

201524005B

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 25 年度～27 年度

総合研究報告書

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 25 年度～27 年度
総括研究報告書

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-----	117
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-----	135
大学院薬学研究科 薬物治療学分野	研究分担者 松田敏夫
大阪大学大学院 薬理学教室	研究分担者 田熊一敞
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-----	149
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-----	153
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-----	165
(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-----	193
III. 研究成果の刊行物・別刷-----	199

**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 25~27 年度における研究成果において、①OECD テストガイドラインに関して、ナノ金・ナノ銀の経皮曝露における局所刺激性および経皮吸収性について、インターラボ間におけるバリデーションを実施し、正常皮膚では皮膚透過性は認められないものの、ドライスキンなど、皮膚透過性が亢進した状態での体内動態を明確にする必要性を示した。②ナノ銀粒子は粒子径が小さいほど母乳移行率が上昇し、その母乳移行率は銀イオンと比較して低いこと、③ナノ銀粒子は母乳を介して乳幼仔に移行し得ること、④移行後のナノ銀粒子は乳幼仔の脳に蓄積されるものの、13 種類の網羅的行動テストバッテリーでは、情動認知行動には影響をおよぼさないことなど、脆弱な個体を対象とした動態・ハザードを明らかとした。また、⑤ナノ銀粒子が、経鼻投与後に嗅球を介して脳に移行し、嗅覚過敏を誘発し得ること、⑥ナノシリカの急性毒性について、致死毒性や肝障害などは、サイズの減少に伴い作用が強くなる一方で、体温低下は、50 nm がピークとなること、⑦ナノシリカの反復投与により、その後の過剰量投与に伴う体温低下が悪化することを明らかとし、反復投与によりナノシリカに対する感受性が高まる可能性があり、新たな安全性評価の視点が必要と考えられた。さらに、⑧ナノ銀粒子の皮内曝露により、銀に対する Th17 性の獲得免疫が誘導されることを見出し、金属アレルギーの発症要因として、イオンではなく、粒子を考慮した検討が必須であることを先駆けて提唱した。加えて、この一連の研究の中で、とりわけ、妊婦をはじめとする脆弱な個体を対象とした、ヒトにおける NM・sNM の体内動態情報の収集が重要であることを認め、我々は現在、それら情報の収集に向けた検討に一部着手している。即ち今後、NM・sNM のヒトにおける体内動態の解析手法の開発、および評価システムの構築が必要不

可欠であると共に、NM・sNM のヒト健康影響に関する科学的根拠・情報の収集と、そのリスク解析が求められるものと考えられる。以上のように、特に、「こどものナノ安全科学」や「こころのナノ安全科学」における新規知見を多く見出し、当初目標を超える特筆すべき成果が得られた。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。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、さらには、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と期待される。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。

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、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。また、細胞内移行量の検討などについては、蛍光修飾されたシリカ粒子を用いた。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. 細胞から排出されるシリカ量の定量

6 well plate に 3×10^5 cells/ 3 mL/ well で細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で 24 時間培養した。緑色蛍光 (FITC) 修飾を施した各シリカ粒子 (nSP70、nSP300、mSP1000) を 15 分間、ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY で超音波処理した後に、ボルテックスし、25 µg/mL に血清非含有培地 (D-MEM、1% antibiotics) を用いて希釈し、3 mL ずつ各 well に添加し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で、2 時間培養した。その後、培養上清を除去し、PBS で細胞を 3 回 wash し、シリカ非含有、

血清含有培地を 3 mL 添加した。その後、0、3、6 時間後に細胞を 0.2mM EDTA 入り Trypsin 溶液にて剥がし、400 µL の FACS buffer (2% FBS, 0.05% アジ化ナトリウム in PBS) で再懸濁した。アルミホイルで遮光し、氷上に保存しておき、測定前に 5 µL の 7-ADD を添加した。測定直前に FACS チューブに細胞懸濁液を通し、細胞塊などを取り除き、FACS calibur フローサイトメーターにて 7-AAD と FITC の蛍光強度を測定し、死細胞の割合および細胞内のシリカ量を算出した。細胞内のシリカの排出は、シリカ入りの血清非含有培地で 2 時間の培養が終了した時点の細胞の蛍光強度を 100% として、0、3、6 時間後の細胞内の蛍光強度を比較した。

3. シリカの排出経路の解明に向けた検討 (阻害剤)

