

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

平成 20 年度 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

研究代表者 堤 康央

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

平成 20 年度 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

研究代表者 堤 康央

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 2
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

II. 分担研究報告書

1. 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 35
(独) 医薬基盤研究所 創薬プラットフォーム 研究分担者 角田慎一
2. 非結晶性シリカの経皮リスクに関する研究 59
大阪大学大学院薬学研究科 薬剤学分野 研究分担者 中川晋作
3. ナノマテリアルの肝臓に対する安全性評価 66
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
4. 電子顕微鏡によるナノマテリアルの主要臓器における各細胞内局在性に関
する研究 96
(独) 医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究分担者 今澤孝喜
5. 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 118
大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 研究分担者 吉岡靖雄

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 143

IV. 研究成果の刊行物・別冊 146

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

「ナノ材料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」

総括研究報告書

「ナノ材料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」

研究代表者 堤 康央

（独）医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト/大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

研究要旨

本年、OECD 主導の下で展開されてきたナノ材料の安全性調査に関するスポンサーシッププログラムにおいて本邦のマイルストーンが決定し、我が国は本プログラムにおいて今後四年半以内にフラーレン・カーボンナノチューブを筆頭に国内産業で主要な位置を占めるナノ材料について可能な限り多くの安全性情報を提示する計画となっている。このような情勢を受けて我が国の NanoTox 研究には、一層の推進が求められているものの、未だ十分とは言い難いのが現状である。このままでは不十分な安全性情報に基づいた闇雲なナノ材料規制が施行されてしまい、将来的にナノテクノロジーに立脚した我が国の産業競争力を喪失させかねない。従って、厚生労働行政においては、ナノ材料の社会受容の促進や国民の健康確保の観点からも、経皮曝露等によるナノ材料のヒト健康への影響を評価・予測できる新たな試験法の開発に加えて、数多くの実サンプルに関して安全性情報を可能な限り集積することが喫緊の最重要課題である。

そこで本研究では、特に実用化が進んでいるナノ材料を経皮適用する領域での安全性情報の集積を目的に、ナノシリカを標準ナノ材料として用いると共に、実際に上市・利用されているナノ材料に関して、物性と動態や毒性との関連評価を通してナノ材料の物性から動態と毒性を予測できるシステム開発を進めてきた。我々のグループはこの点、平成 19 年度までにナノシリカを皮膚に塗布することで角質層などを容易に通過し、血中に移行することを初めて明らかとしたうえで、血中移行後は、肝臓をはじめとする様々な組織に集積し、DNA 損傷をはじめとする種々遺伝毒性を惹起しうることを見いだしている。さらに本年度（平成 20 年度）は種々物性のナノシリカの毒性評価を実施し、本年度は種々物性のナノシリカの毒性評価を実施し、1) 直径 70 nm の表面未修飾ナノシリカ（SP70）が、表皮層を透過してリンパ管や血管が豊富に存在する真皮にまで到達する、2) 全身血中に移行した場合に肝臓を中心とした種々臓器に対する傷害・機能低下とそれらを反映した急性致死毒性を誘発する、3) SP70 が細胞増殖阻害効果や催変異原性を発揮する危険性がある、4) SP70 が薬物併用毒性を誘発する危険性がある、5) SP70 が免疫応答を正負に攪乱する危険性を持つ、6) SP70 が肝実質細胞や胎児細胞にまで到達する上、細胞内の核膜を透過して核内に侵入するなど、サブミクロンサイズ（直径 100 nm 以上）のシリカでは見られない特徴的な動態特性を持つ、7) また、粒子表面をカルボキシル基やアミノ基で修飾することで 1)～3)の毒性を軽減できることを示した。

これらの結果は、今後、続々と開発されるであろう様々なナノ材料の有害性予測/回避法を確立して安全性を確保するにあたっては、物性情報と体内/細胞内動態特性を詳細に把握し、これらの情報を毒性情報と関連させることが極めて重要であることを示している。

A. 研究目的

本邦のナノマテリアル研究は、開発・実用化の点で世界をリードしており、ナノシリカや酸化チタン、フラーレンなどが化粧品や医薬品、食品として上市されている。しかし、欧米各国ではナノマテリアルの革新的機能を反映した毒性 (NanoTox) が懸念され、ナノ製品の使用が規制されようとしている。OECD 等でも、ナノマテリアルのヒトにおける動態解析や毒性、安全性評価、社会的・倫理的な管理策の確立など、NanoTox のリスクマネジメントに向けた国際基準づくりを開始した。

経皮暴露されたナノマテリアルの安全性を、化粧品を一例に考えてみた場合、“250nm 以上のマテリアル”は皮膚の細胞間を通過できないため、従来までの化粧品は基本的に、肌の表面で無害に留まっていた。しかし昨今、ナノマテリアル化することで、肌の細胞間をすり抜け、皮膚の奥底や細胞内にまで浸透させることが可能となったため、ナノマテリアルの機能を活用した様々な有用化粧品の開発が進展し、製品化されるに至っている。この反面、ナノマテリアルは経皮吸収され、全身血流に移行し、皮膚局所のみならず、全身分布してしまうこと、特に数 10nm 以下のサイズになると、皮膚を効率よく透過し、脳など、全身組織に分布することが報告されている。また皮膚沈着してしまったナノマテリアルの場合、細胞膜を容易に通過し、遺伝子が格納されている細胞核にまで侵入してしまうことも知られている。これら皮膚局所や全身組織に分布したナノマテリアルは、米国 NTP program の研究から、ナノマテリアルの発する遠赤外線や放電、光反応性・熱反応性による遺伝子・蛋白質変性などにより、アレルギーなどの未知毒性が誘発され得ることが指摘されている。そのうえ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ており、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。

このような状況をふまえ、本研究では、ナノマテリアルを経皮適用する領域でのリスクマネジメント手法の開発を目的に、食塩やベーキングパウダー、プロセスチーズなどの食品添加物や化粧品基材等に既に実用化されているシリカに関して、1) 物性と経皮曝露後の体内・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・細胞での安全性を種々毒性試験等を用いて解析することにより、ナノシリカの物性-動態-毒性の連関の解明を試みた。

B. 研究方法

1. ナノシリカ

本研究では、Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany) より購入した表面未修飾ナノシリカ (直径 70、100、300、1000 nm ; それぞれ SP70、SP100、SP300、SP1000) と、粒子表面をアミノ基あるいはカルボキシル基で修飾した直径 70 nm のナノシリカ (それぞれ SP70-N、SP70-C) を使用した。尚、特記しない限り、赤色蛍光色素 (RedF) で標識したナノシリカを実験に供した。

