

上の蛍光が観察された(図 14)。以上の結果から、RAW264.7 細胞は各 SP を取り込んだ後に、何らかの機序で細胞死を誘導していることが示唆されると共に、nSP70 でその傾向が強いことが明らかとなった。

オートファジーは元来、細胞が飢餓状態になった際、発動される細胞応答である。一方で近年、細菌・ウイルスなどの異物が細胞内に侵入した際、これら異物を排除する目的でオートファジーが誘導されることが知られている。そこで次に、ナノ粒子が細胞に取り込まれた際、オートファジーが誘導されるか否かに関して検討した。まず、オートファジーの際に形成されるオートファゴソームを、汎用される MDC 試薬を用い検出した(図 15)。その結果、MDC 染色により、オートファジーを誘導することが知られている LPS+ZVAD 作用群と同様の染色像が、各 SP 作用群で観察された。さらに、GFP 融合 LC3 (オートファゴソームのマーカー蛋白質) を発現するプラスミドをトランスフェクションした細胞を用いて、各 SP 作用後の形態観察を試みた(図 16)。その結果、各 SP 作用により、positive control である LPS+ZVAD 作用群と同様に、GFP が dot 状に観察されるというオートファゴソームの形成が確認された。以上の結果より、RAW264.7 細胞において、SP を作用することでオートファジーが誘導されることが示唆された。

一方で、生体内でマクロファージと並び異物取り込み能の高い細胞として、樹状細胞が挙げられる。そこで次に、マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞に対する各 SP の影響を細胞傷害性を指標に評価した(図 17)。その結果、RAW264.7 細胞の場合とは一部異なり、高濃度の nSP70 を作用した際にのみ若干の細胞傷害性が観察された。これらの細胞傷害性の違いが nSP の取り込み量あるいは各細胞の性質に起因するのかは不明であり、今後の検討課題である。

11. SP が血管内皮細胞・神経幹細胞に与える影響

近年、経口投与や経肺投与において、ナノ粒子が血液を介して全身の主要臓器のみならず脳にも分布することが報告され、それらの血液脳関門の通過や生体毒性に及ぼす影響が注目されている。そこで、脳血管内皮を含む全身の血管内皮細胞や脳に存在する神経幹細胞への影響に注目して各 SP の毒性評価を試みた。まず、脳、臍帯静脈、肺、皮膚由来のヒト正常血管内皮細胞に対して各 SP が及ぼす影響を、細胞傷害性を指標に評価した。その結果、RAW264.7 細胞とは異なり、作用 24 時間において全く細胞死は見られなかった。また 72 時間という長期間粒子を作用させた際においても、細胞死は全く観察されなかった(図 18、19)。そこで mSP1000 を作用後 24 時間における HuBME 細胞を蛍光顕微鏡にて観察したところ、細胞内に取り込まれたと考えられるドット上の蛍光が観察された(図 20)。さらに SP が細胞表面に吸着している可能性を除くために、エネルギー依存的な取り込み阻害条件である 4°C における細胞の形態を観察した(図 21)。その結果、37°C 条件下では見られたドット上の蛍光が、4°C 条件下では全く観察されなかったことから、HuBME 細胞はエネルギー依存的に SP を取り込んでいるものの、細胞死には至らないことが判明した。また、各 SP が炎症性のサイトカインである IL-8 の産生誘導に及ぼす影響を検討した結果、いずれの細胞においても SP 作用による IL-8 の産生誘導は観察されなかった(図 22)。今後、内皮細胞における取り込み経路や、細胞内応答の詳細を解明していくと共に、血液脳関門への影響などを評価していく予定である。

続いて、GFP を発現する神経幹細胞を用いて、各 SP が及ぼす影響を細胞傷害性を指標に検討した(図 23)。その結果、高濃度の SP を 24 時間あるいは 72 時間作用させることで、細胞傷害が誘導される傾向が見られた。さらに 24 時間後の細胞を蛍光顕微鏡にて観察したところ、蛍光強度の強い mSP1000 や nSP300 において細胞への粒子の取り込みが見られると共に、粒子作用により

神経幹細胞が形成するスフェア（細胞塊）数の減少が見られた（図 24）。今後、神経幹細胞の分化に及ぼす影響を検討していく予定である。

12. SP の細胞内動態解析

培養細胞を用いて SP の取り込みについて超微形態学的に観察した。培養細胞では nSP70 は細胞質内に取り込まれ、核内および核小体に侵入した像が観察された（図 25）。nSP300 および mSP1000 は細胞質内に取り込まれたが、核内では全く観察されなかった（図 26）。mSP1000 適用群では細胞質内への移行が認められ、また、リソソーム小胞が過形成している様子が観察された。

13. SP の生体内動態解析

動物実験におけるマウス肝組織では SP の投与用量に拘わらず全ての投与群でクッパー細胞に多数の SP が貪食されていた。しかし、nSP70 は肝細胞質内に侵入し、僅かであるが核内にも侵入した像が観察された（図 27）。また、nSP70 を 100 mg/kg 投与したマウスでは肝細胞に小管状物質の顕著な増生やミトコンドリア内に沈着物が観察された（図 28）。一方、nSP300 および mSP1000 はクッパー細胞に貪食されており、肝細胞質内に侵入した像は観察されなかった（図 29）。肺組織では nSP70 のみが肺胞上皮 II 型細胞や毛細血管の内皮細胞に侵入した像が観察された（図 30）。

今回、各種の酸化チタンを電顕で形状観察した結果、凝集性が強いことが明らかになった。このような凝集した NM は NM というよりマイクロマテリアルとなり、動物実験に用いた場合、本来の毒性作用が異なった結果として評価されることが考えられた。そのようなことから鑑みて実験に用いる場合と同じ条件で NM をその都度、電顕での直接確認が必要かと思われた。一方、SP は凝集がほとんど見られなかったことから毒性試験に用いた。SP はサイズの異なる 70 nm、300 nm、1000 nm の 3 種類について in vitro および in vivo の実験で細胞内への侵入、局在性および細胞

毒性について検討した。サイズの小さい nSP70 のみが in vitro のみならず in vivo でも肝細胞質や核内に侵入し、細胞毒性も誘発された。また、肺においても nSP70 のみが肺胞上皮細胞や毛細血管の内皮細胞に侵入することが判明した。一方、nSP300 および mSP1000 は培養細胞に取り込まれるが、動物実験では貪食細胞にほとんど捕捉されており、異物として認識されるものと思われた。一方、70 nm という粒子径は肝細胞質に容易に侵入し、さらに核内へも侵入することから、異物として認識され難い大きさであると考えられた。また、粒子径の差異による明らかな SP の局在性の違いが見られたことから、SP の侵入あるいは局在・蓄積する部位に依存して細胞毒性が誘発されるものと思われた。