6 well plate に 3×10^5 cells/ 3 mL/ well で細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で 24 時間培養した。緑色蛍光 (FITC) 修飾を施した各シリカ粒子 (nSP70、nSP300、mSP1000) を 15 分間、ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY で超音波処理した後に、ボルテックスし、25 µg/mL に血清非含有培地を用いて希釈し、3 mL ずつ各 well に添加し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で、2 時間培養した。その後、培養上清を除去し、PBS で細胞を 3 回 wash し、20 µM のサイトカラシン D、あるいは 100 µM のクロロキンを添加した血清含有培地を添加した。その後、0、6 時間後に細胞を 0.2 mM EDTA 入り Trypsin 溶液にて剥がし、400 µL の FACS buffer で再懸濁した。アルミホイルで遮光し、氷上に保存しておき、測定前に 5 µL の 7-ADD を添加した。測定直前に FACS チューブに細胞懸濁液を通し、細胞塊などを取り除き、FACS calibur フローサイトメーターにて 7-AAD と FITC の蛍光強度を測定し、死細胞の割合および細胞内のシリカ量を算出した。

4. ナノ銀を連日曝露した際の安全性評価

A549 細胞に、nAg10、nAg50、nAg100 を添加し、24、48、72 時間培養後、ELISA により上清中の IL-8 量を解析した。さらに、nAg10 を 48 時間まで曝露させた後、その後 24 時間 nAg10 を含まない培地で培養した際の IL-8 産生量を ELISA により測定した。また、細胞内への銀の移行量を、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 1×10^6 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. 誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) による各脳領域中の銀量の測定

C57BL6/J マウス (8 週齢、雄性) に、glucose 溶液で 0.25 mg/mL に調製した nAg10 を片鼻 10 μ L ずつ (5 μ g/mouse/day)、最大 28 日まで連日経鼻投与した。また、硝酸銀水溶液 (Ag^+) は、 AgNO_3 を nAg と同じ溶媒を用い、銀重量を基準に濃度を調整後、同投与量で投与した。対照群には 5% glucose 溶液を投与した。最終投与 24 時間後に、ペントバルビタールによる麻酔下で脱血死させ、各脳領域 (嗅球、黒質、線条体、小脳、その他) を摘出し、群ごとにプールした。これらの組織をテフロン製分解容器に採取し、硝酸 1 mL、過酸化水素 1 mL を加え、マイクロウェーブ分解装置 ETHOS One により酸分解した。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 3 mL に、内標準として 0.2 μ g/mL のロジウム・タリウム溶液 30 μ L を加え

た。この試料溶液中の銀濃度を誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) Agilent 7500ce を用いて分析した。なお、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 103 (ロジウム)、107 (銀)、195 (白金)、205 (タリウム) とした。また、0.1-20 μ g/L 範囲の銀溶液 10 mL に内標準として 0.2 μ g/mL のロジウム・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。

11. HE 染色による病理学的解析

C57BL6/J マウス (8 週齢、雄性) に、nAg10 もしくは Ag^+ を 5 μ g/mouse/day で 28 日間連日経鼻投与した。対照群には 5% glucose 溶液を投与した。最終投与 24 時間後に、ペントバルビタールによる麻酔下で脱血死させ、脳を摘出し、すぐに 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。EDTA で脱灰後、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 (HE 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、キシレンで透徹処理後、封入した。切片の作成から所見の作成は、アプライドメディカルリサーチに依頼した。

12. Western Blot による嗅球中の神経マーカーの発現評価

マウスに nAg10 または Ag^+ を最大 28 日まで連日経鼻投与し、最終投与 24 時間後に、嗅球を摘出した。摘出した嗅球サンプルは、lysis buffer (50 mM Tris-HCl、pH7.5、5mM EDTA-2Na、120 mM NaCl、1% Triton X-100、Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail 含有) を添加した後、パワーホモジナイザーによりホモジネ

