

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 (NH_3) 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 4)。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 5)。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 6)。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臓内における粒子の局在を観察した (図 7)。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 8)。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。

本項の結果をまとめると、SP70 は、①肝実質細胞内にまで侵入、②肝実質細胞核内にまで到達、③脳血液関門を突破するなど、サブミクロンサイズ (直径 100 nm 以上) のシリカ粒子では見られなかった種々の体内動態特性を発揮することが明らかとなった。これらの結果と急性毒性試験の結果を考え合わせると、ナノシリカの組織分布、細胞内局在の差異が、SP70 の急性毒性の発現と関連している可能性が考えられた。

4. 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) の共存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9)。SP70、SP300、SP1000のHaCaT細胞におけるIC₅₀値は、それぞれ323, 3966, >10000 µg/ml、XS52細胞においてはそれぞれ、4.22、32.6、75.03 µg/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10)。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11)。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関連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。

5. 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12)。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13)。

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

力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。

6. 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 14)。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 (H_2O_2) 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かった (図 15)。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 H_2O_2 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 16)。

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

以上、本年度は種々物性のナノシリカの毒性評価を実施し、直径 70 nm の表面未修飾ナノシリカ (SP70) が、①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こと、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こと、③細胞増殖阻害効果を発揮すること、④催変異原性を発揮する危険性があること、を明らかとした。また、in vitro ならびに in vivo におけるトキシコキネティクス解析から、SP70 が肝クッパー細胞のみならず肝実質細胞にまで到達して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ことを世界に先駆けて明らかとした。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①～④の毒性が軽減できることを示した。以上の結果を総合すると、ナノシリカの急性毒性は粒子径や表面性状といった物性に起因する特徴的な体内/細胞内動態特性を反映したものであることを示している (図 17)。すなわち、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 18、19)。

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., Tani 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, Ryouzuke 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, Ryouzuke 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 biologic 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, Taniai 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., Taniai 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 Interderon 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, Shinsaku Nakagawa: Nanosilicas with various surface potential induce the different profile of cytokine production on macrophage., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore, 15-19 March, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当なし

② 実用新案登録

該当なし

その他

研究協力者

鎌田春彦、吉川友章、阿部康弘、山根美紀、鍋師裕美、伊藤徳夫、今井 直、野村鉄也、長野一也、萱室裕之、小野寺章、岡村賢孝、仲里泰太郎、松山恵吾、山下浩平、吉田徳幸、荻田郁弥、東阪和馬、栃木彩恵子、渡邊貴信、藤村真穂、有田修平、山下琢矢、赤瀬貴憲、東阪和馬、中西亮介、磯部将彰、有森亮裕、橋野のぶよ、物部容子、向洋平、岡田直貴、森重智弘、渡辺光、松尾一彦、田辺綾、石井裕美子、吉川舞、川合泰明、小島拓記、久保貴、瀬戸正志、津森優希、齋場 雄貴、免山智行、横田やよい、川端洋輝、姚 醒蕾、成松翔伍、稲倉裕、近藤昌夫、磯田勝広、長谷崎拓也、田中一成、角谷秀樹、吉田猛史、高橋梓、松久幸司、河原倫之、佐伯理恵、斎藤郁美子、松下恭平、山本芙美、鈴木英彦、李相儒

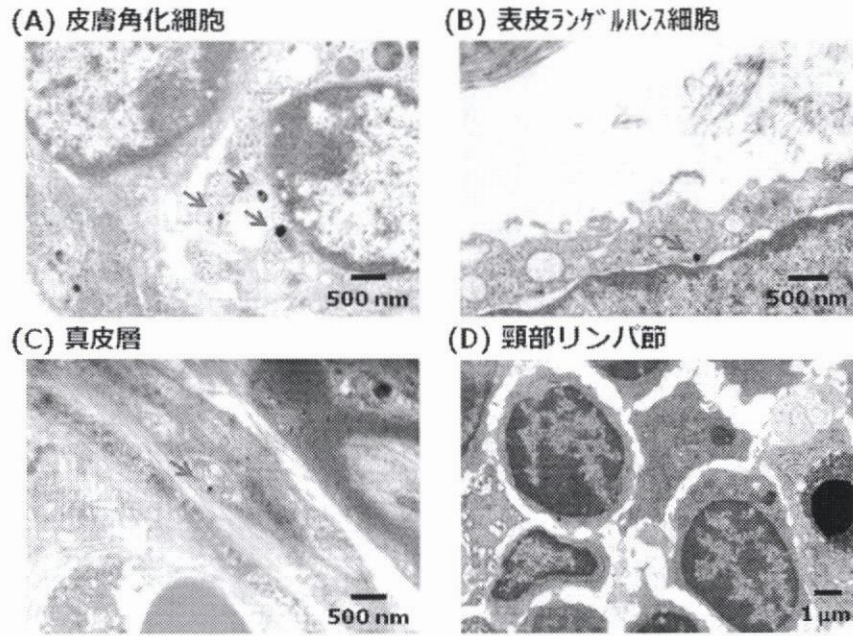


図1. ナノシリカの皮膚透過性評価. 終濃度10%の化粧/医薬品用エステル油剤(ミリスチン酸イソプロピル:IPM)を含む溶液でSP70を懸濁し, このSP70懸濁液を2 mg/head (10 μ l) でBALB/cマウスの耳介に3日間連続投与した。最終投与24時間後にマウス耳介および頸部リンパ節を回収した。これらの組織から超薄切片を作製し, 透過型電子顕微鏡観察により表皮層(角化細胞; A, ランゲルハンス細胞; B), 真皮層(C), 頸部リンパ節(D)におけるSP70の局在を解析した。

