

200736028A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

「ナノマテリアルの経皮毒性に関するトキシコキネティクスおよび
トキシコプロテオミクス等の融合による有害性評価法・リスク予測法の開発」

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 堤 康央

平成 20 年 4 月

目次

I.	総括研究報告書	
	ナノマテリアルの経皮毒性に関するトキシコキネティクスおよびトキシコプロテオミクス等の融合による有害性評価法・リスク予測法の開発	1
	(独)医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト 主任研究者 堤 康央	
II.	分担研究報告書	
1.	化粧品材料としてのナノマテリアルの経皮リスクに関する研究	49
	大阪大学大学院薬学研究科 薬剤学分野 分担研究者 中川晋作	
2.	トキシコキネティクス解析によるナノマテリアルの安全性評価	61
	(独)医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト 分担研究者 角田慎一	
3.	ナノマテリアルの細胞傷害性評価並びにその誘導機序に関する研究	74
	大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 分担研究者 吉岡靖雄	
4.	電子顕微鏡によるナノマテリアルの細胞内局在性および細胞毒性に関する研究	88
	(独)医薬基盤研究所 トキシコゲノミクスプロジェクト 分担研究者 今澤孝喜	
5.	ナノマテリアルの肝臓に対する安全性に関する研究	105
	大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野 分担研究者 八木清仁	
6.	ファージ表面提示法を用いたトキシコプロテオミクス解析法の確立	123
	(独)医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト 分担研究者 鎌田 春彦	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	128
IV.	研究成果の刊行物・別冊	132

「ナノマテリアルの経皮毒性に関するトキシコキネティクスおよび トキシコプロテオミクス等の融合による有害性評価法・リスク予測法の開発」

主任研究者 堤 康央 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト

研究要旨

我が国のナノマテリアル研究は、「開発・実用化」の点で世界を大きくリードしており、化粧品や医薬品（経皮吸収剤）の領域で多くのナノ製品が上市されている。化粧品の有効性成分を例に挙げると、ナノシリカが顔料、酸化チタンが日焼け止め、フラーレンが美白剤として既に利用されている。一方でナノマテリアルのヒト健康への影響など、予測できない負の側面が急速に懸念され始めている。即ち、ナノマテリアルに曝露された後の生体内挙動や蓄積性、これら動態特性に基づいた毒性発現は殆ど理解されていないにも関わらず、実用化ばかり先行している現状が極めて危惧されており、安全性確保の観点から、ナノマテリアルの社会受容の促進に向けた取り組みが欧米を中心に最重要視されるようになってきている。しかし我が国では、このナノマテリアルの安全性評価・確保に関する研究が欧米に比べて、立ち後れているのが現状であり、特に実用化が進んでいる“ナノマテリアルを経皮適用する領域”での情報の集積が、厚生労働行政的にも社会的にも急務となっている。そこで本研究では、既に実用化されているナノシリカおよびその蛍光標識体を標準ナノマテリアルとして用い、①種々物性（サイズ、表面電荷、親水-疎水バランス）と経皮曝露後の皮膚内・体内（肝臓・脳）・細胞内挙動の連関をトキシコキネティクス解析すると共に、②これら組織（皮膚・肝臓・脳など）・細胞での安全性をトキシコプロテオミクス等により *in vivo* および *in vitro* 評価し、以下の知見・情報を得た。

1. 培養皮膚を用いたナノシリカの透過性試験より、70 nm のものでは効率よく皮膚深部にまで浸透することが判明した。
2. ヒト皮膚に類似した皮膚を持つブタを用いた *in vivo* 透過性試験、刺激性試験、短期・長期の毒性試験等を実施したところ、70 nm のナノシリカは角質層を透過し、生きた表皮をも通過して、血中に移行することが初めて判明した。
3. ナノシリカをマウスの尾静脈から投与することにより、70 nm ナノシリカが肝傷害を起こすことが示された。
4. 肝傷害を起こす薬物とナノシリカの併用により、薬物の起こす肝傷害をナノシリカが増大させることが示された。
5. ナノシリカは、ヒト皮膚角化（HaCaT）細胞に対し、濃度依存的に細胞傷害を惹起すること、また粒子サイズが小さいものほど（70 nm）、細胞内に取り込まれやすく、かつ細胞傷害活性が高いことが判明した。
6. 細胞内に取り込まれた 1000 nm のナノシリカは、粒子周辺にリソソーム小胞の異常発達を認めたが、70 nm のナノシリカの場合、リソソーム小胞は認められず、興味深いことに核小体内部に選択的集積していることが電顕観察により判明した。
7. ナノシリカのリスクマーカーを同定し、安全性評価系を確立する目的で、トキシコプロテオミクスを行ったとこ

ろ、興味深い変動蛋白質を見出した。

8. 皮膚局所から肝臓・脳に移行したナノシリカの安全性評価のため、肝細胞・マクロファージ・神経細胞を用いた安全性評価を行ったところ、粒子サイズの低下に伴って、オートファジーと予想される強い細胞傷害性が惹起され、血中に移行したナノシリカの安全性が危惧された。
9. 血管内皮細胞には細胞傷害性を示さなかったことから、ナノシリカの毒性には細胞選択性があるものと判断された。

以上、他に類を見ない新たな知見が多数得られており、これら成果を上記学会で発表すると共に、平成 19 年度成果として 7 報以上の原著論文を国際誌に投稿する予定である。

A.研究目的

ナノマテリアルは現在、万能素材として、産官学のあらゆる領域で注目を集めている。特に昨今では、化粧品や経皮吸収医薬といった「直接ヒト皮膚に曝露する」分野で、爆発的に利用され始めている。例えば、フラーレンは抗酸化作用を有することから、紫外線刺激などによる皮膚細胞の酸化ストレスを抑制し、皮膚細胞死を防御したうえで、美白効果や紫外線防御効果が得られる可能性があることから、化粧品への展開が急速に進められている。しかし最近、ナノフラーレンが体外から体内に侵入し、循環血中を介して脳組織に移行し、傷害性を示すことなどが判明しつつあり、ようやく有用性や話題性のみが先行していたナノマテリアルの危険性に目が向けられるようになってきた。そのため厚生労働行政においては、ナノマテリアルの社会受容の促進や国民の健康と福祉の向上の観点から、経皮曝露されたナノマテリアルの健康への影響を評価出来る新たな試験法の開発やその有害性発現メカニズムの解明が緊急課題となっている。この点本申請研究は3年間で、種々物理化学的特性を有する量子ドット(QD)やフラーレン、酸化チタン、カーボンナノ粒子、PLGA ナノ・コンポジット粒子などのナノマテリアルの皮膚中・体内動態を解析(トキシコキネティクス)し、これらの特定蓄積部位(皮膚および各組織)における毒性発現を、各組織細胞や各人工組織を用いた障害性試験や皮膚刺激性試験、皮膚感作性試験、皮膚光刺激試験、皮膚性状(角層バリア機能、角層水分量、皮膚組成など)試験、アレルギー・炎症試験と共に、形態学的な毒性病理解析により検討し、さらにトキシコプロテオミクス解析により毒性発現マーカーの同定や毒性発現メカニズムの追求を行う

ものである。即ち本研究は、未だ明らかとなっていない“ナノマテリアルの物理化学的特性”と“皮膚中・体内挙動(組織分布)”、“経皮毒性(皮膚局所および蓄積組織)”との連関を明らかとするものであり、将来的にはナノマテリアルの物理化学的特性から経皮毒性を予測できる画期的システムの開発に直結するものである。さらに経皮毒性マーカーの同定により、ナノマテリアルの毒性発現メカニズムの解明や新規経皮毒性評価法の確立を達成するものと位置づけられる。従って本研究成果は、我が国のナノ産業の進展のみならず、国民の保健・医療・福祉の向上に大きく貢献するものである。そこで本研究では、既に実用化されているナノシリカおよびその蛍光標識体を標準ナノマテリアルとして用い、①種々物性(H19年度:サイズ、H20年度:表面電荷、H21年度:親水-疎水バランス)と経皮曝露後の皮膚内・体内(肝臓・脳)・細胞内挙動の連関をトキシコキネティクス解析すると共に、②これら組織(皮膚・肝臓・脳など)・細胞での安全性をトキシコプロテオミクス等により *in vivo* および *in vitro* 評価し、物性-動態-毒性の連関を明らかとすることを目指している。そのうえで最終的に、ナノマテリアルの物性から経皮曝露後の動態・毒性(リスク)を予測できるシステムの開発を行い、酸化チタンやフラーレンなどの実用化済みサンプルを用いてバリデーションを考慮していくことを目標にしている。

本観点から、平成 19 年度は、表面非電荷のナノシリカを用い、サイズと動態、毒性との連関解明を、細胞レベル、実験動物レベル(マウス)、ヒトモデル(ブタ皮膚実験)で検討し、70 nm のナノシリカが皮膚から血中、細胞内、さらには核内へ移行することを見出すなど、初めての興味深い知見を数多く得た。

