

響に関する詳細な情報を可能な限り早急に収集する必要があり、経済協力開発機構 (OECD) では、2006年から「工業ナノ材料作業部会」を設置し、安全性に対する論議が精力的に進められている。また、米国では米国環境保護庁 (EPA) や米国食品医薬品局 (FDA) が、日本では厚生労働省や環境省などが中心となり、ナノマテリアルの安全性に関する研究の重要性が提言されている。しかし、様々なナノマテリアル配合製品が既に実用化・販売され、ナノマテリアルの人体曝露を避け得ない現状では、危険性のみを闇雲に指摘するだけでは社会的混乱を招いてしまう。そのため、これら安全性に関する情報を基盤として、適切なリスクマネジメント (リスク予測・評価) を実施し、有用性とリスクという二面性を考慮した上でナノマテリアルを安全に活用した豊かな社会を構築していくことが必要である。

本観点から我々は、ナノマテリアルの社会受容促進や健康福祉の観点から、ナノマテリアルの安全性評価として、主に免疫システムに与える影響に着目し検討を進めている。本年度は、粒子径、表面修飾、形状等が異なるシリカ、酸化チタンを用いて、炎症惹起作用と免疫抑制作用について検討し、ナノマテリアルが生体に対して免疫を正 (炎症惹起作用)、負 (免疫抑制作用) に攪乱し得ることを明らかとした。更に、妊娠マウスを用いることで、母体に投与されたナノシリカの胎児、胎盤への移行性についても検討した。

B. 研究方法

細胞

RAW264.7 細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。RAW264.7 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS) 添加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM、和光純薬工業株式会社) を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 存在下で培養した。NF- κ B 結合領域を有したプロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを RAW264 細胞に形質導入した細胞 (RAW-ELAM 細胞) と、同じく Interferon β (IFN β) プロモーター配列の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミド

を RAW264 細胞に形質導入した細胞 (RAW-IFN β 細胞) は、国立医薬品食品衛生研究所の室井 正志先生、棚元 憲一先生より分与していただいた。RAW-ELAM 細胞・RAW-IFN β 細胞は、10% FBS 含有、G418 (calbiochem) 0.5 mg/ml 含有 DMEM を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 存在下で培養した。THP-1 細胞は、Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) 細胞バンクより購入した。THP-1 細胞は、10% FBS 含有、2 mM L-グルタミン含有 RPMI 1640 (和光純薬工業株式会社) を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 存在下で培養した。

試薬

各粒子径の非結晶性シリカ (si70:70 nm、si300:300 nm、si1000:1000 nm) と、表面修飾基を付与したシリカ (si70(COOH):70 nm、COOH 基、si70(NH₂):70 nm、NH₂ 基、si1000(COOH):1000 nm、COOH 基、si1000(NH₂):1000 nm、NH₂ 基、si1000(CHO):1000 nm、CHO 基、si1000(SO₃H):1000 nm、SO₃H 基) はコアフロント株式会社より購入した。酸化チタン A-1、A-2、R-1、R-3 は SIGMA-ALDRICH より、酸化チタン A-3、A-4、R-1 は Nano Amor より購入した。結晶性シリカは、U. S SILICA より購入した。Lipopolysaccharide (LPS) は SIGMA より購入した。LTA-SA は invivogen より購入した。Tumor Necrosis Factor α (TNF α)、Interleukin-6 (IL-6) 測定用の BD OptEIA ELISA KIT は、BD Biosciences より購入した。Luciferase Assay System は Promega より購入した。その他の試薬は、分子生物学研究用グレード、研究用特級グレードまたはそれに準ずるものを使用した。なお、本研究に使用した FBS は全て、56°C、30 分間の非働化処理を行った。

RAW264.7 細胞に対する細胞傷害性試験

96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ l/well の 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、10% FBS-DMEM で希釈した各濃度のシリカを 100 μ l 加えた。4、12、24 時間後、25%グルタルアルデヒド (キシダ化学株式会社) 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 (和光純薬工業株式会社) 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、メディウムのみを加えた群の吸光度をコントロール (100%) として生存率を算出した。

ELISA による RAW264.7 細胞培養上清中のサイトカイン量の測定

96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ l/well で 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、10% FBS-DMEM で希釈した各濃度のシリカ、またはシリカと LPS を 100 μ l 加えた。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。

ELISA によるマクロファージ様 THP-1 細胞培養上清中のサイトカインの測定

96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ l/well で単球系 THP-1 細胞を播種し、0.5 μ M Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA, SIGMA) で刺激し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養を行い THP-1 細胞をマクロファージ様細胞に分化させた。その後 PBS で洗浄し、10% FBS-RPMI (L-グルタミン含有) で希釈した各濃度のシリカもしくはシリカと LPS を 100 μ l 加えた。24 時間後、培養上清中の IL-1 β 量を、BD OptEIA ELISA KIT のプロトコールに準じて測定した。

W264 細胞における NF- κ B 活性化、IFN β 転写活性化の評価

12 穴プレートに 2.1×10^5 cells/1.4 ml/well で RAW-ELAM 細胞もしくは RAW-IFN β 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、10% FBS-DMEM (G418 0.5 mg/ml 含有) で希釈した各濃度のシリカを 700 μ l 加えた。0 分、30 分、1 時間、2 時間後に、10% FBS-DMEM (G418 0.5 mg/ml 含有) で希釈した各濃度のシリカ、またはシリカと TLR リガンドを 700 μ l 作用させた。6 時間培養を行

った後、Luciferase lysis reagent (Promega) 100 μ l/well で細胞を溶解させ、Luciferase Assay System (Promega)、Microumat Plus LB96 (Perkin Elmer) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。活性はメディウムのみを作用させた群の Relative Light Unit (RLU) をコントロール (100%) として比活性を表した。

ELISA による THP-1 細胞培養上清中のサイトカインの測定

【単球系 THP-1 細胞】 96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ l/well のヒト単球系 THP-1 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、10% FBS-RPMI (L-グルタミン含有) で希釈した各濃度の酸化チタンを 100 μ l 加えた。24 時間後、培養上清中の TNF α 、IL-8、IL-1 β 量を、BD OptEIA ELISA KIT のプロトコールに準じて測定した。

【マクロファージ様 THP-1 細胞】 96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ l/well のヒト単球系 THP-1 細胞を播種し、0.5 μ M PMA (SIGMA) で刺激し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養を行い THP-1 細胞をマクロファージ様細胞に分化させた。その後 PBS で洗浄し、10% FBS-RPMI (L-グルタミン含有) で希釈した各濃度の酸化チタンを 100 μ l 加えた。24 時間後、培養上清中の IL-1 β 量を、BD OptEIA ELISA KIT のプロトコールに準じて測定した。

エンドサイトーシス、脂質ラフト、NADPH oxidase、ROS、小胞 H⁺ ATP アーゼ、Caspase-1 を阻害した際の IL-1 β 産生量の変化

96 穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ l/well の単球系 THP-1 細胞を播種し、0.5 μ M PMA (SIGMA) で刺激し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養を行い THP-1 細胞をマクロファージ様細胞に分化させた。その後、PBS で洗浄し、10% FBS-RPMI (L-グルタミン含有) で希釈した各濃度の阻害剤を添加した。阻害剤は、アクチン重合阻害によりアクチン重合依存的エンドサイトーシスを阻害する Cytochalasin D (終濃度 1、5 μ M : SIGMA)、細胞膜上のコレステロール分解を促進することで脂質ラ

フトを阻害する Methyl- β -cyclodextran (MBCD、終濃度 2 mM : SIGMA-ALDRICH) を用いた。更に、他の阻害剤として NADPH oxidase のサブユニットであるシトクロム b の機能を阻害することで NADPH oxidase を阻害する Diphenyleneiodonium chloride (DPI、終濃度 10 μ M : SIGMA-ALDRICH)、電子伝達阻害によって ROS を阻害する Butylated Hydroxyanisole (BHA、終濃度 20、100 μ M : SIGMA)、小胞 H⁺ATP アーゼ阻害剤であり、産生リソソーム形成阻害によってタンパク分解機能を抑制しリソソームを安定化する Bafilomycin A₁ (終濃度 50、250 nM : BIOMOL)、Caspase-1 の活性領域に結合して Caspase-1 を阻害する zYVAD-fmk (終濃度 5、10 μ M : calbiochem) も同様に用いた。添加後、37°C で 30 分間プレインキュベートし、10% FBS-RPMI (L-グルタミン含有) で希釈した各濃度の阻害剤と各種酸化チタンを加えた。6 時間後、培養上清中の IL-1 β 量を BD OptEIA ELISA KIT のプロトコールに準じて測定した。

ナノシリカの胎児、胎盤への移行性評価

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。

C. 研究結果

ナノシリカの起炎性評価

一次粒子径がナノメートルサイズであり非結晶性のシリカ (ナノシリカ) は、1970 年代から化粧品に使用されており、2006 年の報告によると、本邦におけるナノシリカの年間使用量は 13500 トンにも及ぶ。主な用途には化粧品、食品、医薬品、ゴム製品等が挙げられ、既に我々の生活に必須となっている。これまでに化粧品原料としての機能性を更に高めるための表面修飾 (疎水化や親水化など) や、ゴム製品の絶縁性、断熱性を高めるための形状制御 (中空状) が施されたものなど、多種多様なナノシリカの開発が進められている。

