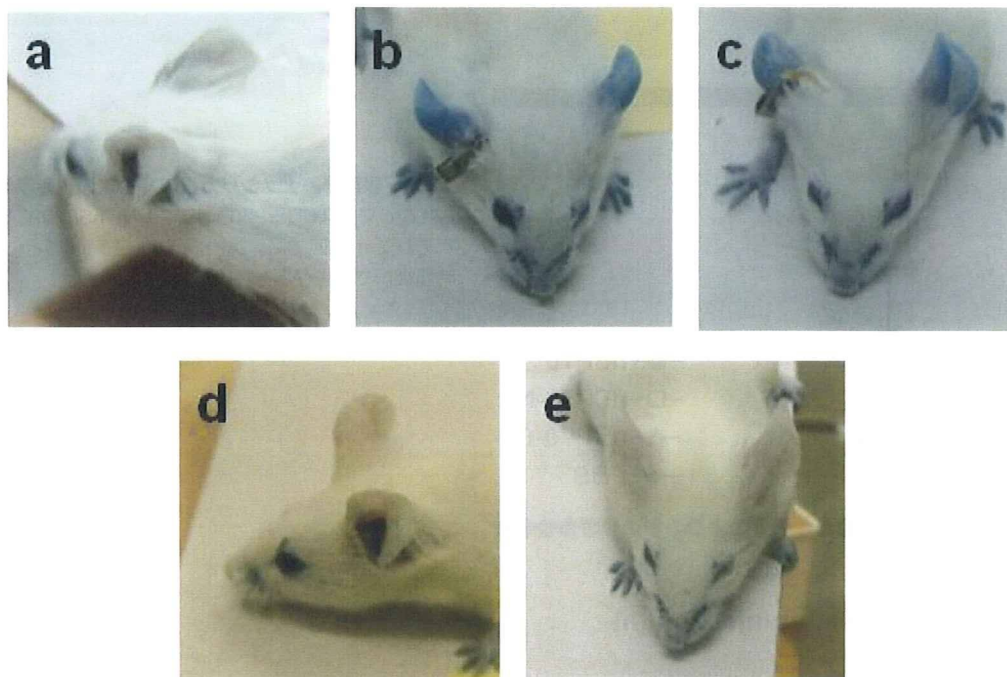


図 78. ナノシリカ投与マウスの血管透過性試験

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。

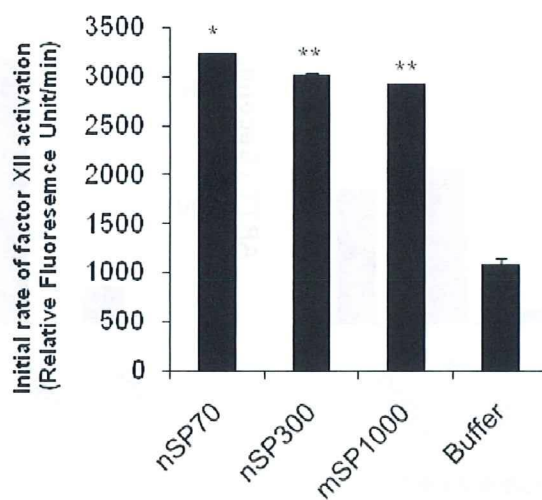


図 79. ナノシリカの血液凝固第 XII 因子活性化能の評価

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

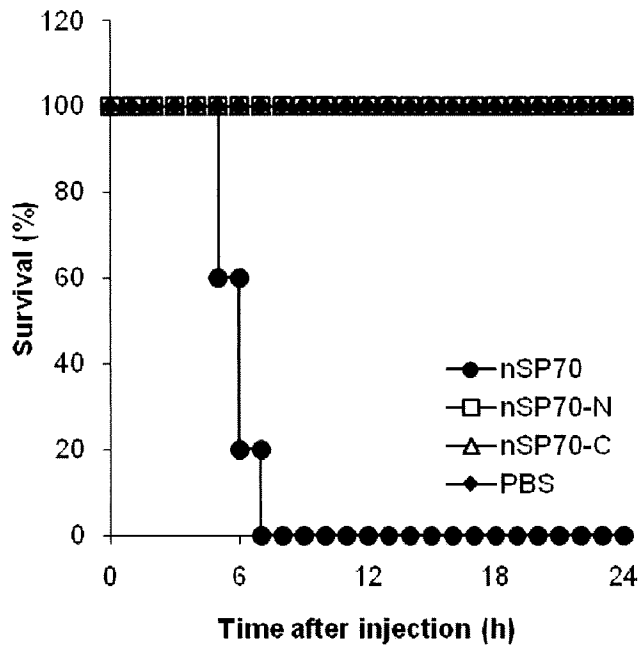


図 80. 表面修飾ナノシリカ投与マウスの生存率評価
BALB/c マウスに nSP70、nSP70-N、nSP70-C をそれぞれ 2 mg/匹で尾静脈内投与し、1 時間ごとに 24 時間後までの生存率を評価した。

