

表13 器官重量(雄)

Table 13. Organ weights of male rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Corn oil (control 1)		Distilled water (control 2)		C60	PVP-C60	SW-CNT	MW-CNT	PVP-K30
	5	5	5	5					
Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Body weight	(g) 318.4 ± 23.6	333.1 ± 21.9	337.6 ± 24.2	326.6 ± 33.8	333.2 ± 32.0	331.3 ± 21.3	331.7 ± 22.0		
Brain	(mg) 1919.7 ± 91.8	1919.8 ± 32.2	1942.7 ± 42.0	1906.9 ± 99.4	1860.7 ± 83.5	1901.7 ± 86.7	1912.3 ± 61.6		
	(mg/g) 6.058 ± 0.567	5.779 ± 0.298	5.777 ± 0.407	5.884 ± 0.601	5.635 ± 0.706	5.759 ± 0.468	5.789 ± 0.475		
Thymus	(mg) 501.9 ± 88.6	558.2 ± 37.9	483.9 ± 130.0	474.1 ± 110.7	462.5 ± 53.9	594.1 ± 114.0	495.5 ± 113.3		
	(mg/g) 1.568 ± 0.155	1.676 ± 0.047	1.419 ± 0.291	1.446 ± 0.276	1.397 ± 0.197	1.803 ± 0.390	1.505 ± 0.386		
Liver	(mg) 10054.3 ± 948.2	10631.9 ± 1435.5	9606.9 ± 435.9	9710.8 ± 1701.3	10116.9 ± 1312.5	10636.1 ± 597.6	10037.0 ± 859.0		
	(mg/g) 31.556 ± 1.418	31.850 ± 3.013	28.318 ± 1.347 *	29.624 ± 3.190	30.294 ± 1.488	32.116 ± 0.585	30.260 ± 1.668		
Kidney (R)	(mg) 1291.0 ± 53.7	1349.0 ± 134.9	1226.1 ± 51.6	1240.7 ± 116.6	1313.3 ± 51.9	1296.7 ± 98.5	1309.5 ± 76.3		
	(mg/g) 4.071 ± 0.313	4.048 ± 0.284	3.643 ± 0.223	3.806 ± 0.188	3.961 ± 0.263	3.916 ± 0.236	3.951 ± 0.118		
Kidney (L)	(mg) 1271.5 ± 64.6	1316.4 ± 142.8	1208.4 ± 53.3	1240.5 ± 103.6	1288.6 ± 91.2	1306.1 ± 114.3	1289.9 ± 94.9		
	(mg/g) 4.009 ± 0.322	3.953 ± 0.355	3.592 ± 0.270	3.807 ± 0.142	3.878 ± 0.189	3.942 ± 0.234	3.890 ± 0.171		
Spleen	(mg) 699.6 ± 120.1	921.0 ± 296.0	818.3 ± 181.0	674.7 ± 152.9	791.8 ± 174.6	722.6 ± 64.9	787.9 ± 159.0		
	(mg/g) 2.203 ± 0.404	2.746 ± 0.782	2.406 ± 0.383	2.046 ± 0.315	2.390 ± 0.550	2.191 ± 0.269	2.378 ± 0.491		
Testis (R)	(mg) 1574.4 ± 109.8	1544.7 ± 71.3	1605.6 ± 70.4	1565.8 ± 135.0	1640.5 ± 160.2	1570.1 ± 74.3	1540.7 ± 121.0		
	(mg/g) 4.959 ± 0.414	4.651 ± 0.329	4.774 ± 0.375	4.839 ± 0.669	4.943 ± 0.488	4.748 ± 0.278	4.676 ± 0.622		
Testis (L)	(mg) 1577.0 ± 117.1	1543.7 ± 36.3	1596.8 ± 64.0	1572.3 ± 109.7	1660.6 ± 182.9	1505.0 ± 119.6	1547.0 ± 96.1		
	(mg/g) 4.968 ± 0.450	4.647 ± 0.290	4.749 ± 0.380	4.861 ± 0.646	5.005 ± 0.580	4.566 ± 0.547	4.691 ± 0.547		
Adrenal gland (R)	(mg) 25.0 ± 2.0	27.5 ± 4.5	31.4 ± 2.9 *	26.7 ± 1.4	32.2 ± 3.8 *	28.3 ± 3.2	26.5 ± 2.5		
	(mg/g) 0.078 ± 0.005	0.082 ± 0.011	0.094 ± 0.012	0.083 ± 0.013	0.097 ± 0.012 *	0.085 ± 0.005	0.080 ± 0.005		
Adrenal gland (L)	(mg) 26.5 ± 2.3	27.0 ± 4.7	32.9 ± 3.8 *	29.2 ± 2.9	34.2 ± 3.5 *	29.4 ± 3.7	27.1 ± 2.7		
	(mg/g) 0.083 ± 0.007	0.081 ± 0.011	0.098 ± 0.011	0.090 ± 0.013	0.103 ± 0.009 *	0.089 ± 0.008	0.082 ± 0.004		

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (*, P < 0.02; control 1).

表14 器官重量(雌)