まずナノシリカの特異性評価を目的に、粒子径が異なるシリカを用いてマクロファージに対する細胞傷害性を評価した。粒子径 70 nm、300 nm、1000 nm のシリカ (si70、si300、si1000) を用いて、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に対する細胞傷害性を経時的に評価した。その結果、シリカ作用後 12 時間において、si70、si1000 作用群で細胞傷害性が認められた。更にシリカ作用後 24 時間においては、いずれの粒子径のシリカも 100 μ g/ml 作用群で細胞傷害性を示したが、特に si70 が強い細胞傷害性を示した (Fig. 1a)。最も強い細胞傷害性を示した si70 に関してより詳細な検討を行うため、si70 表面に COOH 基、NH₂ 基が修飾された si70(COOH)、si70(NH₂)を用いて、RAW264.7 細胞に対する細胞傷害性を評価した。その結果、si70 では強い細胞傷害性が認められたのに対して、si70(COOH)、si70(NH₂)は、共に細胞傷害性を全く示さなかった (Fig. 1b)。本結果より、シリカは粒子径によって RAW264.7 細胞に与える細胞傷害性が異なり、特に si70 は顕著な細胞傷害性を示すことが判明した。また、表面修飾基を変化させることで細胞傷害性を回避可能であることが明らかとなった。

次に、粒子径、表面修飾が異なるナノシリカの炎症惹起作用に関して検討した。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 si70、si300、si1000 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、si70 では顕著な TNF α 産生が認められたのに対し、si300、si1000 では TNF α 産生はほとんど認められなかった (Fig. 2)。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 si70(COOH)、si70(NH₂)で同様の検討を行った結果、si70(COOH)では全く TNF α 産生が認められなかったのに対して、si70(NH₂)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 si70 の 1/5 程度であった (Fig. 3)。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、si70 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。

次に、ヒトマクロファージ様 THP-1 細胞を用いて同様の検討を行った (Fig. 4)。その結果、RAW264.7 細胞の結果と同様に、si70 でのみ顕著な TNF α 産生が認められ、si70(COOH)、si70(NH $_2$)、si300、si1000 では全く TNF α 産生は観察されなかった (Fig. 4a)。近年、結晶性シリカやアスベストが、IL-1 β 産生を強く誘導し、慢性炎症を引き起こすことが報告されている。そこで、種々シリカの IL-1 β 産生について評価した。その結果、si70、si70(COOH)、si70(NH $_2$) では全く産生が見られないのに対し、si300、si1000 で顕著な産生が認められ、si1000 で最も産生されていた (Fig. 4b)。以上の結果から、si70 は TNF α 産生を誘導することで炎症を惹起する一方で、si1000 は IL-1 β 産生により炎症を惹起する可能性が示唆された。本結果は、粒子径の違いにより異なる炎症惹起作用を有する可能性を提示するものであり、大変興味深い結果である。

次に、表面修飾により炎症惹起作用が変化する可能性を考え、粒子径 1000 nm のシリカ表面に異なる修飾基 (COOH、NH $_2$ 、CHO、SO $_3$ H) を付与した、si1000(COOH)、si1000(NH $_2$)、si1000(CHO)、si1000(SO $_3$ H) の炎症惹起作用を検討した。マクロファージ様 THP-1 細胞に si1000 を含めた各種シリカを作用させ、6 時間後の IL-1 β 産生を評価した結果、si1000 で最も強い IL-1 β 産生誘導が認められ、続いて si1000(COOH)、si1000(NH $_2$)、si1000(SO $_3$ H)、si70(CHO) と、修飾基付与により IL-1 β 産生量が減少することが判明した (Fig. 5)。本結果より、種々表面修飾基を付与することで、シリカによる炎症惹起作用を抑制できる可能性が示された。

ナノシリカの免疫抑制作用

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。哺乳類の TLR はヒトでは 10 種類、マウスでは 12 種類など、種によって 10~15 種類の TLR ファミリーが報告されており、各 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 は活性化されて二量体を形成し、下流のアダプター分子 Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) もしくは TIR domain-containing adaptor-inducing interferon beta (TRIF) を介して下流にシグナルを伝達し、転写因子 NF- κ B や IRF-3 を活性化させる。その結果、NF- κ B 活性化によって炎症性サイトカインが、IRF-3 活性化によって IFN 関連サイトカインが誘導され、炎症惹起や獲得免疫の活性化が起こり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、シリカが負の免疫攪乱作用を発揮するに当たっては、TLR に何らかの作用をしている可能性も十分に考えられる。そこで次に、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シリカが与える影響を評価した。RAW264.7 細胞にシリカと LPS を共作用させ、炎症性サイトカイン産生量を評価した。シリカは、RAW264.7 細胞に対して全く細胞傷害性を示さない si70(COOH)、si70(NH $_2$) 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、si70(COOH)、si70(NH $_2$) と LPS 共作用群では、シリカ濃度依存的に TNF α 産生量を増大させた (Fig. 6a)。一方、IL-6 産生に関しては、si70(COOH)、si70(NH $_2$) と LPS 共作用群で濃度依的に IL-6 産生量を抑制することが判明した (Fig. 6b)。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。

次に、LPS 刺激によるサイトカイン産生パターンがシリカ作用によって変動した原因を解明すべく、TLR4 下流シグナルに対するシリカの作用に関して解析した。TLR4 のシグナル伝達経路には、下流のアダプター分子 MyD88 を介して転写因子 NF- κ B を活性化する MyD88 依存的経路と、アダプター分子 TRIF を介して NF- κ B と IRF-3 を共に活性化する MyD88 非依存的経路の二つが存在する (Fig. 7)。TLR4 はこの二つの経路を共に活性化し、転写因子 NF- κ B 活性化による炎症性サイトカインの産生や、転写因子 IRF-3 活性化による IFN α や IFN β 等インターフェロンの産生を誘導する。

そこで本検討では、まずシリカがこれら経路のどちらに影響を与えているかを検討する目的で、LPS とシリカを共作用させた際の、転写因子 NF- κ B (MyD88 依存的経路・MyD88 非依存的経路双方で活性化される) の活性化と、サイトカイン IFN β (MyD88 非依存的経路でのみ活性化される) の転写活性化を評価した。NF- κ B 結合領域を有したプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを RAW264 細胞に形質導入した細胞 (RAW-ELAM 細胞) を用いて NF- κ B 活性化を、同じく IFN β プロモーター配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを RAW264 細胞に形質導入した細胞 (RAW-IFN β 細胞) を用いて IFN β の転写活性化を検討した。まず、RAW-ELAM 細胞に対してシリカ si70(COOH) と LPS を共作用させ、NF- κ B 活性化を評価した。その結果、LPS 単独作用群では強い NF- κ B 活性化が認められたのに対して、si70(COOH) 共作用群では、NF- κ B 活性化を有意に抑制した (Fig. 8)。更に、LPS 刺激前に si70(COOH) を経時的に前処理し、NF- κ B 活性化を評価した結果、いずれの前処理時間においても、si70(COOH) は確かに LPS 刺激による NF- κ B 活性化を抑制していることが明らかとなり、MyD88 依存的、非依存的経路双方を抑制する可能性が示唆された (Fig. 9)。一方で si70(NH₂) についても LPS 刺激による NF- κ B 活性化に与える影響を評価したところ、si70(COOH) と同様に NF- κ B 活性化を有意に抑制したため、MyD88 依存的、非依存的経路双方を抑制する可能性が示唆された。しかし、その

抑制度合いは si70(COOH) より小さく、表面修飾の付与によって細胞との相互作用が変化したことによるものと考えられた (Fig. 10)。

次に、RAW-IFN β 細胞に対して si70(COOH) と LPS を共作用させ、転写因子 IRF-3 活性化に基づく IFN β の転写活性化を評価した。その結果、LPS 単独作用群で IFN β の転写活性化が認められたのに対して、si70(COOH) 共作用群では IFN β の転写活性化には影響を与えず、si70(COOH) は MyD88 非依存的経路には影響を与えないことが示唆された (Fig. 11a)。また、si70(NH₂) 共作用群でも同様に、IFN β の転写活性化には影響を与えず、MyD88 非依存的経路には影響を与えないことが示唆された (Fig. 11b)。

次に、si70(COOH) と si70(NH₂) が MyD88 依存的・非依存的経路に与える影響を、TLR2 に結合し MyD88 依存的経路のみを介して NF- κ B を活性化する LTA-SA (以下、LTA) を用いて評価した。RAW-ELAM 細胞に si70(COOH)、si70(NH₂) と LTA を共作用させて NF- κ B 活性化を評価した結果、LTA 単独作用により NF- κ B 活性化が認められたのに対して、si70(COOH)、si70(NH₂) 共作用群で共に NF- κ B 活性化を抑制した (Fig. 12)。

以上の結果より、si70(COOH)、si70(NH₂) は MyD88 依存的経路を抑制するものと考えられた。MyD88 は多くの TLR の下流でアダプター分子として作用し、自然免疫活性化に重要な役割を果たしているため、si70(COOH)、si70(NH₂) は MyD88 依存的経路を抑制することで自然免疫抑制作用、即ち負の免疫攪乱作用を有する可能性が示唆された。

酸化チタンの起炎性評価

ナノマテリアルはその物性によって生体に与え得る正負の免疫攪乱作用が異なる可能性が示唆された。しかし、ナノマテリアルが有する正負の免疫攪乱作用のバランスは、物性のみならずナノマテリアルの種類によっても異なると考えられる。そこで我々は、ナノマテリアル、マイクロマテリアル双方に汎用されている酸化チタンの免疫攪乱作用に注目した。

