

201524005A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

**脆弱な個体をも対象とした、経皮・吸入曝
露後のナノ・サブナノ素材の挙動解析とハ
ザード情報集積
(ナノリスク解析基盤の構築)**

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 28 (2016) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

**脆弱な個体をも対象とした、経皮・吸入曝
露後のナノ・サブナノ素材の挙動解析とハ
ザード情報集積
(ナノリスク解析基盤の構築)**

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 28 (2016) 年 5 月

目 次

I. 研究報告	
1. ナノ・サブナノ素材の経皮・吸入曝露実態の定量解析および一般毒性・免疫毒性・臓器毒性・生殖発生毒性-----	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・サブナノ素材の臓器毒性における閾値追求-----	37
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. 乳幼仔・小児・成熟個体におけるナノ・サブナノ素材の脳神経系動態解析と神経薬理学的毒性評価-----	47
大阪大学大学院 薬理学教室	研究分担者 田熊一徹
4. ナノ・サブナノ素材の胎盤動態および胎盤/胎仔毒性評価-----	51
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
5. 乳幼仔・小児・成熟個体におけるナノ・サブナノ素材の情動・認知行動毒性学的評価基盤の確立とその評価-----	55
藤田保健衛生大学総合医科学研究所	研究分担者 宮川 剛
6. ナノ・サブナノ素材の一般毒性・免疫毒性評価とインターラボ間バリデーション評価-----	59
(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-----	69
III. 研究成果の刊行物・別刷-----	71

ナノ・サブナノ素材の経皮・吸入曝露実態の定量解析および一般毒性・ 免疫毒性・臓器毒性・生殖発生毒性

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（動態 [ADME]：吸収性、その後の分布、代謝、蓄積・排泄といった細胞内・体内挙動）情報に至っては皆無に等しい。この点で研究代表者らは、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-動態-安全性の連関評価に資するナノ安全科学（Nano-Safety Science）研究を推進してきた。特に、NM・sNM が流産や胎仔発育不全など、発生毒性を呈し得ることを先駆けて明らかとしており、妊婦・胎児・乳幼児といった化学物質に対して脆弱な個体を対象として、個々の感受性や種々相互作用を考慮した安全性評価が必須であることを提示してきた。そこで本研究では、研究代表者らの独自かつ唯一の知見を基盤として、化粧品・食品などに含有されている NM・sNM、中でも世界的に観ても手つかずの sNM に着眼し、脆弱な個体をも対象とした、経皮・吸入曝露後の挙動解析とハザード情報の集積を図り、ナノリスク解析基盤の構築を試みた。平成 27 年度は、①乳幼仔において、サブナノ銀の腸管吸収性は成体と比較して 14 倍以上高いこと、②サブナノ銀の血中からの排泄能が低い可能性を見出し、脆弱な個体を対象とした蓄積・代謝・排泄・分解を精査する重要性を示した。③サブナノシリカの連日曝露により、曝露から 72 時間が経過してはじめてサイトカイン IL-8 が誘導され、曝露後から 24 時間はその産生が持続すること、④サブナノシリカを 28 日間連日曝露することで、Akt 経路が可逆的に、ERK 経路が不可逆的に活性化される可能性を明らかとし、NM・sNM の長期曝露による生体影響、また、それら生体影響の可逆性・不可逆性を評価することが長期曝露影響を理解するうえで重要であることを示した。また、⑤ナノ・サブナノシリカの急性毒性について、粒子径の減少に依存して増強される毒性（急性致死毒性、肝障害、凝固障害）と、50 nm をピークとした粒子径特異的に発現する毒性（体温低下）が存在することを見出すと共に、⑥ナノ・サブナノシリカによる肝障害には、血小板数に依存して誘導される経路が存在すること、⑦体温低下の誘導は、血小板活性化因子依存的であり、その産生には少なくともマクロファージが関与していることを明らかとした。さらに、⑧これまでに研究代表者らが明らかとしてきた、70 nm のナノシリカ投与による生殖毒性の発現に、好中球の増加・活性化が重要な役割を果たしており、好中球の depletion がナノシリカ投与による生殖毒性を悪化させること、⑨好中球を depletion することが、ナノシリカ投与による胎盤傷害の亢進につながり、胎仔数の減少を誘導する可能性を見出した。加えて、⑩サブナノ銀やサブナノニッケルの事前投与により、銀やニッケルに対する感作が成立することを見出し、金属アレルギーの感作成立、および、病態発症において、イオンではなく、金属ナノ粒子が重要な役割を

果たしている可能性を示し、さらには、⑩その発現機序の一因として、イオンと比較し、金属ナノ粒子は感作成立の場であるリンパ節への移行・滞留性が優れている可能性を示した。これら研究成果については、学会のシンポジウム、公開講座や班会議などを通じて、研究者、ナノ産業界、一般国民とのリスクコミュニケーションを多数実施した。以上、本研究において、当初計画を十分に満たしたうえで、当初目標を超える特筆すべき成果が得られた。

A. 研究目的

近年、本邦を始めとする多くの先進諸国で、流産・超早産・先天異常が飛躍的に増加すると共に、超未熟児として産まれた乳幼児の多くに、自閉症や多動症といった「こころ」の発達障害や、メタボリックシンドロームなどの代謝障害が後天的に頻発するなど、少子高齢化社会の大きな社会問題となっている。本観点から、妊婦・胎児・乳幼児といった化学物質に高感受性の集団に対する安全性評価の重要性が世界的に指摘されており、化学物質の次世代影響に関する疫学研究である、「子供の健康と環境に関する疫学調査」、所謂、エコチル調査と共に、化学物質の発生毒性が動物実験により多く検討されている。一方で、ナノ素材(ナノマテリアル[NM]:粒子径 100 nm 以下)、サブナノ素材(サブナノマテリアル [sNM]: 1~10 nm 範囲)の発生毒性に関する知見は、ディーゼル粒子などを例外に、申請者らのグループが推進しているにすぎず、まさに世界を牽引している。即ち、感受性の違いを考慮したリスク管理を実現するためにも、「こどものナノ安全科学」とも言うべき、妊婦・胎児・乳幼児に焦点を絞った、NM・sNMの発生毒性・次世代影響に関する科学的根拠・情報の収集と、そのリスク評価はまさに緊急の課題と位置付けられている。さらに世界保健機構(WHO)は、上述した「こころ」の発達障害の増加も相俟って、2020年には鬱病が罹患疾患の第2位になると予測している。近年の疫学調査からも、妊娠期・乳児期の化学物質曝露が、次世代の情動・認知機能異常を誘発することは明確であり、NM・sNM曝露と情動・認知機能異常の因果関係の解明を目指した「こころのナノ安全科学」の推進が強く求められている。本観点から申請者はこれまでに、sNMにも先駆けて注目

し、経皮・吸入(経鼻【経口腔・経気道を含む】)・経口曝露後の定性・定量的な動態情報を先駆けて収集すると共に、脆弱な個体に対する影響を含め、他に類を見ないハザード情報の収集による閾値探求を図るなど、ナノ安全性研究において国内外を問わずパイオニアとなっている。以上の研究基盤を礎にして、当該申請研究では、化粧品などに含有されているNM・sNM(特にsNM)の、妊婦・胎児・乳幼児といった脆弱な個体をも対象としたナノリスク解析基盤の構築を目的に、物性・品質(粒子径・形状・表面性状・分散/凝集状態など)や、曝露経路毎の体内動態・ハザードの違いを考慮しつつ、①胎盤・胎仔・母乳・乳幼仔などへの分布・蓄積や、排泄・分解をも含めた、経皮・吸入曝露実態(動態)を定量解析すると共に、②一般毒性や免疫毒性(金属系NM・sNMが金属アレルギーの発症要因になる可能性を我々が初めて観察)といった特殊毒性は勿論のこと、次世代影響評価や情動・認知行動解析による、「こどものナノ安全科学」・「こころのナノ安全科学」とも言うべきハザード情報集積基盤手法を開発し、NM・sNMの物性・品質-動態-生体影響との関連追求・閾値追求を図るものである。