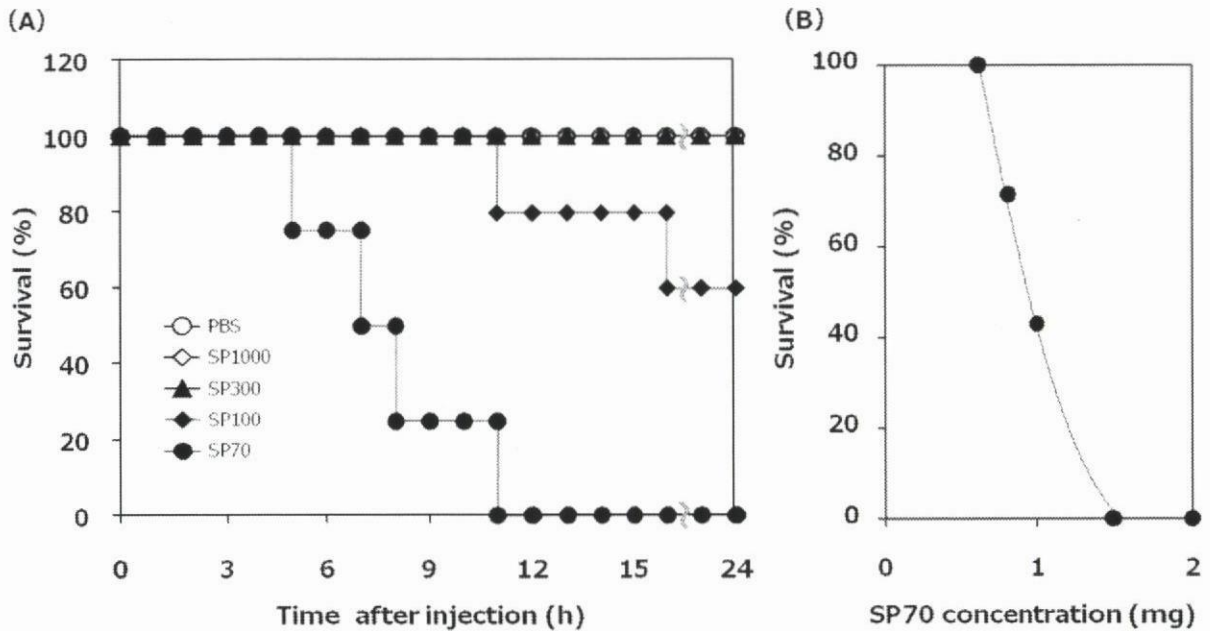


図2. ナノシリカの粒子径依存的な急性毒性. (A) 粒子径依存性: 各ナノシリカを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与し, 生存率を経時的に評価した。(B) SP70濃度依存性: 種々濃度のSP70をBALB/cマウスの尾静脈内より投与してから24時間後の生存率を指標にSP70依存的な急性毒性の濃度依存性を確認した。