B.研究方法

B-1:香粧品材料としてのナノマテリアルの経皮リスクに関する研究

1. ナノシリカ(SP)

本研究では、マイクロモッド社より販売されている粒径 70 nm、300 nm、1000 nm の Red-F 標識ナノシリカ (SP-Red : sicastar®red-F)、DY676 標識ナノシリカ (SP-DY)、FITC 標識したナノシリカ (SP-FITC) および未標識のナノシリカ (SP) を用いた。各粒径の SP の水溶液中での粒径は、動的光散乱法に基づいて ZetaSizer nano (Malvern Instruments) により計測した。また、同時に表面電位 (Z 電位) も測定した。

2. 培養皮膚細胞株 (HaCaT) に対する細胞傷害性試験

96 穴プレートに HaCaT 細胞を 1.0×10^4 cells/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。段階希釈した 70 nm SP-Red (SP-Red70)、300 nm SP-Red (SP-Red300)、1000 nm SP-Red (SP-Red1000) を細胞培養溶液に滴下し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。その後、 $[^3\text{H}]$ -thymidine cocktail (PerkinElmer, Inc., USA) $1 \mu\text{Ci}/20 \mu\text{L}$ で細胞培養培地に添加し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 6 時間培養した。Combi-12 Cell Harvester (Molecular Devices, USA) を用いて細胞をガラスフィルターに回収した後、細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -thymidine 量を液体シンチレーションカウンター (Hewlett Packard, USA) を用いて測定した。細胞を完全に回収するため、1 度セルハーベスターを通した細胞培養プレートに 1 mM トリプシン/EDTA を加え、10 分間インキュベーションした後、再度セルハーベスター処理を行った。なお、細胞増殖率は PBS を添加した群の値をコントロール (100%) として算出した。

3. ヒト三次元培養皮膚 (LSE) を用いた皮膚透過実験

SP-Red70、SP-Red300、SP-Red1000 を 25 mg/ml に調製し、必要に応じてミリスチン酸イソプロピル (Nacalai Tesrue Inc., JAPAN) を終濃度 5% となるように混合した。ドーナツ型のシリコンリング (TOYOBO. Co. Ltd., JAPAN) にシリコンを薄く塗り、シリコン塗布面を下にして LSE (TOYOBO. Co. Ltb., JAPAN) 中央部に接着させた。その後、6 穴アッセイトレイに 1.2 ml PBS を添

加し、その上に LSE が載せたトランスウェル (TOYOBO. Co. Ltd., JAPAN) を移した。シリコンリング中央部へ各種ナノシリカを $100 \mu\text{L}$ 添加し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 9 時間培養した。その後、LSE を載せたトランスウェルを 6 穴アッセイトレイからはずし、PBS で 3 回 wash することで LSE 表面に付着した SP を完全に取り除いた。SP 塗布部の LSE をトランスウェルから 8mmφパイオプシーパンチ (TOYOBO. Co. Ltd., JAPAN) を用いて回収した。そして SP の皮膚透過性を LSE、ならびにアッセイトレイに残存した PBS 溶液を用いて、蛍光顕微鏡によるナノシリカの透過像観察、皮膚モデル中の SP の検出 (Flowcytometry)、SP の透過量測定を実施した。

4. ブタを用いた血中移行性ならびに皮膚・生体毒性に関する検討

SP-FITC70、SP-FITC300、SP-FITC1000 を 25 mg/mL に調製し、必要に応じてミリスチン酸イソプロピル (Nacalai Tesrue Inc., JAPAN) を終濃度 5% となるように混合した。体重 35 kg 付近の系統間三元交雑豚 (LWD; IVTeC Co., Ltd, JAPAN) の耳の内側に各種ナノシリカを 1 mL、21 日間連続塗布した。その後、系統間三元交雑豚を「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」に基づいて安楽死させた後、血清、耳、肝臓を回収した。その後、回収した臓器を用いて SP の皮膚透過性 (血中移行量の定量)、皮膚、肝臓切片の蛍光顕微鏡観察による SP の透過像観察を実施した。

B-2:トキシコキネティクス解析によるナノマテリアルの安全性評価

1. SP の細胞傷害性評価

ヒト不死化ケラチノサイト HaCaT あるいはランゲルハンス細胞株 XS52 (Dr. Takashima, The University Toledo より分与) を 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、24h 後に各濃度の SP-RedF あるいは SP-DY676 を添加した。18h 後 $[^3\text{H}]$ -thymidine を $1 \mu\text{Ci}/\text{well}$ 添加し、さらに 6h 培養後、セルハーベスターにより細胞を回収し、放射活性をシンチレーションカウンター (TopCount NXT, PerkinElmer) により測定した。

2. SP の in vivo 急性毒性の評価

Balb/c マウス(雌 8 週齢)に 70、300、1000 nm 径の SP-Red を 2 mg/head で静脈内投与し、24 時間後までの死亡率で急性毒性を評価した。

3. SP のトキシプロテオーム解析

HaCaT 細胞を 150 ϕ ディッシュに播種し、各粒径の SP-Red を 100 μ g/ml となるように添加し、24h 共培養した。その後細胞をセルスクレイパーで回収し、2D-DIGE 細胞溶解液に懸濁、さらに超音波処理を行うことで蛋白質を抽出した。2D-Quant Kit により蛋白質量を定量し、SP 無処理、70、1000 nm の SP 処理群について 2 次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE)解析(pI レンジ 3-10, 12.5% SDS)によりプロテオームの変動を比較した。また、核を単離して、オルガネラレベルでのプロテオームの変動も同様に 2D-DIGE により解析した。

4. In vivo imaging による SP の体内動態挙動解析

SP の in vivo 動態のトレースには、生体透過性の高い波長の蛍光を発する DY676 標識 SP(SP-DY)を用いた。アルファルファ・フリーの飼料で飼育したヌードマウス(Balb/c, nu/nu)に粒径 70、300、1000 nm の SP-DY (それぞれ SP-DY70、SP-DY7300、SP-DY1000)を 7 \times 10¹⁰ particle/head で静脈内投与し、イソフルラン麻酔下で経時的に in vivo imaging system (IVIS 200, Xenogen Inc.)で解析した。

B-3: ナノマテリアルの細胞傷害性評価並びにその誘導機序に関する研究

1. マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 ならびに樹状細胞株 DC2.4 における細胞傷害性評価

RAW264.7 細胞は 10%ウシ胎児血清(FCS)及び抗生物質を含む DMEM にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96 穴プレートに 1 \times 10⁴ cells の RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、SP-Red70、SP-Red300、SP-Red1000 を 0.8、4、20、100 μ g/ml(最終濃度)で作用させた。24 時間または 72 時間培養を行った後、メチレンブルーあるいは WST 法をもちいて細胞生存率を測定した。

2. RAW264.7 細胞における SP-Red の取り込み

96 穴プレートに 1 \times 10⁴ cells の RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、SP-Red70、

SP-Red300、SP-Red1000 を 20、100 μ g/ml(最終濃度)で作用させた。24 時間培養後、蛍光顕微鏡(BZ-8000、KEYENCE)により細胞を観察した。

3. SP 作用により誘導されるオートファジーに関する検討(MDC 染色)

96 穴プレートに 1 \times 10⁴ cells の RAW264.7 細胞を播種し、37°C 飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、SP70、SP300、SP1000 を 100 μ g/ml(最終濃度)で作用させた。8 時間培養後に MDC(Sigma)を 12 μ M(最終濃度)、10 分間、37°C 作用させた。溶液を除去後、3% paraformaldehyde で 30 分固定、洗浄した後、蛍光顕微鏡(BZ-8000、KEYENCE)により細胞を観察した。また、ポジティブコントロールとして RAW264.7 細胞にオートファジーを誘導することが報告されている、LPS(Sigma)(100 ng/ml)と ZVAD(Calbiochem)(50 μ M)を併用した群についても同様に検討した。

4. SP 作用により誘導されるオートファジーに関する検討(GFP-LC3)

96 穴プレートに 1 \times 10⁴ cells の RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、OPTI-MEM(Sigma)中で Lipofectamine 2000(Invitrogen)を用い pEGFP-LC3(大阪大学微生物学病研究所 吉森先生より供与頂いた)を 200 ng/well で細胞へトランスフェクションした。24 時間培養後に培地を除去し、SP70、SP300、SP1000 を 100 μ g/ml(final 濃度)で作用させた。12 時間後に蛍光顕微鏡により細胞を観察した。また、ポジティブコントロールとして RAW264.7 細胞にオートファジーを誘導することが報告されている、LPS(100 ng/ml)と ZVAD(50 μ M)を併用した群についても同様に検討した。

