

201329015A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

**脆弱な個体をも対象とした、経皮・吸入曝
露後のナノ・サブナノ素材の挙動解析とハ
ザード情報集積
(ナノリスク解析基盤の構築)**

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 26 (2014) 年 5 月

目 次

I. 研究報告	
1. ナノ・サブナノ素材の経皮・吸入曝露実態の定量解析および一般毒性・免疫毒性・臓器毒性・生殖発生毒性-----	1
大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野	研究代表者 堤 康央
2. ナノ・サブナノ素材の臓器毒性における閾値追求-----	57
大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野	研究分担者 八木清仁
3. 乳幼児・小児・成熟個体におけるナノ・サブナノ素材の脳神経系動態解析と神経薬理学的毒性評価-----	63
大阪大学大学院薬学研究科 薬物治療学分野	研究分担者 松田敏夫
4. ナノ・サブナノ素材の胎盤動態および胎盤/胎仔毒性評価-----	71
富山大学大学院医学薬学研究部 産科婦人科学教室	研究分担者 齋藤 滋
5. 乳幼児・小児・成熟個体におけるナノ・サブナノ素材の情動・認知行動毒性学的評価基盤の確立とその評価-----	75
藤田保健衛生大学総合医科学研究所	研究分担者 宮川 剛
6. ナノ・サブナノ素材の一般毒性・免疫毒性評価とインターラボ間バリデーション評価-----	85
(財)食品薬品安全センター秦野研究所 毒性部	研究分担者 桑形麻樹子
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	93
III. 研究成果の刊行物・別刷-----	95

ナノ・サブナノ素材の経皮・吸入曝露実態の定量解析および一般毒性・ 免疫毒性・臓器毒性・生殖発生毒性

研究代表者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

研究要旨

近年、ナノ素材（ナノマテリアル [NM]：少なくとも1次元の大きさが100 nm以下に制御された素材）に加え、蛋白質と同等サイズ領域のサブナノ素材（サブナノマテリアル [sNM]：1~10 nm 範囲）が開発・実用化され、我々は、NM・sNMの意図的・非意図的な経皮・吸入曝露をもはや避け得ない。一方で、NM・sNMの安全性については、ハザード情報でさえ未だ不十分であり、リスク解析に必須の曝露実態（動態 [ADME]：吸収性、その後の分布、代謝、蓄積・排泄といった細胞内・体内挙動）情報に至っては皆無に等しい。この点で申請者らは、種々のNM・sNMの物性・品質を解析すると共に、リスク解析基盤となる細胞内・体内動態と一般毒性・特殊毒性を定性・定量解析し、物性-動態-安全性の連関評価に資するナノ安全科学（Nano-Safety Science）研究を推進してきた。特に、NM・sNMが流産や胎仔発育不全など、発生毒性を呈し得ることを先駆けて明らかとしており、妊婦・胎児・乳幼児といった化学物質に対して脆弱な個体を対象として、個々の感受性及び種々の相互作用を考慮した安全性評価が必須であることを提示してきた。そこで本研究では、申請者らの独自の知見を基盤として、化粧品・食品などに含有されているNM・sNM、中でも世界的に見ても手つかずのsNMに着眼し、脆弱な個体をも対象とした、経皮・吸入曝露後の挙動解析とハザード情報の集積を通じて、ナノリスク解析基盤の構築を図った。平成25年度の当初計画では、NM・sNMについて、①分散・凝集状態といった物性・品質を加味しつつ、従来までの体内吸収性・組織分布のみならず、蓄積・代謝・排泄・分解などの動態解析、②単回・反復投与による一般毒性発現における閾値の追求と毒性発現メカニズムの解明、③投与経路による動態・ハザードの違いも考慮しつつ、胎盤・胎仔・母乳・乳幼仔における動態解析と、妊婦・胎仔・乳幼仔への閾値追求および次世代影響評価、④雄親曝露の次世代影響評価、⑤NM・sNMに対する免疫応答（アレルギー応答、NM・sNMに対する抗体産生など）といったナノ免疫毒性評価、⑥OECD対応や実用化NM・sNMの安全性評価の推進を目指した。その結果、①に関しては、①10 nmのサブナノ金は、30~90 nmのナノ金と比較して、静脈内投与後の血中滞留性が高く、腎排泄されにくいこと、②凝集したサブナノ金は、分散状態と比較して血中滞留性が低いこと、③サブナノ銀は経鼻投与後に、嗅球を介して脳に移行し得ることを見出した。また、④フローサイトメーターや誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を用いることで、in vitro、in vivoにおいて、NM・sNMの蓄積・代謝・排泄を評価し得る方法を構築した。②に関しては、⑤ナノ・サブナノシリカの急性毒性について、粒子径30~100 nmのナノシリカでは補体の活性化を介した体温低下が誘発される一方で、粒子径10 nmのサブナノシリカでは、体温低下を伴わない激しい凝固異常を呈することを見出し、粒子径10 nm付近に急性毒性発現メカニズムの境界が存在することを見出した。また、粒子径の減少に伴い致死毒性は増大し、急性毒性発現の閾値は低下することが明らかとなった。③に関しては、⑥サブナノ銀を母体に静脈内・経口投与した場合、投与量の約1%（静脈内投与の場合）、約0.1%（経口投与の場合）が母乳に移行すること、⑦粒子径が小さいほど、母乳に移行しやすい一方で、同じ粒子径のサブナノ金では母乳に移行せず、素材によっても母乳・乳幼仔への移行性が異なること、⑧静脈内・経口投与など、母体への投与経路の違いにより、サブナノ銀の母体血中から母乳への移行率が大きく異なり（経口投与の場合、静脈内投与と比較して、母体血中から母乳への移行率が約20倍高い）、曝露経路毎のハザード解析が今後必須であること、⑨母体のサブナノ銀曝露により、母乳を介して乳幼仔に移行すること、

⑩乳幼仔において、サブナノ銀の腸管吸収性は成体と比較して10倍高いことなど、脆弱な個体を対象とした動態・ハザードを明らかとした。④に関しては、⑪ナノシリカの雄親曝露により、次世代の仔の記憶能力が低下するなど、認知異常が誘発される可能性を見出した。⑤に関しては、⑫サブナノ金やサブナノ銀の経皮曝露により、粒子に対する獲得免疫が誘導される可能性を見出した。⑥に関しては、⑬OECDの安全性評価におけるサンプルとして推奨されているNanocomposix社製のナノ・サブナノ銀を用い、経皮曝露における局所刺激性および経皮吸収性について評価した。以上のように、特に、「こどものナノ安全科学」や「こころのナノ安全科学」における新規知見を多く見出し、平成25年11月27日(水)に厚労省で開催されたナノ研究者意見交換会でも話題になったように、動物実験でNM・sNMの未知影響を追跡した点での貢献が極めて大であるなど、当初目標を超える特筆すべき成果が得られた。本研究は、安全なNM・sNMの開発支援を通じて、国民が安心して恩恵を最大限に享受でき、一方で、我が国のナノ産業を育成・発展させるなど、NM・sNMの社会受容の促進（Sustainable Nanotechnologyの発展）にも貢献するものである。また本研究の成果は、NM・sNMのリスク管理やレギュレーションの策定といった厚生労働的視点、さらに、OECD対応などによる国際貢献の点で、責任のある先進国・知財技術立国・健康立国としての我が国の発展に資するものである。

A. 研究目的

20世紀以降、科学技術の発展を基盤として産業化/工業化が進展することで、大量生産、大量消費の社会を生み出し、我々人類の生活水準は格段に向上してきた。そして、21世紀における現在でも科学技術の発展はとどまることなく、人類の生活の質の向上に向けて、様々なテクノロジーが開発されている。特に近年では、革新的なナノテクノロジーの進展も相俟って、ナノ素材（ナノマテリアル[NM]:少なくとも1次元の大きさが100 nm以下に制御された素材）に加え、蛋白質と同等サイズ領域のサブナノ素材（サブナノマテリアル[sNM]:1~10 nm範囲）が開発・実用化され、我々は、NM・sNMの意図的・非意図的な経皮・吸入曝露をもはや避け得ない。NMは、例えば、カーボンナノチューブやフラーレンといった新素材や、ナノシリカやナノ酸化チタンなどの従来から使用されてきたサブミクロンサイズ（数百 nm~数十 μm）以上の素材を、直径100 nm以下に微小化したものが開発されている。NM・sNMは、その粒子径の微小化に伴い比表面積が劇的に増大した結果、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材に比べて、電気的・磁氣的・光学的特性や組織浸透性などが飛躍的に向上する。そのため、これら特有の機能を活かし、既に化粧品・医薬品・食品・電子部品など、様々な産業分野の製品に実用化されている。例えば、化粧

品のファンデーションや紫外線遮蔽剤としてそれぞれ利用されている非晶質シリカや酸化チタンは、粒子径を微小化することによって使用感や紫外線遮蔽能を向上させることが可能であるため、粒子径の微小化が一層進んでいる。また、非晶質ナノシリカは化粧品だけではなく、食品添加物やインク、建築材料としても使用されている。すなわち、NM・sNMは高度な生活水準を誇る現代人にとってもはや必要不可欠な存在となっており、今後も分野を問わずあらゆる領域で、その使用拡大やさらなる有効活用が期待されている。

