

示唆している。一方で近年、ヘパリンが凝固系以外に、補体や好中球の活性化に関与しているという報告もあることから、これらの因子が nSP70 による胎仔毒性に関与しているかを検討する必要がある。正常な胎盤の形成は妊娠の維持に必須である。sFlt-1 は、妊娠時に主に胎盤から産生される物質であり、胎盤の血管新生に重要な役割を担う血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に結合することで、胎盤の形成を調節する働きを持つ。各種ナノマテリアルを妊娠後期に投与した際の母体血中の sFlt-1 濃度を測定したところ、nSP70 投与群で、顕著な sFlt-1 濃度の減少が認められた(図 14a)。一方で、nSP70-C、nSP70-N 投与群では nSP70 投与群と比較して sFlt-1 濃度の減少は緩やかだった(図 14b)。さらに、nSP70 による sFlt-1 濃度の減少は、ヘパリン投与によって有意に抑制された(図 14c)。以上の結果は、nSP70 投与群において胎盤の機能異常が起きている可能性を示すものであり、その機能異常が、胎仔毒性の発現に関与している可能性が考えられる。

なお、妊娠 16 日目のナノマテリアルの投与により血圧上昇や、心拍数の変化はなく、母体循環系への影響、妊娠高血圧の発症などはなかった。一方、血液学的所見では、末梢血中の白血球数の上昇が nSP70 投与群で認められたが、若干の炎症が観察されるにとどまった。一方、母体の肝機能、腎機能には、特に大きな変化は認められなかった。いずれも母体の生存そのものに影響するものではなかった。

さて、哺乳類において、胎児に栄養を供給する臓器として、初期発生においては卵黄嚢が重要であり、その後は発生段階にしたがって胎盤が主役となる。マウス妊娠 16 日目ではすでに胎盤は脱落膜、海綿状栄養膜細胞、迷路部の 3 つの層が形成されており、母体側からの螺旋動脈の形成も十分に行われ経胎盤的に栄養や、ガス交換が行われている時期である。一方、卵黄嚢の役割そのものは胎盤の発生に従いその役割が減少してきている時期である。そこで、ナノマテリアル投与マウ

スの胎盤病理について詳細に解析を行った。

nSP70 投与胎盤では、1) 螺旋動脈の構造が認められなかったこと、2) 胎盤に病理的虚血の所見が認められたこと、3) 逆に梗塞や血栓の形成といわれるような所見は認められなかったことなどが確認された。胎盤の総面積は nSP70 で若干の低下が認められたに過ぎなかった。一方、海綿状栄養膜細胞の破壊が著しく、疲弊化が起っていた。海綿状栄養膜細胞の細胞数は減少しており、その理由として TUNEL 染色を試みたところ、nSP70 投与群では海綿状栄養膜細胞にアポトーシスが認められた。さらに胎仔側の組織である迷路部の疲弊化は認められなかったが、絨毛の面積は低下していた。

ヒトの凝固異常による不育症では過凝固を防ぐためにヘパリン療法などが行われることがある。今回 nSP70 投与群においては特に凝固異常を疑わせる病理的な所見が得られたわけではないが、ヘパリン投与による若干の子宮重量の改善や、胎仔吸収率の改善などが見られた。この結果は、局所による凝固系異常の関与を示唆したが、ナノマテリアルの細胞障害機構の一つとしてヘパリン様物質の関与があるのかも知れない。詳細は今後の解析にゆだねる。

4. 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

次に、上記の nSP70 を妊娠期曝露した母体から出生した仔の、情動認知行動に関して検討した。新生仔を 10 週齢まで飼育し(新生仔は仮親に飼育させたため、出生後は、nSP70 には曝露されていない)、行動バッテリーテストを実施した。本格的な行動テストを行う前に、マウスの一般的な健康状態及び筋力等を検査した結果、nSP70 を曝露した母体から出生した仔(nSP70 群)は、10、12、16、20 週齢時の体重が統制群より統計的に有意に低く(図 15A)、妊娠期ナノシリカ曝露が仔の身体的発達を阻害していることが明らかになった。また、握力測定テストでは有意な差が認

められなかったが（図 15C）、wire hang テストにおいて nSP 群のスコアの方が低く（図 15D）、妊娠期ナノシリカ曝露が仔の成長後の筋力低下もしくはうつ様症状を引き起こす可能性が示唆された。

新奇環境下社会的行動テストの結果、統計的に有意ではなかったが、nSP 群の社会的行動は統制群に比べて少ない傾向があった（図 16）。この結果は、妊娠期ナノシリカ曝露が仔の社会性の発達に対して抑制的に作用している可能性を示唆する。しかしながら、Crawley 版社会的行動テストにおいて他個体への選好性に基づく社会的行動の評価では、両群の間には差が認められず（図 17）、妊娠期ナノシリカ曝露による抑制効果は限定的であることが考えられた。

プレパルス抑制テストを行った結果、両群間のプレパルス抑制に有意な違いはなく、感覚運動ゲーティング・注意力に対する妊娠期ナノシリカ曝露の影響は認められなかった（図 18）。しかしながら、本テストによって nSP 群は大きな音に対する驚愕反応が統制群より有意に亢進していることが見出された。

不安の測定として明暗選択テスト（図 19）および高架式十字迷路テスト（図 20）、活動性・情動性の測定としてオープンフィールドテスト（図 21）、痛覚感受性の測定としてホットプレートテスト（図 22）、運動能力・運動学習能力の測定としてローターロッドテスト（図 23）、うつ様行動の測定として強制水泳テスト（図 24）、歩行機能の測定として歩行解析（図 25）、作業記憶機能の測定として 8 方向放射状迷路テスト（図 26）を行ったが、いずれのテストにおいても両群間に有意差はなく、それらの行動発達に対する妊娠期ナノシリカ曝露の影響は認められなかった。

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 27）。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 27）。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。

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 28）。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 27、28）。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。

6. 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 29)。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 29)。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、また高精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。

7. ナノシリカの精巣に対する影響評価

男性不妊は、不妊原因の半数近くを占めるといわれており、不妊患者の診察に際しては、まず精液を検査し男性不妊の可否からはじまる (べきである)。男性不妊と診断する項目は多数あり、数・形態・運動性などから総合的に評価される。本研究の対象となる項目は、生存率および運動性である。診断基準は、①生存率 75%以上、②前進運動精子 50%以上である。前進運動精子が基準値以下であれば、精子無力症 (asthenozoospermia) と診断される。そこで、ナノシリカが精巣や精子に及ぼす影響を評価した。まず、ナノシリカを雄性マウスに尾静脈内投与し、TEM を用いてナノシリカの精巣移行性を評価した。その結果、nSP70 がセルトリ細胞内、精母細胞内、精子近傍にまで分布すること、精母細胞においてはそ

の核内にまで移行することが明らかとなった (図 30)。なお、Control 群と nSP300 群の精巣ではこれらの粒子は認められなかった (Data not shown)。このことから、nSP300 は血液精巣関門を突破しない一方で、nSP70 が血液精巣関門を突破し、精細管内へ移行することが明らかとなった。またこの時、精巣重量や精巣の組織学的変化は認められなかったことから (図 31)、nSP70 は精巣に移行するが、急性的な精巣傷害性は小さいことが示唆された。

そこで次に、精子に及ぼす直接的な作用を、運動能を指標として検討した (図 32)。本研究は、SMAS を用い運動率、直進速度、曲線速度、直進性、頭部振幅、頭部振動数を解析した。その結果、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ はすべての項目で正常値の 30%以下であった。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は直進速度・直進性が正常値の 50%以下、その他の項目は約 60%以上であった。一方、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は、すべての項目において正常値の約 60%~70%であった。以上の結果は、受精能を基準とした nSP70 の安全性評価において、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度であれば、安全性が担保されることが明らかとなった。