14. SP 単回投与による肝傷害

nSP70 を 50、75、100 mg/kg 投与 24 時間後、これら 3 種類の dose で投与されたマウスはほとんどが死亡し、50 mg/kg 投与群において 1 匹生存しているのみであった。このため、nSP 70 50 mg/kg 投与群では、生存していた 1 匹のマウスのみから血液サンプルを回収し、血清中の ALT 値の測定を行った。図 31 に nSP 投与 24 時間後の血清中の AST・ALT 活性の測定結果を示した。nSP70 投与群では AST 値・ALT 値共に Control 群と比べて増加していた。一方、nSP300・mSP1000 投与群では、ほとんど血清 ALT 値が増加していなかった。腎傷害の指標として、血清中の BUN 値を測定した。BUN は、血中の尿素窒素のことであり、腎臓に傷害が起こると血中に溜まる物質である。そのため、BUN の血中濃度は腎傷害のマーカーとして一般的に用いられている。図 32 に結果を示した。nSP70 投与群の血清 BUN 値は、Control 群と比較し、低かった。これは肝傷害によるためだと考えられる。nSP300・mSP1000 投与群では、ほとんど血清 BUN 値が増加していなかったことから腎障害が誘発されないことが示唆された。

15. SP 投与による急性肝傷害の用量依存性

nSP70 を用量 50・60 mg/kg b.w. で投与したマウスは、投与 12 時間後に 50 mg/kg b.w. 投与群において生存率 25% (4 匹中 3 匹死亡)、60 mg/kg b.w. 投与群において生存率 0%であった (4 匹中 4 匹死亡)。図 33 に nSP70 を 0~40 mg/kg b.w. の用量で投与 12 時間後の血清中の ALT 活性の測定結果を示した。結果、ALT 活性は用量依存的に増加していた。図 34 に nSP70 を 0~40 mg/kg b.w. の用量で投与 12 時間後の血清中の IL-6・TNF- α 濃度の測定結果を示した。IL-6、TNF- α 共に用量依存的に増加した。図 35 に nSP70 投与 12 時間後の血清 BUN 濃度の測定結果を示した。血清 BUN 値の用量依存的な減少傾向が見られた。図 36 に HE 染色結果を示した。nSP70 を 30、40、50 mg/kg b.w. の用量で肝細胞壊死を起こしている部位が観察された。

16. SP 単回投与による腎臓・肺・脾臓の組織傷害

図 37 に腎臓、図 38 に肺、図 39 に脾臓、さらに図 40 に肝臓の HE 染色像を示した。nSP70 投与群においては肝臓で傷害が見られたが、他の 3 臓器に傷害は見られなかった。また、nSP300・mSP1000 投与群は、肝臓、腎臓、肺において傷害は見られなかった。mSP1000 投与群の脾臓において巨核球の増加が見られた。これらは、臓器において SP の集積性の違いなどが考えられるが、肝臓特異的傷害については、今後更なる解析が必要である。また、心臓、腸、脳などの他の臓器に関しても詳細な解析が必要である。

17. SP 単回投与による肝傷害

図 41 に非標識 nSP 投与 24 時間後の血清 ALT 活性の測定結果を示した。nSP70 投与群の ALT 活性は Control 群と比べて増加していた。一方、nSP300・mSP1000 投与群では、ALT 活性は増加していなかった。図 42 に非標識 SP 投与 24 時間後の血清 BUN 濃度の測定結果を示した。nSP70・nSP300・mSP1000 投与群全てにおいて、血清 BUN 値の増加は見られず、nSP70 投与群のみ減少傾向が見られた。このことより蛍光物

質ではなく、nSP70 により急性肝傷害が誘導されると考えられる。

18. 炎症性サイトカインの発現

図 43 に SP 投与 3、6 時間後の血清中 IL-6、TNF- α 産生量の測定結果を示した。nSP300・mSP1000 投与群では、血清中 IL-6、TNF- α の大きな増加は見られなかった。一方、nSP70 投与群では、投与 3 時間後に血清中 IL-6、TNF- α が急激な増大を示し、6 時間後以降急速に減少していた。肝毒であるコンカナバリン A は、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインを発現誘導し、肝傷害を与えることが報告されている。nSP70 によって発現する炎症性サイトカインが、急性肝障害に関与している可能性があると考えられる。

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

図 44 に四塩化炭素と各粒径の SP 同時投与し、24 時間後の血清中の AST・ALT 活性の測定結果を示した。nSP70 と四塩化炭素を併用することで、四塩化炭素単独投与群と比較し、有意に AST 活性の増加が見られ、また ALT 活性も増加する傾向が見られた。しかし、nSP300・mSP1000 と四塩化炭素の併用により AST、ALT 活性の有意な増大は示さなかった。この併用による増加は、四塩化炭素による AST、ALT の増加と、nSP70 による増加と考えられる活性であり、四塩化炭素の肝傷害作用と nSP70 による肝傷害作用により相加的に肝傷害が増加している可能性が考えられる。

図 45 にパラコートと nSP を同時投与し、24 時間後の血清中 ALT 活性の測定結果を示した。nSP70 の 20、30 mg/kg b.w. 投与とパラコートを併用することで、パラコート単独投与と比較し、ALT 活性が大きく増加する傾向であった。しかし、nSP70 の 10 mg/kg b.w. 投与量とパラコートの併用によっても、ALT 活性の増加傾向が見られた。nSP300 とパラコートの併用による ALT 活性の増加は見られなかった。mSP1000 とパラコートの併用により単独投与群と比較し、わずかに ALT 活性が増加する傾向であった。nSP の併用

によりパラコートの毒性が増強された原因として考えられることは、nSPが細胞内において ROS 誘導作用があり、パラコートとの ROS 誘導作用を促進し、細胞内の ROS 産生が進行し、より強力な急性肝傷害を引き起こしたと考えられる。SP による肝臓における ROS 誘導作用は、今後、解析する必要があると考えられる。

シスプラチンと nSP70 を 30、40 mg/kg b.w. で同時投与し、24 時間後、これらの用量で投与されたマウスは全て死亡した。図 46 にシスプラチンと SP 同時投与し、24 時間後の血清中 ALT 活性の測定結果を示した。mSP1000 とシスプラチンを併用することで、シスプラチン単独投与と比較し、ALT 活性の増加する傾向が見られた。一方、nSP300 とシスプラチンの併用による ALT 活性の増加は見られなかった。しかし、このときの ALT 活性はそれほど高い値を示しておらず、nSP70 とシスプラチンの併用によりマウスが死亡した原因は、肝臓以外の臓器または組織において致命的な毒性が発現したと考えられる。また、nSP70 投与群のみマウスが死亡していることから、シスプラチンによるマウスの致命的毒性の発生は、nSP70 特異的なものであると考えられる。