その一方で、昨今の人々の健康に対する関心の高まりもあり、NM・sNMの安全性評価や安全性確保がより一層待望されている。さらに、細胞・動物実験レベルではあるものの、NM・sNMが我々の意図しない生体影響を誘発する可能性が疑われている。例えば、カーボンナノチューブが、マウスモデルにおいてアスベストと同様に悪性中皮腫発症の危険性を有することや、ナノ酸化チタンを経鼻曝露したマウスの脳内で酸化ストレス応答が誘発される可能性など、各種NM・sNMについて、続々と生体影響が報告されている。従って、我々の生活環境に既に浸透しているNM・sNMとヒトの健康を取り巻く現状を踏まえると、今後も人類が健康で質の高い生活を謳歌するためには、NM・sNMの安全性情報の収集を図り、安全性を確保することは必要不可欠である。一方

で、科学的根拠に乏しいまま、NM・sNMの有害性情報が独り歩きし、これを根拠に欧米各国がOECDなどに働きかけ、その開発と実用化の規制をスタートさせようとしているが、これは闇雲に社会的・産業的不安をあおることにもつながり、最終的にはNM・sNMの社会拒絶を引き起こしてしまいかねない。すなわち、曝露実態情報とハザード情報の集積により、科学的根拠に基づいたリスク評価・管理を実施せねばならない。特に、老若男女を問わず、NM・sNMに意図的・非意図的に曝露されている現状を鑑みると、妊婦・胎児・乳幼児といった脆弱な個体を対象とした安全性評価をも通じて、適切な閾値（無影響量；NOEL、無毒性量；NOAEL、最小毒性量；LOAEL、耐容一日摂取量；TDIなど）を追求する必要がある。さらにNM・sNMの粒子径・形状・表面性状・蛋白結合性・純度・分散/凝集状態といった物性・品質を加味した安全性評価により、安全性を高度に担保可能な物性・品質をも見出すことで、第一義的な国民の健康環境の確保と共に、NM・sNMの恩恵を社会（国民・産業界）が最大限に享受できるように、全力を尽くす必要がある。

近年、本邦を始めとする多くの先進諸国で、流産・超早産・先天異常が飛躍的に増加すると共に、超未熟児として産まれた乳幼児の多くに、自閉症や多動症といった「こころ」の発達障害や、メタボリックシンドロームなどの代謝障害が後天的に頻発するなど、少子高齢化社会の大きな社会問題となっている。本観点から、妊婦・胎児・乳幼児といった化学物質に高感受性の集団に対する安全性評価の重要性が世界的に指摘されており、化学物質の次世代影響に関する疫学研究である、「子供の健康と環境に関する疫学調査」、所謂、エコチル調査と共に、化学物質の発生毒性が動物実験により多く検討されている。一方で、NM・sNMの発生毒性に関する知見は、ディーゼル粒子などを除き、我々のグループが推進しているに過ぎず、まさに世界を牽引している。すなわち、感受性の違いを考慮したリスク管理を実現する

ためにも、「こどものナノ安全科学」とも言うべき、妊婦・胎児・乳幼児に焦点を絞った、NM・sNMの発生毒性・次世代影響に関する科学的根拠・情報の収集と、そのリスク評価はまさに緊急の課題と位置付けられている。さらに世界保健機構（WHO）は、上述した「こころ」の発達障害の増加も相俟って、2020年には鬱病が罹患疾患の第2位になると予測している。近年の疫学調査からも、妊娠期・乳児期の化学物質曝露が、次世代の情動・認知機能異常を誘発することは明確であり、NM・sNM曝露と情動・認知機能異常の因果関係の解明を目指した「こころのナノ安全科学」の推進が強く求められている。本観点から我々はこれまでに、sNMにも先駆けて注目し、経皮・吸入（経鼻【経口腔・経気道を含む】）・経口曝露後の定性・定量的な動態情報を収集すると共に、脆弱な個体に対する影響を含め、他に類を見ないハザード情報の収集による閾値探求を図るなど、ナノ安全性研究において国内外を問わずパイオニアとなっている。以上の研究基盤を礎にして、本研究では、化粧品・食品などに含有されているNM・sNM（特にsNM）の、妊婦・胎児・乳幼児といった脆弱な個体をも対象としたナノリスク解析基盤の構築を目的に、物性・品質（粒子径・形状・表面性状・分散/凝集状態など）や、曝露経路毎の体内動態・ハザードの違いを考慮しつつ、①胎盤・胎仔・母乳・乳幼仔などへの分布・蓄積や、排泄・分解をも含めた、経皮・吸入曝露実態（動態）を定量解析すると共に、②一般毒性や免疫毒性（無機物に対する抗体産生を我々が初めて観察）・遺伝毒性といった特殊毒性は勿論のこと、次世代影響評価や情動・認知行動解析による、「こどものナノ安全科学」・「こころのナノ安全科学」とも言うべきハザード情報集積基盤手法を開発し、NM・sNMの物性・品質-動態-生体影響との関連追求・閾値追求を図るものである。

B. 研究方法

1. ナノ・サブナノマテリアル

非晶質シリカは Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany) より購入した。ナノシリカは、一次粒子径が 100 nm (nSP100、濃度: 50 mg/ mL)、70 nm (nSP70、濃度: 25 mg/ mL)、50 nm (nSP50、濃度: 25 mg/ mL)、30 nm (nSP30、濃度: 25 mg/ mL)、10 nm (nSP10、濃度: 25 mg/ mL) のものを使用した。また、nSP70 の表面をカルボキシル基修飾したもの (nSP70-C、濃度: 25 mg/ mL)、アミノ基で修飾したもの (nSP70-N、濃度: 25 mg/ mL) も用いた。さらに対照として、1000 nm (mSP1000、濃度: 50 mg/ mL)、300 nm (nSP300、濃度: 50 mg/ mL) のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。また、細胞内移行量の検討などについては、蛍光修飾されたシリカ粒子を用いた。本検討では、Micromod 社 (Micromod Partikeltechnologie GmbH, Germany) の非晶質シリカ分散液を用いた。ナノ銀粒子は、nano Composix 社 (San Diego, CA) より購入した。銀粒子は、表面をクエン酸修飾した、粒子径が 10 nm (nAg10、濃度 1.0 mg/mL)、50 nm (nAg50、濃度 1.2 mg/mL)、100 nm (nAg100、濃度 1.0 mg/mL) のものを使用した。さらに、銀粒子分散液中に含まれる銀イオンの影響を加味するため、銀イオンとして、硝酸銀 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) を用いた。なお、以後の検討では、使用直前に粒子分散液を 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。非晶質ナノシリカについては、ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) による 5 分間の超音波処理も実施した。

2. 実験動物

BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性)、妊娠 13 日目の BALB/c マウス (8-10 週齢、雌性)、Nc/Nga slc マウス (6-8 週齢、雌性) は、日本 SLC より購入した。また、本研究における動物実験の飼育および

実験は医薬基盤研究所の実験動物施設において行い、医薬基盤研究所・大阪大学動物実験規定に準じた。

3. 誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) による各脳領域中の銀量の測定

C57BL6/J マウス (8 週齢、雄性) に、glucose 溶液で 0.25 mg/mL に調製した nAg10 を片鼻 10 μ L ずつ (5 μ g/mouse/day)、最大 28 日まで連日経鼻投与した。また、硝酸銀水溶液 (Ag^+) は、 AgNO_3 を nAg と同じ溶媒を用い、銀重量を基準に濃度を調整後、同投与量で投与した。対照群には 5% glucose 溶液を投与した。最終投与 24 時間後に、ペントバルビタールによる麻酔下で脱血死させ、各脳領域 (嗅球、黒質、線条体、小脳、その他) を摘出し、群ごとにプールした。これらの組織をテフロン製分解容器に採取し、硝酸 1 mL、過酸化水素 1 mL を加え、マイクロウェーブ分解装置 ETHOS One (Milestone General K.K., Kanagawa, Japan) により酸分解した。分解液を水で 10 mL とし、これを試料溶液とした。分解後の試料溶液 3 mL に、内標準として 0.2 μ g/mL のロジウム・タリウム溶液 30 μ L を加えた。この試料溶液中の銀濃度を誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Inc., California, USA) を用いて分析した。なお、分析条件は、試料導入速度: 1.0 mL/min、プラズマガス: アルゴン 15 L/min、キャリアーガス: アルゴン 0.75 L/min、メイクアップガス: アルゴン 0.3 L/min、リアクションガス: ヘリウム、とし、測定質量数は 103 (ロジウム)、107 (銀)、195 (白金)、205 (タリウム) とした。また、0.1-20 μ g/L 範囲の銀溶液 10 mL に内標準として 0.2 μ g/mL のロジウム・タリウム溶液 0.1 mL を加えたものを検量線溶液として用いた。