ナノ酸化チタンは、誘電体、触媒、UV カットなど多彩な機能を持ち、現在最も使用されているナノマ

テリアルの一つである。工業的に用いられる酸化チタンには結晶構造の違いから anatase 型、rutile 型の 2 種類がある。主な使用用途には、anatase 型は光触媒・太陽電池等、rutile 型は日焼け止めやファンデーションを始めとする化粧品、塗料、トナー、ゴム製品等がある。また、サブミクロンサイズ (700 ~ 1000 nm) の酸化チタンも、塗料や化粧品などに用いられている。更なる機能性付与のための形状制御も行われており、比表面積を増大することで使用粒子数を減少可能な針状酸化チタン、肌のすべすべ感を演出する化粧品素材としてのバルーン状の酸化チタンなど、様々なナノ酸化チタンの開発が進められている。

しかしながら近年、従来安全とされてきたナノ酸化チタンを肺に投与した際の炎症惹起作用とそれに伴う肺組織の傷害など、酸化チタンが正の免疫攪乱作用を有することを示唆する報告がなされている。結晶性シリカや、近年甚大な健康被害を引き起こしたことで知られるアスベスト等も、肺組織での炎症を発端として悪性腫瘍等の病態に至る。そのため、酸化チタンの炎症誘導機序を解析し、結晶性シリカやアスベスト等の炎症惹起誘導機序と比較検討することで、悪性腫瘍等に罹患する潜在的な可能性が明らかになると考えられる。そこで、結晶構造、粒子径、形状等の異なる各種酸化チタンの炎症惹起作用、即ち正の免疫攪乱作用に関して、IL-1 β 産生を指標として検討した。更に、酸化チタンがIL-1 β 産生を誘導するメカニズムについても検討した。

酸化チタンによる正の免疫攪乱作用を評価するにあたり、Table 1に示す粒子径・結晶構造・形状の異なる7種類の酸化チタンを用いて、酸化チタン粒子の炎症惹起作用即ち正の免疫攪乱作用を、IL-1 β 産生量を指標として体系的に評価した。また、結晶性シリカやアスベストが肺の慢性炎症や悪性腫瘍の発生を惹き起こす原因として知られるIL-1 β の産生誘導機序に基づき、酸化チタンのIL-1 β 産生誘導メカニズムの解明を行った。

結晶性シリカやアスベストによるIL-1 β 産生誘導は、① エンドサイトーシスによる粒子の取り込みによりNADPH oxidaseが活性化され、ROSを産生するこ

とでNalp3 inflammasomeを活性化する経路と、② エンドサイトーシスによる粒子の取り込み後、粒子によりリソソーム不安定化が起こり、リソソーム破裂によりリソソーム酵素Cathepsin Bが漏れ出し、それによりNalp3 inflammasomeを活性化する経路が報告されている (Fig. 13)。①と②の経路が交差する可能性は十分に考えられるが、詳細は不明である。更に、尿酸結晶は結晶性シリカ等と同様にマクロファージにおいてIL-1 β を産生誘導するが、その際に物質輸送やシグナル伝達の窓口として機能する脂質ラフトも関与するといった報告より、酸化チタンのIL-1 β 産生誘導経路へも脂質ラフトが関与する可能性を考えた。これより、Fig. 13に示した経路のうち、エンドサイトーシス、脂質ラフト、NADPH oxidase、ROS産生、リソソーム不安定化、そしてpro IL-1 β を切断し活性型IL-1 β とするcaspase-1の関与についての検討を行った。

酸化チタンは、結晶構造 (anatase型、rutile型)、粒子径、形状の異なる7種類を用いた。最初に、単球系THP-1細胞における各種酸化チタンの炎症惹起作用を、IL-1 β 産生量を指標に評価した。単球系THP-1細胞に各酸化チタンを作用させ、24時間後のIL-1 β 産生を測定した結果、R-1でのみIL-1 β 産生が認められた (Fig. 14a)。また、その他の炎症性マーカーとしてTNF α ・IL-8についても評価した結果、TNF α 、IL-8産生共にR-1でのみ顕著に認められた (Fig. 14b, c)。次に、単球系THP-1細胞をPMAにて分化させたマクロファージ様THP-1細胞における各種酸化チタンの炎症惹起作用を、IL-1 β 産生量を指標に評価した。その結果、全ての酸化チタンでIL-1 β の産生が認められ、特にR-1では顕著なIL-1 β 産生が誘導された (Fig. 15)。また、各結晶構造で比較すると、anatase型ではA-4が、rutile型ではR-1以外にはR-3が、他の酸化チタンと比較して強いIL-1 β 産生誘導能を有することが判明した。以上の結果から、粒子径がマイクロサイズである酸化チタンR-1は強い炎症惹起作用を有することが示唆され、ナノサイズである酸化チタンA-4、R-3についても炎症惹起作用を有する可能性が考えられた。しかし、粒子径50 μ m以下であるA-1で顕著なIL-1 β 産生は認められな

かったため、結晶構造等の因子を考慮に入れても、特定範囲の粒子径を持つ粒子がIL-1 β を顕著に誘導する可能性が考えられた。

前述の結果より、最も強いIL-1 β 産生誘導能を示したR-1を含むrutile型のR-1、R-2、R-3と、anatase型で最も強いIL-1 β 産生誘導が認められたA-4の計4種類を選択し、粒子径、形状、結晶構造の異なる酸化チタンのIL-1 β 産生誘導機序について比較検討した。

Adenosine TriPhosphate (ATP) は、P2X7受容体に結合し、細胞質内のK⁺を細胞外に流出させることで、NADPH oxidaseを活性化してROSを産生し、ROSがMAPK経路を活性化することでNalp3 inflammasomeを活性化すると考えられており、アクチン重合依存的なエンドサイトーシスや脂質ラフトは介さずIL-1 β 産生を誘導する。そこで、ATPと、同じくNalp3 inflammasomeを活性化してIL-1 β 産生を示す結晶性シリカをコントロールとして、各種酸化チタンのIL-1 β 産生誘導経路の関与を検討した。マクロファージ様THP-1細胞に各経路の阻害剤を前処理し、酸化チタンを添加して6時間後のIL-1 β 産生を測定した。エンドサイトーシス阻害剤のCytochalasin D、脂質ラフト阻害剤のMBCDをそれぞれ処理しIL-1 β 産生を評価したところ、ATPではIL-1 β 産生の抑制が認められなかったのに対して、結晶性シリカ及び各種酸化チタンによるIL-1 β 産生はいずれも強力に阻害された (Fig. 16a, b)。従って、いずれの酸化チタンも脂質ラフト・アクチン重合依存的エンドサイトーシスを介してIL-1 β 産生を誘導していることが判明した。更に、R-1では他の酸化チタンでIL-1 β 産生が抑制されなかったCytochalasin D 1 μ M作用群においてもIL-1 β 産生が顕著に阻害されたことから、IL-1 β 産生におけるアクチン重合依存的エンドサイトーシスの寄与率が大きいと考えられた。

次に、NADPH oxidase阻害剤のDPIと、ROS阻害剤のBHAを用いて検討したところ、ATP、結晶性シリカ、各種酸化チタンいずれにおいてもIL-1 β 産生が抑制された (Fig. 16c, d)。これより、いずれの酸化チタンもNADPH oxidaseの活性化と、それに伴うROSの産生を介してIL-1 β 産生を誘導していることが判明

した。更に、リソソーム安定化作用のあるBafilomycin A₁を用いて検討したところ、ATPではIL-1 β 産生が抑制されなかったのに対し、結晶性シリカ、各種酸化チタンいずれにおいてもIL-1 β 産生が阻害された (Fig. 16e)。また、Caspase-1阻害剤のzYVAD-fmkを作用させた結果、ATP、結晶性シリカ、各種酸化チタンいずれにおいてもIL-1 β 産生が阻害された (Fig. 16f)。以上の結果を総合すると、酸化チタンA-4、R-1、R-2、R-3はいずれも、脂質ラフトが関与するアクチン重合エンドサイトーシスを介して取り込まれた後、NADPH oxidaseの活性化によりROSを産生させる一方で、リソソームに移行し酸性リソソーム形成によりリソソームを不安定化させ、その結果、caspase-1を活性化することが示唆された。

ナノシリカの胎児への移行性評価

現在、成人に及ぼすナノマテリアルの影響とともに、妊娠時に母体がナノマテリアルに暴露された際の、胎児への影響に関しても評価が急がれている。これまで示してきた、シリカ・酸化チタンの起炎性作用、免疫抑制作用に関しても、胎児が出産した後、どのように影響していくのかを検討する必要がある。そこでまず、ナノシリカの胎児への移行性に関して検討した。妊娠マウスの母体に si70 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 (Fig. 17)。その結果、胎盤においては、細胞内に si70 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 (Fig. 17a)。さらに、胎児においては、肝臓で si70 が認められ、胎盤を通過し胎児にまで移行することが示された (Fig. 17b)。

D. 考察

非結晶性でナノサイズのシリカは、食品や化粧品などに汎用され、既に我々の生活の一部となっているため、経肺、経口、経皮など様々な経路で生体に取り込まれる可能性が考えられる。生体に取り込まれたシリカは、各臓器に存在するマクロファージが貪食し様々な免疫反応を惹き起こす可能性がある。まずナノマテリアルの特性評価として、粒子径、表