ートし、10000 × g、5 分間の遠心操作を行うことでタンパク質を回収した。各サンプル 10 µg と 5% 2-mercaptoethanol 含有 Laemmli Sample Buffer を等量混合し、95°C で 5 分処理した後、各サンプルを 10-20% e-PAGEL に添加した。Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) は、ゲル 1 枚当たり 14 mA で 10 分間電気泳動した後、40 mA の定電流で 1 時間電気泳動した。電気泳動後のゲルを PVDF 膜に、ゲル 1 枚当たり 50 mA の定電流で 1.5 時間転写し、1% BSA/PBST (0.1% Tween 20 を含む PBS) を添加して一晩ブロッキングした。1% BSA/PBST で 1000 倍希釈した anti-tyrosine hydroxylase antibody を添加し、緩やかに振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、1% BSA/PBST で 50000 倍希釈した anti-rabbit IgG antibody, peroxidase conjugated を添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。洗浄後、PVDF 膜を SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate で処理し、発光像を ImageQuant LAS 4000mini により撮影した。さらに、Image J (National Institutes of Health) を用い、Tyrosine hydroxylase、および、β-Actin のバンド強度を解析し、Tyrosine hydroxylase のバンド強度をβ-Actin のバンド強度で標準化することで、Tyrosine hydroxylase の発現量を半定量化した。また、Olfactory marker protein の発現評価には、一次抗体として 10000 倍希釈した anti-olfactory marker protein、二次抗体として 20000 倍希釈した anti-goat IgG antibody, peroxidase conjugated、Glutamate decarboxylase の発現評価には、一次抗体として 5000 倍希釈した anti-glutamate decarboxylase、二次抗体として 50000 倍希釈した anti-mice IgG antibody, peroxidase conjugated を使用し、同様の操作を実施した。

13. HPLC による神経伝達物質の測定

マウスに nAg10 または Ag⁺ を最大 28 日まで連日経鼻投与し、最終投与 24 時間後に、嗅球を摘出した。摘出した嗅球サンプルは、homogenize buffer (0.2 M 過塩素酸、0.1 mM EDTA-2Na、内標準; 0.2 µg/mL イソプロテレノール) 400 µL を添加した後、パワーホモジナイザーによりホモジネートし、氷上にて 30 分静置の後、15 分間の遠心操作 (15000 rpm、0°C、) を行った。上清を 300 µL 回収後、1 M 酢酸ナトリウム 35 µL と混合し、PVDF シリンジフィルター (0.22 µm pores) で濾過した。濾過したサンプルを HPLC-ECD システム (HTEC-500) によって測定した。なお、分析カラムは Eicompak SC-5 ODS (3.0 mm inner diameter, 150 mm long; Eicom) を用い、流速は 0.5 mL/min に設定した。移動相には、11.8% (vol/vol) メタノール、170 mg/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム、5 mg/L EDTA-2Na を含んだ 88 mM 酢酸-クエン酸溶液を使用した。

14. 嗅覚試験 (buried food test)

試験の 3 日前から、マウスを飼育しているケージ内にクッキー (エントリー; Nabisco) を設置した。試験の 18-24 時間前の時点で、ケージから餌とクッキーを取り除いた。試験開始の 30 分前に飼育室から実験室に移し、20 分間馴化させた。20 分後、試験用のケージ (testing cage) にマウスを移し、5 分間ケージ内で馴化させた。5 分後に temporary holding cage にマウスを移した後に、クッキーを testing cage 内の床敷きの表面から 1.5 cm 程度のところに隠した。マウスを temporary holding cage から testing cage に再び戻し、マウスがクッキーを発見するまでの時間を最大 900 秒まで測定した。900 秒の間に餌を発見できなかったマウスがいた場合には、発見した時間を 900 秒として記録し、データを解析した。なお、マウスのクッキーへの馴化は、連続経鼻投与 25 日目から 27 日目までの 3 日間行い、連日

投与 28 日目終了の 18-24 時間後の時点で buried food test を実施した。

15. 金ナノ粒子の体内動態評価

BALB/c マウス (6 週齢、雄性) を清水実験材料より購入した。nAu10、nAu30、nAu50、nAu70、nAu90 をそれぞれ 4 mg/kg で静脈内投与し、投与 1、2、4、8、12、24 時間後に血液を回収した。また、投与直後から 24 時間後までの尿を回収した。回収した血液または尿に含まれる金の量を ICP-MS 解析により定量した。さらに、静脈内投与を行ったマウスに関しては、24 時間後の血液を用い、血球検査および血液生化学検査 (ALT、AST、BUN) を行った。

16. NM・sNM の母乳移行性評価

授乳期マウスを乳幼仔マウスから最低 1 時間隔離した後、各粒子溶液を静脈内投与、もしくは経口投与した。静脈内投与の際は、nAg100 (1.5 mg/kg)、nAg50 (1.5 mg/kg)、nAg10 (1.5 mg/kg)、AgNO₃ (1.5 mg/kg Ag⁺)、5%グルコース溶液、マウス血清アルブミンを含む PBS (pH 7.4) を、出産後 3 日、7 日、14 日、もしくは 21 日に投与した。経口投与の際は、nAg10 (10 mg/kg)、AgNO₃ (10 mg/kg Ag⁺)、水を出産後 3 日に投与した。また、投与前に各群の母体重量および各母体の仔数は対照群とほぼ同様になるように調整した。さらに、銀ナノ粒子、Ag⁺を投与されたマウスについては 2 群に分け、一方からは投与 1、2、4 時間後に採血・搾乳し、他方からは投与 8、12 時間後に採血・搾乳し、ICP-MS により、血中および母乳中 Ag 量を測定した。