Table 14. Organ weights of female rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Corn oil (control 1)		Distilled water (control 2)		C60	PVP-C60	SW-CNT	MW-CNT	PVP-K30
	5	5	5	5					
Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Body weight	(g) 197.2 ± 24.8	199.8 ± 6.5	211.9 ± 18.6	189.3 ± 15.6	194.4 ± 9.8	208.2 ± 9.2	204.8 ± 21.4		
Brain	(mg) 1728.7 ± 35.5	1752.9 ± 53.6	1743.3 ± 91.3	1769.7 ± 51.6	1752.8 ± 68.8	1756.7 ± 50.1	1771.4 ± 55.2		
	(mg/g) 8.868 ± 1.032	8.779 ± 0.299	8.256 ± 0.501	9.413 ± 0.972	9.028 ± 0.399	8.456 ± 0.543	8.721 ± 0.895		
Thymus	(mg) 403.8 ± 82.1	422.2 ± 48.0	445.3 ± 117.3	335.1 ± 63.0	416.7 ± 64.8	449.4 ± 64.2	407.6 ± 147.1		
	(mg/g) 2.034 ± 0.173	2.121 ± 0.297	2.088 ± 0.422	1.764 ± 0.233	2.137 ± 0.247	2.159 ± 0.291	1.969 ± 0.637		
Liver	(mg) 6021.3 ± 965.1	6066.1 ± 606.5	6346.5 ± 434.7	5564.6 ± 666.5	6094.9 ± 204.9	6209.9 ± 389.1	6215.8 ± 855.2		
	(mg/g) 30.426 ± 1.192	30.332 ± 2.431	30.018 ± 1.465	29.329 ± 1.384	31.391 ± 1.198	29.816 ± 0.946	30.306 ± 1.854		
Kidney (R)	(mg) 842.7 ± 115.3	861.5 ± 40.9	888.5 ± 94.1	770.6 ± 32.8 #	815.3 ± 25.1	817.1 ± 72.1	848.3 ± 107.4		
	(mg/g) 4.275 ± 0.239	4.312 ± 0.121	4.239 ± 0.773	4.084 ± 0.218	4.206 ± 0.304	3.927 ± 0.329	4.143 ± 0.288		
Kidney (L)	(mg) 838.7 ± 122.3	844.8 ± 36.9	875.1 ± 68.0	745.9 ± 57.8 #	819.6 ± 47.5	797.8 ± 59.9	844.9 ± 118.7		
	(mg/g) 4.255 ± 0.333	4.230 ± 0.164	4.160 ± 0.563	3.945 ± 0.175 #	4.218 ± 0.162	3.832 ± 0.240	4.121 ± 0.295		
Spleen	(mg) 455.6 ± 78.1	508.7 ± 53.8	535.2 ± 98.0	429.2 ± 42.7	518.1 ± 79.5	500.4 ± 34.2	515.4 ± 108.1		
	(mg/g) 2.300 ± 0.138	2.548 ± 0.278	2.520 ± 0.358	2.273 ± 0.224	2.662 ± 0.364	2.411 ± 0.239	2.493 ± 0.320		
Ovary (R)	(mg) 49.4 ± 6.4	39.1 ± 6.9	55.7 ± 8.5	36.5 ± 5.0	48.5 ± 10.2	46.1 ± 5.1	46.3 ± 13.3		
	(mg/g) 0.252 ± 0.032	0.196 ± 0.030	0.264 ± 0.038	0.194 ± 0.029	0.250 ± 0.054	0.222 ± 0.028	0.223 ± 0.043		
Ovary (L)	(mg) 39.4 ± 2.9	38.6 ± 4.5	53.7 ± 7.5 *	40.5 ± 10.8	44.0 ± 9.6	49.6 ± 4.5 *	40.0 ± 10.1		
	(mg/g) 0.201 ± 0.025	0.194 ± 0.023	0.255 ± 0.037	0.216 ± 0.064	0.226 ± 0.049	0.238 ± 0.023	0.194 ± 0.033		
Adrenal gland (R)	(mg) 36.5 ± 7.5	33.1 ± 3.9	33.7 ± 2.4	27.4 ± 7.2	34.6 ± 4.7	33.3 ± 5.4	35.7 ± 5.4		
	(mg/g) 0.188 ± 0.046	0.165 ± 0.015	0.160 ± 0.022	0.144 ± 0.031	0.178 ± 0.020	0.160 ± 0.025	0.175 ± 0.027		
Adrenal gland (L)	(mg) 37.9 ± 4.2	33.2 ± 3.2	35.0 ± 2.2	29.7 ± 5.7	33.3 ± 4.8	33.5 ± 6.3	37.1 ± 6.2		
	(mg/g) 0.193 ± 0.011	0.166 ± 0.017	0.167 ± 0.022	0.156 ± 0.022	0.171 ± 0.022	0.161 ± 0.030	0.182 ± 0.030		

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (#, P < 0.03; control 2, *, P < 0.02; control 1).

表15 解剖所見(雄)

Table 15. Macroscopic findings of male rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Findings	Group Grade	Corn oil	Distilled water (control 2)	C60	PVP-C60	SW-CNT	MW-CNT	PVP-K30
		(control 1)	(control 2)					
		- P	- P	- P	- P	- P	- P	- P
Kidney								
Enlargement		5 0	4 1	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0
Liver								
Whitish area		5 0	5 0	5 0	4 1	5 0	5 0	5 0
Lymph node, submandibular								
Enlargement		5 0	4 1	5 0	5 0	4 1	5 0	4 1
Skin								
Crust ^{a)}		5 0	4 1	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0
Spleen								
Enlargement		5 0	4 1	5 0	5 0	5 0	5 0	5 0

Notes) -: No abnormal changes P: Non-graded change

a) By taping (except exposure area)

Numerals represent the number of animals.

表16 解剖所見(雌)

Table 16. Macroscopic findings of female rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Findings	Group Grade	Corn oil	Distilled water (control 2)	C60	PVP-C60	SW-CNT	MW-CNT	PVP-K30
		(control 1)	(control 2)					
		- P	- P	- P	- P	- P	- P	- P
Kidney								
Pale colored area bilateral		5 0	5 0	5 0	5 0	4 1	5 0	5 0
Lymph node, submandibular								
Enlargement		5 0	4 1	5 0	5 0	4 1	5 0	5 0

Notes) -: No abnormal changes P: Non-graded change

Numerals represent the number of animals.

表17 病理組織学所見(雄)

Table 17-1. Histopathological findings of male rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days [H.E. staining]

Findings	Group	Corn oil (control 1)					Distilled water (control 2)					C60					PVP-C60					SW-CNT					MW-CNT					PVP-K30					
		-	±	+	2+	3+	P	Pos.	-	±	+	2+	3+	P	Pos.	-	±	+	2+	3+	P	Pos.	-	±	+	2+	3+	P	Pos.	-	±	+	2+	3+	P	Pos.	
Lymph node, submandibular																																					
Thymus																																					
Lung																																					
Bronchus																																					
Lymph node, mesenteric																																					
Heart																																					
Liver																																					
Spleen																																					

Notes) -: No abnormal changes ±: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked
P: Non-graded change NE: Not examined Pos.: Total of positive grade
Numerals represent the number of animals.

Table 17-2 Histopathological findings of male rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days [H.E. staining]

Findings	Group	Dose(mL/kg)	Control-1					Control-2					C60					PVP-C60					SW-CNT					MW-CNT					PVP-K30				
			-	±	+	2+	3+	P	Pos.	-	±	+	2+	3+	P	Pos.	-	±	+	2+	3+	P	Pos.	-	±	+	2+	3+	P	Pos.	-	±	+	2+	3+	P	Pos.
Kidney																																					
Adrenal gland																																					
Testis																																					
Epididymis																																					
Skin																																					

Notes) -: No abnormal changes ±: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked
P: Non-graded change NE: Not examined Pos.: Total of positive grade
Numerals represent the number of animals.