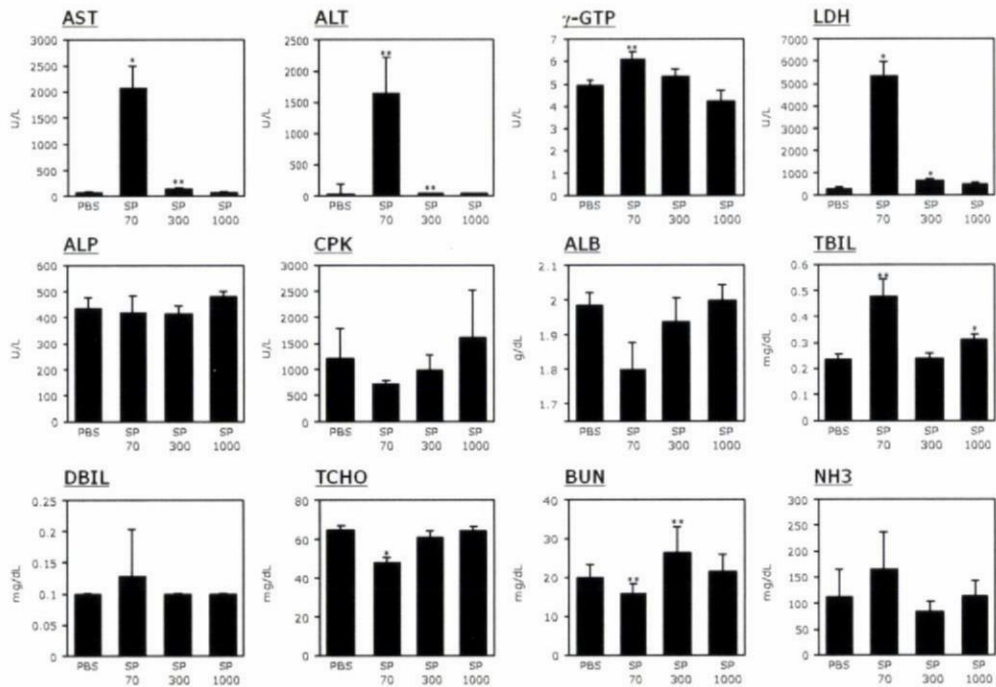


図3. ナノシリカ投与マウスの血液生化学検査-1. 粒子径の異なる各ナノシリカを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。6時間後に眼底から回収した血液を用いて血液生化学検査（アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、 γ -グルタミルトランスぺプチターゼ（ γ -GTP）、乳酸脱水素酵素（LDH）、総ビリルビン（TBIL）、尿素窒素（BUN）、アルカリフォスファターゼ（ALP）、クレアチニンフォスホキナーゼ（CPK）、アルブミン（ALB）、直接ビリルビン（DBIL）、総コレステロール（TCHO）、アンモニア（NH₃））を実施した。

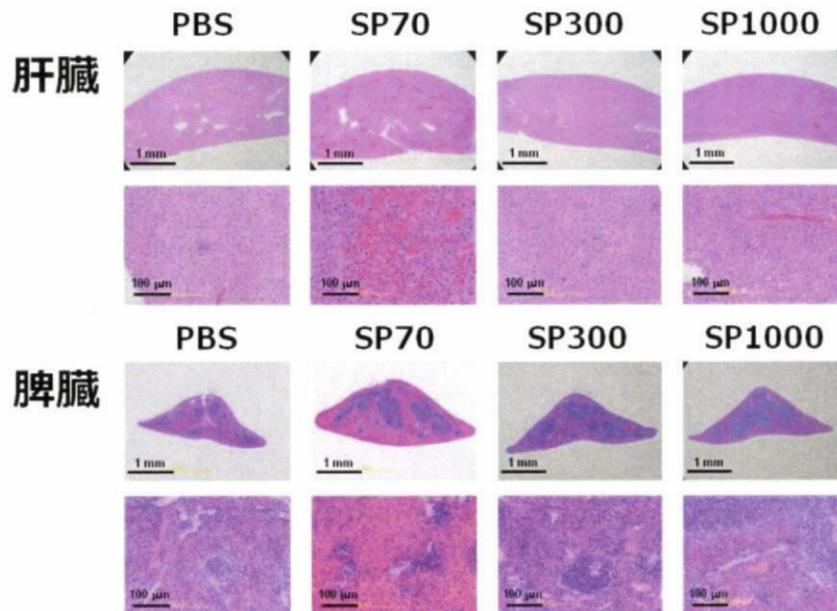


図4. 肝臓および脾臓の病理組織学的検査. 粒子径の異なる各ナノシリカを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。投与6時間後に回収した肝臓および脾臓を病理組織学的検査に供した。