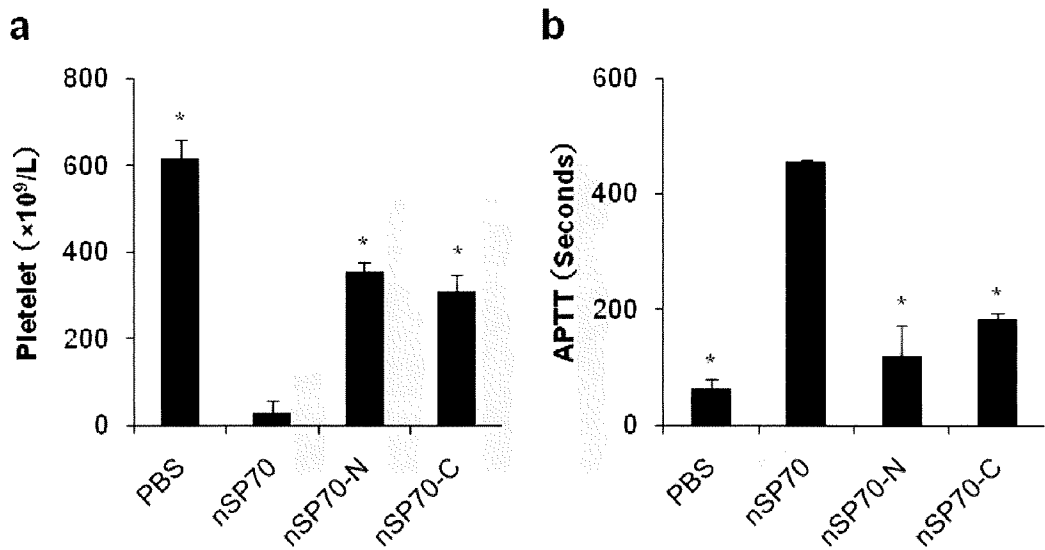


図 81. 表面修飾ナノシリカ投与マウスの血液凝固検査

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)

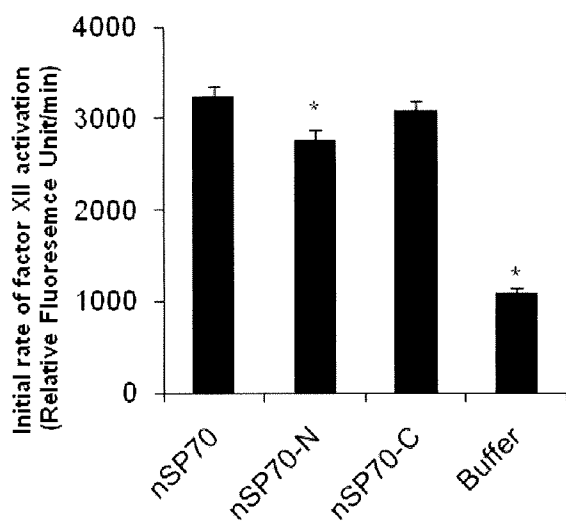


図 82. 表面修飾ナノシリカの血液凝固第 XII 因子活性化能の評価
 37°C に加温しておいた 1 ml の Buffer (pH8.0 Tris-HCl in 0.15 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.1 mg/ml bovine serum albumin) に、血液第 XIIa 因子基質 (PEPTIDE INSTITUTE, Inc, Japan) を 20 μ l 加えた。これとは別に 100 μ l のヒト血漿に各 nSP (25 mg/ml, 0.4 mg/ml) を 100 μ l を加え攪拌した。この血漿と nSP との混合液を、先程の Buffer と基質の混合液に加え、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。* $P < 0.001$ vs nSP70 (Fisher's PLSD)

