

201236006B(1/2)

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 22～24 年度 総合研究報告書
(1/2)

研究代表者 堤 康央

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告

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-----1
研究代表者 堤 康央

II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----263

III. 研究成果の刊行物・別刷-----273

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

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

近年、ナノ素材 (ナノマテリアル [NM]: 粒子径 100 nm 以下) に加え、蛋白質と同等サイズ領域のサブナノ素材 (サブナノマテリアル [sNM]: 1~10 nm 範囲) が開発・実用化され、我々は、NM・sNM の意図的・非意図的な経皮・吸入曝露をもはや避け得ない。一方で未だ、NM・sNM の安全性については、ハザード情報でさえ不十分であり、リスク解析に必須の曝露実態情報に至っては皆無に等しい。本観点から研究代表者らは、安全な NM・sNM の開発に資する基盤情報の収集を目的に、ナノ安全科学 (Nano-Safety Science) 研究として、種々 NM・sNM の物性・品質を解析すると共に、リスク解析基盤となる細胞内・体内動態と一般毒性・特殊毒性を定性・定量解析し、物性・品質-動態-安全性の連関評価を推進してきた。本研究課題の平成 22~24 年度研究では、先駆けて sNM にも着目しつつ、香粧品基材として汎用される非晶質ナノシリカ (nSP)、サブナノ白金 (snPt: 1 nm) やサブナノ銀 (snAg: 1 nm) を用いて、微量同定・定性/定量解析基盤の追求により、①従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは異なり、100 nm 以下の nSP が経皮/経鼻吸収されること、snPt や snAg が経皮吸収されること、その後、全身分布し得ること (吸入曝露は経鼻【経口腔・経気道を含む】曝露で検討)、②特に、snPt や snAg は、ナノサイズや分子状 (イオン) の同一素材と比較して、皮膚吸収性や血中移行性が高いなど、sNM は、NM やイオンとも全く異なる体内挙動を示し、吸収されやすく、蓄積されやすい (排泄されにくい) 可能性を見出した。また、③nSP や snPt は、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すること、④母乳や精巣・精子にまで移行することなどを認めている。また、NM・sNM を経皮・吸入曝露後の一般毒性・特殊毒性試験を多数実施しており、⑤血液凝固異常を誘発し、播種性血管内凝固症候群を惹起し得ること、⑥胎盤障害を誘発し、胎子毒性 (胎子発育障害や流産) を惹起するのみならず、NM・sNM に曝露された母体から出生した仔では、免疫異常や、情動認知異常 (こころの毒性) を惹起すること、⑦母乳を介して NM・sNM に曝露された乳幼仔では、発達障害や免疫異常が懸念されること、⑧NM・sNM に曝露された雄親の仔では、発達障害や免疫異常が懸念されること、⑨経皮吸収された NM・sNM が、免疫攪乱作用により、アトピー性皮膚炎などのアレルギー症状を誘発すること、⑩NM・sNM に対する自然免疫・獲得免疫 (無機物に対する抗体産生を先駆けて発見) といったナノ免疫毒性を惹起し得ることなどを見出し、閾値を追求した。また、⑪トキシコプロテオミクスにより NM・sNM の安全性バイオマーカーの同定にも成功すると共に、表面修飾により NM・sNM の物性を制御することで、上述した NM・sNM の生体影響を大幅に軽減可能であることを明らかとしており、有効かつ安全な NM・sNM の創製に資する Nano-Safety Design (ナノ最適デザイン) とも言うべき新たな視点での知見と考えている。また、⑫OECD テストガイドラインに関して、カーボンナノチューブや C60 フラーレンの安全性評価試験を実施すると共に、snPt や snAg の皮膚影響についても、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。さらに⑬日本化粧品工業連合会・日本化学工業協会や種々ナノ産業との連携を密に取りつつ、既実用化・実用化予定の NM・sNM について、安全性評価や安全性

情報の提供を実施した。また、研究分担者や産業界・厚生労働省のオブザーバーの参加のもと、年に2回の班会議を実施し、各分担者の研究進捗状況を相互に確認・評価する（PDCA サイクルの徹底）と共に、産業界への適切な情報提供を行い、産官学連携のもと研究を推進した。これら成果は、数多くの論文・学会で報告すると共に、新聞記事・公開講座などを通じ、NM・sNMの社会受容（Sustainable Nanotechnology）の促進をも推進してきた。本研究成果は、ヒトの健康確保（安全と安心の確保）や安全なNM・sNMの開発支援など、厚生労働行政的視点で、社会的ニーズや産業界の要請に応えるものである。

研究分担者

八木清仁（大阪大学大学院薬学研究科 教授）
齋藤 滋（富山大学大学院医学薬学研究部 教授）
柳原 格（大阪府立母子保健総合医療センター研究所 部長）
宮川 剛（藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授）
河合裕一（神戸学院大学薬学部 教授）
桑形麻樹子（(財)食品薬品安全センター秦野研究所 室長）

* 研究参画機関の一覧

<官> 経済産業省、富山県、国立医薬品食品衛生研究所、独立行政法人医薬基盤研究所

<産> 日本化粧品工業連合会、日本化学工業協会、資生堂、カネボウ、コーセー、花王、日本アエロジル、ビタミン C60 バイオリサーチ、三菱商事、日産化学工業、住友化学、テイカ、日本たばこ産業、アサヒビール、パナソニック エレクトロニクスデバイス、シャープ、日立ハイテクノロジーズ、バイオフロンティア パートナーズ、食品薬品安全センター秦野研究所

<学> 大阪大学、神戸学院大学、藤田保健衛生大学

<病院> 富山大学医学部附属病院、大阪府立母子保健総合医療センター研究所

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、少なくとも次元の大きさが 100 nm 以下になるように製造されたナノ材料は、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、電氣的・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。さらに近年、ナノ材料（粒子径 100 nm 以下）に加え、蛋白質と同等サイズ領域のサブナノ材料（1~10 nm 範囲）も開発・実用化されている。これらナノ・サブナノ材料は、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・サブナノ材料の新しい機能が、逆に、人体にとって好ましくない影響を発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・サブナノ材料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・サブナノ材料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・サブナノ材料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「工業ナノ材料に関する作業部会」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・サブナノ材料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・サブナノ材料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材料・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・サブナノ材料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・サブナノ材料の大部分は、サブミクロンサイズ（数百 nm~数 μm）