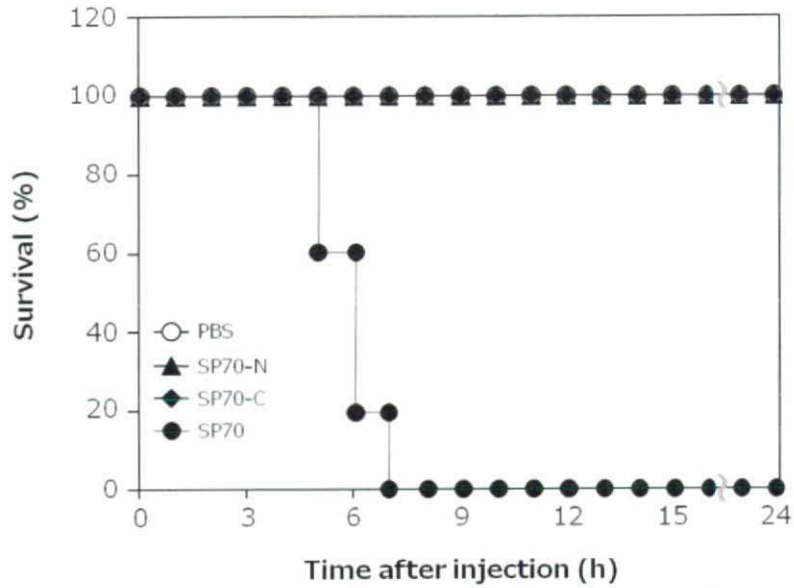
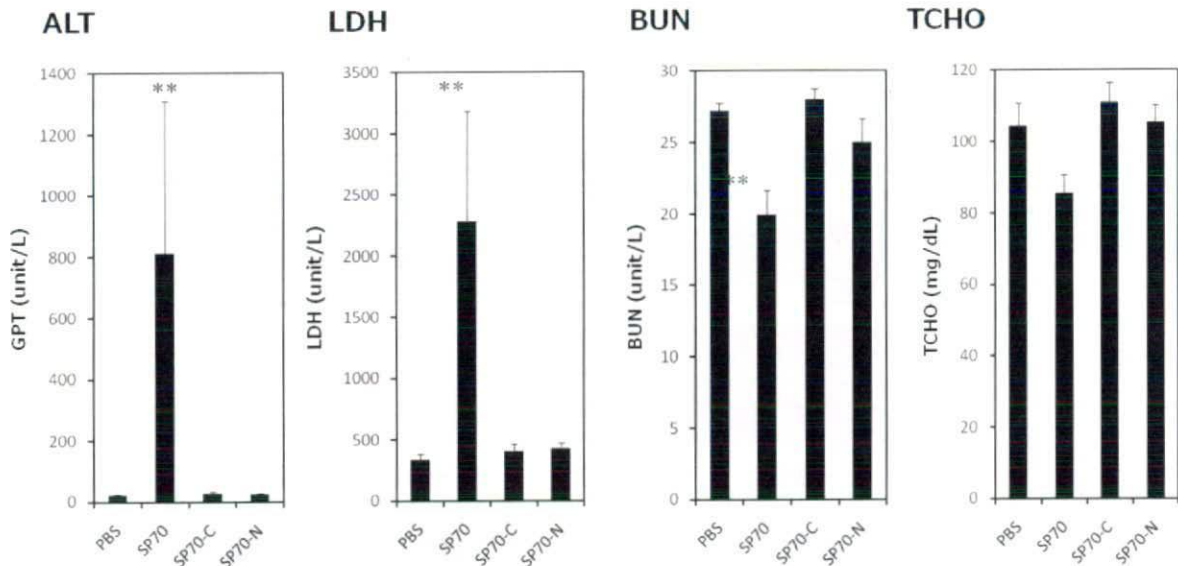


図5. SP70の急性毒性発現における粒子表面性状の影響. SP70（表面未修飾）、粒子表面をカルボキシル基あるいはアミノ基で修飾した直径70 nmのナノシリカ（SP70-C, SP70-N）を2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与し、経時的に生存率を評価した。

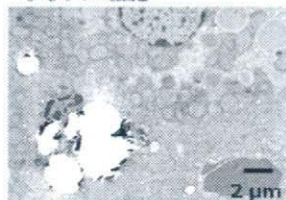


** : $p < 0.01$, * $p < 0.05$, by Student's t-test, n=??

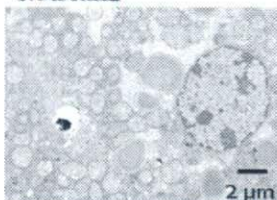
図6. 血液生化学検査-2. SP70（表面未修飾）、粒子表面をカルボキシル基あるいはアミノ基で修飾した直径70 nmのナノシリカ（SP70-C, SP70-N）を2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。6時間後に眼底から回収した血液を用いて血液生化学検査（アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、乳酸脱水素酵素（LDH）、尿素窒素（BUN）、総コレステロール（TCHO））を実施した。

SP1000

クッパー細胞



肝実質細胞



SP300

クッパー細胞



肝実質細胞



SP70

クッパー細胞



肝実質細胞

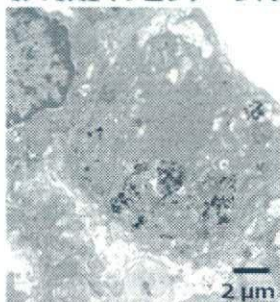


肝実質細胞核内

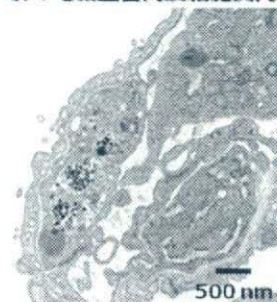


図7. 粒子径の異なるナノシリカの肝組織内動態. 粒子径の異なる種々のナノシリカを2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。投与6時間後に回収した肝臓から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察によりナノシリカの局在を解析した。