4. HE 染色による病理学的解析

C57BL6/J マウス (8 週齢、雄性) に、nAg10 も

しくは Ag^+ を 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ で 28 日間連日経鼻投与した。対照群には 5% glucose 溶液を投与した。最終投与 24 時間後に、ペントバルビタールによる麻酔下で脱血死させ、脳を摘出し、すぐに 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。EDTA で脱灰後、パラフィンブロックを作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色 (HE 染色) を実施した。パラフィン切片をキシレンで脱パラフィン、エタノールで脱水処理し、水洗後、ヘマトキシリンに 15 分浸漬し、再度水洗した。この切片をエオジンに 1 分間浸漬した後、再度エタノールで脱水、キシレンで透徹処理後、封入した。切片の作成から所見の作成は、アプライドメディカルリサーチに依頼した。

5. Western Blotting による Tyrosine hydroxylase の発現評価

C57BL6/J マウス (8 週齢、雄性) に、 $nAg10$ もしくは Ag^+ を 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ で 28 日間連日経鼻投与し、最終投与 24 時間後に嗅球を摘出した。摘出したサンプルは、ホモジナイズし、蛋白質を回収した。各試料 5 μg と 5% 2-mercaptoethanol (Nacalai tesque; Kyoto, Japan) 含有 Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA) を等量混合し、95°C で 5 分処理した後、各サンプルを 10-20% e-PAGEL (Atto; Tokyo, Japan) に添加した。Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) は、ゲル 1 枚当たり 14 mA で 10 分間電気泳動した後、40 mA の定電流で 1 時間電気泳動した。なお、分子量マーカーとして Precision Plus Protein Kaleidoscope molecular weight markers (Bio-Rad Laboratories)、および MagicMark Western Standard (Invitrogen; Carlsbad, CA) を用いた。電気泳動後のゲルを PVDF 膜 (Millipore, Billerica, MA) に、ゲル 1 枚当たり 50 mA の定電流で 1.5 時間転写し、4% Block Ace/PBST (0.1% Tween 20 を含む Phosphate Buffered

Saline) を添加して 2 時間ブロッキングした。4% Block Ace /PBST で 1000 倍希釈した anti-tyrosine hydroxylase antibody (Millipore) を添加し、緩やかに振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、4% Block Ace /PBST で 50000 倍希釈した goat anti-rabbit IgG antibody, peroxidase conjugated (Millipore) を添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。洗浄後、PVDF 膜を SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific; Hudson, NH) で処理し、発光像を ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare) により撮影した。なお、内在性コントロールとして、 β -Actin の発現を評価した。 β -Actin の発現評価には、一次抗体として Monoclonal Anti- β -Actin antibody (sigma aldrich)、二次抗体として goat anti-rabbit IgG antibody, peroxidase conjugated (Millipore) を用いた。さらに、Image J を用い、Tyrosine hydroxylase、および、 β -Actin のバンド強度を解析し、Tyrosine hydroxylase のバンド強度を β -Actin のバンド強度で標準化することで、Tyrosine hydroxylase の発現量を半定量化した。

6. 金ナノ粒子の体内動態評価

BALB/c マウス (6 週齢、雄性) を清水実験材料より購入した。 $nAu10$ 、 $nAu30$ 、 $nAu50$ 、 $nAu70$ 、 $nAu90$ をそれぞれ 4 mg/kg で静脈内投与し、投与 1、2、4、8、12、24 時間後に血液を回収した。また、投与直後から 24 時間後までの尿を回収した。回収した血液または尿に含まれる金の量を誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) 解析により定量した。さらに、静脈内投与を行ったマウスに関しては、24 時間後の血液を用い、血球検査および血液生化学検査 (ALT、AST、BUN) を行った。

7. 母乳の回収

尾静脈内投与においては 27G の注射針を用いて、nAg 溶液を 1.5 mg/kg、0.5 mg/kg、0.17 mg/kg で、nAu10 を 1.5 mg/kg で投与した。経口投与においてはゾンデを用いて、nAg 溶液を 10 mg/kg で強制経口投与した。Ag⁺の投与は、AgNO₃ を nAg と同じ溶媒を用いて、銀重量として nAg と同じ投与量となるように調製したものをを用いた。母体と乳幼仔を、別々のケージに互いの姿が見えるよう 5 時間以上隔離した。隔離時間は母乳の再吸収が始まる 16 時間までとした。母体に生理食塩水（株式会社大塚製薬工場）で 1.8 mg/mL に調製したオキシトシンを 50 μL/mouse で皮下投与した。投与後、直ちに実験動物用搾乳装置を用いて、吸引圧力-120 mmHg、拍動数 60 Pulse/min、拍動比 70 %で鼠径部（後肢側の乳頭）より 10 分間搾乳した。

8. nAg の授乳期曝露が母体及び乳幼仔へ与える影響評価（一般毒性評価）

妊娠 13、14 日の BALB/c マウス（11-13 週齢）を日本 SLC より購入した。出産日を PND0 とし、PND0 から PND20 まで、1 日 1 回、nAg10 もしくは Ag⁺を 0.5、0.1、0.02 mg/kg で母獣に強制経口投与し、母乳育児させた。PND0 から PND21 まで母体体重を連日測定すると共に、摂餌量を測定した。また、乳幼仔体重を経過的に測定すると共に、PND0、7、14、21 に解剖し、PND7、14、21 に、血球検査(白血球・リンパ球・顆粒球・好中球・赤血球・ヘモグロビン・ヘマトクリット・赤血球容積・赤血球色素量・赤血球色素濃度・赤血球分布・血小板・血小板容積・血小板分布)すると共に、ICP-MS 解析により血中 Ag 濃度を測定した。また、PND21 に血球検査後、血漿を回収し生化学検査(ALT、AST、BUN)に供した。さらに、PND21 に母体にオキシトシンを 1.8 U/mouse で皮下注射した後、鼠径部から搾乳した。その後、母体を解剖し、臓器重量測定、血球検査、生化学検査に供した。回収した母乳は、蛋白質量、脂質量の測定に供した。

9. 細胞から排出されるシリカ量の定量

6 well plate に 3×10⁵ cells/ 3 mL/ well で細胞を播種し、37℃、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で 24 時間培養した。緑色蛍光 (FITC) 修飾を施した各シリカ粒子 (nSP70、nSP300、mSP1000) を 15 分間、ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY で超音波処理した後に、ポルテックスし、25 μg/mL に血清非含有培地 (D-MEM、1% antibiotics) を用いて希釈し、3 mL ずつ各 well に添加し、37℃、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で、2 時間培養した。その後、培養上清を除去し、PBS で細胞を 3 回 wash し、シリカ非含有、血清含有培地を 3 mL 添加した。その後、0、3、6 時間後に細胞を 0.2mM EDTA 入り Trypsin 溶液にて剥がし、400 μL の FACS buffer (2% FBS, 0.05% アジ化ナトリウム in PBS) で再懸濁した。アルミホイルで遮光し、氷上に保存しておき、測定前に 5 μL の 7-ADD を添加した。測定直前に FACS チューブ (BD) に細胞懸濁液を通し、細胞塊などを取り除き、FACS calibur フローサイトメーター (BD) にて 7-AAD と FITC の蛍光強度を測定し、死細胞の割合および細胞内のシリカ量を算出した。細胞内のシリカの排出は、シリカ入りの血清非含有培地で 2 時間の培養が終了した時点の細胞の蛍光強度を 100%として、0、3、6 時間後の細胞内の蛍光強度を比較した。

10. シリカの排出経路の解明に向けた検討（阻害剤）

6 well plate に 3×10⁵ cells/ 3 mL/ well で細胞を播種し、37℃、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で 24 時間培養した。緑色蛍光 (FITC) 修飾を施した各シリカ粒子 (nSP70、nSP300、mSP1000) を 15 分間、ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY で超音波処理した後に、ポルテックスし、25 μg/mL に血清非含有培地を用いて希釈し、3 mL ずつ各 well に添加し、37℃、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で、2 時間培養した。その後、

培養上清を除去し、PBS で細胞を 3 回 wash し、20 μ M のサイトカラシン D、あるいは 100 μ M のクロロキンを添加した血清含有培地を添加した。その後、0、6 時間後に細胞を 0.2mM EDTA 入り Trypsin 溶液にて剥がし、400 μ L の FACS buffer で再懸濁した。アルミホイルで遮光し、氷上に保存しておき、測定前に 5 μ L の 7-ADD を添加した。測定直前に FACS チューブ (BD) に細胞懸濁液を通し、細胞塊などを取り除き、FACS calibur フローサイトメーター (BD) にて 7-AAD と FITC の蛍光強度を測定し、死細胞の割合および細胞内のシリカ量を算出した。

11. 雄親曝露に着目したナノマテリアルの次世代影響評価

BALB/c マウス (10 週齢、清水実験材料) に、nSP30 を 1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日 1 回、1 日おきに 4 回静脈内投与した。対照群には生理食塩水を投与した。最終投与 35 日後に、雄親の体重を測定すると共に、精巣・精巣上体・精嚢重量を測定し、さらに、精巣上体中の精子を 7-AAD を含む buffer にて懸濁した後、その生存率をフローサイトメーターにより評価した。また、最終投与 35 日後から 4 日間、無処置の雌マウス (9 週齢、清水実験材料) と同居させた際の交配成功率 (妊娠した雌マウスの数/交配させたマウスのペア数) を算出すると共に、出生仔数、出生仔の体重、雄仔の割合を測定した。出生後の体重を経過的に測定すると共に、各群の 4 週齢時の体重に対する成長率を算出した。