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発揮する。仮にナノ・サブ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発揮する可能性も考えられる。逆にこれらの考え方は、ナノ・サブ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・サブ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・サブ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・サブ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・サブ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・サブ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・サブ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・サブナノマテリアル（サブナノ～ナノスケールで、かつ分散性に優れた非晶質ナノシリカやサブナノ白金、サブナノ銀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・サブ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・サブ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・サブナノマテリアルの安全性評価、さらには安全なナノ・サブ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・サブナノマテリアルの毒性研究（NanoTox）というよりもむしろ、ナノ・サブ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・サブ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）を推進した。平成 22～24 年度にかけて上記について、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)、サブナノ白金、サブナノ銀は 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) のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。白金は、粒子径 1 nm、8 nm (各々、snPt8、snPt1) のものを用いた。銀は、粒子径 1 nm、20 nm (各々、snAg、nAg) 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、さらに 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。なお、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. ナノシリカの皮内投与によるアトピー誘発

NC/Nga slc マウス (雄性 8 週齢) の耳介に、ヤケヒョウダニ抽出抗原 (Dp ; 125 µg/ml)、シリカ (12.5 mg/ml)、Dp とシリカの混合溶液 (Dp ;

125 µg/ml、シリカ ; 12.5 mg/ml) を 20 µl/ear で両耳介に皮内投与した。尚、本検討では、nSP30、nSP70、nSP100、mSP300、mSP1000 を用いた。

4. ナノシリカの経皮投与がアトピー性皮膚炎に与える影響評価

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前日、または前々日に計 2 回除毛処理を実施した。NC/Nga slc マウス (雌性 6 週齢) の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ヤケヒョウダニの抽出抗原 (Dp ; 125 µg/mL)、Dp とシリカの混合溶液 (Dp ; 125 µg/mL、シリカ ; 12.5 mg/mL) をそれぞれ 20 µL/ear、80 µL/back で塗布した。また、塗布は 1 日、もしくは 2 日おきに週三回、4 週間塗布した。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。塗布前 (Day 0)、および塗布開始から 1 週間ごとに耳介部の厚さ、血中の total IgE を測定した。さらに、最終塗布 24 時間後に耳介を回収し、病理組織学的解析を行った。

5. ナノシリカの経皮投与が経皮抗原感作に与える影響評価

上記 4 の方法に従って、Dp 及び Dp とナノシリカの混合溶液を塗布したマウスから血液・脾臓細胞を回収した。血漿中の各種抗体価は、ELISA 法により Dp 特異的 IgE、IgG、IgM を測定した。Dp 特異的抗体の測定は下記の通り実施した。100 µg/mL Dp (in PBS) を 96 well immune plate (Maxisorp ; Nunc) に加え、4°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°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、IgM 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 H₂SO₄ 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、脾臓細胞を用いて、抗原特異的 IFN- γ 、IL-4 産生細胞数を ELISPOT 法により測定すると共に、脾細胞による IL-21 産生量を ELISA 法により解析した。さらに、最終投与から 7 日後、Dp (15 μ g/mouse) を尾静脈内に投与し、その後の経時的な体温変化 (直腸より体温を測定した) を指標としてアナフィラキシー応答を評価した。

6. ナノシリカの胎仔毒性・母体毒性評価

妊娠 16 日目の BALB/c マウスに PBS で 8 mg/ml に調整したシリカ分散液を 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、ネンブータル麻酔下で失血死させた。その後、子宮を回収し、子宮重量、吸収胎仔数、胎仔重量、胎盤重量を測定した。また、この時に回収した血漿中における可溶性 fms 様チロシンキナーゼ 1 (sFlt-1) 量を sFlt-1 ELISA Kit (R&D) を用いて測定した。尚、胎仔毒性・母体毒性の発現における血液凝固の影響を評価する目的で、必要に応じて、適宜、nSP70 投与後 3 時間前、さらに 3 時間後に PBS で 100 IU/ml に調整したヘパリン溶液を 10 IU/100 μ l/匹で腹腔内投与した。

7. ナノシリカを妊娠期曝露した際の、新生仔の情動認知行動解析

BALB/c 系統の妊娠雌マウスおよびその仔を被験体として使用した。妊娠雌マウスが妊娠 16、17 日目の時に nSP70 (0.8 mg/mouse) を静脈内投与する nSP 群と生理食塩水を投与する統制群の 2

群を設け、各群の雌から出生した仔が 10 週齢以上になった後、以下の網羅的行動テストバッテリーを用いて行動を評価した。

行動実験開始 30 分前までに被験体を飼育室から行動実験用防音室に移し、被験体を実験室環境に馴化させた後、各種行動テストを実施した。用いた網羅的行動テストバッテリーには、一般的健康状態および神経学的スクリーニング、明暗選択テスト (不安様行動の評価)、高架式十字迷路テスト (不安様行動の評価)、オープンフィールドテスト (活動性・情動性の評価)、ホットプレートテスト (痛覚感受性の評価)、新奇環境下社会的行動テスト (社会的行動の評価)、ローターロッドテスト (運動能力・運動学習能力の評価)、Crawley 版社会的行動テスト (社会的行動の評価)、プレパルス抑制テスト (感覚・運動ゲーティング、注意力の評価)、強制水泳テスト (うつ様行動の評価)、歩行解析 (歩行機能の評価)、8 方向放射状迷路テスト (作業記憶機能の評価) が含まれていた。

8. 催奇形性試験

妊娠 7 日目の ICR マウス (10 週齢、雌性) に、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。

9. 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 μ 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%CO₂ 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。

10. 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 μ 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。

11. Embryonic stem cell test (EST)

Lipidure coat 96 穴プレート (Thermo Fisher) に 1×10^3 cells/well となるように ES 細胞を播種した。37°C、飽和蒸気圧、5%CO₂ 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。

12. 雄親曝露に着目したナノマテリアルの次世代影響評価

BALB/c マウス (10 週齢、雄性、Japan SLC, Japan) に、nSP30 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日 1 回、1 日おきに 4 回静脈内投与した。対照群には生理食塩水を投与した。雄親マウスへの影響評価では、最終投与の 24 時間後に体重を測定すると共に、解剖した。精巣・精巣上体・精嚢重量を測定すると共に、精巣を HE 染色により病理学的に解析した。また、精巣をホモジナイズし、精巣中の精子数を計数すると共に、精巣上体から精子を回収し、精子の奇形率を算出した。新生仔への影響評価では、最終投与日の夜から、BALB/c マウス (9 週齢、雌性、Japan SLC, Japan) と交配・妊娠を目的とし、同じケージ内で 4 日間飼育した。その後、母獣から産まれた新生仔の体重を経過的に測定した。また、母獣の妊娠率 (出産数) 及び出生仔重量、出生仔数、雌雄比を測定した。