5. 神経幹細胞における細胞傷害性並びに取り込みに関する検討

神経幹細胞は DMEM/F12(GIBCO/BRL)を基本培地とし、EGF、bFGF 等の各種添加剤を加えて継代培養に用い、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96 穴プレートに 2 \times 10⁴ cells の神経幹細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、SP70、SP300、SP1000 を 20、100 μ g/ml(最終濃度)で作用させた。24 時間または 72 時間培養

を行った後、WST-1を20 μ l/wellで添加し、6時間37°Cで培養後、吸光度(455-600 nm)を測定した。また、各シリカ作用後24時間後の細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

6. 血管内皮細胞における細胞傷害性並びに取り込みに関する検討

ヒト脳血管内皮細胞(HuBME)、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HuVEC)、ヒト皮膚血管内皮細胞(HuADM)、ヒト肺血管内皮細胞(HuLME)は、抗生物質を含むCS-C培地にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。なお、細胞培養にはコラーゲンコートされた器材を使用している。96穴プレートに 5×10^3 cellsのHuBME、HuVEC、HuADM、HuLME細胞を播種し、37°Cあるいは4°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で24時間培養を行った後、培地を除去し、SP70、SP300、SP1000を0.8、4、20、100 μ g/ml(final濃度)で作用させた。24時間または72時間培養を行った後、25%グルタルアルデヒドにて細胞を固定した。洗浄後0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色し、96穴プレートを洗浄・風乾した後、0.33 N HClによりメチレンブルーを溶出させた。吸光度(655-415 nm)を測定し、比活性を評価した。また、各SP作用後24時間後の細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

7. 血管内皮細胞のIL-8産生に関する検討

96穴プレートに 5×10^3 cellsのHuBME、HuVEC、HuADM細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で24時間培養を行った後、培地を除去し、SP70、SP300、SP1000を20、100 μ g/ml(最終濃度)で作用させた。24時間培養した後、培養上清を回収、200倍に希釈してIL-8 ELISA kit(R&D Systems)にてIL-8量を測定した。なお、ポジティブコントロールとしてリコンビナントhuman TNF- α (hTNF- α :10 ng/ml)、LPS(30、300 ng/ml)作用群も測定した。

B-4: 電子顕微鏡によるナノマテリアルの細胞内局在性および細胞毒性に関する研究

1. サンプル調製

ナノマテリアルの毒性試験の開始に当たり、本年度は各種サイズのナノ酸化チタンとSPの形状と凝集性について電顕で観察した。酸化チタンは粒子径5 nm、30~40 nm、10 \times 40 nm、5 μ m、50 μ mのサイズの5種類

について、それぞれ0.1%の割合で蒸留水、コーン油あるいは0.1 Mリン酸緩衝液にて懸濁し、超音波発生装置で20分間処置した。その後10分間静置し、親水化処理したグリッドメッシュに検体液を載せ電顕で観察した。SPは表面未修飾の粒子で直径70 nm、300 nm、1000 nmの3種類を用いた。それぞれ0.1%の割合で蒸留水にて懸濁し、超音波処理をせずに親水化処理したグリッドメッシュに検体液を載せ電顕で観察した。5 nmおよび30~40 nmの酸化チタンは粒子状、10 \times 40 nmの酸化チタンは針状を呈し、いずれも凝集が観察された。5 nmおよび50 nmの酸化チタンはサイズにバラツキが見られ、形状も一定ではなく多面体を呈していた。SPはいずれもほぼ表示通りの大きさで、球面体を呈し、凝集はほとんど観察されなかった。

2. SPの細胞内動態解析

SP-Red70、SP-Red300、SP-Red1000を培養液中にそれぞれ30 μ g/mlおよび100 μ g/mlの割合でスライドガラス上に培養した正常表皮細胞(HaCaT細胞)に処置した。対照は無処置とした。培養細胞は処置24時間後、冷2.5%グルタルアルデヒド液で1時間固定後、0.1 Mリン酸緩衝液で洗浄し、1%四酸化オスミウムで30分間後固定し、上昇エチルアルコールで脱水した。常法に従い、エポキシ樹脂で包埋し、熱重合により硬化させた。

3. 電子顕微鏡を用いたSPの生体内動態解析

BALB/cマウス(雌性、5-10週齢)に各粒子径のSP-Redを投与し、in vivoにおける局在性および細胞内取り込み、細胞毒性について電顕で観察した。各SPは注射用水に懸濁し、投与量10、30、100 mg/kg、対照として注射用水のみをそれぞれマウス各2匹に尾静脈内から投与した。投与24時間後、フェノバルビタールで麻酔・屠殺し、肝および肺を摘出し、直ちに冷2.5%グルタルアルデヒド液で2時間固定し、0.1 Mリン酸緩衝液で洗浄後、1%四酸化オスミウムで1時間後固定した。常法に従いエポキシ樹脂で包埋した。熱重合で硬化した標本をダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、無染色あるいは酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛の二重電子染色後、電顕で観察した。

B-5: SPの肝臓に対する安全性に関する研究

1. SP 単回投与が肝臓に与える影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、SP-Red70 を 25、50、75、100 mg/kg b.w.、SP-Red300・SP-Red1000 は 100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。SP は注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には注射用水のみを同量投与した。投与 24 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40 分間室温で放置後、4°C、6000 rpm、10 min で遠心分離を行い、上清を血清として回収した。SP の肝臓への影響を評価するため、肝傷害の指標として血清中の Alanin aminotransferase (ALT) 活性の測定を行った。また腎傷害のマーカーとして血清中の Blood urea nitrogen (BUN) 値の測定を行った。

2. SP 依存的肝傷害の用量依存性に関する検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、SP-Red70 を 0~60 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。SP は注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。投与 12 時間後に心採血により血清を回収した。また、脱血後、肝臓を採取した。SP の肝臓への影響を評価するため、肝傷害の指標として血清中の ALT 値の測定を行った。加えて、血清中の炎症性サイトカインである IL-6、TNF- α 濃度、また BUN 値を測定し、さらに肝臓の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、組織傷害を観察した。

3. 腎・肺・脾臓の組織傷害の観察

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、SP-Red70 を 30 mg/kg、SP-Red300 あるいは SP-Red1000 を 100 mg/kg の用量で尾静脈内に単回投与した。SP は注射用水を用いて希釈し、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には注射用水のみ等量投与した。投与 24 時間後に脱血後、腎臓、肺、脾臓また肝臓を採取し、HE 染色を行い、組織レベルでの傷害を解析した。

4. 非標識 SP 単回投与による肝臓に対する検討

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、非標識 SP70、SP300、SP1000 を 30、50 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に単回投与した。SP は注射用水を用いて希釈し、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には注射用水のみを同量投与した。投与 24 時間後に心採血により血清を回収した。SP の肝臓への影響を評価するた

め、肝傷害の指標として血清中の ALT 値と BUN 値の測定を行った。

5. SP 投与による炎症性サイトカインの発現

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、SP-Red70 を 30 mg/kg b.w.、SP-Red300 あるいは SP-Red1000 を 100 mg/kg b.w. 尾静脈内に単回投与した。SP は注射用水を用いて希釈し、4 mL/kg b.w. の投与量で投与した。Control 群には同量の注射用水を投与した。投与 3、6 時間後に心採血により血清を回収した。SP の肝臓への影響を評価するため、血清中 IL-6、TNF- α 濃度の測定を行った。

6. 四塩化炭素の肝毒性に対する SP の影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、四塩化炭素を 0.005 mL/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて SP-Red70 を 20、30 mg/kg b.w.、SP-Red300 あるいは SP-Red1000 を 100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。SP は注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の投与量で投与し、Control 群には同量の注射用水を投与した。投与 24 時間後に心採血により血清を回収した。肝傷害の指標として血清中の AST、ALT 活性の測定を行った。

7. パラコート・シスプラチン依存的肝毒性に対する SP の影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウスに、パラコートを 50 mg/kg b.w. 用量で腹腔内に投与し、続いて SP-Red70 を 10、20、30 mg/kg b.w.、SP-Red300 あるいは SP-Red1000 を 40、100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。また、シスプラチンは 100 μ mol/kg b.w. の用量で腹腔内に投与し、続いて SP-Red70 を 30、40 mg/kg b.w.、SP-Red300 あるいは SP-Red1000 を 40、100 mg/kg b.w. の用量で尾静脈内に投与した。SP は注射用水を用いて希釈後、4 mL/kg b.w. の投与量で投与し、Control 群には同量の注射用水を投与した。投与 24 時間後に血清を回収し、ALT 活性の測定を行った。

8. 肝実質細胞に対する SP の影響

8~9 週齢の雄性 BALB/c マウス(雄、8W)より肝実質細胞をコラゲナーゼ灌流法により採取した。96 穴プレート(FALCON)に肝細胞(5 \times 10³ cells/well)を播種し、細胞播種 6 時間後に粒径 70 \cdot 300 \cdot 1000 nm の SP-Red を濃度 0.1、1.0、10.0、50.0、100 μ g/ml を添加した。添加