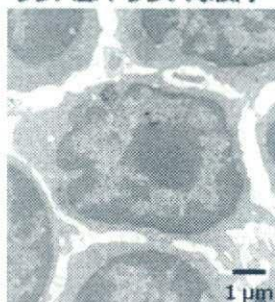
肺：肺泡マクロファージ内



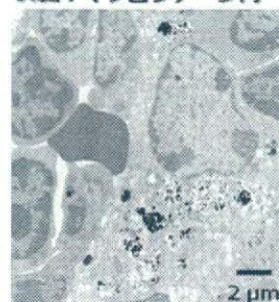
肺：毛細血管内皮細胞質内



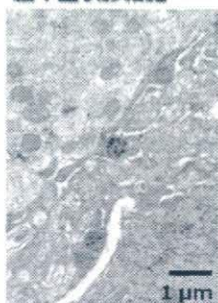
リンパ節：リンパ球核内



脾臓：マクロファージ内



脳：星状膠細胞



脳：星状膠細胞核



脳：脳血液関門

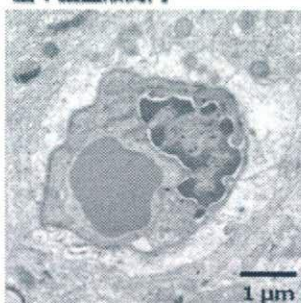


図8. SP70の生体内動態. SP70を2 mg/headでBALB/cマウスの尾静脈内より投与した。投与6時間後に回収した肝臓、リンパ節、脾臓、脳から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察によりSP70の局在を解析した。

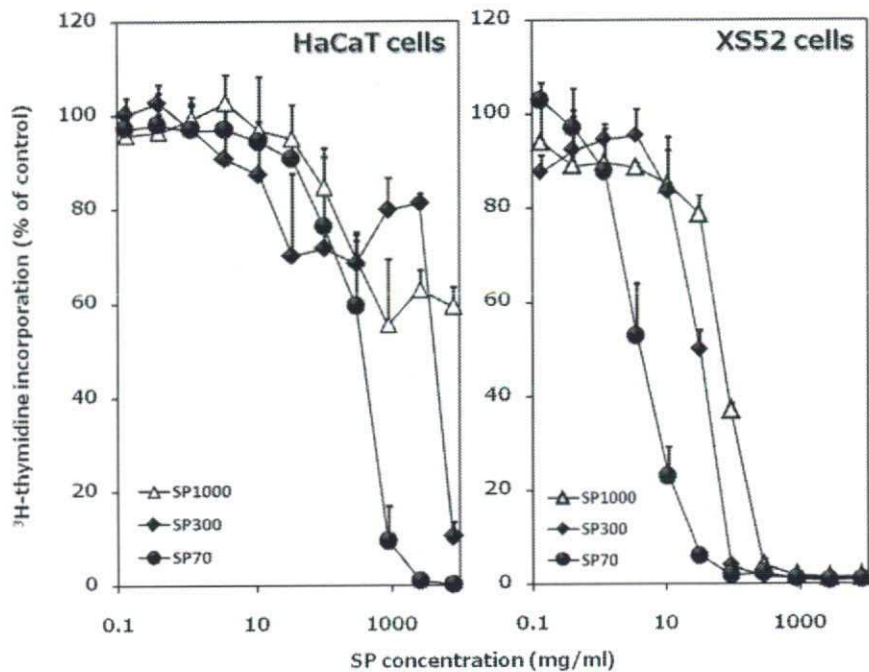


図9. 粒子径の異なるナノシリカの細胞増殖阻害効果. 粒子径の異なるナノシリカを種々の濃度でヒト皮膚角化細胞株 (HaCaT) ならびにマウスランゲルハンス細胞株 (XS52) に添加し、24時間インキュベートした。細胞増殖能は培養終了6時間前に添加したトリチウムラベル化チミジン (1 μ Ci) の取り込み量を指標に評価し、ナノシリカ非添加群の取り込み量を100%として算出した。

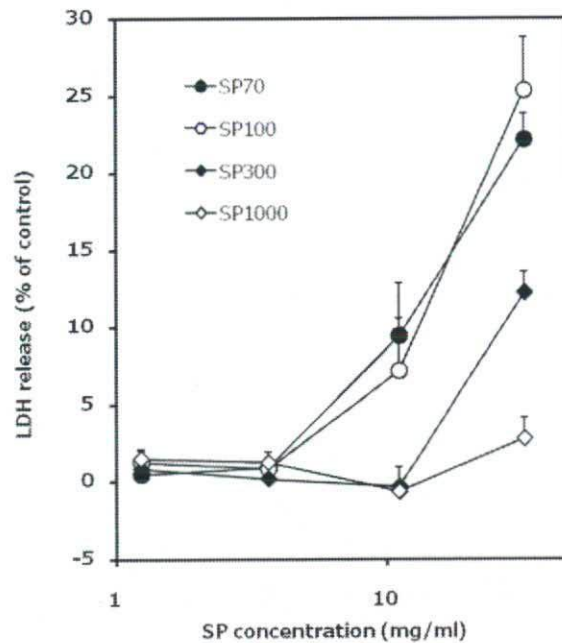


図10. 粒子径の異なるナノシリカの細胞膜傷害性. 粒子径の異なるナノシリカを種々の濃度でマウスランゲルハンス細胞株 (XS52) に添加し、24時間インキュベートした。各ナノシリカの細胞膜に対する傷害性は培養後に、上清中に逸脱した乳酸脱水素酵素の量を指標に評価し、ナノシリカ非添加群における培養上清中へのLDH逸脱量を100%として算出した。