2. ナノシリカの皮膚透過性評価

ナノシリカの経皮透過性は、ナノシリカ適用皮膚ならびに投与部位所属リンパ節から作製した超薄切切片を電子顕微鏡観察することにより評価した。なお、ナノシリカ溶液は、既に医薬品や化粧品用のエステル油剤として実用化されているミリスチン酸イソプロピル (Isopropyl miristate ; IPM) を含む蒸留水 (終濃度 10%) で懸濁することにより調製した。このナノシリカ溶液を 2 mg/head でマウス耳介皮膚に 3 日間連続塗布し、最終投与 24 時間後にマウス耳介および所属リンパ節を回収した。これらの組織から常法に従って超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察に供した。

また、蛍光顕微鏡を用いたナノシリカの皮膚透過性評価は以下の手順に従って実施した。ICR マウス (雌性、6 週齢) の耳介皮膚に、アミノフルオレセイン 標識 SP70、SP300、SP1000 (Corefront Co., JAPAN) を 125 $\mu\text{g}/\text{ear}/\text{day}$ で 24 時間間隔、3 日間連続塗布した。このとき acetone/diethyl ether の 1:1 混合溶液を用いて皮膚を前処理することで、物質の皮膚透過性を亢進させた状態に塗布する群も取り、その影響についても評価した。最終塗布から 24 時間後に各々のマウスから耳を摘出し、腹側と背側にピンセットを用いて 2 層に分離した。それぞれの皮膚を 20 mM EDTA 溶液に浮かべ、37 \cdot C で 4 時間作用させた。その後、ピンセットを用いて真皮層を剥離し、表皮シートを調製した。調製した表皮シートを、核染色ならびにアミノフルオレセインの蛍光退色を防ぐために、Prolong Gold anti-fade reagent with DAPI (Invitrogen) を用いてマウントすることで永久組織標本を作製し、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP2, Leica microsystems) にて観察した。

3. ナノシリカの体内動態追跡

ナノシリカは注射用水あるいはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁し、投与量 2 mg/mouse (ほぼ 100 mg/kg に相当)、対照として注射用水 (あるいは PBS) のみをそれぞれ雌 BALB/c マウス各 1 匹に尾静脈内から投与した。但し、SP70 を 2 mg/mouse 投与すると十数時間以内にマウスが死亡するため、この群のみ 0.6 mg/mouse (ほぼ 30 mg/kg に相当) の投与量とした。投与 24 時間後、フェノバルビタールで麻酔・屠殺後、肝臓、肺臓、大脳 (皮質)、腎臓 (皮質)、心臓、脾臓、鼠頸リンパ節を摘出し、直ちに冷 2.5% グルタルアルデヒド溶液で 2 時間固定し、0.1 M リン酸緩衝容液で洗浄後、1% 四酸化オスミウム溶液で 1 時間後固定し、上昇エタノールで脱水した。常法に従いエポキシ樹脂で包埋し、熱重合で硬化させた。標本はダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、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。但し、直径が 70 nm のナノシリカは、染色することにより確認が困難になるため無染色での観察も行った。なお、ナノシリカの胎児、胎盤への移行性は、妊娠 16 日目の妊娠マウスに 70 nm のナノシリカを尾静脈より単回投与し、24 時間後に胎児、胎盤を回収することで評価した。これらの組織から常法に従って超薄切片を作製し、電子顕微鏡観察に供した。

4. ナノシリカの急性毒性

種々の濃度の SP70、SP100、SP300、SP1000、SP70-N、SP70-C を Balb/c マウス (雌性、8 週齢) の尾静脈内より投与し、生存率および形態・行動変化を経時的に観察した。また、投与 6 あるいは 24 時間に各マウスから眼底採血により血液を回収し、血液生化学検査 (AST/ALT 値、 γ -GTP 値、乳酸デヒドロゲナーゼ値、アルカリフォスファターゼ値、クレアチニンフォスフォキナーゼ値、アルブミン量、総ビリルビン量、総コレステロール量、血液尿素窒素値、アンモニア値) を実施した。さらに、各粒子を投与したマウスから肝臓・腎臓・脾臓・肺・脳をはじめとする主要臓器を回収し、これらの組織は病理学的検査に供した。

5. シスプラチンと SP70 の併用毒性

シスプラチン (CDDP ; 50 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ body weight) あるいは生理食塩水を腹腔内投与した BALB/c マウス (8~9 週齢、雄性) に対して、SP70 を 1、3、10 mg/kg body weight の用量で尾静脈内に投与した。尚、注射用水を尾静脈内投与したマウスをコントロール群として用いた。ナノシリカを投与してから 24 時間後に心臓採血により血液を回収し、40 分間室温で放置した後に遠心分離 (4 $^{\circ}$ C 6000 rpm、10 min) することにより得た上清を血清サンプルとした。このようにして回収した血清中の AST、ALT、BUN の活性を測定し、これらの値を指標に併用毒性を評価した。

6. ナノシリカの細胞増殖阻害効果

96 穴プレートに 10^4 個のヒト不死化ケラチノサイト細胞株 (HaCaT)、マウスランゲルハンス

細胞株 (XS52)、あるいはマウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) を播種し、種々の濃度の SP70、SP100、SP300、SP1000、SP70-N、SP70-C を添加した。18 時間後にトリチウム化チミジン (1 μ Ci) を添加してさらに 6 時間培養した。各粒子を添加して 24 時間後にセルハーベスターを用いて細胞を回収し、細胞内に取り込まれたトリチウム化チミジンの量を液体シンチレーションカウンター (TopCount NXT ; PerkinElmer) により測定した。

7. ナノシリカの細胞膜障害性

ナノシリカの細胞膜傷害性は、96 穴プレートに予め播種した XS52 細胞 (10^4 個) に対して、種々の濃度の SP70、SP100、SP300、SP1000、SP70-N、SP70-C を添加して共培養した。24 時間に回収した培養上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) の量を LDH release assay kit (Wako purechemical co. Ltd.) を用いて定量した。

8. ナノシリカの細胞内動態

8 穴チャンバースライドに予め播種しておいた HaCaT 細胞あるいは XS52 細胞 (10^4 個) に対して、終濃度が 100 μ g/ml になるように SP70、SP100、SP300、SP1000 を添加した。ナノシリカを添加して 24 時間共培養した各細胞を PBS で洗浄した後に氷冷した 2.5 % グルタルアルデヒド液で 1 時間固定した。次いで、0.1 M リン酸緩衝液で洗浄した後に 1% 四酸化オスミウムで 30 分間後固定し、さらに上昇エチルアルコールで脱水した。常法に従ってこれらの標本をエポキシ樹脂で包埋し、熱重合により硬化させた。この標本からダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作製し、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を施した後に、透過電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察した。

9. Ames 試験

本試験においては、ヒスチジン要求性ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) である TA100 株および TA98 株を用いた。種々の濃度のナノシリカと対数増殖期にある TA98 あるいは

TA100 株とを混合し、37°C で 20 分間インキュベートした。この溶液に対して 45°C で保温しておいた 10 倍容量の軟寒天培地を添加・混合し、ヒスチジンを含まない寒天培地に播種した。37°C で 48 時間培養した後に、寒天培地上に形成したコロニー数を計数した。