B. 研究方法

1. ナノ・サブナノマテリアル

非晶質シリカは Micromod Partikeltechnologie 社より購入した。ナノシリカは、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)、10 nm (nSP10、濃度: 25 mg/ mL)のものを使用した。また対照として、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。ナノ銀粒子は、nano Composix 社より購入した。銀粒子は、表面をクエン酸修飾した、粒子径が 10 nm (nAg10、濃度 1.0 mg/mL)、50 nm (nAg50、濃度 1.2 mg/mL)、100 nm (nAg100、濃度 1.0 mg/mL) のものを使用した。さらに、銀粒子分散液中に含まれる銀イオンの影響を加味するため、銀イオンとして、硝酸銀を用いた。なお、以後の検討では、使用直前に粒子分散液を 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。非晶質ナノシリカについては、ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY による 5 分間の超音波処理も実施した。

2. 単回経口投与時の乳幼仔と成体マウスの吸収性の違いの検討

出産後 3 日の乳幼仔、もしくは 6 週齢の成体マウスに、nAg10 (2.5 mg/kg)、AgNO₃ (2.5 mg/kg Ag⁺) を経口投与した。投与 0.25、0.5、1、2、4、8 時間後に血液を回収し、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により血中 Ag 濃度を測定した。

3. ICP-MS による測定

Ag 量は ICP-MS 装置 (Agilent 7700 Series ICP-MS) を用いて測定した。分析条件は、RF パワー：1500 W、キャリアガス：アルゴン 1.05 L/min、とし、測定質量数は 107Ag、197Au、103Rh、205Tl とした。各検体には、内標準として 103Rh (107Ag に対する内標準)、205Tl (197Au に対する内標準) を 2 ng/mL とするよう添加し、ICP-MS による測定に供した。また、6~10 点の既知濃度の Ag 溶液を作成し、検量線溶液として用いた。定量下限以下の値となった検体は濃度を 0 ng/mL とした。

4. ICP-MS に供す検体の調製

粒子溶液は 10%硝酸で希釈したものを検体とし

た。銀投与群、もしくは銀添加群の母乳はまず、蒸留水で 50 倍希釈した。血液、乳清、母乳中細胞、もしくは 50 倍希釈された銀投与群の母乳は希釈液 (70 mM アンモニア、1 μM エチレンジアミン四酢酸、0.007% Triton X-100) にて、さらに 100 倍以上希釈し、検体とした。上記の手順で調製した各検体について、0.02 ng/mL を定量下限値として Ag 濃度を ICP-MS により定量した。

5. 非晶質ナノシリカの長期曝露

150 φ の細胞培養用ディッシュに 1 × 10⁶ cells/10 mL/dish で A549 細胞を播種した後、DMEM で終濃度 125 μg/mL に調製した nSP10 を 10 mL/dish 加え、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で培養した。細胞がコンフルエントにならないよう、3 日おきに継代および、培地交換を行い、最長 30 日まで連日曝露を行った。この時、細胞懸濁液とトリパンブルーを 1:1 の割合で混合し、血球検査盤を用いた細胞計数により細胞数を測定した。

6. マイクロアレイ解析

150φの細胞培養用ディッシュにて 30 日間の曝露を行った後に、PBS で 2 回洗浄し、トリプシン処理して細胞をはがした。その後、細胞から RNeasy Mini Kit により Total RNA を抽出した。Total RNA の品質は、RNA 6000 Nano LabChip Kit により、Bioanalyzer 2100 を用いて評価した。Total RNA に T7 プロモーター配列を付加した oligo-dT プライマーをアニールさせ、AffinityScript reverse transcriptase により逆転写した。その際、Low input Quick-Amp Labeling Kit により、cDNA に Cy3-CTP 標識を行った。Cy3 標識した cDNA を各群 600 ng ずつ、SurePrint G3 Human GE v2 8x60K Microarrays にハイブリダイズし、マイクロアレイ解析を行った。なお、マイクロアレイ解析は Agilent Technologies のプロトコールに準じて解析した。サンプル間の遺伝子発現の変動比率の解析には、Subio Platform

and Subio Basic Plug-in を用いて、バックグラウンド補正、75 パーセントの値で正規化、PM 値の補正、要約化を行うことで、対照群との遺伝子発現変動を比較解析した。

7. 遺伝子発現変動のネットワーク解析

遺伝子変動の認められた遺伝子群から NextBio system を用い、対照群と比較して、2 倍以上発現が増加または減少する遺伝子を抽出した。それら遺伝子群の機能解析、ネットワーク解析には INGENUITY PATHWAY ANALYSIS を用いて、添付のプロトコールに準じて解析を行った。

8. RT-PCR

抽出した Total RNA から High Capacity RNA-to-cDNA kit のプロトコールに準じて、cDNA に逆転写した。得られた cDNA を鋳型として、Table1 に示すプライマーと EmeraldAmp® PCR Master Mix により反応液を調製し、Veriti® Thermal Cycler を用いて、PCR 反応を行った。PCR 産物は 4% アガロースゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色することで可視化した後、発光像を LAS-4000 により撮影した。その後、ImageJ を用いて、バンド強度を解析し、各試薬添加群の遺伝子発現量の変化は、各サンプルの遺伝子発現量を各サンプルの GAPDH 量で除すことで解析した。

9. Western Blot

150φの細胞培養用ディッシュにて 30 日間の曝露を行った後に、細胞を PBS で 2 回洗浄し、トリプシン処理して細胞をはがした。その後、Halt™ Protease Inhibitor Cocktail Kit を添加した M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagent で細胞を可溶化し、タンパク質を回収した。試料は BCA Protein Assay Reagent Kit のプロトコールに従い、タンパク量を測定した。総タンパク量が 10 µg になるように各試料を取り、5 % 2-mercaptoethanol 含有 Laemmli

Sample Buffer を等量混合し、95°C で 5 分処理した後、各試料を Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis した。電気泳動後のゲルを PolyVinylidene DiFluoride (PVDF 膜) に転写し、1 % BSA/PBST (0.05 % Tween 20 を含む PBS) を添加してブロッキングした。1 次抗体として Anti-ERK1/2、anti-phospho-ERK1/2 (Thr183/Tyr185)、anti-p38、anti-phospho-p38 (Thr180/182)、anti-Akt、anti-phospho-Akt (Ser473)、および anti-β-actin を室温で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、2次抗体として HRP/anti-rabbit IgG、HRP/anti-mouse IgG を室温で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、PVDF 膜を SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity substrate で処理し、発光像を LAS-4000 により撮影した。その後、ImageJ を用いて、得られたバンド強度を解析し、各試薬添加群のタンパク発現量の変化は、各サンプルのタンパク発現量を各サンプルの β-actin 量で除すことで解析した。

10. ナノシリカの尾静脈内投与による急性致死毒性試験

C3H/HeN マウス (10 週齢、雄性) に PBS で各濃度に調製したナノシリカ分散液 (nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100) を 200 µL/mouse ずつ尾静脈内投与した。その後、投与から 24 時間後まで、1 時間ごとにマウスの生存を観察した。

11. 血液の回収

PBS または各粒子径のナノシリカを尾静脈内投与した 4 時間後、マウスからソムノペンチル麻酔下で、ヘパリンを含ませたシリンジおよび 26 G の注射針を用い、心臓より採血を行った。ヘパリンは全て生理食塩水を用いて 500 U/mL に調製した。ヘパリンを用いて採血した血液を全血として血球検査に用い、残りを 3000 g で 15 分間、遠心分離して血漿を回収した。得られた血漿は、

血液生化学検査に供した。

12. 血球検査

PBS または各粒子径のナノシリカを尾静脈内投与したマウスから全血を採取し、多項目自動血球計測装置 VetScan HM II を用いて、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。