12. ナノシリカの経皮投与が経皮抗原感作に与える影響評価

投与開始の前日に 6 週齢の NC/Nga slc マウス (雌性) の上背部の毛を Epilat (Klacie) により除毛し、すぐに蒸留水に浸したティッシュペーパーで優しく洗い流した。その後は day20-24 の間に追加で一回、計 2 回除毛処理を実施した。NC/Nga slc マウス (雌性 6 週齢) の両耳介の内側、およ

び除毛した上背部に、ヤケヒョウダニの抽出抗原 (*Dermatophagoides pteronyssinus* Crude Extract: Dp, コスモバイオ) (Dp; 125 μ g/mL)、ニワトリ卵白アルブミン (OVA: sigma aldrich)、またはウシ血清アルブミン (BSA: sigma aldrich) を単独、あるいは、Dp、OVA、または BSA と 30 nm の非晶質ナノシリカ (nSP30)、またはその表面をカルボキシル基により修飾した 30 nm の非晶質ナノシリカ (nSP30-C) の混合溶液 (抗原; 125 μ g/mL、ナノシリカ; 12.5 mg/mL) としてそれぞれ 20 μ L/ear、80 μ L/back で塗布した。また、塗布は 1 日、もしくは 2 日おきに週 3、4 週間塗布した (計 13 回塗布)。一部の実験においては、Dp と nSP30 を混合せずに、24 時間間隔でそれぞれを別個に塗布することを一セットとし、これを連続、もしくは 1 日おきに 4 週間、13 セット行った。なお、上背部への塗布は、塗布前に 70 %エタノールで軽く皮脂及び残存しているサンプルをふき取った後に行った。最終投与の 24 時間後、血液・脾臓細胞を回収した。血漿中の各種抗体価は、ELISA 法により total IgE、Dp 特異的 IgE、IgG、IgG1、IgG2a を測定した。また、脾臓細胞を用いて、抗原特異的 IFN- γ 、IL-4 産生細胞数を ELISPOT 法により測定した。また、各塗布サンプル中の粒子の性状に関して、透過型電子顕微鏡による観察、ならびに動的光散乱法による粒径の評価を実施した。

13. In vitro における、粒子サイズに着目した非晶質ナノシリカの免疫毒性評価

ヒト単球細胞株 (THP-1) を 96 穴プレート (NUNC) に 3.0×10^4 cells/well で播取し、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を 0.5 μ M で添加し、24 時間培養した。その後 10、30、50、70、100、300、1000 nm の非晶質シリカ (順に nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000) を 5、15、45、135、405 μ g/ml、コントロールとして結晶質シリカ (非晶質シリカと同濃度)、または LPS (1 μ g/ml) を

添加し、24 時間培養した。その後上清を回収し、ELISA 法によって炎症性サイトカインである TNF- α (ebioscience)、IL-1 β (BD bioscience) を計測した。

14. In vitro における、粒子サイズに着目した非晶質ナノシリカの免疫毒性評価

nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000 と結晶質シリカを 1 mg/200 μ l、C57BL/6 マウスに腹腔投与した。24 時間後に等張の PBS を 2 ml 投与し、腹腔洗浄液を回収した。腹腔洗浄液中の細胞数を NucleoCounter により計測し、腹腔浸潤細胞数とした。また、洗浄液を遠心後、その上清中の IL-6 産生量を ELISA 法 (BD bioscience) によって計測した。

15. 非晶質ナノシリカによる急性毒性にナノシリカの粒子径が与える影響

C3H/HeN マウス (雌性、10 週齢、Japan SLC、Japan) に PBS で希釈した nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000 (nSP10~70 : 17.5、35、70 mg/kg、nSP100 : 35、70、140 mg/kg、nSP300~mSP1000 : 70、140、280 mg/kg) をそれぞれ尾静脈より投与した。また、対照群には PBS を投与した。投与後から 15 分毎に 60 分まで直腸体温の測定を行うとともに、投与 24 時間後に各群の生存率を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を避け得なかったが、動物愛護の精神を遵守しつつ実施した。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文科省の指針)」に準拠し、大阪大学および大阪大学薬学研究科、(独) 医薬基盤研

究所等の各所属機関の動物実験規程に則り実施した。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属機関の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受けた。さらに本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月、厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」(基発第 0207004 号)【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第 0331013 号) が通達】、2009 年 3 月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進した。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考 察

1. 経鼻曝露による脳移行性評価

近年、環境中微粒子曝露が呼吸器・循環器疾患のみならず、脳疾患の危険因子となり得ることが疫学研究により報告されている。その一方で、NM・sNM の開発・実用化に伴い、環境中微粒子のみならず、NM・sNM への曝露機会が増大している。すなわち、我々は環境中微粒子のみならず NM・sNM への様々な経路での曝露を避けられない状況にある。NM・sNM への曝露環境の 1 つとして、労働環境中での曝露が考えられる。例えば、労働環境中で高濃度のマンガンの化学物質を吸入曝露することで鼻腔を介して脳に移行して神経症状をもたらす可能性が報告されていることから、NM・sNM のように微小な素材を吸入曝露した際にも、脳にまで到達して有害反応をもたらす可能性が懸念されている。その一方で、NM・sNM 吸入曝露後の脳への動態情報・毒性情報はほぼ皆無である。そこで、NM・sNM を吸入曝露した際に鼻腔を介して脳へ直接的に移行して生体影響を引き起こす可能性を鑑み、nAg10

の経鼻曝露によりその影響を評価した。

nAg は、抗菌活性を持つ Ag^+ を徐放化し、安定的に供給できる点で、 Ag^+ よりも優れた抗菌活性を有している。nAg はこうした抗菌活性を期待して、保存容器、調理器具、タオル、マスク、歯磨き粉、制汗剤など、我々の身近にあるあらゆる製品に使用されているほか、健康食品にも適用されている。米国ウッドロー・ウィルソン国際学術センターの調べによると、2012 年における NM 含有食品・飲料（・調理用品）105 品目のうち、nAg 含有製品は 38 品目にもおよぶことが報告されており、nAg の曝露機会は増加の一途を辿っている。

まず、マウスに nAg10 および Ag^+ を単回経鼻投与し、様々な脳領域での動態を解析したところ、鼻腔に近い脳領域（嗅球）では銀が検出されたが、鼻腔から遠い脳領域では検出されなかった（図 1）。この時、嗅球への移行率を算出した結果、nAg10 投与群で 0.0038%、 Ag^+ 投与群で 0.0086% が移行していることが明らかとなった。また、28 日間連日投与後の移行性を解析した結果、嗅球のみならず、他の脳領域にも到達することが明らかとなった。そこで、嗅球中の銀残留率を算出したところ、総投与量のうち nAg10 投与群で 0.0034%、 Ag^+ 投与群で 0.0037% が残留していた。以上の結果から、nAg10 と比較し、 Ag^+ は、嗅球中に留まらず、他の領域へ移行しやすい可能性が示された。次に、nAg10 の脳内侵入性から、脳への傷害を考慮し、病理学的解析を行った（図 2）。その結果、銀の移行量が最も多かった嗅球においても、顕著な病変は認められなかった。一方で、嗅球の主な神経細胞の 1 つであるドパミン神経細胞への影響を評価するために、ドパミン神経細胞マーカー (Tyrosine hydroxylase; TH) をウエスタンブロットにより評価したところ、対照群と比較して nAg10 投与群では、約 15% 減少する一方で、 Ag^+ 投与群では、約 50% 減少することが明らかとなった（図 3）。以上の結果から、ナノ銀粒子の経鼻曝露が、ドパミン神経細胞に影響を与える可能性

が示された。

2. 金ナノ粒子の体内動態評価

本検討では、金ナノ粒子の体内動態を評価した。BALB/c マウスに nAu10、nAu30、nAu50、nAu70、nAu90 をそれぞれ 4 mg/kg で静脈内投与し、投与 1、2、4、8、12、24 時間後に血液を回収した。回収した血液を ICP-MS で解析し、血液に含まれる金の量を定量した（図 4）。その結果、いずれの粒子径の金ナノ粒子も、静脈内投与後、速やかに血中から消失することが明らかとなった。一方で、nAu10 は nAu30、nAu50、nAu70、nAu90 と比較して血中滞留性が高いことも明らかとなった。nAu10 の血中滞留性が他のサイズの粒子と比較して高かった原因として、異物を貪食する細網内皮系に nAu10 は認識されにくい可能性が考えられた。また、静脈内投与後、24 時間後までの尿を回収し、尿に含まれる金の量を ICP-MS で定量した（図 5）。その結果、いずれの粒子径の金ナノ粒子も尿中からは検出されず、いずれの粒子径の金ナノ粒子も腎排泄されにくいことが明らかとなった。さらに、24 時間後の血液を用い、血球検査および血液生化学検査 (ALT、AST、BUN) を行い、各粒子径の金ナノ粒子の一般毒性を評価した（図 6、7）。その結果、血球検査、血液生化学検査いずれの項目においても、正常値範囲を超える影響は観察されなかった。従って、今回の投与量において、金ナノ粒子は一般毒性学的な影響を誘導しないことが明らかとなった。