17. 母乳の回収

母マウスと乳幼仔を、別々のケージに互いの姿が見えるよう 5 時間以上隔離した。隔離時間は母乳の再吸収が始まる 16 時間までとした。母体に 1.8 U/mouse のオキシトシンを皮下投与した。投与後、直ちに実験動物用搾乳装置 (Breast pump

WAT-2006) を用いて、乳頭より搾乳した。100 μL の母乳を 2000 x g、4°C、15 分間遠心して得られた上清を、蒸留水で 10 倍希釈した後、フィルター (Acrodisc Versapor 5 μm) にかけて、乳清を回収した。遠心後に沈降した細胞に PBS を加えて再懸濁し、再度遠心して上清を破棄する洗浄操作を 2 回繰り返した後、100μL の PBS に懸濁し母乳中細胞を回収した。

18. ICP-MS による測定

Ag 量は 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 となるように添加し、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。母乳中細胞層の銀濃度については、細胞を 100 μL の PBS で懸濁した液について銀濃度を測定すると共に、同懸濁液中の細胞数を Nucleocounter にて測定し、細胞 1 つ当たりの銀量を算出した。

19. 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。

20. nAg の授乳期曝露が母体及び乳幼仔へ与える影響評価 (一般毒性評価)

妊娠 13、14 日の BALB/c マウス (11-13 週齢)

を日本 SLC より購入した。出産日を PND0 とし、PND0 から PND20 まで、1 日 1 回、nAg10 もしくは Ag⁺を 0.5、0.1、0.02 mg/kg で母獣に強制経口投与し、母乳育児させた。PND0 から PND21 まで母体体重を連日測定すると共に、摂餌量を測定した。また、乳幼仔体重を経過的に測定すると共に、PND0、7、14、21 に解剖し、PND7、14、21 に、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）すると共に、ICP-MS 解析により血中 Ag 濃度を測定した。また、PND21 に血球検査後、血漿を回収し生化学検査（ALT、AST、BUN）に供した。さらに、PND21 に母体にオキシトシンを 1.8 U/mouse で皮下注射した後、鼠径部から搾乳した。その後、母体を解剖し、臓器重量測定、血球検査、生化学検査に供した。回収した母乳は、蛋白質量、脂質量の測定に供した。

21. 母体への連日経口投与による母乳を介した乳幼仔への影響評価

授乳期マウスに nAg10 (0.1、0.5 mg/kg)、AgNO₃(0.1、0.5 mg/kg Ag⁺)、水を出産日 PND0 から離乳 PND20 まで 21 日間連日経口投与し、母乳育児させた。仔の重量を 42 週齢まで測定した。PND21 に離乳させると共に、一部の乳幼仔を解剖し、血液・血漿を回収した。回収した血液・血漿は、血球検査、生化学検査に供した。10 週齢になった時点で生理学研究所の行動実験施設に移し、1 週間の馴化の後、多種の行動試験により、脳機能を網羅的に解析した。全ての行動実験において、実験を行う順番や装置は、群間に偏りが生じないように実施した。

22. 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。

23. 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。

24. 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。

25. 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、清水実験材料) に、nSP30 を 1.25 mg/kg、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。最終投与 35 日後に、雄親の体重を測定すると共に、精巣・精巣上体・精嚢重量を測定し、さらに、精巣上体中の精子を 7-AAD を含む buffer にて懸濁した後、その生存率をフローサイトメーターにより評価した。また、最終投与 35 日後から 4 日間、無処置の雌マウス (9 週齢、清水実験材料) と同居させた際の交配成功率 (妊娠した雌マウスの数/交配させたマウスのペア数) を算出すると共に、出生仔数、出生仔の体重、雄仔の割合を測定した。出生後の体重を経過的に測定すると共に、各群の 4 週齢時の体重に対する成長率を算出した。さらに、生まれてきた仔を 9 週齢まで飼育し、各種行動試験を実施した。

26. 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 μ L/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。

27. 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。

28. 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。

29. 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ー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。

