

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・吸入曝露実態の解析基盤および経皮・吸入毒性評価基盤の確立とヒト健康影響情報の集積**

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 24 (2012) 年 5 月

## 目 次

### I. 研究報告

1. ナノマテリアルの経皮・吸入曝露実態の解析基盤の開発と曝露実態（細胞内・体内動態）  
情報の集積および免疫毒性・遺伝毒性・発がん性評価-----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
2. ナノマテリアルの肝内動態解析と一般毒性・肝毒性・若年性メタボリック症候群評価---67  
大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野 研究分担者 八木 清仁
3. ナノマテリアルの胎盤動態および胎盤/胎仔毒性、胎仔/母体血液・免疫・幹毒性評価---82  
富山大学大学院医学薬学研究部 産科婦人科学教室 研究分担者 齋藤 滋
4. ナノマテリアルの乳幼仔動態解析と子ども（乳幼仔）健康影響（アトピーといった免疫毒  
性等）評価-----88  
大阪府立母子保健総合医療センター研究所 免疫部門 研究分担者 柳原 格
5. 乳幼仔・小児・成熟個体におけるナノマテリアルの情動・認知行動毒性学的評価基盤の新  
規確立とその評価-----93  
藤田保健衛生大学総合医科学研究所 システム医科学研究部門 研究分担者 宮川 剛
6. ナノマテリアルの生殖器動態評価および繁殖毒性（精子・卵・受精）・胚毒性評価-----104  
神戸学院大学薬学部生命 薬学部門 研究分担者 河合 裕一
7. ナノマテリアルの脳神経系動態の解析と神経毒性/神経発生毒性、一般毒性評価-----115  
(財)食品薬品安全センター秦野研究所 毒性部 研究分担者 桑形麻樹子

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----138

### III. 研究成果の刊行物・別刷-----144

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・吸入曝露実態の解析基盤および経皮・吸入毒性評価基盤の確立  
とヒト健康影響情報の集積」  
総括研究報告書

**ナノマテリアルの経皮・吸入曝露実態の解析基盤の開発と  
曝露実態（細胞内・体内動態）情報の集積  
および免疫毒性・遺伝毒性・発がん性評価**

研究代表者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

**研究要旨**

昨今、ナノマテリアルの安全性が世界的に危惧されている。しかしハザード情報の集積でさえ未だ不十分であるうえ、ナノマテリアルのリスク解析とその評価、そして将来的なリスク管理に必須となる曝露実態情報（吸収性や蓄積性、相互作用を含めた動態情報）に関しては、国内外を問わず皆無に等しい（例えばシリカの動態情報を追求している例は申請者らのグループのみと言っても過言ではない）。研究代表者はこれまで、非晶質ナノシリカ（nSP）をはじめとする種々ナノマテリアルのリスク解析に資するべく、曝露実態（動態）の定性的情報の集積を先駆けて報告すると共に、様々なハザード情報を先駆けて発信してきた（Nature; Vol.461, 2009 にトピック記事）。しかし依然として、経皮・吸入曝露後のナノマテリアルのリスク情報は圧倒的に不足しており、このままではナノマテリアル関連産業や知財立国としての本邦の発展が阻害されかねない。本観点から当該申請研究では、3 年間で①種々ナノマテリアル（サブナノ～ナノスケールで、かつ分散性に優れた nSP やサブナノ白金（snPt）、サブナノ銀（snAg）などをメインサンプルとする）の経皮および吸入（経鼻【経口腔・経気道を含む】）経路からの曝露実態（細胞内・体内動態）を先駆けて微量同定・定量化すること、および②情動・認知行動毒性やトキシコプロテオミクスなど、他に類を見ないハザード情報集積基盤手法を開発し、これらに基づきナノマテリアルのハザード情報を集積することにより、個々のナノマテリアルの曝露経路ごとの閾値を追求するなど、将来的なリスク解析・評価・管理に必須の情報を集積すること、③OECD（経済協力開発機構）主導のナノマテリアル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ける我が国のマイルストーンに関して、イントララボ間・インターラボ間でのバリデーションを図りつつ、引き続きカーボンナノチューブや C60 フラーレン、ナノ酸化チタン、ナノ酸化亜鉛、nSP、snPt、snAg などの経皮毒性情報を集積すること、④産業界と連携して既実用化あるいは実用化予定のナノマテリアルの安全性評価、さらには安全なナノマテリアルの開発支援をさらに加速させること、即ち、Nano-Safety Science（ナノ安全科学研究）を計画している。平成 23 年度研究では、①曝露実態として、微量同定・定量解析基盤の追求により、1 nm 以下の snPt、snAg が経皮・経鼻吸収され、その後、全身分布し得ることなどを初めて定量的に明らかにした。②ハザード情報に関しては、経皮吸収された nSP がアトピー性皮膚炎の悪化やアレルギーの誘発に関与し得ること、snPt が胎児発育不全を誘発すること、snPt や nSP を胎仔期に曝露したマウスに情動・認知障害が生じ得ることを新たに見出した。さらに、トキシコプロテオミクス解析によりヘモペキシンなどの新たなナノ安全性バイオマーカーを同定しただけでなく、miRNA も高確度・高感度なナノ安全性評価マーカーになり得ることを見出した。さらに、miRNA を用いたマーカー探索や EST 法の確立、抗シリカ抗体の創製など、新規安全性評価系の確立につながる検討を実施し、良好な成果を得た。また③OECD テストガイドラインに関して、snPt のイントララボ間・インターラボ間でのバリデーションを完了した。一方で④粧工連や種々ナノ産業との連携を密に取りつつ、既に実用化されている NM の安全性評価や安全性情報の提供、安全な NM の開発支援を行った。特に平成 23 年度は、研究計画を

大幅に前倒しし、ナノサイズおよび、それよりも小さなサブナノサイズ（10 nm 以下）で、しかも nSP と同様に分散性の高い snPt や snAg に関しても、経皮・吸入曝露後実態の微量同定・定量解析とハザード評価を先駆けて着手するとともに、新たな解析方法の確立に向けて抗シリカ抗体の創出や、催奇形性試験の in vitro 代替法の確立にも取り組み、当初目標を超える特筆すべき成果が得られた。以上、本年度はサブナノマテリアルの曝露実態の解明に重要な検出系の構築に成功し、体内吸収率を明らかにするなど、ナノマテリアルのリスクを考える上で最も重要な曝露情報の収集を達成し、独自の Nano-Safety Science 研究が、ヒト健康・環境の安全確保を実現、さらには本邦のナノマテリアル産業の発展とその支援、また国際貢献に極めて有用であることを見出した。

## A. 研究目的

近年、目覚ましい進歩を遂げているナノテクノロジー産業は、将来的に巨大な市場を期待できる分野である。ナノテクノロジー等を活用して、少なくとも一次元の大きさが 100 nm 以下になるように製造されたナノマテリアルは、特徴的な物性（サイズ、形状、表面性状など）を有しており、組織浸透性、電気的・磁氣的・光学的特性などの点において、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは異なる新しい機能を発揮する。ナノマテリアルは、これまでの技術では成し得なかった機能向上や付加価値の可能性を提供する素材として世界中で注目されており、既に化粧品・食品・医薬品・電子部品分野をはじめとして、様々な分野で利用され始めている。

その一方で、最近になってナノマテリアルの新しい機能が、逆に、人体にとって好ましくない影響を發揮する可能性が指摘され始めている。こうした状況を受けて、OECD（経済協力開発機構）や ISO（国際標準化機構）などの国際機関は、本邦を含めた主要各国と連携してナノマテリアルの安全性評価を進めている。米国では、米国環境保護局や米国食品薬品局など、様々な公共機関が中心となって、国家規模でナノマテリアルの生体影響の評価が進められている。日本においても、経済産業省や厚生労働省、環境省によってナノマテリアルの安全性情報の収集とその手法の開発が進められている。日本は OECD の「工業ナノマテリアルに関する作業部会」において、フラーレンやカーボンナノチューブの安全性情報の収集を担当しており、今後もナノマテリアルの安全性情報を国際的に発信していくとしている。いずれ

の取り組みも、ナノマテリアルに特化した具体的な検討を行っているわけではなく、既存の化学物質関連規制の枠組みの中での安全性情報の収集が主要な目的である。その中でも、米国環境保護局によるナノマテリアル・スチュワードシッププログラムは、製造メーカーと連携して、ナノマテリアルの安全性情報を効率的に収集するための興味深い取り組みである。こうした連携にみられるように、ナノテクノロジー産業の成長支援を重視した取り組みが、世界的に重要視されている。

現在流通しているナノマテリアルの大部分は、サブミクロンサイズ（数百 nm～数  $\mu\text{m}$ ）であれば、古くから使われてきた“ありふれた素材”である。例えば、サブミクロンサイズの非晶質シリカは、物理化学的特性や生体影響に関する科学的知見が十分に蓄積された素材であり、食品添加物や化粧品基材として広く用いられてきた。しかし、同じ物質であっても、直径が 100 nm 以下のナノシリカになると、比表面積が大幅に増え、表面活性や電荷、体内吸収性が増大する可能性が考えられるなど、サブミクロンサイズの粒子とは異なる性質を發揮する。仮にナノマテリアルが体内に吸収された場合、極論を言えば、曝露局所だけではなく全身臓器でナノサイズであるが故の反応性を反映した未知の生体影響を發揮する可能性も考えられる。逆にこれらの考え方は、ナノマテリアルは吸収されなければ安全性が極めて高く、物理化学的特性を適切に制御すれば安全なナノマテリアルを創製できる可能性を示している。

