

写真13 実験3のnSP30経鼻投与
 A: 肺胞上皮Ⅱ型細胞核内に粒子が観察される
 B: 肺円柱上皮細胞内に粒子が観察される
 C: 肝細胞核内に粒子が観察される
 D: リンパ球内に粒子が観察される
 全て無染色で観察

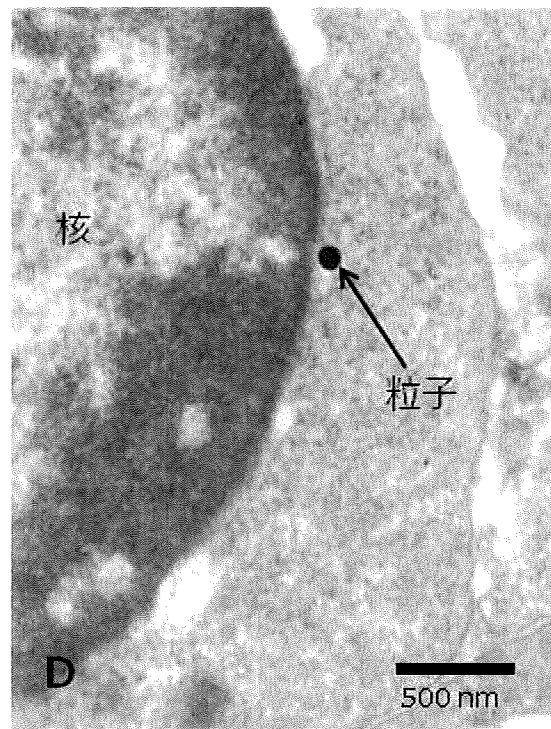
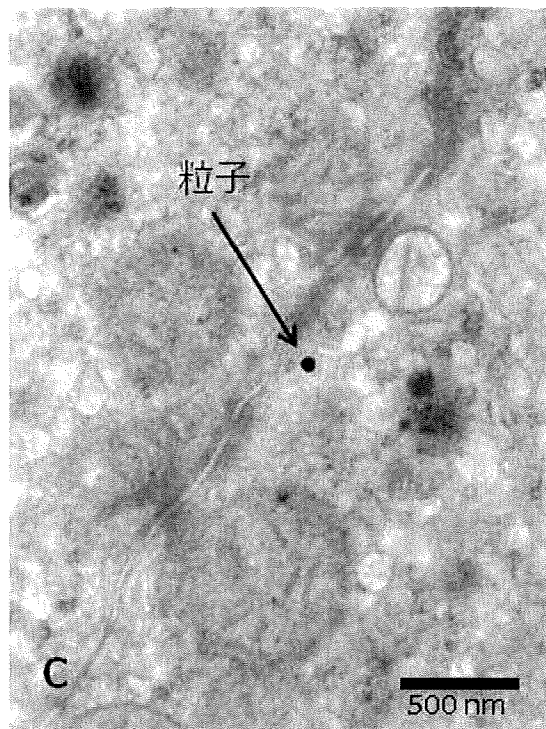
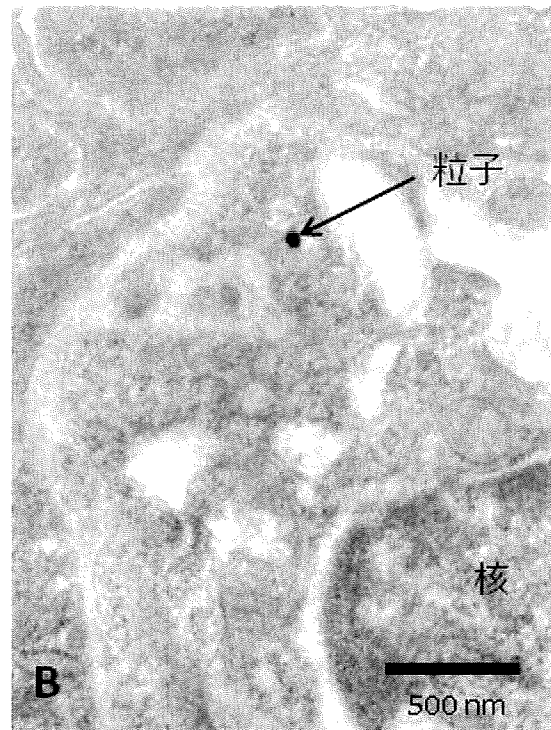
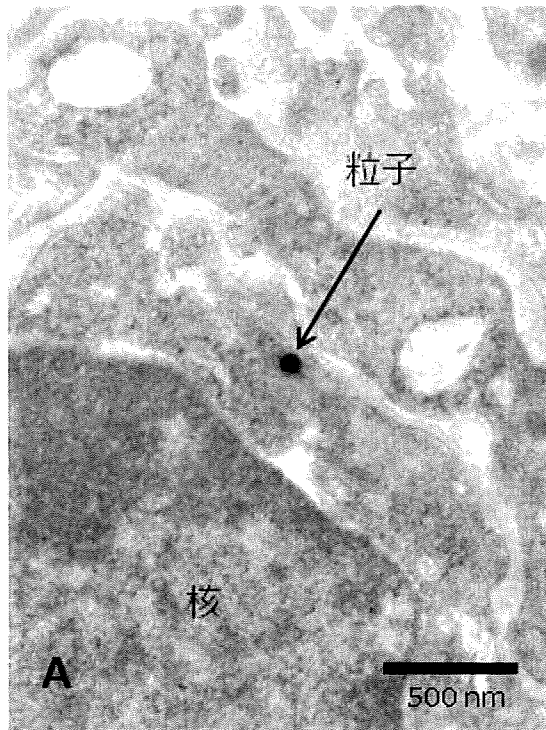


写真14 実験3のnSP70経鼻投与

- A: 肺胞上皮Ⅱ型細胞内に粒子が観察される
 - B: 肺胞上皮Ⅰ型細胞内に粒子が観察される
 - C: 肝細胞内に粒子が観察される
 - D: リンパ球内に粒子が観察される
- 全て無染色で観察