30. 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。

31. 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ぽに量り取り、電気コンロ上で予備灰化した後、500 $^{\circ}$ 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。

32. 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。

33. 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。

34. 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。

35. 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。

36. 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。

37. ナノシリカの事前反復投与がナノシリカ誘導性の急性毒性に与える影響評価

C3H/HeN マウス (雄性、6 週齢) に nSP50 を週 1 回、計 4 週に渡って耳介部皮内へ事前投与した。次に、最終投与の 1 週間後、nSP50 を尾静脈より投与した。投与直後から 15 分毎に直腸体温を測定すると共に、投与 4 時間後に血液を回収し、血球検査・血液生化学検査に供した。

38. 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

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 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 day20-24 の間に追加で一回、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 (Dermatophagoides pteronyssinus Crude Extract : Dp) (Dp ; 125 μ g/mL)、ニワトリ卵白アルブミン (OVA)、またはウシ血清アルブミン (BSA) を単独、あるいは、Dp、OVA、または BSA と 30 nm の非晶質ナノシリカ (nSP30)、またはその表面をカルボキシル基により修飾した 30 nm の非晶質ナノシリカ (nSP30-C) の混合溶液 (抗原 ; 125 μ g/mL、ナノシリカ ; 12.5 mg/mL) としてそれぞれ 20 μ L/ear、80 μ L/back で塗布した。また、塗布は 1 日、もしくは 2 日おきに週 3、4 週間塗布した (計 13 回塗布)。一部の実験においては、Dp と nSP30 を混合せずに、24 時間間隔でそれぞれを別個に塗布することを一セットとし、これを連続、もしくは 1 日おきに 4 週間、13 セット行った。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及び残存しているサンプルをふき取った後に行った。最終投与の 24 時間後、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 total IgE、Dp 特異的 IgE、IgG、IgG1、IgG2a 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 法により測定した。また、各塗布サンプル中の粒子の性状に関して、透過型電子顕微鏡による観察、ならびに動的光散乱法による粒径の評価を実施した。

39. In vitro における、粒子サイズに着目した非晶質ナノシリカの免疫毒性評価

ヒト単球細胞株 (THP-1) を 96 穴プレートに 3.0×10^4 cells/well で播取し、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を $0.5 \mu\text{M}$ で添加し、24 時間培養した。その後 10、30、50、70、100、300、1000 nm の非晶質シリカ (順に nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000) を 5、15、45、135、405 $\mu\text{g/ml}$ 、コントロールとして結晶質シリカ (非晶質シリカと同濃度)、または LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) を添加し、24 時間培養した。その後上清を回収し、ELISA 法によって炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β を計測した。

40. In vitro における、粒子サイズに着目した非晶質ナノシリカの免疫毒性評価

nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000 と結晶質シリカを $1 \text{ mg}/200 \mu\text{l}$ 、C57BL/6 マウスに腹腔投与した。24 時間後に等張の PBS を 2 ml 投与し、腹腔洗浄液を回収した。腹腔洗浄液中の細胞数を NucleoCounter により計測し、腹腔浸潤細胞数とした。また、洗浄液を遠心後、その上清中の IL-6 産生量を ELISA 法によって計測した。

41. 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 ($10 \mu\text{g/mL}$) と共に $20 \mu\text{l/footpad}$ 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) $10 \mu\text{l}$ を右の耳介に、溶媒のみ $10 \mu\text{l}$ 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。

42. 銀ナノ粒子の前投与による影響と獲得免疫応答の関連

nAg10 を 4 回感作投与したマウスに、最終投与の一週間後、 $500 \mu\text{g/mouse}$ で抗 CD4 中和抗体、またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG2b)、あるいは抗 CD8 中和抗体、またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG2a) を PBS 溶媒で腹腔内投与した。抗 asialo GM1 ウサギ血清は $50 \mu\text{l/mouse}$ で静脈内より投与した。それぞれの試薬は、惹起投与の 24 時間前に実施した。細胞の除去は、flow cytometry 解析 (FACS Fortessa) により確認し、それぞれ惹起 96 時間後の脾臓細胞中で、CD4 $^+$ 細胞あるいは CD8 $^+$ 細胞が 95%以上、NK 細胞 (CD3 $^-$, CD49b $^+$ cells) が約 80% 以上除去されていることを確認している。nAg10 を 4 回感作投与したマウスの心臓から未処理のシリンジを用いて血液を回収し、軽く凝固した時点で一度ゆっくりとよくかき混ぜてから 37°C で一時間静置した。その後、 4°C で 5 時間さらに静置した。血液を $5000 \text{ g} \times 15 \text{ min}$ 4°C 条件下で遠心し、その上清を血清として回収した。血清は、2-3 匹分をプールし、未処置の BALB/c マウス (雌性) の 9-10 週齢に、直ちに $500 \mu\text{L/mouse}$ で腹腔投与した。24 時間後、血清を移入されたマウスの耳介皮内へ、nAg10 を $10 \mu\text{L}$ 投与 (0.8 mg/mL) し、経時的に耳介の腫れを測定した。nAg10 を 4 回感作投与したマウスの脾臓と膝下リンパ節を回収し、3-4 匹分をプールして、単細胞浮遊液を調製した。CD4 $^+$ T 細胞は非 CD4 $^+$ T 細胞を磁気標識後、磁気カラム内で除