13. G-CSF 量の測定

BALB/c マウスに saline で 8 mg/mL に調整した各非晶質ナノシリカ分散液を 100 μ l ずつ (0.8 mg/mouse) 尾静脈投与し、投与後 24 時間において血液を回収した後、血中 G-CSF 量を ELISA により解析した。血中 G-CSF 量の測定には、市販の ELISA kit (R&D systems, Inc.; Minneapolis, MN, USA) を用い、操作は添付のプロトコールに準じて行った。

14. Flow cytometry (FCM) による顆粒球画分の変動解析

末梢血中の顆粒球画分の割合は、Flow cytometry により解析した。BALB/c マウスに saline で 8 mg/mL に調整した非晶質ナノシリカ

分散液 (nSP70) を100 μ l ずつ (0.8 mg/mouse) 尾静脈投与し、投与後24時間において血液を回収した後、そのうち150 μ l をNH₄Cl溶液 (0.15 M NH₄Cl, 0.01 M KHCO₃, 0.01M EDTA · 2Na · 2H₂O) で懸濁することにより、赤血球を除去した。Staining buffer (2% FCSを含むPBS) にて各サンプルを1.0 × 10⁶ cells/ml に調整し、anti-mouse CD16/CD32-blocks Fc binding (clone; 93, eBioscience; San Diego, CA, USA) を加えて氷上で静置することで、Fcレセプターをブロッキングした。次に、fluorescein isothiocyanate (FITC) -conjugated F4/80 (clone; CI:A3-1, AbD Serotec; Oxford, UK)、phycoerythrin (PE) -conjugated Gr-1 (clone; RB6-8C5, eBioscience)、allophycocyanin (APC) -conjugated CD11b (clone; M1/70, BD Pharmingen; San Diego, CA, USA)、PE-Cy7-conjugated CD11c (clone; HL3, BD Pharmingen) を添加し、氷上で30分間静置した。これらサンプルを7-Amino-Actinomycin D (Wako) を含むstaining bufferで懸濁した後、FACS Canto flow cytometer (BD Biosciences; Tokyo, Japan) により解析した。なお、各抗体濃度はメーカー推奨濃度で使用し、各静置の間はstaining bufferを用いた細胞洗浄操作を2回繰り返した。

15. 中和抗体の前処置

抗 G-CSF 中和抗体の前処置として、PBS で 300 μ g/mL に調整した monoclonal anti-mouse G-CSF antibody (clone; 67604, R&D systems, Inc.)、Rat IgG₁ Isotype Control (clone; 43414, R&D systems, Inc.) を 100 μ l ずつ (30 μ g/mouse) BALB/c マウスの腹腔内に投与した。中和抗体前処置から 4 時間後に、BALB/c マウスに saline で 20 mg/mL に調整した nSP70 を 100 μ l ずつ (2.0 mg/mouse) 尾静脈投与した。投与後 5 時間において血液を回収し、ELISA により血

中 G-CSF 量を、Flow cytometry により末梢血中の好中球画分を解析した。

16. 非晶質ナノシリカの免疫応答に対する影響評価

マウスに各粒子をそれぞれ尾静脈より投与し (0.8 mg/mouse)、好中球の増加が認められた投与 24 時間後に外来性抗原のモデルとしてニワトリ卵白アルブミン (OVA) を腹腔内に投与した (50 μ g/mouse)。最終投与 2 週間後に血液を回収し、OVA 特異的 IgG 価を ELISA により測定した。

17. ナノシリカの経鼻投与

BALB/c マウスに超純水で各濃度に調整したシリカ分散液 (mSP1000、nSP300、nSP100、nSP70、nSP30) を 20 μ l/mouse (片鼻 10 μ l) で 7 日間連続経鼻投与した。尚、投与は、ペントバルビタール麻酔下にて実施した。

18. 5-アミノサリチル酸による肝毒性に対するナノシリカの影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、5-アミノサリチル酸 (5-ASA) を 500 mg/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて nSP70 を 30、50 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。5-アミノサリチル酸は 1% CMC を用いて希釈後、20 ml/kg b.w. の用量で投与し、5-アミノサリチル酸を投与しない群には、1% CMC のみ等量投与した。ナノシリカ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等量投与した。投与 24 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40 分間室温で放置後、4 $^{\circ}$ C, 6000 rpm, 10 min で遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。5-アミノサリチル酸の毒性に対するナノシリカ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 ALT、AST 濃度、腎臓において評価するため、腎傷害の指標として血清中の BUN 濃度の

測定を行った。テトラサイクリン (Tet) 100 mg/kg b.w.、トラゾドン (Tra) 100 mg/kg b.w. についても、上記と同様の方法で検討した。

19. 高脂肪食摂取マウスの脂肪組織に対する ナノシリカの影響

8週齢の雄性の C57BL/6 マウスに常食 RD (10% of calories as fat) 及び高脂肪食 HFD (45% of calories as fat) を 8 週間摂取させ、肥満モデルマウスを作成した。このマウスに nSP70 を 0、20、40 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に週 2 回、4 週間 (計 8 回) 投与した。ナノシリカ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を投与した。毎回投与前に体重を測定した。最終投与 3 日後、マウスを解剖し、血液サンプルを採取し、40 分間室温で放置後、4 °C, 6000 rpm, 10 min で遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。この血清サンプルから遊離脂肪酸 (FFA) の量を測定した。また、睾丸周囲脂肪組織及び腎臓周囲脂肪組織を採取し、脂肪重量を測定した。採取した睾丸周囲脂肪組織において、HE 染色による組織像の観察を行った。

8 週齢の雄性の C57BL/6 マウスに常食 RD (10% of calories as fat) 及び高脂肪食 HFD (45% of calories as fat) を 8 週間摂取させ、肥満モデルマウスを作成した。このマウスに nSP70 を 0、20、40 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に週 2 回、4 週間 (計 8 回) 投与した。ナノシリカ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。最終投与 3 日後、マウスを解剖し、血液サンプルを採取し、40 分間室温で放置後、4 °C, 6000 rpm, 10 min で遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収し、TNF- α 、IL-6、レプチンの量を測定した。

20. 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 (somnopenyl; Kyouritsuseiyaku, Tokyo, Japan) による麻酔下、Dp (125 μ g/mL)、Dp と各粒子径のシリカ (mSP1000, nSP300, nSP100, nSP70, nSP30) の混合溶液 (Dp; 125 μ g/mL、シリカ; 12.5 mg/mL) を 10 μ 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。