20. マウス肝実質細胞に対する SP の影響

図 47 に SP を添加し、24、48 時間培養したマウス肝細胞の生存率を示した。生存率は、添加していない Control 群を 100%とし、各粒径の SP を添加したときの細胞生存率を示した。各粒径の SP を 1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて添加した肝細胞の生存率は、コントロール群と同等であり、細胞毒性を示さなかった。各粒径の SP を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて添加した肝細胞の生存率は、コントロール群より大きく低下し、肝実質細胞に対し細胞毒性があることを示した。

21. タイトジャンクション (TJ) に対する SP の影響

図 48 に SP を添加し、24、72 時間培養した Caco2 細胞の生存率を示した。Caco2 細胞は TJ を有している細胞である。生存率は、添加してい

ない Control 群を 100%し、各粒径の nSP を添加したときの細胞生存率を示した。各粒径の nSP を 1、10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて添加した Caco2 細胞の生存率は、コントロール群と同等であった。このことより、SP は、Caco2 細胞に対して細胞毒性がないことが示された。このことより、肝実質細胞に対し、SP の直接作用における細胞傷害性は同等であると考えられる。このために、*in vivo* における nSP70 特異的肝傷害は肝細胞に直接 SP が作用していないことが示唆された。今後、肝臓に対する SP の影響に対し、詳細なメカニズムの検討が必要である。

22. nSP の皮膚透過性評価

まず、nSP70 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 49)。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、nSP70 のみが表皮層の細胞へ到達することを確認している(図 50)。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 nSP70 の存在を確認できた(図 49D)。このように、nSP70 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 nSP70 が到達した像が認められたことから、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、nSP70 の安全性を担保するにあたっては、nSP 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。

23. nSP の急性・毒性評価

nSP の全身毒性を評価するために、粒子径の異なる nSP 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 51)。mSP1000、nSP300 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、nSP100 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 nSP70 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、nSP70 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 51B)。さらに、各 nSP 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 52)。その結果、nSP70 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) が有意に減少していた。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 nSP 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、nSP70 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 53)。以上の結果から、nSP 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、nSP70 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、nSP70、nSP70-C、nSP70-N の急性毒性誘導能を比較した。まず、nSP 投与後の生存率を評価したところ、nSP70 投与マウスは先ほどと同様に全例死亡したのに対して、nSP70-C、nSP70-N 投与マウスでは致死毒性を全く認めなかった (図 54)。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、nSP70 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 55)。以上、直径が 100 nm 以下の nSP 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、nSP の表面性状を適切に制御することが、安全な nSP の設計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 nSP 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、nSP 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。

24. nSP の体内動態追跡

本項においては、nSP 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 nSP の体内動態を追跡した。まず、nSP70、nSP300、mSP1000 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 56)。mSP1000 ならびに nSP300 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、nSP70 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 nSP70 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 nSP の局在を解析したところ、これらの組織において nSP300 や mSP1000 の存在を確認することは出来なかった (図 57)。それに対して、nSP70 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、nSP70 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、nSP 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 nSP70、nSP70-N、nSP70-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 nSP 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 58)。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 59)。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 nSP70 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、nSP70-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、nSP70-N は肺組織では観察されなかった (図 60)。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 61)。また、妊娠マウスの母体に nSP70 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 62)。その結果、胎盤においては、細胞内に nSP70 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 nSP70 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 nSP 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、nSP70-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 NM の設計指針の抽出に繋がるものと考えられる。

25. nSP 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、効能を持たないものである。しかしながら、nSP70 のように皮膚の深部にまで侵入する化粧品の場合は、あらかじめ服用していた薬物と相互作用を發揮し、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 nSP70 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 63)。それに対して、CDDP と共に nSP70 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、nSP70 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 の毒性を憎悪させる可能性が考えられた。

26. nSP の細胞毒性評価

nSP の細胞毒性を評価する目的で、まず粒子径の異なる nSP (nSP70、nSP300、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 nSP70 添加群において最も強かった (図 64)。nSP70、nSP300、mSP1000 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 nSP 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 nSP 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、mSP1000 添加群では約 2%、nSP300 では約 10%、nSP70 では約 25%程度の LDH が細胞外に漏出していた (図 65)。この結果は、nSP 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、nSP70、nSP70-C、nSP70-N の細胞増殖阻害効果を比較した。その結果、nSP70-C あるいは nSP70-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 66)。それに対して、nSP70 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、nSP70 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、nSP 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 nSP70 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 nSP に対する感受性が高いことなどを考え合わせると、nSP 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、nSP の細胞毒性発現と粒子物性との関連を nSP 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、nSP 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。

27. nSP 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 67)。mSP1000 ならびに mSP300 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、nSP1000 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 nSP70 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 nSP の局在を観察したところ、HaCaT の場合と同様に、mSP1000、nSP300 適用群では細胞内侵入像のみを認めたのに対して、nSP70 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 68)。

以上の結果は、nSP 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 nSP70 の核内到達性・核小体集積性は nSP 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。

28. nSP の *in vitro* 免疫毒性評価

まず、粒子径、表面修飾が異なる SP 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 nSP70、nSP 300、mSP 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、nSP70 では顕著な TNF α 産生が認められたのに対し、nSP 300、mSP1000 では TNF α 産生はほとんど認められなかった(図 69)。また、IL-6 産生はいずれの SP 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 nSP70-C、nSP70-N で同様の検討を行った結果、nSP70-C では全く TNF α 産生が認められなかったのに対して、nSP70-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 nSP70 の 1/5 程度であった(図 70)。また、IL-6 産生はいずれの SP においても全く認められなかった(data not shown)。本結果より、nSP70 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 SP 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、非晶質 nSP 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、SP 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させる。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、nSP 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 SP が与える影響を評価した。各 nSP 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 nSP が与える影響を評価した。RAW264.7 細胞に nSP 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。nSP は、RAW264.7 細胞に対して全く細胞傷害性を示さない nSP70-C と nSP70-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、nSP70-C、nSP70-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 71)。一方、IL-6 産生に関しては、nSP70-C、nSP70-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、nSP 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、nSP70 が TNF α 産生増強能を発揮すること、ならびに nSP70-C ならびに nSP70-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、nSP 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。

29. nSP の遺伝毒性評価

粒子径の異なる nSP 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 nSP 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 72)。それに対して、TA-100 株を用いた場合、mSP1000 ならびに nSP300 適用群では約 60 個、nSP100 ならびに nSP70 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 nSP 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 nSP 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。nSP300、mSP100 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 73)。それに対して、nSP100 あるいは nSP70 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 nSP 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、nSP100 あるいは

nSP70 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 74)。

以上の結果は、nSP 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。

30. NM の経皮吸収性の評価

代表的な NM である nSP70 と QD を耳介から経皮投与し、各臓器および各細胞への浸透性について検討した (図 75)。nSP70 塗布群における皮膚組織では角化細胞および角化細胞の核内に粒子が観察された。肝臓では肝細胞内に粒子の侵入が観察された。しかし、クッパー細胞に貪食された粒子はほとんど観察されなかった。リンパ節ではリンパ球およびリンパ球の核内に粒子の侵入が観察された。大脳皮質ではグリア細胞および神経網内に粒子の侵入像が観察された。海馬では神経網、神経細胞の前シナプスおよび後シナプス内に粒子の侵入が観察された。