細胞膜を通しての物質の輸送は、「受動輸送 (passive transport) ・能動輸送 (active transport) によるイオンや親水性分子の取り込み」、および「膜動輸送 (endocytosis または exocytosis) ・食作用 (phagocytosis) ・飲作用 (pinocytosis) による輸送タンパクの取り込み」に大別される。ナノマテリアルの毒性は、後者による取り込みと細胞内小器官への移行または蓄積等に基づく毒性発現メカニズムによる理解が一般的である。精子においても、同様の輸送経路が存在することから、精子内へのナノシリカの取り込みが原因であると想定される。一方、電子顕微鏡を用いた解析では、精子内への取り込みは観察されず、精子頭部膜表面への結合が観察された (図 33)。また、精子の中部・尾部膜表面においてはナノシリカの結合は観察されなかった。以上の結果は、ナノシリカによる精子の運動性阻害は、

精子頭部膜表面との結合からはじまる毒性メカニズムに基づくこと示唆された。

精子頭部は、最外殻を原形質膜で覆われており、その構造は他の組織・細胞と同様に4種のリン脂質による二重層が形成されている。リン脂質は、細胞外側にスフィンゴミエリン (SPM)、およびホスファチジルコリン (PC) が存在し、細胞内側にホスファチジルアミン (PE)、ホスファチジルセリン (PS) が存在する。そこで、マウスの精子から脂質成分を抽出し、リン脂質の標準品と共に TLC プレートへ展開し、マウス由来の脂質成分の同定を実施した。その結果、精子由来の脂質には4種のバンドが観察された (図 34)。また、これら4種のバンドは、リン脂質の標準品と RF 値が一致しており、大きい順に PE、PC、PS、SPM であった。またこれ成分の存在比率は、定性的な判断であるが、PC、PE、SPM=PS の順であった。次に、これらリン脂質に nSP70 が結合するか否かを明らかにするため、先ほどと同様にマウスの脂質とリン脂質の標準品を展開した TLC プレートを準備し、蛍光標識された nSP70 溶液と室温で2時間反応させた。その後、INDIGO2 による蛍光イメージングにより、脂質と nSP70 の結合を評価した。その結果、精子由来の PC と SPM および標準品の PC と SPM との結合が観察された。すなわち、nSP70 はリン脂質との親和性が高いため、精子頭部へ結合することが明らかとなった。

次に、実際の曝露経路として想定される経口曝露に着目し、ナノシリカが精子の運動性を阻害するか否かを検討した。実験条件は、nSP70、nSP300、mSP1000 および陰性対象用の PBS を、8週齢の雄性 ICR が 11週齢になるまでの3週間、20 mg/kg の条件で週に2回投与した。そして最終投与 24 時間後に開腹し、採血および精巣上体を摘出、血液生化学検査および精子の運動性を評価した。血液生化学検査では、すべての投与群において、肝障害マーカーの AST、ALT、A/G、及び肝・腎障害マーカーのアルブミン、総蛋白に変化は確認されなかった。一方、腎障害マーカー

の無機リンが、nSP70 曝露で増加した。しかしながら、他の腎障害マーカーとの整合性、及び血中濃度の増加率からすると腎障害とは断定できない。その一方、無機リンはナノシリカの安全性バイオマーカーになり得ると示唆された。次に精子の運動性評価では、すべての投与群において運動率、直進速度、曲線速度、頭部振幅に影響は見られなかった (図 35)。すなわち、過剰量のナノシリカを投与しても、精子の運動性には影響しないことが明らかとなった。

8. 雄親曝露に着目したナノマテリアルの次世代影響評価

近年、雄親の環境因子曝露が仔へ影響を与える可能性が報告され始めている。そこで、雄親曝露に着目し、ナノマテリアルの次世代影響を評価すべく、F0 世代の雄の nSP30 曝露が F1 世代へ及ぼす影響を評価した。まず、基礎情報の収集として、nSP30 を曝露した雄親への影響評価を目的に、雄マウスに nSP30 を1日おきに4回尾静脈内投与し、最終投与 24 時間後に解剖した。体重を測定すると共に、精巣重量、精巣上体重量、精囊重量の観点から生殖関連組織への影響を評価した。その結果、いずれの重量にも、群間で有意な変化は認められなかった (図 36)。次に、精巣の病理所見の観点から、生殖関連組織への影響を評価した。その結果、nSP30 を投与された雄マウスの多核巨細胞数が増加傾向にあったが、有意な差は認められなかった (図 37)。また、精子の量、精子の奇形率を評価すると共に、最終投与日から交配させた際の交配率の観点でも生殖機能を評価したが、いずれの項目にも群間で有意な変化は認められなかった (図 38)。以上の結果から、nSP30 の曝露は、雄親の生殖機能へほとんど障害を誘発しない可能性が示された。次に、nSP30 を曝露した雄マウスを無処置の雌マウスを交配させた際に、出生仔に及ぶ影響を評価した (図 39)。その結果、群間の出生仔体重、出生仔数、雌雄比に有意な変化は認められなかった。一方で、雄親に

nSP30 を 5 mg/kg 投与した群の雄仔において、10 週齢以降から、成長率が有意に上昇していた (図 40)。以上の結果から、パイロット検討ではあるものの、nSP30 が雄親を介して次世代へ影響を与え得る可能性を示した。本結果は、今後の精査を要するものの、ナノマテリアルの次世代影響に関する新知見となり得る興味深いものである。今後は、本現象のメカニズム解明を進めると共に、仔の免疫機能や情動・認知行動など、多岐にわたる項目に着目し、より詳細に次世代影響評価を推進していく予定である。

9. 非晶質シリカ曝露による末梢血好中球画分の割合変動の解析

これまでに我々は、マウスに nSP70 を投与することで、末梢血中の顆粒球画分が増加することを明らかとしてきた。そこで、非晶質ナノシリカ曝露後の末梢血顆粒球画分の割合を詳細に解析した。BALB/c マウスに非晶質シリカ (nSP70、nSP300、mSP1000、nSP70-C、nSP70-N) をそれぞれ 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間において血液を回収した後、Flow cytometry により末梢血顆粒球画分の割合を解析した (図 41)。なお、一般的に、顆粒球は好中球、好酸球、好塩基球の 3 種類に分類されるが、この時、各投与群において、末梢血中の好酸球画分、好塩基球画分に有意な変化は認められなかった。その結果、nSP300、mSP1000 投与群においては、末梢血好中球画分の割合は saline 投与群と比較しほとんど変化は認められなかった。一方で、nSP70 投与群では、saline 投与群と比較し有意に増加することが明らかとなった。また、表面修飾を施すことで、末梢血好中球画分の割合は未修飾の nSP70 投与群と比較し減少する傾向が認められ、nSP70-C 投与群では nSP70 投与群と比較し有意に減少することが明らかとなった。このことから、未修飾の nSP70 曝露により、末梢血好中球画分の割合が増加することが示された。

次に、nSP70 曝露により末梢血好中球画分が増

加するメカニズムを明らかとするために、好中球の増殖・分化などに必須の因子として知られている G-CSF の発現変動を評価した (図 42)。BALB/c マウスに各粒子をそれぞれ 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 G-CSF 量を ELISA により測定した。その結果、血中 G-CSF 量は nSP70 投与群で saline 投与群と比較して有意に増加することが明らかとなった。一方で、nSP300、mSP1000 投与群においては、血中 G-CSF 量は saline 投与群と比較しほとんど変化は認められなかった。このことから、血中 G-CSF 量は非晶質シリカの粒子径の減少に伴い増加することが示唆された。また、表面修飾を施すことで、血中 G-CSF 量は未修飾の nSP70 投与群と比較し減少することが明らかとなった。そこで、非晶質ナノシリカ曝露による血中 G-CSF 量の増加と、末梢血好中球画分の増加との関連について精査した (図 43)。マウスに G-CSF の中和抗体である抗 G-CSF 抗体を腹腔内に投与した後、nSP70 を尾静脈より単回投与し末梢血好中球画分を Flow cytometry により解析した。なお、好中球画分の割合変化をより解析しやすくするために、本検討では nSP70 を 2.0 mg/mouse で投与した。また、この投与条件ではマウスに急性毒性が認められることをすでに明らかとしているため、投与後 5 時間において各評価を実施した。この時、抗 G-CSF 抗体前処置により血中 G-CSF 量が減少することを確認している。その結果、抗 G-CSF 抗体を前処置することで nSP70 投与による末梢血好中球画分の増加が抑制されることが明らかとなった。したがって、nSP70 曝露により誘発される末梢血好中球画分の割合の増加が、G-CSF を介して引き起こされることが示唆された。

