

CytochalasinD を用いて検討した。その結果、各粒子サイズの非晶質シリカ粒子、結晶質シリカ添加群においては、阻害剤濃度依存的に IL-1 β 産生量が減弱した (Fig. 3)。従って、本検討で用いた非晶質シリカ粒子は、従来の知見通り、細胞内に取り込まれることでサイトカインを誘導することが考えられた。

粒子の取り込みに依存した反応であることが観察されたことより、粒子サイズ特異的なサイトカインの誘導は、粒子が取り込まれることによって誘導された応答であることが確認された。従って、nSP50 が他の粒子サイズの非晶質シリカ粒子よりも多く取り込まれた結果、サイトカイン産生が増幅されている可能性が考えられた。そこで、本仮説を検証するために、粒子サイズと取り込み量の連関を解析した。まず、各粒子サイズの非晶質シリカ粒子を添加後、6、12、24 時間において、細胞内に存在するケイ素の質量を ICP-AES によって定量した。その結果、全ての時間において、mSP1000 が最も取り込まれており、nSP50 が最も取り込み量が少ないことが明らかとなった (Fig. 4)。微粒子の微小化に伴ってサイトカイン産生が増大すると考えられている要因の一つとして、単位質量あたりでは、粒子サイズが微小化するほど、表面積、粒子数が増大することが考えられている。そこで、ICP-AES によって得られた細胞内ケイ素の質量を元に、細胞内に存在する非晶質シリカの表面積、粒子数を概算した。その結果、全時間において、細胞内に存在する非晶質シリカ粒子の表面積は、nSP10 で最も多くなり、mSP1000 が最も少なかった (Fig. 4B)。粒子数については、粒子サイズの微小化に伴って、細胞内の存在量が多くなることが明らかとなった (Fig. 4C)。Fig. 1A において、IL-1 β は、nSP50 を極大とする粒子サイズ特異的なベルシェイプ型の産生傾向が認められ、12 時間から 24

時間にかけて、粒子サイズ特異的に IL-1 β の産生が増幅することが示唆された。一方で、細胞内に存在するケイ素の質量、表面積、粒子数いずれの観点においても、全ての観察時間で、nSP50 は他の粒子径と比べて多く取り込まれていることはなかった。従って、nSP50 が最も強く IL-1 β 産生を誘導する機序として、粒子の取り込み量が増加することによって誘導されたわけではないことが明らかとなった。

次に、前述の②の過程に関して、各粒子サイズのシリカが、ファゴリソームの開裂依存的に IL-1 β の産生を引き起こしていることを検証するため、プロトンポンプを阻害することでファゴソーム酸性化を阻害する Bafilomycin A1 を用いて検討した (Bafilomycin A1 によりファゴソームの酸性化が阻害されることで、ファゴソーム内の酵素群が活性化されないため、ファゴリソームの開裂に依存した NLRP3 の活性化が抑制される)。その結果、ATP においては、Bafilomycin A1 添加により、IL-1 β 産生量に影響がなかった (Fig. 5)。一方で、非晶質シリカ粒子、結晶質シリカにおいては、Bafilomycin A1 濃度依存的に IL-1 β 産生量が減弱した。上述したように、ATP による IL-1 β 産生の誘導は、ファゴサイトーシスに依存しないことから、ファゴリソームの開裂に依存しない。一方で、Bafilomycin A1 前処置によって、各粒子サイズのシリカ添加群における IL-1 β 産生量が顕著に減弱したことは、各粒子サイズのシリカによる IL-1 β の産生は、いずれもファゴソームの酸性化に依存すること、即ちファゴリソームの開裂に依存的であることが示唆された。

続いて、各粒子サイズのシリカによる、ファゴリソームの開裂誘導活性を比較した。本検討では、酸性 pH に反応して蛍光波長を変化させ (λ_{em} : 526 \rightarrow 650 nm)、ファゴソームの増減を評価することが出来るアクリジンオレンジを用いた。

各粒子サイズのシリカを添加した 6、12、24 時間後に、アクリジンオレンジを細胞に取り込ませ、フローサイトメトリーを用いてアクリジンオレンジの蛍光 (λ_{em} : 650 nm) を評価した。アクリジンオレンジの蛍光が検出されない画分 (アクリジンオレンジネガティブの画分) が増加することは、酸性ファゴソームの量が減少した状態であることを示している。従って、アクリジンオレンジネガティブの画分の増加を評価することで、ファゴリソームの開裂の誘導を評価できる。フローサイトメトリーを用いた検討の結果、未処理群と比較して、結晶質シリカではアクリジンオレンジネガティブの画分が増加し、ATP においては、アクリジンオレンジネガティブの画分に変化がなかった (Fig. 6A)。一方で、非晶質シリカ添加群については、6、12 時間で、未処理群と比較して、アクリジンオレンジネガティブの画分が減少すると共に、粒子サイズ間の差は観察されなかった (Fig. 6B)。一方で 24 時間においては、未処理群と比較して、nSP50 添加群でのみ、有意にアクリジンオレンジネガティブの画分が増加していた。また、mSP1000 は 24 時間においても、未処理群と比較してアクリジンオレンジネガティブの画分が有意に減少することがわかった。各粒子サイズの非晶質シリカ粒子を添加後、6、12 時間において、アクリジンオレンジネガティブの画分が減少していることは、微粒子の取り込みによってファゴリソームが増加したことで、650 nm の蛍光を発するアクリジンオレンジの割合が高まったことに起因することが考えられる。しかし Fig. 4 では、6、12 時間において、他の粒子径と比較して、nSP50 の取り込み量が特に多いことはなかった。従って、ファゴリソームの増大も少ないことが予想される。また、アクリジンオレンジネガティブの画分が、他の粒子サイズと比べても多くないことから、nSP50 が他の粒子径と比べて、直接的

にファゴリソームの開裂を誘導する活性が高い可能性は考えにくい。一方で、サイトカイン産生量がベルシェイプとなる 24 時間でのみ、他の粒粒子径と比較して、nSP50 が最も強くファゴリソームの開裂を誘導していたことから、nSP50 は、取り込みと時間差で、何らかの因子によって、ファゴリソームの開裂を促進することが考えられた。