13. 血液生化学試験

PBS または各粒子径のナノシリカを尾静脈内投与したマウスから血漿を回収し、血漿中の Alanine aminotransferase (ALT : 肝障害マーカー)、Aspartate aminotransferase (AST : 肝障害マーカー) を比色法にて測定した。ALT および AST 活性は、それぞれの基質である L-アラニンおよび L-アスパラギン酸と α -ケトグルタル酸のアミノ基転移反応によって生じたピルビン酸が、ピルビン酸オキシダーゼと反応することで生じる過酸化水素とジアリアルイミダゾールロイコ色素の反応によって生成した青色色素を測定した。生化学自動分析装置 FUJI DRI-CHEM 7000 を用いて測定した。

14. 直腸体温測定

PBS または各粒子径のナノシリカをマウスへ尾静脈内投与した直後から 15 分毎に 75 分間、直腸体温をデジタルサーモメーターで測定した。

15. 肝臓におけるナノシリカの蓄積量評価

各粒子径のナノシリカをマウスへ尾静脈内投与した 2 時間後に、ソムノペンチル麻酔下で脱血死させ、肝臓を摘出した。摘出した肝臓は、すぐに液体窒素を用いて凍結保存した。その後、肝臓検体の全量を白金るつばに量り取り、電気コンロ上で予備灰化した後、500 °C の電気炉中で灰化した。放冷後、灰に炭酸ナトリウムを加えて融解した。残留物に水を加え、ホットプレート上で 30 分間加温した後、ろ紙を用いてろ過し、水で定容した

ものを試験溶液とした。試験溶液は、ICP-AES (Inductivity Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy) (735-ES) を用いてケイ素の定量を行った。

16. 肝臓の病理学的検査

PBS または各粒子径のナノシリカをマウスへ尾静脈内投与した 4 時間後に、ソムノペンチル麻酔下で脱血死させ、肝臓を摘出した。摘出した肝臓は、すぐに 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。その後、パラフィンブロックの作成、ヘマトキシリン-エオジン染色 (H.E. 染色)、所見の作成はアプライドメディカルリサーチ (Osaka, Japan) に依頼した。

17. 血小板の枯渇処置

ナノシリカを投与する 24 時間前に、マウスへ anti-thrombocyte serum を 50 μ L/mouse ずつ腹腔内投与し、血小板を枯渇させた。また、対照群として PBS および rabbit serum を同様に投与した。

18. 血漿中 PAF (platelet activating factor) 濃度およびヒスタミン濃度の測定

PBS またはナノシリカを投与した 20 分後に回収した血液に関して、前節の方法に準じて血漿を分離し、ELISA に供した。PAF 濃度の定量は Mouse PAF (Platelet Activating Factor) ELISA Kit を、ヒスタミン濃度の定量は Histamine ELISA を用い、添付のプロトコールに準じて行った。

19. PAF 受容体アンタゴニストの処置

ナノシリカを投与する 30 分前に、マウスへ PAF 受容体アンタゴニストである CV6209 を 50 μ g/mouse ずつ腹腔内投与した。また、対照群として PBS を同様に投与した。

20. マクロファージの枯渇処置

ナノシリカを投与する 24 時間前に、マウスへ

Clophosome-A を 150 μ L/mouse ずつ腹腔内投与し、マクロファージを枯渇させた。また、対照群として PBS および Plain Control liposomes for Clophosome-A を同様に投与した。

21. 好中球に対する中和抗体の前処置と nSP70 投与による生殖毒性の評価

好中球に対する特異的抗体である抗 Ly-6G 抗体の前処置として、LEAF Purified anti-mouse-Ly-6G antibody (clone; 1A8)、LEAF Purified Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl (clone; RTK2758) を 150 μ l ずつ (150 μ g/mouse)、妊娠 15 日目 (GD15) の BALB/c マウスの腹腔内に投与した。中和抗体の前処置から 24 時間後 (GD16) に、BALB/c マウスに生理食塩水 (saline) で 8 mg/mL に調整した nSP70 分散液を 100 μ l ずつ (0.8 mg/mouse) 尾静脈内投与した。nSP70 投与後 24 時間において (GD17)、ペントバルビタール麻酔下で脱血死させ、帝王切開により子宮、胎盤、胎仔をそれぞれ回収した。また、本投与条件における、出生生存胎仔数を評価する目的で、GD16 に nSP70 を母体に投与した後、仔が産まれるまで経過観察した。出産の有無は一日に一回確認し、出産が確認できた時点での仔の数を数えると共に、仔の体重と体長を測定した。

22. 胎盤組織の病理解析

nSP70 投与から 24 時間後、マウスをペントバルビタール麻酔下で脱血死させ、胎盤を摘出し、10%中性緩衝ホルムアルデヒド溶液による固定を実施した。その後、パラフィンブロック、および切片の作成は、アプライドメディカルリサーチに依頼した。また、胎盤の病理所見については、富山大学医学薬学研究部の齋藤 滋先生、中島彰俊先生ならびに大阪府立母子保健総合医療センターの柳原 格先生にご指導を賜った。

23. 金属ナノ粒子の感作性評価

それぞれのナノ粒子、あるいはイオン溶液 (0.8 mg metal/mL) を LPS (10 μ g/mL) と共に 20 μ l/footpad でマウスの足蹠に週一回、4 週間皮内投与した (感作投与)。最終投与の一週間後、それぞれの金属溶液 (0.8 mg metal/mL、Ag+のみ 0.09 mg/mL) 10 μ l を右の耳介に、溶媒のみ 10 μ l を左の耳介へ皮内投与した (惹起投与)。なお、各投与はペントバルビタールによる麻酔下で実施した。惹起投与直前の耳介の厚さと、惹起後、24、48、72、96 時間後の耳介の厚さは、ダイヤルシクネスゲージ (0.001-mm type) により測定した。

24. ICP-MS によるリンパ節中金属量の定量

9-10 週齢の BALB/c マウス (雌性) に、各ナノ粒子、あるいはイオン溶液 (0.8 mg metal/mouse) を右耳介へ皮内投与した。投与の 24 時間、48 時間、96 時間後に、それぞれマウスを解剖し、所属リンパ節 (右耳介リンパ節) を回収した。リンパ節に 1 mL の硝酸と 1 mL の過酸化水素水を加え、その後、マイクロウェーブ分解 (Milestone Ethos 1) によりサンプルを均一な溶液とした。これを純水にて 10 mL に希釈し、約 10% 程度の希硝酸溶液とした。マイクロウェーブ処理した溶液中の銀量は、ICP-MS (Agilent 7700x ICP-MS) により定量した。

(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. 成体と乳幼仔での腸管吸収性の違い

母親が日常的に摂取するものから、非意図的に曝露されるものまで、化学物質が母乳を介して乳幼児に悪影響を与える例が多く知られている。このように、授乳による乳幼児の化学物質の曝露が懸念される一方で、母乳育児の有用性が認められ、世界的に授乳機会が増加し続けている現状からも、化学物質の安全性を評価するうえで、母乳を介した乳幼児への影響評価が必要不可欠であると考えられる。以上の観点から、昨年度までに我々は、NM の授乳期曝露に着目し、乳幼児の安全性確保に向けて乳幼児の曝露実態情報を収集するため、NM の母乳移行性、および母乳を介した乳幼仔への移行性に関して検討した。その結果、ナノ銀粒子が母乳中へ移行し、その母乳を飲んだ乳幼仔の体内に吸収されることを明らかとしてきた。一般に、こどもは成体と比較して腸管バリアが緩く、化学物質が体内に侵入しやすいことが知られている。そこで、出生後 3 日（乳幼仔）もしくは 6 週齢（成体）のマウスに nAg10、Ag⁺ を、出生後 3 日の仔に分散性を維持して投与できる最大用量である 2.5 mg/kg で単回経口投与した。経時的に血中銀濃度を測定した結果、nAg10、

Ag⁺を投与した際ともに、最高濃度の時点で比較して、乳幼仔は成体マウスよりも 14 倍以上高い血中銀濃度を示した（Fig.1）。従って、乳幼仔は成体と比較して、銀ナノ粒子を体内に吸収しやすい可能性、銀ナノ粒子の血中からの排泄能が低い可能性が示された。