こうした中、筆者らのグループは、産学連携で、シリカや銀、白金など、様々なナノマテリアルを対象として安全性評価とその評価手法の開発を

進めている。これら一連の研究の目的は、①ナノマテリアルの体内吸収性や体内局在を定量的に解析する技術の開発と応用、②ナノマテリアルの物理化学的特性（大きさや形状など）と生体反応性の関係を精査すること、である。実際、試薬グレードの非晶質ナノシリカを対象に①②を実施したところ、100 nm 以下になると皮膚や消化管粘膜を介して体内に取り込まれるようになることが明らかとなった。また、体内吸収後の動態や生体反応性は、非晶質ナノシリカの表面性状によって左右され、特定の官能基で粒子表面を修飾することによって、生体影響を全く及ぼさない素材を開発出来る可能性を見出した。これらの検討で明らかとなった最も重要な点は、ナノシリカの物理化学的特性を適切に制御することによってナノマテリアルの生体反応性を制御できる可能性を示したことである。これによって、有用性のみではなく、安全性をも付加価値として付与した新しいナノマテリアル製品開発の可能性を先駆けて示したと考えている。

本観点から当該申請研究では、3ヶ年で①種々ナノマテリアル（サブナノ～ナノスケールで、かつ分散性に優れた nSP や snPt, snAg などをメインサンプルとする）の経皮および吸入（経鼻【経口腔・経気道を含む】）経路からの曝露実態（細胞内・体内動態）を先駆けて微量同定・定量化すること、および②情動・認知行動毒性やトキシコプロテオミクスなど、他に類を見ないハザード情報集積基盤手法を開発し、これらに基づきナノマテリアルのハザード情報を集積することにより、個々のナノマテリアルの曝露経路ごとの閾値を追求するなど、将来的なリスク評価・管理に必須の情報を集積すること、③OECD 主導のナノマテリアル安全性調査に関するスポンサーシッププログラムにおける我が国のマイルストーンに関して、イントララボ間・インターラボ間でのバリデーションを図りつつ、カーボンナノチューブや C60 フラーレン、ナノ酸化チタン、ナノ酸化亜鉛、nSP、snPt、snAg などの経皮毒性情報を集積す

ること、④産業界と連携して既実用化あるいは実用化予定のナノマテリアルの安全性評価、さらには安全なナノマテリアルの開発支援をさらに加速させること、即ち、ナノマテリアルの毒性研究（NanoTox）というよりもむしろ、ナノマテリアルの安全性を追求し、安全性情報の発信や、安全なナノマテリアルの開発やその支援を推進しようとする Nano-Safety Science（ナノ安全科学研究）を計画している。平成 23 年度は、上記①～④について、nSP や snPt、snAg に関する特筆すべき知見が得られたので報告する。

## B. 研究方法

### 1. ナノ・サブナノマテリアル

本検討では、非晶質シリカは Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany)、snPt、snAg は polytech-net 社 (Germany) より購入した。シリカは、一次粒子径が 100 nm (nSP100、濃度：50 mg/mL)、70 nm (nSP70、濃度：25 mg/mL)、50 nm (nSP50、濃度：25 mg/mL)、30 nm (nSP30、濃度：25 mg/mL) のものを使用した。また、nSP70 の表面をカルボキシル基修飾したもの (nSP70-C、濃度：25 mg/mL)、アミノ基で修飾したもの (nSP70-N、濃度：25 mg/mL) も用いた。さらに対照として、1000 nm (mSP1000、濃度：50 mg/mL)、300 nm (nSP300、濃度：50 mg/mL) のサブマイクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。シリカのロットに関しては以降に適宜記載する。また、snPt、snAg は粒子径が 1 nm (濃度 5 mg/mL、Lot No. 10062801) のものを用いた。なお、以後の検討では、使用直前に粒子分散液を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 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。尚、以降の実験では、特記しない限り、蛍光色素等で標識されていない未標識のサンプルを実験に供した。

### 2. 実験動物

BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性)、妊娠 13 日

目の BALB/c マウス (8-10 週齢、雌性)、Nc/Nga slc マウス (6-8 週齢、雄性) は、日本 SLC より購入した。また、本研究における動物実験の飼育および実験は医薬基盤研究所の実験動物施設において行い、医薬基盤研究所・大阪大学動物実験規定に準じた。

### 3. ナノシリカの経皮塗布によるアトピー様病態、及びアナフィラキシーの誘導

投与開始の前日に 6 週齢の NC/Nga slc マウス (雌性) の上背部の毛を Epilat (Klacie) により除毛し、すぐに蒸留水に浸したティッシュペーパーで優しく洗い流した。その後は必要に応じ各投与の前日、または前々日に計 2 回除毛処理を実施した。ヤケヒョウダニの抽出抗原 (*Dermatophagoides pteronyssinus* Crude Extract : Dp, コスモバイオ) (1 mg/mL)、Dp と 30 nm のナノシリカ (nSP30) の混合溶液 (Dp; 1 mg/mL、シリカ; 12.5 mg/mL) を 20  $\mu$ l/ear、80  $\mu$ l/back で両耳介の内側、および除毛した上背部に塗布した。また、投与は 1 日、もしくは 2 日おきに週三回、4 週間投与した。なお、上背部への塗布は、塗布前に 70 %エタノールで軽く皮脂をふき取った。

また、アナフィラキシーの誘導のため、最終投与の 1 週間後、これらマウスに Dp を 10  $\mu$ g/mouse/200  $\mu$ l in PBS、もしくは 30  $\mu$ g/mouse/200  $\mu$ l in PBS で尾静脈内投与した。

### 4. ナノシリカの塗布がアトピー様病態、アナフィラキシー病態に与える影響

上記 3. の方法によって各種検体を投与し、最終投与 24 時後の耳介部の腫脹、及び血漿中の各種抗体価を測定することで、アトピー病態に与える影響を評価した。total IgE 量の測定は BD Bioscience の total IgE OptEIA ELISA set を用い添付のプロトコルに準じて行った。まず capture antibody を 96 well immune plate (Maxisorp ; Nunc) に加え、4 $^{\circ}$ C で一晩静置し固相化した。添付のブロッキング剤を 2 時間反応させることでブロッキング後、各濃度に調製した

サンプルを加えて室温にて 2 時間、または 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。これらのプレートを 0.05% Tween 含有 PBS で洗浄後、各濃度に調整した detection antibody を加え、室温にて 1 時間反応させた。プレート洗浄後、さらに HRP 標識ストレプトアビジンを加え、室温で 30 分反応させた。再度、洗浄操作を行った後、添付の TMB 基質液を添加した。2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加することにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、対照波長 570 nm における吸光度を測定した。Dp 特異的な IgG、並びに IgE は、100  $\mu$ g/mL Dp (in PBS) を 96 well immune plate (Maxisorp ; Nunc) に加え、4 $^{\circ}$ C で一晩静置し固相化した。PBS で 2% に調製したブロックエース (DS Pharma Biomedical) で 2 時間反応させることでブロッキングし、その後、各濃度に調製したサンプルを加えて室温にて 2 時間、または 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。これらのプレートを 0.05% Tween 含有 PBS で洗浄後、各濃度に調整した HRP 標識抗マウス IgG 抗体、ビオチン標識抗マウス IgE 抗体 (いずれも Southern Biotechnology Associates) を加え、室温にて 1 時間反応させた。IgE の測定では、プレート洗浄後、さらに HRP 標識ストレプトアビジン (Southern Biotechnology Associates) を加え、室温で 30 分反応させた。再度、洗浄操作を行った後、TMB 基質液を添加した。2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加することにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、対照波長 620 nm における吸光度を測定した。

また、アナフィラキシー発症の指標として、経時的に直腸より体温を測定した。

### 5. 抗シリカ抗体誘導のための免疫プロトコル

6 週齢の NC/Nga slc マウス (雌性)、または 8 週齢の NC/Nga slc マウス (雄性) の耳介に、ペントバルビタール (somnopentyl; Kyouritsuseiyaku, Tokyo, Japan) による麻醉下、Dp (125  $\mu$ g/mL)、Dp と各粒子径のシリカ (mSP1000, nSP300, nSP100, nSP70, nSP30) の混合溶液 (Dp; 125  $\mu$ g/mL、シリカ; 12.5

mg/mL) を 10  $\mu$ l/ear で両耳介の内側に皮内投与した。なお投与は 1 日、もしくは 2 日おきに計 9 回免疫した。

## 6. 抗シリカ抗体の検出

50  $\mu$ g/mL 各粒子径のシリカ (in PBS) を 96 well immune plate (Multisorp; NUNC) に加え、4°C で一晚静置し固相化した。PBS で 1% に調製した cold fish gelatin (sigma) を 2 時間反応させることでブロッキング後、各濃度に調製したサンプルを加えて 4°C にて 6 時間反応させた。これらのプレートを 0.05% Tween 含有 PBS で洗浄後、各濃度に調整した HRP 標識抗マウス IgG 抗体を加え、室温にて 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行った後、TMB 基質液を添加した。2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を添加することにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、対照波長 620 nm における吸光度を測定した。