さらに、caspase-1 の阻害剤である ZYVAD-fmk を前処置した際の、各粒子径の非晶質シリカ、結晶質シリカ、ATP 添加後 24 時間における IL-1 β 産生量を評価した。その結果、結晶質シリカ、ATP、各粒子径の非晶質シリカにおいて、阻害剤の濃度依存的に IL-1 β 産生量が減弱した (Fig. 7)。従って、本検討で用いた非晶質シリカ粒子による IL-1 β 産生誘導には、従来の知見通り、caspase-1 の活性化が必要であることが判明した。また、培養上清中の TNF- α 量を測定した結果、IL-1 β 同様に、caspase-1 阻害剤濃度依存的に減弱していることが分かった。TNF- α の産生は caspase-1 に依存しないことが知られているため、TNF- α は、IL-1 β のオートクライン・パラクライン作用によって産生誘導されたことが示唆された。

次に、粒子サイズが caspase-1 の活性化に与える影響を評価するため、caspase-1 活性化に反応して蛍光を発する色素である、YVAD-FAM FLICA を用い、フローサイトメトリー法によって解析した。その結果、結晶質シリカでは、添加後 6 時間において、未処理群と比較して顕著に蛍光を発する画分の増加が認められ、caspase-1 の活性化が引き起こされていることが確認された (Fig. 8)。一方で、非晶質シリカ添加群では、添加 6 時間において、mSP1000 でのみ、未処理群と比較して若干の上昇傾向が観察されたものの、他の粒子径のシリカでは、caspase-1 の活性化

に差は観察されなかった。非晶質シリカ添加後 24 時間においては、他の粒子径と比較して、nSP50 添加群で蛍光を発した画分の増加傾向が観察され、caspase-1 を強く活性化していることが示唆された。以上の結果をまとめると、各粒子径の非晶質シリカ粒子は、いずれも報告されている既存の経路依存的に IL-1 β を誘導することが明らかとなった。一方で、24 時間後には最も高く IL-1 β 産生を誘導する nSP50 が、6、12 時間時点では他の粒子径と比べていずれの過程も促進しておらず、24 時間でのみ促進していることが明らかとなった。従って、24 時間時点における粒子サイズ特異的な炎症応答は、既知の経路に則って IL-1 β が誘導された結果ではあるものの、既知の経路を活性に導くような、何らかの因子が存在することが示唆された。

スカベンジャーレセプターAに着目した検討

貪食細胞が異物を取り込む機構であるファゴサイトーシスは、受容体を介して行われることが知られている。nSP50によるIL-1 β の産生誘導は、前項までの結果から、取り込み量には依存しないが、未知の因子を介して、IL-1 β 誘導に関わる各経路を活性化していることが示唆された。未知の因子の一つとして、nSP50 が取り込まれる際に、何らかの受容体を介してシグナルを伝達する可能性が考えられた。負電荷を持つ微粒子の取り込みに関しては、スカベンジャーレセプターファミリーの一種であるスカベンジャーレセプターA (SR-A) の関与が示唆されている。マクロファージに発現する SR-A には主に MSR-1、MARCO が知られており、双方に微粒子の取り込みに関与する可能性が報告されている。そこで、各粒子径の非晶質シリカ粒子によるIL-1 β 産生と、SR-Aの関連を検証した。まず、SR-Aの広域アンタゴニストである Poly inosinic acid (Poly I)

を前処置した後に、nSP10、nSP50、nSP100、mSP1000、結晶質シリカ、ATPを添加し、24時間後の細胞培養上清中のIL-1 β 量をELISA法によって測定した。その結果、nSP50、nSP100においては、Poly I濃度依存的にIL-1 β 産生量が減弱した。一方で、nSP10、mSP1000、結晶質シリカ、ATPにおいては、濃度依存的にIL-1 β 産生量が増大した (Fig. 9A)。従って、nSP50とnSP100のみが、SR-Aを介して取り込まれていることが示唆された。

次に、nSP50、nSP100がSR-Aのどのサブクラスによって取り込まれるかを検証するために、MSR-1、MARCOの中和抗体を用い検討した。中和抗体もしくは isotype control (IC)を前処置した後に、各粒子径の非晶質シリカ粒子、結晶質シリカ、ATPを添加し、24時間後の培養上清中のIL-1 β 量を測定した。その結果、IC添加群においては、非晶質シリカ粒子、結晶質シリカ、ATPいずれにおいてもIL-1 β 産生量に変化はなかった。一方で、中和抗体添加群では、nSP50、nSP100添加群のみ中和抗体濃度依存的にIL-1 β 産生量が減弱した (Fig. 9B)。即ち nSP50、nSP100は、MSR-1依存的にIL-1 β 産生を誘導することが示された。これらの結果から、前項までに観察されたnSP50による炎症応答の増幅は、MSR-1を介したシグナル伝達に起因することが示唆された。また、nSP100に関してもMSR-1を介して取り込まれた可能性が考えられた。一方で、nSP100による炎症応答は、nSP50と比較して高くない。従って、単にMSR-1によって取り込まれることが重要なわけではなく、その先のシグナル伝達で何らかの差異が生じることが推察された。MARCOについては、全群においてIL-1 β 産生量の変動は観察されなかった (Fig. 9C)。

MSR-1自身は細胞内ドメインを持たず、MERTK等のリン酸化受容体を介して細胞内に

シグナルを伝達することが知られている。そこで MSR-1 を介したシグナル伝達経路として、MERTKに着目し、そのリン酸化阻害剤(UNC569)を用い、各粒子径の非晶質シリカ粒子による IL-1 β 産生を評価した。その結果、nSP50 添加群では、阻害剤濃度依存的に、顕著に IL-1 β 産生量が減弱することがわかった(Fig. 10)。一方で、nSP100 を含め、他の粒子径の非晶質シリカ粒子、結晶質シリカ、ATP においては、IL-1 β 産生量に影響を及ぼさなかった。従って、MERTK が nSP50 添加群に認められる粒子サイズ特異的な炎症の増幅に関与することが考えられた。また、興味深いことに、nSP100は、MSR-1 依存的に取り込まれる一方で、MERTK を介した IL-1 β 誘導は行わないことが示唆された。従って、MSR-1 を介した MERTK の活性化には、MSR-1 への結合のみならず、結合の仕方等が重要である可能性が考えられる。今後は、nSP50、及び nSP100 が MSR-1 に結合した際の、MSR-1 の結晶構造の変化を解析していくことが必要であると考えている。

D. 考察および E. 結論

本検討では、抗原送達キャリアおよびアジュバントとして有望なナノシリカの、アジュバント作用発揮メカニズムの解明を試みた。その結果、粒子径特異的なサイトカイン産生プロファイルを示すことを明らかにすると共に、そのメカニズムの一端を明確にした。一方で、ナノシリカは生体で分解されることは無いと考えられる。現在臨床で汎用されるアラムも、生体で分解されない粒子状物質であるものの、今後開発される抗原送達キャリアおよびアジュバントには、安全性が強く求められることから、生分解性であることが望まれる。本観点から、新たな生分解性ナノ粒子を開発し、アジュバントおよび抗原送達キャリア

として有望である可能性を既に明らかとしている(現段階ではプレリミナリーな結果であることから、今年度の報告書では記載しない)。現在、HHV-6B タンパク質を用いたワクチン効果の検討や、アジュバント送達キャリアとしての有効性を精査しているところであり、来年度、そちらについて鋭意検討を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

書籍

1. Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : The absorption, distribution, metabolism, and excretion profile of nanoparticles., Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application., pp. 259-71, 2014.
2. Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Biocompatibility of nanomaterials., Nanomaterials in Pharmacology., in press.