一方で、QD 塗布群における皮膚組織では角化細胞内、棘細胞核内に粒子が観察された。肝臓では肝細胞のミトコンドリアおよびミトコンドリア内に粒子の侵入が観察された。クッパー細胞に貪食された粒子はほとんど観察されなかった。リンパ節ではリンパ球内およびリンパ球の核内に粒子の侵入が観察された。大脳皮質ではグリア細胞内、希突起膠細胞内、樹状突起内、後シナプス内に粒子の侵入像が観察された。海馬ではグリア細胞内、前シナプスおよび後シナプス内に粒子の侵入が観察された。

これらの結果は、経皮適用した直径 100 nm 以下の NM が、体内に吸収された後に血液循環を介して全身に分布することを実証するものである。特に、これらの NM が血液-脳関門を突破して脳細胞内に侵入すること、細胞内のミトコンドリアや核といったオルガネラに侵入するという事実

は世界初の知見である。これらの結果から、NM のリスクを評価するに当たっては、適用部位である皮膚のみならず全身のあらゆる臓器を対象としたハザード評価が必要不可欠であることを示している。

31. 血液凝固系に着目した nSP の急性毒性発現機構の解析

これまでに我々のグループでは、nSP70 をマウス尾静脈内より投与した際に、急性肝障害・致死毒性を誘発することを見出している。特に、これらのマウスにおいては肝臓や脾臓に顕著な鬱血を認めており、血液凝固系がかく乱される可能性が考えられる。これらの結果を踏まえて本検討では、主要な血中蛋白質の一つである血液凝固因子と nSP との相互作用に着目して、nSP70 によって誘発される急性致死毒性発現機構の解析を試みた。一般に、血液凝固経路には、傷害を受けた組織に発現する組織因子 (Tissue Factor : TF) を起点とする外因性凝固経路と、コラーゲンやガラスといった異物表面と XII 因子との相互作用や活性化血小板由来のリン脂質によって活性化される内因性凝固経路の二つが存在することが知られている。周知の通り、こういった血液凝固系は生体恒常性維持に必須の役割を果たす重要な生体システムであるが、一度破綻すると血栓性疾患や血友病のような様々な病態の発症に繋がる。特に、血液凝固系が全身的かつ持続的に活性化されることによって生ずる播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation : DIC) のような病態は微小血栓の多発や消費性血液凝固障害を呈し、短時間で死に至る重篤な病態に繋がることが知られている。我々は、①nSP70 投与マウスにおいて、脾臓や肝臓のうっ血、組織からの出血症状などの血液凝固異常の所見が認められたこと、②nSP70 投与マウスが投与後短時間で死に至ること、さらに、③SP がガラスと同様に血液凝固経路の活性化因子であること、等の情報を総合的に考察し、nSP のサイズ減少による比表面積の増大やその他の機能変化が血液凝固

因子との相互作用を促進し、これが起点となって DIC 様の症状が誘発されることが、nSP の粒子径依存的急性致死毒性に繋がったものと考えた。そこでまず、非晶質 nSP の急性致死毒性の発現における粒子サイズと血液凝固の関係を調べるために、抗凝固剤（ヘパリン）を前投与したマウスを用いて急性毒性試験を行った（図 76）。その結果、ヘパリンの前投与によって nSP70 誘発急性致死毒性が完全に阻害されることが明らかになった。続いて、nSP70 投与マウスを用いて典型的な DIC 症状である消費性凝固障害（血小板数減少、血液凝固遅延等）や血管透過性の亢進の有無を評価した（図 77, 78）。その結果、直径 300 nm 以上の nSP を投与したマウスにおいては消費性凝固障害が認められなかったのに対して、nSP70 投与マウスでは血中血小板数の著しい減少や血液凝固時間の有意な延長が認められた。さらに、エバンスブルーの血管外漏出を指標に nSP70 投与マウスの血管透過性を評価したところ、100 nm 以下の nSP を投与したマウスにおいてのみ、四肢・耳・鼻の劇的な青変が認められた。先述した通り、ガラスやコラーゲンと言った異物表面は、血液凝固第 XII 因子を活性化することが知られており、nSP70 の血中への侵入によって第 XII 因子を起点とする血液凝固カスケードの促進が生じた可能性が考えられた。そこでこの点を解析するために、各粒子径の SP の精製ヒト第 XII 因子活性化能を評価した（図 79）。いずれの SP を適用した場合においても第 XII 因子の活性化が認められたもの、その効果は nSP70 適用群において最も強かった。以上の結果は、nSP70 投与による急性致死毒性が DIC 様症状の誘発によるものであることを示唆すること、これらの現象が 100 nm 以下の nSP に特徴的なものであることが示している。現在、nSP の比表面積と血液凝固活性化との相関を調べると共に、nSP と血液凝固因子との結合性の解析を進めている。

続いて、血液凝固系の活性化と非晶質 nSP の表面物性との連関を追求した。まず、表面修飾 nSP

の急性毒性ならびに APTT を評価した（図 80, 81）。その結果、表面未修飾の nSP70 投与マウスは前年度までの結果と同様に投与後 12 時間以内に死亡した。その一方で、nSP70-C あるいは nSP70-N を投与したマウスにおいては急性致死毒性や APTT の延長が全く認められなかった。さらに、これらのマウスの PT や APTT を測定したところ、nSP70-C あるいは nSP70-N において血液凝固の活性化が緩和されることが明らかとなった。以上の結果から、nSP70 の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血液凝固系の活性化を緩和でき、それを反映して急性致死毒性をも回避できることが明らかとなった。表面修飾非晶質 nSP の急性致死毒性回避効果が、粒子表面と第 XII 因子との相互作用の低減によるものであると考え、各 nSP の第 XII 因子活性化能を解析した（図 82）。その結果、予想に反して、表面修飾の有無にかかわらず、第 XII 因子が同程度に活性化されることが明らかとなった。すなわち、表面修飾 nSP の急性致死毒性回避効果には、第 XII 因子との相互作用以外の要因が関与している可能性が考えられた。一般に、第 X 因子、プレカリクレイン、高分子キニノゲンといった第 XII 因子以外の血液凝固因子が異物表面との接触を介して活性化されることが知られている。今回は、第 XII 因子活性化能のみを対象として解析したが、今後はその他の凝固因子の活性化についても nSP の表面物性との関連を精査する必要があると思われる。また、研究分担者の角田・八木らが明らかにしているように、nSP70 の血中への侵入が急性肝組織傷害を誘発することにも留意する必要がある。傷害された組織からは、一般に組織因子（Tissue factor）と呼ばれる血液凝固因子が発現することが知られている。つまり、nSP70 によって傷害された肝組織の類洞血管表面に組織因子が発現した可能性が強く示唆されるため、これが起点となって血液凝固が促進されたものとも考えることもできる。現在、①粒子表面と血液凝固因子との接触、②組織障害等を起点とする血液凝固カスケードの活性化と急性毒性の発現との連関解析を進めており、これらの知見を有効活用することで、生体にとって有害な作用を及ぼさ