## 7. BIAcore を用いた抗シリカ抗体のシリカ結合性の解析

BIAcore 3000 (GE Healthcare) により抗シリカ抗体のシリカへの結合能を評価した。血漿サンプルからプロテイン G を用いたカラム (MAbTrap Kit; GE Healthcare) により IgG を粗精製し、センサーチップ CM3 (GE Healthcare) へ固定化した。固定化はアミンカップリングキット (GE Healthcare) を用いて行った。32.5  $\mu$ g/mL N-ethyl-N'-(3-dimethylamino propyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC)、5.75  $\mu$ g/mL N-hydroxysuccinimide (NHS) 溶液を 70  $\mu$ L (7 分間) インジェクションし、センサーチップ上の CM-デキストランのカルボキシル基を活性化した後、10 mM 酢酸緩衝液 pH 4.0 で 50  $\mu$ g/mL に調整した IgG 溶液をインジェクションし、コントロールの IgG を 5400 RU、抗シリカ血漿からの IgG を 3900 RU 固定化した。その後、1 M Ethanolamine hydrochloride (pH 8.5) 溶液で残存している活性化 NHS 基をブロッキングした。さらに再生溶液 (10 mM Glycine-HCl 緩衝液 pH 2.0) により、非特異的

に結合しているレセプターを洗浄した。250  $\mu$ g/mL にランニングバッファー HBS-EP で希釈した nSP30、nSP70 を 60  $\mu$ L (2 分間) インジェクション後、180 秒間ランニングバッファーを流すことで結合反応と解離反応における相互作用を計測した。

## 8. CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞非存在下での抗シリカ抗体産生評価

CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞を枯渇させるためにそれぞれ GK1.5 抗体、53-6.72 抗体を用いた。GK1.5 抗体、53-6.72 抗体はシリカの免疫四日前から 120  $\mu$ g/day/200  $\mu$ l PBS で腹腔内投与し、以降は 5 日おきに投与した。なお、抗体投与を行ったマウスについてはシリカ投与後 1 日目と最終日の末梢血、もしくは脾臓中の CD4<sup>+</sup>細胞および CD8<sup>+</sup>細胞が 95% 以上消失していることをフローサイトメトリー解析により確認している。CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞を枯渇させたマウスに上記免疫プロトコルに沿って nSP70 を免疫し、抗体価の上昇を観察した。

## 9. シリカとフェノバルビタールとの共投与における薬物相互作用の評価

BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に超純粋および非晶質シリカ分散液 (nSP30、mSP1000) をそれぞれ 200  $\mu$ l ずつ (0.5 mg/body/day)、1 週間経口投与した。ポジティブコントロールとして、CYP1A2 および CYP 3A4 を誘導するフェノバルビタール (和光純薬) を 80mg/kg で 3 日間腹腔内投与した。最終投与 24 時間後に全てのマウスに CYP1A2 および CYP 3A4 で代謝されるペントバルビタール (和光純薬) を 50mg/kg で腹腔内投与し、睡眠時間を計測した。睡眠時間の測定は、ペントバルビタール投与後、マウスを仰向けに寝かせ、うつ伏せに戻るまでの時間を睡眠時間として測定した。

## 10. 催奇形性試験

妊娠 7 日目の ICR マウス (10 週齢、雌性) に、非晶質シリカ (nSP30) を 0.9 または 0.7 mg/匹、ナノ酸化チタン (R-1 ; sigma、R-2 ;

nano-amorphous) を 0.9 または 0.45 mg/匹、サブナノ白金 (snPt) を 0.35 mg/匹になるように生理食塩水 (saline) で調整し、3日間連続で尾静脈内投与した。また、ポジティブコントロールとして催奇形性物質として知られるトレチノインを妊娠 8 日目の ICR マウス (10 週齢、雌性) に 50 mg/匹で腹腔内投与した。投与開始日から解剖当日まで、毎日母体重量を測定した。妊娠 17 日目に母獣より子宮を回収し、胎仔数、子宮重量、胎仔重量、胎盤重量を測定した。その後、摘出した胎仔を実体顕微鏡下で観察し、外表奇形の有無を評価した。

### 11. ES 細胞

ES-D3 細胞 (マウス胚性幹細胞) 株は、American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。またフィーダー細胞として、マイトマイシン C 処理済みマウス胚性繊維芽細胞 (MEF) を Millipore より購入した。ES-D3 細胞の培養には、15% FBS、1% NEAA、1% Nucleosides、110  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol、1% Pen-Strep、1% Glutamine、5000 U/mL mLIF (Millipore, Massachusetts, USA) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM、和光純薬株式会社) を用いた。また、MEF の培養には 10% FBS、1% Ab を含む D-MEM を用いた。細胞株は共に 37°C、飽和蒸気圧、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。1%ゼラチン溶液 (Millipore) でコーティングしたディッシュに MEF を播種し、MEF 用培地で培養した。翌日に ES 細胞を播種し、ES 細胞用培地で未分化維持培養した。

### 12. ES 細胞の精製

MEF より ES 細胞の接着速度が遅いことを利用し ES 細胞を精製した。未分化維持培養した細胞を 0.25%トリプシンにより剥離し、遠心後、分化誘導培地 (15% FBS、1% NEAA、1% Nucleosides、110  $\mu$ M 2-ME、1% Pen-Strep を含む D-MEM) に懸濁し、60φのディッシュに播種した。30 分後に上清を静かに回収し、ES 細胞を精製した。

### 13. Embryonic stem cell test (EST)

Lipidure coat 96 穴プレート (Thermo Fisher) に  $1 \times 10^3$  cells/well となるように ES 細胞を播種した。37°C、飽和蒸気圧、5%CO<sub>2</sub> 存在下で 6 時間浮遊培養し、凝集体を形成させた後、各濃度の mSP1000、nSP300、nSP70、nSP70-C、nSP70-N、nSP30、nSP30-C、nSP30-N、トレチノインを添加し、さらに浮遊培養を継続し胚様体 (EB) を形成させた。5 日後に tissue culture treated 96 穴プレート (Nunc) に EB を再度播種し、5 日間接着培養した。培養開始から 10 日目に、各ウェルの細胞を光学顕微鏡下で観察した。心筋に分化することで認められる拍動を分化の指標として、24 ウェルあたりの拍動数から拍動率を算出した。

### 14. ナノシリカのトキシコプロテオミクス

尾静脈投与による検討では、BALB/c マウスに生理食塩水 (saline) で 8 mg/mL に調整した非晶質シリカ分散液 (nSP70、nSP300、mSP1000、nSP70-C、nSP70-N) および、4 mg/mL に調整した非晶質シリカ分散液 (nSP30) をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ (0.8 mg/mouse および 0.4 mg/mouse) 投与し、投与後、経時的に (6 時間、24 時間、3 日、7 日) 血液を回収した。経鼻投与による検討では、BALB/c マウスに、非晶質シリカ分散液 (nSP30) を 20  $\mu$ l (0.5 mg/mouse) 投与し、24 時間後に心臓採血により血液を回収した。いずれのサンプルも 12000 rpm、15 分間遠心操作を行うことにより血漿を回収した。この血漿を 2 次元ディフアレンシャル電気泳動 (2D-DIGE) に供し、発現変動が認められたスポットを切り出し、100  $\mu$ l の脱色液 (50% acetonitrile/25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) を加え、室温で 10 分間振盪した後、脱色液を取り除くことで脱色を行った。続いて 200  $\mu$ l の 100% acetonitrile を加え、ゲル片が白濁した後取り除き、遠心濃縮器によって乾燥させることで脱水した。脱水したゲル片に 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> で 5 倍希釈した 20  $\mu$ l/mL の trypsin 溶液を 4  $\mu$ l 加え、37°C で 16



時間反応させることで、ゲル内の蛋白質を trypsin 消化した。消化後、ゲル片に抽出液 (50  $\mu$ l の 50% acetonitrile / 0.1% formic acid 溶液) を加え、30 分間ボルテックスした後、抽出液を回収した。この操作を計 3 回 (2 回目は 50  $\mu$ l の 80% acetonitrile / 0.1% formic acid 溶液、3 回目は 50  $\mu$ l の 100% acetonitrile で抽出) 繰り返すことで消化ペプチドを抽出した。ペプチド抽出液は遠心濃縮器によって濃縮し、14000 rpm、5 分間遠心後の上清をサンプルとして用いた。得られたサンプルは nano-flow liquid chromatography/tandem mass spectrometry (maXis, Bruker Daltonik GmbH) により解析した。