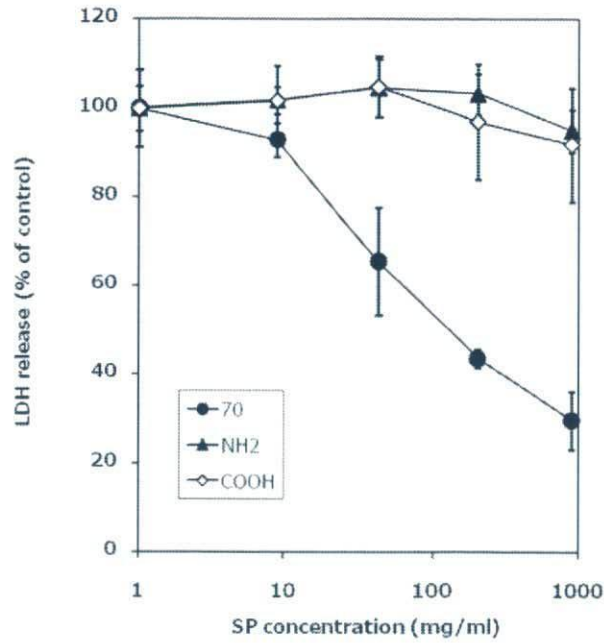


図11. 表面性状の異なるナノシリカの細胞増殖阻害効果. SP70、SP70-C、SP70-Nを種々の濃度でマウスマクロファージ細胞株 (RAW264.7) に添加し、24時間インキュベートした。細胞増殖能は培養終了6時間前に添加したトリチウムラベル化チミジン (1 μ Ci) の取り込み量を指標に評価し、ナノシリカ非添加群の取り込み量を100%として算出した。

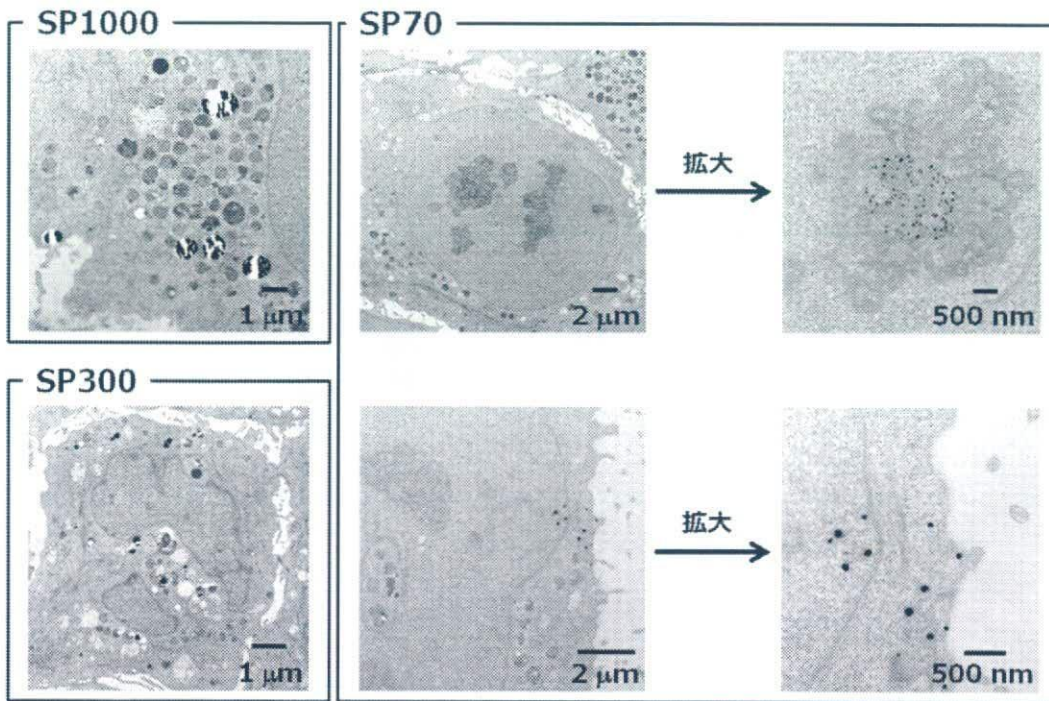


図12. HaCaT細胞内におけるナノシリカの局在. 粒子径の異なるナノシリカ (終濃度: 100 μ g/ml) をHaCaTに添加し、24時間インキュベートした。培養後のサンプルを用いて超薄切片を作製し、電子顕微鏡を用いてナノシリカの細胞内局在を解析した。