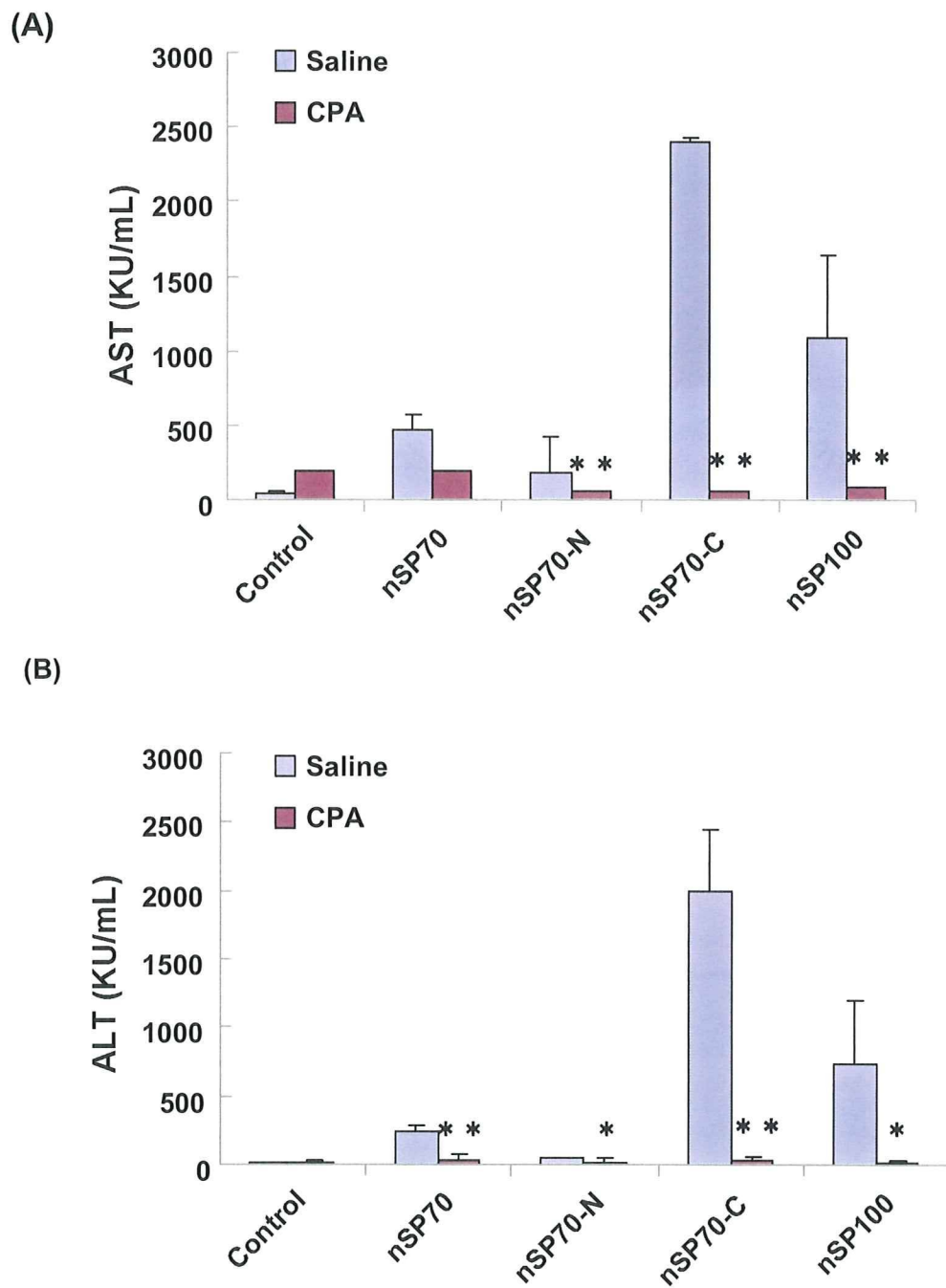
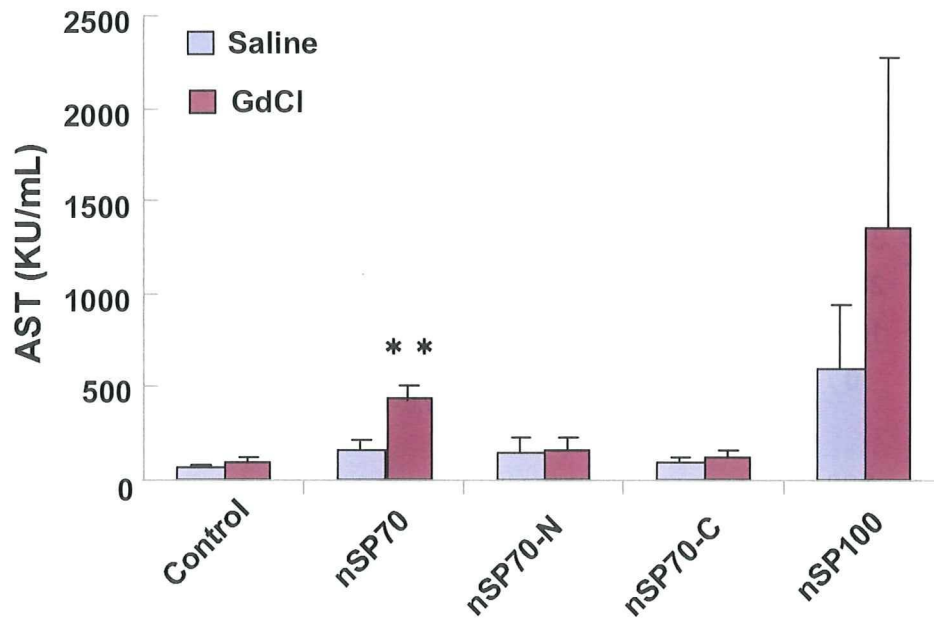


図 83. シクロフォスファミド (CPA) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害

シクロフォス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)