非晶質ナノシリカ曝露により好中球の増加が誘導された際の、免疫応答に及ぼす影響を評価する目的で、異物排除の働きを担うことが知られている抗原特異的 IgG 量を評価した (図 44)。その結果、nSP300、mSP1000 を前投与した群にお

いては、コントロールである saline を前投与した群と比較し、OVA 特異的 IgG の抗体価に有意な変化は認められなかった。一方で、nSP70 を前投与した群において、saline 投与群、及び、nSP300、mSP1000 を前投与した群と比較し、OVA 特異的 IgG の抗体価が有意に増加することが明らかとなった。即ち、非晶質ナノシリカの前投与により、OVA に対する免疫応答の誘導が促進される可能性が示された。現在、これら生体応答の発現と nSP70 曝露により誘発される末梢血好中球画分の増加との連関について精査している。

10. ナノシリカを吸入（点鼻）曝露した際の安全性評価

各シリカを経鼻投与した際の体内吸収性を評価した。各シリカを経鼻投与マウスから回収した鼻腔組織（図 45a～e）、肺（図 45f～j）、肝臓（図 45k～o）および脳（図 45p～t）を TEM で観察した。その結果、mSP1000、nSP300 は投与局所である鼻粘膜の粘膜上皮細胞内や II 型肺胞上皮細胞内においてのみ観察された。一方で、粒子径が 100 nm 以下のシリカ（nSP100、nSP70、nSP30）は投与局所だけではなく、肝細胞内や脳のグリア細胞内においても粒子が認められた。尚、nSP70 を 28 日間経鼻投与したマウスの脳および鼻腔組織を TEM-EDX 解析したところ、黒いドット状に見える粒子が確かにシリカであることを確認した（図 46）。これらの結果は、経鼻曝露したナノシリカが体内に吸収されて全身に分布し得るため、全身臓器を対象とした安全性評価が必須であることを示唆している。

これらの結果を受けて次に、投与局所である鼻粘膜や肺、さらに全身の主要臓器である脳・肝臓・腎臓の病理組織学的検査を実施した（図 47a～c）。その結果、鼻粘膜では nSP70、nSP30 投与群においてのみ極軽度ではあるものの組織障害が認められた。また、脳・肝臓においては、サブミクロンサイズ以上のシリカ投与群はコントロール群と比較して、病理組織学的変化はほとん

ど認められなかったが、nSP70、nSP30 投与群においては、コントロール群と比較して軽度の組織障害を誘導していることが明らかとなった。肺・腎臓はいずれのシリカ投与群においてもコントロール群と比較して病理組織学的変化は見られなかった。以上の結果から、nSP70、nSP30 を経鼻投与することによって、サブミクロンサイズ以上のシリカとは異なる生体影響を及ぼす可能性が示され、これは経鼻吸収性の結果と良く一致していた。

上記の病理組織学的解析により nSP70、nSP30 において肝障害が発現している可能性が示されたため、次に各マウスから回収した血漿を用いて、肝障害マーカーを中心に ALT、BUN、ALB を測定した（図 48a～c）。一般に ALT は肝細胞の破壊により血中に流出するため肝障害の指標となり、BUN、ALB は肝臓で合成されるためこちらも肝障害マーカーとして用いられる。上記三種の肝障害マーカーを測定した結果、粒子径が小さくなるにつれて ALT の上昇傾向が認められ、nSP70 投与群においてはコントロール群と比較して有意な上昇であった。一方で、BUN と ALB はいずれのサイズのシリカ投与群においてもコントロール群と比べ変化は認められなかった。

続いて、血中の血球成分の変動についても解析した。その結果、粒子径が小さくなるにつれて、血小板の減少が認められ、nSP30 投与群における血小板数は正常値（BALB/c マウス； $250\text{--}450 \times 10^9/l$ 参考文献）を下回っていた（図 49a）。この現象は、nSP70 および nSP30 の投与量依存的に生じることを確認した（図 50a, b）。リンパ球、単球、白血球はいずれのシリカ投与群においてもコントロール群と比較して変化は見られなかった。一般的に血小板数の減少は、血液凝固異常を誘発するため、本結果は、nSP70、nSP30 への経鼻曝露が血液凝固系に何らかの影響を及ぼす可能性を示唆している。そこで血小板の減少による生体影響を精査する目的で、各マウスの出血時間を Duke 法により比較した。その結果、nSP70、

nSP30 を経鼻投与したマウスの出血時間はコントロール群と比較して顕著に延長していた (図 51)。以上の結果から、nSP70、nSP30 は、体内吸収されることによって全身血管内において持続的な凝固活性化を誘導し、凝固因子や血小板を消費するため出血症状を呈する病態、いわゆる消費性血液凝固障害を誘発している可能性が示された。

本検討の結果から、nSP70、nSP30 を経鼻投与することによって、粒子は投与局所だけではなく全身循環して脳や肝臓にまで達することが明らかとなった。また、nSP70、nSP30 は、経鼻吸収性を反映して血小板の減少や肝障害、消費性凝固障害を誘発することが明らかとなった。これらの知見は、ナノシリカを経鼻曝露した際のリスク解析に資する基盤情報になるものと考えられる。本節の結果の中でも、ナノシリカが脳内に移行したという事実は大変興味深い現象である。脳は、生体の認知・情動・記憶・感覚等をつかさどる組織であるため、例え微量であっても長期的に曝露した際には何らかの悪影響が生ずる可能性がある。例えば、ナノ酸化チタンは経鼻投与により脳内へ移行して脳組織で酸化ストレスや TNF- α 、IL-1 β などを産生すること、また、銅ナノ粒子が経鼻投与後に肝臓・腎臓・脳に局在し、組織障害を誘導することなどが報告されている。これらの情報を踏まえて、ナノシリカについても脳や脳機能に対する影響を精査する必要がある。

11. シリカと薬物との相互作用の解析

5-アミノサリチル酸は、炎症性腸疾患での基本となる治療薬であり、*in vitro* における検討において、初代培養肝細胞に ROS の発生を誘発し、ミトコンドリアへダメージを与えることが確認されたことから、肝毒性があるのではないかと考えられている。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、肝障害の指標である血中 ALT と AST 値を測定したところ、ナノシリカと 5-アミノサリチ

ル酸との併用により ALT、AST 値の上昇傾向が観察された (図 52A, B)。従って、5-アミノサリチル酸とナノシリカの併用では、肝障害が増悪化することが分かった。ALT 値に関して、30 mg/kg b.w.の用量で有意な上昇が観察されたが、50 mg/kg b.w.の用量では 30 mg/kg の投与時と比較して変化が観察されなかった (図 52A)。一方、AST 値は 50 mg/kg b.w.の用量でも上昇が確認された。この原因として、肝障害ではなく、心障害が引き起こされた可能性が考えられる。また、図 52C に示すように、ナノシリカとの併用では血中 BUN 値に変化は観察されなかった。従って、5-アミノサリチル酸とナノシリカの併用では、腎臓に影響を及ぼさないことが示唆された。

テトラサイクリンは、広域スペクトラム抗生物質の一種として使用されている。しかし、低用量の投与では体内 ROS の産生を促進し、さらに高用量では急性脂肪肝を誘導するなど肝臓への影響が知られている。テトラサイクリン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 濃度を測定した結果、ナノシリカとテトラサイクリンの併用により ALT、AST 値共に顕著な上昇が見られた (図 53 A, B)。従って、テトラサイクリンとナノシリカの併用では、肝障害が増悪化することが明らかとなった。また、ナノシリカのいずれの投与群でも、テトラサイクリンとの併用によりマウスの死亡が確認されたことから、詳細は不明であるがナノシリカとテトラサイクリンの併用時には、致死的な毒性が観察されることも分かった。一方、BUN 値を測定したところ、ナノシリカとの併用による腎障害の増悪化は観察されなかったが、予想と反してナノシリカ高用量時において BUN 値の低下が観察された (図 53C)。BUN は蛋白質の終末代謝産物であり、肝臓で合成され、腎臓から排泄される。高用量時に見られる BUN 減少の原因について詳細は不明だが、肝臓での尿素合成機能、または腎機能になんらかの影響を及ぼした可能性が考えられる。