2. 非晶質ナノシリカを連日曝露した際の起炎症性評価

NM を曝露する際には、老若男女を問わず、多岐にわたる経路から曝露し続けていることが考えられる。そのため NM の安全性評価を推進するうえで、実際の曝露状況に則した「慢性曝露」に着目した検討が求められる。そこで本検討では、NM を細胞に連日曝露させ、細胞の起炎症性を経時的に評価した。本検討では、制汗剤などに使用され、吸引曝露における曝露頻度の高い、10、50、100 nm の非晶質ナノシリカ（それぞれ nSP10、nSP50、nSP100）をモデル粒子として用いた。まず初めに、非晶質ナノシリカの連日曝露が炎症応答性を示すのか評価を行った。nSP10、nSP50、nSP100 を A549 細胞に最長 72 時間にわたって曝露させ続け、培養上清中に含まれる IL-6、IL-8 産生量を評価した。その結果、IL-6 に関して、いずれの粒子径の非晶質ナノシリカの曝露においても、72 時間まで未処置群と比較して IL-6 の有意な変化は認められなかった。また、IL-8 に関しては、曝露 24 時間後、48 時間後において、いずれの非晶質ナノシリカの曝露によっても有意な変化は認められなかったものの、曝露 72 時間後においては、粒子径の最も小さい nSP10 曝露群において、未処置群と比較して、有意な IL-8 産生量の増加が認められた（Fig.2a）。本結果は、非晶質ナノシリカが 72 時間の曝露によりはじめて IL-8 産生が誘導されることが認められた。また、非晶質ナノシリカ曝露による IL-8 産生が持続するのか評価するため、nSP10、nSP50、nSP100 を A549 細胞に 48 時間まで曝露させた後に、新しい培地に交換し、さらに 24 時間培養

を行った。結果、nSP10 誘導性の IL-8 産生は、ナノ銀粒子の曝露とは反対に、曝露を休止することにより収束することが認められた (Fig.2b)。

3. 非晶質ナノシリカ粒子の連日長期曝露が A549 細胞におよぼす影響評価

これまでの結果より、NM の連日曝露により、急性期 (24 時間) における検討では、見過ごされていた生体影響を誘発する可能性があることが示された。従って、曝露期間が NM の生体影響に与える重要な因子であることを改めて示している。しかし、NM の長期曝露に関する報告は不足していると共に、曝露から一定時間経過後における生体影響を報告した例は殆どない。前述のように、我々は日常的に NM に曝露していることを鑑みると、NM の長期曝露による生体影響、また、それら生体影響の可逆性・不可逆性を評価することが長期曝露影響を理解するうえで重要である。また、長期曝露により変動し、曝露から時間を経た後にも変動が持続する不可逆性の因子が特定されれば、所謂、慢性影響と関連の深い因子である可能性があり、重要なリスク解析項目になり得ると考えられる。そこで本検討では、製造されている NM の中でも人体に直接触れる製品において使用量が多い素材であり、ヒトへの曝露機会が多い NM である非晶質ナノシリカの吸引曝露経路による長期曝露を想定して、肺胞上皮細胞への長期曝露による生体影響の評価、および、曝露から時間を経た際における生体影響の可逆性・不可逆性を評価した。

長期影響評価に際し、前述の連日曝露において、最も IL-8 誘導能が高く、細胞への影響が顕著であると予想された粒子径が 10 nm の非晶質ナノシリカ (nSP10) を使用した。本検討では、細胞障害性の認められない最高濃度である 125 μ g/mL に曝露濃度を設定し、以降の検討を進めた。本検討では、肺胞上皮細胞のターンオーバーが最も短い 30 日であると仮定して、吸引経路を介して曝露を受けた肺胞上皮細胞が寿命を全うし、新

た細胞に代謝されるまでの期間である 30 日間、常に nSP10 を曝露され続けた際のハザード同定を行った。

まず、nSP10 の長期曝露において、3 日おきに継代を行いながら、①nSP10 を 30 日間曝露させ続ける (曝露群)、②nSP10 を 15 日間曝露後、15 日間の休止期間を設ける (曝露休止群)、③ nSP10 を含まない条件で 30 日間培養を続ける (未処置群)、以上 3 つの群に分け、検討を行った (Fig.3a)。曝露時の細胞障害性、および増殖能を評価するため、トリパンプルー法により 3 日おきに細胞数を計数した。その結果、曝露群と曝露休止群ともに、未処置群と比較して有意な細胞数の変化は認められなかった (Fig.3b)。従って、nSP10 の長期曝露は、本検討における濃度帯と曝露期間において、細胞障害性と増殖能に影響を与えないことが認められた。

4. nSP10 の 30 日間曝露による遺伝子発現変動の網羅解析

一方で、長期曝露時においては、急性曝露時の検討では認められない、未知の影響を生じ得る可能性も考えられたことから、次に、nSP10 の長期曝露時における遺伝子発現の変化に関して網羅的に解析することにより、細胞影響のスクリーニング的な解析を行った。曝露 30 日後における曝露群、曝露休止群、未処置群の細胞から Total RNA を回収し、遺伝子の発現変動について、マイクロアレイを用いて網羅的な解析を行った。解析の結果、nSP10 曝露群においては、未処置群と比較して、2 倍以上に発現が上昇していた遺伝子が 480 個、2 倍以下に発現が減少していた遺伝子が 303 個の、計 783 個の遺伝子に発現変動が認められた。同様に、曝露休止群においては、未処置群と比較して、2 倍以上に発現が上昇していた遺伝子が 344 個、2 倍以下に発現が減少していた遺伝子が 365 個の、計 709 個の遺伝子に発現変動が認められた (Fig.4a)。この時、変動が認められた遺伝子のうち、曝露群と曝露休止群に共通して発現

が上昇している遺伝子が 112 個、共通して発現が減少している遺伝子が 123 個同定された (Fig.4b,c)。これら曝露群と曝露休止群の共通項となる計 235 個の遺伝子は、nSP10 の長期間曝露により発現変動し、曝露を終えた後 15 日間経過しても引き続き変動が生じ続ける不可逆的な変動を示す遺伝子を表しており、慢性影響に関わる重要因子である可能性を有している。他にも、曝露群にのみ発現上昇している 368 個、発現減少している 180 個の遺伝子は、曝露を休止した際に変動が認められないことから、可逆的な変動を示す遺伝子である。また、曝露休止群にのみ発現上昇している 232 個、発現減少している 242 個の遺伝子は、曝露期間中ではなく曝露を休止した後に変動が認められることから、曝露により生じた生体影響を正常に戻そうとする、生体の恒常性維持機構に関連する可能性を有していると考えられる。

5. 遺伝子発現変動のネットワーク解析

これらの各因子に関して、Gene-set enrichment analysis を実施し、変動した遺伝子群がどのような遺伝子セットに多く含まれているかを評価した。本検討では特に、慢性影響に関連が深いと考えられる曝露群、曝露休止群共に発現変動した計 235 個の遺伝子の発現変動に着目し、以降、遺伝子の詳細なネットワーク解析を行った。その結果、235 個の遺伝子群に関連の深い 5 つの経路と、それらを構成する因子として合計 70 個の遺伝子を分類することができた。5 つの経路はそれぞれ、臓器形態変化、細胞発達、細胞移動、細胞間シグナル伝達、循環器系疾患に関連していた (Table 1)。5 つの経路の内、発現変動した遺伝子の数が最も多く、連関が最も深いと考えられた、臓器形態変化やリンパ組織の構造発達、血管系の構造発達に関連する経路に関して詳細な解析を進めた。本経路の内、変動した遺伝子は 23 個存在しており、23 個の内、特に A549 細胞において発現の確認されている遺伝子を抽出し