血漿中の hemopexin、haptoglobin 量は、市販の ELISA kit (Life Diagnostics) を用い測定した。また、heme、hemoglobin 量は市販の kit (BioAssay Systems) を用い測定した。操作は添付のプロトコールに準じて行った。血漿中の総ビリルビン、直接ビリルビン量を比色法にて測定した。測定には、生化学分析装置 FUJII DRI-CHEM 7000 (FUJIFILM) を用いた。さらに、血漿中の IL-6 量は、市販の kit (BD Pharmingen) を用い、CXCL2 量は、市販の kit (R&D systems) を用いて測定した。操作は添付のプロトコールに準じて行った。

#### 15. ナノシリカ投与時の肝障害マーカーとしての miR-122 の有用性評価

非晶質ナノシリカ (nSP70) を複数濃度投与し、経時的に血中 miR-122 量を測定した検討では、BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性) に生理食塩水 (saline) で 1 mg/mL、4 mg/mL、8 mg/mL、20 mg/mL に調整した nSP70 を 100  $\mu$ l (0.1 mg/mouse、0.4 mg/mouse、0.8 mg/mouse、2 mg/mouse) 尾静脈投与し、経時的に (8 時間、24 時間) 血液を回収した。投与後、8 時間における血液は眼窩採血により回収し、24 時間後における血液は心臓採血により回収した。また、異なる粒子径の非晶質シリカを用いた検討と表面修

飾を施した非晶質シリカを用いた検討では、nSP70、nSP70-C、nSP70-N、nSP300、mSP1000 を 8 mg/mL に調整し、それぞれ 40 mg/kg となるように BALB/c マウスに尾静脈より投与し、投与後 8 時間において血液を回収した。回収した血液を 12000 rpm、15 分間遠心操作を行って血清を回収した。回収した血清を用いて、miR-122 量を測定するとともに、一般に使用されている肝障害マーカーである ALT、AST を測定した。回収した血清から miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて miRNA を精製した。10 ng の RNA を TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) と TaqMan microRNA assays (Applied Biosystems) のプライマーを用いて、T3 Thermocycler (Biometra) により miR-122 を逆転写した。なお、操作は添付のプロトコールに準じて行った。逆転写の反応条件は、16°C で 30 分、42°C で 30 分、85°C で 5 分の反応条件で行った。その後、以下の手順で血中 miR-122 量の測定を行った。

96 穴プレートの 1well あたり、12.5  $\mu$ l の TaqMan Universal Master MixII, with UNG (Applied Biosystems) と 1.25  $\mu$ l の TaqMan microRNA Assays の 20 $\times$ プライマー・プローブ、9.65  $\mu$ l の Nuclease-free 水 (日本ジーン) を含むように混合液を予め用意し、各 well に 23.4  $\mu$ l ずつ分注した。その後、逆転写したサンプルを対応する well に 1.6  $\mu$ l ずつ加え、よく混ぜ合わせた。プレートにシールを貼付した後、軽く遠心して液を下に落とし、ABI-PRISM7000 (Applied Biosystems, USA) を用いて、定量的リアルタイム PCR 解析を行った。反応条件は、50°C で 2 分、95°C で 10 分を 1 サイクルした後、95°C で 15 秒、60°C で 60 秒を 40 サイクル分反応させた。また、miR-122 量は、逆転写に持ち込んだ RNA 液量当たりの発現量として表し、saline 投与群を対照群としてその相対値を測定した。

#### 16. 血液生化学検査

各種シリカの最終投与から 24 時間後に、マウスをペントバルビタール（ソムノペンチル；Schering-plough Animal Health）で麻酔し、心臓より採血を行った。採血は、1/9 容量の 3.8% のクエン酸ナトリウム溶液であらかじめ湿らせたシリンジおよび注射針を用いて行った。この溶液を全血として血球検査に用い、残りを 1750 x g、15 分間、遠心分離して上清を血漿として回収した。得られた血漿は以下の血液生化学検査および血液凝固試験に供した。すなわち、血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、血中尿素窒素 (BUN)、アルブミン (ALB) を生化学分析装置 FUJI DRICHEM 7000 を用いて測定した。

#### **17. サブナノ銀・サブナノ白金の経皮塗布における一般毒性評価**

BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、サブナノ銀分散液 (snAg lot:10070501)、ナノ銀分散液 (nAg lot:10122301)、コントロールとして硝酸銀水溶液を 200 µg/body、サブナノ白金分散液 (snPt lot:10070501)、ナノ白金分散液 (nPt lot:10122302) を 100 µg/body で 7 日間連続経皮投与した。また、サブナノ白金分散液については、28 日間経皮塗布による影響も検討した。その際、経日的に体重を測定した。最終投与 24 時間後に、マウスをペントバルビタール麻酔下で脱血死させ、心臓採血により血液を回収した。回収した血液を多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 (Abaxis) を用いて、総白血球数、リンパ球数、単球数、顆粒球数、赤血球数、血小板数を電気抵抗法により測定した。

#### **18. 誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を用いたサブナノ銀・サブナノ白金の経皮塗布における体内吸収性解析**

BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、各粒子を 100 µg/body で耳介に片耳 10 µl ずつ 7 日間連続経皮塗布した。最終投与から 24 時間後に、耳介、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を摘出した。これらの組織をテフロン製分解容器に採取し、硝酸 1 mL 及び過酸化水素 1 mL を加え、マイクロ

ウェーブ分解装置 (MILESTONE ETHOS1、マイルストーンゼネラル社製) により分解した。分解液を水で 10 mL とし、これを試料溶液とした。分解後の試料溶液に、内標準として 0.2 µg/mL のタリウム溶液 0.1 mL を加えた。この試料溶液中の白金濃度を ICP-MS 装置 (Agilent 7500ce、アジレントテクノロジー社製) を用いて分析した。尚、分析条件は、試料導入速度：1.0 ml/min、プラズマガス：アルゴン 15 L/min、キャリアーガス：アルゴン 0.75 L/min、メイクアップガス：アルゴン 0.3 L/min、リアクションガス：ヘリウム、とし、測定質量数は 195 (白金)、108 (銀)、205 (タリウム) とした。また、0-20 µg/L 範囲の白金溶液 10 mL に内標準として 0.2 µg/mL のタリウム溶液 0.1 mL を加えたものを検量線溶液として用いた。

#### **19. サブナノ銀・サブナノ白金の経皮塗布における各組織の病理学的解析**

BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snAg (lot:10070501)、nAg (lot:10122301)、コントロールとして硝酸銀水溶液を 200 µg/body、snPt (lot:10070501)、nPt (lot:10122302) を 100 µg/body で耳介に片耳 10 µl ずつ 7 日間連続経皮塗布した。最終投与から 24 時間後、耳介、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、すぐに 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。その後、各組織のパラフィンブロックを作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色 (H.E. 染色) を実施した。パラフィン切片をキシレンで脱パラフィン、エタノールで脱水処理し、水洗後、ヘマトキシリンに 15 分間浸漬し、再度水洗した。この切片をエオジンに 1 分間浸漬した後、再度エタノールで脱水、キシレンで処理後、封入した。また、サブナノ白金分散液については、28 日間経皮塗布による影響も検討した。

#### **20. サブナノ銀の経鼻曝露時における生体影響評価**

BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snAg (Lot: 10122301) を 0.1 mg/mouse、0.08

mg/mouse、0.06 mg/mouse、0.04 mg/mouse、0.02 mg/mouse で 7 日間連続経鼻投与し、その際、経日的に生存率の評価、体重測定を行った。最終投与 24 時間後に、心臓採血により血液を回収し、多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 (Abaxis) を用いて、総白血球数、リンパ球数、単球数、顆粒球数、赤血球数、血小板数を電気抵抗法により測定した。また、頭部を、脳・皮膚を取り除き同固定液で固定し、EDTA 脱灰液にて脱灰後、鼻粘膜を摘出した。その後、各組織のパラフィンブロックを作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色 (H.E.染色) を実施した。

### 21. サブナノ銀・サブナノ白金の経鼻曝露時における一般毒性評価

BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snPt (lot:10070501)、nPt (lot:10122302)、コントロールとして硝酸銀水溶液をそれぞれ 1.2 mg Ag/kg で 7 日間連続経鼻投与した。また、BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、nPt (lot:10070501)、nPt (lot:10122302) をそれぞれ 0.1 mg Pt/mouse で 7 日間連続経鼻投与した。その際、経日的に体重、食餌量、および投与前、投与 15 分後の体温をデジタル温度計 TD-300 (芝浦電子) を用いて測定した。最終投与 24 時間後に、心臓採血により血液を回収し、多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 (Abaxis, Union City, CA) を用いて、総白血球数、リンパ球数、単球数、顆粒球数、赤血球数、血小板数を電気抵抗法により測定した。また、回収した血液から血漿を分離し、生化学分析装置 FUJI DRICHEM 7000 (FUJIFILM) を用いて、ALT、AST、BUN、CPK、ALB、Na、K を測定した。

### 22. snPt の生殖発生毒性評価

妊娠 14 日目の BALB/c マウス (8-10 週齢、雌性) を清水実験材料より購入した。0.9%生理食塩水で 2.25mg/ml、1.125mg/ml に調整した nPt、snPt 溶液を妊娠 16 日目、17 日目に 20、10、5mg/kg でマウスへ尾静脈内投与した。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、胎仔、胎盤を摘出し、それぞれの重量を測定した。