表18 病理組織學所見(雌)

Table 18. Histopathological findings of female rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days [H.E. staining]

Group	Corn oil (control 1)					Distilled water (control 2)					C60					PVP-C60					SW-CNT					MW-CNT					PVP-K30												
	Grade	-	+	2+	3+	P	Pos.	-	+	2+	3+	P	Pos.	-	+	2+	3+	P	Pos.	-	+	2+	3+	P	Pos.	-	+	2+	3+	P	Pos.	-	+	2+	3+	P	Pos.						
Findings																																											
Lymph node, submandibular		5					5					5					5					5					5					5					5						
Thymus																																											
Tingible body macrophage, cortex		3	2	0	0	0	2	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2	3	2	0	0	0	2	4	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2
Lung																																											
Accumulation, foam cell, alveolus		5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3	3	2	0	0	0	2	3	2	0	0	0	2	3	2	0	0	0	2
Cellular infiltration, eosinophil, periarterial		0	5	0	0	0	5	3	2	0	0	0	2	1	4	0	0	0	4	0	5	0	0	0	5	1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4
Metaplasia, osseous, focal		4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1
Mineralization, artery wall		5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0
Bronchus		5					5						5					5		5					5									5					5				
Lymph node, mesenteric		5					5						5					5		5					5									5					5				
Heart																																											
Degeneration/fibrosis, myocardial, focal		4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Liver																																											
Fatty change, hepatocyte, periportal		4	1	0	0	0	1	3	2	0	0	0	2	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0
Microgranuloma		1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4	1	4	0	0	0	4	4	1	0	0	0	1	1	4	0	0	0	4
Spleen																																											
Deposit, pigment, brown		0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5
Hemopoiesis, extramedullary		0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5	0	5	0	0	0	5
Kidney																																											
Basophilic tubule, cortex		0	4	1	0	0	5	1	3	1	0	0	4	2	2	1	0	0	3	2	3	0	0	0	3	1	3	1	0	0	4	1	4	0	0	0	4	0	4	1	0	0	5
Cellular infiltration, lymphocyte, interstitial		4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0
Mineralization, cortico-medullary junction		1	3	1	0	0	4	2	3	0	0	0	3	2	2	0	1	0	3	2	3	0	0	0	3	2	2	1	0	0	3	0	5	0	0	0	5	1	3	1	0	0	4
Adrenal gland		5					5						5					5		5					5										5					5			
Ovary																																											
Decrease, corpus luteum, bilateral		5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	0	1	0	0	1	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
Uterus		5					5						5					5		5					5										5					5			
Vagina		5					5						5					5		5					5											5					5		
Skin																																											
Cell debris, hair follicle		5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0

Notes) -: No abnormal changes +: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked
 P: Non-graded change NE: Not examined Pos.: Total of positive grade
 Numerals represent the number of animals.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央	非晶質ナノシリカ の経皮吸収性/生 体内動態と安全性 との関連追求	巨理文夫 (北海道大 学大学院歯 学研究科)	ナノ材料のリ スク評価と安 全性対策	フロンテ ィア出版	日本	44-53	2010

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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	65(3)	199-201	2010

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	33(4)	276-280	2010
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.	The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1 β production, ROS production and endosomal rupture.	Biomaterials	31(26)	6833-6842	2010
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	65(8)	596-599	2010
Higashisaka K., Yoshioka Y., Yamashita K., Morishita Y., Fujimura M., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshikawa T., Itoh N., Tsutsumi Y.	Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials.	Biomaterials	32(1)	3-9	2011

<p>Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., 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., Nakagawa S., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y.</p>	<p>Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application.</p>	<p>Biomaterials</p>	<p>32(11)</p>	<p>2713-2724</p>	<p>2011</p>
<p>Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., 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.</p>	<p>Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes.</p>	<p>Part. Fibre. Toxicol.</p>	<p>8</p>	<p>1</p>	<p>2011</p>
<p>Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y.</p>	<p>Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice.</p>	<p>Nature Nanotechnology</p>	<p>6(5)</p>	<p>321-328</p>	<p>2011</p>

Li X., Tsutsumi Y., Yagi K. et. al.	Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice.	Pharmazie	In press		
Isoda K., Hasezaki T., Yagi K. et. al.	Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury	Pharmazie	In press		
Itoh A., Yagi K. et. al.	Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl ₄ -Induced Liver Injury.	Biol. Pharm. Bull.	33	983-987	2010
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～	コスメティックスステージ	4(4)	44-48	2010
Nabeshi H., Yoshikawa T., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Safety Assessment of Nanomaterials Using Toxicokinetics and Toxicoproteome Analysis.	Yakugaku Zasshi	130(4)	465-470	2010
堤 康央	ナノマテリアルのヒト健康への影響	阪大 NEWS LETTER	48 (6)	19	2010
吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央	革新的技術/素材の恩恵を最大限に享受した豊かな社会の構築に向けて ～ナノマテリアルの安全性確保基盤の構築を例に～	生産と技術	6(4)	52-56	2010
Yoshioka Y., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.	Nano-safety science for assuring the safety of nanomaterials.	Nippon Eiseigaku Zasshi	65(4)	487-492	2010
Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Recent topics of NanoTox studies for their safety -Foreword-.	Yakugaku Zasshi	131(2)	193-194	2011
Tsunoda S.	Transdermal penetration and biodistribution of nanomaterials and their acute toxicity in vivo.	Yakugaku Zasshi	131(2)	203-207	2011
Yoshikawa T.	Development of NanoSafety forecasting system from the viewpoint of nanomaterial-protein interaction.	Yakugaku Zasshi	131(2)	209-213	2011
Abe Y.	Safety studies of nanomaterials about intracellular distribution and genotoxicity.	Yakugaku Zasshi	131(2)	215-219	2011
Yoshioka Y.	NanoSafety studies of nanomaterials about biodistribution and immunotoxicity.	Yakugaku Zasshi	131(2)	221-224	2011
Nagano K.	Biodistribution of nanosilica particles in pregnant mice and the potential risk on the reproductive development.	Yakugaku Zasshi	131(2)	225-228	2011

非晶質ナノシリカの経皮吸収性/生体内動態と安全性との連関追求

大阪大学 大学院 薬学研究科

吉川 友章

堤 康央

大阪大学 臨床医工学融合研究教育センター

吉岡 靖雄

(独)医薬基盤研究所

角田 慎一

『ナノ材料のリスク評価と安全性対策』

2010年6月 フロンティア出版刊 抜刷

3 非晶質ナノシリカの経皮吸収性 / 生体内動態と安全性との関連追求

吉川 友章*¹, 吉岡 靖雄*², 角田 慎一*³, 堤 康央*⁴

3.1 はじめに

近年のナノテクノロジーの発展も相俟って、ナノマテリアルを配合した化粧品や食品、医薬品など、数多くの製品が既に実用化・上市されている。ナノマテリアルは、特徴的な物性(サイズ減少効果など)によって、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは異なる機能(組織浸透性、電気的・磁氣的・光学的特性など)を発揮するため、種々の産業に革命を起こす新素材として、分野・領域横断的に期待されている。事実、化粧品関連産業だけでも、ナノシリカやナノ酸化チタンといったナノマテリアルが、世界で年間約2000トンも使用されていること、新たなナノマテリアルが続々と開発されていることなどを鑑みると、今やナノマテリアルは、産業界のみならず、我々の生活にも不可欠な素材となっている。視点を変えると、我々は既に、製造現場や環境中に放出されたナノマテリアルに対する非意図的な曝露に加え、医薬品・化粧品・食品中のナノマテリアルに対する意図的な曝露を避け得ないことを示している。