3. 母乳への移行性評価 1

母乳育児は母子間の愛情形成や、こどもの肥満、糖尿病などへの罹患リスクの低下につながるなどが知られるなど、栄養面以外にも、人工保育では得られない多数のメリットを有している。こうした点から、WHO とユニセフが母乳育児推進の共同声明を出しているほか、母乳の出ない母親であっても、他の母親の母乳を与える「母乳バンク」

という制度が既に世界 40 か国で普及しているなど、母乳育児は世界的に奨励されており、本国においてもその割合は増加している。一方で、母乳に PCB やダイオキシンなどの化学物質が含まれている人もいることが知られている。環境省の報告をもとにすると、母親の曝露量によっては、出生直後の乳児は、母乳を介して、耐容一日摂取量の 25 倍程度のダイオキシンを曝露してしまっていると考えられる。「こどもは小さな大人ではない」と言われるように、乳幼児は薬物や化学物質に対する感受性が高いことが知られ、例えば、乳幼児は成人と比較して代謝能力や腸管バリア、免疫機能などが未熟であり、出生後すぐの乳幼児の薬物クリアランスは成人の 1/3 程度である。そのため、母親が日常的に摂取するものから、非意図的に曝露されるものまで、化学物質が母乳を介して乳幼児に悪影響を与える例が多く知られている。このように、授乳による乳幼児の化学物質の曝露が懸念される一方で、母乳育児の有用性が認められ、世界的に授乳機会が増加し続けている現状からも、化学物質の安全性を評価するうえで、母乳を介した乳幼児への影響評価が必要不可欠であると考えられる。

以上の観点から次に、NM の授乳期曝露に着目し、乳幼児の安全性確保に向けて乳幼児の曝露実態情報を収集するため、NM の母乳移行性、および母乳を介した乳幼児への移行性に関して検討した。

本研究では、粒子径 10、50、100 nm の nAg (nAg10、nAg50、nAg100) を用いた。また後述するが、素材の違いによる動態の違いを評価する目的で、粒子径 10 nm のナノ金粒子 (nAu10) も使用した。また本検討では、静脈内投与する際には、各溶液を等張にする目的から、nAg は分散溶媒として 5 % グルコース溶液を用い、nAu10 は分散溶媒として PBS を用いたため、nAg は 5 % グルコース溶液中、nAu10 は PBS 中の物性を評価した。なお、nAg の分散溶媒に PBS を用いなかったのは、コントロールとして Ag^+ を投与して

おり、 Ag^+ を PBS に溶かすと塩が析出し、投与に支障をきたすためである。

nAg の投与により乳腺が傷害されると、乳腺細胞がバリア機能を発揮できなくなり、母乳中への透過性が変化してしまう可能性がある。従って、nAg が乳腺傷害を誘発するような条件下では、母乳移行性を正確に評価できない可能性があることから、まず、nAg の乳腺傷害性を評価した。急性的な乳腺への傷害性を評価するため、分散状態を維持して投与できる最大用量である 1.5 mg/kg (母親がサプリメントから経口摂取し得る量の 300 倍程度) の Ag^+ 、nAg10、nAg50、nAg100 を母マウスに静脈内投与し、12 時間後に乳腺を病理学的に解析した。対照群には nAg の分散溶媒であるグルコースを投与した。病理解析の結果、全個体に乳管細胞の脱落が認められた (図 8)。乳管細胞の脱落は、しばらく母乳が吸われないまま溜まり続けると起こることが知られているが、本検討では投与後に母親と乳幼児を隔離しているため、全個体で観察されたと考えられる。一方で、腺腔内の石灰化などはみられず、それ以外にも、各群に異常所見は認められなかった。本検討で用いた最大用量である 1.5 mg/kg でも乳腺組織の傷害が認められなかったため、以降では、ICP-MS における母乳移行量の定量下限値を少しでも上げるため、1.5 mg/kg 以下で、静脈内投与後の母乳移行性を評価した。

血中から母乳中への nAg の移行性を評価する目的で、出産後 3 日の授乳期マウスに、 Ag^+ 、nAg10、nAg50、nAg100 を 1.5 mg/kg で静脈内投与した。経時的に母乳を回収し、ICP-MS により母乳中銀濃度を測定した (図 9)。その結果、いずれの銀投与群においても、投与後 8 時間を最高濃度として母乳中に銀が検出され、nAg と Ag^+ が血中から母乳中へ移行することが明らかとなった。なお、分散溶媒であるグルコース投与群においては、母乳中で銀が同定されないことを確認済みである。 Ag^+ 、nAg 投与群の母乳中銀量は、母乳の全量を 1 mL と仮定すると、 Ag^+ 、nAg10、

nAg50、nAg100 でそれぞれ投与量の 1.8%、0.7%、0.4%、0.3%に相当していた。また、母乳中 AUC を算出したところ、Ag⁺、nAg10、nAg50、nAg100 でそれぞれ 6385、2020、781、463 であった。以上の結果から、nAg の粒子径が小さいほど母乳移行率が上昇すること、nAg の母乳移行率は Ag⁺と比較すると低いことが明らかとなった。一般に母乳への移行性は、母乳中 AUC と血中 AUC との比である M/P 比を指標に求められることから、M/P 比を算出するために血中銀濃度を測定した。その結果、いずれの nAg も Ag⁺と比較して、静脈内投与後、速やかに血中から消失することが明らかとなり、nAg と Ag⁺では血中での動態が大きく異なる可能性が示された。また、血中 AUC を算出したところ、Ag⁺、nAg10、nAg50、nAg100 でそれぞれ 50607、13890、12853、11880 であった。母乳中 AUC と血中 AUC の結果から M/P 比を算出したところ、Ag⁺、nAg10、nAg50、nAg100 でそれぞれ 0.13、0.15、0.06、0.04 であり、nAg10 と Ag⁺は同程度の値であった。従って、血中濃度が等しい場合には、nAg10 と Ag⁺の母乳移行性は同等であると考えられた。また、M/P 比が nAg の粒径の減少に伴い増加したことから、nAg は粒径が小さくなるほど、血中から母乳中へ移行しやすい可能性が明らかとなった。

次に、nAg の母乳移行性について用量依存性を評価するため、出産後 3 日の授乳期マウスに Ag⁺、nAg10 を 1.5 mg/kg、0.5 mg/kg、0.17 mg/kg で静脈内投与した。投与後 4 時間の母乳中銀濃度を測定した結果、Ag⁺投与群、および nAg10 を 1.5 mg/kg、0.5 mg/kg で投与した群では母乳中濃度が投与量依存的に増加していた (図 10)。また、母乳移行率も nAg10 を 1.5 mg/kg、0.5 mg/kg で投与した群ではそれぞれ 1%程度、Ag⁺投与群ではそれぞれ 2%程度と、濃度によらずほぼ一定であった。

次に、素材による母乳移行性の違いを評価する目的で、nAu10 を 1.5 mg/kg で静脈内投与し、

4 時間後の母乳中金濃度を測定した。その結果、母乳中、血中共に金は同定されなかった。なお、nAg と nAu の検出下限 (母乳 100 ng/mL、血液: 2 ng/mL) は同一である。nAg が母乳中で認められた投与量・時間と同一の検討で金が母乳中で検出されなかったことから、同じ大きさの粒子であっても、素材により母乳移行性を含めた体内動態が大きく異なる可能性が示された。

4. 母乳への移行性評価 2

次に、現実の曝露実態を加味した母乳移行性を評価する目的で、母親に経口投与した際の母乳移行性についても検討した (図 11)。出産後 3 日の授乳期マウスに nAg10 を単回経口投与後、投与 4、8、12 時間後に母乳中、血中の銀濃度を測定した。nAg の投与量については、母乳移行性を評価するうえで、少しでも検出感度を上げる目的から、分散状態を維持して投与できる最大用量である 10 mg/kg (サプリメントとして経口摂取し得る量の 2000 倍程度) とした。その結果、母乳中、血中共に銀が検出され、nAg10 が経口投与後、血中のみならず母乳中へ移行することが明らかとなった。また、血液の全量を体重の 7.3%、母乳の全量を 1 mL と仮定し、母乳中・血中の最大銀濃度が投与量の何%にあたるかを算出した。その結果、経口投与した際の血中最大銀濃度は、投与量の 0.06%に相当する一方、母乳中最大濃度は投与量の 0.08%に相当していた。従って、血中に移行した nAg10 の多くが母乳中へ移行した可能性が考えられた。また、今後、より短い時間での血中濃度・母乳中濃度の測定が必要ではあるものの、nAg10 の経口投与時の母乳移行性の指標として、母乳中 AUC と血中 AUC の結果から M/P 比を算出した。その結果、nAg10 の母乳中 AUC は 2101、血中 AUC は 734、M/P 比は 2.86 となった。静脈内投与した際の nAg10 の M/P 比が 0.15 であった一方で、経口投与した際には M/P 比が 2.86 に上昇していた。従って、経口投与後に血中移行した nAg は、静脈内投与された nAg と比較して、