雑誌

3. Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Recent topics on development of nanomaterials and nano-safety science., Yakugaku Zasshi., 134(6), 721-2, 2014.
4. Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Nano-safety Science for Sustainable Nanotechnology., Yakugaku Zasshi., 134(6), 737-42, 2014.
5. Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Neutrophilia due to silica nanoparticles induces release of double-stranded DNA.,

- Journal of Nanomedicine & Nanotechnology., 5(5):1000236, 2014.
6. Imai S., Yoshioka Y., Morishita Y., Yoshida T., Uji M., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Size and surface modification of amorphous silica particles determine their effects on the activity of human CYP3A4 in vitro., Nanoscale Res Lett., 9(1):651, 2014.
 7. Hata K., Higashisaka K., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Evaluation of silica nanoparticle binding to major human blood proteins., Nanoscale Res Lett., in press.

2. 学会発表

特記すべきことなし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記すべきことなし

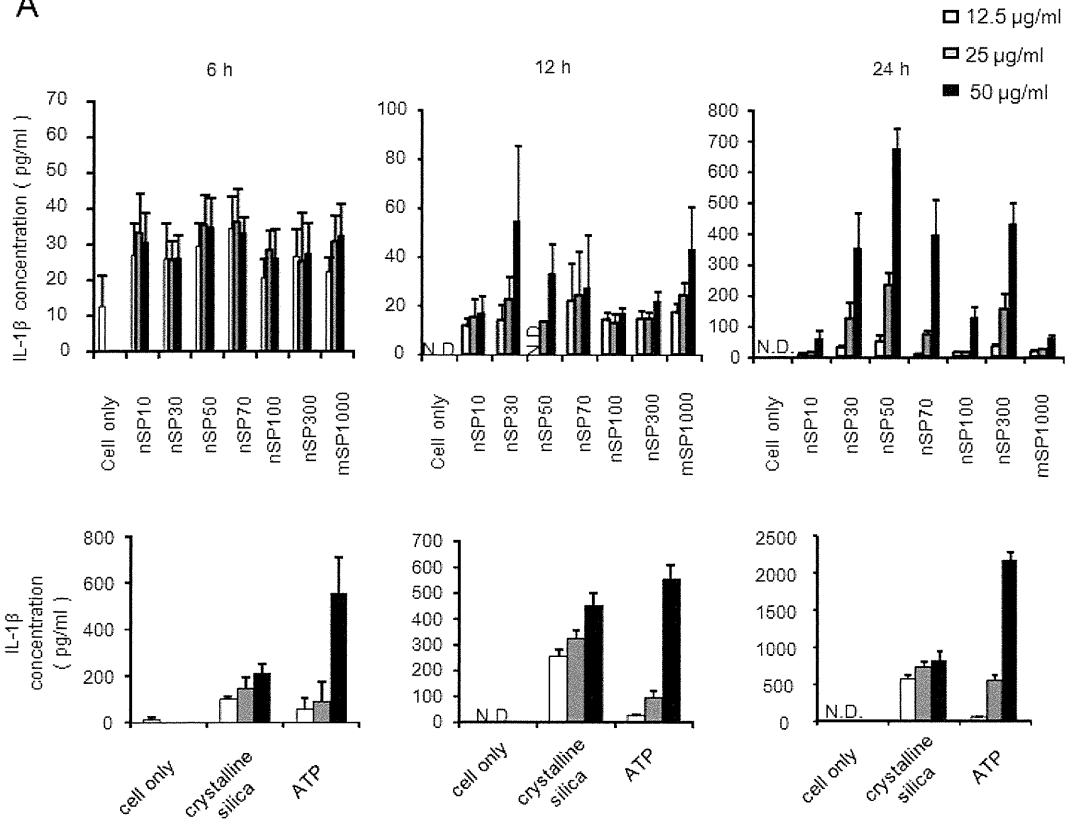
2. 実用新案登録

特記すべきことなし

3. その他

特記すべきことなし

A



B

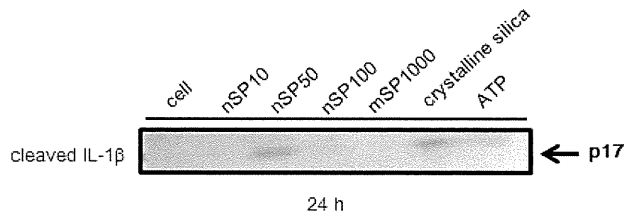


Figure 1. Size dependent IL-1 β secretion. (A) PMA differentiated THP-1 cells were incubated with each diameter of SPs in each concentrations for 6, 12, 24 h, and then, each supernatant were collected. IL-1 β secretion was detected by ELISA. (B) Cleaved IL-1 β secretion in supernatant was detected by Western blotting. Supernatants of each size of SPs (50 μ g/ml), crystalline silica (500 μ g/ml) and ATP (3 mM) at 24 h were precipitation with organic solvent, and loaded on a 20% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel.