50 μ g/mL 各粒子径のシリカ (in PBS) を 96 well immune plate (Multisorp; NUNC) に加え、4°C で一晩静置し固相化した。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 H₂SO₄ 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。

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。固定化はアミンカプリングキット (GE Healthcare) を用いて行った。32.5 μ g/mL N-ethyl-N'-(3-dimethyl - amino propyl)-carbodiimide hydrochloride (EDC)、5.75 μ g/mL N-hydroxysuccinimide (NHS) 溶液を 70 μ 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 μ 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 µg/mL にランニングバッファー HBS-EP で希釈した nSP30、nSP70 を 60 µL (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。

CD4⁺T 細胞、CD8⁺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 µg/day/200 µl 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⁺細胞および CD8⁺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⁺T 細胞、CD8⁺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。

21. 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)、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。

22. 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。

23. 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、nAg、コントロールとして硝酸銀水溶液を 200 µg/body、snPt1、snPt8 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。

24. サブナノ白金の経皮感作性評価

BALB/c マウス（雌性、6週齢）、および BALB/c nu-nu マウス（雌性、6週齢）の耳介に、snPt8、あるいは snPt1 を週5日、3週間連続塗布（0.1 mg/mouse/day）し、経日的に耳介部の厚さを測定した。最終投与24時間後に解剖し、耳介部の病理学的解析、および頸部リンパ節の重量測定を実施した。また、BALB/c マウス（雌性、6週齢）の左耳介部に、snPt1 を週5日、3週間連続塗布（45 µg/mouse/day）し、経日的に左耳介部の厚さを測定した。その後、右耳介部に snPt1 を皮内投与（3.9 µg/mouse）し、投与後2日間の右耳介部の厚さを測定した。

25. 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、snAg、nAg、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、snPt を 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。

26. 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。

27. サブナノ白金の妊娠期曝露が母体・胎仔へ及ぼす影響評価（静脈内投与）

妊娠14日目の BALB/c マウス（11-13週齢）を日本 SLC より購入した。妊娠16日、17日に、snPt8 もしくは snPt1 を 2.5、5、7.5、10 mg/kg で尾静脈内投与した。最終投与24時間後に血漿を回収し、生化学検査に供した。さらに子宮・胎仔・胎盤を回収し、子宮重量、胎仔数、死亡胎仔数、胎仔重量を測定すると共に、胎盤、胎仔肝臓、胎仔脳中の白金を ICP-MS により定量した。また、10 mg/kg の snPt1 を妊娠16日の BALB/c マウスに尾静脈内投与し、最終投与2時間後の血液を炎症性サイトカインの測定に供した。

28. サブナノ白金の妊娠期曝露が母体・胎仔へ及ぼす影響評価（経口投与）

妊娠13日目の BALB/c マウス（11-13週齢）を日本 SLC より購入した。妊娠13日～17日に1日1回、snPt8 もしくは snPt1 を 3、10 mg/kg で強制経口投与した。最終投与24時間後に血漿を回収し、生化学検査に供した。また、子宮・胎仔を回収し、子宮重量、胎仔数、死亡胎仔数、胎仔重量を測定した。

29. サブナノ白金の妊娠期曝露が仔の情動認知機能へ及ぼす影響評価

上記「snPt の妊娠期曝露が母体・胎仔へ及ぼす影響評価（静脈内投与）」の方法に従って、snPt を投与された妊娠マウスから仔を出産させた。出生時体重、出生仔数、雌雄比を測定すると共に、経時的に体重を測定した。また、仔が10週齢になった時点から、体温・各種反射・筋力・活動量・不安様行動・痛覚感受性・社会的行動・うつ様行動・記憶・学習などに及ぼす影響を網羅的行動バ

ッテリーにて評価した。その後、海馬、大脳皮質前頭前野、視床下部を回収し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により各組織中のセロトニン (5-HT)、5-ハイドロキシインドール酢酸 (5-HIAA)、ドーパミン (DA)、ジドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)、ホモバニール酸 (HVA)、ノルアドレナリン (NA)、メトキシハイドロキシフェニルエチレングリコール (MHPG) を定量した。また、胎仔期の脳への影響を評価するため、「snPt の妊娠期曝露が母体・胎仔へ及ぼす影響評価 (静脈内投与)」の方法に従って、snPt を投与する際、妊娠 17 日の snPt 投与 3 時間前に臭素化デオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与した。妊娠 18 日に胎仔脳を回収した後、BrdU に対する免疫染色を施し、脳組織中の BrdU 陽性細胞を計数した。

30. 母乳移行性の検討

妊娠 14 日目の BALB/c マウス (11-13 週齢) を清水実験材料より購入した。白金粒子の検討では、出産 3 日後、snPt8、snPt1 をそれぞれ 20 mg/kg で静脈内投与した。投与 12 時間後、5 日後、7 日後に、母獣と新生仔を 5 時間以上隔離し、母獣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、オキシトシンを 0.18 U/kg で皮下注射した後、鼠径部から搾乳した。また、出産日から、snPt8、snPt1 をそれぞれ 30 mg/kg で 1 日 1 回、1 週間に 5 回のペースで 3 週間にわたり経口投与した。その後、投与 21 日目に上記と同様の方法により搾乳した。銀粒子の検討では、出産 3 日後、nAg、snAg、Ag+ をそれぞれ 1.5mg/kg で静脈内投与した。投与 1、2、4、8、12、24 時間後に上記と同様の方法により搾乳した。回収した母乳に含まれる白金、もしくは銀の量を誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) 解析により定量した。

31. サブナノ白金の授乳期曝露が母体及び新生仔へ及ぼす影響評価

妊娠 14 日目の BALB/c マウス (11-13 週齢) を清水実験材料より購入した。出産日から、30 mg/kg、10 mg/kg、3 mg/kg の投与量の snPt8 を 1 日 1 回、1 週間に 5 回のペースで、1 週間、ないしは 3 週間連続経口投与した。投与期間中の母体・新生仔の生存率、及び母体・新生仔の体重を測定した。1 週間投与の検討では出産後 8 日目、3 週間投与の検討では出産後 21 日目に、母体と新生仔を 5 時間以上隔離し、母体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、オキシトシンを 0.18 U/kg で皮下注射した後、鼠径部から搾乳した。またその際、血液を回収し、血球検査(白血球・リンパ球・顆粒球・好中球・赤血球・ヘモグロビン・ヘマトクリット・赤血球容積・赤血球色素量・赤血球色素濃度・赤血球分布・血小板・血小板容積・血小板分布)に供した。3 週間投与による検討では、新生仔からも血液を回収し、血球検査に供した。その後、血清を回収し、血液生化学検査 (ALT・AST・BUN) に供した。