血中から母乳へ移行しやすくなる可能性が示された。

5. 乳幼仔への移行性評価 1

母親が nAg を静脈内投与された際の、nAg の母乳を介した乳幼仔への移行性を評価した。出産後 3 日の授乳期マウスに Ag⁺、nAg10、nAg50、nAg100 を 1.5 mg/kg で静脈内投与した後、母乳育児させた。投与後 12 時間、24 時間、72 時間に、仔の血中銀濃度を測定した。その結果、いずれの銀投与群の乳幼仔の血中からも銀が検出され、親が曝露した nAg を、乳幼仔が母乳を介して曝露する可能性が示された (図 12)。投与後 12 時間、24 時間で母乳移行率は、静脈内投与における母乳移行率と同様に、Ag⁺、粒径の小さい nAg 粒子の順に大きかった一方で、投与後 72 時間では nAg10、nAg50 の移行率が Ag⁺の移行率を上回っていた。このことから、nAg10 や nAg50 が Ag⁺と比較して母乳中に残留しやすく、投与 24 時間後や 72 時間後では母乳中濃度が Ag⁺と比較して高くなっている可能性が考えられる。さらに、静脈内投与した際に、母乳中への移行量は投与後 12 時間において、Ag⁺の方が nAg よりも 2 倍以上多かった一方で、乳幼仔への移行量は、Ag⁺、nAg10、nAg50 で同等であったことから、nAg10 と nAg50 は Ag⁺と比較して、乳幼仔に吸収されやすい、もしくは排泄されにくい可能性が考えられた。

6. 乳幼仔への移行性評価 2

次に、現実の曝露実態を加味し、nAg の母乳を介した乳幼仔への移行性を評価するため、授乳期マウスに Ag⁺と nAg10 を出産日から 2 週間連続で経口投与し、投与期間を通じて母乳育児させた (図 13)。投与量は、本検討では現実の曝露量を加味して乳幼仔へのハザードも評価するため (ハザード評価に関しては現在進行中である)、現実で想定される曝露量に安全係数の 100 を乗じた 0.5 mg/kg (サプリメントとして経口摂取し得る

量の 100 倍程度) を最大用量に、0.1 mg/kg (摂取し得る量の 20 倍程度)、0.02 mg/kg (摂取し得る量 4 倍程度) とした。2 週齢の乳幼仔の血中銀濃度を測定した結果、いずれの群においても乳幼仔の血中に銀が同定され、母親に経口投与した際にも、nAg10 と Ag⁺が母乳を介して乳幼仔へ移行する可能性が示された。また、乳幼仔の血液量を体重の 7.3%と仮定し、乳幼仔への移行率(親への総投与量の何%が乳幼仔の血中で同定されたか)を算出したところ、nAg10 の 0.5 mg/kg、0.1 mg/kg、0.02 mg/kg 投与群においては、それぞれ総投与量の約 0.003%、0.008%、0.018%、Ag⁺投与群においては、それぞれ総投与量の約 0.004%、0.005%、0.014%であった。従って、nAg10 や Ag⁺の乳幼仔中の残留率は、高用量ほど減少する可能性が示された。本検討においても、静脈内投与での乳幼仔への移行性の検討と同様に、乳幼仔の血中銀濃度は nAg10 と Ag⁺で同等であった。従って、この時の母乳中銀濃度をまず測定する必要はあるものの、Ag⁺の方が nAg10 と比較して血中移行後に母乳中へ多く移行するというデータから考えると、nAg10 は Ag⁺と比較して、①母乳中での残留性が高い可能性、②乳幼仔に吸収されやすい可能性、③乳幼仔から排泄されづらい可能性が考えられた。また、上記のような母乳中・乳幼仔中での ADME だけでなく、nAg10 が Ag⁺と比較して、経口投与後に母体血中へ移行しやすい可能性も考えられる。今後、nAg10 や Ag⁺の母体血中への移行、血中から母乳中への移行、新生仔の血中への移行の各段階において、用量依存性を含めて検討することで、nAg10 と Ag⁺の残留率が同程度になる原因と、高用量ほど乳幼仔への移行率が低下する原因について検討する予定である。

7. 新規細胞内動態解析技術の確立

現在、NM の細胞内動態の解析手法として、透過型電子顕微鏡 (TEM) や共焦点顕微鏡が汎用されている。しかし、TEM による局在解析では、細

胞を固定する必要があることから、NM の細胞内における運動をリアルタイムで評価することは不可能である。また、蛍光修飾した NM を用いた共焦点顕微鏡による挙動解析は、リアルタイムで評価可能である一方で、NM の微小さゆえに感度が十分ではないことから、1 粒子単位で NM の細胞内挙動を詳細に評価することは困難であることを確認している。従って、細胞内における NM 1 粒子単位の運動を詳細に追跡可能な、新たな評価手法の確立が求められている。そこで我々は、細胞内における蛋白質の 1 分子イメージングを可能とする新規蛍光顕微法として注目が集まりつつある、薄層斜光照明顕微法 (highly inclined laminated optical sheet; HILO) に着目した。様々な照明法があるものの、従来の落射照明顕微法は、観察部位以外の蛍光も励起してしまい、バックグラウンドが高く、高感度に観察部位の蛍光を観察することができない。また、全反射顕微鏡は、その性質上、ガラス面に近い(200 nm 以内)、細胞膜近傍の蛍光しか観察できないことから、細胞内の観察には適していない。一方で HILO 法は、細胞質、核内を、落射蛍光顕微法と比べて約 8 倍の感度で観察可能であるという利点を有している。以上の観点から、HILO 法を用いた 1 粒子単位での細胞内挙動の観察、すなわち、細胞内 1 粒子イメージング法の確立を試みた。

本検討においては、従来までの細胞内への取込性の検討の結果、細胞内への粒子の取り込みが最も多いヒト肺胞基底上皮細胞株 (A549 細胞) を用いた。A549 細胞に蛍光修飾された非晶質シリカ (以降、蛍光シリカと表記) である nSP70、nSP300、mSP1000 を添加した。3 時間後に、細胞内に存在する蛍光シリカを HILO 法により観察した (図 14)。その結果、nSP70 は 1 細胞当たり 20 粒子以上存在し、細胞内に広く分布していた。また、nSP300、mSP1000 は nSP70 に比べて、細胞内に存在する粒子は少なく、多くの細胞で nSP300 は 1 細胞当たり 5~15 粒子、mSP1000 は 1~5 粒子しか観察されなかった。

なお、従来の共焦点顕微鏡を用いた場合、本作用濃度・作用時間においては、細胞内で nSP70 の存在は認められないことから、従来法よりも高感度にナノサイズの NM の挙動を評価可能であると考えられた。また、本実験に使用した蛍光シリカの作用濃度においては、細胞内における蛍光粒子が十分に少なく、蛍光を 1 輝点ごとに認識可能である。その輝点の蛍光強度が、1 粒子の輝点の大きさと差がないことから、細胞内の 1 つの輝点は 1 粒子であると考えている。今後、本検討と同様の条件で電子顕微鏡により観察し、細胞内に認められる粒子数を本検討の結果と比較することで、1 つの輝点がかたに 1 粒子に由来するものであることを確認する予定である。

8. 細胞外への排出経路の解析

NM・sNM の細胞内取り込み経路については、多くの検討がなされているものの、細胞内から細胞外への排出経路に関する解析は皆無に等しい。安全性を考える場合、細胞内への蓄積・滞留性が大きく影響することから、細胞外排出経路の解析は急務となっている。そこで、ナノシリカを用いて、細胞内に取り込まれた粒子がどの程度、細胞外に排出されるかについて検討した。

ナノマテリアルは血清非存在下において細胞内への移行性が向上することが知られていることから、血清無添加培地を用い、25、50、100 μ g/mL の FITC 修飾蛍光シリカ粒子を細胞に添加した。添加 1、2、3 時間後に、細胞内の FITC の蛍光強度を指標として、細胞内シリカ量を定量した。また、7-AAD により染色された死細胞の割合も解析した (図 15)。その結果、nSP70 添加群においては、添加 2 時間後以降、いずれの濃度においても蛍光強度が変化せず、プラトーに達したと考えられた。一方で、細胞傷害性は時間・濃度依存的に増大する傾向が認められた。従って、本検討においては、75%以上の細胞が生存しており、また、細胞内に粒子を十分に取り込んだと考えられることから、25 μ g/mL の濃度で 2 時間作用と

いった条件で細胞内にシリカ粒子を取りこませることとした。一方で、nSP300、mSP1000 は添加後 2 時間以内であれば、いずれの濃度においても細胞傷害性がないことから、nSP70 と条件を統一して検討した。