一方で、近年、遺伝子改変マウスなどを用いた安全性試験から、カーボンナノチューブがアスベスト様の発がんリスクを有するなど、ヒトの健康を確保する上で軽視できない事実が続々と報告されている¹⁾。そのため昨今では、ナノマテリアルはヒトにとって有用な“光”の側面と、望ましくない“闇”の側面を併せ持つこと、即ち、二面性を呈することが世界的に認識されつつある²⁻⁶⁾。ナノマテリアルの開発や実用化は日進月歩の目覚ましい勢いで進展しているものの、残念ながら、ナノマテリアルの安全性研究は、殆ど省みられておらず、世界的にみても大きく立ち後れている。

そのため、最近になってようやく、世界経済協力機構(OECD)の主導のもと、ナノマテリアルの安全性確保や規制に向けたスポンサーシッププログラムが世界規模で開始された。本プログラムにおいて我が国は、日本国内産業で主要な位置を占めるナノマテリアルについて可能な限り多くの安全性情報の提示を求められているものの、我が国のナノマテリアルの安全性評価は、欧米各国に比べ、特に遅れている。また、NanoTox 研究を行ううえで考慮すべき点は、

* 1 Tomoaki YOSHIKAWA 大阪大学 大学院 薬学研究科 毒性学分野 助教

* 2 Yasuo YOSHIOKA 大阪大学 臨床医工学融合研究教育センター 特任講師

* 3 Shin-ichi TSUNODA (独)医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト サブプロジェクトリーダー

* 4 Yasuo TSUTSUMI 大阪大学 大学院 薬学研究科 毒性学分野 教授

例えば医薬品・化粧品・食品の場合、老若男女・妊婦・胎児・乳幼児・病人を問わず、あらゆる世代のヒトが一生にわたって曝露され続けることにある。そのため、ナノマテリアルがごく僅かでも体内に吸収され、長期にわたって蓄積され続けると、過去の多くの事例が物語っているように、安全性に大きな問題を招きかねない。しかし、NanoTox 研究の大部分はハザード評価(毒性の有無)に偏重しているのが現状であり、肝心の“体内吸収性や体内/細胞内動態に関する情報”は、世界的に枯渇しており、まさに空洞化状態にある。これは、一般に低分子量の化学物質の場合は曝露と吸収がほぼ同義で捉えられているのに対して、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材で積み重ねられてきた知見に基づき、ナノマテリアルの場合でも曝露されても吸収されるはずがないだろうという誤った認識にも大きく影響されている。これは、一次粒径が100 nm 以下であっても、多くのナノマテリアルは実用条件下で凝集体(あるいは成形)となり、その二次粒径がサブミクロンサイズになっていることに起因する。しかし昨今では、ナノマテリアルのナノメートルサイズであるが故の機能性を最大限に活用するため、分散性に優れた“二次粒径もナノメートルサイズ”であるものが開発、実用化されていること、また体内に侵入したナノマテリアルは体内成分と相互作用し、様々な分散状態を呈することに、我々は注意しなくてはならない。即ち、このままでは、ナノマテリアルの体内吸収性・生体内動態に関する検討がなされぬまま、科学的根拠に乏しい使用規制がむやみに施行されてしまい、ナノマテリアルの有用性を享受した豊かな社会の構築や産業発展が阻害されてしまいかねない。従って、我が国の知的財産を確保しつつ、ヒトの健康を確保していくためには、ナノマテリアルの二面性(NanoTox)を解析・理解した上で、科学的根拠に基づいてナノマテリアルの安全性を確保することが急務となっており、本観点での NanoTox 研究は、2008 年9月にスイス(チューリッヒ)で開催された国際ナノ毒性会議でも明らかなように、国内外を問わず、皆無に等しい。

以上の背景を踏まえて筆者らは、最も汎用されているナノマテリアルの一つである非晶質ナノシリカの①体内吸収性と体内/細胞内動態の解析、②実験動物を用いたハザード評価、③ NanoTox 発現機構の解析を統合的に推進している(図1)。これら①~③の情報の連関から、ナノマテリアルの物性(サイズ;二次粒径、表面電荷、親/疎水バランス、形状など)と安全性の因果関係を明確化することができれば、最終的にナノマテリアルの物性から安全性を予測する方法の確立や有効かつ安全なナノマテリアルの設計指針の策定に繋がり、安全なナノマテリアルの開発と実用化の支援、ヒトの健康環境の確保に貢献できるものと考えている。既に筆者らは、所謂サブミクロンサイズよりも小さな非晶質ナノシリカ(直径100 nm 以下)が、経皮吸収性や体内/細胞内動態、種々安全性の点で、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは決定的に異なる特性を発揮することを見出している(表1)⁸⁾。本稿では、この表1の中から、非晶質ナノシリカの粒子サイズと動態(経皮吸収性や体内/細胞内動態)、安全性の連関に焦点を

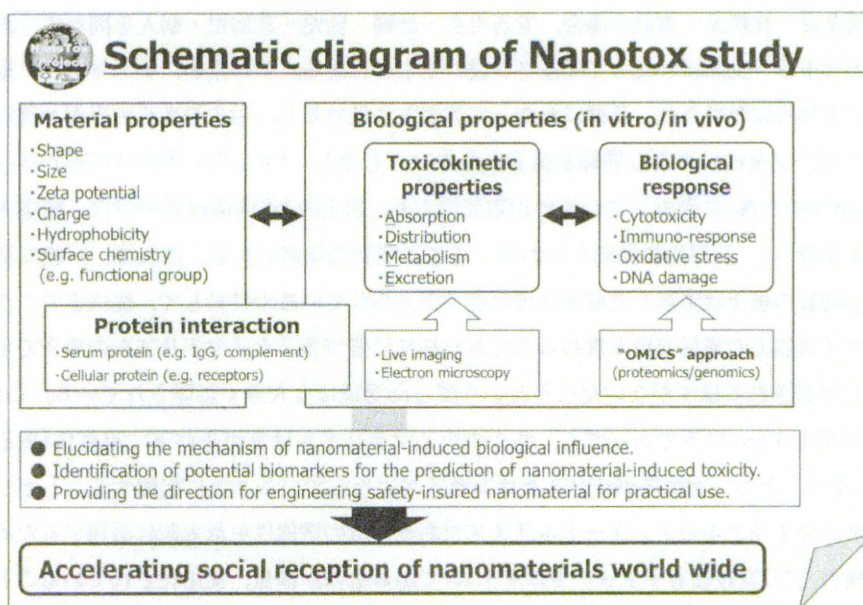


図1 NanoTox 研究戦略

表1 nSP70 の生体内 / 細胞内動態と生体影響

局在	生体影響
皮膚 ^a	表皮および真皮層にまで到達、皮膚バリアを透過した後に血中へ移行。
肝臓 ^b	肝クッパー細胞や肝実質細胞に蓄積、急性肝毒性や肝実質細胞におけるDNA傷害を誘発。
<i>In vivo</i> 脳 ^{a, b}	経皮塗布後に脳に蓄積、脳細胞に対する増殖阻害や脳内における炎症性サイトカイン産生を誘発。
脾臓 ^b リンパ節 ^a	免疫担当組織である脾臓やリンパ節にも蓄積したことから、免疫学的な生体影響の誘発が懸念される。
子宮 ^b 胎児 ^b	早産や胎児の発育阻害を誘発。
<i>In vitro</i> 核 核小体	核膜透過性や核小体への蓄積性を示す、DNA傷害を誘発。