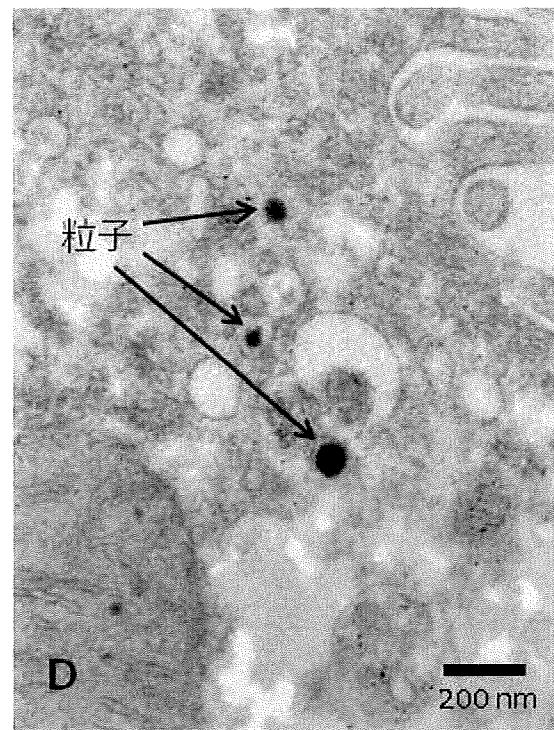
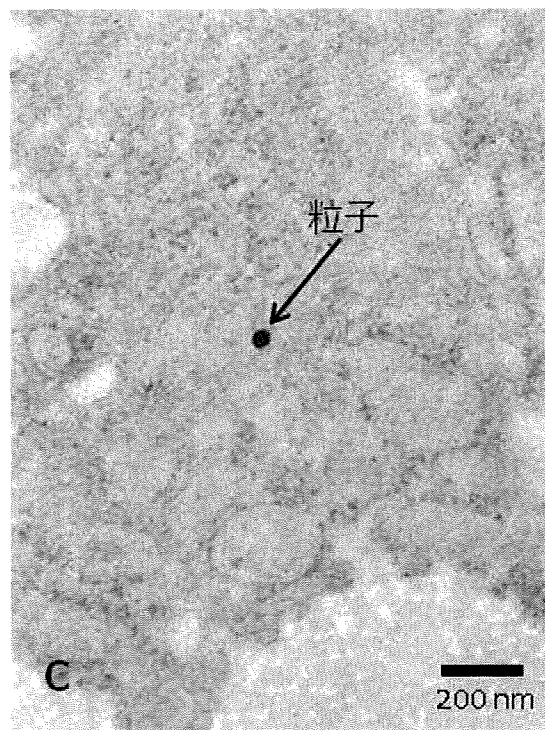
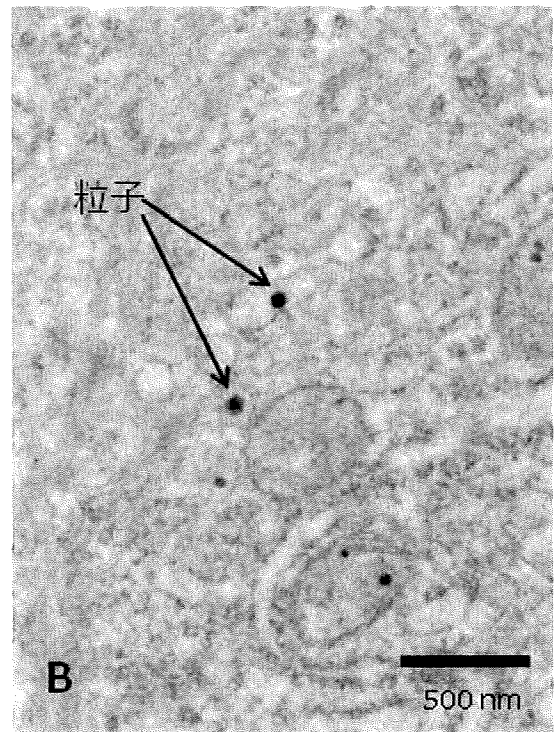
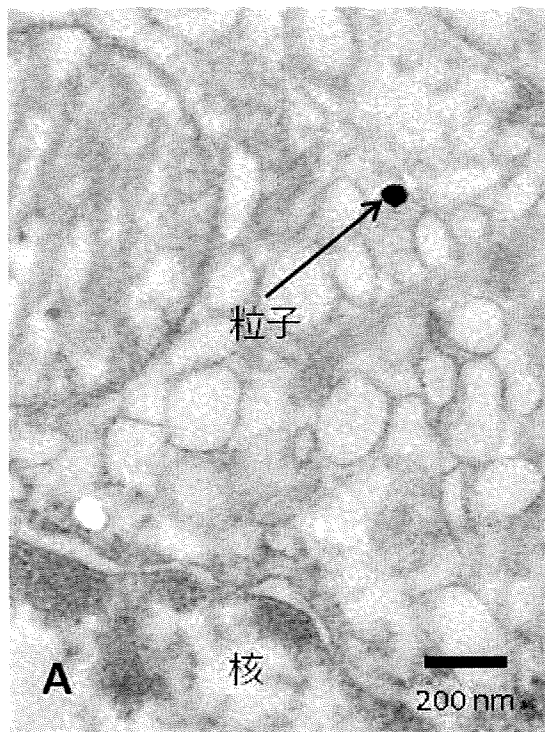


写真15 実験4のnSP70を強制経口投与
 A: 胃粘膜の壁細胞内に粒子が観察される
 B: 小腸粘膜の吸収上皮細胞内に粒子が観察される
 C: 大腸粘膜の杯細胞内に粒子が観察される
 D: 肝細胞内に粒子が観察される
 全て無染色で観察

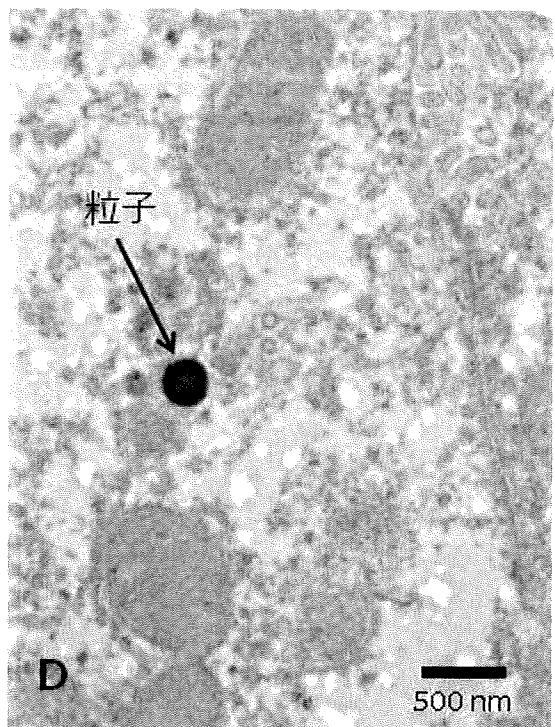
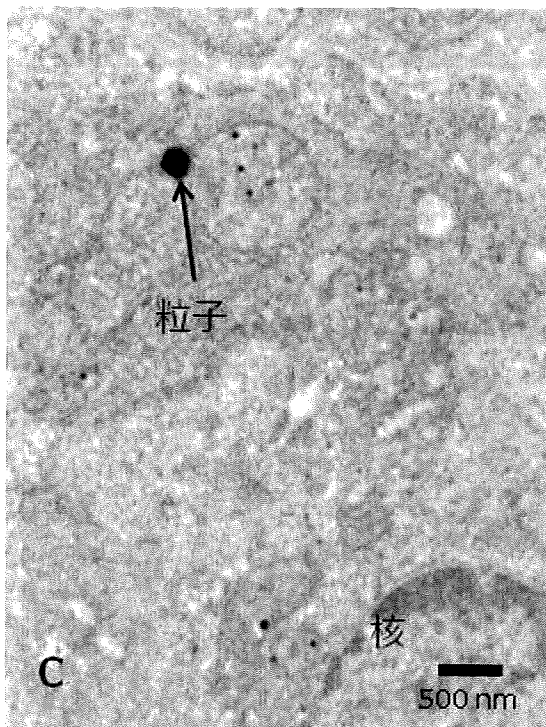
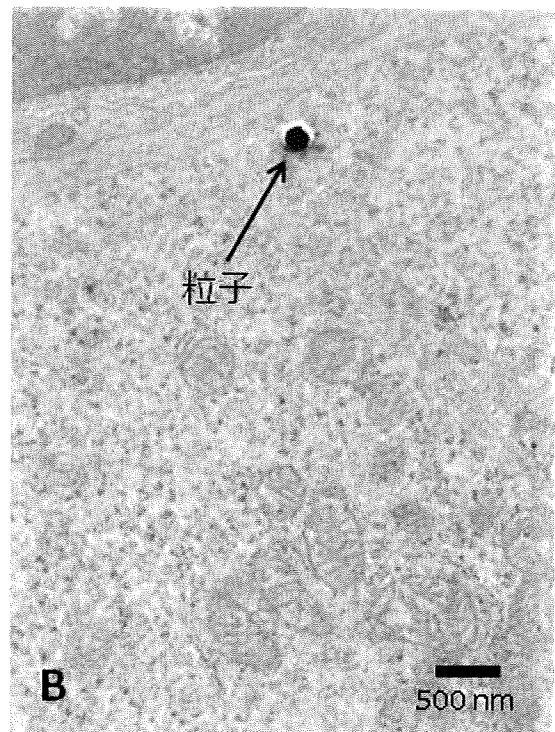
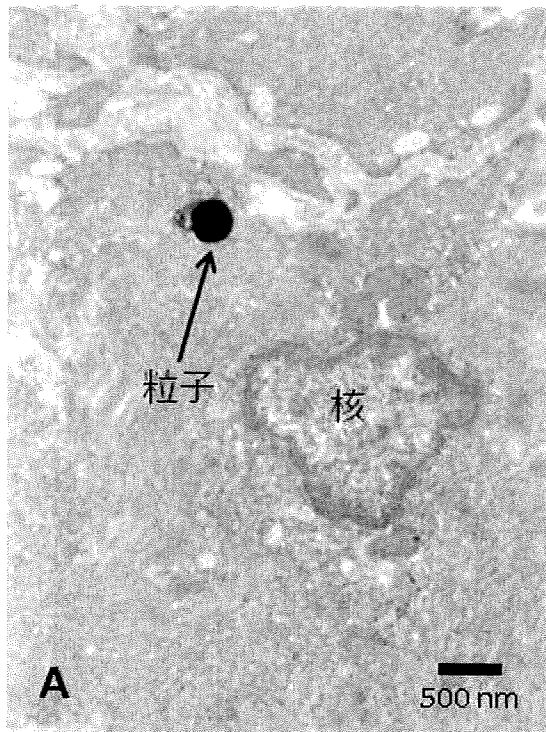