去することで精製した (CD4⁺T cell isolation kit)。CD4⁺T 細胞は精製後、PBS に懸濁してすぐに、未処置の BALB/c マウス (雌性) の 9-10 週齢に、 $2 \cdot 10^7$ cells/mouse で静脈内より投与した。CD4⁺T 細胞 (CD3⁺, CD4⁺ cells) の精製度は、Flow Cytometer により、95%以上であることを確認している。CD4⁺T 細胞移入の 24 時間後、耳介皮内に nAg10 を 10 μ L 投与 (0.8 mg/mL) し、経時的に耳介の腫れを測定した。

43. 銀ナノ粒子誘導性のアレルギー病態を担う免疫応答

nAg10、あるいは Ag⁺ を、マウスの足蹠に週 1 回、計 4 回投与し、脾細胞を単離した後、nAg10、nAg50、nAg100 あるいは Ag⁺ で再刺激し、その際に産生される IL-17A 産生を評価した。nAg10 を 4 回感作投与したマウスに、最終投与の 1 週間後、耳介皮内に nAg10 を 10 mL 投与 (0.8 mg/mL) した。投与直後に、抗 IFN-g 中和抗体またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG1) を 500 mg/mouse で腹腔内へ、あるいは、抗 IL-17A 中和抗体、またはアイソタイプコントロール (rat IgG1) を 200 mg/mouse で静脈内より投与した。その後、経時的に耳介の腫れを測定した。

44. 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 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. 新規細胞内動態解析技術の確立

現在、NM の細胞内動態の解析手法として、透過型電子顕微鏡 (TEM) や共焦点顕微鏡が汎用されている。しかし、TEM による局在解析では、細胞を固定する必要があることから、NM の細胞内における運動をリアルタイムで評価することは不可能である。また、蛍光修飾した NM を用いた共焦点顕微鏡による挙動解析は、リアルタイムで評価可能である一方で、NM の微小さゆえに感度が十分ではないことから、1 粒子単位で NM の細胞内挙動を詳細に評価することは困難であるこ

とを確認している。従って、細胞内における NM 1 粒子単位の運動を詳細に追跡可能な、新たな評価手法の確立が求められている。そこで我々は、細胞内における蛋白質の 1 分子イメージングを可能とする新規蛍光顕微法として注目が集まりつつある、薄層斜光照明顕微法 (highly inclined laminated optical sheet; HILO) に着目した。様々な照明法があるものの、従来の落射照明顕微法は、観察部位以外の蛍光も励起してしまい、バックグラウンドが高く、高感度に観察部位の蛍光を観察することができない。また、全反射顕微鏡は、その性質上、ガラス面に近い(200 nm 以内)、細胞膜近傍の蛍光しか観察できないことから、細胞内の観察には適していない。一方で HILO 法は、細胞質、核内を、落射蛍光顕微法と比べて約 8 倍の感度で観察可能であるという利点を有している。以上の観点から、HILO 法を用いた 1 粒子単位での細胞内挙動の観察、すなわち、細胞内 1 粒子イメージング法の確立を試みた。

本検討においては、従来までの細胞内への取込性の検討の結果、細胞内への粒子の取り込みが最も多いヒト肺胞基底上皮細胞株 (A549 細胞) を用いた。A549 細胞に蛍光修飾された非晶質シリカ (以降、蛍光シリカと表記) である nSP70、nSP300、mSP1000 を添加した。3 時間後に、細胞内に存在する蛍光シリカを HILO 法により観察した (Fig.1)。その結果、nSP70 は 1 細胞当たり 20 粒子以上存在し、細胞内に広く分布していた。また、nSP300、mSP1000 は nSP70 に比べて、細胞内に存在する粒子は少なく、多くの細胞で nSP300 は 1 細胞当たり 5~15 粒子、mSP1000 は 1~5 粒子しか観察されなかった。なお、従来の共焦点顕微鏡を用いた場合、本作用濃度・作用時間においては、細胞内で nSP70 の存在は認められないことから、従来法よりも高感度にナノサイズの NM の挙動を評価可能であると考えられた。また、本実験に使用した蛍光シリカの作用濃度においては、細胞内における蛍光粒子が十分に少なく、蛍光を 1 輝点ごとに認識可能で