32. 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、生理食塩水で 8 mg/ml に調整した nSP70、nSP300、mSP1000、nSP70-C、nSP70-N をそれぞれ 0.8 mg/100 μ l/匹で投与した。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、nSP30、nSP70 をそれぞれ 20 μ l ずつ (0.5 mg/匹) 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 分間遠心操作を行った後に上清を血漿として回収した。この血漿を SDS 電気泳動に供し、CBB 染色したゲルから、目的のバンドを切り出し、100 μ l の脱色液 (50% acetonitrile/25 mM NH_4HCO_3) 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 μ 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 (CENTRIFUGAL

CONCENTRATOR, TOMY) 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_4HCO_3 で 5 倍希釈した 20 $\mu\text{l}/\text{mL}$ の trypsin 溶液を 4 μl 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 μl 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 μl の 80% acetonitrile / 0.1% formic acid 溶液、3 回目は 50 μl 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。回収した血漿中の haptoglobin、C Reactive Protein (CRP)、Serum Amyloid A (SAA) 量は、市販の ELISA kit (Life Diagnostics, Inc.) を用い測定した。なお、操作は添付のプロトコールに準じて行った。

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 μl 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 μl (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 次元ディフュージョン電気泳動 (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 μl の脱色液 (50% acetonitrile/25 mM NH_4HCO_3) 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 μl 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_4HCO_3 で 5 倍希釈した 20 $\mu\text{l}/\text{mL}$ の trypsin 溶液を 4 μl 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 μl 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 μl の 80% acetonitrile / 0.1% formic acid 溶液、3 回目は 50 μl 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 FUJI 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。

33. ナノシリカ投与による肝障害に対する安全性評価 バイオマーカーとしての miR-122 の有用性評価

各非晶質シリカの静脈内投与による検討では、BALB/c マウスに、各サンプルを 40 mg/kg で投与し、投与後 8 時間における血清中の miR-122、miR-192、miR-194 量を、リアルタイム PCR に

より測定した。次に、経口投与による検討では、nSP70 を 125、250、500 mg/kg でゾンデを用いて強制投与し、投与 8 時間後における血清 miR-122 の発現変動をリアルタイム PCR により測定した。また、サブナノ白金を用いた尾静脈投与による検討では、BALB/c マウスに、サブナノ白金分散液を 20 mg/kg で投与し、投与 8 時間後における血清中の miR-122 量を測定した。

34. OECD に準拠した安全性試験

9 週齢の雄 Wistar ラットに SW-CNT あるいは MW-CNT を 200 μ g/200 μ L/body/day で、C60 あるいは PVP-C60 を 10mg/200 μ L/body/day で、それぞれ、28 日間反復経皮投与した試験である。Wistar ラットの平均体重を 200g として計算すると、SW-CNT あるいは MW-CNT は 1 mg/kg、C60 あるいは PVP-C60 は 50 mg/kg がほぼ同等量の投与量となる。また、投与容量はリント布(3x3 cm)の大きさを考慮し、2mL/kg とした。被験物質の調製は、超音波ホモジナイザー-US-600T(株式会社日本精機製作所)を用いて、氷冷下にて 200 μ A、5 分間攪拌して用時調製した後に直ちに投与に用いた。

マウスに 300 μ g/mL のサブナノ銀を耳介に一週間塗布した結果、顕著な皮膚病変が観察された。一方、100~10000 μ g/mL のナノ銀をモルモットに 13 週間(5 日/週)塗布した結果、全ての群で皮膚病変が認められたがマウスの変化よりも軽度であった。したがって本試験では、顕著な皮膚病変が予想される 100 μ g/mL をサブナノ銀群の高用量に設定し、10 および 1 μ g/mL 投与群を設けた。被験物質の調製は、ボルテックスミキサー (KMC-1300V、Vision Scientific.Co.LTD.) で 30 秒、続いて超音波スターラー (USS-1、日本精機製作所)を用いて 5 分間攪拌させた後に秤量し、段階希釈して投与に用いた。調製は用時調製とした。

投与は、化粧品、塗装、剥離した物質として経皮的に吸収された場合の毒性を検討するために

背部に閉塞貼付した(経皮投与)。3x3 cm のリント布に被験物質を滴下した後、皮膚にリント布を貼付し、プラスチックラップを巻いて被覆固定した。その上に粘着フォームパット(伸縮性粘着包帯)を巻き、固定した。

投与回数は 1 日 6 時間、週 5 日(土、日は休薬)として、雄は投与 29 日(投与初日=投与 1 日)、雌は投与 30 日に解剖した。毎日、投与時間終了後には、貼付領域を被験物質の媒体(コーン油あるいは注射用水)を用いて清塗した。

なお、投与前日に、背部をバリカンにて剪毛した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を避け得なかったが、動物愛護の精神を遵守しつつ実施した。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(文科省の指針)」に準拠し、大阪大学および大阪大学薬学研究科、(独)医薬基盤研究所等の各所属機関の動物実験規程に則り実施した。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属機関の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受けた。さらに本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月、厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」(基発第 0207004 号)【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第 0331013 号)が通達】、2009 年 3 月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進した。