本表で示した現象は nSP70 を曝露したマウスにおいてのみ観察された。また、これらの解析は nSP70 を経皮塗布 (a) あるいは尾静脈内投与 (b) したマウスを用いて実施した。

絞って紹介する。

3.2 非晶質ナノシリカの物性と経皮吸収性との関連評価

非晶質ナノシリカは、数あるナノマテリアルの中でもカーボンブラックに次いで生産量が多

い素材であり、医薬品や食品、化粧品など、ヒトに直接適用する分野では、最も使用されている。ナノシリカの用途は非常に幅広く、ファンデーションやクリーム剤、乳液などの化粧品を中心に、直径 100 nm 以下の素材が汎用されている。さらに、歯磨き粉や歯の充填剤といった歯科治療用途、固結防止剤として食品中にも多く含まれており、非晶質ナノシリカの市場規模は 30 億ドルにも及ぶ。また、従来までのナノシリカは凝集性に富んでおり、実際の使用条件下ではサブミクロンサイズ以上の凝集塊を形成していた。しかし、ナノシリカは微小化すればするほど、使用感や透明性、吸湿性の向上などの様々な有用機能が付与できるため、この数年でナノシリカのサイズダウンや分散性を向上する技術の開発が加速度的に進展しており、現在では、直径が 25 nm 程度のもので開発されつつある。一方で、先述した NanoTox に対する懸念の高まりを受けて、非晶質ナノシリカについても、身近な素材であるが故に安全性の再評価が進められている。2006 年の ECETOC (欧州化学物質生態毒性及び毒性センター) によれば、サブミクロンサイズ以上のシリカ (一次粒径は 100 nm 以下であっても、凝集体として、サブミクロンサイズ以上になるナノシリカを含む) の安全性に問題はないと報告されている¹⁾。しかし、この報告は、昨今の分散性に優れた 100 nm 以下のナノシリカの安全性を保証するものではない。即ち、ナノマテリアル産業の将来を見据えると、より分散性が高く直径 100 nm 以下の素材を用いて、物性や動態、安全性の点におけるナノマテリアルとマイクロメートルサイズの素材の違いを明確化する必要があるものと考えられる。

先述したとおり、ナノマテリアルの安全性やリスクを評価するための第一歩は、経皮あるいは経口・経肺経路で曝露されたナノマテリアルが体内に吸収され、臓器蓄積性を示すか否かを検討することである。そこで本研究では、分散性が極めて高い表面未修飾非晶質ナノシリカを用いて、経皮吸収性・体内動態・細胞内動態と粒子サイズとの関連を検討した。筆者らは一次粒径が 70 nm (nSP70)、300 nm (nSP300)、1000 nm (mSP1000) のものを実験に用いている (現在は、30 nm、50 nm の nSP も使用しているが、これらに関しては今後、報告させて頂く)。図 2 に表面未修飾のシリカの透過型電子顕微鏡 (TEM) 写真を示す。いずれの粒子も非常に滑らかな形状をした粒子であり、一次粒子径もカタログ値とほぼ同等であった。また、動的光散乱法を用いて平均二次粒子径を測定した場合でも、カタログ値とほぼ同等の測定値が得られたことから、これらの粒子は極めて分散性の高い粒子であることが明らかとなった。続いて、nSP70、nSP300、mSP1000 をマウス耳介に塗布した際の経皮吸収性を評価した。各シリカを BALB/c マウスに 5 日間あるいは 28 日間連続経皮塗布し、投与局所および所属リンパ節、主要組織の TEM 観察を行った。その結果、nSP70 が角質層を通過して表皮や真皮層にまで到達し、さらに興味深いことに、nSP70 塗布マウスの脳アストロサイト、脳血管内皮細胞内に nSP70 が蓄積することが明らかとなった (表 1)。なお、筆者らは、従来までのサブミクロンサイズ以上の

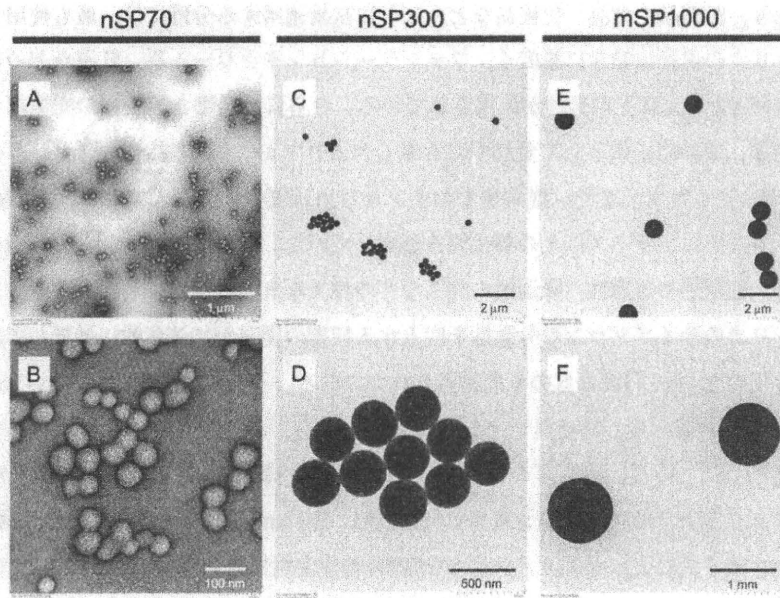


図2 非晶質シリカの電子顕微鏡写真

(A and B) 直径 70 nm のシリカ (nSP70), (C and D) 直径 300 nm のシリカ (nSP300), (E and F) 直径 1000 nm のシリカ (mSP1000).