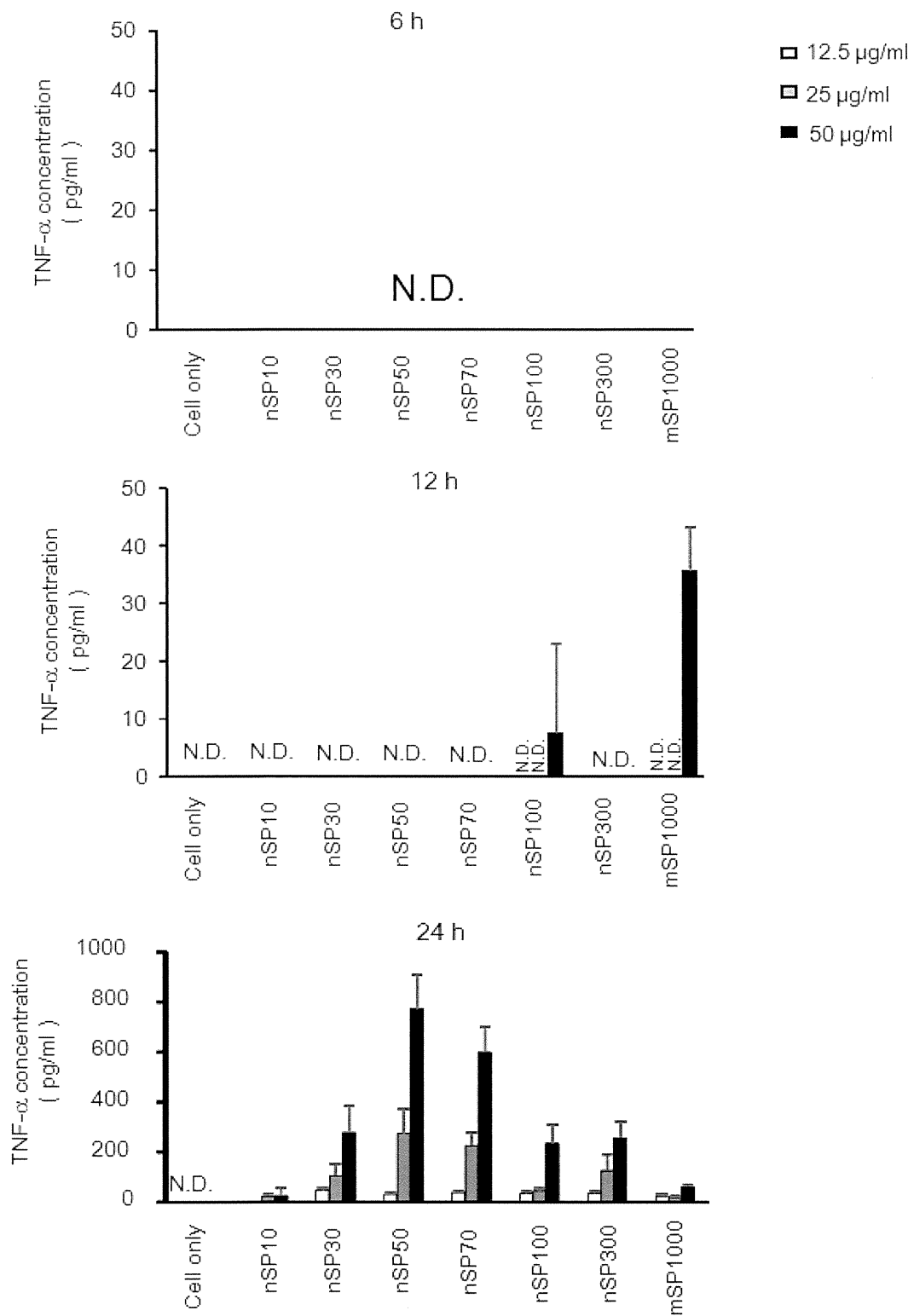


Figure 2. Size dependent TNF- α secretion. PMA differentiated THP-1 cells were incubated with each diameter of SPs in each concentrations for 6, 12, 24 h, and then, each supernatant were collected. TNF- α secretion was detected by ELISA.

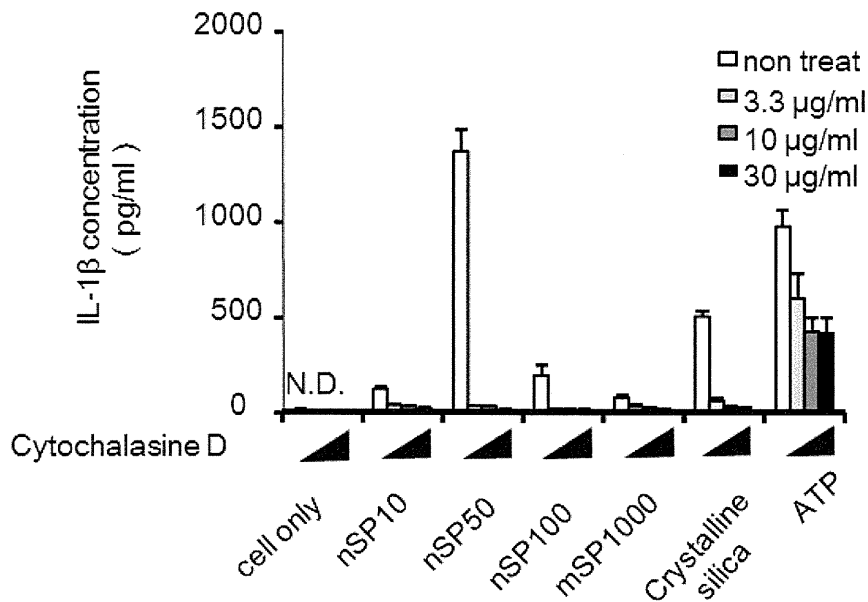


Figure 3. IL-1 β secretion induced by SPs were dependent on cellular uptake. PMA differentiated THP-1 cells were pre-treated with CytochalasinD in each concentrations for 30 minutes, and then each diameter of SPs(50 μ g/ml), Crystalline silica(500 μ g/ml) or ATP(3 mM)were administrated for 24 h. After 24 h incubation, each supernatant were collected. IL-1 β secretion was detected by ELISA.

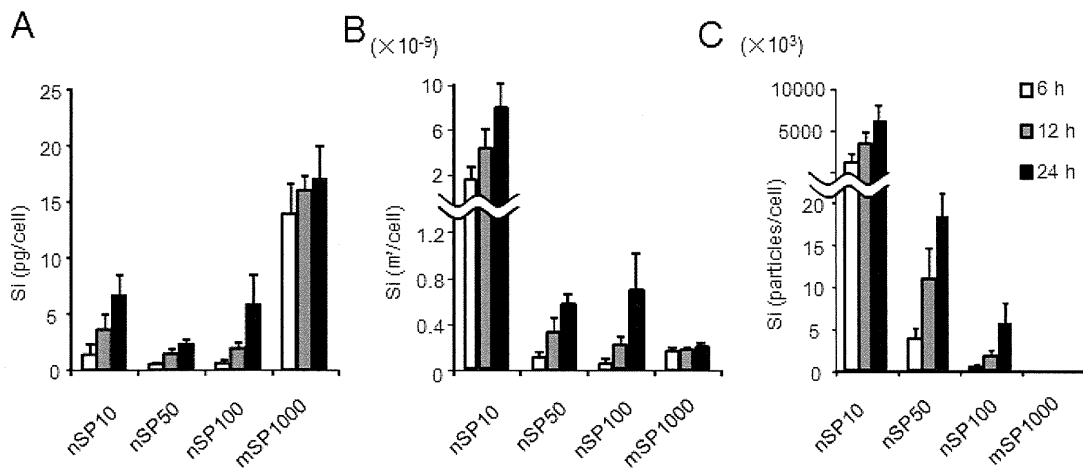


Figure 4. The cellular uptake of nSP in differentiated THP-1 cells. Differentiated THP-1 cells were incubated with each size of SPs at 50 μ g/ml for 6, 12, 24 h. The silicon level in cells was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (A), and then we calculated the surface(B)and the number of particles(C).