妊娠 14 日目の BALB/c マウス (8-10 週齢) を清水実験材料より購入した。妊娠 16 日目、17 日目に生理食塩水で希釈した白金溶液を 20、10、5 mg/kg になるようにマウスへ尾静脈内投与した。最終投与から 24 時間後に心臓採血により血液を回収した。いずれのサンプルも室温で 30 分放置後、12000 rpm で 15 分遠心し、血清を回収し、生化学的検査を実施した。

### 23. 誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を用いた実銀・実白金の経皮塗布における体内吸収性評価

BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、実銀サンプルを 2 µg/mouse、実白金サンプルを 10 µg/mouse で 7 日間連続経皮塗布した。最終投与から 24 時間後に、耳介、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を摘出した。これらの臓器をマイクロウェーブ分解により酸分解した後、ICP 質量分析法により銀・白金の定量解析を行なった。

### 24. 実銀・実白金の経鼻曝露時における一般毒性評価

BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、実銀サンプルを 2 µg/mouse、実白金サンプルを 10 µg/mouse で 7 日間連続経鼻投与した。また、比較対象としてサブナノ白金も用いた。

### 25. 透過型電子顕微鏡を用いた nSP・snPt の生体内/細胞内局在の解析

各サンプルを曝露した際の体内局在を透過型電子顕微鏡 (TEM) により評価した。最終投与から 24 時間後に、鼻粘膜、脳、肝臓、肺を摘出した。これらの組織をおよそ 1 mm 角にカットした後に、氷冷した 2.5%グルタルアルデヒド中で 2 時間固定した。固定液を冷 0.1 M リン酸緩衝液で置換した後、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) 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、厚さがおよそ 60 nm の超薄切片を作成して TEM で観察した。

## C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

### D. 考察

#### 1. シリカの塗布によるアトピー病態、及びアナフィラキシー病態への影響評価

これまでに我々は、非晶質ナノシリカが経皮的に投与された場合には、Dp 誘導性のアトピー病態を悪化させることを見出している。そこで本検討では、現実的な曝露経路を考慮し、経皮的なナノシリカの曝露 (ナノシリカの塗布) が、アトピー性皮膚炎に与える影響を解析した。ダニ抗原を単独塗布した群と比較し、nSP30 を共塗布した群では、耳介部の腫脹がわずかに軽減されていた一方で、一般にアトピー病態の重症度と相関することの知られる total IgE の値は逆に上昇している傾向が観察された (図 1)。さらに、Dp 特異的な IgG の産生を ELISA にて評価した結果、nSP30 との共塗布群ではその産生がほとんど観察されなかった (図 2)。したがって、本検討の結果、nSP30 を Dp とともに共塗布することで、Dp に対する抗原特異的免疫応答の誘導が抑制され、Dp によるアトピー様病態が抑えられることが示唆された。一方で、アレルギー病態と密接なかわりのある IgE の産生が増強される傾向があることから、今後、nSP30 の塗布による影響を、アトピー病態に限らず、他のアレルギー病態を指標として評価していくことが重要である。また、抗原特異的な IgG は、IgE 性の急性アレルギー応答、アナフィラキシーショックなどを抑制することが知られており、nSP30 を共塗布されたマウスでは、Dp によるアナフィラキシーショックに易感受性を示す可能性が考えられた。そこで、これらマウスに Dp を尾静脈内から投与し、アナフィラキシー応答への感受性を評価した。その結果、nSP30 を共塗布した群では、Dp に対するアナフィラキ

シー応答により高い感受性を示すことが示された (図 3)。したがって、nSP30 の塗布は、Dp 誘導性のアトピー病態には大きな影響を与えないものの、Dp に対する抗体産生に影響を与え、アナフィラキシー易感受性を誘導することが明らかとなった。今後は、Dp と nSP30 の経皮塗布後の動態の定性、定量的解析などを通じ、nSP30 塗布によるハザード発現機構の解明を試みる予定である。

#### 2. 抗シリカ抗体の検出

ナノマテリアルが生体異物である以上、体内に侵入したナノマテリアルと生体免疫系との相互作用は必然である。免疫系は大きく自然免疫系と獲得免疫系に区別することが出来るが、これまで、ナノマテリアルの安全性に関して行われてきた検討は自然免疫系との関連に着目された検討のみであった。そこで本検討では、ナノマテリアルの未知の生体影響への懸念を考慮し、あらゆる可能性を検証していくため、獲得免疫系によるナノシリカ認識の可能性に関して検討した。獲得免疫系によるシリカ認識の可能性を検証するため、シリカ特異的抗体の産生を評価した。その結果、100 nm 以下のナノシリカを投与した群においてのみ、免疫原であるシリカに結合する IgG 抗体の誘導が認められた (図 4)。したがって、100 nm 以下のナノシリカのみが獲得免疫系を活性化し、無機微粒子に対する特異的抗体の誘導という極めて興味深い現象を引き起こすことが明らかとなった。そこで次に、この抗シリカ抗体の特異性を確かめるため、BIAcore を用いて抗体とシリカ間の相互作用を解析した。解析には、Dp と nSP70 を免疫することで得た血漿から、IgG 分画を精製し、抗シリカ IgG として用いた。まず、nSP70 と抗体の相互作用を解析した結果、抗シリカ IgG で、コントロールの IgG よりも高いシグナルが検出された (図 5)。したがって、抗シリカ IgG が、

nSP70 に対して強い結合性を示すことが明らかとなった。なお、この抗シリカ IgG の、nSP30 に対する相互作用を解析した結果、nSP30 に対しても高い相互作用を示すことが示された (図 5)。したがって、抗シリカ IgG には、様々なサイズのシリカに交差する抗体が含まれている可能性が明らかとなった。そこでさらに、抗シリカ抗体のシリカのサイズに対する交差反応性を評価した。その結果、抗シリカ抗体の誘導は 100 nm 以下のナノシリカによってのみ引き起こされ、誘導された抗体はすべてのサイズのシリカと交差することが明らかとなった (図 6)。以上の事実により、100 nm 以下のナノシリカのみが獲得免疫系を活性化し、様々なサイズのシリカに交差反応性を示す抗体の誘導を行うことが初めて示された。

### 3. 抗シリカ抗体誘導メカニズムの解析

抗シリカ抗体産生メカニズムを解析した。まず、シリカ単独で免疫した際の抗体誘導能を評価することで、抗体産生における Dp の寄与を評価した。その結果、Dp と nSP70 をともに免疫した群では、前結果同様に、抗 nSP70 抗体の誘導が観察された (図 7)。一方で、nSP70 単独の免疫では全く抗体の誘導が生じなかった (図 7)。したがって、抗シリカ抗体の産生には Dp の存在が必須であることが示された。次に、抗シリカ抗体産生におけるヘルパー T 細胞 (Th 細胞 ; CD4 陽性) の関与を調べるため、抗 CD4 抗体により CD4 陽性細胞を除去したマウスの抗シリカ抗体産生能を評価した。その結果、CD4 陽性細胞を除去したマウスでは抗 nSP70 抗体の誘導が認められず、シリカに対する抗体の誘導には Th 細胞の存在が必須であることが示唆された (図 8)。また、抗 CD8 抗体により CD8 陽性細胞を除去したマウスでは抗体の産生に変化は観察されず、これら抗体産生に細胞傷害性 T 細胞などの関与はないことが

認められている (図 8)。したがって、抗シリカ抗体産生経路には、①BCR による非タンパク性抗原 (ナノシリカ) の認識と、②TCR によるタンパク性抗原 (Dp) の認識が同時に生じる必要があると考えられる。すなわち、ナノシリカが Dp をキャリアとしたハプテンとしてふるまうことで抗シリカ抗体が誘導されていると推測された。一方で、通常、ハプテンに対する抗体産生には、ハプテンとキャリアタンパクの間に共有結合やイオン結合などの強固な結合があることが必須条件であると考えられてきた。今回の系では、Dp とシリカを混合したのみであり、そのような結合が生じていることがないであろうことを鑑みると、本現象により、新たな抗体産生経路が示唆されたといえる。通常では考えられない無機物に対する抗体、抗シリカ抗体がなぜ誘導されたのか、今後、サイズの微小化により、タンパク質との相互作用が変化した可能性などを視野に検討を進めていきたい。また、これら抗体が産生されることで、ナノシリカによる生体影響がどのように変化するかについても詳細な検討が必要である。一方で、この抗シリカ抗体を応用することで、これまで困難であったナノシリカの体内動態の定量的解析を実現できる可能性が考えられ、今後の検討に期待がかかる。

### 4. シリカと薬物との相互作用の解析

これまでに我々は、nSP30 を 28 日間経口投与した際に、nSP30 が肝臓をはじめとした全身組織に分布していることを見出している。従って、nSP30 の経口曝露により肝臓に移行し、重要な肝機能の一つである薬物代謝機能に影響を与える可能性が考えられる。そこで、BALB/c マウスに nSP30 および mSP1000 を 1 週間経口投与した後、ペントバルビタールを投与し、睡眠時間を測定した。その結果、nSP30 を経口投与した群において、コントロール群と比較して睡眠時間が延長