写真 16 実験4のnSP300を強制経口投与
 A: 胃粘膜の固有層細胞内に粒子が観察される
 B: 小腸粘膜の吸収上皮細胞内に粒子が観察される
 C: 大腸粘膜の吸収細胞内に粒子が観察される
 D: 肝細胞内に粒子が観察される
 全て無染色で観察

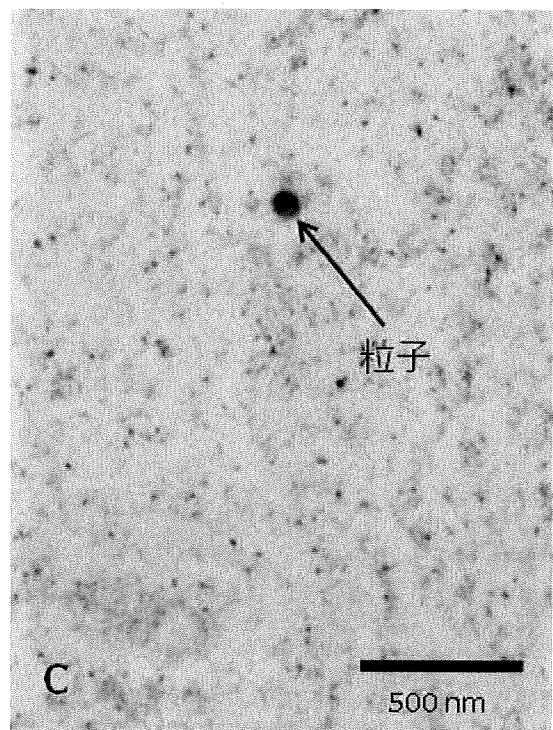
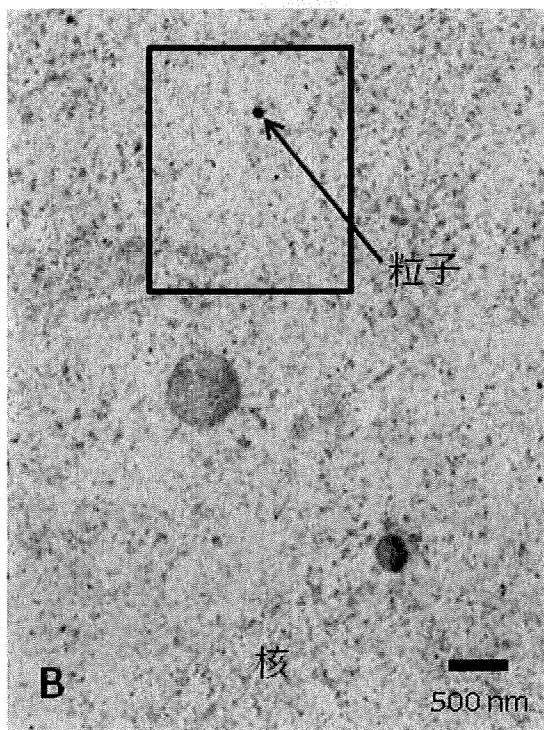
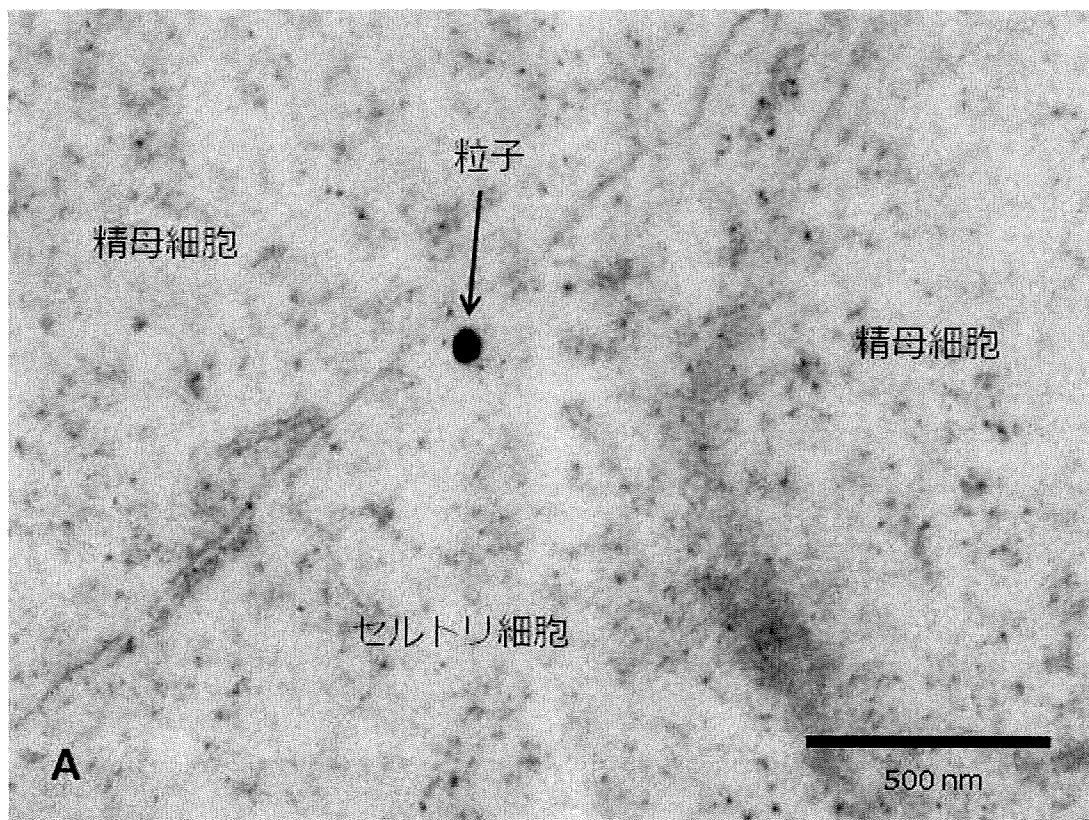


写真 17 実験5のnSP70を尾静脈内投与
 A: セルトリ細胞内に粒子が観察される
 B: 精母細胞内に粒子が観察される
 C: Bの拡大像
 全て無染色で観察