た結果、15 個の遺伝子が同定された (Table 2)。

6. RT-PCR による遺伝子発現変動と Western blot によるタンパク発現変動の評価

次に、これら 15 個の遺伝子に関して、マイクロアレイの結果を確認するため、RT-PCR 法を用いて遺伝子の発現変動を半定量的に解析した (Fig.5)。その結果、曝露群と曝露休止群共に、未処置群と比較して、発現変動の認められた不可逆性の遺伝子として、Transforming growth factor alpha (TGFA)、Deiodinase, iodothyronine, type II (DIO2)、CD163 の 3 遺伝子が同定された。また、上記 3 遺伝子のほかに、曝露群で顕著に発現上昇するが曝露休止群において発現変動が認められない可逆性の遺伝子として、Interleukin 21 receptor (IL21R)、Keratin, type I cytoskeletal 13 (KRT13)、RAR-related orphan receptor C (RORC) が同定された。これら遺伝子群の発現が変動すると共に、ネットワーク解析においては、臓器形態変化やリンパ組織の構造発達、血管系の構造発達に関連する因子として Extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38、Akt、Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) が見出された。そこで、これら分子の発現変動を Western blot により、タンパクレベルで評価することで、経路のより詳細な解析を行った。ERK、p38、Akt はリン酸化により、活性化することが知られていることから、リン酸化状態を Western blot により評価した。その結果、ERK においては曝露群と曝露休止群共に、未処置群と比較してリン酸化のバンドが強く検出された (Fig.6a)。一方で、p38 においては曝露群と曝露休止群共に、リン酸化のバンドに変動は認められなかった (Fig.6b)。また、Akt においては、曝露群においてリン酸化のバンドが強く検出された一方で、曝露休止群においてはリン酸化のバンドに変動が認められなかった (Fig.6c)。また、核内転写因子の一つである Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) は核内移行を制御する Inhibitor of

transcription factor NF- κ B (I κ B) と複合体を形成しており、上流からのシグナル伝達により I κ B がリン酸化され、ユビキチンプロテアソーム系により分解されることで活性化する。そこで、I κ B の分解を評価することで NF- κ B の活性化を間接的に評価した。その結果、I κ B は曝露群と曝露休止群共に、未処置群と比較してバンドが消失（分解された）することが認められた (Fig.6d)。つまり、曝露群と曝露休止群共に NF- κ B が活性化していることが認められた。以上の結果を考え合わせると、本検討で同定された経路においてタンパクレベルでは、ERK、Akt、NF- κ B は nSP10 の長期曝露に関連して活性化される一方、p38 は関連しない可能性が示された。

7. 非晶質ナノシリカによる肝障害の誘導に対する血小板の関与

これまでに我々は、非晶質ナノシリカの急性毒性に粒子径の減少に依存して増強される毒性（急性致死毒性、肝障害、凝固障害）と、粒子径特異的に発現する毒性（体温低下）が存在することを明らかとし、少なくとも「急性致死毒性・肝障害・凝固障害」と「体温低下」はそれぞれ異なるメカニズムで誘導されている可能性が高いことを見出してきた。そこで本検討では、肝障害と体温低下に着目し、誘導メカニズムの解明に向けた検討を行った。

まず、ナノシリカの過剰量投与によって誘導される肝障害に着目した。肝障害と同様に粒子径依存的な減少が認められた血小板は、当研究室の過去の検討において明らかとなったナノシリカによる、消費性凝固障害と関連することから、ナノシリカによる肝障害の誘導メカニズム解明に向け、肝障害の誘導に対する血小板の関与を精査した。マウスへ事前に抗血小板血清を処置しておいた 24 時間後に、体温低下を誘導せず、本研究に供したナノシリカのうち、肝障害を最も強く誘導し得る nSP10 と、体温低下を最も強く誘導し、かつ肝障害も十分に誘導可能である nSP50 を尾

静脈内投与した。その後、前述の結果と同様に、ナノシリカ投与 4 時間後において血液を回収し、肝障害マーカーの測定を行った (Fig.7)。なお、抗血小板血清を前処置したマウスの血液を回収して血球検査を行うことにより、血小板数が定量下限以下の数値となっていることを確認済みである。その結果、nSP10 投与群においては、抗血小板血清の投与により、ALT および AST 活性の値が有意に減少する傾向が観察された。一方で、nSP50 投与群に関してはその傾向が観察されず、抗血小板血清の投与によって ALT および AST に変動は観察されなかった。従って、nSP10 による肝障害の誘導については、血小板を介する経路が関与している可能性が考えられた。一方で、nSP50 による肝障害に関しては、抗血小板血清処置によって軽減されなかったことから、血小板を介する誘導メカニズム以外にも、例えば直接的な細胞傷害や、上述した ROS 産生を介した DNA 傷害などといった、血小板を介さない肝障害の誘導メカニズムが存在し、その寄与が粒子径によって異なる可能性が考えられる。従って、本結果を踏まえると、より詳細な検討は必要あるものの、少なくとも一部の粒子径の粒子に関しては、血小板を介したナノシリカの生体影響を防ぐことで、同時に肝障害を回避することができると考えられる。

8. 非晶質ナノシリカによる体温低下の誘導に対するケミカルメディエーターの関与

次に、ナノシリカの過剰量投与によって誘導される、体温低下を伴う一過性のショックのメカニズム解明を試みた。一過性の体温低下を特徴とするのが、I 型アレルギー反応の一つであるアナフィラキシーショックである。アナフィラキシーショックが起こると、ヒスタミンや血小板活性化因子 (PAF) といったケミカルメディエーターの作用によって毛細血管拡張が引き起こされ、一過性の体温低下が誘導されることから、体温低下の誘導に対するケミカルメディエーターの関与を評

価した。PBS または nSP50 の投与 20 分後に血漿を回収し、ELISA によってヒスタミンおよび PAF の定量を行った (Fig.8)。その結果、PBS 投与群と比較して、nSP50 投与群において血漿中のヒスタミン濃度には増加が観察されなかった。その一方で、血漿中の PAF 濃度に関しては、nSP50 投与群において、PBS 投与群と比較して有意な増加が確認された。

そこで次に、PAF 受容体アンタゴニストを用いることで、ナノシリカ投与後の血中において産生されていた PAF の体温低下への関与を評価した。事前に PAF 受容体アンタゴニストである CV6209 をマウスへ処置しておき、その 30 分後に nSP10 および nSP50 を投与した後、前節と同様に 75 分間の体温測定を行った (Fig.9)。なお、CV6209 の前処置によって、PAF を投与した際に誘導される体温低下が抑制されることは、事前に確認している。その結果、コントロールとして事前に PBS を処置しておいた群では、前節の検討と同様に体温低下が誘導されている一方で、CV6209 を事前に処置しておいた群においては、体温低下の誘導が有意に抑制された。よって、非晶質ナノシリカ投与後に血中で定量された PAF が、実際に体温低下の誘導に関与していることが示唆された。

そこで、PAF の産生に関わる細胞の同定を試みた。先ほどの検討結果より、本検討で観察されたアナフィラキシー様のショック症状は、ヒスタミン非依存性であることから、ヒスタミンに依存しない IgE 非依存性アナフィラキシーと同様の機構で体温低下が誘導されている可能性が考えられた。そこで、IgE 非依存性アナフィラキシーショック時に PAF を産生する細胞として知られ、微粒子による炎症応答の誘導に関与していることも多く報告されているマクロファージに着目した。事前に Clophosome-A (クロドロン酸内包リポソーム) を処置してマクロファージを枯渇させておき、24 時間後に nSP10 および nSP50 を投与して、先ほどの検討と同様に体温測定を行った (Fig.