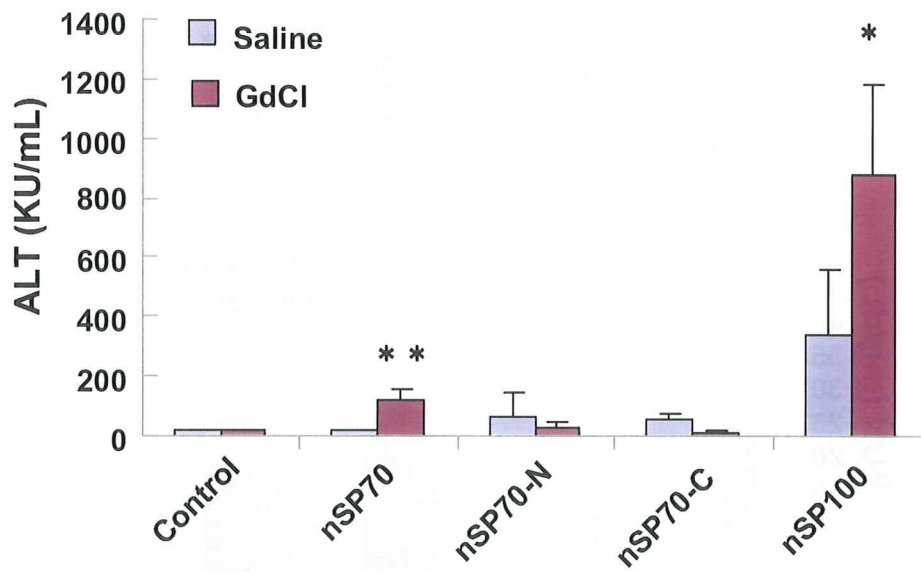


図 84. ガドリニウムクロライド (GdCl) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害。ガドリニウムクロライドは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。*: $p < 0.05$ vs. Control, **: $p < 0.01$ vs. Control