シリカである nSP300 や mSP1000 は、表皮層にすら到達しないことを確認している。これまでも、直径が数百ナノメートルのナノ粒子が体内に侵入した後に脳内に蓄積する可能性がいくつか報告されている。例えば、Wang らは、鼻腔内投与したナノ酸化チタンが脳内に蓄積し、脳組織内での酸化ストレスや炎症の増悪を誘発することを報告している¹¹⁾。また、Takeda らは妊娠マウスに皮下投与した酸化チタンが胎仔の脳内に蓄積して脳細胞にアポトーシスを誘導することを報告している¹²⁾。しかしながら、非晶質ナノシリカが経皮塗布後に体内吸収性や脳内蓄積性に関する検討は世界的に見ても報告はない。非晶質ナノシリカが非常に強固な皮膚角質バリアを通過して脳内蓄積性を示すという事実は非常に興味深い結果であり、少なくともこれらの事実は、ナノシリカの経肺・経口曝露後の安全性評価の重要性や、脳神経/免疫学的な安全性評価の必要性を示している。現在、筆者らは安全性評価において最も重要な経皮吸収量(曝露量)の評価を進めると共に、皮膚透過機構の解析や皮膚局所における安全性評価を推進している。

3.3 非晶質ナノシリカの体内動態と急性毒性の評価

前項において分散性の高い非晶質ナノシリカが経皮吸収される可能性が示唆されたため、次

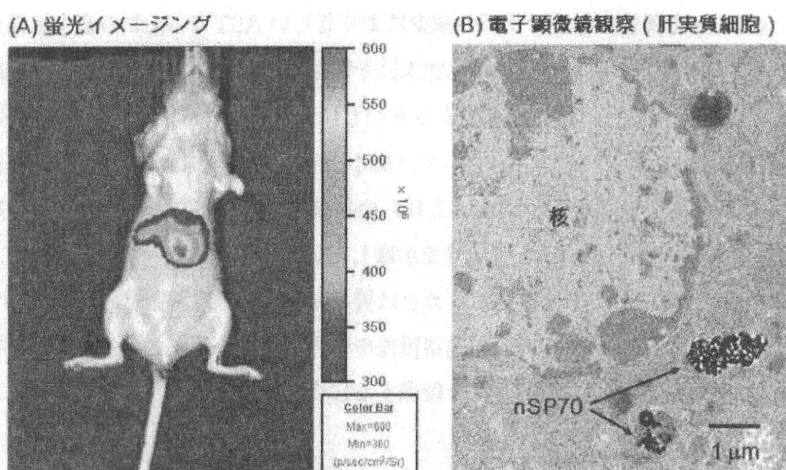


図3 nSP70 の体内動態解析

DY676 で標識した nSP70 (7×10^{10} 個) を BALB/c マウス (雌, 8 週齢) の尾静脈内より投与した。投与 24 時間後に Xenogen IVIS 200 を用いて nSP70 の局在を蛍光イメージングにより解析した(A)。また、同様に nSP70 を投与したマウスから肝臓を回収し、電子顕微鏡を用いて nSP70 の肝臓内局在を観察した。

に各ナノシリカを尾静脈内より投与したマウスを用いてナノシリカが全身循環した際の動態および生体影響を評価した。まず、種々の粒子径の非晶質ナノシリカの生体内動態を蛍光イメージングならびに TEM 解析により評価したところ、nSP300 と mSP1000 は胆嚢に局在し、一方で nSP70 は肝臓全体へ速やかに分布することが明らかとなった(表 1, 図 3)。また、nSP300 と mSP1000 は、肝実質細胞には殆ど移行せず、一方で粒子径 70 nm 以下になると肝実質細胞へ移行し、最終的に核内にまで到達

した。続いて、各シリカを 2 mg/head で尾静脈内投与した際の急性毒性試験を実施した。nSP300 や mSP1000 を静脈内投与したマウスにおいては急性毒性や肝毒性は全く認められなかったのに対して、nSP70 投与マウスは投与後 12 時間以内に全例が死亡した(表 2)。これらのマウスから回収した血液中の肝障害マーカーを測定し

表 2 非晶質シリカの急性毒性試験

群	生存率 (%)	ALT 値* (IU ¹ /L)
コントロール	100	27.6 ± 2.13
nSP70	0	1640.4 ± 569.6*
nSP100	60	71.6 ± 10.8
nSP300	100	35.0 ± 2.4
mSP1000	100	32.4 ± 2.59

生存率は非晶質シリカ投与 24 時間後に評価した。また、血漿中 ALT レベルの測定は、非晶質シリカ投与 6 時間後に回収した血漿を用いて実施した。

1: Alanine aminotransferase

2: International Unit

*: p<0.01 vs. Control (PBS) (ANOVA)

たところ、100 nm を閾値に粒子サイズの減少により著しい AST や ALT の産生上昇が認められた。これらの結果を重ね合わせると、急性毒性や肝障害性といった生体影響の違いは非晶質ナノシリカの体内分布特性の差異に起因するものと考えられた。また、筆者らは nSP70 を静脈内より頻回投与したマウスの肝臓において、微小肉芽の形成や線維化といった“肝炎様の症状”が誘導され得ることを見出している。これらの結果は、nSP70 に対する持続的な曝露が肝硬変や肝がんの発症リスクを高める可能性を示唆している。以上の知見は、直径 100 nm 以下のナノシリカがサブミクロンサイズのシリカとは異なる体内/細胞内動態特性を発揮する可能性を示しており、ナノシリカの肝実質細胞蓄積性や核内蓄積性を反映した生体影響解析とそのメカニズムの解明がナノシリカの安全性を確保するに当たって必要不可欠であることが示された。

3.4 非晶質ナノシリカの細胞内動態と安全性との関連追求

ここまでの検討結果から、直径 100 nm 以下の非晶質ナノシリカがサブミクロンサイズの従来素材とは異なる動態特性を発揮し、ナノマテリアルの動態情報を基盤とした安全性評価が NanoTox 研究において重要であることを明らかにした。そこで本項では、特にナノシリカの細胞内動態特性に焦点を当てた安全性評価について紹介する。まず、ヒト皮膚角化細胞株 (HaCaT) を用いて、ナノシリカの細胞内局在を解析した。HaCaT 細胞に各粒子サイズのシリカを添加し、24 時間後の細胞を TEM にて観察した。その結果、nSP300 あるいは mSP1000 を適用したいずれの群においても各シリカが細胞内に侵入した像が認められ、特に mSP1000 を添加した群においては細菌感染時と同様のリソソーム小胞の過形成を認めた。それに対して、nSP70 は細胞内に侵入するばかりか核膜を透過して核内に侵入していた(表 1)。これらの事実は、直径が 100 nm 以下のナノマテリアルが従来までのマイクロメートルサイズのマテリアルとは異なる細胞内動態特性を示すことを裏づけている。即ち、ナノマテリアルの安全性を確保するに当たっては、細胞内取り込み経路や細胞内オルガネラへの到達性、およびその機構などの細胞内動態に関して精査し、それらの情報を基盤とした安全性評価が必須であり、特に今回使用したナノシリカの場合は核内移行特性を反映した遺伝子や核機能に対する影響の評価が必要であるものと考えられた。そこでまず、HaCaT 細胞に対する細胞傷害性試験を行った(図 4)。nSP70 を作用させた群においては、ナノシリカの添加量依存的な細胞傷害性の増大を認めた。また、その効果は粒子径依存性が認められた。さらにコメットアッセイを用いてシリカ処理による DNA 損傷の有無を実施したところ、nSP70 を適用した群においてのみ強力な DNA 損傷効果が認められた(表 1)。これらの結果は、nSP が粒子径の減少を反映して細胞傷害や DNA 損傷を誘発し、発がんリスクを増大させ得ることを示している。今後は、nSP70 の核内移行性