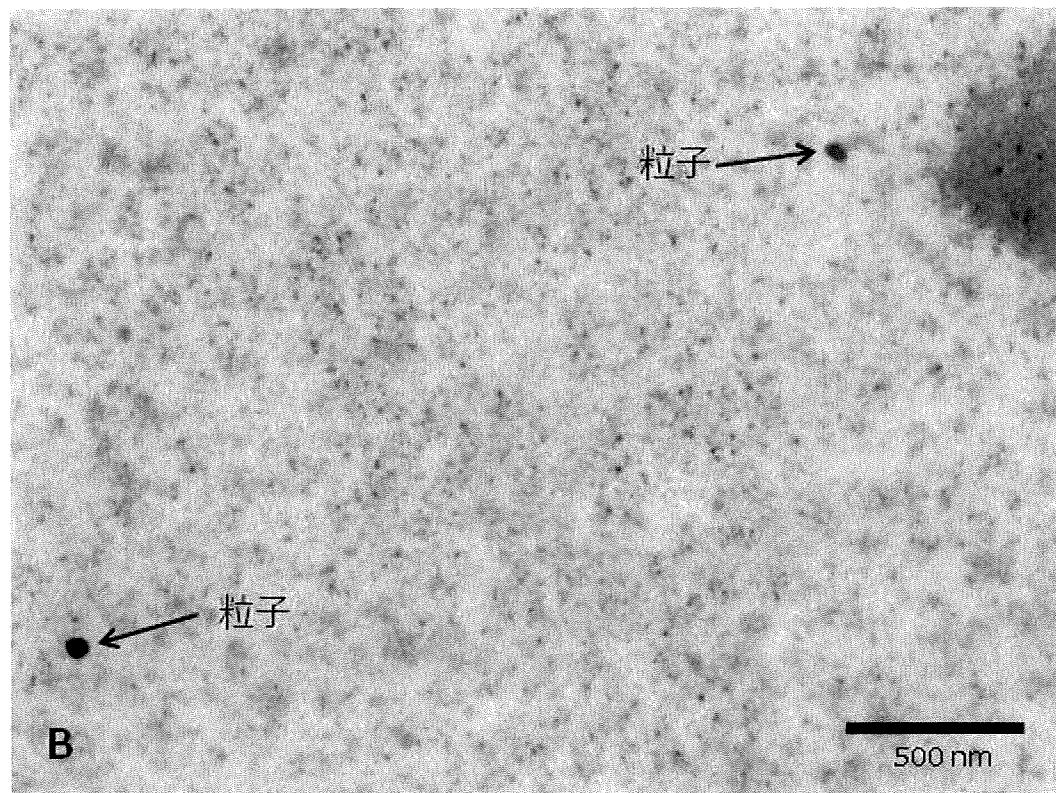
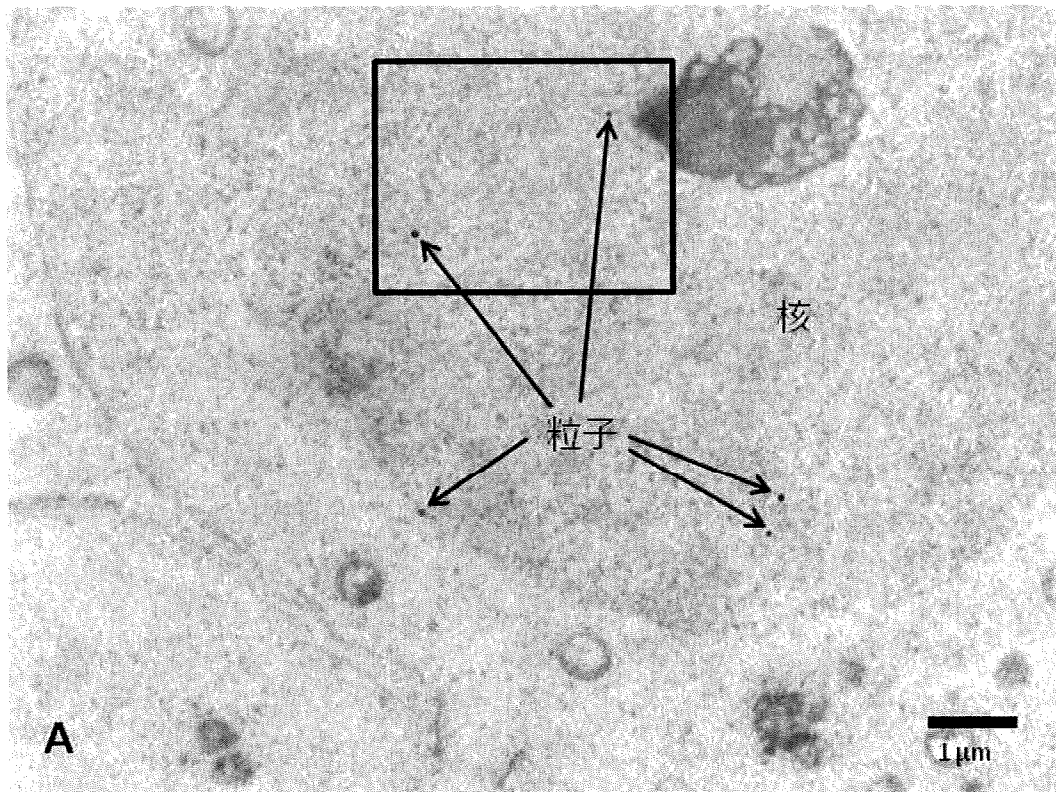


写真18 実験5のnSP70を尾静脈内投与
 A:精母細胞核内に数個の粒子が観察される
 B: Aの拡大像
 全て無染色で観察

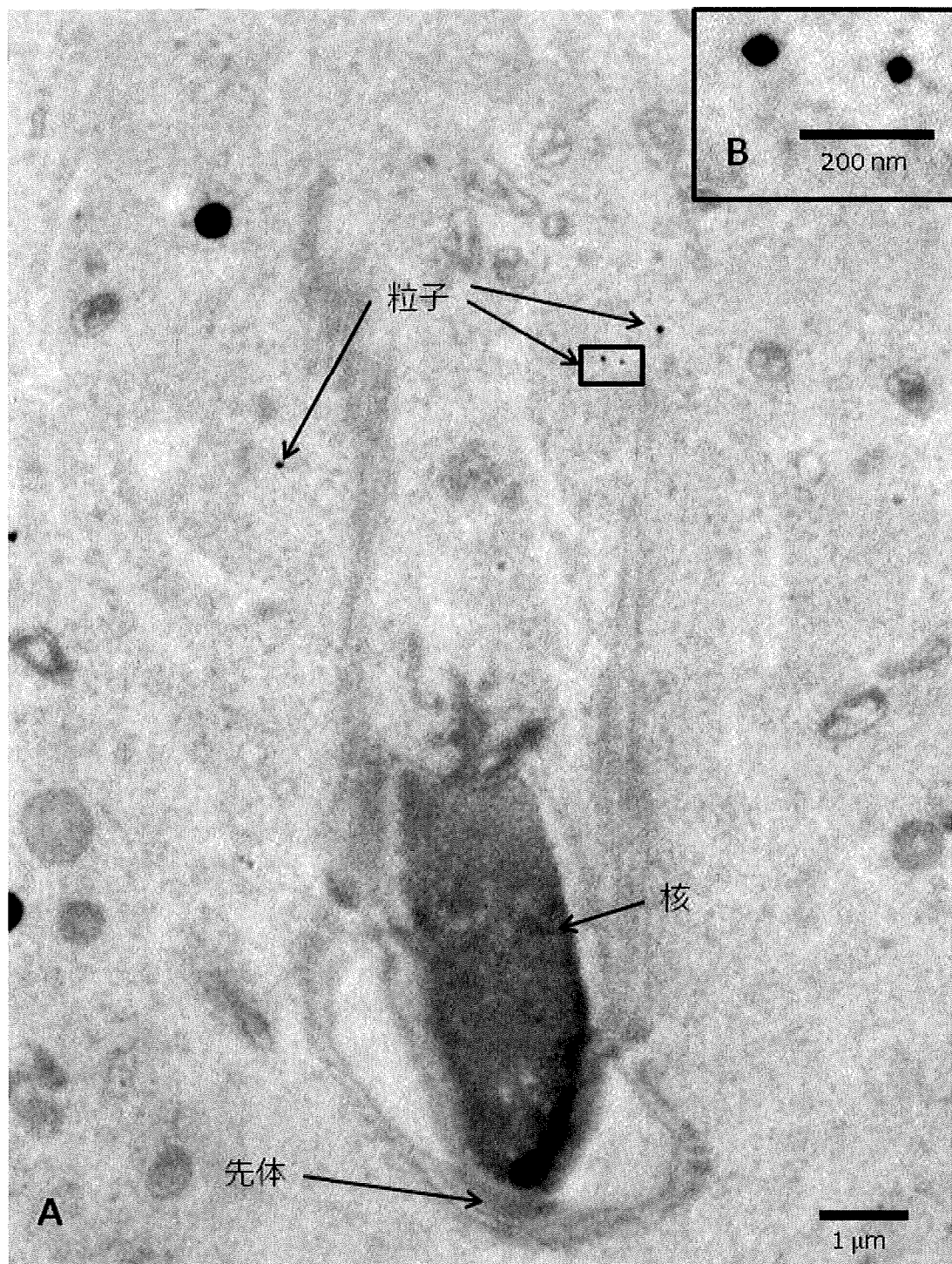


写真19 実験5のnSP70を尾静脈内投与
A:精子内に数個の粒子が観察される
B: Aの拡大像
全て無染色で観察

表 1

経皮曝露におけるnSP70およびQDの各細胞における局在性

標的臓器/細胞	nSP70		QD	
	アセトン/ジエチルエーテル		アセトン/ジエチルエーテル	
	(-)	(+)	(-)	(+)
皮膚組織				
角化細胞	○	○	○	○
角化細胞核	○	—	○	○
膠原線維	○	○	—	○
棘細胞	—	—	○	—
ランゲルハンス細胞	—	—	—	○
肝組織				
肝細胞	○	○	○	○
粗面小胞体	—	—	—	○
ミトコンドリア	—	—	—	○
ディツセ腔	○	○	○	—
リンパ節				
リンパ球	○	○	○	○
リンパ球核	—	—	○	○
細網細胞	—	○	—	—
大脳皮質				
グリア細胞	○	—	○	—
希突起膠細胞	—	—	○	○
神経網	○	○	○	○
前シナプス	—	—	—	○
後シナプス	—	—	○	—
海馬				
グリア細胞	○	—	○	—
希突起膠細胞	—	○	—	—
神経網	○	○	○	○
前シナプス	○	—	○	—
後シナプス	○	○	○	○