10. DNA 傷害性の評価 (コメットアッセイ)

100 ϕ ディッシュに予め播種しておいた HaCaT 細胞に対して、種々の濃度の SP70、SP100、SP300、SP1000 を添加し、3 時間インキュベートした。セルスクレイパーを用いて細胞を剥離し、250 \times g で 5 分間遠心した。この細胞をカルシウムならびにマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(Ca/Mg free)) で再懸濁し、250 \times g で遠心することにより洗浄した。同様の操作で三回洗浄した HaCaT 細胞を 10^5 cells/ml になるように PBS(Ca/Mg free) に懸濁した。これらの細胞懸濁液と PBS で終濃度 1% に調製したアガロース溶液を 1:10 の比率で混合し、Comet Slide (TREVIGEN 社) にプレーティングした。4°C で 10 分間静置することにより、アガロースを固化させた後に細胞を溶解し、25V で 10 分間電気泳動した。この標本に SYBR Green I (Molecular probe) を 50 μ l 加えて DNA を染色し、蛍光顕微鏡を用いて撮像した (励起波長: 494 nm、蛍光波長: 521 nm)。Tail moment ならびに Tail length の算出にはコメットアナライザ (YOUWORKS Co. Ltd.) を使用した。

11. 細胞内活性酸素種の検出 (DCFH-DA 法)

100 ϕ ディッシュに予め播種しておいた HaCaT 細胞に対して、種々の濃度の SP70、SP100、SP300、SP1000 を添加した。3 時間インキュベートしたこれらの細胞を回収・洗浄した後に、DMSO に溶解した DCFH-DA を終濃度 10 μ M 含有した Phenol Red Free の MEM 培地を添加した。30 分間インキュベートした後に、PBS で細胞を洗浄し、蛍光プレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した (励起波長: 485 nm、蛍光波長: 530 nm)。

12. サイトカイン産生能の評価

96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ l/well でマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 存在下で 12 時間培養を行った後、これらの細胞に対して 10% FBS 含有 DMEM で希釈した各濃度のナノシリカを、単独あるいは LPS や *S. aureus* 由来の lipoteichoic acids (LTA-SA) と共に添加した。さらに 4、12、24 時間後、培養上清中の TNF- α 、IL-6 量を BD OptEIA ELISA KIT のプロトコールに準じて測定した。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. ナノシリカの皮膚透過性評価

まず、SP70 溶液を 3 日間連続塗布したマウスの皮膚を電子顕微鏡にて観察した。その結果、SP70 は表皮層に存在する角化細胞やランゲルハンス細胞のみならず、表皮層の下層に存在する真皮層の細胞内にまで到達していた (図 1)。また、同様に表皮シートを用いた蛍光顕微鏡観察によって、SP70 のみが表皮層の細胞へ到達することを確認している (図 2)。さらに、投与部位近傍の所属リンパ節を観察したところ、リンパ球細胞内で SP70 の存在を確認できた (図 1D)。このように、SP70 が表皮層を透過して真皮層にまで到達したという事実は、真皮層内で発達した血管やリンパ管を介して全身に分布する可能性を示唆している。事実、ごくわずかではあるが投与部位の所属リンパ節内に SP70 が到達した像が認められたことから (図 1D)、リンパ行性あるいは血行性に全身分布する可能性は十分に考えられる。以上の結果から、SP70 の安全性を担保するにあたっては、ナノシリカの全身毒性ならびに生体内動態を精査する必要があると考えられた。

2. ナノシリカの急性・毒性評価

ナノシリカの全身毒性を評価するために、粒子径の異なるナノシリカをマウス尾静脈内より投与した際の急性毒性を評価した (図 3)。SP1000、

SP300 を投与したマウスにおいては、マウスの生存率や形態的な変化は全く認められなかった。それに対して、SP100 投与群では約 40%のマウスが死亡し、さらに驚くべきことに SP70 投与群では投与後 12 時間以内に全てのマウスが死亡した。また、SP70 投与による致死毒性は、粒子濃度に依存して増大し、50%致死濃度 (IC₅₀) は 0.9 mg/head であること、0.5 mg/head 以上の濃度で致死毒性が誘発されることを明らかとした (図 2B)。さらに、各ナノシリカを 2 mg/head で投与したマウスから 6 時間後に血液を回収し、血液生化学検査を実施した (図 4)。その結果、SP70 投与マウスにおいて、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -GTP)、乳酸脱水素酵素 (LDH) といった細胞内酵素や、総ビリルビン (TBIL) の血中濃度が著しく上昇し、さらに尿素窒素 (BUN) が優位に減少していた。一方で、アルカリフォスファターゼ (ALP)、クレアチニンフォスフォキナーゼ (CPK)、アルブミン (ALB)、直接ビリルビン (DBIL)、総コレステロール (TCHO)、アンモニア (NH₃) に関しては有意な変化は認められなかった。また、各ナノシリカを投与したマウスの肝臓および脾臓の病理組織学的検査の結果、SP70 投与マウスの肝臓や脾臓において明らかな鬱血が認められた (図 5)。以上の結果から、ナノシリカの粒子径減少によって静脈内投与時の急性毒性を発現する危険性が高まること、SP70 が全身血流に移行した場合、肝臓を中心とした種々臓器の傷害・機能低下を招き、最終的にそれらを反映した急性毒性を誘発する可能性が示唆された。

続いて、SP70、SP70-C、SP70-N の急性毒性誘導能を比較した。まず、ナノシリカ投与後の生存率を評価したところ、SP70 投与マウスは先ほどと同様に全例死亡したのに対して、SP70-C、SP70-N 投与マウスでは致死毒性を全く認めなかった (図 6)。また、これらのマウスから回収した血液を用いて、ALT、LDH、BUN、TCHO の血中

濃度を測定したところ、SP70 投与マウスにおいてのみ ALT や LDH の血中逸脱と、BUN 濃度の低下が認められた (図 7)。以上、直径が 100 nm 以下のナノシリカによって誘導される急性毒性は、粒子表面をアミノ基あるいはカルボキシル基で修飾することによって軽減されることが示された。また、これらの結果は、ナノシリカの表面性状を適切に制御することが、安全なナノシリカ的设计指針になり得ることを裏付けるものである。これらの現象を各ナノシリカの体内動態や細胞内侵入経路/細胞内動態の観点から解析・考察することで、ナノシリカの安全性確保や有害性予測/回避法の開発に資する基盤情報を収集できるものと考えられた。