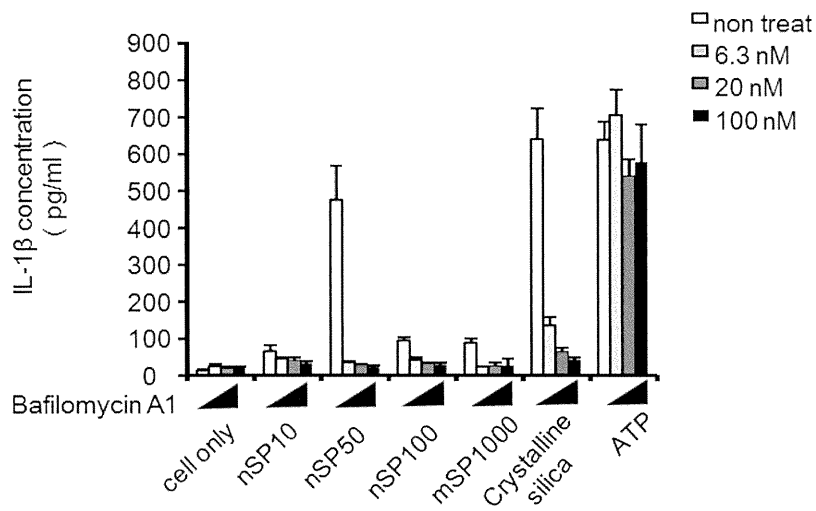


Figure 5. IL-1 β secretion induced by amorphous silica particles were dependent on cellular uptake. PMA differentiated THP-1 cells were pre-treated with CytochalasinD in each concentrations for 30 minutes, and then each diameter of SPs (50 μ g/ml), Crystalline silica (500 μ g/ml) or ATP (3 mM) were administrated for 24 h. After 24 h incubation, each supernatant were collected. IL-1 β secretion was detected by ELISA.

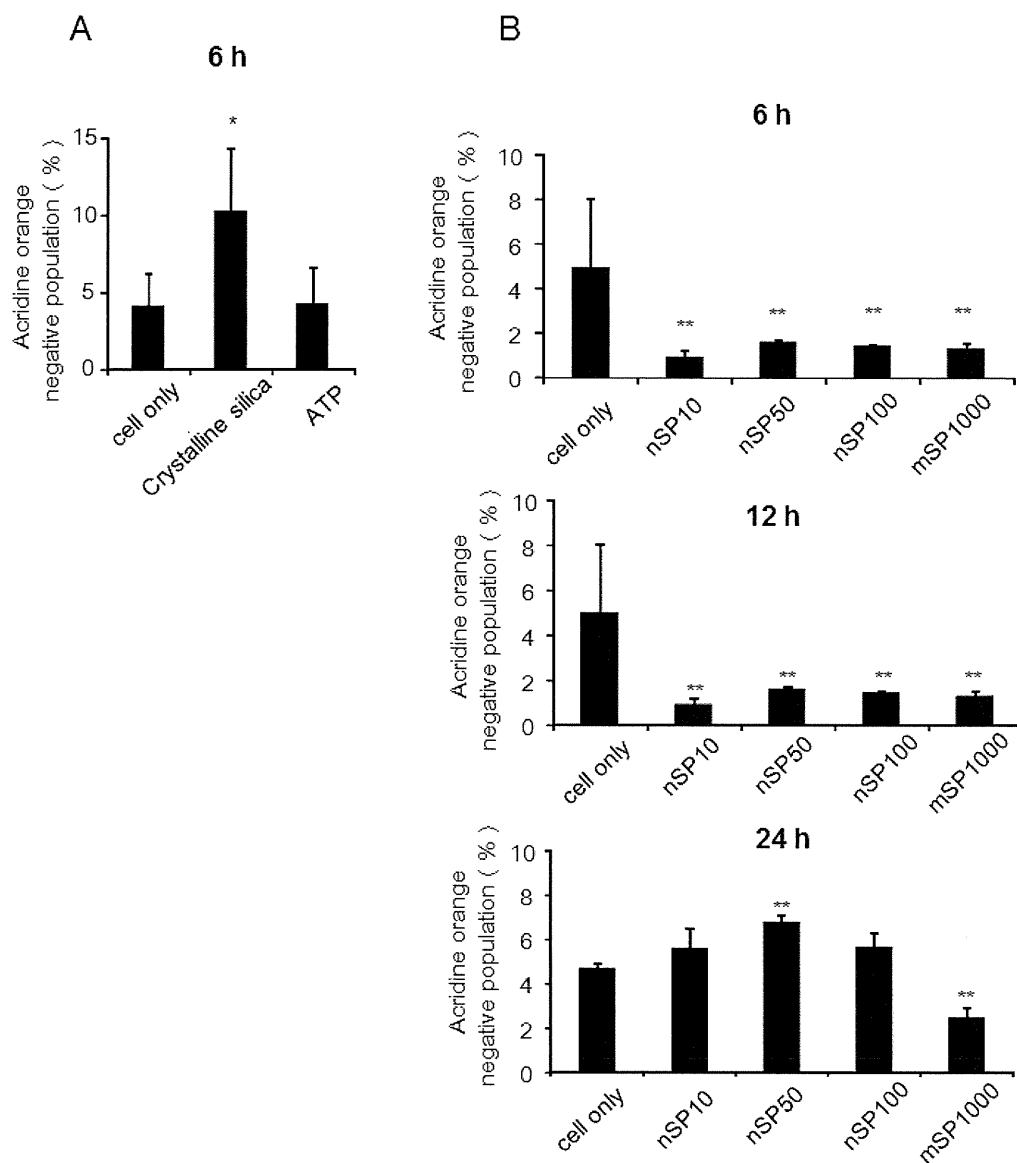


Figure 6. Phagocytosis of nSP50 leads to lysosomal destabilization at 24 h. Flowcytometry of differentiated THP-1 cells treated with crystalline silica (500 μ g/ml) or ATP (3 mM) for 6 h (A), SPs (50 μ g/ml) for 6, 12 and 24 h (B), and then stained with acridine orange (excitation, 488 nm; emission, 650–690 nm).