次に、細胞内から排出されるシリカ粒子の評価を試みた。細胞にシリカ粒子を上記の条件で添加し、細胞内に存在するシリカ粒子の蛍光強度の減少を指標に細胞外への排出を評価した (図 16)。その結果、nSP300、mSP1000 は経時的に細胞外への排出が認められ、培地交換時 (0 時間) を 100% とすると、培地交換 6 時間後での細胞内でのシリカ残留率はそれぞれ 27%、42% と約 6 割以上の粒子が排出された。一方で、nSP70 添加群においては、時間依存性が認められず、また、添加 6 時間後における細胞内のシリカ残留率は約 90% とほとんど排出されない可能性が示された。

次に、細胞外排出経路の解明に向け、阻害剤を用いて検討した。まず初めに、細胞内への取り込みや排出に関与するアクチンの重合を阻害することで細胞外への排出全般を阻害するサイトカラシン D を用いた。また、リソソームを破壊することで、リソソームを経由する排出機構を阻害すると考えられるクロロキンの作用が細胞外への排出に与える影響を評価した (図 17)。その結果、クロロキン作用群においては、いずれの粒子径においても、クロロキンにより顕著な差は認められず、シリカ粒子の細胞外への排出において、リソソームは関与していない可能性が示された。一方で、サイトカラシン D 作用群においては、nSP300、mSP1000 作用群で、細胞外へのシリカ粒子が阻害される傾向が認められた。しかし、nSP70 添加群においては、サイトカラシンによっても変化は認められず、nSP70 と nSP300、mSP1000 の細胞外への排出機構が異なる可能性が示された。

9. 雄親曝露に着目したナノマテリアルの次世代影響評価

近年、雄親の環境因子曝露が仔へ影響を与える

可能性が報告され始めている。そこで、雄親曝露に着目し、ナノマテリアルの次世代影響を評価すべく、F0 世代の雄の nSP30 曝露が F1 世代へ及ぼす影響を評価した。まず、基礎情報の収集として、nSP30 を曝露した雄親への影響評価を目的に、雄マウスに nSP30 を 1 日おきに 4 回尾静脈内投与し、投与開始 35 日後に解剖した。体重を測定すると共に、精巣重量、精囊重量、精巣上体重量、精子生存率の観点から生殖関連組織への影響を評価した (図 18)。その結果、いずれの重量にも、群間で有意な変化は認められなかった。また、精巣上体中の精子の生存率をフローサイトメトリーにより評価したところ、各群間において、精子生存率に有意な差は認められなかった。これらの結果から、nSP30 の曝露は、雄親の生殖関連組織へほとんど障害を誘発しない可能性が示された。

また、雄親の投与開始 35 日後から交配させた際の交配率、雌親 1 匹当たりの出生仔数、雄仔の割合を評価したが、群間で変化は認められなかった (図 19、20)。以上の結果から、nSP30 の雄親曝露は、交配、出産に影響を与えない可能性が示された。

一方で、産まれた仔の体重を経過的に測定し、4 週齢の時点での体重を 100% として成長率を算出したところ、雄親に nSP30 を 5 mg/kg 投与した群の雄仔において、10 週齢から 14 週齢にかけて、成長率が有意に減少していた (図 21)。以上の結果から、パイロット検討ではあるものの、nSP30 が雄親を介して次世代へ影響を与え得る可能性が示された。

10. ナノシリカの経皮投与がアトピー性皮膚炎に与える影響評価

ナノマテリアルを曝露する際には、ナノマテリアル単独で曝露する状況の他に、多くの化学物質や、一部アレルゲンとなり得る蛋白質等と同時に曝露する状況が想定される。ナノマテリアル単独への曝露によるハザード同定が精力的に進められる一方で、ナノマテリアルと他の環境因子との

相互作用を介したハザードの存在に関する検証は十分に進んでいない。本観点から我々は、化粧品基剤等として汎用されるナノシリカと、最も代表的なアレルゲンである、ヤケヒョウダニの抽出抗原 (*Dermatophagoides pteronyssinus Crude Extract* : Dp) を共に皮膚から曝露した際の影響に関して評価を行ってきた。その結果、ナノシリカと Dp の共曝露が、Dp 誘導性のアトピー病態や、アレルギー発症の原因となる Dp 特異的 IgE の産生に影響を与えない一方で、アレルギー発症に対し抑止的に働く Dp 特異的な IgG を抑制することを報告してきた。また、この IgG 抑制作用を介し、Dp と nSP30 を共皮膚曝露したマウスでは、IgE 性のアレルギー応答であるアナフィラキシーショックに対する感受性が亢進してしまうことが示されている。そこで、アレルゲンと nSP30 の共皮膚曝露による IgG 抑制作用のメカニズムをアレルゲンと nSP30 の相互作用の観点から解析した。

これまでに一部報告した通り、Dp と nSP30 の混合溶液は白く白濁しており、nSP30 が Dp を介して強く凝集している様子が観察されている (図 22)。この Dp と nSP30 の混合物を、透過型電子顕微鏡により観察した結果、実際に粒子が凝集している様子が観察された。さらに、動的光散乱法により測定した粒径のピークも、nSP30 本来の 20-30 nm 程度から 1000 nm 以上にまでシフトしている様子が示された。そこで次に、このような凝集体形成が、IgG 抑制作用に与える影響を評価するため、Dp と nSP30 を混合せず、それぞれを別個に、交互に塗布する検討を実施した (図 23)。その結果、Dp と nSP30 を混合せずに、それぞれを交互に塗布した群において、Dp 単独塗布群と比較した IgG の抑制作用は観察されなかった。従って、Dp と nSP30 を少なくとも同時に曝露することが、IgG 抑制作用に必須であることが示された。

次に、Dp と nSP30 の凝集体形成を伴う相互作用が IgG 抑制作用に及ぼす影響を評価した。蛋白質

と NM の相互作用は、NM の表面性状により強く制御されていることが知られている。そこで、nSP30 の表面をカルボキシル基で修飾した表面修飾ナノシリカ (nSP30-C) と Dp の相互作用を評価した結果、Dp と nSP30 を混合した際に観察された粒子の凝集はほとんど観察されないことが明らかとなった (図 22)。さらに、この凝集体を形成しない Dp と nSP30C の混合溶液をマウスに塗布した結果、Dp と nSP30 の混合液を塗布した際に観察される IgG 抑制作用が観察されないことが示された (図 24)。従って、Dp と nSP30 を混合塗布することによる IgG 抑制作用には、Dp と nSP30 が凝集体を形成することが重要である可能性が考えられた。

nSP30 による IgG 抑制作用における、アレルゲンと nSP30 の相互作用の重要性を評価するため、さらに、Dp とは異なる抗原を nSP30 と混合した際の凝集体形成を観察した (図 25)。その結果、モデルアレルゲンである OVA と nSP30 は凝集体を形成せず、逆に BSA と nSP30 は凝集体を形成することが明らかとなった。そこで、これら相互作用の異なるアレルゲンと nSP30 の混合溶液を塗布し、それぞれの抗原に対する抗体産生を評価した。その結果、凝集体を形成しない OVA と nSP30 の混合液を塗布した際には、OVA 単独塗布群と同程度の IgG 産生が観察された。一方で、凝集体を形成している BSA と nSP30 の混合溶液においては、BSA 単独塗布群と比較して顕著な IgG 抑制作用が観察された。従って、アレルゲンと nSP30 の共皮膚曝露による IgG 抑制作用には、アレルゲンと nSP30 が凝集体の形成を伴う相互作用をしていることが重要であることが示唆された。さらに、Dp と nSP30 共投与による IgG の抑制作用は、Dp と nSP30 の混合溶液を他の経路 (皮内注射、経鼻投与、経口投与) より投与した際には観察されなかった (図 26)。従って nSP30 による IgG 抑制作用は、皮膚曝露特異的な影響であることが示された。近年、茶のしずく石鹼による食物アレルギー発症の事例にみるように、皮膚

からのアレルゲン曝露がアレルギー発症に非常に重要であることが明らかとなってきている。今後、アレルギー発症における皮膚の重要性と、nSP30 による IgG 抑制作用の関連を精査することで、ナノマテリアルの安全性のみならず、アレルギー発症の予防に資する知見を得られる可能性が想起される。一方で、一般に、凝集体を形成するナノマテリアルが皮膚バリアを容易に突破することは考えにくい。そのため、nSP30 皮膚曝露による IgG の抑制作用は、アレルゲンと nSP30 の凝集体形成により、アレルゲンの皮膚動態が変動した結果である可能性が考えられ、現在、nSP30 がアレルゲンの皮膚動態へ与える影響を解析している。