面修飾の異なるシリカのマウスマクロファージに対する細胞傷害性と炎症性サイトカイン産生について検討した。その結果、si70 が顕著な細胞傷害性と TNF α 産生を示すこと、更に si70 に表面修飾基を付与することで細胞傷害性、TNF α 産生が共に認められなくなることを見出した。更に、ヒトマクロファージを用いて粒子径の異なるシリカが誘導する IL-1 β 産生を指標として炎症惹起作用を評価した結果、シリカの粒子径が大きくなるにつれて IL-1 β 産生量の増加が認められた。次に、最も顕著な IL-1 β 産生量が認められた si1000 に種々表面修飾基を付与すると、修飾基によっては IL-1 β 産生量が減少することが判明し、ナノ材料に表面修飾を付与することで正の免疫攪乱作用を減弱できる可能性が示された。以上の結果より、si70 は TNF α 産生を誘導することで炎症を惹起する一方で、si1000 は IL-1 β 産生により炎症を惹起する可能性が示唆された。本結果は、粒子径の違いにより異なる炎症惹起作用を有する可能性を提示するものであり、大変興味深い結果である。本結果は、新規にナノ材料を創製する際に重要な情報となり得るものと考えられる。また、シリカは、マクロファージ等の免疫担当細胞に発現しているクラス A スカベンジャー受容体、例えば macrophage receptor with a collagenous structure (MARCO)、Class-A scavenger receptors-A I / II (SR-A I / II) 等に結合し細胞傷害性、サイトカイン産生等を示すことが知られている。シリカの性質によってスカベンジャー受容体への結合性や受容体を介したシグナルが異なる可能性も十分考えられるため、各粒子径・表面電荷のシリカがそれぞれ異なる作用を示した理由は、受容体との相互作用の違いによるものと考えられる。

次に、負の免疫攪乱作用即ち免疫抑制作用について、si70 (COOH)、si70 (NH₂) を LPS と共作用させサイトカイン産生を比較検討したところ、共に LPS 単独作用群と比較して、TNF α 量を増大させるが、IL-6 量は減少させる結果となった。このメカニズム解明の一端として、TLR4 シグナル下流分子の活性化を検討したところ、si70 (COOH)、si70 (NH₂) は共に MyD88 依存的経路を抑制する可能性が示唆された。このこと

より、これらシリカは TLR4 のシグナル伝達を抑制する作用、即ち負の免疫攪乱作用という側面を有することが示唆された。本現象の理由として現在は、シリカが、マクロファージ表面上の SR-A I / II への結合により、TAM ファミリーの一つである Mertk を介した STAT1 活性化を惹起し、SOCS-1 を活性化することで IL-6 産生を抑制する可能性を考え更なる検討を進めている。また I κ B ファミリータンパク質である、I κ B- ζ や Bcl-3、I κ BNS などの核内タンパク質が NF- κ B により転写活性化されるサイトカインの発現調節を担っているという報告もあり、今後検討を進める予定である。また、si70 (COOH) と si70 (NH₂) ではシグナル下流分子の活性化抑制の度合いが若干異なった。この原因は、スカベンジャー受容体のリガンド認識ドメインの帯電状態によってリガンドとの相互作用が異なるという報告より、シリカの表面電荷が表面修飾基によって変化したことでスカベンジャー受容体との相互作用が異なり、TLR シグナルに与える影響の変化が認められた可能性を考えている。今後より詳細な検討が必要である。

結晶構造、粒子径、形状の異なる酸化チタンを用いて、IL-1 β 産生を指標とした炎症惹起作用、即ち正の免疫攪乱作用について評価したところ、酸化チタンの物性によって異なる IL-1 β 産生量を示すことを見いだした。特に、粒子径 5 μ m 以下の酸化チタン R-1 は、強い IL-1 β 産生誘導能を示し、単球系 THP-1 細胞の検討においては炎症性サイトカイン TNF α やケモカイン IL-8 をも顕著に誘導したことから、強い炎症惹起能を有する可能性が示唆された。TNF α 、IL-8 がいずれも IL-1 β とほぼ同じ挙動を取った理由は、IL-1 β のオートクライン作用によって NF- κ B が活性化し、その結果 TNF α や IL-8 が産生された可能性を考えている。シリカの結果も考慮すると、IL-1 β 産生を介した炎症惹起作用即ち正の免疫攪乱作用を有する材料の粒子径は、数 μ m ~ 数十 μ m の範囲にあると考えられた。また、R-1 に続いて強い IL-1 β 産生誘導能を示した酸化チタン A-4 や R-3 の結果より、粒子径が 10 nm ~ 40 nm ほどの粒子であっても、酸化チタンの形状や結晶構造によっては IL-1 β 産生誘導能が向上するものと考えられた。今後、各種粒子の

電子顕微鏡観察を行い、粒子径、形状とその炎症惹起作用の連関をより詳細に解析したいと考えている。

また、結晶構造、粒子径、形状の違いによるIL-1 β 産生誘導機序を解析するために、酸化チタンA-4、R-1、R-2、R-3についてIL-1 β 産生誘導で知られる各経路の関与について検討したところ、いずれの酸化チタンもアスベストやシリカと類似の経路を介してIL-1 β を産生誘導していることが判明し、ナノマテリアルの及ぼす危険性の一端を示す結果であると考えられた。今後は、Nalp3 inflammasomeの関与を検討し、更にこれらの経路間の関連も解析していく予定である。

さらに、ナノマテリアルが母体から胎児にまで移行することも示された。現在は、肝臓だけでなく、脾臓への集積も検討している。胎児肝臓は、免疫細胞が数多く存在することから、出産した後の免疫システムになんらかの影響が及ぼされる可能性も考えられる。この点に関しても、現在検討を進めているところである。

E. 結論

ナノマテリアルの安全性評価を目的に、粒子径、結晶構造、形状、表面修飾の異なる各種非結晶性シリカ、各種酸化チタンの、正の免疫攪乱作用（炎症惹起作用）と負の免疫攪乱作用（免疫抑制作用）について検討し、以下の結論を得た。

1. シリカを用いて負の免疫攪乱作用を解析した結果、粒子径 70 nm、COOH 基もしくはNH₂基を修飾したシリカがTLRシグナルを抑制する可能性を示した。
2. 粒子径の異なるシリカを用いて炎症惹起作用の観点から正の免疫攪乱作用を検討したところ、si70はTNF α 産生を誘導することで炎症を惹起する一方で、si1000はIL-1 β 産生により炎症を惹起する可能性が示唆された。
3. 酸化チタンを用いて炎症惹起の観点から正の免疫攪乱作用を解析したところ、粒子径 5 μ m以下、rutile型の酸化チタンで、強い炎症惹起作用を示す可能性が示唆され、メカニズム解析よ

り、アスベストと類似の危険性を有する可能性が示された。

4. ナノマテリアルを妊娠マウスに投与することで、胎盤のみならず、胎児にまで移行することが示された。

以上、ナノマテリアルのもたらす正負の免疫攪乱作用について、新たな知見を得ることができた。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

①論文発表

1. 吉川友章、鍋師裕美、**吉岡靖雄**、トキシコキネティクス/トキシコプロテオーム解析によるナノマテリアルの生物学的影響評価、薬学雑誌、*in press*
2. **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 NEWS 第12号、*in press*

②学会発表

国内学会

1. 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。
2. 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。
3. **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。
4. 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.

5. 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.
6. 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.
7. 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年回, 京都, 2009年3月.
8. 吉田徳幸, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 山下浩平, 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年回, 京都, 2009年3月.
9. 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との関連評価., 日本薬学会 第129年回, 京都, 2009年3月.
10. 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年回, 京都, 2009年3月.
11. 森重智弘, 吉岡靖雄, 田辺綾, 渡辺光, 姚醒蕾, 堤康央, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作 : 各種酸化チタンの起炎性評価及びそのメカニズム解析., 日本薬学会 第129年回, 京都, 2009年3月.

国際学会

12. 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, HUP0 7th Annual World Congress Amsterdam 2008, Amsterdam (The Netherlands), 16 - 20 August, 2008.
13. 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., Zurich (Switzerland), 7-10 September, 2008
14. Yoshioka Y., Tanabe A., Mukai Y., Okada N., Tsutsumi Y., Nakagawa S. : Nanosilicas with various surface potential induce the different profile of cytokine production on macrophage., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore (U.S.A.), 15-19 March, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