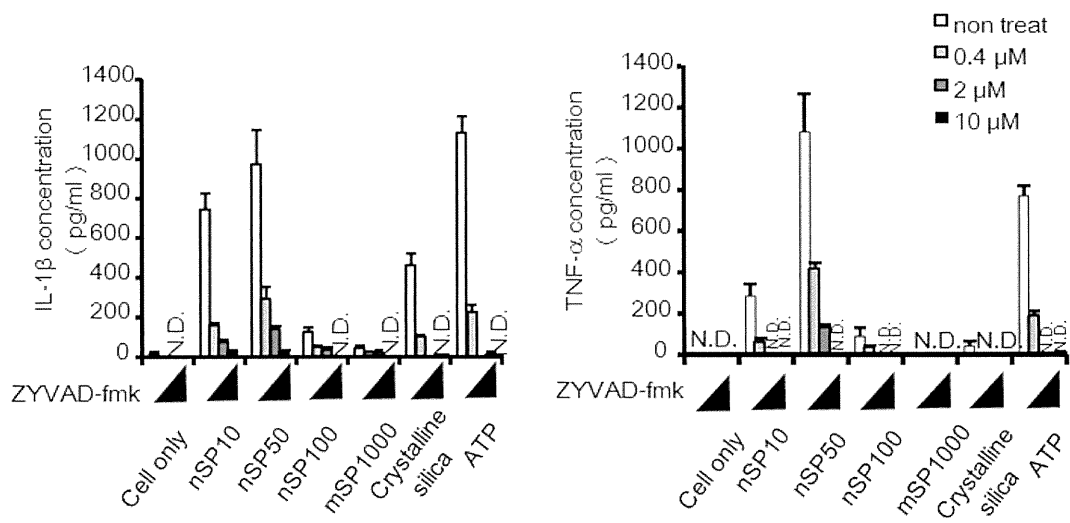


Figure 7. IL-1 β and TNF- α secretion induced by amorphous silica particles were dependent on caspase-1 activation. PMA differentiated THP-1 cells were pre-treated with ZYVAD-fmk in each concentration for 30 minutes, and then each diameter of nSPs (50 μ g/ml), Crystalline silica (500 μ g/ml) or ATP (3 mM) were administrated for 24 h. After 24 h incubation, each supernatant were collected. IL-1 β and TNF- α secretion were detected by ELISA.

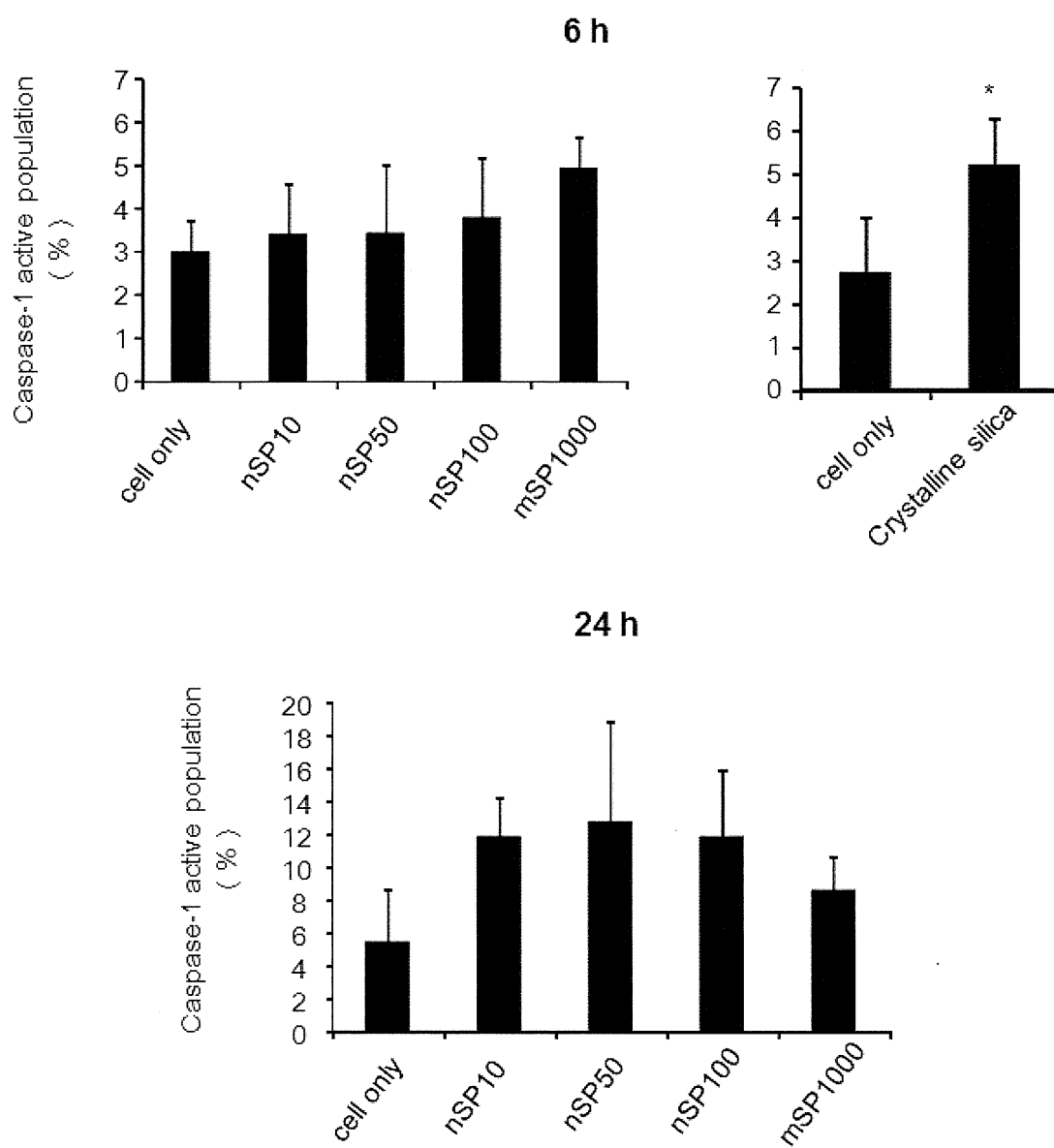
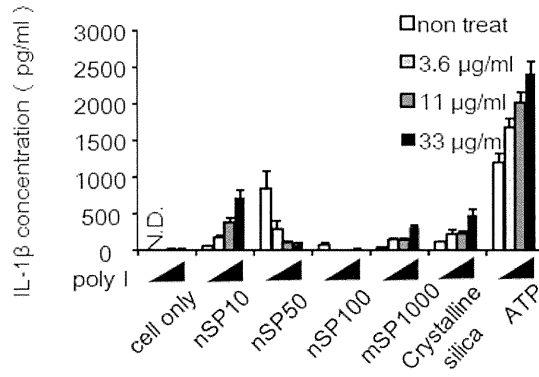
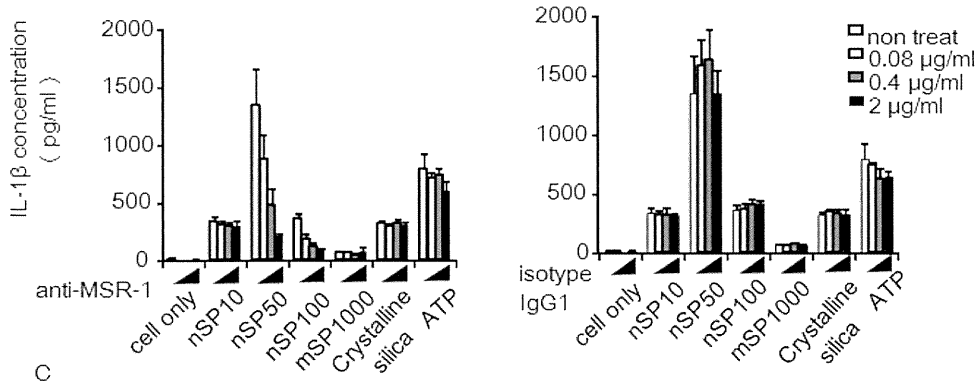