の際の培養液はWilliam's Medium Eを用いた。SP添加24、48時間後にWST法により生存細胞数を測定した。

9. Tight junction (TJ)に対するナノシリカの影響

96穴プレート(FALCON)にCaco2細胞(1×10^4 cells/well)を播種し、細胞播種24時間後に粒径70・300・1000 nmのSP-Redを濃度0.1、1.0、10.0、50.0、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した。添加の際の培養液はDMEMを用いた。ナノシリカ添加24、72時間後にWST法(細胞測定キットSF、ナカライ)により生存細胞数を測定した。さらに、Caco2細胞をTranswell(Corning)に播種し、TER値を安定後、粒径70・300・1000 nmのSP-Redを100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加し、添加6、12、18、24時間後のTER値を測定した。

B-6: ファージ表面提示法を用いたトキシプロテオミクス解析法の確立

1. In vivo ピオチン化法の確立に向けた基礎検討

膜タンパク質および細胞外マトリクス等を標的としたトキシプロテオミクス技術の修得に際し、①細胞レベルでのナノトックス解析ではなく、ナノマテリアルの個体レベルでの健康影響(安全性/毒性)を評価・解析すること、②リスクマーカーの同定を行うため、プロテオミクス解析に基づいたプロテインデータベースが高度に充実していることを必須条件とした結果、マウスをモデル動物として利用することとした。細胞膜タンパク質、および細胞外マトリクスの発現挙動の解析には、ダリオ・ネリ教授が先駆けて独自開発した、in vivo biotinylation methodを活用し、細胞膜および細胞外マトリクスの発現挙動の変化をプロテオーム解析した。マウスをピオチン化試薬により還流した後、Tris溶液にて、未反応のピオチン化試薬をクエンチングし、ピオチン化された組織を回収した。回収した組織を、手早く液体窒素にて凍結し、 -80°C にて保存した。また同時に、組織染色用にマウント剤に組織を入れ、凍結切片作製用組織を -80°C にて保存した。その後、還流後のピオチン化ラベル組織を用いて、タンパク質を精製し、プロテオーム解析に値するサンプル調整を試みた。

C. 研究結果

以下のDの項に結果および考察として記載。

D. 考察

D-1: 化粧品材料としてのナノマテリアルの経皮リスクに関する研究

1. 培養皮膚細胞株(HaCaT)に対する細胞傷害性試験

当初、培養皮膚細胞に対する細胞傷害性を評価するための系として、non-RIのバイアピリティ測定法であるWST-8 assay、LDH-release assayにより検討を行った。しかしながら、WST-8 assay、LDH-release assayの両者では、吸光度の値に、高濃度の粒子が影響を与えるという結果であった。そこで、吸光度ではなく、RIを使用する方法として、 $[^3\text{H}]$ -thymidine uptake assayを選択し、検討を行うこととした。

粒子径の異なるSP-Red(70 nm、300 nm、1000 nm)を細胞に作用させ、24時間後の生存率を評価したところ、全ての群において、粒子量依存的な細胞傷害性が観察された(図1)。しかしながら、その傷害の度合いは各群で異なっており、70 nm > 300 nm > 1000 nmの順であった。本結果は、培養細胞に与える細胞傷害に対して、粒子径依存性が存在することを示唆するものと考えられる。

2. ヒト三次元培養皮膚(LSE)を用いたSP-Redの皮膚透過実験

ヒト三次元培養皮膚(LSE)に対する皮膚透過試験は、70 nm、300 nm、1000 nmのSP-RedをLSE上に添加し、以下の3項目について、評価を行った。①LSEの凍結切片を作製し、皮膚内部に含まれる蛍光標識SPを蛍光顕微鏡により観察する。②LSEを組織溶解剤で溶かし、単細胞を単離した後、細胞内に含まれる蛍光標識SPをフローサイトメトリーにより検出する。③LSE下部へ透過した蛍光標識SPの量を、PBS中の蛍光強度を測定することにより概算する。

なお、本実験では、化粧品の基剤として用いられ、皮膚への化粧品の浸透性を高めるとされる、ミリスチン酸イソプロピル(IPM)を併用した群を取り、その影響についても評価した。回収したLSEの凍結切片を作製し、顕微鏡により観察した(図2)。その結果、IPM非適用群では70 nm、300 nm、1000 nm全ての群で、SP-Redの透過像は観察されなかった。一方IPM適用群では、全ての群にて蛍光が観察された。これは、IPMが経皮吸収促

進効果を示したものと考えられた。粒子径の違いによる局在の変化については、1000 nm、300 nm の群では、主に蛍光は角質に留まり、皮膚深部まで到達したものは比較的少量であった。一方、70 nm の SP を作用させた群では、角質にほとんど蛍光は観察されず、主に皮膚深部に観察された。この実験に使用した SP の単位重量あたりの蛍光強度は、70 nm : 300 nm : 1000 nm = 1 : 4 : 12 であったことから、SP-Red70 は効率よく皮膚を透過する可能性が示唆された。

3. 皮膚モデル中の SP の検出 (FCM)

回収した LSE をコラゲナーゼ処理により溶解し、単細胞とした。その後、その細胞をフローサイトメトリーにより解析した結果、IPM 作用群、未作用群ともに、十分な蛍光を観察することはできなかった。これは、SP-Red の蛍光強度が弱く、十分な感度を得られなかったこと、あるいは、細胞内に取り込まれた SP は微量である可能性が考えられた。いずれにせよ、現段階では、SP の皮膚透過性をフローサイトメトリーで評価するのは、困難であると考えられた。

4. SP の透過量測定

LSE を透過した SP は、下部のウェル内の PBS 中に移行する。そこで、PBS 中の蛍光強度を測定することで、透過量を算出した(図 3)。その結果、IPM の有無に関わらず、SP-FITC70 での LSE の透過が観察された。一方、SP-FITC300、SP-FITC1000 では、全く透過は観察されなかった。今回の検討では、n=3 で行ったものの、70 nm シリカでも透過するものとしめないものとの 2 パターンに別れた。これは、LSE のロットのばらつきによるものと考えられるが、少なくとも、300 nm、1000 nm のもので透過が観察されなかったことを加味すると、SP-FITC70 は皮膚を透過する能力があるものと示唆される。なお、IPM の効果に関しては、今回の検討のみでは議論することができない。今後は、より n 数を増やした実験を行うことによって信頼性の高いデータを蓄積する。

5. ブタを用いた血中移行性、ならびに皮膚・生体毒性に関する検討

ヒトの皮膚と構造が類似すると考えられているブタの皮膚を用い、SP-FITC70、SP-FITC300、SP-FITC1000 の *in vivo* 皮膚透過性を評価するため、ブタの耳に対し、21 日間に渡り、1 日 1 回の連続塗布を行った。21 日後

の塗布が完了したブタを解剖し、耳、血清、ならびに肝臓を回収し、以降の実験に供した。回収した血清を希釈し、その蛍光強度を測定することで、皮膚へ塗布したナノシリカの血中への移行性を評価した(図 4)。SP-FITC300、SP-FITC1000 を塗布したブタ血清からは、蛍光は検出されず、これらの SP は血中まで到達できなかった可能性が示唆された。一方、SP-FITC70 を塗布したブタ血清には、投与量の実に 1.7% が残存していることが明らかとなった。今回の実験では、21 日間連続塗布の後の血清を回収しているため、他の臓器への分布や生体からの排泄に関する情報は得られなかったが、少なくとも、皮膚に塗布された SP は、血中へ高い割合で移行することが明らかとなった。今後は、経日的に血清を回収するなどの実験を行うことにより、その SP の血中への移行、残存率などの詳細を評価する予定である。

また、回収した耳、ならびに肝臓の組織切片を作製し、ナノシリカの局在を観察した。プレリナリーな結果ではあるが、耳の切片では、70 nm の SP で強い蛍光が観察された。また、LSE の検討と一致して、皮膚深部まで到達していることが明らかとなった(Data not shown)。今後は、肝臓等の切片を詳細に観察することで、血中への移行後の、臓器分布、生体への影響を検討する予定である。

D-2: トキシコキネティクス解析によるナノマテリアルの安全性評価

1. SP の細胞傷害性評価

化粧品添加物としての SP の毒性を評価する目的で、まず粒子径 70、300、1000 nm の SP 存在下で培養した際のケラチノサイト HaCaT に対する細胞傷害性を ³H-thymidine の取り込みで評価した。その結果、SP-Red、SP-DY のいずれの粒子を作用させた細胞においても濃度依存的に細胞増殖の阻害が認められた(図 4)。また、粒子径による明確な違いは認められなかった。次に、皮膚ランゲルハンス細胞株 XS52 に対する影響を検討したところ、粒子径に依存した細胞増殖抑制効果を示し、70 nm 径の粒子が XS52 に対して最も高い細胞毒性を示した(図 5)。XS52 細胞での IC50 値は 70 nm: 4.2 μg/ml, 300 nm: 32.6 μg/ml, 1000 nm: 75.0