該当事項無し

②実用新案登録

該当事項無し

③その他

該当事項無し

I. 研究協力者

森重智弘 ; 大阪大学大学院薬学研究科 博士後期課程 3年

田辺綾 ; 大阪大学大学院薬学研究科 博士前期課程 2年

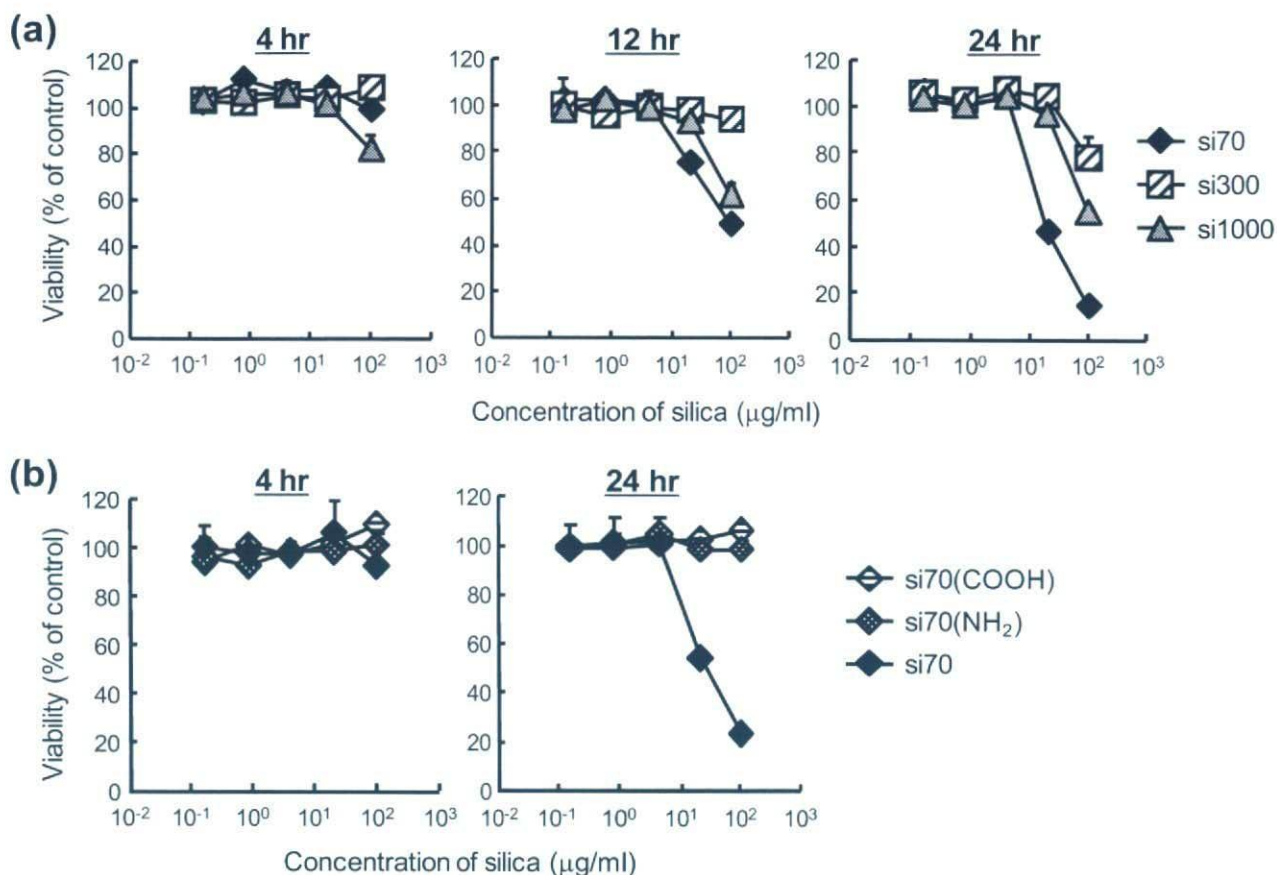


Fig. 1 粒子径・表面電荷の異なる様々なシリカ粒子のRAW264.7細胞に対する細胞傷害性試験。RAW264.7細胞を、各シリカ粒子 (0.16、0.8、4、20、100 μg/ml) 存在下で4、12、24時間培養した。その後メチレンブルーアッセイにて細胞生存率を評価した。誤差範囲はS.D.表記である。

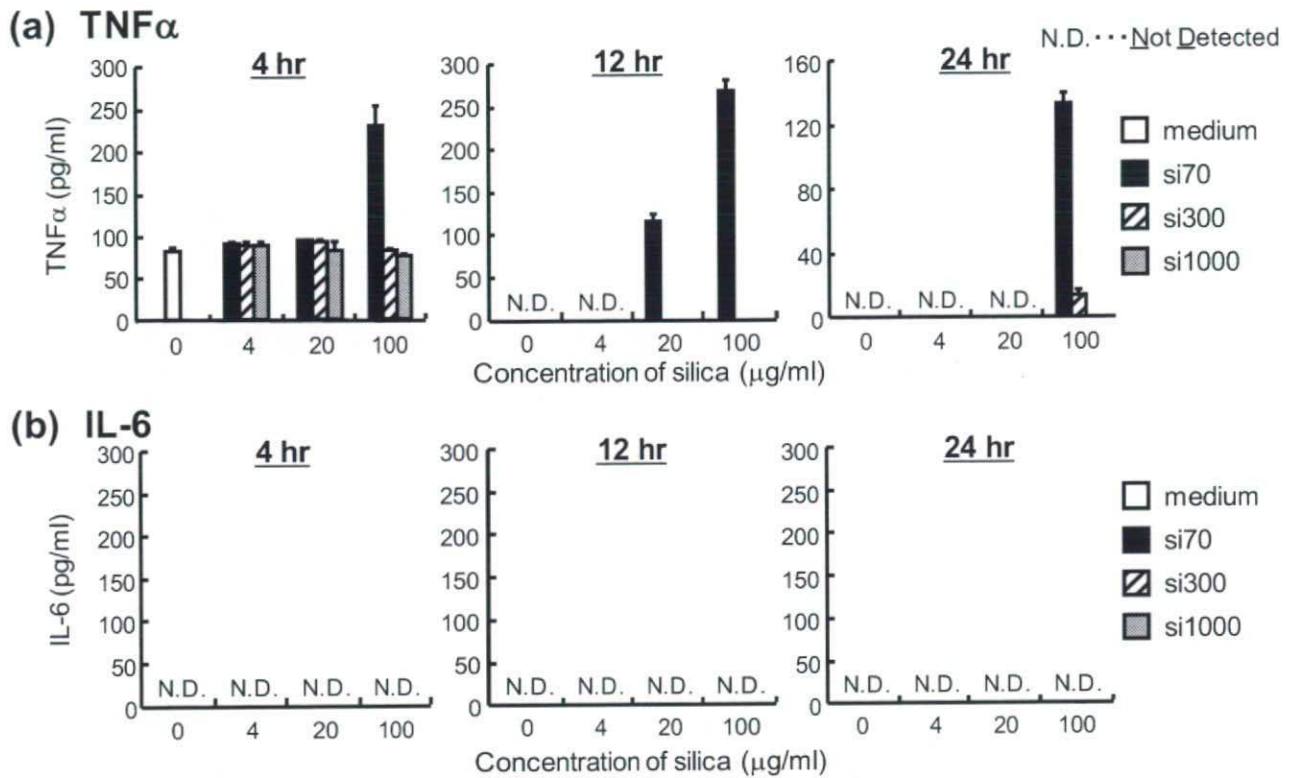


Fig. 2 粒子径の異なるシリカ粒子のRAW264.7細胞に対するサイトカイン産生誘導能評価。RAW264.7細胞を、粒子径70、300、1000 nmのシリカ粒子(4、20、100 $\mu\text{g/ml}$)存在下で4、12、24時間培養した。その後上清を回収し、ELISAにて(a) TNF α 及び(b) IL-6産生量を評価した。誤差範囲はS.D.表記である。

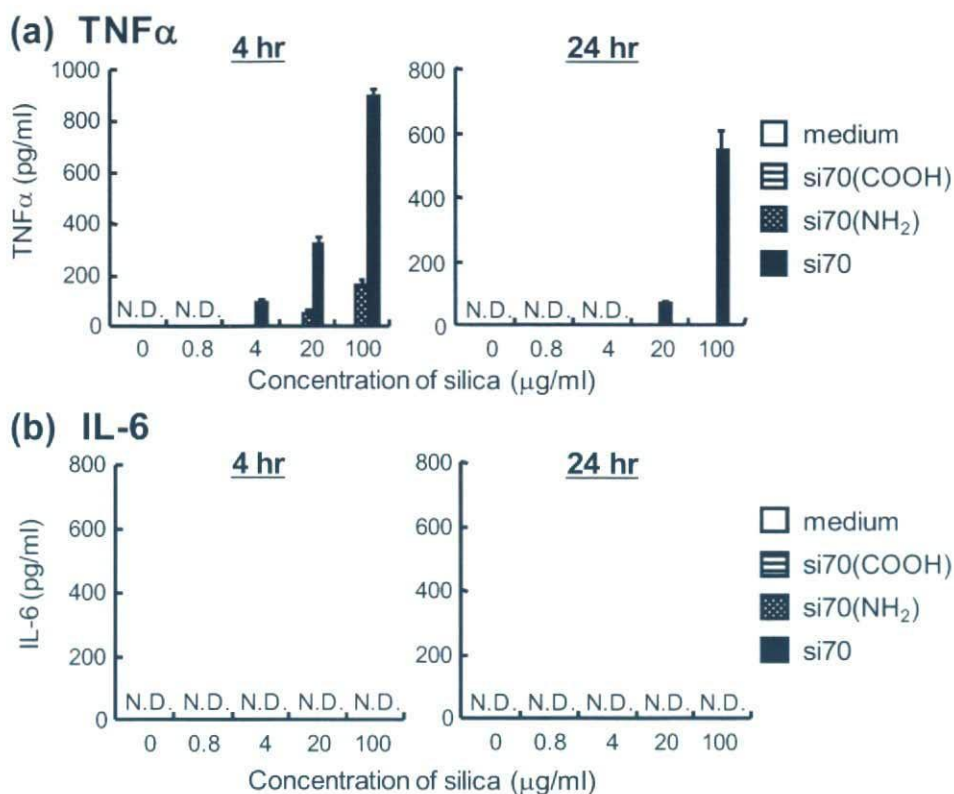


Fig. 3 表面電荷の異なるシリカ粒子のRAW264.7細胞に対するサイトカイン産生誘導能評価。RAW264.7細胞を、各シリカ粒子 (0.8、4、20、100 μg/ml) 存在下で4、24時間培養した。その後上清を回収し、ELISAにて (a) TNFα及び (b) IL-6産生量を評価した。誤差範囲はS.D.表記である。