C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

D. 考察

1. ナノシリカの皮内曝露がアトピー様症状の発症/悪化に与える影響

ナノシリカのアトピー様疾患に及ぼす影響を精査する目的で、ナノシリカを皮膚内に投与した。まず、耳介部の腫脹を指標に、シリカのアトピー様症状への影響を評価した。その結果、nSP300 や、mSP1000 といった、所謂サブミクロンサイズ以上のシリカとヤケヒョウダニの抽出抗原 (*Dermatophagoides pteronyssinus* Crude Extract: Dp) の混合溶液を投与した群の腫脹は、Dp 単独投与群とほぼ同程度であった (図 1A)。一方で、nSP30、nSP70、nSP100 といった、100 nm 以下のナノシリカを適用した群では、Dp 単独よりも 2-5 倍程度、顕著な耳介の腫脹が観察された。次に、投与局所である耳介部の、HE 染色による病理組織学的に観察し (図 1B~E)、アトピー病態において観察される代表的症状についてその重症度をスコア化した (図 1F)。その結果、どの大きさのシリカを適用した群においても、炎症性細胞の浸潤数が Dp 単独投与群よりも顕著に増大した。さらに、病理学的には Dp 単独の投与群では表皮の肥厚が全く観察されなかったが、粒子径 300 nm 以下のシリカを適用した群で肥厚が認められた。さらに興味深い事に、浮腫、痂皮の形成は、粒子径 100 nm 以下のシリカを投与した群においてのみ観察された (図 1F)。また、アトピー病態におけるかゆみ、炎症といった病態発現に重要な働きをする肥満細胞の浸潤数をトリジンブルー染色し (図 1G~J)、スコア化 (図 1K) することにより評価したところ、シリカの粒子径の減少と、肥満細胞の浸潤数には正の相関関係が認められた。以上の検討により、Dp により誘発されるアトピー病態は、シリカの投与により増悪され、この効果は、シリカの粒子径が小さいほど、また、特に 100 nm 以下のナノサイズとなることで顕著に誘導されることが明らかとなった。

一般に、アトピー病態の重症化には、総 IgE またはアレルゲン特異的 IgE の産生増加が関与すると言われている。そこで、アトピー様病態の重症化における総 IgE や Dp 特異的 IgE の関与を精査するため、血漿中の総 IgE、並びに Dp 特異的 IgE 量を ELISA にて定量した。その結果、総 IgE の産生量はシリカの粒子径の減少に依存して顕著に上昇した (図 2A)。回帰分析の結果から、総 IgE の産生とシリカの粒子径は負の相関を持つことが明らかとなった (図 2B)。したがって、Dp と共に投与するシリカの粒子径は小さければ小さいほど、アトピー病態がより重症化する可能性が示唆された。一方で、Dp 特異的な IgE の産生に関しては、Dp 単独投与群と比較して、シリカ共投与群で産生の上昇が観察されるものの、シリカの粒子径、特に 100 nm 以下の粒子径による産生の変化などは見られなかった (図 2C)。このことから、または 100 nm 以下のナノシリカ投与によってのみ誘発される本アトピー病態の増悪には、抗原特異的 IgE ではなく、総 IgE の産生が関与する可能性が考えられた。

続いて、投与局所である耳介の病変部におけるサイトカイン産生の変動を解析し、ナノシリカによるアトピー悪化メカニズムの解明に迫った。アトピーなどのアレルギー病態の急性期においては、一般に Th2 型の免疫応答が過剰に促進され、一方で、Th1 型の免疫応答は抑制される傾向にあることが知られている。そこでまず、我々は皮膚病変部における Th1/Th2 バランスを、IFN- γ 、Th2 IL-4、IL-5、IL-13 産生量を指標に評価した (図 3A)。その結果、とりわけ 300 nm 以下のシリカを Dp と共に投与した群において、顕著な IL-4 の産生上昇、すなわち Th2 応答の増強が認められた。その一方、300 nm 以下のシリカを共投与した群においては、IFN- γ の産生は認められず、IL-4 産生の顕著な上昇のみが観察された。したがって、これら病態において、通常のアトピー病態と同様に Th2 型の免疫応答が促進されることが病態の増悪につながっていることが示唆された。また、

Th2 型サイトカインである IL-5 や、IL-13 に関して、シリカ投与群で、Dp 単独投与群と比較し、その産生の減少が観察された。IL-5 や IL-13 に関して、その産生は病態の進行度、段階によりその変動が観察されることが知られるため、さらに時間を追って解析することで、より詳細な情報が得られるものと考えられる。次に、近年、単独でもアトピー病態の発症を招き、アトピーの発症や悪化に深く関与することが報告された上皮性のサイトカインである IL-18 と Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) の産生を解析した (図 3B, C)。その結果、回帰分析の結果からも明らかのように、Dp と共に共投与したシリカの粒子径の減少と相関した顕著な IL-18 の産生が観察された。この結果は総 IgE の産生の結果と良く一致していた。また、TSLP に関して、その産生上昇は、100 nm 以下のシリカを共投与した群でのみ観察された。これは、耳介の腫脹のデータ (図 1A~E) や浮腫・痂皮の形成とも一致し、シリカの粒子径が 100 nm 以下となることによって誘導される病態は、この TSLP の産生により引き起こされている可能性が考えられた。以上、本病態において 100 nm 以下の粒子径のナノシリカで誘導された病態の発症には、IL-18 や TSLP といった上皮性のサイトカインの産生が関与している可能性が示唆された。一方で、シリカによるこれらサイトカイン産生のメカニズムに関してはより詳細な検討を要する。

最後に、ナノシリカによるアトピー病態悪化のメカニズム解明を念頭に、全身面での免疫応答について、Dp 特異的抗体産生、脾臓中での Dp 特異的細胞頻度の解析により評価した。まず Dp 特異的 IgG の力価を ELISA にて評価した (図 4A)。その結果、粒子径 100 nm 以下のナノシリカ投与群で顕著に上昇することが分かった。さらに、この IgG 抗体のサブタイプを調べたところ、Th2 型の免疫応答が促進された場合にその産生が上昇する IgG1 に関しては、300 nm 以下のシリカを投与した群において有意に力価が上昇した。一方

で Th1 型の免疫応答が促進された場合にその産生が上昇する IgG2a の力価は、最も小さい nSP30 を投与した群においてのみ有意に上昇した。これら免疫応答を詳細に解析するため、脾臓中における Dp 特異的 IFN- γ 、IL-4 産生細胞頻度を、ELISPOT 法を用いた解析により評価した (図 4B)。Dp 特異的 IFN- γ 産生細胞頻度に関しては、IgG2a 抗体産生と相関し、nSP30 を投与した群でのみその頻度上昇が観察された。一方で IL-4 産生細胞頻度は、回帰分析の結果からも明らかのように、投与したシリカの粒子径の現象と相関した産生上昇が認められた。したがって、シリカの粒子径の減少により全身での Th2 型免疫応答が促進されることが、本アトピー病態において、粒子径依存的なアトピー様病態の悪化が観察される原因の一つであると考えられる。また、最も重症度の高い病態が観察される、nSP30 投与群でのみ Th1 型の免疫応答の促進が観察されたことは非常に興味深い。現在、安全性の高いナノシリカの創製に向けて、nSP30 の皮内曝露によるアトピー病態の悪化と Th1 免疫増強の関係を精査している。