3. ナノシリカの体内動態追跡

本項においては、ナノシリカの安全性確保、有害性予測/回避法の開発に向けた基礎情報の収集を目的として、電子顕微鏡を用いてナノシリカの体内動態を追跡した。まず、SP70、SP300、SP1000 を静脈内投与したマウスを用いて肝組織内における粒子の局在を観察した (図 8)。SP1000 ならびに SP300 の大部分は肝クッパー細胞に取り込まれ、肝実質細胞には殆ど取り込まれていなかった。一方で、SP70 の一部は肝クッパー細胞にも取り込まれていたものの、大部分は肝実質細胞内に局在していた。また、驚くべきことに SP70 は肝実質細胞の核膜を通過して核内にまで到達していた。さらに、肝臓以外の主要臓器 (肺・リンパ節・脾臓・脳) におけるナノシリカの局在を解析したところ、これらの組織において SP300 や SP1000 の存在を確認することは出来なかった (図 9)。それに対して、SP70 は肺のマクロファージ細胞や血管内皮細胞、リンパ節局在性リンパ球の細胞核内、脾臓のマクロファージ細胞内にまで到達していた。さらに興味深いことに、SP70 は脳血液関門を突破して、脳アストロサイトの細胞質や核にまで侵入していた。以上、ナノシリカは粒子径が 70 nm 以下になるとサイズ減少効果によって体内のあらゆる組織の深部に侵

入することが明らかとなった。

続いて表面性状の異なる SP70、SP70-N、SP70-C の肝臓・脳・肺・リンパ節内動態を比較解析した。まず、肝実質細胞を超微形態的に観察したところ、いずれのナノシリカも肝実質細胞内に侵入するのみならず、肝実質細胞の核内にまで到達していた (図 10)。脳組織内では、毛細血管内皮細胞内、星状膠細胞内あるいは星状膠細胞核内に僅かではあるが侵入像が観察された (図 11)。また、粒子が星状膠細胞の水解小体 (ライソゾーム) に捕捉されている像も観察された。また、肺組織では SP70 が毛細血管内皮細胞および II 型肺胞上皮細胞内に侵入した像が観察され、SP70-C は毛細血管内皮細胞内に僅かに侵入した像が観察されたが、SP70-N は肺組織では観察されなかった (図 12)。また、鼠頸リンパ節ではいずれの粒子も大食細胞に多数貪食された像が観察された (図 13)。また、妊娠マウスの母体に SP70 を投与し、24 時間後に胎児、胎盤を回収し、電子顕微鏡を用いて移行を評価した (図 14)。その結果、胎盤においては、細胞内に SP70 が移行していることが観察され、胎盤内のマクロファージにおいてもとりこまれていることが示された。さらに、胎児においては、肝臓で SP70 が認められ、胎盤を通過して最終的に胎児にまで移行することが示された。

以上、直径 70 nm のナノシリカは、表面の性状にかかわらず、生体内の種々の組織に浸透し、細胞内の核や胎児組織内にまで到達する可能性が示唆された。一部、SP70-N が肺組織に到達しないなど、表面性状によって局在が異なる事例が認められた。詳細な機構は不明であるが、これらの原因を追究することで、安全なナノマテリアルの設計指針の抽出に繋がるものと考えられる。

4. ナノシリカの併用毒性評価

化粧品は、薬物の服用・非服用を問わず皮膚に塗擦あるいは散布されるものであり、効果を持たないものである。しかしながら、SP70 のように皮膚の深部にまで侵入する化粧品の場合は、あら

はじめ服用していた薬物と相互作用を発揮し、予期せぬ併用毒性を誘発する可能性が懸念される。そこで本稿では、代表的なシスプラチン (CDDP) と SP70 を尾静脈内より共投与したマウスを用いて併用毒性試験を行った。

その結果、CDDP (50 $\mu\text{mol/kg}$ body weight) のみを投与した群では AST・ALT 値の上昇は殆ど認められなかった (図 15)。それに対して、CDDP と共に SP70 を 0.1 mg/kg で共投与した群では約 2 倍、0.5 mg/kg で共投与した群では約 5 倍以上高い AST・ALT 活性を認めた。CDDP は、一般に、ヒドロキシラジカルを中心とした ROS 産生の増大や、アポトーシスの誘導を介して肝障害を誘導することが知られている。今回の結果とこれらの情報を総合すると、SP70 は何らかの機構によって CDDP 依存的な ROS 産生やアポトーシス誘導能を促進し、CDDP の毒性を増悪させる可能性が考えられた。

5. ナノシリカの細胞毒性評価

ナノシリカの細胞毒性を評価する目的で、まず粒子径の異なるナノシリカ (SP70、SP300、SP1000) の共在下で培養したヒト皮膚角化細胞株 (HaCaT) とマウスランゲルハンス細胞株 (XS52) の増殖性を評価した。その結果、いずれの粒子を作用させた細胞においても、粒子濃度依存的な細胞増殖阻害効果が認められ、その効果は SP70 添加群において最も強かった (図 16)。SP70、SP300、SP1000 の HaCaT 細胞における IC_{50} 値は、それぞれ 323, 3966, >10000 $\mu\text{g/ml}$ 、XS52 細胞においてはそれぞれ、4.22、32.6、75.03 $\mu\text{g/ml}$ であり、HaCaT 細胞と比べて XS52 細胞の方がナノシリカの細胞増殖阻害効果に対する感受性が 80~100 倍高いことが明らかとなった。また、各ナノシリカの細胞膜傷害性を LDH の細胞外逸脱性を指標に評価したところ、SP1000 添加群では約 2%、SP300 では約 10%、SP70 では約 25% 程度の LDH が細胞外に漏出していた (図 17)。この結果は、ナノシリカの粒子径が減少すると、細胞膜に対する傷害性が増大す

ることを示すものであり、この効果が細胞増殖阻害を誘発する一つの要因である可能性が考えられた。

続いて、マウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) を用いて、SP70、SP70-C、SP70-N の細胞増殖阻害効果を比較した。その結果、SP70-C あるいは SP70-N を添加した群ではいずれの濃度においても細胞増殖阻害効果は殆ど認められなかった (図 18)。それに対して、SP70 添加群では、粒子濃度が 1 mg/ml でおおよそ 70% の細胞増殖阻害効果を認めた。以上、SP70 の *in vitro* 細胞毒性は粒子表面の性状によって大きく変動することが明らかとなった。

本項の結果から、ナノシリカの粒子径や表面性状といった物性が細胞増殖阻害効果や細胞膜傷害性に著しく影響すること、ならびに細胞種による感受性の違いはあるものの表面未修飾の SP70 が最も強い細胞毒性を発揮することが明らかとなった。直径や表面性状といった粒子物性が細胞毒性に大きく影響する理由は明らかではないが、少なくとも細胞内への侵入機構の差異が関連するものと推察している。例えば、生体内の異物処理細胞として機能しているマクロファージや樹状細胞のような貪食細胞は、異物を細胞内に取り込んで消化する機能を高度に発達させた細胞群である。これらの貪食細胞は、ウイルスや細菌といった微粒子状異物を細胞内に効率よく取り込むために、スカベンジャーレセプターや Fc レセプター、マンノースレセプターをはじめとする種々の異物認識受容体を発現している。これらのレセプターの中には異物表面の電荷の偏りや構造を認識するものが存在することが明らかとされていること、本項の検討において示したように HaCaT 細胞と比較して XS52 や RAW264.7 といった貪食細胞の方がナノシリカに対する感受性が高いことなどを考え合わせると、ナノシリカの細胞内取り込み機構の差異が細胞毒性の強度に影響を与える要因である可能性が高いと考えられる。今後、ナノシリカの細胞毒性発現と粒子物