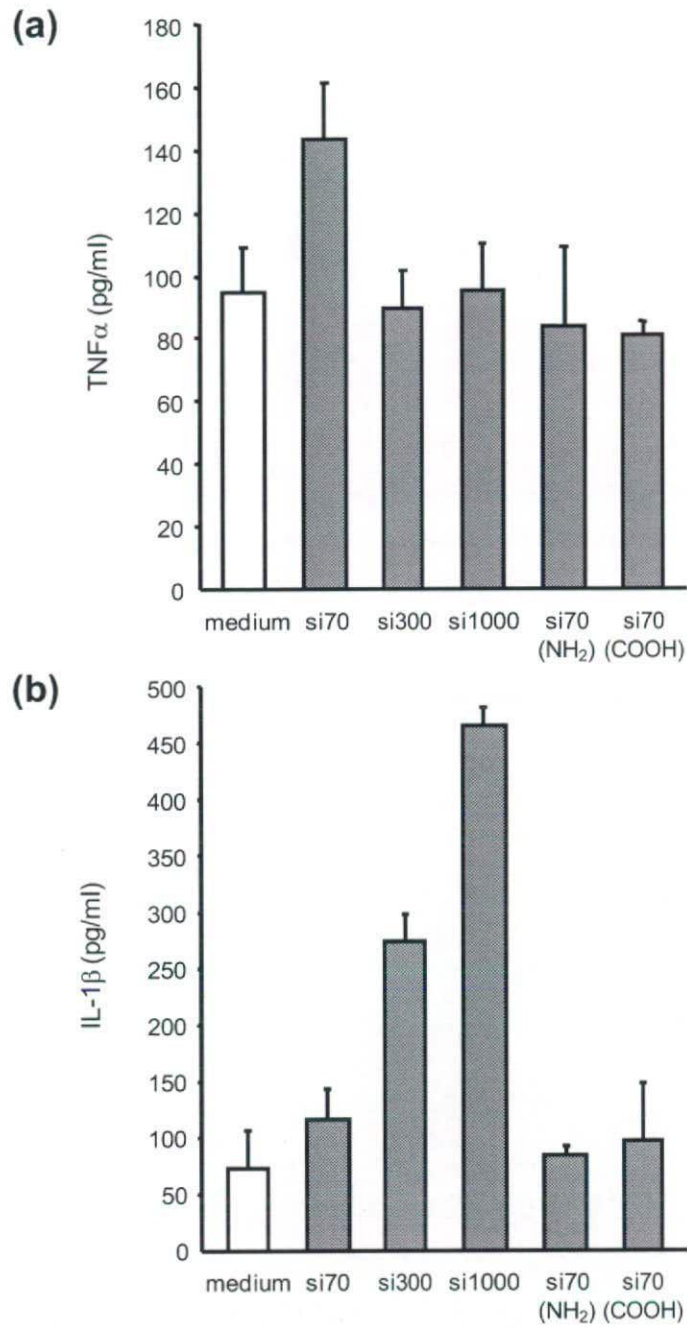


Fig. 4 シリカ粒子はTHP-1マクロファージ細胞に対してサイトカイン産生を誘導する。THP-1細胞をPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) によりマクロファージへと分化誘導した後、各シリカ (100 μ g/ml) 存在下で6時間培養した。続いて上清を回収し、ELISAにて (a) TNF α 及び (b) IL-1 β 産生量を評価した。誤差範囲はS.D.表記である。

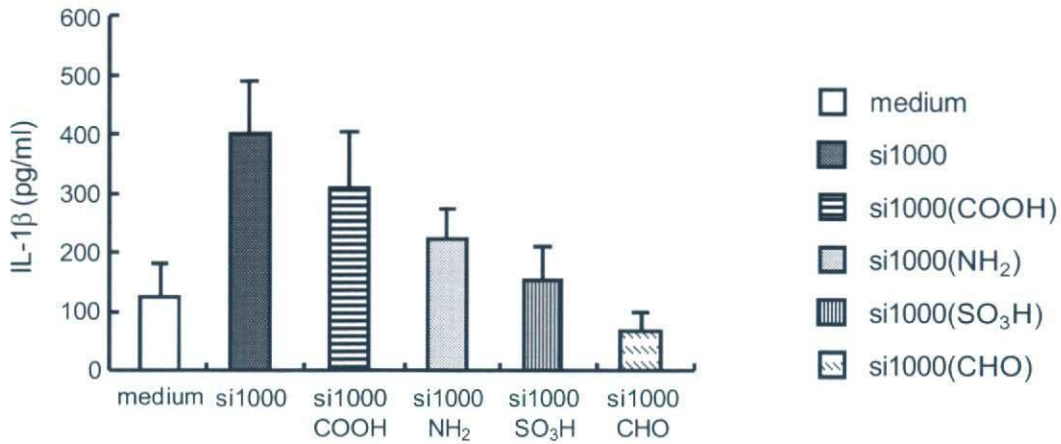


Fig. 5 シリカ粒子のTHP-1マクロファージ細胞に対するIL-1 β 産生誘導能は表面修飾により変化する。THP-1細胞をPMAによりマクロファージへと分化誘導し、各シリカ（100 μ g/ml）存在下で6時間培養した。その後上清を回収し、ELISAにてIL-1 β 産生量を評価した。誤差範囲はS.D.表記である。

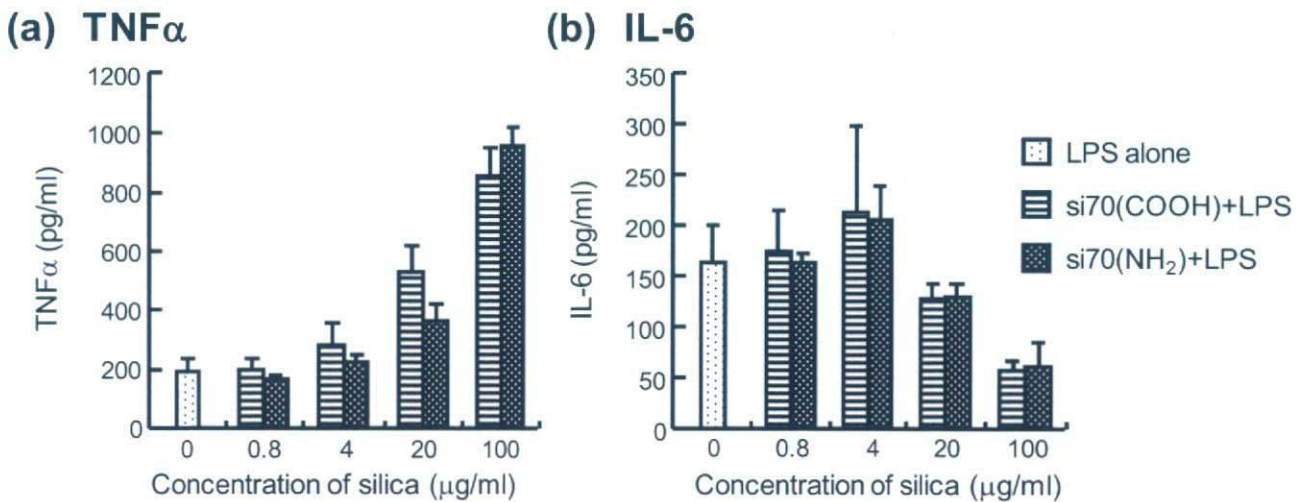


Fig. 6 ナノシリカは、LPS刺激により産生誘導されるTNF α 量を増大させ、IL-6量を減少させる。RAW264.7をナノシリカ（0.8、4、20、100 μ g/ml）とLPS（1.25 μ g/ml）共存下で24時間培養した。培養上清中の（a）TNF α 、（b）IL-6濃度をELISA法により測定した。誤差範囲はS.D.表記である。