— : NMが観察されず (-) : アセトン/ジエチルエーテル無処置群
 ○ : NMが観察された (+) : アセトン/ジエチルエーテル処置群

表2

経鼻投与におけるNMの各細胞における局在性

実験 2			実験 3		
標的臓器/細胞	nSP50	nSP70	標的臓器/細胞	nSP30	nSP70
嗅粘膜			肺		
嗅細胞	○	○	肺胞上皮 I 型細胞	—	○
支持細胞	○	○	肺胞上皮 II 型細胞	○	○
			肺胞中隔間質	○	—
嗅 球			円柱上皮細胞	○	—
神経細胞	○	○	肝 臓		
ミトコンドリア	—	○	肝細胞	○	○
神経線維	○	○	肝細胞核	○	—
大脳皮質			脾 臓		
グリア細胞	○	○	リンパ球	○	○
神経網	○	○	リンパ球核	○	—
前シナプス	○	—	好中球	—	○
後シナプス	—	○	脾洞細網線維	○	—
大脳髄質					
グリア細胞	○	○			
ミエリン	—	○			
後シナプス	○	—			
海 馬					
グリア細胞	○	○			
希突起膠細胞	○	○			
神経網	○	○			
小 脳					
神経膠細胞	○	○			
無髄神経線維	○	—			
下垂体					
前葉細胞	○	○			

— : NMが観察されず
○ : NMが観察された

表3

強制経口投与におけるNMの各細胞における局在性

標的臓器/細胞	nSP70	nSP300
胃		
主細胞	○	—
壁細胞	○	○
壁細胞ミトコンドリア	○	—
重層扁平上皮細胞	○	○
小 腸		
吸収上皮細胞	○	○
大腸		
吸収上皮細胞	○	○
杯細胞	○	—
粘膜筋板	○	—
肝臓		
肝細胞	○	○

— : NMが観察されず

○ : NMが観察された

ナノマテリアルの免疫毒性評価

研究分担者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター

研究要旨

従来のサブミクロンサイズ以上の素材にはない有用機能を有するナノマテリアルは、食品・化粧品領域などでの実用化が進展しているものの、その安全保障は未だ十分ではない。近年、生体免疫系がナノマテリアルを異物として認識した際に、過剰な免疫応答など、機能不全を起こし得ることが報告され、ナノマテリアルの革新的機能が予想外の免疫攪乱作用を呈してしまうものと懸念されている。しかし、こういったナノマテリアルの負の生体影響に関する表面的な情報は、ナノ産業界や社会にマイナスでしかなく、科学的根拠に基づいた安全性評価が急がれている。本観点から我々は、様々な分野で汎用されている非晶質ナノシリカの免疫系への影響評価を進めている。本研究では、非晶質ナノシリカの起炎性に焦点を絞り、ナノマテリアルの科学的根拠に基づいた安全性情報の集積を図った。

A. 研究目的

ナノマテリアルは、ナノサイズであるが故の、組織浸透性・表面積・電子反応性・光反応性・熱反応性の増大など種々の有用機能を発揮し得るため、夢の万能素材として、医学・工学・薬学などあらゆる領域に様々な恩恵をもたらすものと期待されている。しかしながら、ナノマテリアルの生体影響については十分に解明されていないのが現状である。ナノマテリアルは、ナノサイズであることに起因する未知の体内挙動を取る可能性や、単位重量当たりの表面積増大による反応性の増強等による未知の有害性を示す可能性も十分に考えられる。事実、世界的にナノマテリアルが予期せぬ生体影響を発現してしまうことに対する懸念が高まっており、カーボンナノチューブや酸化チタンの発がん性・起炎性など、健康被害を示唆する研究報告が相次いでいる。特に、生体に取り込まれた粒子状異物排除の根幹を担う免疫担当細胞が、ナノマテリアルを異物として認識した際に過剰反応や機能不全を起こす可能性が報告されており、ナノマテリアルが未知の免疫

攪乱作用を呈する危険性が指摘されている。これらは、ナノマテリアルの長期暴露が、アレルギー・アトピーや喘息の発症・増悪の誘発のみならず、全身臓器の機能障害をも誘発するなど予期せぬ毒性を発現し得る可能性を示唆している。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、安全性に関する情報を集積すると共に、それを基盤とした適切なリスクマネジメントを実施し、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。

数あるナノマテリアルの中でも、非晶質ナノシリカは合成が簡便・低コストであるうえ、分散性・水溶性に優れること、表面修飾が容易であることなど数多くの利点を有しており、既に化粧品・食品・医薬品・ゴム製品などに幅広く用いられるなど我々の生活に必須のものとなっている。2007年度の報告によれば、シリカの年間生産量

は世界で約160万トンにも及び、現在では、機能性を高めるための表面修飾（疎水化や親水化など）や、医薬品の徐放性を高めるための形状制御（多孔状）が施されたものなど、多種多様なシリカの開発が進められており、その適用範囲は益々拡大しつつある。しかし、他のナノマテリアルと同様、非晶質ナノシリカにおいても未知の健康影響が懸念され始めており、非晶質ナノシリカの有用性を最大限に享受するためには、非晶質ナノシリカの粒子特性と生体応答の連関を体系的に評価したうえで新たな粒子設計が必要と考えられる。

本観点から本研究では、安全性に優れた新規ナノマテリアルの設計に向けた基礎情報の集積を目指して、粒子径・表面修飾が異なる様々な粒子特性の非晶質ナノシリカが自然免疫システム（マクロファージ）に与える影響を解析し、非晶質ナノシリカの粒子特性と炎症誘導能の体系的な評価、並びに炎症応答の差異に関するメカニズム解明を図った。

B. 研究方法

1. シリカ

本研究では、Micromod Partikeltechnologie 社（Germany）より購入した表面未修飾シリカ（直径 30、70、300、1000 nm；それぞれ nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000）と、粒子表面をカルボキシル基で修飾した nSP70（nSP70-C）を使用した。

2. サイトカイン産生評価

96 穴プレートに THP-1 あるいは RAW264.7 細胞を播種した。THP-1 は 0.5 μ M PMA 存在下で 24 時間培養することで、マクロファージ様細胞に分化させた。各シリカ（100 μ g/mL）を添加し、6 時間後、培養上清中の Interleukin (IL) -1 β 、IP-10 を含むその他サイトカイン濃度を Bio-Plex Suspension Array System（Bio-Rad）にて測定した。RAW264.7 細胞は 12 時間培養後、各シリカ（100 μ g/mL）を 100 μ L 添加し、12 時間後、

培養上清中の Tumor necrosis factor (TNF) α を enzyme-linked immunoSorbent assay (ELISA) にて測定した。