ある。その輝点の蛍光強度が、1 粒子の輝点の大きさと差がないことから、細胞内の 1 つの輝点は 1 粒子であると考えている。今後、本検討と同様の条件で電子顕微鏡により観察し、細胞内に認められる粒子数を本検討の結果と比較することで、1 つの輝点がかくかに 1 粒子に由来するものであることを確認する予定である。

2. 細胞外への排出経路の解析

NM・sNM の細胞内取り込み経路については、多くの検討がなされているものの、細胞内から細胞外への排出経路に関する解析は皆無に等しい。安全性を考える場合、細胞内への蓄積・滞留性が大きく影響することから、細胞外排出経路の解析は急務となっている。そこで、ナノシリカを用いて、細胞内に取り込まれた粒子がどの程度、細胞外に排出されるかについて検討した。

ナノマテリアルは血清非存在下において細胞内への移行性が向上することが知られていることから、血清無添加培地を用い、25、50、100 μ g/mL の FITC 修飾蛍光シリカ粒子を細胞に添加した。添加 1、2、3 時間後に、細胞内の FITC の蛍光強度を指標として、細胞内シリカ量を定量した。また、7-AAD により染色された死細胞の割合も解析した (Fig.2)。その結果、nSP70 添加群においては、添加 2 時間後以降、いずれの濃度においても蛍光強度が変化せず、プラトーに達したと考えられた。一方で、細胞傷害性は時間・濃度依存的に増大する傾向が認められた。従って、本検討においては、75%以上の細胞が生存しており、また、細胞内に粒子を十分に取り込んだと考えられることから、25 μ g/mL の濃度で 2 時間作用といった条件で細胞内にシリカ粒子を取りこませることとした。一方で、nSP300、mSP1000 は添加後 2 時間以内であれば、いずれの濃度においても細胞傷害性がないことから、nSP70 と条件を統一して検討した。

次に、細胞内から排出されるシリカ粒子の評価を試みた。細胞にシリカ粒子を上記の条件で添加

し、細胞内に存在するシリカ粒子の蛍光強度の減少を指標に細胞外への排出を評価した (Fig.3)。その結果、nSP300、mSP1000 は経時的に細胞外への排出が認められ、培地交換時 (0 時間) を 100% とすると、培地交換 6 時間後での細胞内でのシリカ残留率はそれぞれ 27%、42% と約 6 割以上の粒子が排出された。一方で、nSP70 添加群においては、時間依存性が認められず、また、添加 6 時間後における細胞内のシリカ残留率は約 90% とほとんど排出されない可能性が示された。

次に、細胞外排出経路の解明に向け、阻害剤を用いて検討した。まず初めに、細胞内への取り込みや排出に関与するアクチンの重合を阻害することで細胞外への排出全般を阻害するサイトカラシン D を用いた。また、リソソームを破壊することで、リソソームを経由する排出機構を阻害すると考えられるクロロキンの作用が細胞外への排出に与える影響を評価した (Fig.4)。その結果、クロロキン作用群においては、いずれの粒子径においても、クロロキンにより顕著な差は認められず、シリカ粒子の細胞外への排出において、リソソームは関与していない可能性が示された。一方で、サイトカラシン D 作用群においては、nSP300、mSP1000 作用群で、細胞外へのシリカ粒子が阻害される傾向が認められた。しかし、nSP70 添加群においては、サイトカラシンによっても変化は認められず、nSP70 と nSP300、mSP1000 の細胞外への排出機構が異なる可能性が示された。

3. ナノ銀粒子を連日曝露した際の安全性評価

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・sNM を細胞に連日曝露させ、細胞の起炎性を経時的に評価した。まず、ナノ銀粒子を細胞に連日曝露させた際の、培養上清中に含まれる IL-8 産生量の測定を行った。その結果、ナノ銀粒子の