μg/mlであった。

2. ナノシリカの in vivo 急性毒性の評価

SP の in vivo 急性毒性を評価するため、マウスに SP-Red を静脈内投与し、その後の生死を観察した。その結果、1000 nm および 300 nm 径の SP-Red を 2 mg/head 投与しても死亡例は認められなかったが、70 nm 径の SP-Red 投与群では 18 時間までに 3 例中 3 例が死亡した(図 7)。

3. SP のトキシコプロテオーム解析

各粒子径の SP の細胞に及ぼす影響を詳細に解析するために、SP-Red を作用させた HaCaT 細胞のプロテオーム変化を 2D-DIGE 法により解析した。無処理細胞と 70 nm、1000 nm 径の SP-Red を作用させた細胞で whole cell プロテオームを比較した結果、SP-Red70、SP-Red1000 作用により発現上昇が認められた蛋白質スポットがそれぞれ 25 個、17 個、発現減少が認められたスポットが 8 個、6 個検出された(図 8)。また、SP-Red70 作用細胞で SP-Red1000 作用細胞よりも発現上昇していたスポットが 23 個、減少していたスポットが 10 個検出された。さらに、細胞内動態観察によって SP-Red70 が核に移行することが示唆されたことから、核を単離してオルガネラレベルでのプロテオームを解析した。その結果、SP-Red70、SP-Red1000 作用により発現上昇が認められた蛋白質スポットがそれぞれ 147 個、119 個、発現減少が認められたスポットがいずれも 50 個検出された(図 8)。また、SP-Red70 作用細胞で SP-Red1000 作用細胞よりも発現上昇していたスポットが 4 個、減少していたスポットが 3 個検出された(図 9)。これら蛋白質スポットについて、質量分析法による同定を進めている。

4. In vivo imaging による SP の体内動態挙動解析

経皮適用されたナノマテリアルが皮膚を透過すると全身循環に入ることになる。そこで、SP が静脈内投与した場合の体内挙動の解析を行った。生きたマウスでの経時的な観察を可能とするよう、蛍光色素 Dy676 標識 SP (SP-DY)を用いて in vivo imaging system(IVIS 200, Xenogen Inc.)により計測を行った。SP-DY70、SP-DY300、SP-DY1000 いずれも静注後 3 時間には肝臓に集積する傾向が観察され、その後 6 時間、24 時間でも同様であった(図 10)。さらに詳細な解析のために

24 時間後に安楽死させ、開腹して臓器分布を評価したところ、肝臓および、特に胆嚢で強い蛍光が観察され、糞便中にも蛍光が認められた(図 11)。

5. SP の粒子径測定

Zeta-sizerを用いて動的光散乱法による SP の物理化学的特性の評価を試みたところ、粒子径はほぼカタログ値に近い値として計測された(図 12)。製品ロット間、あるいは蛍光標識の種類によっても、粒子径の値に差が認められた。Z 電位は非標識 SP、SP-Red、SP-DY で大差は認められず、ほぼ非電荷であると考えられた。

D-3: ナノマテリアルの細胞傷害性評価並びにその誘導機序に関する研究

1. SP が抗原提示細胞株に与える影響

ナノ粒子はあらゆる経路で生体内に取り込まれる可能性がある。化粧品や医薬品として使用される場合は経皮・静脈内経路で、大気汚染物質としてのナノ粒子は、経鼻・経肺経路などで取り込まれるものと考えられる。どの経路で取り込まれた場合にも、各組織に存在するマクロファージ様細胞に貪食されることが予想される。そこでまず、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞に各濃度の SP-Red を 24 時間または 72 時間作用させた際の細胞傷害性についてメチレンブルーアッセイにて検討した(図 13)。その結果、24 時間、72 時間共に各粒子径の SP-Red において、濃度依存的な細胞死が誘導されることが判明した。特に SP-Red70 において顕著な細胞死が観察された。また、各粒子の細胞傷害性に関して、ミトコンドリアの酵素活性を指標とした WST-1 assay 並びに DNA 合成を指標とした BrdU assay にて同様に検討した(図 14)。その結果、WST-1 assay ではメチレンブルーアッセイと同様に、濃度依存的な細胞傷害性が観察された。一方、BrdU assay においては SP-Red300、SP-Red1000 作用群で傷害性は見られなかったものの、SP-Red70 作用群では強い傷害性が観察された。また、各 SP を作用後 24 時間における細胞を蛍光顕微鏡にて観察した結果、蛍光強度の強い SP-Red300 及び SP-Red1000 において、細胞内に取り込まれたと考えられるドット上の蛍光が観察された(図 15)。以上の結果から、RAW264.7 細胞は

各 SP を取り込んだ後に、何らかの機序で細胞死を誘導していることが示唆されると共に、SP-Red70 でその傾向が強いことが明らかとなった。

オートファジーは元来、細胞が飢餓状態になった際、発動される細胞応答である。一方で近年、細菌・ウイルスなどの異物が細胞内に侵入した際、これら異物を排除する目的でオートファジーが誘導されることが知られている。そこで次に、ナノ粒子が細胞に取り込まれた際、オートファジーが誘導されるか否かに関して検討した。まず、オートファジーの際に形成されるオートファゴソームを、汎用される MDC 試薬を用い検出した(図 16)。その結果、MDC 染色により、オートファジーを誘導することが知られている LPS+ZVAD 作用群と同様の染色像が、各シリカ作用群で観察された。さらに、GFP 融合 LC3(オートファゴソームのマーカー蛋白質)を発現するプラスミドをトランスフェクションした細胞を用いて、各 SP 作用後の形態観察を試みた(図 17)。その結果、各 SP 作用により、positive control である LPS+ZVAD 作用群と同様に、GFP が dot 状に観察されるというオートファゴソームの形成が確認された。以上の結果より、RAW264.7 細胞において、SP を作用することでオートファジーが誘導されることが示唆された。

一方で、生体内でマクロファージと並び異物取り込み能の高い細胞として、樹状細胞が挙げられる。そこで次に、マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞に対する各 SP の影響を細胞傷害性を指標に評価した(図 18)。その結果、RAW264.7 細胞の場合とは一部異なり、高濃度の SP-Red70 を作用した際にのみ若干の細胞傷害性が観察された。これらの細胞傷害性の違いが SP の取り込み量あるいは各細胞の性質に起因するのかが不明であり、今後の検討課題である。

2. SP が血管内皮細胞・神経幹細胞に与える影響

近年、経口投与や経肺投与において、ナノ粒子が血液を介して全身の主要臓器のみならず脳にも分布することが報告され、それらの血液脳関門の通過や生体毒性に及ぼす影響が注目されている。そこで、脳血管内皮を含む全身の血管内皮細胞や脳に存在する神経幹細胞への影響に注目して各シリカの毒性評価を試みた。まず、脳、臍帯静脈、肺、皮膚由来のヒト正常血管内皮細胞に対して各 SP が及ぼす影響を、細胞傷害性を指

標に評価した(図 19)。その結果、RAW264.7 細胞とは異なり、作用 24 時間において全く細胞死は見られなかった。また 72 時間という長期間粒子を作用させた際においても、細胞死は全く観察されなかった(図 20)。そこで SP-Red1000 を作用後 24 時間における HuBME 細胞を蛍光顕微鏡にて観察したところ、細胞内に取り込まれたと考えられるドット上の蛍光が観察された(図 21)。さらにシリカが細胞表面に吸着している可能性を除くために、エネルギー依存的な取り込み阻害条件である 4°C における細胞の形態を観察した(図 22)。その結果、37°C 条件下では見られたドット上の蛍光が、4°C 条件下では全く観察されなかったことから、HUBME 細胞はエネルギー依存的に SP を取り込んでいるものの、細胞死には至らないことが判明した。また、各 SP が炎症性のサイトカインである IL-8 の産生誘導に及ぼす影響を検討した結果、いずれの細胞においても SP 作用による IL-8 の産生誘導は観察されなかった(図 23)。今後、内皮細胞における取り込み経路や、細胞内応答の詳細を解明していくと共に、血液脳関門への影響などを評価していく予定である。

続いて、GFP を発現する神経幹細胞を用いて、各 SP が及ぼす影響を細胞傷害性を指標に検討した(図 24)。その結果、高濃度の SP を 24 時間あるいは 72 時間作用させることで、細胞傷害が誘導される傾向が見られた。さらに 24 時間後の細胞を蛍光顕微鏡にて観察したところ、蛍光強度の強い SP-Red1000 や SP-Red300 において細胞への粒子の取り込みが見られると共に、粒子作用により神経幹細胞が形成するスフェア(細胞塊)数の減少が見られた(図 25)。今後、神経幹細胞の分化に及ぼす影響を検討していく予定である。