トラゾドンは抗うつ薬として用いられる有機化合物の一種である。5-アミノサリチル酸と同様に、*in vitro* における検討で、初代培養肝細胞への ROS を介した障害性などが確認されたことから、肝毒性を引き起こすことが予想されている。トラゾドン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 濃度を測定した結果、ナノシリカとトラゾドンを併用投与時には、ナノシリカ単独が誘導する ALT、AST 値とほぼ同等の値が観察された (図 54A, B)。*in vitro* での検討では、トラゾドンは肝細胞に ROS の産生を誘導するとの報告があるが、今回の *in vivo* での検討では、マウスの肝臓には影響が見られなかった。従って、ナノシリカとトラゾドンの併用による肝障害の増悪化は観察されなかった。また、図 54C に示すように、血中 BUN 値の変化も観察されなかったことから、トラゾドンとナノシリカの併用では、腎臓への影響も観察されなかった。

12. 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

我々はこれまでに、ナノシリカの投与により、高脂肪食摂取マウスの体重が減少することを見出している (図 55)。高脂肪食摂取マウスの体重増加は脂肪の増加が主なものなので、体重減少の原因としてまず、ナノシリカの脂肪組織への影響を検討した。検討する脂肪組織として、肥満の際に蓄積しやすい内臓脂肪である睾丸周囲脂肪及び腎臓周囲脂肪に着目し、これらの重量を測定した。図 56A, B に示すように、正常マウスにナノシリカを投与すると、睾丸周囲脂肪重量及び腎臓周囲脂肪重量は変化しないのに対し、高脂肪食摂取マウスに投与すると、ナノシリカ投与量依存的な脂肪組織重量の減少が見られた。従って、ナノシリカ投与により高脂肪食摂取マウスの脂肪組織が減少していることが明らかとなった。

次に、脂肪細胞へのナノシリカの影響に関して検討を行った。脂肪組織の HE 染色の結果から、

高脂肪食摂取マウスにナノシリカを投与すると、脂肪細胞のサイズ縮小が観察された (図 57D~F)。一方、正常マウスでは、脂肪細胞のサイズに変化は見られなかった (図 57A~C)。図 57G に示すように、各群の脂肪細胞のサイズを定量化した結果からも、高脂肪食摂取マウスのナノシリカ投与群において脂肪細胞のサイズ縮小が確認された。従って、ナノシリカは高脂肪食摂取マウスにおいてのみ、脂肪細胞のサイズ減少を誘導することが明らかとなった。

脂肪組織重量の減少、及び脂肪細胞のサイズ縮小から、ナノシリカ投与により脂質の溶解が起きているのではないかと推察された。脂肪細胞にはトリグリセリド (TG) が蓄積されており、脂質溶解が起こると、トリグリセリドは FFA とグリセリンに分解され、血液中に入る。そこで、ナノシリカによる脂質溶解作用の可能性を検討するため、血清中の FFA 量を測定した。図 58 に示すように、高脂肪食摂取マウスでは、肥満の症状として血中 FFA 濃度の上昇が確認された。ナノシリカを投与すると、この血中 FFA 濃度がさらに上昇することが観察されたことから、ナノシリカにより脂質の溶解が促進されたことが分かった。一方、正常マウスにおいて、ナノシリカ投与による血清中の FFA 量の変動は観察されなかった。従って、ナノシリカ投与により、高脂肪食摂取マウスの脂肪細胞の溶解が促進されていることが示唆された。

以上、ナノシリカの投与により高脂肪食摂取マウスの脂肪細胞における脂質の溶解が引き起こされたため、体重減少が起こったのではないかと考えられた。

現在までの検討から、ナノシリカの単回投与により、TNF- α 及び IL-6 など炎症性サイトカインの血中濃度が上昇することが分かっている。しかし、ナノシリカの頻回投与や高脂肪食摂取マウスにおける検討は未だに行われていない。図 59 A, B に示すように、ナノシリカを頻回投与すると、正常マウスと同様に高脂肪食摂取マウスにおいても血中の TNF- α 及び IL-6 濃度の上昇が観察され

た。これまでの報告により、TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインは脂肪細胞の脂質溶解を引き起こすことが知られている。従って、脂肪組織において脂質溶解が促進された原因の1つとして、ナノシリカ投与による炎症性サイトカインの増加が推測された。正常マウスと高脂肪食摂取マウスにおいて、ナノシリカが誘導する炎症性サイトカインのレベルは同程度であったにも関わらず、高脂肪食摂取マウスにおいてのみ脂質溶解が誘導された要因として、正常マウスと高脂肪食摂取マウスにおける脂肪組織の炎症状態の違いが予想される。肥満脂肪組織では、正常の脂肪組織と比較して既に軽度の炎症状態であることが知られている。そのため、ナノシリカにより更なる炎症が惹起された高脂肪食摂取マウスの脂肪組織では、脂質の溶解が引き起こされたのではないかと推測される。

次に、血中レプチン濃度の測定を行った。レプチンは脂肪組織において産生されるホルモンであり、脳の視床下部に作用することによって、食欲抑制作用やエネルギー消費の亢進を惹起することが知られている。肥満病態においては血中レプチン濃度が増大するのに伴い、レプチン抵抗性が起こっている。実際、図 60 に示すように正常マウスと比べて高脂肪食摂取マウスにおいて血中レプチン濃度の上昇が確認された。今回、ナノシリカが血中レプチン量に影響を及ぼすかに関して検討を行った結果、正常マウス及び高脂肪食摂取マウスどちらにおいても、ナノシリカ投与により血中レプチン量の減少が確認された。ここで、高脂肪食摂取マウスのほうが顕著にレプチン量の減少が確認されたが、これはレプチンを産生する脂肪組織が減少したため、もしくはナノシリカが生体内において脂肪細胞のレプチン分泌機能を阻害したためだと考えられる。また、レプチンの変動が観察されているにも関わらず、摂食量に関しては変動が確認されなかったことから、レプチン量の変動と体重変化に関しては今後更なる検討が必要であると考えられる。

13. 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 61)。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 62)。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 62)。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 63)。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。

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 64)。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 64)。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 65)。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 65)。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の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。

14.snPt の体内吸収性の評価

蒸留水に懸濁した 1 次粒子径 1 nm の試薬グレードの snPt (5 mg/ml) を、BALB/c マウスの耳介に (50 μ g/10 μ l/ear) で両耳に 7 日間連続で塗布した。最終投与 24 時間後に各種臓器を回収した。これらの臓器を用いて TEM によるナノシリカおよび snPt の局在を観察した。まず、snPt 曝露個体の投与皮膚を観察したところ、経皮投与した snPt は、投与部位の耳介皮膚のみならず、脳、肺、肝臓、腎臓、頸部リンパ節にまで到達していた(図 66)。以上の結果は、snPt が生体内で最も強固なバリアーである皮膚角質層を突破して体内に吸収されて血液循環することを示している。続いて、同様の方法で snPt を塗布したマウスにおける、snPt の体内吸収性を ICP-MS を用いて定量した(図 67)。その結果、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 67)。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 67)。

次に、サブナノ銀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(nAg)、コントロールとして硝酸銀水溶液を 200 μ g/body を 100 μ g/body で、耳介に片耳 10 μ l 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68)。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、その分量は投与局所である耳介から認められた(図68)。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を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68)。更に、体内分布に関しても、nAgを経皮塗布群、硝酸銀水溶液を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を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68)。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68)。本検討では、各マウスがお互いの耳を舐めることによって経口的に体内に吸収されたことを否定出来ない。しかしながら、snPtを経口投与した場合と経皮投与した場合は、snPtの組織分布パターンが全く異なることを見出している。これらの知見を重ね合わせると、snPtが経皮吸収される可能性と投与経路の違いによって体内吸収後の組織移行性が劇的に変化する可能性が示された。今後は、経口的な体内吸収の可能性を除外した条件でのsnPtの経皮吸収量や体内局在の定量や、到達した各種臓器を対象とした詳細な安全性評価などリスク解析に資する基礎情報の収集が必須である。