10a, 10b)。なお、Clophosome-A 投与 24 時間後におけるフローサイトメトリー解析により、脾臓中マクロファージが 90%程度減少していることを確認している。その結果、PBS および Control liposome を投与しておいた群では、体温低下が観察された一方で、Clophosome-A を投与した群においては、体温低下の誘導が有意に抑制された。つまり、マクロファージが枯渇している条件下で体温低下の誘導が抑制されたことから、ナノシリカによる体温低下の誘導に、マクロファージが関与している可能性が考えられた。そこで、各群に関して、ナノシリカ投与 20 分後において回収した血漿に関し、PAF 濃度の定量を行った。その結果、体温低下と同様、Clophosome-A を投与しておいた群において PAF 濃度が低下する傾向が観察された (Fig.10c)。従って、ナノシリカ投与後の PAF 産生にマクロファージが関与している可能性が考えられた。一方で、本検討においては、Clophosome-A を投与しておくことで、体温低下が大幅に改善したにもかかわらず、PAF 濃度に関しては、部分的な減少に留まる結果となった。一般に、PAF は血小板凝集や炎症などに対して重要な働きを有する分子であり、血小板や好中球、好塩基球をはじめ、マクロファージ以外にも様々な細胞種によって産生されることが知られている。従って、本検討の結果を踏まえると、マクロファージ以外の PAF 産生細胞の関与にも焦点を当てて解析を行う必要があることが考えられる。

9. 非晶質ナノシリカ投与による好中球増加と生殖毒性との連関解析

nSP70 投与による生殖毒性と好中球画分の増加との連関を解析する目的で、抗 Ly-6G 抗体を前処置して好中球を depletion したうえで、nSP70 を投与し、母体体重の推移、胎盤・胎仔重量について評価した。まず、母体体重を経日的に測定したところ、これまでの筆者らの検討結果と同様に、nSP70 を投与することで、対照群と比較し、母体体重が有意に減少することが示された。一方で、

好中球を depletion したうえで nSP70 を投与した群では、母体体重の低下が亢進することが示された (Fig.11A)。即ち、nSP70 投与による生殖毒性の発現好中球の増加、あるいは活性化が重要な役割を果たしており、好中球の depletion が nSP70 投与による生殖毒性を悪化させることが示唆された。

そこで次に、母体体重の低下が亢進する結果について精査する目的で、摘出した子宮の重量を測定した。その結果、母体体重の結果と同様に、nSP70 を投与することで、nSP70 未処置群と比較し、子宮重量が有意に減少することが確認された。この時、nSP70 単独投与群では、死亡胎児が認められることを確認している。また、母体体重の結果と同様に、抗 Ly-6G 抗体を前処置し、好中球を depletion することで、nSP70 投与による子宮重量の低下が亢進することが示された (Fig.11B)。そこで、摘出した子宮を観察したところ、nSP70 単独投与群と比較し、好中球非存在下での nSP70 投与群では、子宮中に含まれる胎児数が減少している傾向が認められた (Fig.11C)。このことから、好中球を depletion することで、nSP70 投与による生殖毒性が悪化することが示された。

また、子宮から胎児・胎盤を摘出し、子宮中に含まれている胎児数を計測したところ、子宮所見と同様に、好中球を depletion したうえで nSP70 を投与した群において、nSP70 単独投与群と比較し、胎児数が有意に減少することが示された (Fig.12A)。この時、好中球存在下での nSP70 投与群と好中球非存在下での nSP70 投与群の胎児、胎盤を観察したところ、肉眼的所見では顕著な差は認められず (Fig.12B)、胎盤重量 (Fig.12C)、胎児重量 (Fig.12D) を測定した結果にも有意な変動は認められなかった。さらに、nSP70 投与後、胎児を出産させ、好中球の存在下、非存在下での生存新生仔数を比較解析した。その結果、帝王切開での検討結果 (Fig.12A) と同様に、好中球非存在下で nSP70 を投与した群において、出産胎

仔数の減少傾向が認められた (Fig.13A)。この時、産まれてきた仔の体重 (Fig.13B)、および体長 (Fig.13C) に各群間で有意な差は認められなかった。以上の結果から、nSP70 投与による母体への影響、特に、妊娠維持の破綻に対し、好中球が抑制的に働く可能性が示された。

10. 好中球が妊娠維持における胎盤機能におよぼす影響の解析

一般に、胎盤は胎児への栄養・酸素供給、老廃物の排泄などの機能を担う重要な器官であり、胎盤構造の崩壊やその機能不全は、胎児死亡や胎児発育不全につながる事が知られている。これまでに筆者らは、nSP70 が胎盤の栄養膜層への傷害により胎盤構造の崩壊を誘導することを見出してきた。そこで、以降の検討では、好中球が妊娠維持における胎盤機能にどのように関与しているかについて解析を進めた。HE 染色による病理組織学的解析を実施し、胎盤構造への影響を評価した。これまでの検討結果と同様に、nSP70 投与群において、胎盤全体の赤みが少なく、血流量が乏しくなっていることが確認できた (Fig.14A)。また、栄養膜層における実線で囲った範囲を拡大写真で観察してみたところ、抗 Ly-6G 抗体を前処置した nSP70 投与群の胎盤において、nSP70 投与による傷害が増大していることが明らかとなった (Fig.14B)。さらに、破線で囲った範囲で認められるように、好中球非存在下で nSP70 を投与した群において、顕著な辺縁部のうっ血が確認され、好中球存在下で nSP70 を投与した群、および、Isotype を前処置した nSP70 投与群と比較し、その程度が亢進することが示された (Fig.14C)。以上の結果から、好中球を depletion することが、nSP70 投与による胎盤傷害の亢進につながり、胎児数の減少を誘導したことが示唆された。

11. 金属ナノ粒子によるアレルギー誘導の普遍性

金属アレルギーは、体内に侵入した金属イオンに対する獲得免疫応答によって発症する病態であり、銀は金属アレルギーの原因となる金属であることが知られている。金属アレルギーの誘導機序としては、接触した金属からイオンが溶けだし、このイオンが自己のタンパクに結合することで獲得免疫応答の対象として認識される。一方で、金属イオンを単に投与するのみでは、金属アレルギーの動物モデルを作成することが困難であることが知られるなど、金属に対する感作成立の機序は、ほとんど明らかになっていない。近年、金属から、イオンのみならず、ナノ粒子が放出されることや、体内の金属イオンから、ナノ粒子が形成される可能性が報告された。ナノ粒子の体内・細胞内動態が、イオンを含めた低分子とは大きく異なることや、ナノ粒子からイオンが徐放される機序を考え合わせると、金属アレルギーの発症が、ナノ粒子を介在として誘導される可能性が想起された。そこで、これまでに我々は、高い分散性を有するナノ銀粒子をモデル金属ナノ粒子として用い、金属アレルギー発症に金属ナノ粒子が与える影響を評価した。BALB/c マウスの足蹠に nAg10 あるいは Ag^+ を週一回、四週間投与した。最終投与の一週間後に、耳介部に再度 nAg、あるいは Ag^+ を投与し、耳介部の腫脹を経時的に測定した。この結果、事前に nAg10 を投与したマウスでは、nAg10 による耳介部の腫脹が増強することが示された。一方で、nAg10 に対する耳介部の腫脹の増強は、 Ag^+ を事前に投与していたマウスでは観察されなかった。また、nAg10 事前投与マウスにおいて、 Ag^+ を再度投与した場合にも、 Ag^+ に対する耳介部の腫脹に変動は観察されなかった。以上の結果により、金属アレルギーの感作成立、および、病態発症において、金属ナノ粒子が重要な役割を果たしている可能性を見出してきた。

そこで、金属ナノ粒子が金属の感作成立に関わる普遍性を評価するため、金属アレルギー最大の要因であるニッケルを用いた検討を実施した。本

検討では、一次粒子径が 3 nm のニッケル粒子である nNi3 と、イオンの対照群として塩化ニッケル溶液 (II) (Ni^{2+}) を用いた。銀における検討と同様に、nNi3 を前投与しておいたマウスにおいて、nNi3 あるいは Ni^{2+} による耳介の腫れ、病理標本における炎症細胞の浸潤などを指標として、感作成立を評価した。その結果、溶媒前投与群と Ni^{2+} 前投与群では、nNi3、 Ni^{2+} のいずれに対する耳介の腫れにも差は検出されなかった (Fig. 15a)。一方で、nNi3 前投与マウスにおいて、nNi3 および Ni^{2+} による耳介の腫れが、溶媒前投与マウスと比べて有意に増幅し、感作が成立していることが示された。また病理所見の結果も同様に、nNi3 の前投与により、nNi3、 Ni^{2+} いずれに対する炎症応答も増幅していることが示された (Fig. 15b)。以上より、銀と同様にニッケルにおいても、イオンではなく、ナノ粒子を曝露することで、ニッケルに対する感作が成立することが示された。ここで、金属アレルギー患者において、特定の金属に対するアレルギーを有している場合であっても、パッチテスト上、しばしば複数の金属へ陽性反応が現れることが知られている。即ち、金属アレルギーでは、感作金属以外に対する交差反応性が観察されることがある。そこで、本モデルにおける金属間の交差性を、nAg10 感作における nNi に対する起炎性、並びに nNi 感作マウスにおける nAg10 の起炎性を指標として評価した。その結果、nAg10 感作マウスでは、nNi に対する起炎性は増強されず、nNi マウスにおける nAg10 に対する起炎性も同様であった (Fig. 16)。従って、本モデルでは、ニッケルと銀の間には交差性がないことが示された。