D-4: 電子顕微鏡によるナノマテリアルの細胞内局在性および細胞毒性に関する研究

1. SP の細胞内動態解析

培養細胞を用いて SP の取り込みについて超微形態学的に観察した。培養細胞では 70 nm シリカは細胞質内に取り込まれ、核内および核小体に侵入した像が観察された(図 26)。300 nm および 1000 nm シリカは細胞質内に取り込まれたが、核内では全く観察されなかった(図 27)。1000 nm 径の SP-Red 適用群では細胞質内

への移行が認められ、また、リソソーム小胞が過形成している様子が観察された。

2. SP の生体内動態解析

動物実験におけるマウス肝組織では SP の投与用量に拘わらず全ての投与群でクッパー細胞に多数のナノシリカが貪食されていた。しかし、SP-Red70 は肝細胞質内に侵入し、僅かであるが核内にも侵入した像が観察された(図 28)。また、SP-Red70 を 100 mg/kg 投与したマウスでは肝細胞に小管状物質の顕著な増生やミトコンドリア内に沈着物が観察された(図 29)。一方、SP-Red300 および SP-Red1000 はクッパー細胞に貪食されており、肝細胞質内に侵入した像は観察されなかった(図 30)。肺組織では SP-Red 70 のみが肺胞上皮 II 型細胞や毛細血管の内皮細胞に侵入した像が観察された(図 31)。

今回、各種の酸化チタンを電顕で形状観察した結果、凝集性が強いことが明らかになった。このような凝集したナノマテリアルはナノマテリアルというよりマイクロマテリアルとなり、動物実験に用いた場合、本来の毒性作用が異なった結果として評価されることが考えられた。そのようなことから鑑みて実験に用いる場合と同じ条件でナノマテリアルをその都度、電顕での直接確認が必要かと思われた。一方、SP は凝集がほとんど見られなかったことから毒性試験に用いた。SP はサイズの異なる 70 nm、300 nm、1000 nm の 3 種類について *in vitro* および *in vivo* の実験で細胞内への侵入、局在性および細胞毒性について検討した。サイズの小さい SP-Red70 のみが *in vitro* のみならず *in vivo* でも肝細胞質や核内に侵入し、細胞毒性も誘発された。また、肺においても SP-Red70 のみが肺胞上皮細胞や毛細血管の内皮細胞に侵入することが判明した。一方、SP-Red300 および SP-Red1000 は培養細胞に取り込まれるが、動物実験では貪食細胞にほとんど捕捉されており、異物として認識されるものと思われた。一方、70 nm という粒子径は肝細胞質に容易に侵入し、さらに核内へも侵入することから、異物として認識され難い大きさであると考えられた。また、粒子径の差異による明らかな SP の局在性の違いが見られたことから、SP の侵入あるいは局在・蓄積する部位に依存して細胞毒性が誘発されるものと思われた。

D-5: ナノマテリアルの肝臓に対する安全性に関する研究

1. SP 単回投与による肝傷害

SP-Red70 を 50、75、100 mg/kg 投与 24 時間後、これら 3 種類の dose で投与されたマウスはほとんどが死亡し、50 mg/kg 投与群において 1 匹生存しているのみであった。このため、SP-Red 70 50 mg/kg 投与群では、生存していた 1 匹のマウスのみから血液サンプルを回収し、血清中の ALT 値の測定を行った。図 32 にナノシリカ投与 24 時間後の血清中の ALT 活性の測定結果を示した。SP-Red70 投与群では AST 値・ALT 値共に Control 群と比べて増加していた。一方、SP-Red300・SP-Red1000 投与群では、ほとんど血清 ALT 値が増加していなかった。腎傷害の指標として、血清中の BUN 値を測定した。BUN は、血中の尿素窒素のことであり、腎臓に傷害が起ると血中に溜まる物質である。そのため、BUN の血中濃度は腎傷害のマーカーとして一般的に用いられている。図 33 に結果を示した。SP-Red70 投与群の血清 BUN 値は、Control 群と比較し、低かった。これは肝傷害によるためだと考えられる。SP-Red300・SP-Red1000 投与群では、ほとんど血清 BUN 値が増加していなかったことから腎障害が誘発されないことが示唆された。

2. SP 投与による急性肝傷害の用量依存性

SP-Red70 を用量 50・60 mg/kg b.w. で投与したマウスは、投与 12 時間後に 50 mg/kg b.w. 投与群において生存率 25%(4 匹中 3 匹死亡)、60 mg/kg b.w. 投与群において生存率 0%であった(4 匹中 4 匹死亡)。図 34 に SP-Red70 を 0~40 mg/kg b.w. の用量で投与 12 時間後の血清中の ALT 活性の測定結果を示した。結果、ALT 活性は用量依存的に増加していた。図 35 に SP-Red70 を 0~40 mg/kg b.w. の用量で投与 12 時間後の血清中の IL-6・TNF- α 濃度の測定結果を示した。IL-6、TNF- α 共に用量依存的に増加した。図 36 に SP-Red70 投与 12 時間後の血清 BUN 濃度の測定結果を示した。血清 BUN 値の用量依存的な減少傾向が見られた。図 37 に HE 染色結果を示した。SP-Red70 を 30、40、50 mg/kg b.w. の用量で肝細胞壊死を起こしている部位が観察された。

3. SP 単回投与による腎臓・肺・脾臓の組織傷害

図 38 に腎臓、図 39 に肺、図 40 に脾臓、さらに図 41 に肝臓の HE 染色像を示した。SP-Red70 投与群においては肝臓で傷害が見られたが、他の 3 臓器に傷害は見られなかった。また、P-Red300・SP-Red1000 投与群は、肝臓、腎臓、肺において傷害は見られなかった。SP-Red1000 投与群の脾臓において巨核球の増加が見られた。これらは、臓器において SP の集積性の違いなどが考えられるが、肝臓特異的傷害については、今後更なる解析が必要である。また、心臓、腸、脳などの他の臓器に関しても詳細な解析が必要である。

4. 非標識 SP 単回投与による肝傷害

図 42 に非標識ナノシリカ投与 24 時間後の血清 ALT 活性の測定結果を示した。SP70 投与群の ALT 活性は Control 群と比べて増加していた。一方、SP300・SP1000 投与群では、ALT 活性は増加していなかった。図 43 に非標識 SP 投与 24 時間後の血清 BUN 濃度の測定結果を示した。SP70・SP300・SP1000 投与群全てにおいて、血清 BUN 値の増加は見られず、SP70 投与群のみ減少傾向が見られた。このことより蛍光物質ではなく、SP70 により急性肝傷害が誘導されると考えられる。

5. 炎症性サイトカインの発現

図 44 に SP 投与 3、6 時間後の血清中 IL-6、TNF- α 産生量の測定結果を示した。SP300・SP1000 投与群では、血清中 IL-6、TNF- α の大きな増加は見られなかった。一方、SP70 投与群では、投与 3 時間後に血清中 IL-6、TNF- α が急激な増大を示し、6 時間後以降急速に減少していた。肝毒であるコンカナバリン A は、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインを発現誘導し、肝傷害を与えることが報告されている。SP70 によって発現する炎症性サイトカインが、急性肝障害に関与している可能性があると考えられる。

6. 四塩化炭素とパラコート、シスプラチンによる肝毒性に対する SP の影響

図 45 に四塩化炭素と各粒径の SP 同時投与し、24 時間後の血清中の AST・ALT 活性の測定結果を示した。SP70 と四塩化炭素を併用することで、四塩化炭素単独投与群と比較し、有意に AST 活性の増加が見られ、また ALT 活性も増加する傾向が見られた。しかし、

SP300・SP1000 と四塩化炭素の併用により AST、ALT 活性の有意な増大は示さなかった。この併用による増加は、四塩化炭素による AST、ALT の増加と、SP70 による増加と考えられる活性であり、四塩化炭素の肝傷害作用と SP70 による肝傷害作用により相加的に肝傷害が増加している可能性が考えられる。

図 46 にパラコートと SP を同時投与し、24 時間後の血清中 ALT 活性の測定結果を示した。SP70 の 20、30 mg/kg b.w. 投与とパラコートを併用することで、パラコート単独投与と比較し、ALT 活性が大きく増加する傾向であった。しかし、SP70 の 10 mg/kg b.w. 投与量とパラコートの併用によっても、ALT 活性の増加傾向が見られた。SP300 とパラコートの併用による ALT 活性の増加は見られなかった。SP1000 とパラコートの併用により単独投与群と比較し、わずかに ALT 活性が増加する傾向であった。SP の併用によりパラコートの毒性が増強された原因として考えられることは、SP が細胞内において ROS 誘導作用があり、パラコートとの ROS 誘導作用を促進し、細胞内の ROS 産生が進行し、より強力な急性肝傷害を引き起こしたと考えられる。SP による肝臓における ROS 誘導作用は、今後、解析する必要があると考えられる。