性との連関をナノシリカの細胞内侵入経路や細胞内局在の観点から解析することで、ナノシリカの有害性予測・回避法の開発に繋がる非常に有用な知見を得られるものと期待している。

6. ナノシリカの細胞内動態解析

SP の細胞内取込み、および細胞内挙動を調べるため、SP と共培養した HaCaT 細胞の TEM 観察を行った (図 19)。SP1000 ならびに SP300 適用群においては、細胞膜を通過して細胞内にまで到達している粒子が数多く認められ、特に SP1000 適用群においてリソソーム小胞の過剰に形成する特徴的な像が認められた。一方で SP70 を適用した群においては、粒子が細胞質内に到達するのみならず、核膜を通過して核内へ侵入し、核小体に集積した様子が観察された。さらに、XS52 細胞内におけるナノシリカの局在を観察したところ、HaCaT の場合と同様に SP1000、SP300 適用群では細胞内侵入像のみを認めたのに対して、SP70 では極わずかではあるが核内にまで到達した様子が観察された (図 20)。

以上の結果は、ナノシリカの粒子径の減少が細胞内動態に著しく影響することを示しており、特に SP70 の核内到達性・核小体集積性はナノシリカによる遺伝毒性発現の危険性を強く示唆するものである。

7. ナノシリカの in vitro 免疫毒性評価

まず、粒子径、表面修飾が異なるシリカが、RAW264.7 細胞に対して与える影響を炎症性サイトカイン産生の面から評価した。粒子径の異なる SP70、SP 300、SP 1000 を RAW264.7 細胞に作用させ、炎症性サイトカイン TNF α 、IL-6 産生誘導を経時的に評価した結果、SP 70 では顕著な TNF α 産生が認められたのに対し、SP 300、SP 1000 では TNF α 産生はほとんど認められなかった (図 21)。また、IL-6 産生はいずれのシリカにおいても全く認められなかった (data not shown)。更に、表面修飾が異なる SP70-C、SP70-N で同様の検討を行った結果、SP70-C では全く TNF α 産生が認められなかったのに対して、

SP70-N では作用後 4 時間でのみ TNF α 産生が認められたが、その産生量は SP70 の 1/5 程度であった (図 22)。また、IL-6 産生はいずれのシリカにおいても全く認められなかった (data not shown)。本結果より、SP70 は TNF α を産生し、炎症惹起作用を有することが示唆された。

結晶性シリカを長期、多量に吸入すると、結核菌などの細菌感染に対する抵抗性が弱まることが疫学的調査より明らかとなっている。従って、非結晶性のナノシリカにおいても、類似の危険性が示唆されており、早急な検討が待望されている。そこで我々は、シリカが免疫抑制作用、即ち負の免疫攪乱作用を有する可能性を考え自然免疫に着目し検討を進めた。自然免疫は、細菌やウイルスなどの病原体が体内に侵入すると即座に発動し、異物排除に働く免疫防御の第一線を成している免疫システムである。近年、Toll-like receptor (TLR) と呼ばれる一群の受容体が、自然免疫における病原体の認識とその後の免疫反応に必須の分子であることが判明した。TLR はそれぞれ異なる病原体成分 (TLR リガンド) を認識して自然免疫を活性化する。病原体成分が TLR に結合すると、TLR は種々炎症性サイトカインの産生を誘導し、病原体の除去に働く。このように TLR は自然免疫に対して非常に重要な役割を担っているため、ナノシリカが TLR シグナル伝達系に何らかの影響を及ぼし、免疫攪乱作用を発揮する可能性も十分に考えられる。そこでまず、TLR4 リガンドであるグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分 LPS を用い、LPS の炎症性サイトカイン誘導能にシリカが与える影響を評価した。各ナノシリカが自然免疫に与える影響を評価するため、LPS により誘導されるサイトカイン産生にナノシリカが与える影響を評価した。RAW264.7 細胞にナノシリカと LPS を共作用させ、炎症性サイトカイン産生量を評価した。ナノシリカは、RAW264.7 細胞に対して全く細胞傷害性を示さない SP70-C と SP70-N を用いた。その結果、LPS 単独作用により TNF α の産生が認められるのに対して、SP70-C、

SP70-N と LPS を共作用させた群では、粒子濃度依存的に TNF α 産生量を増大させた (図 23)。一方、IL-6 産生に関しては、SP70-C、SP70-N と LPS を共作用させた群で粒子濃度依存的に IL-6 産生量を抑制することが判明した。これより、シリカが TLR4 刺激により発動される自然免疫に影響を与える可能性が示唆された。

以上、SP70 が TNF α 産生増強能を発揮すること、ならびに SP70-C ならびに SP70-N が LPS 依存的な TLR シグナル伝達を抑制することを明らかとした。これらの結果は、ナノシリカが粒子径や表面性状といった物性を反映した異なる免疫かく乱作用を示すことを裏付けるものである。

8. ナノシリカの遺伝毒性評価

粒子径の異なるナノシリカの催突然変異性を調べるために、ヒスチジン要求性ネズミチフス菌である TA98 株ならびに TA100 株を用いた Ames 試験を実施した。TA98・TA100 株は突然変異によってヒスチジン要求性に形質転換した菌株であり、それぞれフレームシフト型あるいは塩基対置換型の突然変異を検出できる。尚、本検討では陽性コントロールとして、高い変異原性を理由に 1974 年に厚労省によって使用が禁止された防腐剤、フリルフラマイド (AF-2) を用いた。TA-98 株を用いた場合では、いずれのナノシリカを用いた場合でも変異コロニーの出現は全く認められなかった (図 24)。それに対して、TA-100 株を用いた場合、SP1000 ならびに SP300 適用群では約 60 個、SP100 ならびに SP70 を適用した群では約 100 個と AF-2 適用群とほぼ同数の変異コロニーの出現を認めた。これらの結果は、直径 100 nm 以下のナノシリカが AF-2 と同等の塩基対置換型突然変異を誘発する危険性があることを示している。

続いて、コメットアッセイを用いてナノシリカの哺乳動物細胞における DNA 損傷性を評価した。尚、本検討では陽性コントロールとして過酸化水素 (H₂O₂) を用いた。SP300、SP100 を適用した群では DNA 損傷作用はほとんど認められな

った (図 25)。それに対して、SP100 あるいは SP70 を適用した場合、粒子濃度依存的な DNA 損傷作用を認め、その作用は強力な DNA 損傷剤である H₂O₂ を上回るものであった。また、各ナノシリカを作用させた HaCaT 細胞内における活性酸素種の産生量を定量したところ、SP100 あるいは SP70 添加群においてのみ粒子濃度に依存した ROS 産生量の増大が認められた (図 26)。