とDNA損傷との因果関係を精査すると共に、体細胞への影響として発がん性試験、生殖系列への影響として生殖発生毒性試験などを検討する必要がある。

現在のところ、直径70 nmの微粒子が核膜孔を通過する機序は不明である。核膜には核膜孔が存在するが、これらの間隙はおよそ30 nm程度と言われているため、ナノシリカが受動的に核膜孔を透過することは非常に考えにくい。従って、細胞内に侵入したナノシリカは何らかの核内移行分子と結合した後に、能動的に核内に移行する可能性が考えられる。我々は現在、ナノシリカの核内移行性とDNA合成阻害、DNA損傷の発

現機構の解明を目指して、nSP70曝露細胞の核分画をサンプルとしたプロテオーム解析を進めており、2次元ディファレンシャル電気泳動法を用いた解析から、添加するシリカの粒子サイズの違いによって、発現量が変動する多数の核内たんぱく質を見出している。これらのたんぱく質は、DNA合成阻害やDNA損傷の発現機序の解明に有用であることに加え、安全性を評価できるバイオマーカーとして活用できる可能性がある。以上のナノマテリアルの細胞内局在解析によって得られる局在部位/内部曝露量に関する情報は、より精密なトキシコプロテオミクスを実行する上で有用な指針を与えるものと考えている。

3.5 おわりに

米国では「国家ナノテクノロジー戦略(National Nanotechnology Initiative)」の中で、既にナノテクノロジー応用製品の開発のみならず、NanoToxにも着目して先進的な研究を命じている。また、英国においても英国学士院(Royal Society)を頂点とする研究機関がNanoTox研究を統括するなどの対策がとられている。それに対して、本邦のナノテクノロジーは、開発面では世界トップレベルであるものの、「闇」の部分ともいえるナノマテリアルのリスク評価に関する情

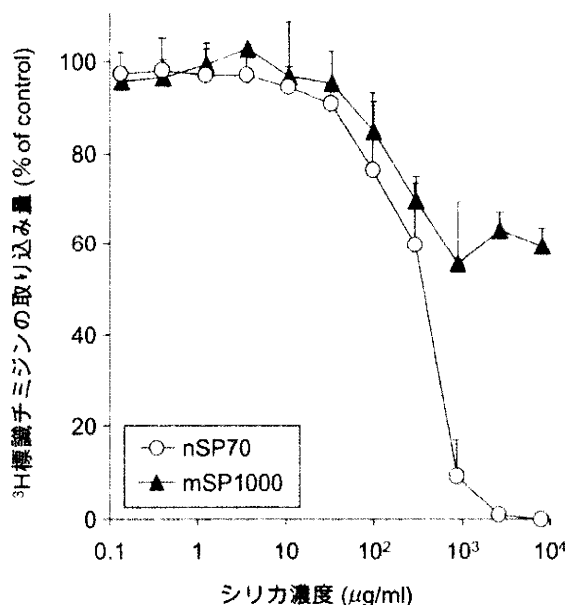


図4 非晶質シリカの細胞傷害性評価

種々の濃度の非晶質シリカ(nSP70, mSP1000)ヒト皮膚角化細胞(HaCaT)に添加し、24時間培養した。細胞障害性は、培養終了6時間前に添加した³H標識チミジンの細胞内への取込量を指標として評価した。なお、PBS添加群をコントロールとして用いた。

報開示は極めて少なく、本邦の NanoTox 研究は欧米諸国に比べると圧倒的に立ち後れている。従って、これまで殆ど検討されていなかったナノマテリアルの体内吸収性やハザードの明確化およびメカニズムの解明を積極的に推進すると共に、これらの現象をナノマテリアルの体内/細胞内動態の観点から考察することによって、安全なナノマテリアルの開発と実用化の支援、ナノマテリアルのメリットを最大限に享受した豊かな社会の確立が実現でき、先進国・技術立国・知財立国としての我が国の国際貢献に寄与できるものと考えられる。

本稿では、100 nm 以下の非晶質ナノシリカは、皮膚透過性や体内動態/生体影響の点においてサブミクロン以上のサイズ(数百 nm ~ 数十 μm)のバルクマテリアルとは異なる性質を発揮することを実証した。即ち、ナノマテリアルの安全性確保と社会受容の促進を実現するためには、ナノマテリアルをバルクマテリアルとは別個の新素材として捉え、体内吸収性や組織浸透性/蓄積性といった生体内動態をより慎重に解析し、安全性情報を収集する必要があることを示している。今回は紙面の都合上、割愛させて頂いたが、筆者らは本項で紹介した検討に加えて、経肺・経口曝露時の体内吸収性・体内動態の解析や、脳神経/免疫/生殖発生的な NanoTox 研究を推進しており、既に多くの興味深い知見を得つつある。一方で、ナノマテリアルが体内に侵入した場合、体内のたんぱく質や脂質、糖質、遺伝子のような生体高分子、皮膚や腸内、口腔に存在する体内常在菌、さらには同時に摂取した医薬品や食品などと相互作用するものと考えられる。従って、NanoTox 研究においては体内動態解析に加えて、生体高分子との相互作用、さらには医薬品や食品との飲み/食べあわせ、アレルゲンや細菌、ウイルスとの相互作用を考慮に入れ、なおかつ老若男女、病人(疾患との兼ね合い)、妊婦、乳幼児を想定した安全性試験が必須となる。本稿で紹介したようなナノマテリアルの安全性確保研究は、ナノマテリアルが人類の健康や環境に悪影響を与えることなく、産業発展に資するテクノロジーとして社会に受容されるために必須のプロセスと言えよう。

詳細は割愛したものの、筆者らの検討からサブミクロンサイズ以上のシリカ(凝集体を含む)は安全性に優れていること、また 100 nm 以下のサイズであっても表面修飾を最適化することで安全性を確保し得ることを認めている。このことは、ヒトや環境の安全を確保すると同時に、我々がナノテクノロジーの恩恵を享受しつつ、ナノ産業界の発展も達成できることを意味している。本稿では紙面の都合上、筆者らの知見の一例のみ紹介させて頂いたが、今後、こういった NanoTox 研究を積み重ねることで、ヒトの健康環境を確保しつつ、産業界も発展するものと期待している。