ない安全かつ有効な非晶質 nSP の創製が実現するものと考えている。

32. 各種 nSP による急性肝障害のメカニズムの検討

各種 nSP 投与による肝障害のメカニズムを解明するために、肝非実質細胞であり異物貪食能をもつ肝クッパー細胞、及び肝臓内の有窓血管を形成する類洞内皮細胞の関与について検討した。シクロフォスファミド (CPA) は類洞内皮細胞の働きを抑える阻害剤として使用されている。そこで、nSP と CPA を併用投与した時の肝障害について検討した。図 83 に示すように、いずれの nSP を用いた場合でも CPA 併用によって有意に AST 及び ALT 活性が減少した。前年度に行った nSP70 における検討から、類洞内皮細胞が nSP による肝毒性に関与することが示されている。よって、表面修飾 nSP 及び粒子径 100nm の nSP における急性肝障害においても類洞内皮細胞が関与している可能性が示唆された。

続いてガドリニウムクロライド (GdCl) との併用による検討を行った。GdCl はクッパー細胞の働きを抑える阻害剤として使用されている。そこで、nSP と GdCl を併用投与した時の肝障害について検討した。図 84 に示すように、nSP70 及び nSP100 では GdCl との併用により AST 及び ALT 活性の上昇が観察された。一方、nSP70-N 及び nSP70-C では AST 及び ALT 活性の上昇が観察されなかった。昨年度の検討から、クッパー細胞が nSP70 を取り込むことが明らかとなっている。そのため、nSP100 も同様に取り込まれている可能性が考えられる。逆に、表面修飾体ではその取り込みが無くなった可能性が推察される。しかし、GdCl と各種 nSP の急性肝障害に関する詳細は不明であり、今後の検討が必要である。

33. 表面修飾 nSP 頻回投与における肝臓への影響

NM は急速な技術発展により、粒子表面を改質し、粒子の物性を様々に変化させることが可能となっている。そのため、表面を改質した NM が今後増加するものと考えられる。そこで、同一粒子径の NM の表面にアミノ基 (-NH₂) やカルボキシル基 (-COOH) を修飾した nSP (nSP70-C、

nSP70-N) を用いて、表面修飾 nSP の肝臓に対する安全性評価を行った。昨年度の検討により、単回投与では表面修飾 nSP (nSP70-N 及び nSP70-C) は未修飾の nSP70 に比べ肝臓への障害性が低いことが明らかとなった。そこで今年度は表面修飾 nSP 頻回投与における肝臓への影響を検討した。表面修飾 nSP である nSP70-N 及び nSP70-C と未修飾 nSP である nSP70 とを頻回投与した後、肝傷害の指標として AST、ALT 活性を測定した。AST 活性において、nSP70 はコントロールに比べ顕著な上昇が観察されたが、nSP70-N、nSP70-C は共にコントロール群と同程度の活性を示した (図 85A)。一方、ALT 活性は nSP70 に比べ低い活性を示したものの、nSP70-N 及び nSP70-C 共に高用量投与群において有意な上昇が観察された。(図 85B) また、腎障害を検討するため BUN の測定を行ったところ、いずれの群においても有意な差は観察されなかった。(図 85C) 次に、肝臓の線維化を検討するため、肝臓における HYP 含量の測定と AZAN 染色を行った。コントロール群と比較し nSP70 では顕著な HYP 値の上昇が観察されたが、nSP70-N、nSP70-C 低用量投与群では共にコントロールと同程度の値を示した。一方、高用量投与群では nSP70-C において HYP 値の有意な上昇が観察された (図 86A)。そこで、AZAN 染色を行い組織像から評価したところ、nSP70-C 高用量投与群においても肝線維化は観察されなかった(図 86E)。以上の結果から、表面修飾 nSP の頻回投与における肝障害性は単回投与における場合と同様に、未修飾 nSP よりも低いことが明らかとなった。また、障害性の強さは nSP70-C に比べ nSP70-N の方が低いことが分かった。従って、nSP の表面を適切に修飾することで、安全な nSP の利用・開発が可能になると考えられる。

34. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討

-1: 四塩化炭素による肝毒性に対する nSP の影響

四塩化炭素 (CCl₄) は、肝細胞のチトクロム P-450 により代謝され、トリクロロメチルラジカル (·CHCl₃) となり肝毒性を発現する。このトリクロロメチルラジカルの化学反応が肝実質細胞

に傷害を与え、肝傷害が誘導される。前年度までに CCl₄ と nSP の併用投与により肝傷害が相加的に上昇することを明らかにした。そこで、今年度は各種 nSP との併用投与が CCl₄ による肝障害作用にどのような影響を及ぼすかを検討した。

AST 活性を検討した結果、nSP70 及び nSP70-C において CCl₄ との併用により AST 活性が上昇することが確認された。これに対し、nSP70-N 及び nSP100 ではコントロール群と同程度の活性を示した (図 87A)。次に ALT 活性を検討した結果、nSP70-N を除き全ての nSP において CCl₄ との併用により ALT 活性が上昇した。特に nSP70-C 及び nSP100 については大きく値が上昇した (図 87B)。今回の検討により、nSP70-N を除き、nSP と四塩化炭素による相乗的な肝障害の憎悪化が観察された。AST 及び ALT 活性上昇の詳細な原因は今後の検討課題であるが、nSP70 は nSP300 と比べ ROS 産生能が高いため CCl₄ のラジカル誘導作用と協調的に働き急性肝障害を憎悪したと推察される。また、nSP 表面修飾の違いにより肝障害作用が異なることから、適切な修飾方法を選択することが安全性確保に重要であることが示された。

35. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討 -2 : パラコートによる肝毒性に対する nSP の影響

パラコートは、除草剤などの農薬として使用され、本邦においては中毒死者数が年間 200 人に上る。パラコートは細胞内でラジカルを発生し、酸化ストレスが生じる。酸化ストレス時の活性酸素が肝実質細胞に対し、細胞傷害を示す。前年度までに、nSP との併用投与で肝障害が相加的に上昇することが明らかとなっている。そこで、今年度は各種 nSP との併用による肝臓への影響を検討した。図 88 に示すように、多くの nSP においてパラコートとの併用により AST・ALT 活性が有意に上昇した。この結果から、表面修飾に関わらず、nSP と薬剤との併用時には肝障害が上昇することが示唆された。

36. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討 -3 : シスプラチンによる肝毒性に対する nSP70-C、nSP70-N、nSP100 の影響