以上の結果は、ナノシリカは、直径が 100 nm 以下になると ROS 依存的な DNA 損傷作用を発揮し、これらの作用が最終的に催変異原性に繋がる危険性を示している。

E. 結論

本年度は種々物性のナノシリカの毒性評価を実施し、以下の結論を得た。

- 1) 直径 70 nm の表面未修飾ナノシリカ (SP70) が、表皮層を透過してリンパ管や血管が豊富に存在する真皮にまで到達する
- 2) 全身血中に移行した場合に肝臓を中心とした種々臓器に対する傷害・機能低下とそれらを反映した急性致死毒性を誘発する
- 3) SP70 が細胞増殖阻害効果や催変異原性を発揮する危険性がある
- 4) SP70 が薬物併用毒性を誘発する危険性がある
- 5) SP70 が免疫応答を正負に攪乱する危険性を持つ
- 6) SP70 が肝実質細胞や胎児細胞にまで到達する上、細胞内の核膜を透過して核内に侵入するなど、サブミクロンサイズ (直径 100 nm 以上) のシリカでは見られない特徴的な動態特性を持つ
- 7) また、粒子表面をカルボキシル基やアミノ基で修飾することで 1)~3) の毒性を軽減できることを示した。

これらの結果は、今後、続々と開発されるであろう様々なナノマテリアルの安全性を確保する

にあたっては、物性情報と体内/細胞内動態特性を詳細に把握し、これらの情報を毒性情報と関連させることが極めて重要であることを示している。現在、これらの情報・手法を基盤として、酸化チタン、酸化亜鉛、白金ナノコロイド、フラーレン、カーボンナノチューブなどのサンプルに関して各々の素材の物性と有害性や体内動態との関連や OECD ガイドラインに則った毒性試験を進めている (図 27、28)。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. 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.*, 283:998-1007, 2008.
2. Takahashi A., Komiya E., Kakutani H., Yoshida T., Fujii M., Horiguchi Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Tsunoda S., Koizumi N., Isoda K., Yagi K., Watanabe Y., Kondoh M. : Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis., *Biochem. Pharm.*, 75:1639-1648, 2008.
3. 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 of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction., *Br. J. Pharmacol.*, 153(6):1143-52, 2008.
4. 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.*, 335(1-2):71-8, 2008.
5. Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus., *J. Mol. Biol.*, 380(5):777-782, 2008.
6. Yoshikawa M., Mukai Y., Okada Y., Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Okada N., Doi T., Nakagawa S. : Ligand independent assembly of purified soluble human Magic Roundabout (Robo4), a tumor endothelial specific marker., *Protein. Expr. Purif.*, 61(1):78-82, 2008.
7. Gao J.Q., Kanagawa N., Xu D.H., Han M., Sugita T., Hatanaka Y., Tani Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Mayumi T., Okada N., Nakagawa S. : Combination of two

- fiber-mutant adenovirus vectors, one encoding the chemokine FKN and another encoding cytokine interleukin 12, elicits notably enhanced anti-tumor responses., *Cancer Immunol. Immunother.*, 58:291-299, 2008..
8. Imai S., Mukai Y., Takeda T., Abe Y., Nagano K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The effect of protein properties on display efficiency using the M13 phage display system., *Pharmazie.*, 63(10):760-764, 2008.
 9. Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Abe Y., Nomura T., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M., Ohta T., Mayumi T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The therapeutic effect of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF- α in murine hepatitis models., *Cytokine*, 44(2):229-233, 2008.
 10. Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Taniai M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., *J. Mol. Biol.*, 385:1221-1229, 2009.
 11. Kamada H., Fugmann T., Neri D., Roesli C.: Improved protein sequence coverage by on resin deglycosylation and cysteine modification for biomarker discovery. , *Proteomics*, 9(3):783-787, 2009
 12. Imai S., Yoshida Y., Okamura T., Nagano K., Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The specific effect of 2-Methoxyestradiol on lymphatic vascular endothelial cells., *Pharmazie.*, in press.
 13. Nagano K., Imai S., Mukai Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library., *Pharmazie.*, in press.
 14. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Crystallization and preliminary X-ray analysis of TNF-TNFR2 complex, *Acta. Crystallogr. Sect. F.*, in press.
 15. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. : Silica nanoparticles as hepatotoxicants., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, in press.
 16. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. : Influence of 70-nm silica particles in mice with cisplatin or paraquat-induced toxicity., *Pharmazie*, in press.
 17. Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The augmentation of intracellular delivery of peptide therapeutics by artificial protein transduction domains., *Biomaterials*, in press.
 18. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Taniai M., Ohta T., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists.,

J. Biochem., in press.

19. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. : Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice., Eur. J. Pharm. Biopharm., in press.

【総説・その他】

20. Yoshikawa T, Nabeshi H, Yoshioka Y. : Evaluation of Biological Influence of Nano-materials using Toxicokinetic and Toxicoproteomic Approach., Yakugaku Zasshi, 128(12):1715-1725, 2008.
21. Tsunoda S, Tsutsumi Y. : Application of nanomaterials for drug innovation and their risks., Yakugaku Zasshi, 128(12):1713-1714, 2008.
22. 吉岡靖雄、吉川友章、角田慎一：医薬品・化粧品におけるナノマテリアルの安全性評価、Pharma-VISION 第12号: 14-18, 2008.

② 学会発表

【シンポジウム等：合計10件】

1. 角田慎一：抗体プロテオミクス., 大阪大学大学院薬学研究科特別講演会, 大阪, 2008年5月.
2. 堤 康央：創薬プロテオミクスの現状と今後～プロテオーム情報を有効活用した創薬とその基盤技術開発～., 神戸学院大学薬学部特別講演会, 神戸, 2008年6月.
3. 堤 康央：創薬プロテオミクス研究の推進に向けたDDS., 第45回薬剤学懇談会研究討論会, 静岡, 2008年6月.
4. 堤 康央：プロテオーム情報を有効活用した創薬とその基盤技術開発., 富山大学和漢研講演会, 富山, 2008年7月.
5. 堤 康央：プロテオーム解析論., DDS型治療システム NEDO 特別講座, 京都, 2008年9月.
6. 堤 康央：医薬品・化粧品中のナノマテリア

ルの安全性., 2008年度第四回大阪大学薬学部卒後研修会, 大阪, 2008年9月.

7. 堤 康央：薬学への招待：安全かつ有効な医薬品等の開発を目指して., 2008年度群馬県立前橋高等学校講演会, 大阪, 2008年10月.
8. 堤 康央：医薬品開発におけるバイオマーカー～探索研究から臨床開発まで～., 平成20年度厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究推進事業 第11回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ, 静岡, 2008年11月.
9. 堤 康央：ナノマテリアルの社会受容の促進を目指した安全性研究., 第2回ナノシンポジウム「ナノ粒子テクノロジーの国際動向－レギュレーションと安全性－」, 東京, 2008年11月.
10. 堤 康央：抗TNF医薬の創製および創薬プロテオミクスによるリウマチ治療薬の開発に向けて., 臨床医・製薬企業研究者、それぞれの立場から見た関節リウマチにおける治療のパラダイムシフトと今後治療薬に求められる治療コンセプト, 東京, 2008年12月.