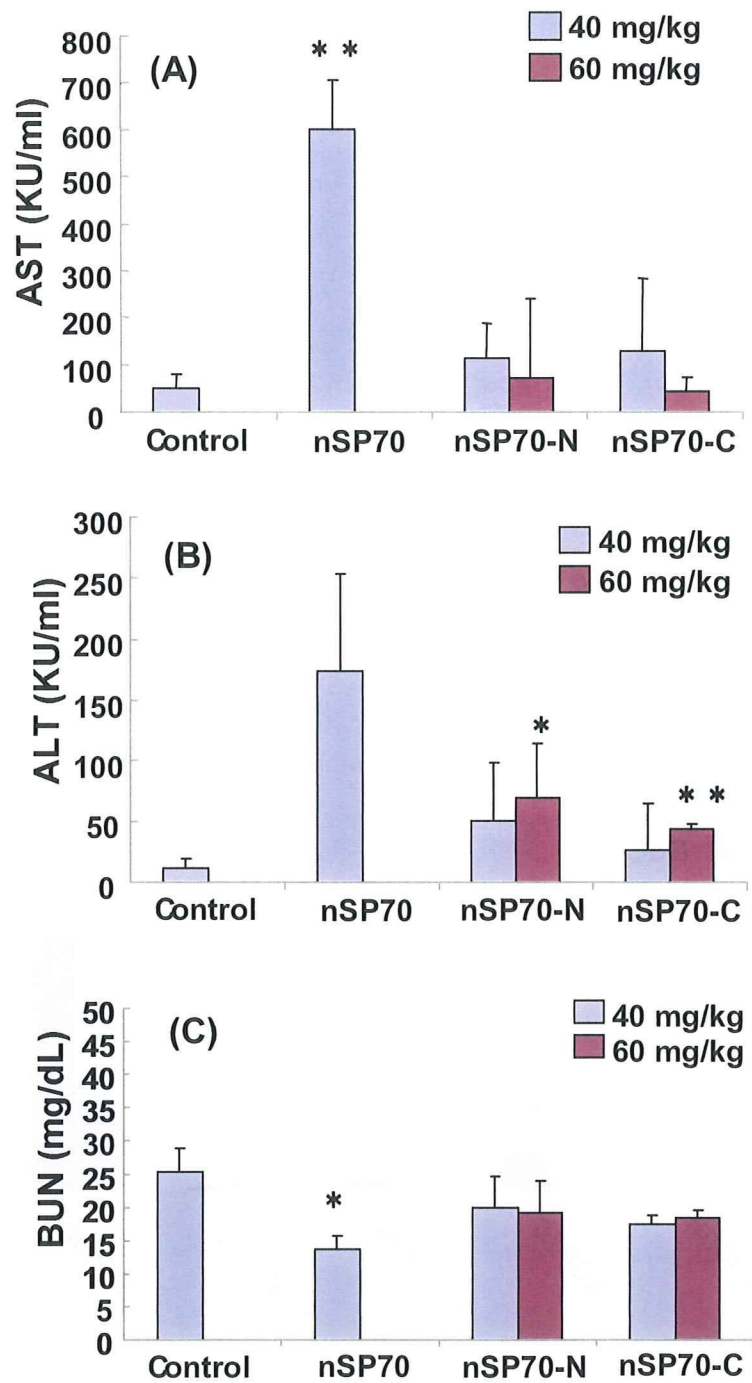


図 85. 表面修飾ナノシリカを頻回投与したマウスにおける慢性肝障害。

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

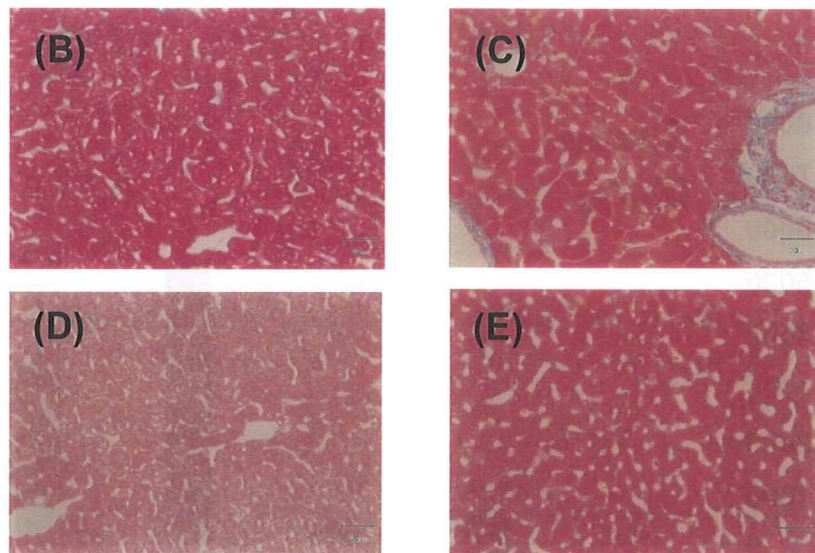
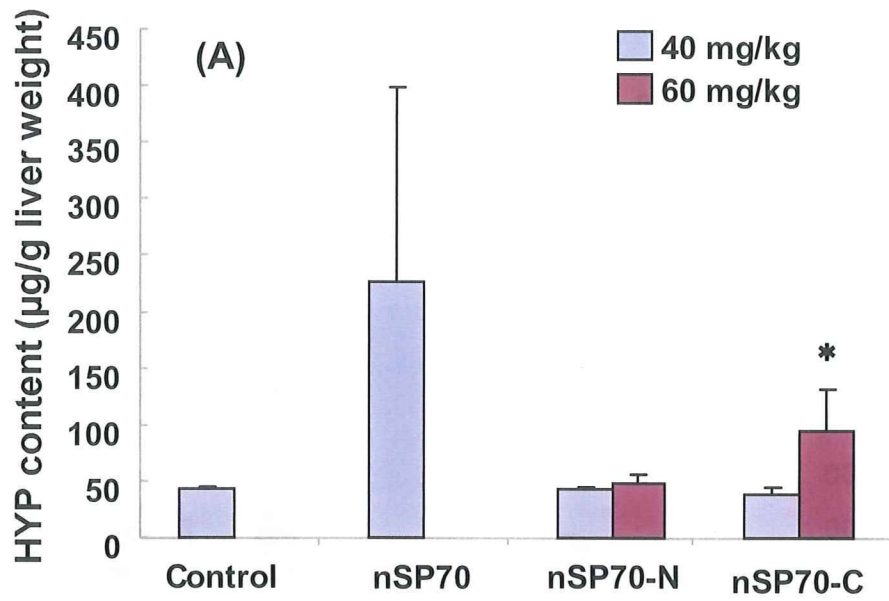


図 86. 表面修飾ナノシリカを頻回投与したマウスにおける肝臓の線維化

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)