12. 金属ナノ粒子による金属アレルギー発症機序解明に向けた情報収集

ナノ粒子への曝露により、イオンに対する免疫応答が効率的に誘導されることが明らかとなった。その機序として、ナノ粒子がイオンのキャリアとして働いている可能性が考えられた。即ち、

①接触性皮膚炎などで感作が成立する場合は皮膚の所属リンパ節であること、②一般にナノ粒子は、免疫誘導に必須のリンパ節への移行性・滞留性、あるいは樹状細胞などによる取り込みといった面で、低分子よりも優れることが知られていることを考慮すると、イオン単体よりも、ナノ粒子の状態の方が、免疫誘導に必要な場へ効率的にイオンを届けられる可能性が考えられる。以上の可能性を検証するため、まず、その前提となるイオン共存の必要性を、最も安定な金属である 10 nm の金ナノ粒子 (nAu10) と、非金属のナノ粒子である 10 nm の非晶質ナノシリカ (nSP10) を用いて評価した。nAu10、nSP10 の感作性を、銀やニッケルと同様の実験系にて評価した。その結果、nAu10 あるいは nSP10 の前投与により、それぞれに対する耳介の腫れは増強されなかった (Fig.17)。従って、本実験系において、nAu10、nSP10 の感作性はない、あるいは非常に弱いことが示された。従って、銀やニッケルナノ粒子における感作性は、イオンを放出する性質によって担われていることが示唆された。

13. ICP-MS によるリンパ節中金属量の定量

次に、銀ナノ粒子の所属リンパ節への移行性並びに滞留性と、感作成立の関連を評価した。各粒子径の銀ナノ粒子あるいは Ag^+ 投与後の所属リンパ節における局在を、ICP-MS を用いて定量的に評価した。この結果、銀ナノ粒子は、 Ag^+ と比較して顕著にリンパ節移行性、あるいは滞留性が優れることが示された (Fig.18)。nAg10 がイオンに対して強い免疫応答を誘導する事実を考慮すると、 Ag^+ と比べて nAg10 の感作性が高い理由の一つとして、以下のような可能性が考えられる。即ち、①感作成立の場への移行・滞留性の面で優れる nAg10 は、リンパ節へ効率的に局在し、②その場でイオンを放出することで、樹状細胞へ効率的にイオンを引き渡し、③その結果として、樹状細胞による効率のよいイオンの抗原提示が可能となるため、それを認識する金属特異的 T 細

胞が強く誘導される (活性化、増殖し、金属特異的な炎症応答を誘導できるようになる)、という機序の可能性である。今後は、リンパ節でのイオン放出の可能性をより詳細に追及すると共に、ナノ粒子である点が、樹状細胞内への取り込みなどの点においても利点を有する可能性を追求することで、ナノ粒子が高い感作性を発揮する機序を明らかにできると考えられる。

E. 結論

我が国のナノ産業は世界トップレベルの開発・実用化技術を誇っており、21 世紀の日本産業/経済の発展を牽引するものと期待されている。一方で、科学的根拠に乏しいまま、NM・sNM の有害性情報が独り歩きし、これを根拠に欧米各国が OECD などに働きかけ、その開発と実用化の規制をスタートさせようとしているが、これは闇雲に社会的・産業的不安をあおることにもつながり、最終的には NM・sNM の社会拒絶を引き起こしてしまいかねない。本研究は、安全な NM・sNM の開発支援を通じて、国民が安心して恩恵を最大限に享受でき、一方で、我が国のナノ産業を育成・発展させるなど、NM・sNM の社会受容の促進にも貢献するものである。また本研究の成果は、NM・sNM のリスク管理やレギュレーションの策定といった厚生労働的視点、さらに、OECD 対応などによる国際貢献の点で、責任のある先進国・知財技術立国・健康立国としての我が国の発展に資するものである。将来的には、「子供の健康と環境に関する疫学調査」、所謂、エコチル調査と連携・補完し、我が国の厚生労働行政の推進に資することも期待される。さらに、学会のシンポジウム、公開講座や班会議などを通じて、研究者、ナノ産業界、一般国民とのリスクコミュニケーションを多数図っており、国民が納得・安心して NM・sNM の恩恵を最大限に享受でき、我が国のナノ産業の育成・発展に直結するのみならず、労働・生活衛生の向上と国民の健康確保など、NM・sNM の社会受容 (Sustainable Nanotechnology)

の促進といった国際貢献も期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

1. Yoshida T., Yoshioka Y., Morishita Y., Aoyama M., Tochigi S., Hirai T., Tanaka K., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Protein corona changes mediated by surface modification of amorphous silica nanoparticles suppress acute toxicity and activation of intrinsic coagulation cascade in mice., *Nanotechnology.*, 26(24):245101, 2015.
2. Hirai T., Yoshioka Y., Takahashi H., Ichihashi K., Uda A., Mori T., Nishijima N., Yoshida T., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Takagi T., Ishii K., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Cutaneous exposure to agglomerates of silica nanoparticles and allergen results in IgE-biased immune response and increased sensitivity to anaphylaxis in mice., *Part. Fibre. Toxicol.*, 12(1):16, 2015.
3. Wakimoto T., Uchida K., Mimura K., Kanagawa T., Mehandjiev TR., Aoshima H., Kokubo K., Mitsuda N., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Kimura T., Yanagihara I. : Hydroxylated Fullerene: a potential anti-inflammatory and anti-oxidant agent for preventing mouse preterm birth., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 213(5):708, 2015.

【総説・その他】

1. Hirai T., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Potential hazards of skin exposure to nanoparticles., *Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances.*, Springer., 123-35, 2015.
2. Morishita Y., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Reproductive and developmental effects of nanomaterials., *Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances.*, Springer., 77-101, 2015.
3. 堤 康央:ナノマテリアルの安全性評価(2)., *MEDCHEM NEWS.*, 25(2), 109-10, 2015.
4. Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Applications and safety of nanomaterials used in the food industry., *Food Safety.*, 3(2), 39-47, 2015.
5. 堤 康央:ナノマテリアルの安全性評価(最終回)., *MEDCHEM NEWS.*, 25(3), 158-59, 2015.
6. 堤 康央:「安全と安心」を強みにした、付加価値の高い香粧品への期待., *日本香粧品学 40 周年記念誌 (寄稿)*., 39, 76-8, 2015.
7. Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Biocompatibility of nanomaterials., *Nanomaterials in Pharmacology.*, Springer., 185-99, 2015.
8. 東阪和馬:ナノ医薬の安全性確保に向けたナノ安全科学研究の推進. *Drug Delivery System.* 31(2): 168-9, 2016.

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 6 件】

1. 吉岡靖雄、東阪和馬、堤 康央：金属系ナノ粒子の免疫毒性評価～ナノ安全科学研究による Sustainable Nanotechnology を目指して～., 第 26 回日本微量元素学会学術集会., 札幌 (北海道), 2015 年 7 月.