する傾向が見られた (図 9)。今後は、肝臓ホモジネートを作製し、CYP1A2 および CYP3A4 の活性測定と定量解析を予定している。更に、今回の結果を受けて、CYP1A2、CYP3A4 以外の CYP 2 E1 など代表的な CYP への影響の解析、経口曝露時の投与局所である腸管局所に発現する薬物代謝酵素に及ぼす影響も解析する予定である。

## 5. 外表観察による非晶質ナノシリカの催奇形性評価

非晶質ナノシリカの催奇形性を評価するため、妊娠 7 日目の ICR マウスに nSP30 を 3 日間連続で尾静脈内投与し、母体体重を毎日測定した。その結果、nSP30 を投与した群ではともに母体体重が減少する傾向が認められた。さらに、nSP30 を 0.9 mg 投与した群では母獣の死亡が強く誘発された (図 10)。また、妊娠 17 日目に胎仔、胎盤を回収し、胎仔数、胎仔重量、胎盤重量及び胎仔の外表奇形の有無を評価した。その結果、胎仔数、胎仔重量、胎盤重量に各群で有意な差は認められなかった。また、nSP30 を 0.7 mg 及び 0.9 mg 投与した群において、一部の胎仔に奇形が観察されたが、コントロール群と有意な差は認められなかった (図 10)。以上の結果から、nSP30 は催奇形性を有する可能性が示されたものの、その作用は母獣への急性毒性が認められる投与量においても非常に弱いものであることが示唆された。

## 6. 外表観察によるナノ酸化チタン、サブナノ白金の催奇形性評価

我々は非晶質ナノシリカ同様、ナノ酸化チタン、サブナノ白金が胎仔発育不全を誘発する可能性を明らかとしている。本観点から、ナノ酸化チタン、サブナノ白金のより詳細な発生毒性を評価するため、催奇形性評価を試みた。妊娠 7 日目から各ナノマテリアルを 3 日間連続で尾静脈内投与し、母体体重を毎日測定するとともに、妊娠 17 日目に胎仔、胎盤を回収し、胎仔数、胎仔重量、胎盤重量及び胎仔の外表奇形の有無を評価した。その結果、ポジティブコントロールであるレチノイン酸投与群では、胎仔数、胎仔重量、胎盤重量

に変化は認められないものの、顕著な先天異常仔の増加が認められた (図 11)。ナノ酸化チタンを投与した群では、胎仔重量の低下が認められたが、ナノ酸化チタン、サブナノ白金を投与した群ではともに、胎仔の外表に奇形は認められなかった (図 11)。以上の結果から、ナノ酸化チタン、サブナノ白金は催奇形性を示さない、あるいは示すとしても非常に弱い作用であることが示唆された。

## 7. ES 細胞の心筋細胞への分化に及ぼす非晶質ナノシリカの影響評価

ナノマテリアルの催奇形性を *in vitro* で予測する評価系の構築を目的に、非晶質シリカが ES 細胞の心筋への分化に及ぼす影響を EST 法により評価した。その結果、コントロール群では、ほぼすべてのウェルで拍動が観察されたが、催奇形性物質として知られるトレチノインを添加した群では拍動が認められず、催奇形性物質により、心筋への分化が抑制されることが示唆された (data not shown)。また、mSP1000、nSP300、nSP70、nSP70-C、nSP70-N、nSP30-C、nSP30-N、を添加した群で拍動率に影響は認められなかった (図 12)。一方で、nSP30 を添加した群では、細胞傷害性が認められない濃度においても拍動率の低下傾向が認められ、心筋の分化が抑制されることが示唆された (図 12)。本結果は、nSP30 が弱い催奇形性を有する可能性を示す一方で、表面修飾によりその影響を回避できる可能性を示すものである。今後は、*in vivo* での催奇形性試験の結果、及び骨芽細胞や神経細胞などの他の細胞への分化に及ぼす影響評価も考慮し、より詳細に、また高確度にナノマテリアルの催奇形性を評価可能な *in vitro* 評価系の構築を進める予定である。

## 8. 非晶質シリカ投与後の血中 hemopexin 量の測定

ナノマテリアルの安全性を迅速に評価できる安全性評価バイオマーカーの確立を目指し、ナノシリカ曝露によって発現変動する血中蛋白質の網羅的解析

を試みた。BALB/c マウスに、nSP70 を尾静脈より単回投与し、24 時間後に回収した血漿を用いて、2D-DIGE を行った。発現変動解析によりコントロール群と比較して nSP70 投与群で、2 倍以上の発現変動が認められたスポットを切り出し、LC/TOF/MS により対応する蛋白質の同定を試みた。その結果 7 種類の蛋白質が同定された。その中で発現変動の大きかった hemopexin に関して、検討を進めた。非晶質シリカ投与後の血中 hemopexin 量の発現変動を経時的に解析するために、BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ 0.8 mg/mouse で、および nSP30 を 0.4 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 6 時間、24 時間、3 日、7 日における血中 hemopexin 量を ELISA により測定した。なお、nSP70、nSP300、mSP1000 投与群において、一般的な組織障害マーカーとして知られている ALT、AST、BUN 値の有意な変動は認められなかった (date not shown)。その結果、nSP300、mSP1000 投与群では、いずれの時間においても血中 hemopexin 量の有意な増加は認められなかった (図 13)。一方で、nSP70 投与群では、投与後 24 時間において血中 hemopexin 量が最大ピークを示すことが明らかとなった (図 13)。さらに、nSP30 投与群では、投与後 3 日において血中 hemopexin 量が最大ピークを示すことが明らかとなった (図 13)。次に、BALB/c マウスに nSP70 を各投与量 (0.05 mg/mouse、0.2 mg/mouse、0.8 mg/mouse) で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 hemopexin 量を ELISA により測定した。その結果、0.2 mg/mouse、0.05 mg/mouse で投与した群では、saline 投与群と比較し、ほとんど血中 hemopexin 量の増加は認められなかった (図 14)。これらの結果から、血中 hemopexin 量が、非晶質シリカの粒子径の減少に伴い増加すること、また、非晶質ナノシリカの投与量依存的に増加することが明らかとなった。

#### 9. 表面修飾を施した非晶質シリカ投与による血中 hemopexin 量の発現変動解析

hemopexin が非晶質ナノシリカ投与による負の生体影響を予測する安全性評価マーカーになり得るかを評価するために、表面修飾を施した nSP70 を用いて、血中 hemopexin 量の発現変動を解析した。BALB/c マウスに nSP70、nSP70-C、nSP70-N をそれぞれ 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 hemopexin 量を ELISA により測定した。その結果、前述の結果と同様に、nSP70 投与群では、saline 投与群と比較し有意に血中 hemopexin 量の増加が認められた (図 15)。さらに、nSP70-N 投与群では nSP70 投与群と比較し、血中 hemopexin 量が有意に減少することが明らかとなった (図 15)。一方で、nSP70-C 投与群では nSP70 投与群と比較し、hemopexin の産生量に有意な差は認められなかった (図 15)。このことから、nSP70-C 投与により、未知の生体影響が誘発されることが示された。以上の結果から、hemopexin が、非晶質ナノシリカ投与による生体影響を予測する安全性評価マーカーとなり得ることが示唆された。

#### 10. 様々な経路からの非晶質シリカ投与による血中急性期蛋白質の発現変動解析

ナノマテリアルは既に我々の生活に広く浸透していることから、我々は、様々な経路からナノマテリアルに投与される機会に溢れている。したがって、有用な安全性評価マーカーを探索するためには、実際の投与経路を想定してナノマテリアルを投与した時の血中での発現変動を評価することが必要である。そこで、非晶質ナノシリカを経鼻投与した時の血中 hemopexin 量を解析した。BALB/c マウスに nSP30 を各投与量 (0.02 mg/mouse、0.1 mg/mouse、0.5 mg/mouse) で経鼻投与し、投与後 24 時間における血中 hemopexin 量を ELISA により測定した。その結果、いずれの投与量においても血中 hemopexin 量に有意な変化は認められなかった (図 16)。今後は、経口・経皮など他の投与経路での血中 hemopexin 量の発現変動を解析するとともに、ナノマテリアルの長期投与による影響について

も解析を進めることで、安全なナノマテリアルの開発支援に資する情報集積を進めていく。

### 11. 非晶質ナノシリカ投与による溶血誘発の可能性

hemopexin は、急性期蛋白質の一種である haptoglobin とともに、溶血等により増加する遊離型の heme の毒性を回避するための生体防御反応の一環として働くことが知られている。生体内において hemopexin は heme と結合し、haptoglobin は hemoglobin と結合することでそれらを血流中から除去する。そこで、非晶質ナノシリカ投与により、血中 hemopexin 量が増加していたことから、非晶質ナノシリカが溶血を誘発すると考え、血中の heme、hemoglobin 量の発現変動を解析した。BALB/c マウスに nSP70 を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 heme、hemoglobin 量を測定した。その結果、投与後 24 時間において血中 hemoglobin 量、血中 heme 量に有意な変化は認められなかった (図 17)。次に、溶血の指標である血漿中の総ビリルビン、直接ビリルビン量の発現変動を評価した。BALB/c マウスに nSP70 を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 5 時間における総ビリルビン、直接ビリルビン量を測定した。その結果、本検討における投与条件下では nSP70 投与により、総ビリルビン、直接ビリルビン量に有意な変化は認められなかった (図 18)。今後、非晶質ナノシリカ投与による未知の生体影響発現の可能性も踏まえ、より詳細な検討が必要であると考えている。