2. ナノシリカの経皮投与がアトピー性皮膚炎に与える影響評価

近年、茶のしずく石鹸の例にもみられるように、皮膚からの抗原感作 (経皮抗原感作) がアトピー性皮膚炎などの皮膚局所でのアレルギー病態のみならず、喘息や食物アレルギーなどの様々なアレルギー疾患発症の要因に重要な働きを示すことが明らかとなり注目されている。一方で、経皮抗原感作がなぜアレルギー発症を促進するのか、環境因子の関与を含めて明らかではない。上述したように、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。一方で、実際の曝露実態を加味すると、経皮塗布された場合の影響評価が必要不可欠である。

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。

はじめに、本検討で使用する一次粒子径 30 nm のナノシリカ（nSP30）の物性をゼータサイザーにより評価した。その結果、nSP30 は非常に分散性に優れ、平均二次粒子径も一次粒子径と同等に約 30 nm であることが判明した。また、透過型電子顕微鏡を用いた解析により、nSP30 は表面の滑らかな球状の素材であることは確認済みである。一方で、nSP30 と Dp を混合したサンプルの平均二次粒子径は 3193.3 nm であり、nSP30 と Dp が溶液中で凝集を伴う相互作用をしていることが示された。

次に、Dp の連続塗布によりアトピー性皮膚炎様病態を発症する NC/Nga マウスを用い、nSP30 の連続塗布がアトピー病態に与える影響を評価した。病態悪化の指標として、経時的に塗布局所である耳介の厚さを測定したところ、Dp 単独塗布群（Dp 群）と、Dp と共に nSP30 を塗布した群（Dp/nSP30 群）の間に有意な変化は認められなかった（図 5A）。さらに、最終塗布 24 時間後の耳介部を病理学的に解析した結果、表皮の肥厚、炎症性細胞浸潤、線維化、肥満細胞の浸潤数などのアトピー病態における特徴的な緒症状においても Dp 群、Dp/nSP30 群の間に変化は観察されなかった（図 6）。

続いて、アトピー病態を含め多くのアレルギー病態の重症度と相関する総 IgE 量を測定した。その結果、Dp/nSP30 群において、Dp 群よりもその産生量が上昇していることが明らかとなった（図 5B）。本結果から、nSP30 の経皮曝露は、Dp により誘導されるアトピー性皮膚炎の病態悪化には関与しないことが明らかとなった。一方で、nSP30 連続塗布により総 IgE 量の上昇が観察されたことから、次に、Dp に特異的な抗体産生を評価した。その結果、Dp 群と Dp/nSP30 群で、アレルギー発症に寄与する抗原特異的な IgE 産生

においては変化が観察されなかった（図 7A）。一方で、抗原特異的 IgG の産生においては、Dp/nSP30 群で Dp 群と比べてその産生が顕著に減少していた（図 7A）。さらに、Dp 特異的 IgG 産生を力価にて評価した結果、Dp 塗布群と Dp/nSP30 塗布群の Dp 特異的な IgG 産生の差はおおよそ 18 倍であることが示された（図 7B）。次に、Dp/nSP30 塗布群で産生が抑制されていた IgG について、サブクラス毎に評価した。産生される IgG のサブクラスは、どのような獲得免疫応答が誘導されているかを知る手掛かりとなることが知られており、Th2 型の免疫応答が活性化すると IgG1 が、Th1 型の免疫応答が活性化すると IgG2a が産生される。まず Dp 特異的 IgG1 を測定したところ、Dp 塗布群においてはコントロール群と比較して有意な産生量の上昇が認められた。一方で、Dp/nSP30 投与群ではコントロール群と比較して、IgG1 の産生量に有意な増加は認められず、Dp 塗布群と比べてその産生量は有意に減少していることが認められた（図 7A）。さらに、Dp 特異的 IgG2a の産生量においても、Dp 塗布群においてはコントロール群と比較して有意な上昇が認められた一方で、Dp/nSP30 塗布群では Dp 塗布群と比較して、IgG2a 産生量が有意に減少していることが認められた（図 7A）。IgG1/IgG2a の産生が nSP30 の塗布により抑制されていたことから、全身の Th1/Th2 型の獲得免疫の誘導が減弱している可能性が示された。

そこで次に、全身の Th1/Th2 型獲得免疫応答を ELISPOT アッセイにより解析した。本検討では、Dp 特異的に IFN- γ を産生する脾細胞を Th1 型の免疫応答の指標として、IL-4 を産生する脾細胞を Th2 型の指標として評価した。その結果、Dp 塗布群と Dp/nSP30 塗布群において、コントロール群と比較して Dp 特異的 IFN- γ 、IL-4 産生脾細胞頻度が有意に上昇していることが示された（図 8A）。一方で、Dp 塗布群、Dp/nSP30 塗布群の間では有意な差は認められなかった（図 8A）。しかし、本検討で用いている Dp は、抗原そのも

のに免疫賦活化作用があり(それ自体がTLRに認識される)、非特異的に細胞を活性化してしまう。そのため本検討におけるELISPOTアッセイでは、Dp 特異的に増殖したT細胞とは異なる細胞までも検出してしまっている可能性がある。そこで、細胞内染色法を用いたFCMにより、CD3、CD4陽性であるヘルパーT細胞の抗原特異的なIFN- γ 、IL-4産生を解析した(図8B)。その結果、Dp塗布群ではPBS塗布群よりも脾細胞中のCD3⁺/CD4⁺/IFN- γ ⁺細胞、CD3⁺/CD4⁺/IL-4⁺細胞の分画の増加が観察されると共に、この傾向は、Dp/nSP30塗布群でも同様であった。以上の結果は、ELISPOTアッセイによる解析結果と相関するものである。

全身の免疫応答がTh1型、Th2型に大別されることは事実であるが、近年、獲得免疫応答を制御するT細胞の分類が進み、過剰な免疫応答を抑制する制御性T細胞(Treg)、自己免疫疾患やアレルギー性疾患の促進などにも関わるTh17細胞、抗体の親和性成熟の過程に重要な役割を果たす濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)がそれぞれ独自に獲得免疫応答の制御に関わっていることが明らかとなってきている。そこで次に、nSP30塗布によるIgG抑制機構の解明に向け、獲得免疫応答を制御するT細胞性の免疫応答に関して、上記T細胞サブセットが産生する代表的なサイトカインであるIL-10(Treg)、IL-17(Th17)、IL-21(Tfh)の産生量を指標に評価した。最終塗布の24時間後、回収した脾細胞をDpにより再刺激し、Dp特異的に産生されるサイトカイン量をELISA法により定量した。その結果、コントロール群と比較して、Dp塗布群ではIL-10、IL-17、IL-21いずれのサイトカインも顕著に上昇していることが明らかとなった(図9)。Dp/nSP30塗布群においても、IL-10、IL-17の産生量はDp塗布群と同程度にまで産生されることが明らかとなった。一方でIL-21については、Dp/nSP30塗布群においてはコントロール群と同様に、その産生量は検出感度以下であり、コントロール群と比較して産