Figure 8. Caspase-1 activation determined by a fluorescent inhibitor of caspase-1 (FLICA). PMA differentiated THP-1 cells were incubated with crystalline silica (500 μ g/ml) for 6 h, or each diameter of SPs (50 μ g/ml) for 6 and 24 h.

A



B



C

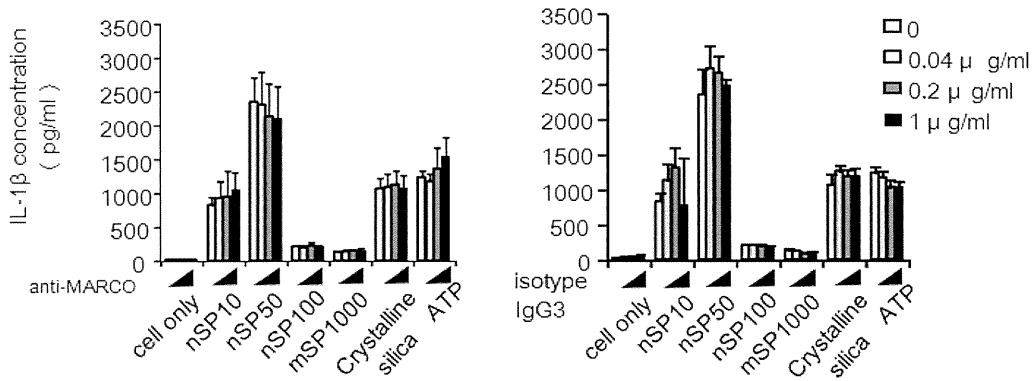


Figure 9. nSP50 and nSP100 secretion of IL-1 β were MSR-1 dependent, but the others were not. IL-1 β secretion induced by amorphous silica particles was independent on MARCO. Differentiated-THP-1 cells were pre-incubated for 30 min with Poly I (A), human SR-A mAb, isotype IgG1 (B), human MARCO mAb or isotype IgG3 (C) at each concentration. The cells were then treated with SPs at 50 μ g/mL, crystalline silica at 500 μ g/ml or ATP at 3 mM for 24 h.

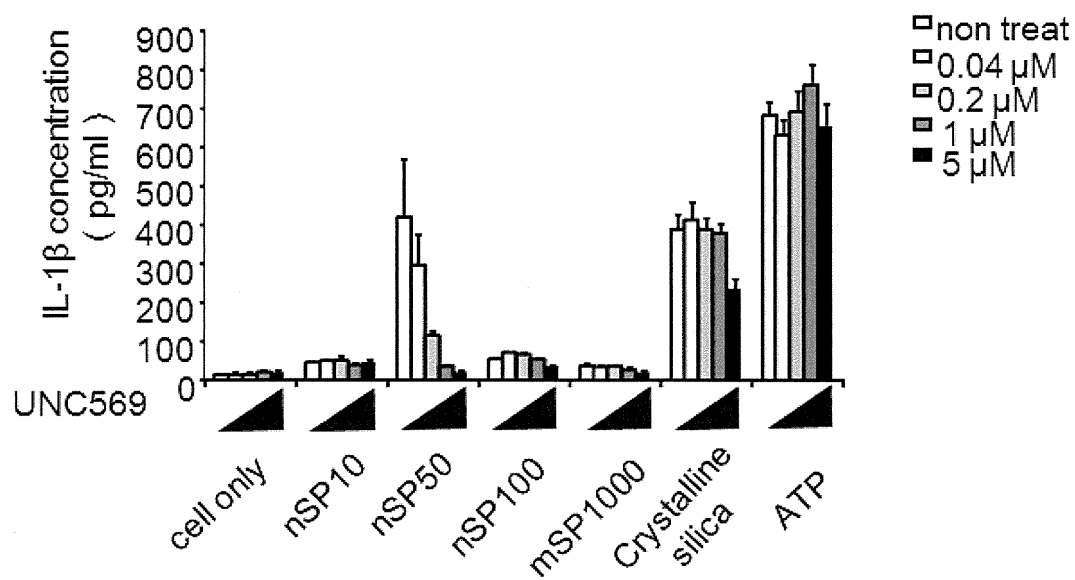


Figure 10. nSP50 induced IL-1 β secretion via Mertk, but the others did not. Differentiated-THP-1 cells were pre-incubated for 30 min with UNC569 at each concentration. The cells were then treated with SPs at 50 μ g/mL, crystalline silica at 500 μ g/ml or ATP at 3 mM for 24 h.