2. Higashisaka K. : Promotion of sustainable nanotechnology by fusion between nano-safety science and nano-safety design., The ceremony presentation at College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University., Hangzhou (China), 12 October, 2015.
3. 堤 康央 : ナノマテリアルの安全性研究の現状と今後., 大阪府立公衆衛生研究所創立記念講演会., 大阪 (大阪) ., 2015 年 11 月.
4. Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Elucidation of immunotoxicity of nanoparticles for developing the sustainable nanotechnology., The international chemical congress of pacific basin societies., Hawaii (USA), 15-20 December, 2015.
5. 堤 康央、広瀬明彦 : Conclusion., 日本薬学会第 136 年会., 横浜 (神奈川) , 2016 年 3 月. (シンポジウム : ナノマテリアルの社会受容に向けた安全性評価の最新動向)
6. 東阪和馬 : ナノ安全科学研究とナノ最適デザイン研究の融合による sustainable nanotechnology の推進., 日本薬学会第 136 年会., 横浜 (神奈川) , 2016 年 3 月. (シンポジウム : ナノマテリアルの社会受容に向けた安全性評価の最新動向)
3. 西川雄樹, 東阪和馬, 真木彩花, 吉岡靖雄, 堤 康央 : ナノマテリアルの慢性影響の解明に向けた基礎的検討—ナノ銀粒子の連日曝露による炎症誘発性の評価—., 第 42 回日本毒性学会学術年会., 金沢 (石川) , 2015 年 6 月.
4. 半田貴之, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 西島伸郎, 和泉夏実, 東阪和馬, 堤 康央 : 血小板に着目した、非晶質ナノシリカ誘導性の急性毒性メカニズム解析., 第 42 回日本毒性学会学術年会., 金沢 (石川) , 2015 年 6 月.
5. 和泉夏実, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 西島伸郎, 半田貴之, 東阪和馬, 堤 康央 : 金属ナノ粒子投与による金属アレルギー様症状の発症に関わる細胞種の同定., 第 42 回日本毒性学会学術年会., 金沢 (石川) , 2015 年 6 月.
6. 清水雄貴, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 瀧村優也, 難波佑貴, 柳原 格, 東阪和馬, 堤 康央 : ナノマテリアルが血液胎盤関門の透過性へ与える影響評価., 第 42 回日本毒性学会学術年会., 金沢 (石川) , 2015 年 6 月.
7. 真木彩花, 東阪和馬, 西川雄樹, 吉岡靖雄, 堤 康央 : ナノ粒子による DNA メチル化への影響に関する基礎的検討., 第 42 回日本毒性学会学術年会., 金沢 (石川) , 2015 年 6 月.
8. 磯田勝広, 大坊萌美, 油科香里, 平裕一郎, 平 郁子, 吉岡靖雄, 堤 康央, 石田 功 : ナノ白金粒子の単回投与毒性と薬物相互作用の検討., 第 42 回日本毒性学会学術年会., 金沢 (石川) , 2015 年 6 月.
9. 東阪和馬, 山口真奈美, 平井敏郎, 樋口ゆり子, 山下富義, 橋田 充, 吉岡靖雄, 堤 康央 : 安全なナノ医薬の開発に向けたナノマテリアルの体内動態解析., 第 31 回 DDS 学会学術集会., 東京 (東京) , 2015 年 7 月.
10. 青山道彦, 吉岡靖雄, 新井由之, 石本里緒, 永井健治, 東阪和馬, 堤 康央 : ナノマテリアルの細胞内挙動におけるエンドソームの

【国内学会発表 : 合計 27 件】

1. 吉岡靖雄, 東阪和馬, 堤 康央 : Sustainable Nanotechnology を目指したナノ安全科学研究., 第 42 回日本毒性学会学術年会., 金沢 (石川) , 2015 年 6 月.
2. 難波佑貴, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 瀧村優也, 清水雄貴, 吾郷由希夫, 田熊一敬, 松田敏夫, 東阪和馬, 堤 康央 : ナノマテリアルの雄親曝露による次世代影響評価., 第 42 回日本毒性学会学術年会., 金沢 (石川) , 2015 年 6 月.

- 重要性., 第 31 回 DDS 学会学術集会., 東京 (東京), 2015 年 7 月.
11. 石本里緒, 吉岡靖雄, 青山道彦, 齋藤 滋, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの動態とオートファジーの関わりに着目した基礎情報の収集., 第 31 回 DDS 学会学術集会., 東京 (東京), 2015 年 7 月.
 12. 青山道彦, 吉岡靖雄, 新井由之, 石本里緒, 長野一也, 永井健治, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの動態解明に向けた細胞内運動の定量的解析., 第 14 回次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム., 千葉 (千葉), 2015 年 9 月.
 13. 石本里緒, 吉岡靖雄, 青山道彦, 齋藤 滋, 長野一也, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの細胞内移行とオートファジーの関わり., 第 65 回日本薬学会近畿支部., 富田林 (大阪), 2015 年 10 月.
 14. 難波佑貴, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 清水雄貴, 吾郷由希夫, 田熊一敬, 松田敏夫, 長野一也, 東阪和馬, 堤 康央: 雄親曝露に着目したナノマテリアルの次世代影響評価., 第 65 回日本薬学会近畿支部., 富田林 (大阪), 2015 年 10 月.
 15. 西川雄樹, 東阪和馬, 真木彩花, 長野一也, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノマテリアルの慢性影響の解明に向けた基礎的検討—ナノ銀粒子の連日曝露による炎症応答性の評価—., 第 65 回日本薬学会近畿支部., 富田林 (大阪), 2015 年 10 月.
 16. 半田貴之, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 和泉夏実, 長野一也, 東阪和馬, 堤 康央: 非晶質ナノシリカ誘導性の急性毒性メカニズム解明に向けた検討., 第 65 回日本薬学会近畿支部., 富田林 (大阪), 2015 年 10 月.
 17. 和泉夏実, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 半田貴之, 長野一也, 東阪和馬, 堤 康央: 金属ナノマテリアルにより誘導される免疫応答に関わる細胞種の同定., 第 65 回日本薬学会近畿支部., 富田林 (大阪), 2015 年 10 月.
 18. 清水雄貴, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 難波佑貴, 柳原 格, 長野一也, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルが胎盤関門の透過性に与える影響評価., 第 65 回日本薬学会近畿支部., 富田林 (大阪), 2015 年 10 月.
 19. 真木彩花, 東阪和馬, 西川雄樹, 長野一也, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノ銀粒子曝露による DNA メチル化への影響., 第 65 回日本薬学会近畿支部., 富田林 (大阪), 2015 年 10 月.
 20. 青山道彦, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 石本里緒, 平井はるな, 新井由之, 永井健治, 堤 康央: ナノマテリアルの細胞内運動とエンドソームによる輸送の連関解析., 日本薬学会第 136 年会., 横浜 (神奈川), 2016 年 3 月.
 21. 和泉夏実, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 青山道彦, 平井敏郎, 半田貴之, 衛藤舜一, 堤 康央: ナノ銀粒子により誘導される金属アレルギー様症状の発症に粒子径が与える影響評価., 日本薬学会第 136 年会., 横浜 (神奈川), 2016 年 3 月.
 22. 清水雄貴, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 青山道彦, 難波佑貴, 泉 雅大, 柳原 格, 堤 康央: ナノマテリアルの胎盤関門透過性へ与える影響の評価., 日本薬学会第 136 年会., 横浜 (神奈川), 2016 年 3 月.
 23. 真木彩花, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 青山道彦, 西川雄樹, 石坂拓也, 笠原淳平, 堤 康央: ナノ銀粒子曝露による DNA メチル化酵素の mRNA 発現に与える影響., 日本薬学会第 136 年会., 横浜 (神奈川), 2016 年 3 月.
 24. 石坂拓也, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 青山道彦, 西川雄樹, 真木彩花, 原田和生, 堤 康央: 単一粒子 ICP-MS 法による金属ナノ粒子分析に向けた評価系の構築., 日本薬学会第 136 年会., 横浜 (神奈川), 2016 年 3 月.
 25. 泉 雅大, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 青山道彦, 難波佑貴, 清水雄貴, 堤 康央: ナノマテリアル曝露による雄の生殖組織への移行性評