3. Western Blot

12 穴プレートに RAW264.7 細胞を播種し、37 $^{\circ}$ C で 12 時間培養した。その後、各シリカ（100 μ g/mL）を添加した。各時間培養後に氷冷 PBS で細胞を洗浄し、HaltTM Protease Inhibitor Cocktail Kit 及びホスファターゼ阻害剤カクテルを添加した細胞溶解液で細胞を破碎した。各 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) の検出には Mammalian Protein Extraction Reagent を用いて細胞全画を回収した。総蛋白質量 1 - 5 μ g の各サンプルをポリアクリルアミドゲルを用いて SDS 電気泳動した後、メンブレンへ転写した。メンブレンをブロッキングした後、各 1 次抗体を 4 $^{\circ}$ C、オーバーナイトで反応させた。その後、HRP 標識 2 次抗体を室温で 1 時間反応させた後、Super Signal[®] West Femto Maximum sensitivity Substrate によってシグナルを検出した。

4. 各種阻害剤存在下でのサイトカイン測定

96 穴プレートに RAW264.7 細胞を播種し、12 時間培養した。その後、p38 阻害剤 SB203580、Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) 阻害剤 U0126 または c-jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤 SP600125 を添加した。2 時間後、各シリカ（100 μ g/mL）を加え、4 時間後、培養上清中の TNF α 濃度を ELISA にて測定した。

5. 各 SP の *in vivo* 炎症誘導能評価

BALB/c マウス（8 週齢、雌性）に対して各シリカを 1 mg/200 μ L/mouse で腹腔内に投与した。24 時間後、4 mL の PBS を腹腔内へと投与し、腹腔洗浄液を回収した。その後、NucleoCounter を用いて生細胞数を測定した。

C. 研究結果

1. 様々な粒子径のシリカが有する起炎性の解析

約 30 nm - 1000 nm の粒子径の異なるシリカを用いることで、シリカの粒子径とマクロファージに対する起炎性との関連を解析した。各シリカを THP-1 細胞へと添加した際の、サイトカイン・ケモカイン産生誘導能を評価した (Fig. 1A)。その結果、IL-1 β に関しては、mSP1000 が 300 nm 以下のシリカと比較して高い産生誘導能を示すことが判明した。一方で、nSP30、nSP70 作用群においては、従来型シリカである nSP300、mSP1000 作用群では全く観察されなかったケモカイン IP-10 の産生が有意に亢進していた。すなわち、シリカは粒子サイズに応じて全く異なる機序で起炎性を示す可能性が見出された。次に、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用い、各シリカの TNF α 産生誘導能を解析した (Fig. 1B)。その結果、RAW264.7 細胞においては、従来型シリカの nSP300、mSP1000 作用群では TNF α 産生の亢進は全く認められなかったのに対し、ナノシリカを作用させた場合、有意な TNF α 産生が認められた。一方で、THP-1 細胞において観察された IL-1 β 、IP-10 の産生は全く観察されなかった。同様の結果が、マウスマクロファージ細胞株である J774.1 細胞でも認められている (data not shown)。以上の結果より、シリカは、粒子径に応じて異なる機序・レベルで起炎性を示す可能性が示されると共に、ヒト、マウスマクロファージに対して異なるサイトカイン産生パターンを誘導することが示唆された。

2. 細胞内シグナル解析

次に、シリカによる TNF α の産生誘導メカニズムを RAW264.7 細胞を用いて解析した。細胞が外部からのストレスやサイトカイン刺激を受けると、MAPK ファミリーである p38、JNK 及び ERK1/2 がリン酸化を受けて活性化し、炎症応答や細胞分化、細胞死等、多様な細胞応答に関わるシグナルを伝達することが知られている。そこで、RAW264.7 細胞に各粒子径のシリカを作用させた際のリン酸化 MAPK を Western Blot 法により半定量的に評価することで、MAPK 活性化を評価

した (Fig. 2)。その結果、従来型シリカである nSP300、mSP1000 作用群の各 MAPK は、未処理群と比較してほとんどリン酸化体のバンド強度に変化が認められず、活性化されていないことが示された。一方で、nSP30、nSP70 作用群では、いずれの MAPK においても顕著にリン酸化体が増加しており、ナノシリカ作用により MAPK の活性化が誘導されることが判明した。以上の結果より、ナノシリカは各 MAPK の活性化を介して TNF α の産生を誘導している可能性が考えられた。

そこで、各 MAPK 阻害剤存在下で、各粒子径のシリカを RAW264.7 細胞に添加し、TNF α の産生量を ELISA により評価した (Fig. 3)。その結果、シリカ単独で作用させた場合、nSP30、nSP70 作用群で有意な TNF α の産生上昇が認められたのに対し、p38 阻害剤 (SB203580)、JNK 阻害剤 (SP600125) 及び ERK1/2 阻害剤 (U0126) いずれの作用条件下においても、ナノシリカによる TNF α の産生は未処理群と同程度にまで抑制された。本結果より、ナノシリカは、p38、JNK、ERK1/2 全ての活性化を介して TNF α の産生を誘導することが明らかとなった。なお、JNK 及び ERK1/2 の阻害条件下で nSP300、mSP1000 作用群の TNF α の産生量が抑制されているが、未処理群においても同様に抑制されていることから、恒常的な TNF α の産生が抑制されたものと考えられる。更に、シリカによる MAPK の活性化と細胞傷害性との関連について阻害剤を用いて検討した (Fig. 4)。その結果、シリカによる細胞傷害性は、JNK 及び ERK1/2 阻害条件において変化が認められなかったのに対し、p38 阻害条件では nSP30、nSP70 作用群で認められた細胞傷害性が有意に低減した。従って、ナノシリカによる細胞傷害性には、p38の活性化が重要であることが示された。以上の結果より、ナノシリカ は p38、JNK、ERK1/2 を介して TNF α 産生を、p38 を介して細胞傷害性を誘導することが明らかとなった。

3. 表面特性の異なるナノシリカの起炎性評価

近年、表面修飾を施したナノシリカも、化粧

品・食品分野を中心に流通し始めている。従って、表面修飾を施したナノシリカが、細胞・生体に与える影響について検討する必要がある。そこで、nSP70-C を用いて、表面修飾と起炎性との関連について評価した。まず、THP-1 細胞に nSP70、nSP70-C をそれぞれ添加し、IP-10 の産生量を評価した (Fig. 5A)。その結果、nSP70 は IP-10 の産生を有意に亢進した一方で、nSP70-C 作用群では IP-10 の産生はほとんど認められなかった。さらに、RAW264.7 細胞に対する TNF α 産生誘導能を同様に評価した結果、nSP70-C 作用群においては、nSP70 作用群で認められた TNF α 産生が、ほとんど観察されなかった (Fig. 5B)。すなわち、官能基による表面修飾が、その起炎性を大きく低減し、免疫毒性の低い安全なナノシリカを創製可能であることが示唆された。

これまで明らかとしたように、nSP70 は p38、JNK、ERK1/2 全ての MAPK を活性化することで TNF α の産生を誘導する。そこで、nSP70-C が MAPK 活性化に及ぼす影響を評価した (Fig. 6)。RAW264.7 細胞に nSP70 及び nSP70-C を作用させ、リン酸化 MAPK を Western Blot 法により半定量的に評価した。その結果、nSP70 作用群では p38、JNK 及び ERK1/2 いずれの MAPK もリン酸化され活性化されていたのに対して、nSP70-C 作用群では p38、JNK のリン酸化はほとんど認められなかった。一方で、ERK1/2 のリン酸化レベルについては、nSP70 作用群と比較して抑えられているものの、依然としてリン酸化が認められた。従って、nSP70 はカルボキシル基修飾によって、p38、JNK の活性化が強く抑えられた結果、TNF α の産生が大幅に減弱した可能性が示された。

そこで、各 nSP70 の、*in vivo* における起炎性を評価した (Fig. 7)。nSP70、nSP70-C を BALB/c マウス腹腔内へと投与し、24 時間後の腹腔内における総細胞数を評価した。その結果、nSP70-C 投与群においては、nSP70 投与群で認められた顕著な細胞浸潤が、ほぼ完全に抑制されることが判

明した。さらに、投与 2 時間後における腹腔内のサイトカイン産生パターンを解析した結果、nSP70-C 投与群においては、nSP70 投与群で認められた全てのサイトカイン・ケモカイン産生の亢進が、ほぼ完全に消失することが判明した。すなわち、nSP70-C は、nSP70 と比較して細胞浸潤、サイトカイン産生のいずれの観点からも、起炎性が劇的に低減されていることが確認された。以上の結果より、官能基によるナノシリカの表面修飾は、その起炎性を低減し得ることが示された。