曝露により 24 時間では未処置群と比較して、変化が認められないものの、48、72 時間後においては経時的に IL-8 産生量が上昇することが認められた (Fig.5a)。また、48 時間までナノ銀粒子を曝露させ、その後 24 時間ナノ銀粒子を含まない培地で培養した際においてもナノ銀粒子曝露時と同程度の IL-8 産生が認められた。この時、粒子サイズが小さいほど IL-8 産生量は増加した。一方で、同様の条件で起炎性物質の LPS を曝露した際には、曝露後 24 時間において IL-8 産生が誘導され、LPS を含まない培地に置換したところ速やかに IL-8 産生が収束することが認められた (Fig.5b)。即ち、nAg10 の起炎性が一般の起炎性物質と比較し、遅発的、経時的、かつ、持続的な挙動を示す可能性が示された。次に、細胞内の銀取り込み量を ICP-MS により解析した。その結果、曝露時間の経過に伴い銀取り込み量が増加し、蓄積することが認められた (Fig.6)。以上の結果から、ナノ銀粒子が持続的な炎症応答を誘発すること、ナノ銀粒子が細胞内に移行、蓄積することが持続的な炎症誘発の引き金となる可能性が示された。

4. 非晶質ナノシリカを連日曝露した際の起炎性評価

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.7a)。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.7b)。

5. 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、新たな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.8a)。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.8b)。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。

6. 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.9a)。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増している遺伝子が 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.9b,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。

7. 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)。

8. 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.10)。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-

κB)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.11a)。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.11b)。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.11c)。また、核内転写因子の一つである Nuclear factor-kappa B (NF-κB) は核内移行を制御する Inhibitor of transcription factor NF-κB (IκB) 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 IκB 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、IκB の分解を評価することで NF-κB の活性化を間接的に評価した。その結果、IκB 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.11d)。つまり、曝露群と曝露休止群共に NF-κB 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-κB 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。

9. ナノ銀を経鼻曝露した際の脳への移行性

化学物質の吸入・経鼻曝露によるハザードに関しては、外来異物と接触する頻度の高い気管や肺などの呼吸器への影響を中心に研究が行われることが多い。実際に、ナノ粒子の吸入曝露による安全性研究も呼吸器系に関するものが多くを占めている。一方で、化学物質の職業曝露等を対象とした疫学研究によると、化学物質の吸入曝露が

呼吸器系のみならず、脳神経系にも悪影響をおよぼし得ることが報告されている。これらの知見は、化学物質を鼻腔から曝露した場合に、血液と脳間の物質輸送を厳密に制御する血液脳関門を突破しなくとも、嗅神経等を通過して脳に直接移行する経路が存在することを示唆している。近年、このような鼻腔を介した脳への輸送経路は鼻腔-脳経路と呼ばれ、化学物質が脳神経系へ悪影響をおよぼすうえで、鼻腔-脳経路の関与が推察されている。即ち、これらの知見は、化学物質の吸入曝露による脳神経系への影響を評価するにあたり、鼻腔-脳経路に着目することの重要性を示すものである。そこで、ナノ粒子の中でも最も多くの用途で利用されている銀ナノ粒子 (nAg10) を対象に、nAg10 を用いてマウスに経鼻曝露した場合に、脳に直接的に移行するか評価した。まず、マウスに nAg10 および Ag⁺を単回経鼻投与し、様々な脳領域での動態を解析したところ、鼻腔に近い脳領域 (嗅球) では銀が検出されたが、鼻腔から遠い脳領域では検出されなかった。この時、嗅球への移行率を算出した結果、nAg10 投与群で 0.0038%、Ag⁺投与群で 0.0086%が移行していることが明らかとなった。また、28 日間連日投与後の移行性を解析した結果、嗅球のみならず、他の脳領域にも到達することが明らかとなった。なお、嗅球中の銀の存在率を算出したところ、総投与量のうち nAg10 投与群で 0.0034%、Ag⁺投与群で 0.0037%が残留しており、ほぼ同量の銀が嗅球に残存していることが示された。一方で、他の部位における銀の存在率は、nAg10 投与群で、総投与量の 0.0002% (黒質)、0.0003% (線条体)、0.0009% (小脳)、0.0044% (その他)であった。また、Ag⁺投与群では、総投与量の 0.0007% (黒質)、0.00014% (線条体)、0.00039% (小脳)、0.00207% (その他)であったことから、nAg10 は、嗅球以外の部分には Ag⁺の 1/3 以下しか到達していないことが判明した (Fig.12)。嗅球中の銀濃度が他の脳領域と比較して非常に高いことから、少なくとも nAg10、