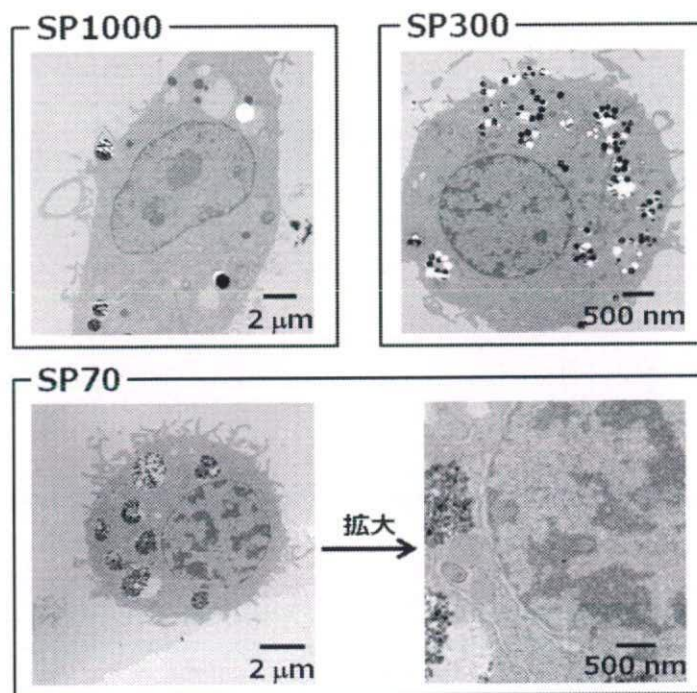
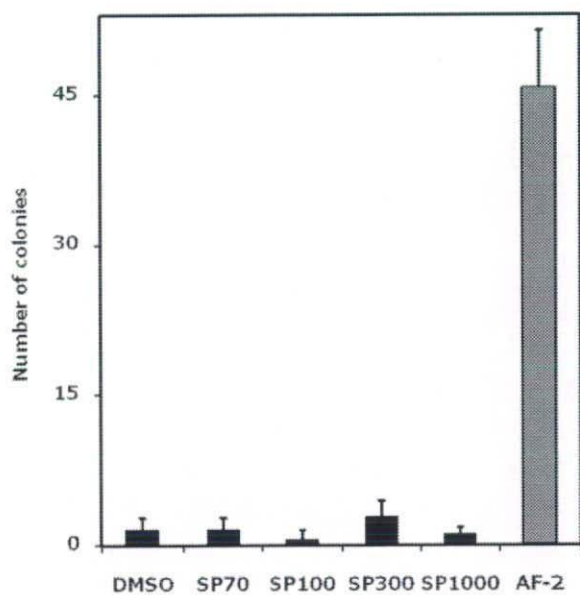


図13. X52細胞内におけるナノシリカの局在。粒子径の異なるナノシリカ（終濃度：100 $\mu\text{g/ml}$ ）をHaCaTに添加し、24時間インキュベートした。培養後のサンプルを用いて超薄切切片を作製し、電子顕微鏡を用いてナノシリカの細胞内局在を解析した。

TA98



TA100

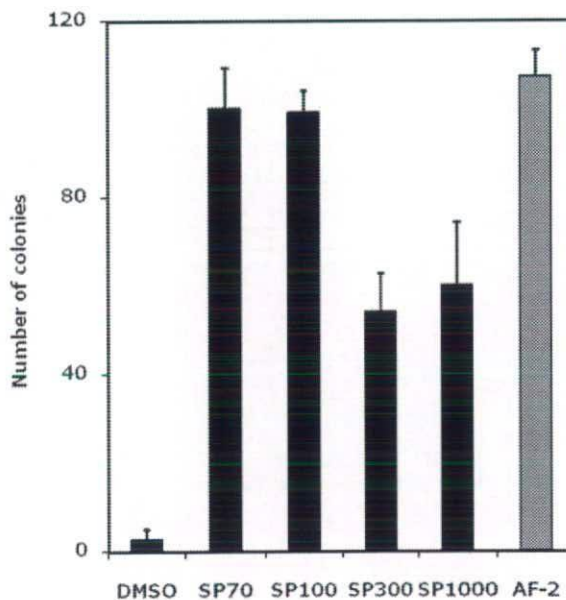


図14. ナノシリカの催変異原性 (Ames試験)。SP70 (25 $\mu\text{g/ml}$)、SP100、SP300、SP1000 (50 $\mu\text{g/ml}$) を作用させたTA98あるいはTA100株をヒスチジンを含まない寒天培地にプレーティングした。37°Cで48時間静置培養した後のコロニー数を計数した。