シスプラチンは、DNA に結合し細胞周期を休止状態に導く作用を持つ抗癌剤として臨床で用いられており、精巣癌、卵巣癌、子宮癌、肺癌等幅広い適応を持つ。しかし、シスプラチンは ROS と関連し、神経障害などの副作用があり、また肝障害作用として ALT 及び AST 活性が上昇することが報告されている。前年度までに報告したように、抗がん剤として使用されているシスプラチンは、nSP との併用投与により強い毒性を示すことが分かっている。そこで今年度は、シスプラチンと各種 nSP との併用時における肝臓への影響を検討した。図 89 に示すように、nSP70-N ではシスプラチン単独投与と同様な AST 及び ALT 活性を示したが、nSP70-C、nSP100 では AST 及び ALT 活性が著しく上昇した。しかし、nSP70 ではこの用量で AST 活性が 4000 程度まで上昇しているのに対し、nSP70-C、nSP100 では 1500 程度と半分以下であるため、相乗効果の程度は nSP 自体の傷害性の違いに依存するものと推察される。

37. 非晶質 nSP と各種薬剤の併用毒性の検討 -4 : アセトアミノフェンによる肝毒性に対する nSP の影響

アセトアミノフェンは解熱鎮痛剤として広く使用されている薬剤である。そこで、nSP がアセトアミノフェンによる肝臓への毒性に影響を及ぼすかを検討した。図 90 に示すように、これまでに検討を行った薬物とは異なり、アセトアミノフェンでは nSP70・nSP100 において相乗効果が観察されたのに対し、nSP70-N・nSP70-C では相乗効果が観察されなかった。詳細な原因については検討課題であるが、表面修飾 nSP と未修飾 nSP では、アセトアミノフェンに関連する代謝経路が異なっているため今回のような結果になった可能性が想定される。また、nSP の表面を適切に修飾することで、安全な nSP の利用が可能となると考えられる。

38. 様々な粒子径の SP が有する起炎性の解析

約 30 nm - 1000 nm の粒子径の異なる SP を用いることで、SP の粒子径とマクロファージに対する起炎性との連関を解析した (図 91)。各 SP 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。その結果、IL-1 β に関しては、mSP1000が300 nm以下のSP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SP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、SP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SPのTNF α 産生誘導能を解析した。その結果、RAW264.7細胞においては、従来型SP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、nSP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、SP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。

次に、SP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SP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（図92）。その結果、従来型SP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発現量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、nSPを作用させたことによりMAPKが活性化されることが判明した。以上の結果より、nSP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SPをRAW264.7細胞に添加し、TNF α の産生量をELISAにより評価した（図93）。その結果、SP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、nSP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、nSP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、SP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（図94）。その結果、SP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、nSP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、nSP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。

39. 表面特性の異なるnSPの起炎性評価

近年、表面修飾を施したnSP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nSP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 (図 95A)。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 (図 95B)。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 nSP 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 (図 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 (図 97)。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 nSP の表面修飾は、その起炎性を低減し得ることが示された。

40. 妊娠マウスにおける nSP の体内動態追跡

当研究室ではこれまでに、皮膚に塗布した非晶質 nSP が、角質層を通過し、表皮層にまで到達するとともに、全身血流にまで移行することを明らかにしている。そこで、非晶質 nSP が血中に侵入後の妊娠マウスにおける体内動態を評価した。蛍光修飾された各粒子径の非晶質 SP を、胎盤が形成され安定期に入った妊娠 16 日目のマウスに尾静脈内投与し、*in vivo* imaging により体内動態を観察した (図 98)。その結果、すべての粒子において、肝臓で強い蛍光が観察され、肝臓への集積が認められた。一方で、nSP70 においてのみ、未処理群と比較して胎盤で強い蛍光が観察され、nSP70 は胎盤にまで移行することが示唆された。

次に、より詳細な体内動態を解析するため、TEM を用いて SP の局在を評価した。*in vivo* imaging と同様に非晶質 nSP を妊娠後期のマウスに尾静脈内投与し、出生直前に帝王切開により胎盤と胎子を回収し、胎盤への移行を観察した (図 99)。その結果、nSP300 や mSP1000 は胎盤細胞への移行が認められなかったのに対して、nSP70 投与群においてのみ、胎盤の栄養膜層や迷宮層部分において黒いドット状の nSP70 が確認された。また、幾つかの粒子が集団で凝集して存在する様子も観察された。胎盤は胎子の発育に重要な役割を担う組織であるため、nSP70 が胎盤へと移行することにより、胎子へ影響が及ぶ可能性が示唆された。

さらに、非晶質 SP が胎盤を通過し、胎子へも移行するかを検討するために、胎子の脳と肝臓組織を TEM により観察した。その結果、nSP300 や mSP1000 は胎子への移行が観察されなかった一方で、胎子の脳や肝臓において nSP70 が観察された。このことより、nSP70 は血液胎盤関門を

通過し、胎仔にまで移行することが示唆された。一般に血液胎盤関門は分子量 1000 以上の物質を受動的に通過させないため、nSP70 の胎仔への移行には何らかの能動的な機構が関与していると考えられる。今後は、血中から胎盤や胎仔に移行する nSP70 の量を定量的に測定するとともに、移行した nSP70 の蓄積量・期間を詳細に検討する必要がある。

ヒトとマウスは非常に類似した胎盤構造を形成している。妊娠後期の胎盤では、母体側にある脱落膜層へと子宮筋層から母体血管が進出し、母体血管から胎盤の栄養膜層へ血液が流入する。流入した血液は迷宮層に移行し、胎児側から伸びる索状の臍帯血管網を通じて栄養と老廃物を交換する。これら一連の流れにより、母体と胎児の血液は入り混じることなく、胎児は母体と物質交換をする。この胎盤の恒常性が崩壊し、胎盤機能が低下した場合、胎児は子宮内胎児発育遅延 (IUGR) や胎生致死といった深刻な影響を受けることが知られている。これまでの検討と同様に、妊娠後期のマウスに nSP70 を投与し、出産後、新生仔の飼育・観察を続けた。本検討では、母親の育仔能力や母乳からの nSP の影響を除外するために、里親として広く使用されている ICR マウスを里親として使用した。出産時における新生仔の体重を測定したところ (図 100)、nSP70 投与群で、コントロール群と比較して新生児体重の著しい低下が観察された。出生後は、コントロール群と nSP70 投与群は同等の体重増加を示し、6 週齢の時点ではほぼ同じ体重であった。一方で、6 週齢時に血球数を比較した結果 (図 101)、コントロール群と nSP70 投与群で赤血球数、血小板量に顕著な変化が認められなかったのに対して、白血球数や顆粒球数が nSP70 投与群で顕著に増加していた。以上の結果から、母体に非晶質 nSP を投与することで、IUGR が誘発されるだけでなく、出生後の免疫機能にも影響を及ぼし、アトピーや花粉症といったアレルギー性疾患の発症に関与する可能性が示唆された。今後は、糖尿病や、肥