4. 粒子径の異なるシリカの細胞傷害性評価

我々はこれまでに、マウスマクロファージ細胞株に対して、粒子径の小さいナノシリカほど細胞傷害性が高いことを明らかとしている。そこで、ヒトマクロファージにおいても、同様の現象が観察されるかについて検討した。ヒトマクロファージ細胞株である THP-1 細胞に、各粒子径のシリカを添加し、細胞傷害性を評価した (Fig. 8)。その結果、マウスマクロファージ細胞株とは異なり、粒子径の大きな従来型シリカのほうが、細胞傷害性が高いことが判明した。また、種々官能基で表面を修飾した mSP1000 を用い、同様に細胞傷害性を検討した結果、表面修飾により細胞傷害性が低減することが判明した (Fig. 9)。以上の結果より、mSP1000 においても、表面修飾によりその安全性を担保できる可能性が示された。

次に、mSP1000 を用い、細胞傷害性誘発メカニズムを検討した。ROS 阻害剤 BHA 及び、カスパーゼ阻害剤 zVAD-fmk を用いた結果、ROS 阻害剤存在下で有意な細胞傷害性の低減が認められた (Fig. 10)。以上の結果から、mSP1000 による細胞傷害は、アポトーシスでなく、ROS 依存的な細胞死であることが示唆された。我々はこれまでに、mSP1000 が細胞に取り込まれた後、リソソームからのカテプシン B の細胞質への流出を促進することを明らかとしている。そこで、カテプシン B 阻害剤を用いて、mSP1000 の細胞傷害性を評価した (Fig. 11)。その結果、カテプシン B 阻害剤存在下で、有意な細胞傷害性の低減が観

察された。以上の結果から、mSP1000 による細胞傷害性は、ROS 及びカテプシン B 依存的であることが示された。

D. 考 察

本研究では、粒子径・表面修飾基の異なる様々な粒子特性のシリカと起炎性との連関を評価した。まず、粒子径の異なるシリカを用い、起炎性を評価した結果、ナノシリカは肺線維症などの誘発因子である TNF α や IP-10 の産生を、従来型シリカはシリコーシスやアスベストosisなどの発症要因となる IL-1 β 産生を誘導するなど、シリカは粒子径に応じて全く異なる機序で起炎性を誘導することが明らかとなった。近年、ナノマテリアルは、サブマイクロサイズのマテリアルとは異なり、スカベンジャーレセプターと呼ばれる異物認識レセプター依存的に、細胞内へと取り込まれることが明らかとなってきた。中でも、scavenger receptor class A (SR-A) により認識、取り込まれた場合、MAPK ファミリーに属する p38 の活性化を誘導することで、細胞傷害性やサイトカイン産生を誘導することが明らかとされている。従って、粒子サイズにより異なる機序で起炎性を示した要因は、ナノメートルサイズにまで微細化されたマテリアルが、従来のサブマイクロサイズのマテリアルに見られるエンドサイトーシスではなく、SR-A などによるレセプター依存的な認識・取り込み経路を惹起したためである可能性が考えられる。

次に、ナノシリカによる TNF α 産生には p38、JNK、ERK1/2 の活性化が、細胞傷害性には p38 の活性化が必須であることを明らかとした。ナノシリカが MAPK の活性化を強く誘導する原因は不明であるが、ROS が MAPK を活性化することから、ROS の関与を考えている。一方で、シリカ表面に存在するシラノール基は、ROS の産生に関与することが報告されていることから、シリカの比表面積の上昇によって細胞とシラノール基との接触が増大することに起因している可能性が

考えられる。

次に、nSP70 に対して官能基修飾を施すことで、起炎性をほぼ完全に減弱し得ることを見出した。ナノマテリアルへと曝露されたマクロファージでは、ROS 産生が誘導されることが報告されていることから、nSP70 においても、官能基修飾により ROS 産生が減弱した可能性が考えられる。また、官能基修飾により粒子の表面特性が変化することで、SR-A からの認識・取り込みが回避された可能性、あるいは、表面特性の変化がナノマテリアルの細胞内動態を変動させることも知られており、これら細胞接触後のナノマテリアルの挙動が起炎性の変動を誘導した可能性が考えられ、今後の重要な検討課題であると考えている。なにより、本研究成果は、ナノマテリアルを表面修飾することで、起炎性を低減可能であることを強く示しており、免疫毒性の少ないナノマテリアルの開発に向け、重要な知見といえる。本検討における投与経路は腹腔内投与であること、更には生体には多様な免疫担当細胞が存在することを考え合わせると、今後は経肺投与や経口投与、静脈内投与時における粒子特性と起炎性の連関評価、更には生体内挙動をも考慮した上で、各組織レベルでの起炎性を詳細に評価する必要があると考えられる。

E. 結 論

シリカは粒子径に応じて異なる機序で炎症を惹起する可能性が示された。ナノシリカは細胞内シグナル分子である MAPK の活性化を介して、炎症性サイトカインである TNF α の産生を誘導することを明らかとした。さらに、官能基による表面修飾が、nSP70 の起炎性を著しく減弱することを実証した。本研究成果は、粒子特性に応じたナノマテリアルの基礎情報集積が、安全性の向上につながる可能性を示すものであり、今後の安全性・機能性に優れたナノマテリアル開発をはじめとする幅広い分野に貢献出来るものと期待する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Morishita Y., Yoshida T., Fujimura M., Kayamuro H., Nabeshi H., Yamashita T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Kawai Y., Mayumi T., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape., *Inflammation.*, 2010 Feb 20. [Epub ahead of print]
2. Morishige T., Yoshioka Y., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Titanium dioxide induces different levels of IL-1beta production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 392: 160-165, 2010.
3. Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties., *Pharmazie.*, in press.
4. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells., *Pharmazie.*, in press.
5. Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Narimatsu S., Monobe Y., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Surface modification of silica particles suppresses their inflammatory effect by reducing ROS production and subsequent endosomal rupture., submitted
6. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Morishita Y., Yoshida T., Fujimura M., Kayamuro H., Nabeshi H., Yamashita T., Saito S., Nagano K., Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Imazawa T., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : NanoTox studies of nanosilica for ensuring safety-3; biodistribution of amorphous nanosilicas in pregnant mice and the potential risk on the fetus development., submitted.
7. Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Narimatsu S., Monobe Y., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Silica nanoparticle induce the inflammatory responses via MAPK pathway., in preparation.
8. Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Narimatsu S., Monobe Y., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Silica nanoparticle modulate the innate immune responses induced by LPS., in preparation.
9. Yamashiita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Morishita Y., Yoshida T., Fujimura M., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Itoh N.,

- Yoshikawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Amorphous nanosilicas induce the enhancement of granulocyte in vivo., in preparation.
10. Higashisaka K., **Yoshioka Y.**, Yamashita K., Morishita Y., Yoshida T., Fujimura M., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Acute phase proteins are sensitive biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials., in preparation.
 11. Morishita Y., **Yoshioka Y.**, Yamashita K., Higashisaka K., Yoshida T., Fujimura M., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Itoh N., Yoshikawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Distribution analysis of nanosilica to the testis for the safety scientific assessment, in preparation.
 12. Yoshida T., **Yoshioka Y.**, Fujimura M., Kayamuro H., Yamashita K., Higashisaka K., Nakanishi R., Morishita Y., Nabeshi H., Yamashita T., Muroi M., Tanamoto K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Kawai Y., Mayumi T., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Induction of antigen specific allergic disease by intranasal instillation of nanosilica., in preparation.
- 【総説・その他】**
13. Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., **Yoshioka Y.**, Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : In vitro nanotoxicological study of silica nanoparticles using dermal cell lines., *Toxicol. Lett.*, 189S: S179-180, 2009. (Supplement)
 14. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., **Yoshioka Y.**, Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas., *Toxicol. Lett.*, 189S: S181-182, 2009. (Supplement)
 15. Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Imazawa T., **Yoshioka Y.**, Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent intracellular distribution and genotoxicity of amorphous nanosilicas in human keratinocytes., *Toxicol. Lett.*, 189S: S183, 2009. (Supplement)
 16. Nakazato Y., Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Imazawa T., **Yoshioka Y.**, Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Differential acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas: The role of surface physicochemical properties., *Toxicol. Lett.*, 189S: S183, 2009. (Supplement)
 17. Yoshida T., **Yoshioka Y.**, Kayamuro H., Yamashita K., Higashisaka K., Nakanishi R., Abe Y., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Urban aerosol directly stimulates antigen presentation cells in vitro and cause airway inflammation in vivo., *Toxicol. Lett.*, 189S: S176-177, 2009. (Supplement)
 18. **Yoshioka Y.**, Morishige T., Tanabe A., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Nanosilicas with different sizes and surface charges induce different profiles of cytokine production

on macrophages., *Toxicol. Lett.*, 189S: S182, 2009. (Supplement)