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増大すること、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。

15. 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69)。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70)。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71)。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71)。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72)。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71)。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。

16. サブナノ白金の経皮感作性評価

本検討では、サブナノ白金の経皮感作性を評価した。まず、正常マウスと免疫不全マウスを用いて、サブナノ白金の経皮感作性を比較解析した。BALB/c マウスに、snPt8、あるいは snPt1 を3週間連続塗布したところ、snPt1 を塗布した群においてのみ、塗布開始後2週間経過してから顕著な耳介部の腫脹、および皮膚病変が認められた(図73)。また、最終塗布24時間後に耳介の所属リンパ節である頸部リンパ節の重量を測定したところ、snPt1 を塗布した群においてのみ顕著な重量増加が認められた(図74)。一方で、獲得性の免疫応答不全の BALB/c nu-nu マウスを用いて同様の検討を行ったところ、いずれの群においても上記検討項目に異常は認められなかった。

次に、BALB/c マウスの左耳介部に、PBS、あるいは snPt1 を3週間連続塗布し、snPt1 塗布群の左耳介部の腫脹を確認した後、右耳介部に snPt1 を皮内投与し、右耳介部の厚さを測定した。その結果、snPt1 を感作させた群においてのみ顕著な右耳介部の腫脹が認められた(図75)。

以上の結果から、snPt1 による炎症の誘導は獲得性の免疫応答によるものであり、snPt1 に経皮感作性があることが示唆された。これまで、金属イオンなどがハプテンとして作用し、感作性を持つことは知られているものの、金属粒子そのものが獲得免疫系に認識されることに関しては知られていない。この点、本知見は金属粒子がそのサイズの微小化により獲得免疫系に認識される可能性を示している。即ち、サブナノ素材特有の新たな性質の発見であると共に、生体の異物認識においても新たな視点を供するものであると考えられる。従って、サブナノ素材の安全性評価のみならず、生命科学の発展への寄与をも見据え、今後の検討に期待が掛かる。

17. サブナノ白金・サブナノ銀の静脈内投与による肝臓・腎臓に対する影響

サブナノ白金 (snPt) を尾静脈内注射した際の

肝臓および腎臓への影響を検討した。まず、肝臓への影響を検討した。図76 A, B に示すように、snPt を投与24時間後、control 群と比べ snPt 用量依存的な ALT、AST 値の増加が見られた。従って、snPt は肝障害を引き起こすことが分かった。高容量の20 mg/kg 投与群では、投与の直後に5匹中3匹のマウスにおいて死亡が確認されたため、snPt には致死的な毒性を有することも明らかとなった。今回、20 mg/kg 投与群では生存していた2匹のマウスから血液サンプルを回収し測定を行った。続いて、腎臓への影響を検討した。図76C に示すように、snPt を投与24時間後、control 群と比べ snPt 用量依存的な BUN 値の増加が見られた。従って、snPt は腎障害を引き起こすことが分かった。

サブナノ銀 (snAg) を尾静脈内注射した際の肝臓および腎臓への影響を検討した。snAg を2 mg/kg 投与直後、マウスにおいて痙攣が観察され、その後すぐに死亡した。1 mg/kg の投与群では、投与直後にマウスに痙攣が観察されたが、死亡は確認されなかった。以上、snAg は高容量において致死的な毒性を有することが明らかとなった。今回の肝臓・腎臓への影響に関する検討では、投与量1 mg/kg 以下での検討を行った。その結果、図77A, B に示すように snAg を投与24時間後、ALT、AST 値はいずれも、control 群と同程度の値を示した。従って、snAg は肝障害を引き起こさないことが示唆された。また、BUN 値を測定したところ、ALT、AST と同様に snAg 投与による影響が見られなかった(図77C)。従って、snAg は腎障害も引き起こさないことが示唆された。snAg 投与直後の致死性の毒性に関しては今後の検討が必要である。

snPt を投与24時間後に、血中 TNF- α および IL-6 を測定したところ、図78A, B に示すように、いずれの炎症性サイトカインにおいても、高容量の投与群で血中濃度の増加が確認された。従って、snPt は炎症誘導作用を有することが示された。snPt 低容量時では炎症性サイトカインの値が上

昇していないことから、低用量投与時に確認される肝障害および腎障害は炎症性サイトカイン以外の要因が関与するのではないかと考えられる。

snAg を投与 24 時間後に、血中 TNF- α および IL-6 を測定したところ、IL-6 に関しては、snAg 投与による血中濃度の増加は確認されなかった (図 79B)。従って、snAg には炎症誘発作用がないことが示唆された。一方、TNF- α に関しては、snAg 投与による血中濃度の減少傾向が観察された (図 79A)。snAg は抗菌作用を有することが報告されているため、炎症誘発物に作用することで、炎症性サイトカインの産生を抑制したのではないかと推察された。

上述した通り、サブナノ白金 (snPt) を尾静脈内注射した際の 24 時間後の肝臓への影響を検討した結果、control 群と比べ snPt 用量依存的な ALT、AST 値の増加が見られた。今回、その際に顕著な測定値の上昇が認められた高容量、15 mg/kg を投与し 24 時間後の各種臓器 (心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓) を摘出し、HE 染色をおこなうことで組織学的に snPt による障害性を評価した。その結果、心臓、肺、脾臓において障害性は確認されなかった。一方、肝臓、及び腎臓においては種々の障害を示す像が確認された。肝臓においては、肝細胞の細胞質に空胞が生じる空胞変性が認められた。腎臓においては、尿細管中で種々の物質の異常濃縮により生じる尿細管円柱の集積が認められた。また、尿細管上皮細胞の壊死変性が認められた (図.80)。この結果は、これまでに得られた肝臓障害性マーカーである ALT・AST 値の上昇、及び腎臓障害性マーカーである BUN、Creatinine 値の上昇と相関する結果となる。従って、snPt は肝臓、及び腎臓に生化学的・組織学的に障害を及ぼすことが明らかとなった。

次に、snPt 投与時における肝障害マーカーの経時的変化について検討した。8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt 15 mg/kg b.w. を投与後、3、6、12、24、48 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、血清中の ALT・AST 値の測

定を行った。その結果、ALT は投与後 12、24 時間後に、AST は 6、12、24、48 時間後に control と比較して有意に高い値を示し、両値とも 12、24 時間後をピークに減少傾向を示した (図 81)。このことから、ALT・AST 値のピークは 12~24 時間にあるものと考えられる。また、血清中の BUN、及び Creatinine 値の測定を行った結果、BUN は投与後 12、48 時間後に control と比較して有意に高い値を示し、Creatinine は投与後 12、48 時間後に control と比較して有意に高い値を示した。両値共に経時的に上昇傾向を示した (図. 82)。従って、BUN、Creatinine 値のピークは 48 時間後、及びそれ以降であることが考えられる。

snPt 投与時におけるサイトカイン誘導の経時的変化についても検討したところ、TNF- \cdot は投与後 12、24、48 時間後に control と比較して有意に高い値を示し、IL-6 は投与後 3、6、12、24 時間後に control と比較して有意に高い値を示した。TNF- \cdot は 12 時間後をピークに経時的に減少傾向を示し、IL-6 は 3 時間後をピークに経時的に減少傾向を示した (図. 83)。従って、サイトカインの誘導は TNF- \cdot と IL-6 双方の誘導されるタイミングが異なるため、それぞれのサイトカインは生体において別々の作用を誘発する可能性が考えられる。

次に、snPt の生体影響に関する濃度依存性を検討した。8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、snPt1 及び snPt8 を 5、10、15、20 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。24 時間後に心採血により血液サンプルを回収し、肝傷害の指標として血清中の ALT・AST 値の測定を行った。その結果、15、20 mg/kg において snPt と比較して nPt の ALT・AST 値は有意に低い値を示した (図. 84)。従って、当検討における濃度範囲において、nPt は肝臓に明確な障害性を示さないことが明らかとなった。また、Pt は、サブナノサイズとナノサイズにおいて異なる障害性を示すことが明らかとなった。また、腎傷害の指標として血清中の BUN 値の測定を行った。その結果、15、20 mg/kg