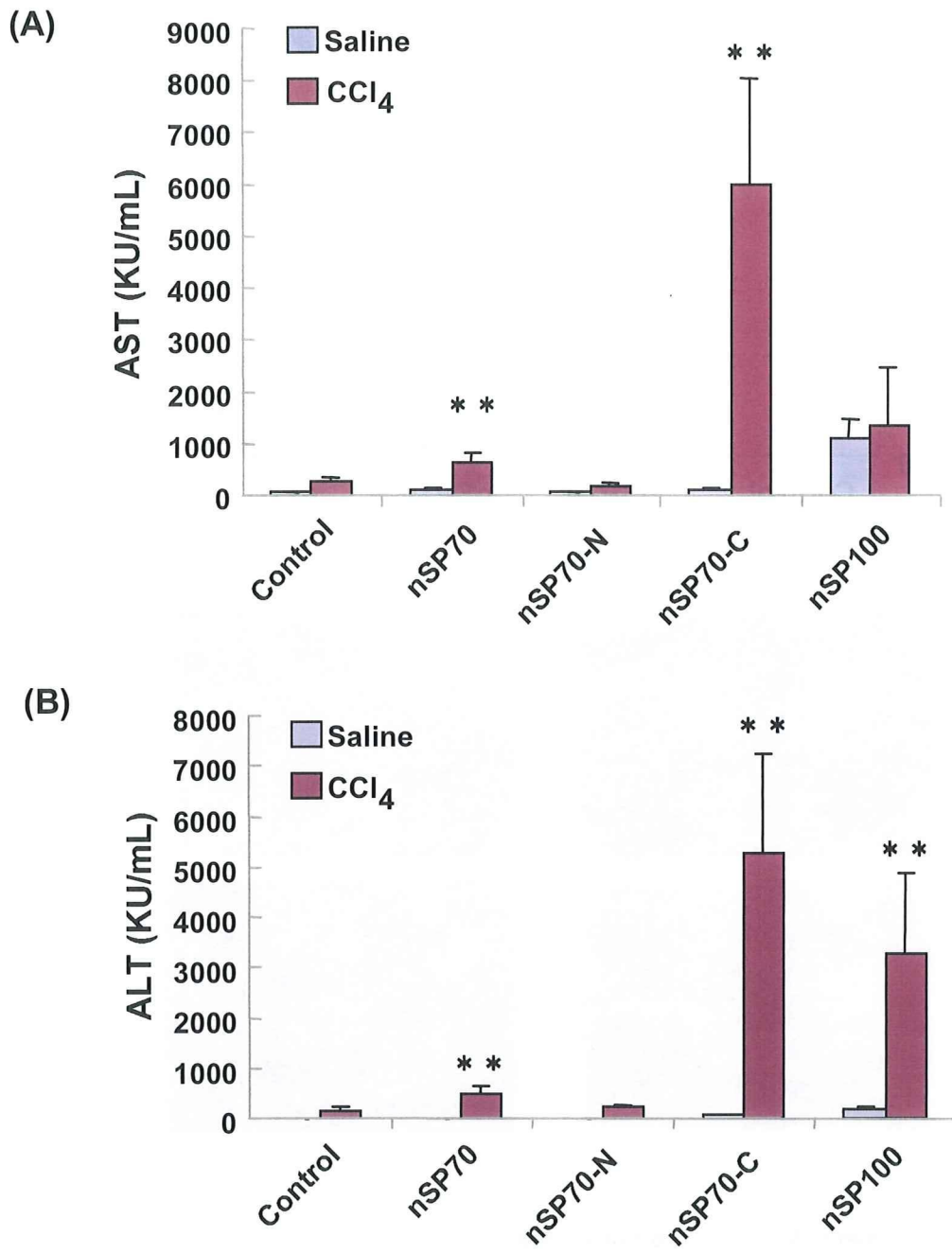
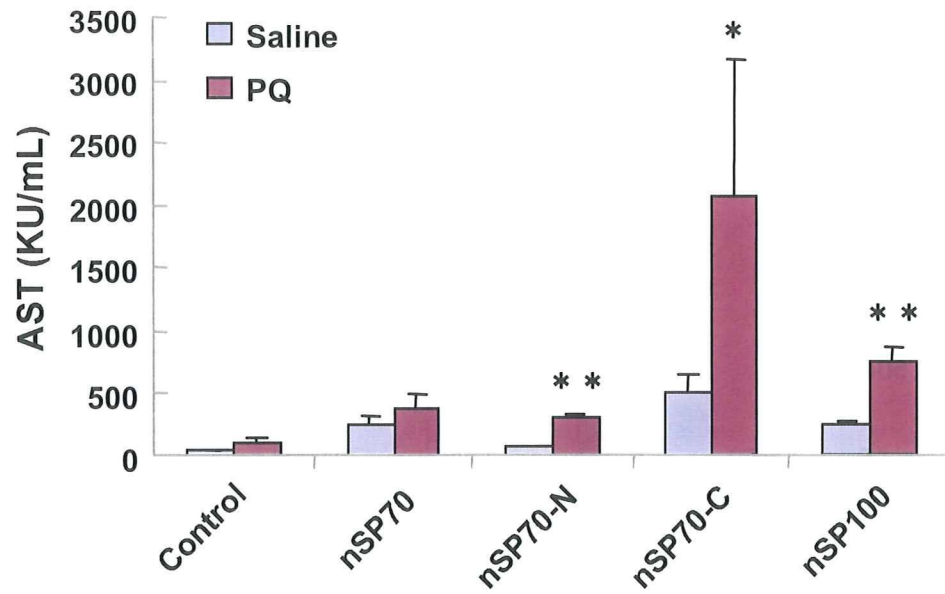


図 87. 四塩化炭素 (CCl₄) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害
 四塩化炭素は腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。
 **: $p < 0.01$ vs. Control

(A)



(B)