【国内学会発表：合計28件】

1. 山下琢矢, 宇都口直樹, 鈴木 亮, 長野一也, 角田慎一, 堤 康央, 丸山一雄：ファージ表面提示法を用いた抗腫瘍組織血管抗体の創製., 遺伝子・デリバリー研究会 第8回シンポジウム., 大阪, 2008年5月.
2. 鍋師裕美、吉川友章、杉田敏樹、長野一也、鎌田春彦、今澤孝善、角田慎一、堤康央：ナノシリカの体内動態と生体影響に関する基礎的検討., 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京, 2008年6月
3. 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、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：

- 関節リウマチモデルに対する治療効果および安全性の検討., 第 24 回 DDS 学会, 東京 2008 年 6 月.
23. 渡辺 光, 吉岡靖雄, 森重智弘, 鎌田春彦, 向 洋平, 角田慎一, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作: ファージ表面提示法を用いた活性増強型リンフォトキシン・の創製とその特性評価., 第 8 回 日本蛋白質科学会年会, 東京, 2008 年 6 月.
 4. 田辺綾, 吉岡靖雄, 森重智弘, 角田慎一, 堤 康央, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作: 各種ナノマテリアルの自然免疫応答に及ぼす影響., 第 15 回 日本免疫毒性学会学術大会, 東京, 2008 年 9 月.
 5. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 形山和史, 鎌田春彦, 野村鉄也, 阿部康弘, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央: TNF スーパーファミリーに着目した粘膜ワクチンアジュバント能の体系的評価., 第 56 回 日本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008 年 10 月.
 6. Hikaru Watanabe, Yasuo Yoshioka, Tomohiro Morishige, Shin-ichi Tsunoda, Haruhiko Kamada, Yasuo Tsutsumi, Yohei Mukai, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa: In vitro and in vivo antitumor effects of mutant lymphotoxin- α s with enhanced bioactivities., 第 67 回日本癌学会学術総会, 東京, 2008 年 10 月.
 7. Shin-ichi Tsunoda, Kazuya Nagano, Tomoaki Yoshikawa, Yasuo Yoshioka, Shinsaku Nakagawa, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Yasuo Tsutsumi: Antibody-based proteomics for efficient discovery and validation of tumor biomarkers., 第 67 回日本癌学会学術総会, 東京, 2008 年 10 月.
 8. 鎌田春彦, 萱室裕之, 吉岡靖雄, 形山和史, 廣井隆親, 阿部康弘, 角田慎一, 堤康央: 活性増強型 TNF・構造変異体の粘膜ワクチンアジュバントへの応用., 第 22 回 日本エイズ学会学術集会, 大阪, 2008 年 11 月.
 9. 田辺綾, 吉岡靖雄, 森重智弘, 角田慎一, 堤 康央, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作: ナノマテリアルの自然免疫活性化メカニズムの検討., 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008, 東京, 2008 年 11 月.
 10. 吉岡靖雄, 田辺綾, 堤康央, 向洋平, 岡田直樹, 中川晋作: ナノシリカの自然免疫応答に及ぼす影響., 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008 年 12 月.
 11. 田辺綾, 吉岡靖雄, 堤康央, 向洋平, 岡田直樹, 中川晋作: ナノマテリアルのオートファジー誘導に関する検討., 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008 年 12 月.
 12. 成松翔伍, 吉岡靖雄, 堤康央, 向洋平, 岡田直樹, 中川晋作: T細胞受容体を用いた新規ターゲティング分子の創製に関する基礎的検討., 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008 年 12 月.
 13. Tokuyuki Yoshida, Yasuo Yoshioka, Hiroyuki Kayamuro, Kouhei Yamashita, Kazuma Higashisaka, Ryouyusuke Nakanishi, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Norio Ito, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi., 第 37 回日本環境変異原学会, 沖縄, 2008 年 12 月.
 14. Kouhei Yamashita, Yasuo Yoshioka, Hiroyuki Kayamuro, Tokuyuki Yoshida, Kazuma Higashisaka, Ryouyusuke Nakanishi, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Norio Ito, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi., 第 37 回日本環境変異原学会, 沖縄, 2008 年 12 月.
 15. Hiromi Nabeshi, Tomoaki Yoshikawa, Yasutaro Nakazato, Keigo Matsuyama,

- Akihiro Arimori, Masaaki Isobe, Takayoshi Imazawa, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Norio Itoh, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi.: Influence of physicochemical property of nano-silicas on in vivo biological behavior (1). 第37回日本環境変異原学会, 沖縄, 2008年12月.
16. Yasutaro Nakazato, Tomoaki Yoshikawa, Hiromi Nabeshi, Keigo Matsuyama, Akihiro Arimori, Masaaki Isobe, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Norio Itoh, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi.: Influence of physicochemical properties of nano-silica particles on in vivo biological behavior (2). 第37回日本環境変異原学会, 沖縄, 2008年12月.
17. Keigo Matsuyama, Tomoaki Yoshikawa, Hiromi Nabeshi, Yasutaro Nakazato, Akihiro Arimori, Masaaki Isobe, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Norio Itoh, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi.: Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in human keratinocytes exposed to amorphous nano-silica. 第37回日本環境変異原学会, 沖縄, 2008年12月.
18. 鍋師裕美, 吉川友章, 阿部康弘, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央 : ナノマテリアルの生体影響の評価及びトキシコプロテオミクスによる安全性マーカーの探索., 日本薬学会 第129年会, 京都, 2009年3月.
19. 松山恵吾, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里奏太郎, 磯部将彰, 有森亮裕, 阿部康弘, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央 : ナノシリカの細胞内動態と遺伝毒性との関連評価, 日本薬学会 第129年会, 京都, 2009年3月.
20. 仲里奏太郎, 吉川友章, 鍋師裕美, 松山恵吾, 磯部将彰, 有森亮裕, 阿部康弘, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央 : ナノシリカの表面物性との有害性との関連評価, 日本薬学会 第129年会, 京都, 2009年3月.
21. 吉岡靖雄, 田辺綾, 森重智弘, 姚醒蕾, 渡辺光, 室井正志, 棚元憲一, 堤康央, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作: 新規素材として期待されるナノマテリアルの自然免疫攪乱作用に関する検討, 日本薬学会 第129年会, 京都, 2009年3月.
22. 松尾一彦, 免山智行, 角田慎一, 堤 康央, 向洋平, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作: ナノシリカの皮膚透過性と経皮リスクに関する基礎検討, 日本薬学会 第129年会, 京都, 2009年3月.
23. 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 吉田徳幸, 中西亮介, 阿部康弘, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: カーボンナノチューブの物性と発癌リスクの関連評価, 日本薬学会 第129年会, 京都, 2009年3月.
24. 吉田徳幸, 吉岡靖雄, 萱室裕之, 山下浩平, 東阪和馬, 中西亮介, 阿部康弘, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: 都市大気粉塵に対する抗原提示細胞の免疫応答解析, 日本薬学会 第129年会, 京都, 2009年3月.
24. 長谷崎拓也, 田中一成, 磯田勝広, 近藤昌夫, 角田慎一, 堤康央, 八木清仁: 球状ナノシリカ粒子の肝傷害性に対する表面荷電の影響, 日本薬学会 第129年会, 京都, 2009年3月.
25. 西森光, 磯田勝広, 近藤昌夫, 角田慎一, 堤康央, 八木清仁: 球状ナノシリカ粒子の急性肝傷害機構解析, 日本薬学会 第129年会, 京都, 2009年3月.
26. 長谷崎拓也, 田中一成, 磯田勝広, 近藤昌夫, 角田慎一, 堤康央, 八木清仁: 球状シリカ粒子の肝傷害性に及ぼす粒子径の影響, 日本薬学会 第129年会, 京都, 2009年3月.
27. 西森光, 長谷崎拓也, 磯田勝広, 近藤昌夫, 角田慎一, 堤康央, 八木清仁: ナノシリカ粒