シスプラチンと SP70 を 30、40 mg/kg b.w. で同時投与し、24 時間後、これらの用量で投与されたマウスは全て死亡した。図 47 にシスプラチンと SP 同時投与し、24 時間後の血清中 ALT 活性の測定結果を示した。SP1000 とシスプラチンを併用することで、シスプラチン単独投与と比較し、ALT 活性の増加する傾向が見られた。一方、SP300 とシスプラチンの併用による ALT 活性の増加は見られなかった。しかし、このときの ALT 活性はそれほど高い値を示しておらず、SP70 とシスプラチンの併用によりマウスが死亡した原因は、肝臓以外の臓器または組織において致命的な毒性が発現したと考えられる。また、SP70 投与群のみマウスが死亡していることから、シスプラチンによるマウスの致命的毒性の発生は、SP 特異的なものであると考えられる。

7. マウス肝実質細胞に対する SP の影響

図 48 に SP を添加し、24、48 時間培養したマウス肝細胞の生存率を示した。生存率は、添加していない Control 群を 100% とし、各粒径の SP を添加したときの

細胞生存率を示した。各粒径の SP を 1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて添加した肝細胞の生存率は、コントロール群と同等であり、細胞毒性を示さなかった。各粒径の SP を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて添加した肝細胞の生存率は、コントロール群より大きく低下し、肝実質細胞に対し細胞毒性があることを示した。

8. TJ に対する SP の影響

Fig.49 に SP を添加し、24、72 時間培養した Caco2 細胞の生存率を示した。Caco2 細胞は TJ を有している細胞である。生存率は、添加していない Control 群を 100%し、各粒径の SP を添加したときの細胞生存率を示した。各粒径のナノシリカを 1、10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて添加した Caco2 細胞の生存率は、コントロール群と同等であった。このことより、SP は、Caco2 細胞に対して細胞毒性がないことが示された。図 50 に TER 値測定結果を示した。各粒径の SP を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し、添加 12、18、24 時間後の TER 値を測定した。結果、ポジティブコントロールである C-CPE 添加群は TER 値が低下したが、SP 添加群は TER 値の低下はしなかった。これらのことより、SP は *in vitro* において TJ に影響を与えないことが示された。このことより、肝実質細胞に対し、SP の直接作用における細胞傷害性は同等であると考えられる。このために、*in vivo* における SP70 特異的肝傷害は肝細胞に直接 SP が作用していないことが示唆された。今後、肝臓に対する SP の影響に対し、詳細なメカニズムの検討が必要である。

D-6: ファージ表面提示法を用いたトキシプロテオミクス解析法の確立

肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節、子宮、筋肉、胸腺など、ビオチン化された“主要な組織”を回収した。次に *in vivo* におけるビオチンラベル化の効率を評価するため、マウスから回収した組織の凍結切片を作製した(図 51)。赤で染色された部分がビオチン化された組織、青で染色された部分は、ヘマトキシリン染色された部分である。その結果、全ての組織でビオチンラベルが成功していること、一方で同一組織内でもラベル化効率に差が生じてしまうことが明らかとなった。このラベル化効率の相違は、病体組織(肝臓)を実験に供したため、その一部で正常な血管構造が破綻し、血液還流効率が局所的

に低下した可能性が考えられた。今後、ドットプロット等の方法により、組織におけるタンパク質のビオチン化効率を詳細に検討する予定である。続いて、上記臓器からのタンパク質の抽出を行った結果を表 1 および表 2 に示した。現在、この抽出タンパク質を用いて、図 52 に示した方法に従って、順次、プロテオーム解析を実施しているところである。

E. 結論

1. 70nm, 300nm, 1000nm という異なった粒子径を有するナノシリカの皮膚培養細胞に対する細胞傷害性を評価し、その傷害性に粒子径依存性を見出した。
2. ヒト 3 次元培養人工皮膚モデル(LSE)を用い、ナノシリカの透過性を評価したところ、300nm, 1000nm のナノシリカでは、透過は観察されなかったのに対し、70nm のナノシリカでのみ皮膚の透過が観察された。
3. ヒトの皮膚に構造が類似すると言われるブタを使用した 21 日間連続塗布実験を行い、ナノシリカの経皮透過特性を評価したところ、ヒト 3 次元培養人工皮膚モデルを用いた検討と同様に、70nm のナノシリカでのみ、血中への移行が観察された。
4. 3H-thymidine の取り込みによる細胞傷害性試験、透過電子顕微鏡観察、トキシプロテオーム解析、蛍光 *in vivo* imaging 法等の手法がナノマテリアルの特性評価法として有用であることが明らかとなった。
5. モデルナノマテリアルとして粒子径の異なるシリカ粒子を用いて、各種細胞に対する細胞傷害性・サイトカイン産生誘導能・オートファジー誘導能を評価した。その結果、使用した全ての細胞に対して、ナノ粒子が取り込まれていることが明らかとなった。マウスマクロファージ細胞株に対して、粒子径減少に伴い細胞傷害性を強く誘導した。また、マウス神経幹細胞に対しても細胞傷害性を誘導することが明らかとなった。一方で、4 種のヒト由来血管内皮細胞に対しては、細胞傷害性を示さなかった。更に、

マウスマクロファージ細胞株を用いた検討から、シリカはオートファジーを誘導することが明らかとなった。

- 動物実験において 70 nm シリカ投与群のみが肝細胞内や核内、さらに肺胞上皮細胞内および毛細管血内皮細胞内に観察された。生体内では 70 nm という粒子は異物として認識され難い大きさで、細胞質内に容易に侵入し、さらに核内へも侵入するものと思われた。またそれに伴い、特に肝細胞では小管状物質の増生、ミトコンドリアの変性というような細胞毒性も誘発された。しかし、300 nm および 1000 nm シリカは貪食細胞に捕捉されており、肝細胞質内には観察されなかったことから異物として認識される大きさであると考えられた。このように 70 nm シリカは 300 nm および 1000 nm シリカと比較して粒子径の差異による明らかな粒子の局在性の違いによる細胞毒性が顕著に現れるものと考えられた。
- ナノシリカをマウスの尾静脈から投与することにより、70nm ナノシリカが肝傷害を起こすことが示された。
- 肝傷害を起こす薬物とナノシリカの併用により、薬物の起こす肝傷害をナノシリカが増大させることが示された。
- ナノシリカは粒径に関係なく肝実質細胞に対し細胞傷害性があることが示された。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

G-1:論文発表

- Kamada H., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Sato M., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S. : Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain., *Biol. Pharm. Bull.*, 30(2):218-223, 2007.
- Shibata H., Kamada H., Nishibata K., Yoshioka Y., Nishibata T., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Role of amino acid residue 90 in bioactivity and receptor binding capacity of tumor necrosis factor mutants., *BBA - Proteins and Proteomics.*, 1774(8):1029-1035, 2007.
- Nomura T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Okamoto T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S. : Creation of novel cell penetrating peptide, using random 18mer peptides library., *Pharmazie*, 62(8):569-573, 2007.
- Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Yamato T., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Improved cytosolic translocation and tumor-killing activity of Tat-shepherdin conjugates mediated by co-treatment with Tat-fused membrane-disruptive HA2 peptide., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363(4):1027-1032, 2007.
- Harada M., Kondoh M., Ebihara C., Takahashi A., Komiya E., Fujii M., Mizuguchi H., Tsunoda S-I., Horiguchi Y., Yagi K., Watanabe Y. : Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Biochem. Pharmacol.*, 73(2):206-214, 2007.
- Kondoh M., Yagi K. : The claudin family as a new approach for drug delivery. *Drugs of the Future.*, 32:1-5, 2007.
- Kondoh M., Fujii M., Yagi K., Watanabe Y. : Barriology-based Strategy for drug Absorption. *Ykagaku Zasshi.*, 127(4):601-609, 2007.
- Kondoh M., Yagi K.. Tight Junction Modulator :