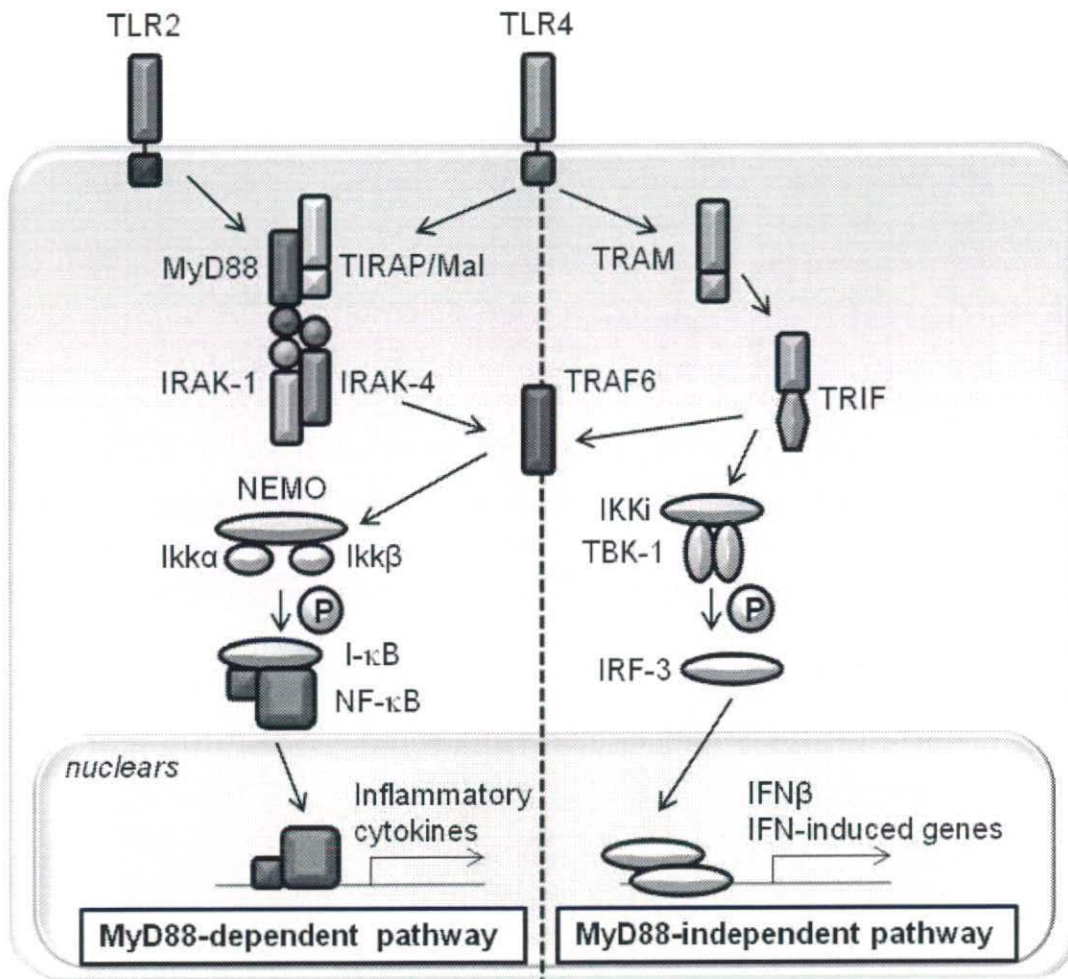


Fig. 7 TLR2/4シグナル概略図: MyD88依存的経路とMyD88非依存的経路。Toll-like receptor 4 (TLR4) シグナル伝達経路は、MyD88依存的経路と、MyD88非依存的経路の2種類に大別される。MyD88依存的経路の活性化により、NF- κ Bの早期活性化を介して種々の炎症性サイトカインの発現が誘導される。MyD88非依存的経路の活性化により、IRF3を介したIFN- β やIFN誘導性遺伝子群の発現、NF- κ Bの活性化が誘導される。TLR2シグナル伝達においては、MyD88依存的経路が選択的に活性化される。

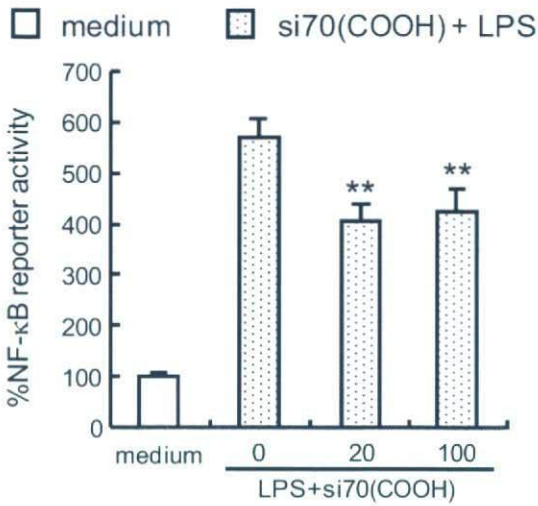


Fig. 8 si70(COOH)は、LPS刺激により誘導されるNF-κBの活性化を抑制する。NF-κB応答性ルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入したRAW 264細胞 (RAW-ELAM cells) にsi70(COOH) (0、20、100 μg/ml) とLPS (0.25 μg/ml) を6時間共作用させた。細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。誤差範囲はS.D.表記である。

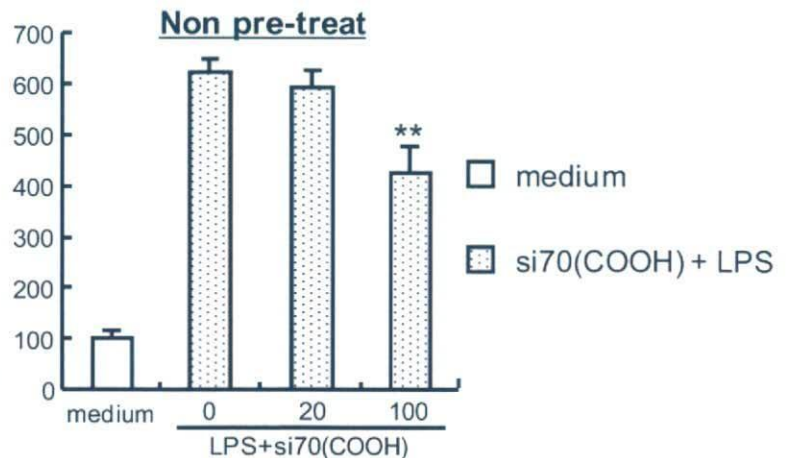
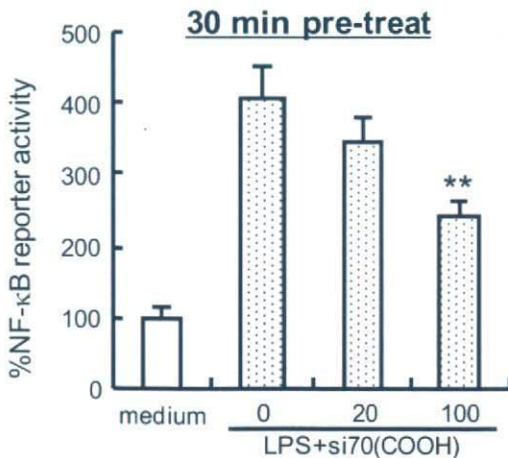
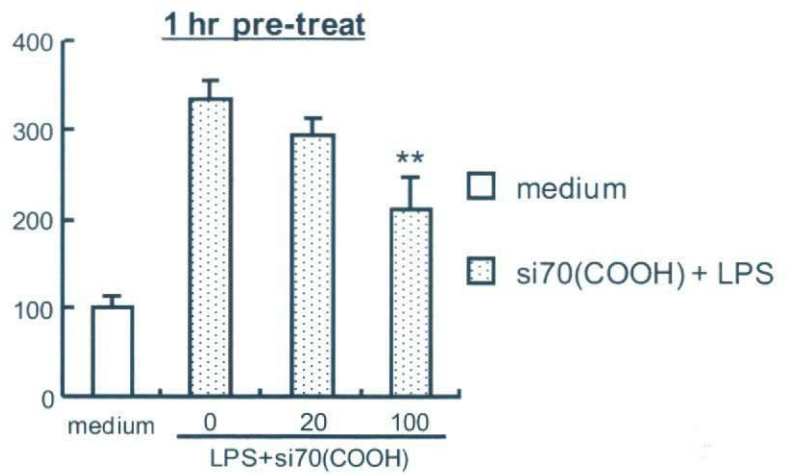
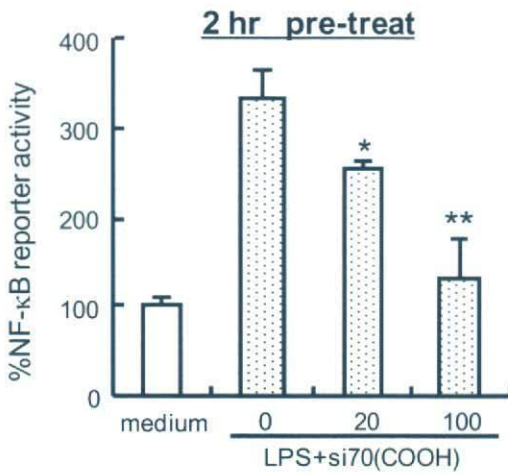


Fig. 9 si70(COOH)は、LPS刺激により誘導されるNF-κBの活性化を抑制する。RAW-ELAM cellsにsi70(COOH) (0、20、100 μg/ml) を前処理し、LPS (0.25 μg/ml) をさらに6時間作用させた。細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。誤差範囲はS.D.表記である。

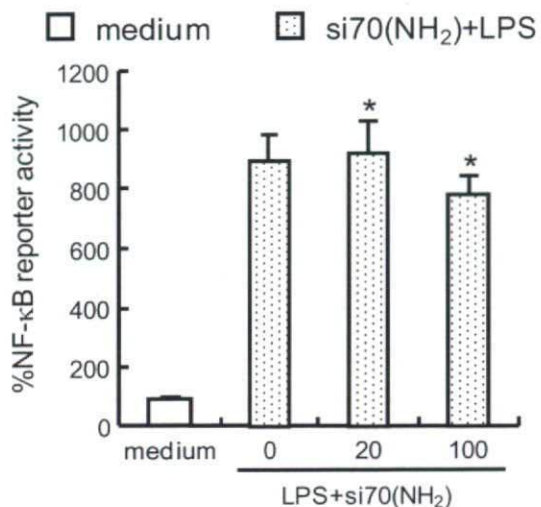
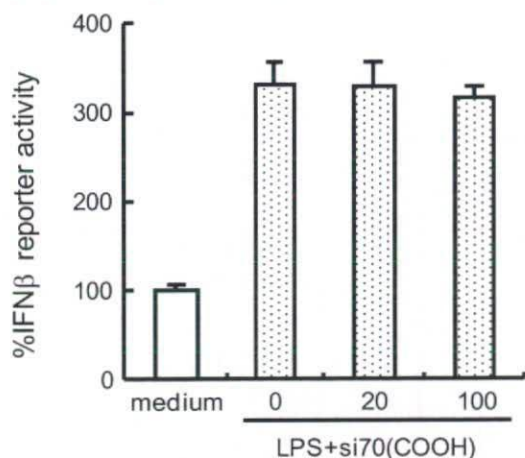