満といったメタボリックシンドロームとの関連を調査する必要があると考えられる。

4.1. ROS 産生に着目した非晶質 nSP の DNA 傷害誘発メカニズムの解明

8-OHdG は遺伝子 DNA 中のグアニン塩基が活性酸素種 (ROS) の作用により酸化損傷を受けることによって生成されることが知られており、ROS による DNA 損傷のバイオマーカーとして知られている。そこでまず、nSP の DNA 酸化修飾誘発能を検討する目的で、nSP70, nSP300, mSP1000 を HaCaT に様々な濃度で作用させ、8-OHdG の定量を行った。その結果、コメントアッセイと同様に、nSP70 添加群のみにおいて 8-OHdG 含量が PBS 添加群と比べて有意に増加していることが示された (図 102)。これらの結果より、非晶質 nSP は従来型 SP とは異なる変異原性や DNA 酸化修飾の発現を誘導することが明らかとなった。つまり、100 nm 以下の新素材である非晶質 nSP は、従来までのサブミクロンサイズ以上の SP とは異なる細胞内局在-安全性を示すことが明らかとなった。

そこで次に、非晶質 nSP の安全性確保を目指して、ROS 産生の観点から HaCaT 細胞の DNA 損傷の発現メカニズムの解明を試みた。まず、HaCaT 細胞を用いて非晶質 SP 処理による ROS 産生の有無を検証した。nSP70, nSP300, mSP1000 を HaCaT 細胞に添加して 3 時間後の細胞内における ROS 量を DCFH-DA の蛍光量を指標に測定した。その結果、すべてのサイズの非晶質 SP を添加した群において ROS の産生が認められたが、特に nSP70 添加群において最も顕著な ROS 産生が認められた (図 103)。更に、蛍光プローブである HPF78 を用いて、ROS の中でも特に反応性の高い次亜塩素酸とヒドロキシラジカルの産生を解析したところ、先ほどの結果と同様に、nSP70 添加群において最も顕著なラジカルの産生が認められた (図 104)。ラジカルの中でも DNA と相互作用を起こすのは、このような反応性の高い ROS のみであることが知られており、

nSP70 による DNA 損傷発現に ROS が関与していることが強く示唆された。そこで、nSP70 による ROS 産生と DNA 損傷発現メカニズムとの関連について精査するために、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) 存在下における nSP70 の ROS 産生能を評価した。NAC を前処理した HaCaT 細胞に対して、30 分後に nSP70 を添加した。粒子添加 3 時間後に ROS 産生量を定量したところ、NAC を前処理した群では、PBS 添加群と同等の値にまで Tail Length の値の減少が認められた (図 105)。抗酸化剤共存下で nSP70 依存 DNA 損傷作用の抑制が認められたことから、nSP70 による DNA 損傷が ROS を介して生ずることが裏付けられた。これまでに、フラレーンを用いた検討により ROS が細胞傷害性に関与する例や、酸化チタンが産生する ROS が p53 発現を誘導し最終的に DNA 損傷に関与する例が報告されており、これらの結果からも、nSP70 による DNA 損傷発現メカニズムには ROS が強く関与していることが示唆された。すなわち、nSP70 の ROS 産生や細胞内局在を制御することで、NanoTox を誘導しない安全な NM の創製が実現するものと考えられた。

42. カーボンナノチューブおよびフラレーンの 21/28 日反復経皮投与毒性試験

OECD スポンサーシッププログラムへの対応に向けてカーボンナノチューブ (CNT) とフラレーン (C60) の反復投与経皮毒性試験を実施した。ラット (各群雄 5 匹) に各サンプルを 28 日間経皮塗布した結果、いずれの群においても体重測定や死亡率評価、剖検時の肉眼的検査 (ドレイズ試験) において、顕著な影響は見られなかった (図 106 及び表 1)。投与部位の病理学的検査においても、サンプル投与による影響は認められなかった (データは示さず)。さらに、各動物から回収した血液を用いて、各種血液検査を実施した。血液学的検査及び血液生化学的検査の結果、MWCNT あるいは SWCNT を塗布した群のクレアチニン値、総ビリルビン値、カリウム量、塩化

物イオン量、FL を作用させた総ビリルビン値、カリウム量、塩化物イオン量、において統計学的な有意差が散発的に認められた (図 107, 108, 109)。この変化が、被験物質投与に関連した生物学的意義のある変化か否かは、他国のグループによって提出される検査結果と重ね合わせて総合的に判断し、必要であれば被験物質の濃度依存性を検定する必要がある。以上、CNT やフラレーンに関して、これらの素材が適切に使用される場合、安全性に懸念がないと考えられるものの、血液検査の結果に関しては他国の検査結果と共に総合的に判断し、ADI を特定する必要性について慎重に議論する必要があると評価した。

43. NanoTox 解析の新技术

これまでに我々は、透過型電子顕微鏡を用いて nSP の体内動態追跡を進めている。電顕解析においては、形状やサイズを指標に nSP の局在を解析することが可能であるが、生体中に存在する微粒子 (カルシウムなど) や染色によって生ずる不純物としての微粒子との区別が付きにくいなどの課題を抱えている。そこで筆者らは、X 線元素分析装置付き電子顕微鏡 (EDX-TEM) を用いて、生体中 nSP の同定を試みた。本装置を用いることで、nSP 由来のケイ素原子シグナルを検出することが可能であり、視覚的な局在観察と同時に nSP の同定を実施できる。nSP70 を静脈内投与したマウスの肝臓を用いて EDX-TEM 解析を実施した (図 110)。その結果、肝臓中の組織切片中に認められた黒いドットからケイ素由来のシグナルを検出することが出来た。この結果から、静脈内投与した nSP70 が確かに肝臓中に到達することが裏付けられた。以上、X 線分析装置を併用することで nSP、ひいては NM の生体内細胞内局在を極めて詳細に追跡できる基盤技術の確立に成功した。

一方で、EDX-TEM を解析では、NM の生体内動態を定量的に解析する事は不可能である。NM の曝露量や体内吸収量、閾値、無作用量などを算出するに当たっては、NM の定量解析法の開発が

必要不可欠である。そこで本年度は、NM の定量解析法の確立を目指して、ICP-AES の有用性を検証した。ICP-AES は ICP によってサンプルを原子化・熱励起し、これが基底状態に戻る際の発光スペクトルから元素の同定・定量を行う方法である。特定の原子から発するスペクトルから目的原子の定量解析が可能であるため、NM の定量解析にも応用できるものと考えられた。本年度は、nSP70 を静脈内投与したマウスの肝臓を用いて予備検討を実施した (図 37)。その結果、投与した nSP70 の内 90%以上が肝臓に到達することが明らかとなった。また、本手法は検出感度の改善が必要であるものと考えられた。現在、本手法を適用して曝露量や体内吸収量の解析を進めると共に、検出感度の改善を進めている。