- Promising Candidates for Drug Delivery. *Curr. Medicin. Chem.*, 14(23): 2482-2488, 2007.
9. Harada M., Kondoh M., Masuyama A., Nakanishi T., Utoguchi N., Watanabe Y. : Effect of forskolin on the expression of claudin-5 in human trophoblast BeWo cells. *Phamizie.*, 62(4):291-294, 2007.
 10. Ebihara C., Kondoh M., Harada M., Fujii M., Mizuguchi H., Tsunoda S-I., Horiguchi Y., Yagi K., Watanabe Y. : Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin for modulation of tight junction. *Biochem. Pharmacol.*, 73(6):824-830, 2007.
 11. Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Taniai M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandeenabeele P., Aggarwal BB., Nakamura T., Yamagata Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist. *J. Biol. Chem.*, 283(2):998-1007, 2008.
 12. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Comparative Study on transduction and toxicity protein transduction domains. *Br. J. Pharmacol.*, 153(6): 1143-52, 2008.
 13. Isoda K., Kagaya N., Akamatsu S., Hayashi S., Tamesada M., Watanabe A., Kobayashi M., Tagawa Y., Kondoh M., Kawase M., Yagi K. : Hepatoprotective Effect of Vitamin B12 on Dimethylnitro osamine-Induced Liver Injury. *Biol. Pharm. Bull.* 31(2):309-311, 2008.
 14. Yagi K., Kojima M., Oyagi S., Ikeda E., Hirose M., Isoda K., Kawase M., Kondoh M., Ohgushi H. : Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine. *Ykakugaku Zasshi.*, 128(1):3-9, 2008.
 15. Hayashi S., Itoh A., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Yagi K. : Fucoidan partly prevents CCl₄-induced liver fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.*, 580(3):80-84, 2008.
 16. Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity. *J. Immunol. Methods.*, in press.
- G-2:学会発表**
1. 野村鉄也, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 鎌田春彦, 堤 康央 : 抗腫瘍活性に優れた TNF レセプター指向性変異体の創製. 第 23 回 DDS 学会, 熊本, 2007 年 6 月.
 2. 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向洋平, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : プロテオミクス創薬を志向した疾患関連蛋白質抗体の迅速単離システムの開発. 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
 3. 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : 腫瘍壊死因子- α の活性に及ぼす 90 番目のアミノ酸の影響に関する検討. 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.
 4. 阿部康弘, 野村鉄也, 鍋師裕美, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 鎌田春彦, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : フェージ表面提示法を駆使した TNFR2 指向性アゴニストの創製. 日本ヒトプロテオーム機構第 5 回大会, 東京, 2007 年 7 月.

5. 鍋師裕美, 鎌田春彦, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : 三酸化ヒ素の抗白血病治療効果発現に関連した蛋白質の探索., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
6. Tsunoda S., Mukai Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y. : A method for rapid preparation of antibodies to tumor-related proteins by the combination of phage library and 2D-DIGE., 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月.
7. 吉川友章, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 細胞膜透過性 TAT ペプチドと膜融合性 HA2 ペプチドを活用した核内高分子送達法の開発., 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月.
8. 向 洋平, 今井 直, 吉川友章, 長野一也, 中川晋作, 堤 康央, 角田慎一 : 新規抗体医薬の開発を目指した乳がん細胞特異マーカーの探索とそれらに対する網羅的抗体創製法の開発., 第57回日本薬学会近畿支部大会, 大阪, 2007年10月.
9. 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向 洋平, 吉川友章, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血栓性疾患の機能解明・治療を目指した新規抗体単離システムの構築., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
10. 長野一也, 今井 直, 杉田敏樹, 向 洋平, 吉川友章, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血栓性疾患の機能解明・治療を目指したフェージ抗体ライブラリの構築., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
11. 向 洋平, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : TNFレセプター選択的阻害剤開発を目指した TNFR2-TNF 複合体の X 線結晶構造解析., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
12. 吉川友章, 杉田敏樹, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
13. 杉田敏樹, 吉川友章, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発-2., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
14. 吉田康伸, 吉川友章, 杉田敏樹, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 新規細胞内移行ペプチドの創出と血管機能制御技術としての展開., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
15. 鍋師裕美, 鎌田春彦, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : プロテオーム解析を用いた白血病における血栓症発症に関与する蛋白質の探索., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
16. 萱室裕之, 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 吉川友章, 形山和史, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央 : Intranasal immunization with mutant TNF induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice., 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2007年11月.
17. 吉田康伸, 今井 直, 吉川友章, 杉田敏樹, 長野一也, 向 洋平, 小泉桂一, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管新生阻害剤を用いたリンパ管新生シグナル伝達経路の解析., 第80回日本生化学会大会, 横浜, 2007年12月.
18. 杉田敏樹, 吉川友章, 長野一也, 鍋師裕美, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 新規 Protein Transduction Domain peptide の細胞内 DDS キャリアーとしての特性解析., 日

- 本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
19. 阿部康弘, 向 洋平, 角田慎一, 中川晋作, 堤康央 : 創薬プロテオミクスの実現に叶う機能性人工蛋白質の迅速創出技術の開発., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
 20. 今井 直, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : 疾患関連蛋白質の同定およびこれらに対する抗体を一挙かつ短期間で網羅的作製できる抗体プロテオミクスの確立., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
 21. 鍋師裕美, 吉川友章, 杉田敏樹, 長野一也, 向 洋平, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての安全性評価(1):トキシコプロテオーム解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
 22. 吉川友章, 鍋師裕美, 杉田敏樹, 長野一也, 向 洋平, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての安全性評価(2):細胞内局在解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
 23. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 形山和史, 阿部康弘, 野村鉄也, 廣井隆親, 吉川友章, 角田慎一, 堤 康央 : 活性増強型 TNF 変異体の粘膜ワクチンアジュバントとしての応用., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
 24. 長野一也, 吉川友章, 杉田敏樹, 今井 直, 鍋師裕美, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 免疫制御技術の開発に向けた制御性 T 細胞の抗体プロテオミクス研究., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
 25. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 山本昌, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : アンタゴニスト活性を有する I 型受容体指向性 TNF 変異体の評価 (1) : 関節リウマチモデルに対する治療効果の検討., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
 26. 吉田康伸, 今井 直, 杉田敏樹, 阿部康弘, 萱室裕之, 長野一也, 鍋師裕美, 野村鉄也, 小泉桂一, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央 : 抗体プロテオミクスによるリンパ管新生関連分子の探索と機能評価に向けて., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
 27. 西森 光, 磯田勝広, 近藤昌夫, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤 康央, 八木清仁: ナノシリカの急性肝毒性と粒子径の相関., 日本薬学会第 128 年会., 東京, 2007 年 3 月.
 28. 亀井数正, 向 洋平, 小島拓記, 吉川舞, 角田慎一, 堤 康央, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作 : 化粧品材料としてのナノマテリアルの経皮リスクに関する基礎検討., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
 29. 吉岡靖雄; ナノマテリアルの細胞死誘導メカニズムの検討; 日本薬学会 第 128 年会(シンポジウム講演); 横浜; 2008 年 3 月
 30. 角田慎一 : 疾患関連たんぱく質の探索とその有効活用技術の開発-1., 大阪大学大学院薬学研究科特別講演会, 大阪, 2007 年 6 月.
 31. Minowa K., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Fujita T., Yamamoto A., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of TNFR1-selective mutant TNF using phage display system, Pharmaceutical Sciences World Congress, Amsterdam (Netherlands), April, 2007.
 32. Tsunoda S., Imai S., Yoshida Y., Nagano K., Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y. : An efficient method for the production of monoclonal antibodies to tumor-related proteins using a combination of phage display library and 2-dimensional differential gel electrophoresis, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
 33. Mukai Y., Nakamura T., Shibata H., Abe Y., Tsunoda S., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Crystal structure of the receptor subtype I

selective antagonistic TNF revealed its molecular basis as the proteo-antagonist, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.

34. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of a novel therapeutic approach using an intracellular targeting strategy with membrane-permeable peptides., HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
35. Nabeshi H., Kamada H., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Minowa K., Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Arsenic trioxide alters expression and oxidative modification of the proteome in leukemic cells, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
36. Nomura T., Shibata H., Abe Y., Minowa K., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of bioactive Lysine-deficient tumor necrosis factor for antitumor therapy., HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
37. Yoshikawa T., Imai S., Nagano K., Sugita T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Simultaneous identification of tumor-specific proteins and their antibodies by combining a proteomics technique and phage display library, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
38. Minowa K., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Kayamuro H., Shibata H., Fujita T., Yamamoto A., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of TNF receptor1-selective mutant TNF using phage display system, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
39. Abe Y., Nabeshi H., Nomura T., Kayamuro H.,

Minowa K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of the valuable cell line which evaluates the bioactivity through TNFR2 using chimeric receptor strategy., 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.

H.知的財産権の出願・登録状況

- ①特許取得
なし
- ②実用新案登録
- ③その他
なし

I.研究協力者

- ・吉川 友章
(独)医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト
- ・鍋師 裕美
(独)医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト
- ・杉田 敏樹
(独)医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト
- ・向 洋平
大阪大学大学院薬学研究科 特任助教
- ・岡田 直貴
大阪大学大学院薬学研究科 講師
- ・亀井 数正
大阪大学大学院薬学研究科 博士前期課程 2年
- ・吉川 舞
大阪大学大学院薬学研究科 博士前期課程 1年
- ・小島 拓記
大阪大学薬学部 4年
- ・磯田勝広
大阪大学大学院薬学研究科 助教
- ・西森光
大阪大学大学院薬学研究科 博士前期課程 2年
- ・衛藤祐介
大阪大学大学院薬学研究科 博士後期課程 3年