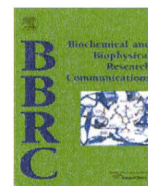
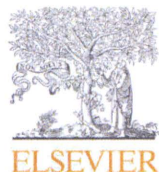
[謝辞]

本研究では、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究(No.20015052)、日本学術振興会科

学研究費補助金基盤研究B一般(No.21390046)、厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業(No.H19-化学一般-005)、厚生労働科学研究費補助金医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業(No.H19-医薬一般-010)、厚生労働科学研究費補助金政策創薬総合研究(HS)事業(No.K10-1017)、厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業：創薬バイオマーカー探索研究事業(No.H21-バイオ-指定-005)、文部科学省地域科学技術振興施策知的クラスター創成事業、環境省環境研究・技術開発推進費(地球環境研究総合推進費)、厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究事業(H20-子ども一般-002)、財団法人永井記念薬学国際交流財団の支援を賜りました。ここに深謝申し上げます。

文 献

- 1) A. Takagi *et al.*, Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube, *J Toxicol Sci*, **33**, 105-16(2008).
- 2) C.A. Poland *et al.*, Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study, *Nat Nanotechnol*, **3**, 423-8(2008).
- 3) A.B. Kane, R.H. Hurt, Nanotoxicology: the asbestos analogy revisited, *Nat Nanotechnol*, **3**, 378-9(2008).
- 4) K. Kostarelos, The long and short of carbon nanotube toxicity, *Nat Biotechnol*, **26**, 774-6(2008).
- 5) Y. Zhao *et al.*, Nanotoxicology: Are carbon nanotubes safe?, *Nat Nanotechnol*, **3**, 191-2(2008).
- 6) R.F. Service, Nanotoxicology: Nanotechnology grows up, *Science*, **304**, 1732-4(2004).
- 7) T. Yoshikawa *et al.*, [Evaluation of biological influence of nano-materials using toxicokinetic and toxicoproteomic approach], *Yakugaku Zasshi*, **128**, 1715-25(2008).
- 8) H. Nabeshi *et al.*, Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells, *Pharmazie*, 2009. In press.
- 9) R. Merget *et al.*, Health hazards due to the inhalation of amorphous silica, *Arch Toxicol*, **75**, 625-34(2002).
- 10) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Synthetic Amorphous Silica, JACC Report, No.51, (2006).
- 11) J. Wang *et al.*, Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles, *Toxicology*, **254**, 82-90(2008).
- 12) K. Takeda *et al.*, Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can Damage the Genital and Cranial Nerve Systems, *Journal of Health Science*, **55**, 95-102(2009).
- 13) A.E. Nel *et al.*, Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, *Nat Mater*, **8**, 543-57(2009).



Titanium dioxide induces different levels of IL-1 β production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B

Tomohiro Morishige^{a,1}, Yasuo Yoshioka^{a,b,*}, Aya Tanabe^{a,1}, Xinglei Yao^a, Shin-ichi Tsunoda^{b,c}, Yasuo Tsutsumi^{b,c,d}, Yohei Mukai^a, Naoki Okada^a, Shinsaku Nakagawa^{a,b,*}

^aLaboratory of Biotechnology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^bThe Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^cLaboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

^dLaboratory of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2009

Available online 7 January 2010

Keywords:

Cytokine
Inflammation
Macrophage
NALP3
Nanomaterial

ABSTRACT

Although titanium dioxide (TiO₂) is widely used, its inhalation can induce inflammatory diseases accompanied by interleukin-1 β (IL-1 β) production. The particle characteristics of TiO₂ are important factors in its biological effects. It is urgently necessary to investigate the relationship between the particle characteristics and biological responses for the development of safe forms of TiO₂. Here, we systematically compared the production of IL-1 β in response to various forms of TiO₂ by macrophage-like human THP-1 cells using various sizes (nano to micro), crystal structures (anatase or rutile), and shapes (spherical or spicular) of TiO₂. The production of IL-1 β depended dramatically on the characteristics of the TiO₂. Notably, smaller anatase and larger rutile particles provoked higher IL-1 β production. In addition, IL-1 β production depended on active cathepsin B and reactive oxygen species production independent of the characteristics of TiO₂. Our results provide basic information for the creation of safe and effective novel forms of TiO₂.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Titanium dioxide (TiO₂) is a natural mineral that occurs in three different crystallographic structures: rutile, anatase, and brookite. Because of its physicochemical properties of good fatigue strength, machinability, biocompatibility, and whitening and photocatalytic effects, TiO₂ is widely used in paints, wastewater treatment, sterilization, cosmetics, foods, biomedical ceramics, and implanted biomaterials. Rutile is used in pigments and sunscreens. Anatase is used as an efficient photocatalyst and in printing ink. TiO₂ is commercially manufactured in large quantities around the world because it is considered to be of low toxicity [1,2]. However, the increasing use of TiO₂ has raised public concern about the potential risks to human health. For instance, TiO₂ can induce lung inflammation and brain damage [3–9]. It has become evident that particle

characteristics, including particle size, surface properties, crystal structure, and physical attributes, are important factors in cellular responses. Therefore, it is necessary to evaluate the association between the particle characteristics of TiO₂ and its biological effects.

Inflammation has been suggested as a key factor in the development of fibrosis and cancers [10]. Studies have shown that TiO₂ induces substantial, albeit transient, inflammation accompanied by significant interleukin-1 β (IL-1 β) production [6,8]. Macrophages and the IL-1 β produced by them have been suggested to play a crucial role during the early inflammatory response after exposure to TiO₂ [6,8]. The pro-inflammatory cytokine IL-1 β is involved in the initiation of inflammatory processes and thus contributes to inflammatory diseases [11]. In fact, the IL-1 β receptor antagonist anakinra has been successfully used to treat patients suffering from inflammatory diseases, indicating underlying increased IL-1 β production [12,13]. Therefore, for the development of safe novel forms of TiO₂, systematic analysis of the association between particle characteristics of TiO₂ and IL-1 β production levels and the elucidation of the mechanisms of TiO₂-induced IL-1 β production are urgently needed.

Mature IL-1 β is produced through the cleavage of inactive pro-IL-1 β precursor by caspase-1, which is activated within a large

* Corresponding authors. Addresses: The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Fax: +81 6 6879 8177 (Y. Yoshioka); Laboratory of Biotechnology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Fax: +81 6 6879 8179 (S. Nakagawa).

E-mail addresses: yasuo@phs.osaka-u.ac.jp (Y. Yoshioka), nakagawa@phs.osaka-u.ac.jp (S. Nakagawa).

¹ These authors contributed equally to this work.