において snPt と比較して nPt の BUN 値は有意に低い値を示した (図 85)。従って、当検討における濃度範囲において、nPt は腎臓に明確な障害性を示さないことが明らかとなった。また、Pt は、サブナノサイズとナノサイズにおいて異なる障害性を示すことが明らかとなった。

18. サブナノ銀・サブナノ白金の経鼻投与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 86、87)。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 88)。一方で、この群のマウスの鼻粘膜を回収し、病理学的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 89)。

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 90)。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 90)。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 91)。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 92)。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 93)。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 94)。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 94)。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。

19. 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 95 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 (図 96)。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（図 97、98）。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（図 99）。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。

20. 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、snPt の静脈内投与が母体へ与える影響を、母体の組織障害マーカー（ALT、AST、BUN）の観点から解析した。その結果、いずれのマーカーも正常値範囲内の変動であり、snPt の静脈内投与は、組織傷害の観点で、母体に大きな影響を及ぼさない可能性が示された（図 100）。次に、snPt を静脈内投与した際の胎盤・胎仔への移行性を評価した。その結果、投与量の 0.08% 程度の snPt1 が 1 つ当たりの胎盤に分布するのみならず、血液胎盤関門を突破し、胎仔の肝臓（投与量の 0.003% 程度）や脳（投与量の 0.0005% 程度）にまで移行し得ることが明らかとなった（図 101）。次に、母体の体重を測定すると共に、帝王切開により子宮を摘出し、子宮重量、胎仔数、死亡胎仔数、胎仔重量を測定した。その結果、群間の母体の体重、子宮重量、胎仔数、死亡胎仔数には有意差は認められなかった（図 102、図 103）。一方で、snPt8 投与群では対照群と比較して有意な変化が認められない一方、snPt1 を投与した群の胎仔重量が、投与濃度依存的に減少し、10 mg/kg 投与群では有意な差が認

められた（図 104）。以上により、snPt の妊娠期曝露は胎仔の発育不全を誘発する可能性があること、そのハザードは粒子径の制御により減弱可能であることが明らかとなった。

妊娠母体における、IL-6 等の炎症性サイトカインの上昇が胎児発育不全を誘発することが知られていることから、そこで次に、本現象のメカニズム解明の一端として、snPt1 を投与した際の母体血中の炎症性サイトカインの定量を試みた。その結果、対照群と比較して、snPt1 投与群で IL-2、IL-6、IL-12(p40)、G-CSF、MCP-1、MIP-1b が有意に発現上昇していた（図 105）。今後、中和抗体を用いた検討等により、これらのサイトカインと胎仔発育不全との因果関係をより詳細に検討する予定である。

以上は静脈内投与による検討であったが、現実的な曝露経路を加味し、次に、snPt の経口投与が母体・胎仔へ及ぼす影響を評価した。まず、snPt が母体へ及ぼす影響を、組織障害マーカー、体重推移の観点から評価した。その結果、母体血中の ALT、AST、BUN（図 106）、母体の体重推移（図 107）に群間で有意な変化は認められなかった。次に、仔へ及ぼす影響を評価する目的で、帝王切開し、子宮重量、胎仔数、死亡胎仔数、胎仔重量を評価した。その結果、子宮重量、死亡胎仔数には群間で有意な変化が認められなかった。一方で、snPt を投与した群の胎仔数が、対照群と比較して減少傾向にあると共に、snPt1 を 3 mg/kg 投与した群では有意に減少していた（図 108）。また、snPt1 を 10 mg/kg 投与した群の胎仔重量が、対照群と比較して有意に減少、その他の snPt 投与群では有意に上昇していた（図 109）。snPt 投与群のうち、胎仔重量が増加したものについては、snPt の投与により胎仔数に減少傾向、ないしは対照群と比較して有意な減少が認められたことから、胎仔 1 匹あたりの重量が大きくなったことに起因すると考えられた。一方で、snPt1 10 mg/kg 投与群において、胎仔重量が減少していたことは、snPt1 が経口投与によっても、胎仔発育不全を誘

発し得ることを示していると考えられた。今後、ハザード同定にとどまらず、NOAEL の設定が必要不可欠である。

21. snPt の妊娠期曝露が仔の情動認知機能へ及ぼす影響評価

近年、情動・認知機能の異常を主徴とする疾患に罹患する子供が増加しているが、これらこころの問題の発症に、妊娠期の化学物質曝露が関与している可能性が懸念されている。従って、妊娠期の化学物質曝露と、次世代の脳機能の因果関係の解明が重要課題である。本観点から、ナノ・サブナノマテリアルの妊娠期曝露が、次世代の情動認知機能へ及ぼす影響を評価した。妊娠後期に snPt を静脈内投与した妊娠マウスを出産させたところ、各群の出生仔数、雌雄比に有意な差は認められなかった (図 110)。一方で、snPt1 を投与されたマウスの子 (snPt1 群) の出生時体重が対照群と比較して有意に減少していた (図 110)。また、snPt1 群はキャッチアップグロースを示さず、成長後も対照群と比較して有意に低体重を示すことが明らかとなった。一方で snPt8 を投与されたマウスの子 (snPt8 群) では上記は認められなかった。したがって snPt1 の妊娠期曝露は、出生仔体重の減少と、仔の成長不全を誘発することが明らかとなった。次に、仔マウスを 10 週齢まで飼育後、筋力、活動量、不安様行動、痛覚感受性、社会的行動、協調運動、運動学習、感覚-運動ゲーティング、うつ様行動、記憶・学習、などを、網羅的行動バッテリーにて評価した。

本格的な行動テストを行う前に、マウスの一般的な健康状態及び筋力等を検査した結果、nPt 群と対照群の間に有意な差はなく、妊娠期ナノ白金曝露による仔の身体的発達への影響は認められなかった (図 111A-D)。一方、snPt 群は 10 週齢時の体重が対照群より統計的に有意に少なく (図 111A)、妊娠期サブナノ白金曝露が仔の身体的発達を阻害していることが明らかになった。妊娠期サブナノ白金曝露を受けた仔の成長後の体

温には異常は認められなかった (図 111B)。また、wire hang テストにおいて群間に有意な筋力の違いは認められなかったが (図 111C)、握力測定テストにおいて snPt 群の握力が対照群よりも有意に低く (図 111D)、妊娠期サブナノ白金曝露が握力低下を引き起こす可能性が示唆された。

不安様行動を評価するために、明暗選択テスト、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト、ガラス玉覆い隠しテストを行ったところ、明暗選択テスト (図 112)、オープンフィールドテスト (図 113)、ガラス玉覆い隠しテスト (図 114) においては、各群の不安様行動に有意な差はなかった。一方、高架式十字迷路テストでは、snPt 群が対照群と比較して不安様行動が低下していることが明らかになった (図 115)。但し、この変化は逃避行動の亢進を反映している可能性もあり、今後の検討が必要である。

うつ様行動を評価するために強制水泳テストおよび尾懸垂テストを行った。強制水泳テストでは、snPt 群が対照群に比べて不動時間の割合が有意に少なく、移動距離が多いことから、うつ様行動が低下していることが示唆された (図 116)。一方、nPt 群は、対照群と比較して、不動時間の割合が早い段階で増加し、うつ様行動の開始が早い傾向が認められた。しかしながら、尾懸垂テストでは、いずれの群間のうつ様行動にも有意な差は検出されず (図 117)、妊娠期ナノ白金およびサブナノ白金曝露が次世代のうつ様行動に与える影響については今後も検討する必要がある。