これら X 線元素分析法の感度向上方法として、X 線強度の増強が有力である。X 線強度を増強することによって、必然的に目的元素由来のシグナルが強くなるため、検出感度を向上出来るものと予想される。そこで、本年度は世界最高峰の放射光施設である SPring-8 の光源を利用した走査型 X 線顕微鏡解析を実施し、検出感度の増強が可能か否かを検証した。本検討では、酸化チタンを静脈内投与したマウスの肺および肝臓を使用した。これらのマウスの肺では酸化チタンの存在を位相差顕微鏡にて視覚的に確認出来る一方で、肝臓では確認することは出来ない。まず、酸化チタンを視認できる肺の走査型 X 線顕微鏡解析を実施したところ、位相差顕微鏡で黒い影として見えた物質が、確かに酸化チタンであることが確認出来た。また、酸化チタンの存在を視認できない肝臓を解析したところ、予想に反して所々に酸化チタン由来のシグナルが検出された。これらの結果は、走査型 X 線顕微鏡を適用することで酸化チタンの生体内局在をより高感度に解析できることを示唆している。現在、SPring-8 の放射光を利用した、NM の定量解析法の確立を進めている。

E. 結論

本研究では、特に実用化が進んでいる NM を経皮適用する領域での安全性情報の集積を目的に、非晶質シリカ (SP) を標準 NM として用いると共に、実際に上市・利用されている NM に関して、物性と動態や安全性との関連評価を通して NM 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。その結果、100 nm 以下のサイズの SP (nSP) は、従来までのサブミクロンサイズ以上の SP とは決定的に異なり、①経皮・経粘膜吸収され、全身血中にまで移行し得ること、②肝実質に移行し、肝障害を引き起こし得ること、③皮内ランゲルハンス細胞に取り込まれ、所属リンパ節にまで運搬され、免疫毒性を招き得ること、④血液-脳関門 (BBB) を突破し、脳神経毒性を呈し得ること、⑤胎盤に集積した後、血液-胎盤関門を突破して胎仔の脳や肝臓にまで移行すること等を初めて明らかとしている。さらに種々物性の nSP の毒性評価を実施したところ、100 nm 以下のサイズの nSP が、1) nSP によって生ずる DNA 損傷作用が活性酸素種の産生によって生ずること、2) 血中に移行した際に播種性血管内凝固症候群 (DIC) を誘発しうること、3) 胎盤に集積した後、胎盤関門を突破して胎仔の脳や肝臓にまで移行し、胎仔発育障害や流産、胎仔血液毒性、胎仔幹毒性を惹起し得ること、4) nSP を曝露した母体から出生した新生仔は成長後に免疫機能不全となり得ること、5) nSP 投与によって誘発される DIC や肝障害が、nSP の粒子表面をカルボキシル基やアミノ基等の官能基で修飾することによって回避できること、などを見出した。また、OECD テストガイドライン作成における経皮反復投与毒性試験を担当し、フラーレンと多層カーボンナノチューブ (MWCNT) と単層カーボンナノチューブ (SWCNT) の限定試験を完了した。本試験の結果、これらの素材が適切に使用された場合、安全性に懸念がないと考えられるものの、血液検査において統計学的に有意な影響が散発的に見られたため、他国の検査結果と共に総合的に判断し、一日摂取許容量 (ADI) 等を設定する必要性について慎重に議論する必要があると

評価した。

これらの結果は、非晶質 nSP を含有した経皮適用 NM 製品に関しては、曝露実態の定量的かつ詳細な評価やそれらを基盤とした摂取許容量や最大無影響量等の設定が必要になる可能性を強く示唆している。また、nSP をモデル NM とした本事業の成果によって、ナノ酸化チタンや白金ナノコロイド、ナノ銀といったその他の既実用化 NM や、今後、続々と開発されるであろう様々な NM に関しても、物性情報と体内/細胞内動態特性、ハザードとの連関を詳細に把握し、リスク管理の必要性を科学的に検証する必要があることを裏付けるものである。将来的には、本事業で確立した物性-体内動態-ハザード連関解析を基盤として、NM の社会受容の促進や NM 産業の発展支援が実現することを期待している。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

G-1 : 論文発表

1. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K. : Silica nanoparticles as hepatotoxicants., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72(3):496-501, 2009.
2. 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*, 64(6):395-7, 2009.
3. 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.*, 72(3):626-9, 2009.
4. Nabeshi H., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Sugita T., Abe Y., Nagano K., Nomura T., Minowa K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Arsenic trioxide has the inhibitory effect on transmission of human T-cell leukemia virus type 1., *Biol. Pharm. Bull.*, 32(7):1286-8, 2009.
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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)
9. 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)
10. 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)
11. Yagi K., Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Hepatotoxicity of silica nanoparticles in mice., *Toxicol. Lett.*, 189S: S184, 2009. (Supplement)
 12. 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)
 13. 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(2):160-165, 2010.
 14. 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.**
 15. 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.**
 16. 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.*, **in press.**

G-2 : 学会発表

国内学会発表

1. 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, 渋谷区 (東京), 2008 年 6 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 : 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.
3. 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.
4. 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 (兵庫), 2008 年 12 月.
5. 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 (兵庫), 2008 年 12 月.
6. Tokuyuki Yoshida, Yasuo Yoshioka, Hiroyuki Kayamuro, Kouhei Yamashita, Kazuma Higashisaka, Ryosuke

- Nakanishi, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Norio Ito, Shin-ichi Tsunoda, Yasuo Tsutsumi :第 37 回日本環境変異原学会, 宜野湾 (沖縄), 2008 年 12 月.
7. 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, 宜野湾 (沖縄), 2008 年 12 月.
 8. 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, 宜野湾 (沖縄), 2008 年 12 月.
 9. 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.
 10. 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, 宜野湾 (沖縄), 2008 年 12 月.
 11. 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 (京都), 2009 年 3 月. (大学院生シンポジウム)
 12. 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 年回, 京都 (京都), 2009 年 3 月.
 13. 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 (京都), 2009 年 3 月.
 14. 西森 光, 磯田勝広, 近藤昌夫, 角田慎一, 堤 康央, 八木清仁: ナノシリカ粒子頻回投与によるナノマテリアルの安全性評価., 日本薬学会 第 129 年回, 京都 (京都), 2009 年 3 月.
 15. 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連関評価., 日本薬学会 第 129 年回, 京都 (京都), 2009 年 3 月.
 16. 松山恵吾, 吉川友章, 鍋師裕美, 仲里泰太郎, 有森亮裕, 磯部将彰, 阿部康弘, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 非結晶性ナノシリカの粒子サイズと遺伝毒性との連関解析., 日本薬学会 第 129 年回, 京都 (京都), 2009 年 3 月.
 17. 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 (京都), 2009 年 3 月.
 18. 森重智弘, 吉岡靖雄, 田辺 綾, 渡辺 光,