19. Yamashita K., **Yoshioka Y.**, Kayamuro H., Yoshida T., Higashisaka K., Abe Y., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Cancer hazard of carbon nanotubes: size/shape-dependent induction of DNA damage and inflammation., *Cytokine.*, 48S(1-22): 55, 2009. (Supplement)
20. 吉川友章, **吉岡靖雄**, 角田慎一, 堤 康央 : 化粧品ナノマテリアルの安全性評価の現状と技術的課題～安全なナノマテリアルの開発支援に向けて～., *コスメティックステージ*, Vol.4(4), 44-48, 2010.
21. 吉川友章, **吉岡靖雄**, 堤 康央 : ナノ粒子の細胞内取り込みと経皮浸透., ナノ材料のリスク評価と安全性対策, フロンティア出版, in press.

② 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 2 件】

1. **吉岡靖雄** : ナノマテリアルの動態特性と免疫毒性., 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
2. **吉岡靖雄** : ナノマテリアルの安全確保に向けた NanoTox 研究の最前線 (総括) ., 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.

【国内学会発表 : 合計 20 件】

1. 鍋師裕美, 吉川友章, 仲里泰太郎, 松山恵吾, **吉岡靖雄**, 阿部康弘, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央 : 食品添加物としてのナノシリカの物性と生体影響の連関解析., 日本食品衛生学会第 97 回学術講演会, 中央区 (東京) , 2009 年 5 月.
2. 松山恵吾, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, **吉岡靖雄**, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央 : 化粧品素材

としての非結晶性ナノシリカの皮膚細胞に対する遺伝毒性評価と安全確保に向けて., 第 34 回日本化粧品学会, 港区 (東京) , 2009 年 6 月.

3. 山下浩平, **吉岡靖雄**, 東阪和馬, 萱室裕之, 吉田徳幸, 阿部康弘, 吉川友章, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央 : 非結晶性ナノシリカの生殖発生毒性に関する検討., 日本先天異常学会第 49 回学術集会, 鹿児島 (鹿児島) , 2009 年 6 月.
4. 鍋師裕美, 吉川友章, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 今澤孝喜, **吉岡靖雄**, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央 : ナノシリカの in vitro 安全性評価における血清蛋白質の作用の解析., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手) , 2009 年 7 月.
5. 松山恵吾, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, **吉岡靖雄**, 今澤孝喜, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央 : 非結晶性ナノシリカの皮膚細胞に対する遺伝毒性作用., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手) , 2009 年 7 月.
6. 仲里泰太郎, 吉川友章, 鍋師裕美, 松山恵吾, **吉岡靖雄**, 今澤孝喜, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央 : 非結晶性ナノシリカの表面物性と有害性発現との連関評価., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手) , 2009 年 7 月.
7. 山下浩平, **吉岡靖雄**, 東阪和馬, 萱室裕之, 吉田徳幸, 阿部康弘, 吉川友章, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央 : 非結晶性ナノシリカの生殖発生毒性に関する検討., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手) , 2009 年 7 月.
8. 東阪和馬, **吉岡靖雄**, 山下浩平, 萱室裕之, 吉田徳幸, 阿部康弘, 吉川友章, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央 :

- カーボンナノチューブの発癌リスクに関する基礎的検討., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手), 2009 年 7 月.
9. 吉岡靖雄, 森重智弘, 田辺 綾, 堤 康央, 河合裕一, 眞弓忠範, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作: 非結晶性シリカの粒子特性と起炎性の連関評価., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手), 2009 年 7 月.
 10. 稲倉 裕, 吉岡靖雄, 森重智弘, 田辺 綾, 堤 康央, 河合裕一, 眞弓忠範, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作: 各種酸化チタンの起炎性評価とそのメカニズム解析., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手), 2009 年 7 月.
 11. 森重智弘, 吉岡靖雄, 田辺 綾, 堤 康央, 室井正志, 棚元憲一, 河合裕一, 眞弓忠範, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作: 非結晶性ナノシリカの自然免疫抑制作用に関する検討., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡 (岩手), 2009 年 7 月.
 12. 角田慎一, 吉川友章, 鍋師裕美, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 向 洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-1 ナノマテリアルの経皮吸収性・体内動態と急性毒性・肝毒性., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
 13. 吉川友章, 鍋師裕美, 平井敏郎, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 角田慎一, 近藤昌夫, 八木清仁, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-2 ナノマテリアルの相互作用解析と急性毒性・肝毒性機構の追求., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
 14. 阿部康弘, 吉川友章, 鍋師裕美, 松山恵吾, 近藤小百合, 長野一也, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-3 ナノマテリアルの細胞内動態と遺伝毒性., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
 15. 吉岡靖雄, 森重智弘, 吉田徳幸, 稲倉 裕, 藤村真穂, 鍋師裕美, 阿部康弘, 長野一也, 吉川友章, 今澤孝喜, 角田慎一, 向 洋平, 岡田直貴, 堤 康央, 中川晋作: ナノマテリアルの安全確保に向けて-4 ナノマテリアルの動態特性と免疫毒性., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
 16. 長野一也, 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 森下裕貴, 鍋師裕美, 阿部康弘, 吉川友章, 角田慎一, 齊藤 滋, 河合裕一, 眞弓忠範, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-5 ナノマテリアルの動態特性と生殖発生毒性., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
 17. 鍋師裕美, 吉川友章, 仲里泰太郎, 栃木彩恵子, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-6 表面修飾ナノシリカの安全性評価と安全なナノマテリアルの開発支援., 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 函館 (北海道), 2009 年 10 月.
 18. 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 森下裕貴, 吉田徳幸, 藤村真穂, 鍋師裕美, 長野一也, 阿部康弘, 吉川友章, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 眞弓忠範, 角田慎一, 堤 康央: 安全確保に向けた非晶質ナノシリカの生殖発生毒性に関する検討., ファーマバイオフォーラム 2009, 名古屋 (愛知), 2009 年 11 月.
 19. 平井敏郎, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 栃木彩恵子, 近藤小百合, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 樹状細胞を標的としたナノシリカの経皮安全性評価., 日本薬学会 第 130 年会, 岡山 (岡山), 2010 年 3 月.
 20. 栃木彩恵子, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 平井敏郎, 近藤小百合, 赤瀬

貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 血液凝固系に着目した非晶質ナノシリカの安全性評価., 日本薬学会 第 130 年会, 岡山(岡山), 2010 年 3 月.

【国際学会発表: 合計 7 件】

1. Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : In vitro nanotoxicological study of silica nanoparticles using dermal cell lines., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
 2. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
 3. Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent intracellular distribution and genotoxicity of amorphous nanosilicas in human keratinocytes., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
 4. Nakazato Y., Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Differential acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas: The role of surface physicochemical properties., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
 5. Yoshioka Y., Morishige T., Tanabe A., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Nanosilicas with different sizes and surface charges induce different profiles of cytokine production on macrophages., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
 6. Yamashita K., Yoshioka Y., Kayamuro H., Yoshida T., Higashisaka K., Abe Y., Yoshikawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Cancer hazard of carbon nanotubes: size/shape-dependent induction of DNA damage and inflammation., 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), Lisbon (Portugal), 18-21 October, 2009.
 7. Yoshioka Y., Morishige T., Inakura H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Inflammatory responses of titanium dioxide with different size and properties., 49th Annual Meeting & ToxExpo (SOT2010), Salt Lake City, (USA), 7-10 March, 2010.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- ① 特許取得