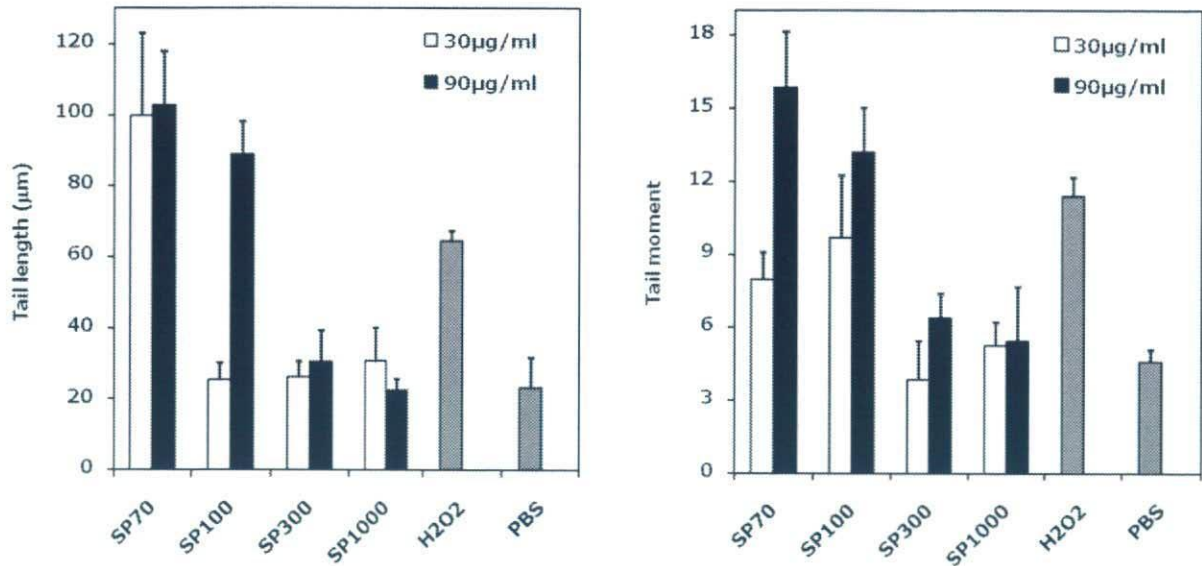


図15. 哺乳動物細胞におけるナノシリカのDNA損傷性. 粒子径の異なるナノシリカを種々の終濃度でHaCaTに作用させ、24時間インキュベートした。ナノシリカ処理細胞におけるDNA損傷の度合いをコメットアッセイにより検出・定量した。

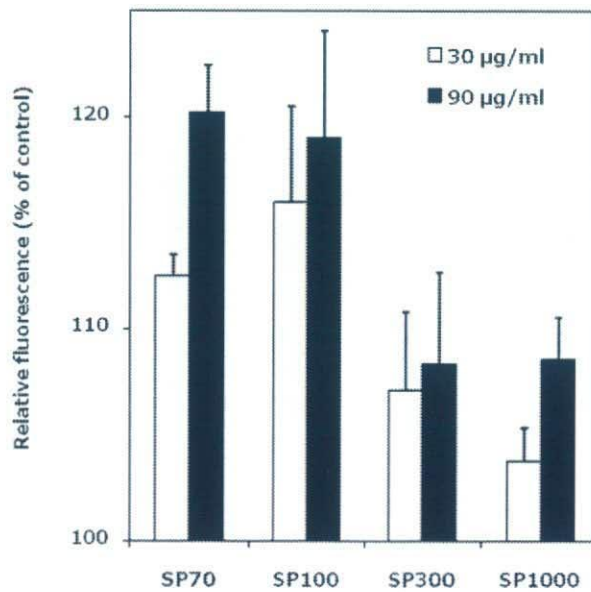


図16. ナノシリカ処理細胞におけるROS産生. 種々の濃度のナノシリカをHaCaT細胞に作用させ、3時間インキュベートした。これらの細胞を回収・洗浄した後に細胞膜透過性ROS特異的プローブであるDCFH-DAを添加して30分間反応させた。細胞を十分に洗浄した後に、DCFH由来の蛍光（励起波長：485 nm、蛍光波長：530 nm）を蛍光プレートリーダーを用いて測定した。

サンプル	粒子径 (nm)	表面性状	生体内動態	細胞内動態	有害性
SP1000	1000	未修飾	主に肝クッパー細胞	細胞質	特に無し
SP300	300	未修飾	主に肝クッパー細胞	細胞質	特に無し
SP100	100	未修飾	主に肝クッパー細胞	細胞質	急性毒性
SP70	70	未修飾	肝実質細胞 脳アストロサイト	細胞質 核内 (核小体)	急性毒性、DNA傷害性、炎症惹起
SP70-C	70	COOH修飾	肝クッパー細胞 脳アストロサイト	細胞質	特に無し (DNA傷害性は未検討)
SP70-N	70	NH ₂ 修飾	主に肝クッパー細胞	細胞質 細胞膜	特に無し (DNA傷害性は未検討)

図17. ナノシリカの物性-動態-有害性連関 (まとめ)

素材名	物性	実用途
酸化チタン	直径20, 35 nmのルチル型およびアナターゼ型	全て化粧品用途の実サンプル
酸化亜鉛	直径20 nmの表面未修飾および表面 (シメチコン/メチコン) コポリマー修飾体	
白金ナノコロイド	- (未計測)	
フラーレン	表面未修飾およびポリビニルピロリドン修飾体	

図18. 平成21年度に解析予定のナノマテリアル一覧。

サンプル	OECDガイドライン (No.)
単層カーボンナノチューブ	Acute Dermal Toxicity (TCG402) Repeated Dose Dermal Toxicity (TCG410&411)
多層カーボンナノチューブ	
フラーレン	

図19. OECDスポンサープログラムへの情報提供に向けた検討項目。