子と化学物質の併用によるナノマテリアルの安全性評価, 日本薬学会 第 129 年会, 京都, 2009 年 3 月.

28. 西森光, 磯田勝広, 近藤昌夫, 角田慎一, 堤康央, 八木清仁: 西森光、磯田勝広、近藤昌夫、角田慎一、堤康央、八木清仁, 日本薬学会 第 129 年会, 京都, 2009 年 3 月.

【国際学会発表 : 合計 17 件】

1. Shin-ichi Tsunoda, Hiromi Nabeshi, Tomoaki Yoshikawa, Haruhiko Kamada, Takayoshi Imazawa, and Yasuo Tsutsumi. : Analysis of size-dependent biological behavior of silica nanoparticles by imaging and toxicoproteomics, 5th SETAC World Congress, Sydney , 3-7 August, 2008.
2. Yoshikawa T., Nabeshi H., Sugita T., Nagano K., Mukai Y., Yoshioka Y., Kamada H., Tsunoda S.-I., Tsutsumi Y.: Proteomics and imaging analysis for size-dependent biological behavior of silica-nanoparticles, HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam 2008, The Netherlands, 16 - 20 August, 2008.
3. Sunao I., Shin-ichi T., Yasunobu Y., Shinsaku N., Junya F. and Yasuo T.: A novel system for efficiently screening tumor-related proteins using antibody proteomics, HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam 2008, The Netherlands, 16 - 20 August, 2008.
4. Yasunobu Yoshida, Sunao Imai, Tomoaki Yoshikawa, Haruhiko Kamada, Shin-ichi Tsunoda, and Yasuo Tsutsumi.: Proteomic profiling of human lymphatic endothelial cells for analyzing lymphangiogenesis, HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam 2008, The Netherlands, 16 - 20 August, 2008.
5. Nabeshi H., Yoshikawa T., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Imaging and proteomics analysis for studying size-dependent biological behavior of nanosilicas., Nanotoxicology - 2nd International Conference., Switzerland, 7-10 September, 2008.
6. Yoshioka Y., Eto Y., Tanebe A., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S.: Effect of nanomaterials on the induction of autophagy., Nanotoxicology - 2nd International Conference., Switzerland, 7-10 September, 2008.
7. Abe Y, Shibata H, Nomura T, Kayamuro H, Mukai Y, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Tanai M, Ohta T, Nakagawa S, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y.: Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive-subtractive panning., 7th Joint Conference of the International Society for Interderon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Canada, 12-16 October, 2008
8. Nomura T., Abe Y., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Mukai Y., Tanai M., Ohta T., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Creation of mutant TNF- α with TNF receptor-1 selective antagonistic activity for the development of a novel autoimmune disease drug., 7th Joint Conference of the International Society for Interderon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Canada, 12-16 October, 2008.

9. Kayamuro H., Yoshioka Y., Katayama K., Kamada H., Nomura T., Abe Y., Hiroi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., MUTANT TNF ELICITS TH2-TYPE RESPONSES FOR ENHANCED MUCOSAL IMMUNITY., 7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Canada, 12-16 October, 2008.
10. Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant., 7th Joint Conference of the International Society for Interferon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Canada, 12-16 October, 2008.
11. Yasuo Yoshioka., Hiroyuki Kayamuro., Kazufumi Katayama., Haruhiko Kamada., Yasuhiro Abe., Takachika Hiroi., Shin-ichi Tsunoda., Yasuo Tsutsumi. : IDENTIFICATION OF NEW CANDIDATES AS MUCOSAL VACCINE ADJUVANT IN TNF SUPERFAMILY CYTOKINES., FIMSA 2008, Taipei (Taiwan), 17-20 October, 2008.
12. Hikaru Watanabe., Yasuo Yoshioka., Tomohiro Morishige., Yasuo Tsutsumi., Yohei Mukai., Naoki Okada., Shinsaku Nakagawa. : Creation of TNFR1-Selective Mutant Lymphotoxin-Alpha Using Phage Display System., FIMSA 2008, Taipei (Taiwan), 17-20 October, 2008.
13. Tomohiro Morishige, Yasuo Yoshioka, Aya Tanabe, Hiroshi Inakura, Hikaru Watanabe, Yasuo Tsutsumi, Yohei Mukai, Naoki Okada, Shinsaku Nakagawa.: LIGHT induces the anti-tumor effect by activating the tumor specific immune response., FIMSA 2008, Taipei (Taiwan), 17-20 October, 2008.
14. Hiromi Nabeshi, Tomoaki Yoshikawa, Keigo Matsuyama, Yasutaro Nakazato, Akihiro Arimori, Masaaki Isobe, Takayoshi Imazawa, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Norio Itoh, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi.: Evaluation of size-dependent biological behavior of nano-silicas., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore, 15-19 March, 2009.
15. Tomoaki Yoshikawa, Hiromi Nabeshi, Yasutaro Nakazato, Keigo Matsuyama, Akihiro Arimori, Masaaki Isobe, Takayoshi Imazawa, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Norio Itoh, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi.: Influence of physicochemical properties of nano-silica particles on in vivo toxicity., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore, 15-19 March, 2009.
16. Yasuhiro Abe, Hiroko Shibata, Tetsuya Nomura, Hiroyuki Kayamuro, Tomoaki Yoshikawa, Yasuo Yoshioka, Shinsaku Nakagawa, Haruhiko Kamada, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi.: Evaluation of safety and efficacy of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF as a novel anti-inflammatory drug., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore, 15-19 March, 2009.
17. Yasuo Yoshioka, Aya Tanabe, Yohei Mukai, Naoki Okada, Yasuo Tsutsumi,