### 12. 非晶質ナノシリカ投与による血中急性期蛋白質の発現メカニズムの解明に向けて

一般的に、急性期蛋白質は IL-6 などの炎症性サイトカインの刺激により、主に肝臓から産生されることが知られている。そこで、非晶質ナノシリカ投与による血中急性期蛋白質量の増加メカニズムの解明を目的とし、非晶質ナノシリカ投与後の血中 IL-6 量の発現変動を解析した。BALB/c マウスに nSP70 を 0.8 mg/mouse で尾静脈投

与し、投与後 2、6 時間における血中 IL-6 量を ELISA により測定した。その結果、投与後 2 時間において、nSP70 投与により血中 IL-6 量が有意に増加することが明らかとなった (図 19)。今後は、抗 IL-6R 抗体などを前処置した際の、非晶質ナノシリカ投与による血中急性期蛋白質量の発現変動について評価していく予定である。

### 13. 非晶質ナノシリカ投与による末梢血好中球画分の増加メカニズムの解明に向けて

これまでに我々は、非晶質ナノシリカを投与することで、血中 G-CSF 量の増加に伴い、末梢血好中球画分が増加することを明らかとしてきた。そこで、非晶質ナノシリカ投与による末梢血好中球画分の増加メカニズムを解明するために、非晶質ナノシリカ投与後の血中 CXCL2 量の発現変動を解析した。ケモカインの一種である CXCL2 は、単球やマクロファージから産生され、好中球を血中から炎症部位に誘引する役割を有することが知られている。BALB/c マウスに nSP70 を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 2、6、24 時間における血中 CXCL2 量を ELISA により測定した。その結果、投与後 2 時間において、nSP70 投与により血中 CXCL2 量が有意に増加することが明らかとなり、nSP70 投与による末梢血好中球画分の増加に、血中 CXCL2 の発現増加が関与する可能性が示された (図 20)。今後は、非晶質ナノシリカ投与による末梢血好中球画分の増加と、それに伴い誘発される生体影響との関連について詳細な検討を進めていく予定である。

### 14. 非晶質シリカ曝露後の血中 ALT・AST、miR-122 量の発現変動解析

これまでに我々は、高用量 (2 mg/mouse) の尾静脈内投与ではあるものの、nSP70 がマウスに肝障害を誘発し得ることを明らかとしてきた。そこで、肝障害を指標として、非晶質ナノシリカの安全性を迅速に評価できる安全性評価バイオマーカーの探索を試みた。我々は、現在汎用されている肝障害マーカーである ALT・AST が、筋疾患においても発現上昇するなど、正確に肝障害を反



映し得ない可能性があることを考慮し、近年新規のバイオマーカーとして期待される microRNA に着目した。本検討では、肝臓特異的に発現し、肝障害マーカーとして期待される miR-122 が、非晶質ナノシリカの負の生体影響を予測する安全性評価バイオマーカーとなり得るかを、投与量依存性、経時的発現変動の観点から評価した。nSP70 を 0.1 mg/mouse、0.4 mg/mouse、0.8 mg/mouse、2 mg/mouse で尾静脈投与した。まず、投与 8 時間後における血中 ALT・AST を測定したところ、2 mg/mouse 投与群においてのみ上昇傾向が認められた (図 21)。一方で、投与 8 時間後の血中 miR-122 量は、ALT・AST の発現変動が認められなかった 0.4 mg/mouse、0.8 mg/mouse 投与群においても saline 投与群と比較して数十倍の発現上昇が認められたことに加え、2 mg/mouse 投与群では saline 投与群と比較して数千倍の発現上昇が認められた (図 21)。次に、投与 24 時間後の血中 ALT・AST を測定したところ、0.8 mg/mouse 投与群の AST が saline 投与群と比較して有意に上昇していた (図 21) (2 mg/mouse 投与群は全例が死亡した)。一方で、投与 24 時間後の血中 miR-122 量は、有意な変化ではないものの、ALT・AST の発現変動が認められなかった 0.4 mg/mouse 投与群においても、saline 群と比較して十数倍発現上昇することを明らかとした (図 21)。次に、miR-122 の発現変動を非晶質シリカの粒子径依存性の観点から検討した。nSP70 で尾静脈内投与し、血液を回収した。血中の ALT・AST、及び miR-122 量は nSP70 投与群では saline 投与群と比較して発現上昇を示した一方、表面修飾体を投与したマウスでは変動は認められなかった。(図 22)。miR-122 が肝障害マーカーである ALT・AST と同様の発現変動を示したこと、miR-122 は ALT・AST と比較して大きな発現変動を示したことから、血中 miR-122 は、ナノマテリアルにより誘発され得る肝障害を予測する有用な安全性評価マーカーとなり得る可能性が示された。今後、miR-122

のみならず他の microRNA についても検討を進め、ナノマテリアルの安全性評価マーカーとしての microRNA の有用性をより詳細に評価していく予定である。

#### 15. サブナノ銀・サブナノ白金の経皮塗布における体内吸収性評価

サブナノ銀、サブナノ白金の経皮塗布による体内吸収性を評価するため、BALB/c マウスに、サブナノ銀分散液 (snAg)、ナノ銀分散液 (nAg)、コントロールとして硝酸銀水溶液を 200 µg/body、サブナノ白金分散液 (snPt)、ナノ白金分散液 (nPt) を 100 µg/body で、耳介に片耳 10 µl ずつ 7 日間連続で経皮塗布した。その後、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、ICP 質量分析により各組織の銀量、白金量を定量した。その結果、硝酸銀水溶液を経皮塗布した群においては、理論上投与した全量の 15% が投与局所である耳介から検出され、他の組織では肝臓でのみ 0.1% 弱が認められたものの、他の組織では 0.1% 未満であった (図 23)。また、nAg を経皮塗布した群では、体内から投与した全量の約 0.2% が検出され、その半分は投与局所である耳介から認められた (図 23)。今回解析した他の組織では肝臓で全量の 0.02% が検出され、他は全て 0.01% 未満であった。一方で、snAg を経皮塗布した群では、体内から投与した全量の約 0.5% が検出され、nAg 経皮塗布時よりも体内吸収量が増加する傾向が認められた (図 23)。更に、体内分布に関しても、nAg 経皮塗布群、硝酸銀水溶液経皮塗布群では投与局所から 80% 以上が検出されたのに対し、snAg 経皮塗布群では投与局所で検出された量は 0.01% 未満であり、体内に吸収され全身の各組織に分布していることが明らかとなった (図 23)。特に、肝臓において全量の約 0.4% が認められ、snAg は肝臓に蓄積される可能性が示された (図 23)。同様に、白金素材に関しては、nPt 経皮塗布群では投与局所から投与した全量の約 0.3% が検出され、他の組織からは全く検出されなかった (図 24)。一方で、snPt 経皮塗

布群では体内から投与した全量の約 3.5%が検出され、その内約 95%は投与局所から認められたものの、残り 5%は全身の各組織に分布していることが明らかとなった(図 24)。その中でも、特に肝臓で約 0.06%、腎臓で約 0.03%認められ、吸収された snPt は肝臓・腎臓に蓄積される可能性が示された(図 24)。以上の結果から、①サブナノサイズになることで体内吸収性が增大すること、②素材によって体内分布が異なることが示唆された。現在、血中に移行した銀量・白金量の定量を進めており、これまでの結果と統合することで、snAg、snPt の血中半減期の算出、体内蓄積性を評価できると考えている。また、体内吸収性のデータから、肝臓や腎臓といった蓄積性の高い臓器をターゲットとしたハザード同定を進めていく予定である。

#### 16. サブナノ銀・サブナノ白金の経皮塗布におけるハザード同定に向けた一般毒性評価

サブナノ銀、サブナノ白金の経皮塗布による影響を評価するため、BALB/c マウスに、各粒子を 100 µg/body で、耳介に片耳 10 µl ずつ 7 日間連続で経皮塗布した。その結果、いずれの粒子を経皮塗布した群においても、コントロールとして用いた超純水投与群と比較して有意な体重変動は認められなかった(図 25)。また、各マウスの血液中の血球数を測定した結果、総白血球数、リンパ球数、顆粒球数、単球数、赤血球数、血小板数は、いずれの粒子を経皮塗布した群においてもコントロール群と比較し、顕著な差は認められなかった(図 26)。一方で、病理解析の結果、snAg を経皮塗布したマウスの塗布局所の耳介において、中程度以上の痂皮、潰瘍、炎症性細胞の浸潤、軽度ではあるものの、皮膚の上皮が破壊され、下の組織が露出した状態であるびらんが認められた(図 27)。また、snPt を 7 日間経皮塗布したマウスの耳介においても、軽度の炎症性細胞の浸潤が認められた(図 27)。snPt 分散液を 28 日間経皮塗布したマウスの耳介では、炎症性細胞の浸潤に加え、中程度の痂皮、潰瘍、表皮肥厚が認め