IgE 性のアレルギー患者の多くは、アレルゲンに対する IgG があまり誘導されておらず、アレルゲンに対する IgG/IgE 比が低いことが知られている。このため、本検討の結果観察された、ナノシリカとアレルゲンが凝集することで、IgG 産生のみが抑制される病態は、実際に臨床で観察されるアレルギー病態に酷似していると考えられることもできる。一方で、本検討でのナノシリカの投与量は $250 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$ に相当し、ファンデーションが一般的な組成として 2% 程度のシリカを含むことから考えると、ファンデーション (2 g) を、1 か月で使用した場合の曝露量 ($2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{day}$) の約 100 倍の投与量となっている。従って、ファンデーションなどから直接経皮曝露する量では、ナノシリカがアレルギー病態の促進・悪化に影響を与えている可能性は少ないかもしれない。しかし、現実にはより長期、一生涯に渡りナノマテリアルを曝露することに加え、我々は環境中からも NM を曝露しており、実際の病態に酷似する本病態を軽視することはできない。今後より注意深くそのメカニズムを追究していくことが、我々の健康確保に重要であろう。

11. 粒子サイズに着目した非晶質シリカの免疫毒性評価

近年、アスベストや尿酸結晶など、生体内外の微粒子が特有の起炎性を伴う免疫毒性を惹起することが明らかになってきている。当然、NM・sNM に対しても同様のハザードを有する可能性が危惧される。一方で、微粒子のサイズや形状などの物性を免疫系がどのように認識し、免疫毒性に結びついているのか、その理解は進んでいない。そこで本検討では、分散性に優れる非晶質シリカ粒子を用い、粒子サイズと微粒子免疫毒性の関連を評価することで、より安全なナノマテリアルの創製に資する情報の収集を行った。

まず、ヒト単球細胞株 (THP-1) を PMA によって分化させ、24 時間後に nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000 を添加した。24 時間後の上清内の IL-1 β 、TNF- α の産生量を指標として各粒径のシリカの起炎性を評価した。その結果、50~1000nm で粒子径が小さくなるほど上昇した一方で、興味深いことに nSP10、nSP30 においては逆に nSP50 よりも減弱する傾向が得られた (図 27)。すなわち、粒子による起炎性は 50 nm をピークとする、サイズ依存的な反応である可能性が考えられた。

また、各粒径の非晶質シリカを C57BL/6 マウスの腹腔内へ投与し、*in vivo* における起炎性と粒子径の関連性を評価した。起炎性はシリカ投与後 24 時間後の腹腔浸潤細胞数、及び、炎症性サイトカインである IL-6 の産生量を指標として評価した。その結果、いずれのシリカ投与群においても腹腔浸潤細胞数の上昇と、IL-6 産生量の増大が観察された。一方で、この *in vivo* における起炎性も、*in vitro* と同様、粒子径 50 nm をピークとして最も強く発揮される傾向が得られた (図 28)。従って、シリカによる起炎性は 50 nm を極大とし、それ以下では減弱することが明らかとなった。

以上の結果より、ナノマテリアルの粒子としての性質による起炎性は、確かに既存の粒子よりも高い可能性がある一方で、粒子サイズの厳密な制御により回避できる可能性が示された。また近年

では、ナノサイズの粒子をワクチンナノキャリア等の DDS 製剤やワクチンアジュバントとして応用する研究も成されている。従って、本結果は、ナノマテリアルの応用面にも有用な知見を提供し得るデータであると考えられる。

12. 非晶質ナノシリカによる急性毒性にナノシリカの粒子径が与える影響

これまでに我々は、nSP70 や nSP100 を静脈内より過剰量投与した際に、従来のサブミクロンサイズ以上のシリカ (nSP300、mSP1000) では観察されない、急性致死毒性や、一過性の体温低下を伴うショック等の急性毒性が発現することを明らかとしてきた。そこで、ナノシリカの有効かつ安全な利用の促進に向け、より微小サイズの粒子も含めて、その急性毒性とサイズとの連関を精査した。まず、C3H/HeN マウスに nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000 を尾静脈より過剰量投与し、投与後から 15 分毎に 60 分まで体温測定を行った。その結果、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300 において、およそ 45 分後をピークとする投与量依存的な一過性の体温低下が観察された(図 29)。一方で、今回の投与量では、nSP10、及び mSP1000 では体温低下は観察されなかった。また、粒子径ごとの体温低下誘導能は、50～1000nm では粒子径の減少に伴って増強する一方で、30nm 以下で減弱することが明らかとなった。次に、投与 24 時間後における各群のマウスの生存率を測定した(図 30)。その結果、体温低下の結果とは異なり、過剰量投与による致死毒性は、粒子径が小さくなるほど高くなることが示された。すなわち、非晶質シリカを静脈内より過剰量投与することで誘導される急性毒性には、致死毒性のように、サイズ依存的に作用が強くなる毒性がある一方で、体温低下のように、ある特定のサイズにおいてピークを有する毒性も存在することが示された。本知見は、少なくとも一部のハザードに関し、ナノマテリアルの粒径を厳密に制

御することで回避可能であることを示している。今後、本現象と前項において観察された起炎性の関連を精査し、ハザード回避に重要な物性情報を蓄積していきたい。

E. 結論

NM・sNM は産業化されてからの歴史が浅く、今後の応用可能性・市場規模は計り知れないものがある。従って、NM・sNM の危険性だけが無闇に強調され、社会受容が損なわれることだけは絶対に避けねばならない。すなわち、NM・sNM の曝露量や生体影響に関する科学的な情報の収集・蓄積が必須であるのは勿論のこと、安全な NM・sNM の創製を目指した学術的な基礎研究が不可欠である。研究代表者らは、現在、ヒトの健康確保と豊かな社会の実現を目指し、産官学連携で、NM・sNM の安全性確保や、安全な NM・sNM の開発支援に資する基盤情報を収集するなど、Nano-Safety Science (ナノ安全科学研究)・Nano-Safety Design (ナノ最適デザイン) とも言うべき新たな視点での研究を推進している。そのために、医薬工学領域の大学・研究所の先生方に加え、日本化粧品工業連合会、日本化学工業協会など、多くのメーカーの方々と協力体制を築きつつ、議論を進めている(年に 2 回の班会議を実施。その他、定期的にメール・電話等で情報/意見交換を実施。)。さらに、本事業の成果は、研究代表者が企画した学会シンポジウムのみならず、一般市民や高校生向けの公開講座・出張講義などで紹介しており、さらなる研究推進に加えて、NM・sNM の安全性に関する正しい情報を広く発信することで、安全で安心な健康社会の実現、そして NM・sNM の社会受容 (Sustainable Nanotechnology) の促進に尽くしていきたいと考えている。このような研究代表者らの取組は、他に類を見ない特色と独創性を有しているうえ、質的・量的に圧倒的な知見・情報や基盤技術を提供するものであり、学術的・社会的・行政的にもニーズが高く、かつ経済的メリット (ナノ産業の

発展) も大きいものと考えられる。

当該申請研究の成果は、脆弱な個体をも対象とした、NM・sNM の閾値追及を通じて、リスク解析に必須の情報を提供するうえ、OECD-テストガイドライン策定などの国際的なガイドライン策定に貢献すると共に、NM・sNM の物性・品質(粒子径・形状・表面性状・分散/凝集状態)に言及した新たな化審法の必要性を示唆するなど、Nano-Safety Science (ナノ安全科学)・Nano-Safety Design (ナノ最適デザイン)の観点から、NM・sNM の安全性確保や有効かつ安全な NM・sNM の開発およびその支援に直結するものであり、この両輪を指向した取組は皆無に等しく、申請者らがまさに先駆けとなっている。さらに将来的には、「子供の健康と環境に関する疫学調査」、所謂、エコチル調査と連携・補完し、我が国の厚生労働行政の推進に資することも期待される。その結果、国民が安心して NM・sNM の恩恵を最大限に享受でき、我が国のナノ産業の育成・発展に直結するのみならず、労働・生活衛生の向上と国民の健康確保など、NM・sNM の社会受容 (Sustainable Nanotechnology) の促進にも貢献するものである。

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., Pan H., Taira M., Ogura T., Nagano T., Aoyama M., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda SI., Aoshima H., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Biochemical and hematologic effects of polyvinylpyrrolidone-wrapped fullerene C60 after oral administration.,

Pharmazie., 68(1):54-7, 2013.

2. Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K. : Hepatotoxicity of sub-nanosized platinum particles in mice., Pharmazie., 68(3):178-82, 2013.
3. Yoshida T., Yoshioka Y., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Ichihashi K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Higashisaka K., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Intranasal exposure to amorphous nanosilica particles could activate intrinsic coagulation cascade and platelets in mice., Part. Fibre. Toxicol., 10:41, 2013.
4. Nagano T., Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Liver-specific microRNAs as biomarkers of nanomaterial-induced liver damage., Nanotechnology., 24(40):405102, 2013.
5. Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X., Kondoh M., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Yagi K. : Acute and chronic nephrotoxicity of platinum nanoparticles in mice., Nanoscale Res. Lett., 8(1):395, 2013.

【総説・その他】

1. 東阪和馬, 堤 康央 : 安全・安心な最先端医薬としての DDS 開発とレギュラトリーサイエンス-ナノ DDS の安全性評価・確保の現状と今後., 応用が広がる DDS 人体環境から農業・家電まで, NTS 出版, pp. 140-5, 2013.

② 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 11 件】

1. 吉岡靖雄, 堤 康央 : ナノ粒子の安全使用に向けた検討 : 免疫毒性学の観点から., 第 40