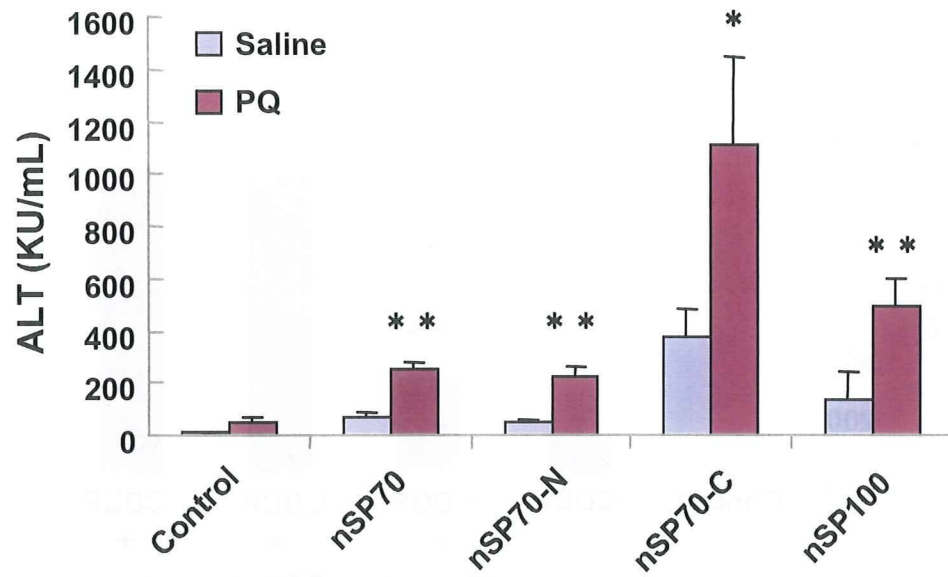


図 88. パラコート (PQ) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害

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

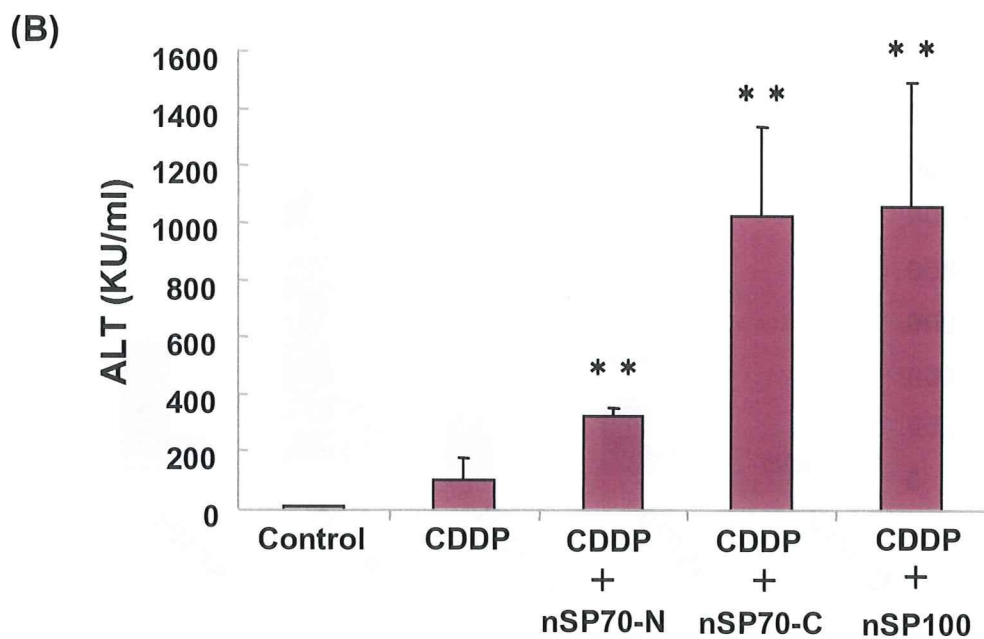
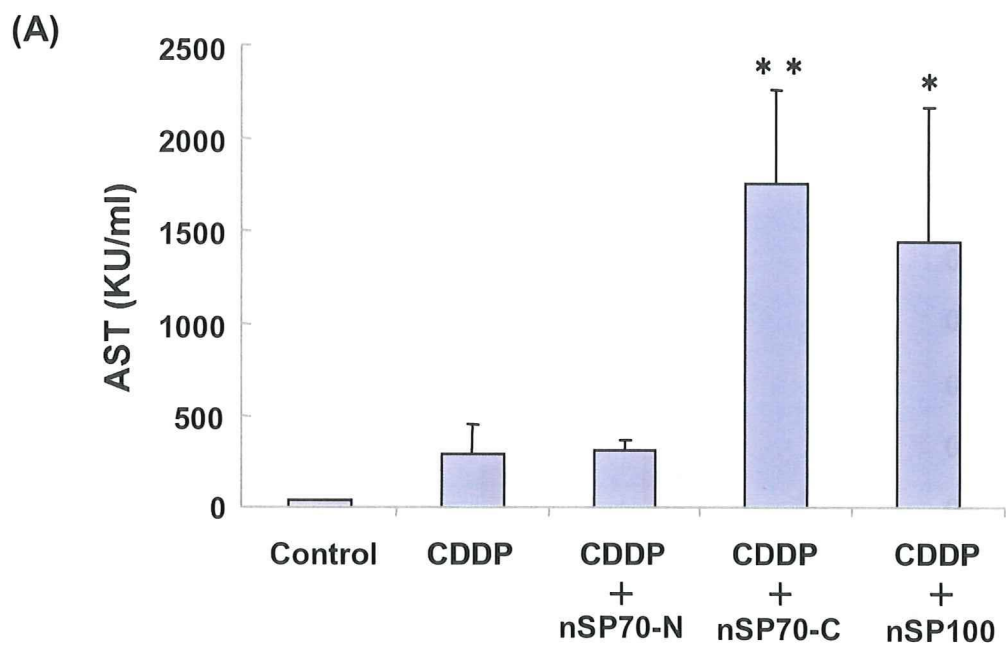