新奇環境下においてこれまでに出会ったことのない 2 個体を出会わせる社会的行動テストを行った結果、nPt 群は対照群に比べて他個体に対する一回当たりの接触時間が有意に長かった (図 118)。この結果は、妊娠期ナノ白金曝露が仔の社会性の発達に対して促進的に作用している可能性を示唆する。しかしながら、Crawley 版社会的行動テストにおいては、他個体への選好性に基づく社会的行動の増加は認められず (図 119)、妊娠期ナノ白金曝露による促進効果は限定的であ

り、再確認する必要があると考えられる。一方、snPt 群はいずれのテストにおいても対照群との間に有意な差は認められなかった。

プレパルス抑制テストを行った結果、各群間のプレパルス抑制に有意な違いはなく、感覚運動ゲーティング・注意力に対する妊娠期ナノ白金およびサブナノ白金曝露の影響は認められなかった(図 120B)。しかしながら、本テストにおいてnPt 群は大きな音に対する驚愕反応が統制群より亢進している傾向があった(図 120A)。

痛覚感受性の測定としてホットプレートテスト(図 121)、協調運動・運動学習能力の測定としてローターロッドテスト(図 122)を行ったが、いずれのテストにおいても各群間に有意差はなく、痛覚感受性や協調運動・運動学習能力の発達に対する妊娠期ナノ白金およびサブナノ白金曝露の影響は認められなかった。

音刺激と電気ショック刺激の対呈示による連合記憶の形成、ならびに音刺激および電気ショック刺激を受けた環境下で想起される文脈記憶・恐怖記憶を評価した結果、いずれも各群間に有意な差はなく(図 123)、妊娠期ナノ白金・サブナノ白金曝露の影響は確認されなかった。

そこで、分子レベルで脳に及ぶ影響を解析する目的で、行動解析が終了した 23 週齢時の脳を回収し、不安やうつに関与する、海馬、大脳皮質前頭前野、視床下部中の神経伝達物質濃度を測定した。その結果、snPt8 群、snPt1 群ともに、各組織中の 5-HT、5-HIAA、DA、DOPAC、HVA、NA、MHPG 量に、対照群と比較して有意な変化は認められなかった(図 124)。従って、神経伝達物質の含量には、snPt の妊娠期曝露は影響しない可能性が示された。次に、胎仔期の神経成長を評価するため、胎仔の各脳組織の BrdU 陽性細胞を計数した。その結果、嗅球の脳室下帯の BrdU 陽性細胞数が対照群と比較して有意に減少していた(図 125)。したがって、snPt の妊娠期曝露は胎仔の脳の神経成長異常を誘発する可能性が示された。脳室下帯は歯状回と並び、神経幹細胞からのニュー

ロンの産生(Neurogenesis)が成体になっても続く、数少ない部位である。成体での Neurogenesis は様々な精神・神経疾患との関連が示唆されており、Neurogenesis と抗うつ作用との関与も明らかとなっている。従って、脳室下帯の Neurogenesis を変動させることが、snPt1 の妊娠期曝露が仔の情動・認知機能異常を誘発する一因である可能性が考えられた。

妊娠期にナノ白金を投与した雌マウスから生まれた仔は、社会的行動の増加、聴覚性驚愕反応の亢進、うつ様行動の亢進傾向を示した。また、同様に胎生期にサブナノ白金に曝露された仔は、成長後の体重および筋力が低く、不安様行動やうつ様行動の低下が認められた。なお、不安様行動やうつ様行動の低下は、ストレス場面からの逃避行動が亢進した結果を反映している可能性もある。これらの結果は、妊娠中の雌マウスが 20nm サイズ以下のナノ白金あるいはサブナノ白金に曝露されると、胎盤を通して胎仔の体内にもそれらの物質が流入し、脳神経系の発達に影響した結果として成長後の不安・うつ様行動や社会的行動、聴覚性驚愕反応のような心理的発達に異常が生じる可能性を示唆している。今後は、今回実施していない別のうつ様行動や学習・記憶機能に関する行動解析についても行い、妊娠期ナノ白金・サブナノ白金曝露による次世代への影響をより詳細に検討する必要がある。また、前年度に実施した妊娠期ナノシリカ(nSP70)曝露は、聴覚性驚愕反応の顕著な亢進が生じることが明らかになったが、妊娠期ナノ白金でも同様の亢進傾向が認められた。聴覚脳幹誘発電位の測定による確認や、驚愕反応に関連する脳部位の特定および遺伝子発現解析、ならびに透過型電子顕微鏡による脳へのナノシリカおよびナノ白金移行の確認を行う必要があるだろう。さらに、他のナノマテリアルの影響や投与量・投与時期の違いの影響についても評価する必要がある。例えば、前年度は、nSP70 を妊娠マウスに静脈内投与した検討であったが、表面修飾した nSP70-C や nSP70-N を用いた検

討 (nSP70 は胎仔吸収や IUGR を誘発するが、nSP70-C や nSP70-N は誘発しない)、低投与量での検討、妊娠初期や授乳期投与の効果の検討を実施する必要がある。また、静脈内投与だけでなく、経皮投与など他の投与ルートや、雄マウスの精子を介した次世代への影響を評価する必要もあるだろう。

22. snPt の母乳移行性の検討

母乳は、栄養源や子の免疫機能の補助など、多様な有用機能を持っている。一方で、新生児が母乳を介して化学物質等に曝露し、悪影響を受ける例が多数報告されていることから、化学物質の母乳を介した新生児への影響評価は必須であると考えられる。そこで、授乳期におけるナノ・サブナノマテリアルの安全性評価を推進するうえでの基礎情報の収集を目的に、ナノ・サブナノマテリアルの母乳移行性を評価した。まず、単回・静脈内投与における snPt の母乳移行性を評価した。出産 3 日後の母獣に snPt8、snPt1 をそれぞれ 20 mg/kg で静脈内投与し、投与 12 時間後、5 日後、7 日後に、母乳を回収した。ICP-MS による解析の結果、投与 5 日後及び 7 日後では母乳中に白金は検出されなかった。一方で、母乳量を 1mL と仮定すると、投与 12 時間後に、snPt1 はおよそ 0.3%、snPt8 はおよそ 0.01%の白金が血中から母乳中へ移行する可能性が示された (図 126)。snPt8 投与群における母乳中白金量は snPt1 投与群より少なく、経時的なデータの取得は必要であるが、snPt の母乳中への移行量は粒子径に依存する可能性が示された。次に、マウスの授乳期間である 3 週間、連日経口投与後の snPt の母乳移行性を評価した。その結果、snPt1 群は、母体・新生児の死亡が散見され、母乳が回収不可能であった。一方で、snPt8 投与群においては、最終投与 24 時間後に回収した母乳中に、およそ 4 ng/mL の白金が同定された。1 回投与量を 100%とすると、およそ 0.0005%の snPt8 が経口投与後、母乳中へ移行する可能性が示唆された (図 127)。

今後、経時的に移行量を測定し、実際に仔が摂取しているであろう量を算出する予定である。次に、銀の母乳移行性を評価した。出産後の母獣に nAg、snAg、Ag+をそれぞれ 1.5 mg/kg で静脈内投与し、経時的に母乳を回収した。ICP-MS による解析の結果、母乳量を 1mL と仮定すると、snAg、Ag+はおよそ 7%、nAg はおよそ 2%の銀が少なくとも血中から母乳中へ移行する可能性が示された(図 128)。このことから銀の母乳中への移行量は粒子径に依存する可能性が示された。以上より、白金粒子は銀粒子と比較して母乳へ移行しづらい可能性、同元素の比較では、粒子径が小さいものほど母乳移行性が高くなる可能性が示された。また、粒子によって母乳中最大濃度のピーク時間が異なることから、母乳への移行経路が異なる可能性が考えられる。今後、母乳中局在や母乳中での存在形態を測定することで、各粒子の母乳への移行経路を検討する予定である。