られた(図 28)。一方で、nAg、nPt を経皮塗布した群では塗布局所における病理異常は認められなかった(図 27)。また、いずれの粒子を経皮塗布した群においても、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓では顕著な病理異常は認められなかった。以上の結果から、サブナノ粒子がナノ粒子・イオンとは異なる生体影響を及ぼす可能性が示された。今後は、血中の生化学マーカーやサイトカインなどの解析を進め、サブナノ素材のハザード同定に向けた基礎情報を収集していく予定である。

#### 17. サブナノ銀・サブナノ白金の経鼻投与時における生体影響評価

BALB/c マウスに、サブナノ銀分散液を 0.1 mg/body、0.08 mg/body、0.06 mg/body、0.04 mg/body、0.02 mg/body で 7 日間連続経鼻投与した。その結果、snAg の投与量依存的な致死毒性、体重減少が認められた(図 29、30)。そこで、致死毒性が認められなかった snAg を 0.02 mg/body で投与した群について血球検査を行ったところ、各項目に異常は認められなかった(図 31)。一方で、この群のマウスの鼻粘膜を回収し、病理解析を行ったところ、鼻腔骨の増生、粘膜固有層の線維化が見られ、これらの所見はコントロールとして用いた超純水投与群には認められなかった。以上の結果から、snAg は鼻腔局所で激しい傷害を与えること、体重減少効果、致死毒性を示すことが明らかとなった(図 32)。

次に、snAg が致死毒性を示さない投与量である 1.2 mg Ag/kg (今回の実験から表記を Ag/kg で表記。先の実験で考えるとこの量は約 0.02 mg/body) で、BALB/c マウスに、サブナノ銀分散液、ナノ銀分散液、コントロールとして硝酸銀水溶液を 7 日間連続経鼻投与した。その結果、snAg 投与群、硝酸銀水溶液投与群において有意な体重減少が認められた(図 33)。特に snAg 投与群は投与 2 日目までの急激な体重減少、その後の回復傾向といった特徴的な変化が認められた。snAg 投与群では、食餌量の減少も認められたため、体重減少の一因になっていると考えられる

(図 33)。また、投与初日の snAg 投与 15 分後の体温は、投与前と比較して有意に低下していた(図 34)。一方で、血球検査・血液生化学検査では、各項目に異常は認められなかった(図 35)。以上の結果から、詳細は不明であるが、snAg は、特徴的な体重減少、体温低下など、nAg とともに銀イオンとも異なる生体影響を発現する可能性が示唆された。

また、白金素材による生体影響を解析するために、BALB/c マウス(6 週齢、雌性、Japan SLC, Japan)に、ナノ白金分散(nPt lot:10122302)、サブナノ白金分散液(snPt lot:10070501)をそれぞれ 0.1 mg Pt/mouse で 7 日間連続経鼻投与した。その結果、snPt を投与した群でのみ有意な体重減少が認められ、この現象に相関して、食餌量は約半分に減少していた(図 36)。また、snPt 最終投与の 15 分後の体温は、投与前と比較して有意に低下していた(図 37)。一方で、血球検査では、各項目に異常は認められなかった(図 37)。以上の結果から、詳細についてはさらなる検討が必要ではあるが、snPt は nPt にはないハザードを発現する可能性が示唆された。

#### 18. 実銀・実白金の経皮塗布における体内吸収性評価

実際に種々製品として使用されているサンプルを用いて、銀・白金粒子(各粒子の二次粒径を図 38 に示す)の経皮塗布による体内吸収性を評価した。BALB/c マウス(6 週齢、雌性)に、銀粒子サンプルを 2 µg/mouse、白金粒子サンプルを 10 µg/mouse で 7 日間連続経皮塗布した。最終投与から 24 時間後に、各粒子を経皮塗布したマウスの耳介、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、ICP 質量分析により各組織の銀量、白金量を定量した。その結果、銀、白金粒子のいずれにおいても投与局所のみからそれぞれ銀、白金が検出され、それ以外の組織では検出限界以下であった(現在のところ図 39)。投与局所から、銀が投与した全量の理論上約 0.7%、白金が約 2.5%、認められた。以上の結果から、本検討で

用いた実銀・実白金はいずれにおいても経皮塗布した場合においては、体内に吸収されないことが示唆された。今後は、実際の使用状況なども加味し、長期曝露におけるハザード同定、および体内吸収量の解析を進めていく予定である。

次に、実銀・実白金サンプルを経鼻曝露時における一般毒性を評価した。その結果、体重、体温に異常は認められなかった(現在のところ図 40、41)。また、血球検査においても、各項目に異常は認められなかった(現在のところ図 42)。今後は、実銀サンプル、実白金サンプルの安全性確保に向けて、投与局所、全身組織を対象とした病理学的解析、血液生化学的検査などの一般毒性評価に加え、より詳細な曝露情報を収集する必要がある。

#### 19. ナノ白金、サブナノ白金の胎仔への影響評価

胎仔毒性を呈さない安全なナノマテリアルの開発に向けた基礎情報の収集を目標に、nPt、snPt が胎仔に及ぼす影響を評価した。妊娠 16 日目の BALB/c マウスに nPt、snPt を 2 日間連続で尾静脈内投与した。まず、母体へ及ぶ影響を評価する目的で、最終投与 24 時間後の母体について血液生化学検査を実施した。その結果、snPt の 20 mg/kg 投与群のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、総ビリルビン(TBIL)、血中尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)が、コントロール群と比較して有意に増加していた(現在のところ図 43)。に、母体重量、子宮重量を測定したところ、有意な差ではないものの、snPt の 20 mg/kg 投与群の子宮重量が、コントロール群と比較して減少傾向にあった(現在のところ図 44)。そこで、胎仔に及ぶ影響をより詳細に評価する目的で、帝王切開により胎仔、胎盤を取り出し、重量を測定するとともに、胎仔数、死亡胎仔数を計数した。その結果、胎盤重量には変化が認められない一方で、snPt の 20 mg/kg 投与群で死亡胎仔数の増加が認められるとともに、母体の血液生化学検査では変化の認められなかった、snPt の 10 mg/kg 投与群において胎仔重量の減

少が認められた。一方で、同用量の nPt 投与群の胎仔重量はコントロール群と比較して変化は認められなかった（現在のところ図 45）。なお、これらの新生仔は正常に出産し、帝王切開による検討から予想された通り、snPt 投与群の出生時体重がコントロール群と比較して有意に低値を示すことを確認している（現在のところ図 46）。以上の結果から、snPt が胎仔発育不全を誘発する可能性があること、本ハザードは粒子径の制御により回避・減弱可能であることが示された。今後は、胎仔へのナノマテリアルの移行性・移行量といった定性・定量的な動態情報を得ると共に、snPt が胎仔の発育に影響を及ぼすメカニズムを詳細に検討する予定である。

## E. 結論

ナノマテリアルは産業化されてからの歴史が浅く、今後の応用可能性・市場規模は計り知れないものがある。従って、ナノマテリアルの危険性だけが無闇に強調され、社会受容が損なわれることだけは絶対に避けねばならない。すなわち、ナノマテリアルの曝露量や生体影響に関する科学的な情報の収集・蓄積が必須であるのは勿論のこと、安全なナノマテリアルの創製を目指した学術的な基礎研究が不可欠である。筆者らは、現在、ヒトの健康確保と豊かな社会の実現を目指し、産官学連携で、ナノマテリアルの安全性確保や安全なナノマテリアルの開発支援に資する基盤情報を収集するなど、Nano-Safety Science（ナノ安全科学研究）にチャレンジしている。そのために、医薬工学領域の大学・研究所の先生方に加え、日本化粧品工業連合会、日本化学工業協会など、多くのメーカーの方々と協力体制を築きつつ、議論を進めている（平成 22、23 年度に 2 回ずつ計 4 回の班会議を実施しており、平成 23 年度は、6 月 7 日(火)および平成 24 年 2 月 9 日(木)に実施した。その他、定期的にメール・電話等で情報/意見交換を実施。)。また、平成 24 年 3 月の日本薬学会第 132 年会では、研究代表者が中心となって、

産官学それぞれの視点から、ナノマテリアルの安全性への取り組みを紹介・議論するシンポジウムを実施した。さらに、本事業の成果は、一般市民や高校生向けの公開講座・出張講義などで紹介しており、更なる研究推進に加えて、ナノマテリアルの安全性に関する正しい情報を広く発信することで、安全で安心な健康社会の実現、そしてナノ産業の発展の両輪に尽くしていきたいと考えている。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ① 論文発表

1. Higashisaka K., Yoshioka Y., Yamashita K., Morishita Y., Fujimura M., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshikawa T., Itoh N., Tsutsumi Y. : Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials., *Biomaterials.*, 32(1):3-9, 2011.<Leading Opinion Paper にセレクト>
2. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., 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., Nakagawa S., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application., *Biomaterials.*, 32(11):2713-2724, 2011.
3. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y.,