生増強が認められなかった。従って、nSP30の経皮曝露は、Tfhの活性化に影響を与えている可能性が考えられた。骨髓中の造血幹細胞から分化した成熟B細胞は、自らのB細胞受容体(BCR)に特異的な抗原を取り込むと、MHC class IIに提示する。その後、同じ抗原に特異的なTh1やTh2細胞などにより認識され、シグナルを受け取ることによって活性化・増殖し、IgM産生形質細胞へと分化しIgMを産生する(一次応答)。また、一部の細胞は胚中心へと移行し、抗体定常部の構造が変化してIgMからIgGにクラススイッチすることでIgG産生形質細胞へと分化する(二次応答)。そしてこのクラススイッチの過程にはTfhによるIL-21産生が必須であることが明らかとされている。即ち、IL-21の産生がなければIgM抗体の産生しか生じず、クラススイッチの過程を経て産生されるIgG産生が誘導されない。今後、IgMの産生に関し詳細な検討を必要とするものの、nSP30の経皮曝露によるIgG産生の抑制は、IL-21の産生抑制によるクラススイッチ阻害によるものである可能性も考えられる。

抗原特異的IgGにより、IgEにより誘導されるアレルギー応答が抑制されることが知られている。従って、nSP30の塗布により抗原特異的IgGの産生が減少したマウスにおいては、逆に、IgE性アレルギー応答に対する感受性が高まってしまっている可能性が考えられた。そこで、IgE性アレルギー応答が最も顕著に表れるアナフィラキシーショックのモデルを用いて、各群のIgE性アレルギー応答に対する感受性を評価した。その結果、Dp塗布群ではコントロール群と比較して体温がほとんど低下しなかった一方で、Dp/nSP30塗布群において顕著な体温低下が観察された(図10)。従って、Dp塗布群ではIgEアレルギーを発症させない低用量の抗原曝露によっても、Dp/nSP30塗布群ではアナフィラキシー応答が誘導されることが示された。本結果から、nSP30の経皮曝露によりIgGの産生が抑制された状態では、通常ならばアレルギーを誘導しない

ほどの少量の抗原曝露によっても、アレルギーが誘導されるようになるのではないかと考えている。

以上の結果は、食べこぼしに含まれる食物抗原や、環境中に存在する抗原をナノシリカと共に経皮曝露した際に、本来誘導されるべき抗原特異的 IgG の産生が抑制され、IgE 性のアレルギー発症を容易としてしまう可能性を示している。現在、本現象のメカニズムをより詳細に解析することで、安全なナノシリカ創製に向けた情報を収集すると共に、安全な使用量域の設定に向けた閾値の検討などを実施している。

なお、本検討でのナノシリカの投与量は 250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$ に相当する。本用量は、ファンデーションが一般的な組成として 2%程度のシリカを含むことから考えると、ファンデーション (2 g) を、1 か月使用した場合の曝露量 (2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$) の約 100 倍の投与量となる。そのため、ファンデーションなどから経皮曝露する量では、ナノシリカが AD 病態の促進・悪化に与える影響は少ないであろうと考えられる。

3. ナノシリカを妊娠期曝露した際の安全性評価 (胎仔毒性・母体毒性)

我々はこれまでに、非晶質ナノシリカの生殖発生毒性を評価し、過剰量を妊娠マウスに静脈内投与するハザード解析ではあるものの、nSP70 は nSP300 や mSP1000 とは異なり、①母体の肝臓のみならず、胎盤や胎仔にまで移行すること、② nSP70 が胎仔吸収や胎仔発育不全を誘発する可能性を見出してきた。そこで本検討では、nSP70 の胎仔吸収・胎仔発育不全誘発メカニズムの解明を図ると共に、これら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試みた。

本研究では、nSP70 の表面がカルボキシル基、アミノ基で修飾された nSP70-C、nSP70-N を用いて検討した。まず、詳細な体内動態を評価するために、TEM により体内動態を観察した。その結

果、いずれの投与群においても、胎盤 (図 11a~d)、胎仔の脳 (図 11i~l) や肝臓 (図 11e~h) において黒いドット状の粒子が観察され、これらナノマテリアルは、血液胎盤関門を通過し、胎仔にまで移行することが明らかとなった。

続いて、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、表面修飾が nSP70 の胎仔毒性に及ぼす影響を評価した。まず、妊娠後期のマウスに過剰量の nSP70 を静脈内投与し、ハザード解析を試みた (図 12)。その結果、以前と同様に、nSP70 投与群において投与後から著しい母体体重・子宮重量の減少が観察され、胎仔吸収率の増加が認められた (図 12a~d)。さらに、以前の結果と同様に、nSP70 投与群では胎仔体重がコントロール群よりも 10% 以上減少し、胎仔発育不全を誘発していることが明らかとなった (図 12e,g)。一方で、nSP70-C、nSP70-N 投与群では、nSP70 投与群で認められた母体体重の減少 (図 12a)、子宮重量の減少 (図 12c)、胎仔吸収率の増加 (図 12b,d)、胎仔発育不全 (図 12e,g) は一切認められなかった。以上の結果から、表面修飾を施すことで、nSP70 による胎仔発育不全や胎仔吸収を回避できる可能性があることが示された。今後は、より長期間の投与による検討や、経皮・経口投与など実際の曝露経路における検討を推進するなど、より詳細な検討を進める必要があると考えられる。

次に nSP70 による胎仔毒性発現メカニズムの解明に向け、ヘパリン投与による胎仔毒性への影響を評価した (図 13)。抗凝固剤として使用されるヘパリンは流産や子宮内胎児発育遅延 (IUGR) を予防する目的で妊婦に対して使用されている。妊娠後期のマウスに nSP70 を投与するとともに、腹腔投与でヘパリンを投与した。その結果、nSP70 投与によって認められた子宮重量、胎仔体重の減少が有意に抑制されるとともに (図 13b, d)、胎仔吸収率の増加も抑制される傾向が認められた (図 13c)。以上の結果は nSP70 による胎仔毒性には、凝固系の異常が関与している可能性を