Fig. 10 si70(NH₂) は、LPS刺激により誘導されるNF-κBの活性化を抑制する。RAW-ELAM cells にsi70(NH₂) (0、20、100 μg/ml) とLPS (0.25 μg/ml) を6時間共作用させた。細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。誤差範囲はS.D.表記である。

(a) si70(COOH)



(b) si70(NH₂)

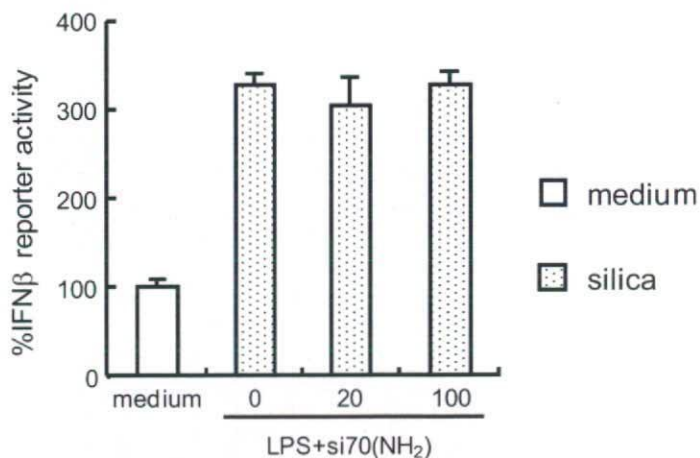
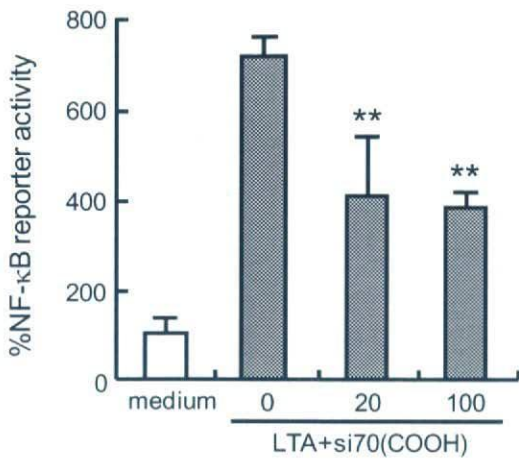


Fig. 11 LPSが誘導するIFNβ活性化にシリカが及ぼす影響。Interferon β (IFNβ) プロモーター配列の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドをRAW264細胞に形質導入した細胞 (RAW-IFNβ細胞) に各濃度 (0、20、100 μg/ml) のシリカ (a) si70(COOH)、(b) si70(NH₂) と、0.25 μg/mlのLPSを作用し、6時間培養した。その後細胞破碎液中のルシフェラーゼ活性を測定した。誤差範囲はSD表記である。

(a) si70(COOH)



(b) si70(NH₂)

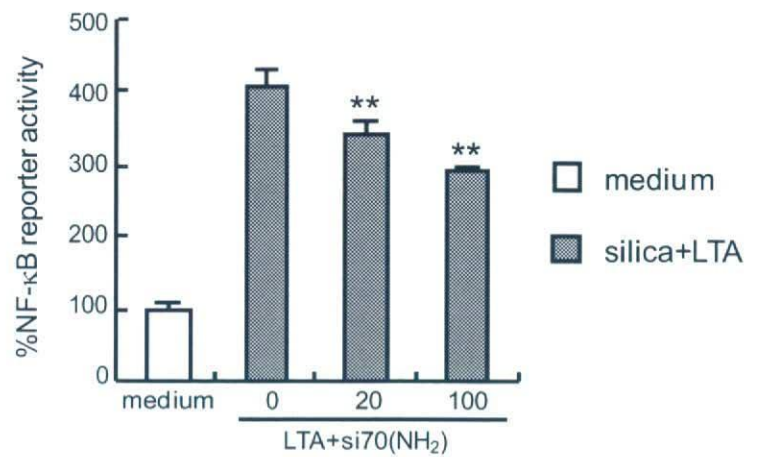


Fig. 12 LTA-SAが誘導するNF-κB活性化にシリカが及ぼす影響

RAW-ELAM細胞に各濃度 (0、20、100 μg/ml) のシリカ (a) si70(COOH)、 (b) si70(NH₂) と、5 μg/mlのLTA-SAを作用し、6 時間培養した。その後細胞破碎液中のルシフェラーゼ活性を測定した。誤差範囲はSD表記である。

Table 1 The behavior of titanium dioxide.

	crystal construction	size
A-1	anatase	<50 μm
A-2	anatase	< 25 nm
A-3	anatase	5 nm
A-4	anatase	10 nm
R-1	rutile	< 5 μm
R-2	rutile	30 ~40 nm
R-3	rutile	~10 nm × 40 nm (spicula)

anatase : photocatalyst

rutile : food, paint, cosmetic

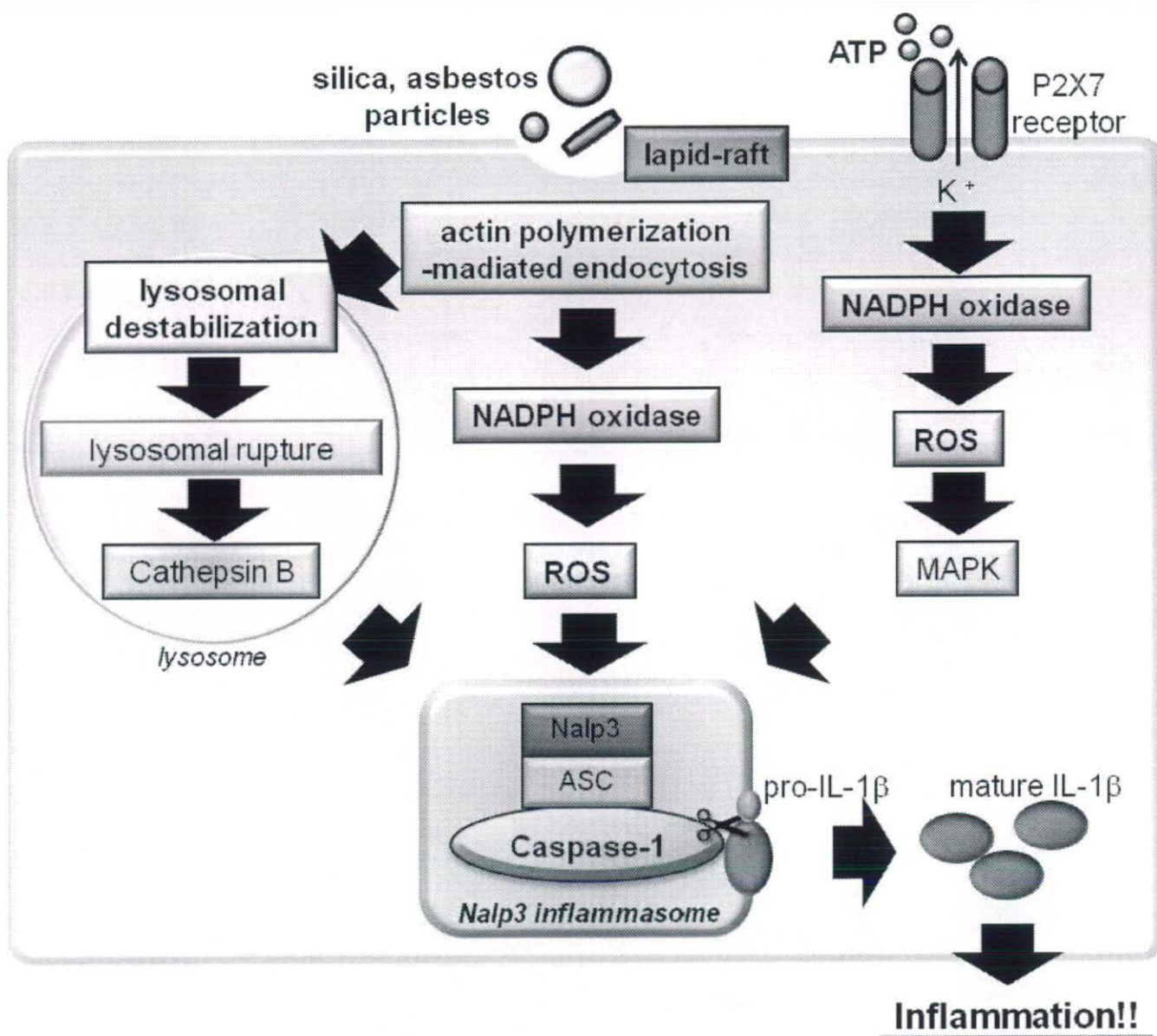


Fig. 13 酸化チタンにより誘導されるインフラマソーム活性化の予想経路