図 89. シスプラチン (CDDP) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害
シスプラチンは腹腔内に、各種ナノシリカは尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) AST, (B) ALT を測定した。
** : $p < 0.01$ vs. Control

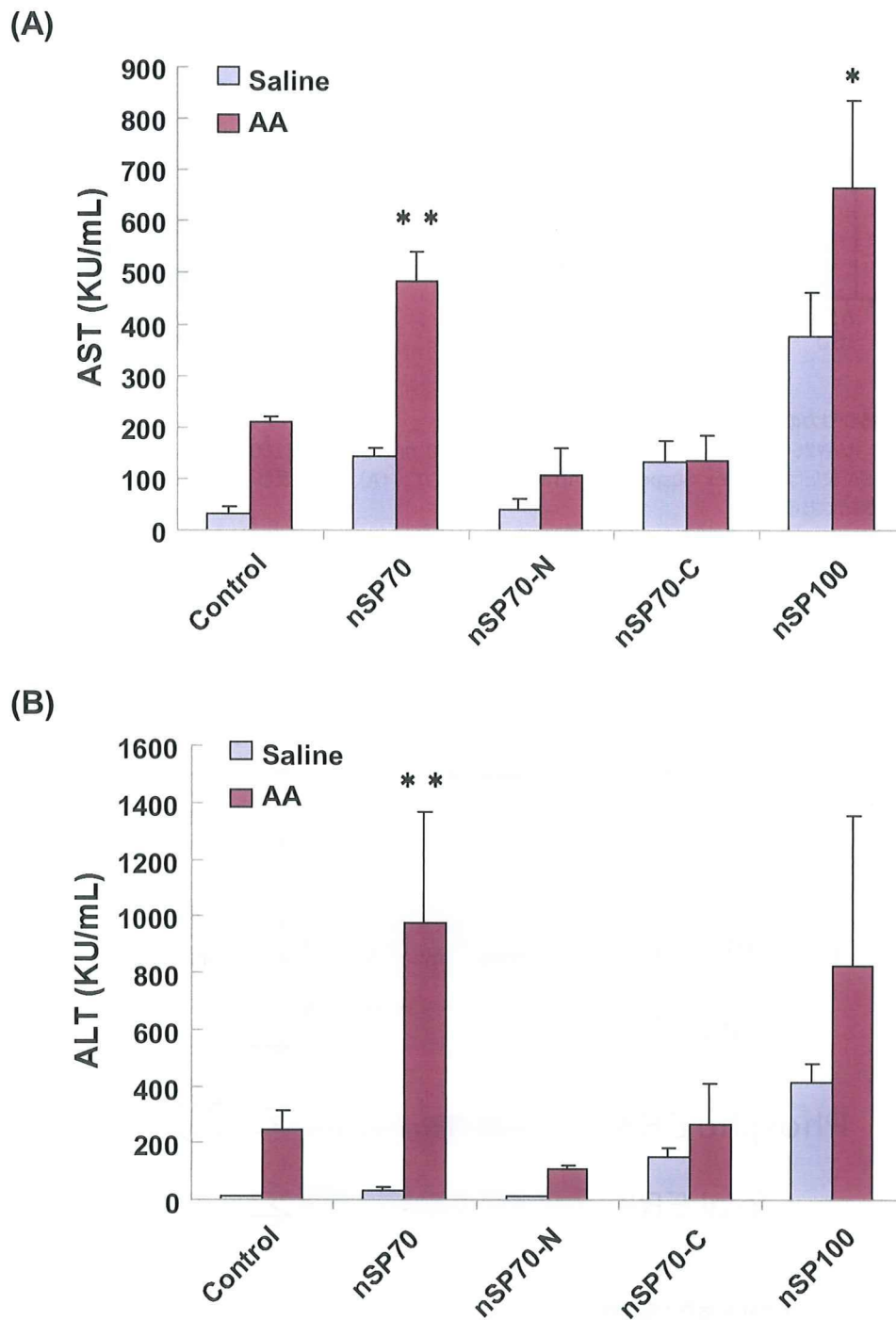


図 90. アセトアミノフェン (AA) と各種ナノシリカを併用投与したマウスにおける急性肝障害

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