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

分担研究報告書

利便性の高い五種混合ワクチンの開発に向けた研究(H25-新興- 一般-020)

5. HHV-6B 構造タンパク質の精製および立体構造解析に向けた研究

研究分担者・鶴田 宏樹

神戸大学・連携創造本部 応用構造科学産学連携推進センター長

研究要旨：

本研究は HHV-6B 特異的な中和抗体による中和メカニズムを、結晶構造解析によって解明するため、中和抗体が認識するウイルス抗原が含まれる HHV-6B の構造タンパク質複合体を恒常的に発現した HEK293GnTI 細胞株の培養上清から、HHV-6B の構造タンパク質複合体の精製を試みた。Blue Native PAGE での分析では 230 kDa 付近に目的の構造タンパク質複合体と思われる会合体が検出された。また、その中和抗体の精製を行い、Fab 化を実施した。

A. 研究目的

本研究事業の全体の目的は、現行の四種混合ワクチンに、社会的ニーズの高いヒトヘルペスウイルス 6B (HHV-6B) ワクチンを加えた新たな五種混合ワクチンを作製することである。HHV-6B ワクチンの開発にあたって、ワクチン原による免疫誘導のメカニズムの解明が必要であると考えられる。そこで、本研究では、HHV-6B 特異的な中和抗体に注目し、その中和メカニズムを結晶構造解析により解明することを目指した。

B. 研究方法

(1) HHV-6B 構造タンパク質複合体の精製

HHV-6B の構造タンパク質複合体 (gH/gL/gQ1/gQ2) を恒常的に発現したヒト胎児腎臓由来 HEK293GnTI 細胞 (N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI欠損) 株を無血清培地で培養し、その培養上清を His タグアフィニティーカラム

に供試した。溶出した画分を透析し、PreScission Protease で処理した後、再度 His タグアフィニティークロマトグラフィーに供試して素通り画分を回収し、タグを除去した。次に、得られた素通り画分を透析した後、陰イオン交換クロマトグラフィーに供試して溶出画分を回収した。得られた画分を濃縮、ゲルろ過クロマトグラフィーに供試し、280 nm に吸光を示す画分を回収した。その画分を濃縮し、SDS-PAGE および Blue Native-PAGE に供試した。

(2) 抗gH抗体の精製とFab化

抗gH抗体を Protein G カラムに供試し、イムノグロブリン G (IgG) を分取した。得られた IgG 溶液を Papain で消化した後、再度 Protein G カラムに供試して、定常領域 (Fc) を除いた。

(倫理面への配慮)

本分担研究では、遺伝子組換え実験、動物実験

並びに臨床試験等の実施はなく、倫理面における問題はなかった。

C. 研究結果

(1) 結晶構造解析のためのHHV-6B構造タンパク質複合体の精製

本研究では、gHに対する中和抗体を解析に使用する。そのため、既に樹立済みであるHHV-6Bの構造タンパク質複合体(gH/gL/gQ1/gQ2)を恒常的に発現するヒト胎児腎臓由来HEK293GnTI細胞を用い、上記の方法で精製したHHV-6B構造タンパク質複合体をSDS-PAGEに供試したところ、gH、gL、gQ1、gQ2のバンドが検出された。また、Blue Native-PAGEにも供試したところ、gH/gL/gQ1/gQ2複合体のバンド(約230 kDa)を確認することができた。

(2) 抗gH抗体の精製とFab化

Protein Gカラムで精製したIgGをPapainで消化した後、SDS-PAGEに供試したところ、25 kDa付近に2本のバンドが検出された(図1)。

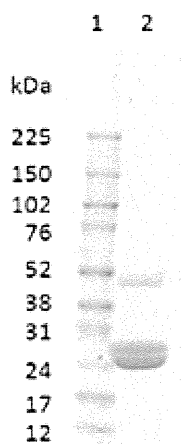


図1. Papain処理後の抗gH抗体をSDS-PAGEに供試した結果。レーン1:分子量マーカー、レーン2: Papain処理後の抗gH抗体。

D. 考察

本研究では、gHに対する中和抗体の中和メカニズムを解明するため、gH/gL/gQ1/gQ2複合体と抗体のFab部分と結合する複合体の構造の解明を目指し、gH/gL/gQ1/gQ2複合体および中和抗体の精製を試みた。精製したHHV-6B構造タンパク質複合体あるいは抗gH抗体のFabを検出したところ、それぞれ数本の他のタンパク質のバンドが検出されたことから、精製方法に関しては再検討の余地があることも示唆された。複合体に関しては精製方法のほか、培養方法の再検討によりHEK293GnTI細胞におけるHHV-6B構造タンパク質複合体の発現量を増加させ、混在する他のタンパク質量の比率を低減することも有効だと推察される。

E. 結論

HHV-6Bワクチン抗原と中和抗体の結晶構造解析のため、HHV-6B構造タンパク質複合体を精製したところ、非変性状態において230 kDaの会合体として得ることができた。また、HHV-6B 抗gH抗体のFab化および精製に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表
特記すべきことなし
2. 学会発表
特記すべきことなし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記すべきことなし
2. 実用新案登録
特記すべきことなし
3. その他
特記すべきことなし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Yoshioka Y, Higashisaka K, Tsunoda S, Tsutsumi Y	The absorption, distribution, metabolism, and excretion profile of nanoparticles	Akashi M, Akagi T, Matsusaki M	Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application	Springer	USA	2014	259-71
Yoshioka Y, Higashisaka K, Tsutsumi Y	Biocompatibility of nanomaterials., Nanomaterials in Pharmacology	Sakuma N, Lu Z	Nanomaterials in pharmacology	Springer	USA		In press

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
Yoshioka Y, Tsutsumi Y	Nano-safety Science for Sustainable Nanotechnology	Yakugaku Zasshi	134	737-42	2014
Yoshioka Y, Tsutsumi Y	Recent topics on development of nanomaterials and nano-safety science	Yakugaku Zasshi	134	721-2	2014
Imai S, Yoshioka Y, Morishita Y, Yoshida T, Uji M, Nagano K, Mukai Y, Kamada H, Tsunoda S, Higashisaka K, Tsutsumi Y	Size and surface modification of amorphous silica particles determine their effects on the activity of human CYP3A4, in vitro	Nanoscale Res Lett	9	651	2014
Higashisaka K, Kunieda A, Iwahara Y, Tanaka K, Nagano K, Mukai Y, Kamada H, Tsunoda S, Yoshioka Y, Tsutsumi Y	Neutrophilia due to silica nanoparticles induces release of double-stranded DNA	Journal of Nanomedicine & Nanotechnology	5	1000236	2014
Hata K, Higashisaka K, Nagano K, Mukai Y, Kamada H, Tsunoda S, Yoshioka Y, Tsutsumi Y	Evaluation of silica nanoparticle binding to major human blood proteins	Nanoscale Res Lett			In press