23. snPt の授乳期曝露が母体及び新生仔へ及ぼす影響評価

次に、snPt の授乳期曝露が母体及び新生仔へ及ぼすハザードの同定を試みた。まず、1 週間にわたり snPt8 を経口投与し、母体・新生仔へ及ぼす影響を評価した。その結果、いずれの濃度の snPt8 投与群でも、母体の AST・ALT・BUN のいずれにも有意な変化は認められなかった (図 129)。一方で、snPt8 を 30mg/kg、10mg/kg 投与した群の新生仔の体重が、対照群と比較して有意に低下していた(図 130)。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、授乳期の母体への snPt8 投与は、新生仔の成長を抑制する可能性が示唆された。次に、3 週間にわたり snPt8 を経口投与し、母体・新生仔へ及ぼす影響を評価した。その結果、いずれの濃度の snPt8 投与群でも、対照群と比較して、母体の AST・ALT・BUN に有意な変化は認められなかった(図 131)。一方で、snPt8 を 30mg/kg 投与した群の新生仔の体重が、対照群と比較して有意に低下していた(図 132)。

また、snPt8 を 30mg/kg 投与した群において、母体の血小板容積と血小板分布が対照群と比較して有意に増加していた(図 133)。この変動は血小板の産生疾患で認められる変化と同程度のものであった。また、母体と比較して軽度ではあるものの、いずれの濃度の snPt8 投与群においても、仔の血小板容積と血小板分布が対照群と比較して有意に増加していた(図 134)。以上の結果から、授乳期の母体への snPt8 投与は、新生仔の成長抑制に加え、血球細胞の変動を誘発する可能性が示された。新生仔において snPt8 を直接曝露した母体と同様の影響が認められたことから、snPt8 が母乳を介して新生仔へ移行し、直接影響を及ぼす可能性があると考えられる。今後、新生仔に直接投与した際の影響を評価する予定である。

24. snPt は EVT 細胞にオートファジーを誘導するが、snAg は誘導しない

ナノマテリアルにはオートファジー活性化能があることは報告されていた。そこで、snPt および snAg の細胞毒性のメカニズムにオートファジーが関与するかを検討するため、HchEpC1b 細胞に対し、細胞増殖抑制を示さない snPt 50・g/ml, snAg 0.5・g/ml にて処理を行い、オートファジーの活性化を評価した。snPt は HchEpC1b 細胞に LC3-II 蓄積を誘導し、LC3-II 蓄積はオートファゴソームの分解抑制 (E64d+pepstatin 処理) により増強された。また、オートファジー選択的分解基質である p62 も、snPt 処理により減少した。一方で、snAg 処理では LC3-II 蓄積および p62 減少は認めなかった。同様の現象は HTR8 細胞においても認められた。この結果は、snPt が EVT 細胞においてオートファゴソーム分解抑制ではなく、オートファジーの活性化作用を持つことを示す。一方で snAg にはその作用は認めなかった。

そこで、オートファジー能を欠損したセルラインを使用し、snPt の増殖への影響とオートファジーの関与を検討した。snPt を培養液に

HchEpC1b:0-200 μ g/ml、HTR8/SVneo:0-32 μ g/ml で加え、24 時間培養後の細胞数を WST-1 アッセイにて評価した。オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞において、25 μ g/ml で 50%の増殖抑制を示したが、コントロール細胞 (オートファジー正常) では 100 μ g/ml において 59%の増殖抑制を認め、オートファジー欠損が snPt の細胞毒性を増強させた。さらに、snPt 0-50 μ g/ml を含有した培養液で 24 時間培養後の snPt 細胞内濃度を測定したところ、オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞ではコントロール細胞に比し、濃度依存性に細胞内 snPt 蓄積量の増加を認めた。一方、もうひとつの EVT セルラインである HTR8/SVneo 細胞では、オートファジー欠損による細胞増殖への影響は見られなかった。しかし、オートファジー欠損細胞内の snPt 蓄積も認められなかった。この 2 種類の EVT セルラインによる snPt の影響の違いとして、セルライン化の方法が違う。HTR8/SVneo 細胞は SV40 による癌化である一方、HchEpC1b 細胞はヒトパピローマウイルスの E6/E7 および hTERT 導入による不死化である。また、HchEpC1b 細胞は染色体数も正常であることから、我々は HchEpC1b がより Primary 細胞に近い形質を維持していると考え、HchEpC1b 細胞における snPt 取り込み・排出にオートファジーが如何に関与するかをさらに検討した。

snPt を 25 μ g/ml で含む培養液で 12,24,48 時間培養後、細胞内 snPt 濃度を評価した。コントロール細胞では時間経過において細胞内 snPt 量は増加しなかったが、オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞では有意な蓄積を示した。一方、25 μ g/ml で snPt を含む培養液で 24 時間培養、細胞を洗浄後 12,24,48 時間後の細胞内遺残 snPt 濃度を評価した。コントロール細胞では細胞内 snPt 量は、12 時間の snPt 遺残量に比し、48 時間後で 19.7%であった。一方、オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞では、48 時間後で 40.2%の snPt が細胞内に遺残していた。つまり、この

結果はオートファジー欠損が snPt 取り込みの促進あるいは排出遅延に関わる可能性を示唆していた。

オートファジーが正常な HchEpC1b 細胞にオートファジー抑制を行うと、オートファジー欠損細胞と同様の snPt 増殖抑制を呈すかを、WST-1 アッセイで検討した。snPt を非含有培養液および 25 μ g/ml 含有培養液に 3-MA を 0-10mM で加え、24 時間培養後に測定した。snPt 非含有では、3-MA 投与によって、2 種類の細胞の間の細胞増殖率に有意な影響を認めなかった。一方で、snPt 25 μ g/ml 存在下では、3-MA 0mM ではオートファジー欠損細胞の細胞数は、オートファジー正常細胞数に比し、有意に低下していた。一方、3-MA:2.5-5mM 存在下でオートファジーを抑制すると、オートファジー欠損細胞の細胞数は低下しなかったが、オートファジー正常細胞数が低下し、2 種細胞間の細胞数に有意な差を認めなくなった。このことは、snPt の細胞増殖抑制にオートファジーが関与することを強く示唆する結果である。

25. ナノマテリアルの安全性評価バイオマーカーの探索

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。まず、非晶質ナノシリカ曝露による血中での発現変動蛋白質の解析を試みた。BALB/c マウスに、nSP70 を 0.8 mg/匹で尾静脈より単回投与し、24 時間後に血液、及び血漿を回収した。この血漿を SDS-PAGE に供し、発現変動蛋白質を評価した。その結果、コントロールとして生理食塩水 (saline) を投与した群と比較し nSP70 投与群において、分子量約 37 kDa のバンドの濃さに違いが認められた (図 135)。そこで、この部位のバンドを切り出し、LC/TOF/MS により対応する蛋白質の同定を試みたところ、いくつかの蛋白質が同定され、その中

で急性期蛋白質の一種である haptoglobin を候補蛋白質として見出した。

非晶質シリカ曝露後の血中 haptoglobin 量を定量解析するために、BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 haptoglobin 量を ELISA により測定した。なお、nSP70、nSP300、mSP1000 投与群において、一般的な組織傷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)。血中 haptoglobin 量を測定したところ、mSP1000 投与群では、saline 投与群と比較しほとんど変化は認められなかった。一方で、nSP300 投与群でわずかに産生量の増加が見られ、さらに、nSP70 投与群では saline 投与群と比較して有意に増加することが明らかとなった (図 136A)。次に、非晶質シリカ曝露後の血中 haptoglobin 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/匹で尾静脈投与し、投与後 6 時間、24 時間、3 日、7 日における血中 haptoglobin 量を ELISA により測定した。その結果、mSP1000 投与群では、いずれの時間においても血中 haptoglobin 量の増加は認められなかった (図 136B)。一方で、nSP70、nSP300 投与群では、投与後 24 時間において血中 haptoglobin 量が最大ピークを示すことが明らかとなった。さらに、投与後 3 日においても、nSP70 投与群の血中 haptoglobin 量は saline 投与群と比較し有意に増加していた。次に、BALB/c マウスに nSP70 を各投与量 (0.05 mg/匹、0.2 mg/匹、0.8 mg/匹) で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 haptoglobin 量を ELISA により測定した。その結果、0.2 mg/匹、0.05 mg/匹で投与した群では、saline 投与群と比較しほとんど血中 haptoglobin 量の増加は認められなかった (図 136C)。これらの結果から、血中 haptoglobin 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