

なかった。一方で、nAg10 を前投与されていたマウスにおいて、nAg10、Ag+のいずれによる耳介の腫れも、溶媒前投与マウスと比較して有意に増強された (Figure 33a)。さらに、耳介の HE 標本を作製し、金属アレルギー病態でしばしば観察される表皮の肥厚、表皮への炎症性細胞浸潤、真皮における炎症細胞浸潤数の各項目を評価した。その結果、溶媒前投与群と比較して、nAg10 前投与群のみで、nAg10 あるいは Ag+による炎症応答が、それぞれ二つの項目で有意に増強されていることが示された (Figure 33c,d)。従って、nAg10 の前投与により、nAg10 と共に、Ag+に対する起炎性も増強されることが明らかとなった。

次に、銀ナノ粒子の粒子径と、前投与による影響の関連を評価した。nAg100、nAg50、nAg10 を事前に投与したマウスに、最終投与の 1 週間後、各粒子径の銀ナノ粒子を耳介へ投与した。この結果、nAg10 前投与マウスでは、溶媒前投与のコントロールマウスと比較して、いずれの粒子径の銀ナノ粒子による耳介の腫れも有意に増強されることが示された (Figure 34)。また、有意差は検出されなかったものの、nAg50 前投与マウスにおいて、nAg10 による耳介の腫れが増強する傾向が観察された。以上の結果より、nAg10 の前投与は、nAg10 のみならず、より大きな粒子径の銀ナノ粒子による耳介の腫れも増強することが示された。

10. 銀ナノ粒子の前投与による影響と獲得免疫応答の関連

金属アレルギーを含むアレルギー性の接触皮膚炎は、一般に、T、B、NK 細胞の関わる獲得免疫応答によって誘導されることが知られている。そこで、銀ナノ粒子の前投与による影響が、獲得免疫によって引き起こされるアレルギー反応であるかどうかを検証した。まず、成熟 T 細胞をほとんど持たない nude マウス、T、B 細胞を欠失する SCID マウスにおける nAg10

の感作性を評価した。この結果、野生型のマウスと比べ、その差は小さいながら、nude マウスにおいても、nAg10 の前投与により、有意に nAg10 に対する耳介の腫れが増強することが示された。一方で、SCID マウスにおいては、nAg10 の前投与の有無による影響は観察されなかった (Figure 35a)。本結果により、nAg10 の前投与による nAg10 に対する耳介の腫れの増強作用は、少なくとも獲得免疫応答によるものであり、nAg10 の前投与により、銀に対する感作が成立し、アレルギー性の炎症応答が引き起こされていることが示された。

nAg10 感作により誘導されるアレルギー応答の要因をさらに詳しく解析するため、まず、T 細胞および NK 細胞の影響について中和抗体を用いて検討した。nAg10 前投与マウスに対し、抗 CD4、抗 CD8、抗 asialo GM1 (NK 細胞) 抗体を投与し、それぞれの細胞を除去した。その後、nAg10 を耳介部へ投与し、腫れの変動を評価した。その結果、nAg10 感作により増幅される nAg10 に対する耳介の腫れの増強は、CD4+ 細胞の除去により、完全に消失することが示された (Figure 35b)。一方で、他のハプテンによるアレルギー性の接触皮膚炎に重要なことが報告されている CD8+ 細胞や NK 細胞の除去は、nAg10 感作による作用にはほとんど影響を与えないことが示された。さらに、nAg10 感作の影響が、CD4+T 細胞によるものであることを検証するため、nAg10 感作マウスの CD4+T 細胞を移植したマウスを用いて、nAg10 に対する耳介の腫れを指標に、養子免疫の成立を評価した。非感作マウスの CD4+T 細胞を移入されたマウスと比較して、nAg10 感作マウスの CD4+T 細胞を移入されたマウスでは、nAg10 による耳介の腫れが有意に増強されることが示された (Figure 28c)。従って、nAg10 感作によるアレルギー性の炎症応答は、CD4+T 細胞に依存的であることが示された。一方で、nAg10 感作マウスの血清を移入されたマウス

では、nAg10 による耳介の腫れは影響を受けず、nAg10 感作後の惹起相において、抗体による反応はほとんど関わっていないことが示唆された (Figure 35d)。

11. 銀ナノ粒子誘導性のアレルギー病態を担う免疫応答

ここまで、nAg10 によるアレルギー応答は、CD4+T 細胞に依存的な応答であることが明らかとなった。本検討では、さらにどのような T 細胞サブセットの関わる応答であるのかを評価するため、nAg10 感作マウスの脾細胞を単離し、nAg10 あるいは Ag+ で再刺激し、その際に産生される T 細胞性のサイトカイン産生を評価した。なお、IFN- γ を Th1 型、IL-4、5 を Th2 型、IL-17A を Th17 型の免疫応答の指標として評価した。まず、nAg10 と Ag+ による脾細胞の傷害性を評価した結果、nAg10 では、今回刺激に用いた量では、ほとんど傷害性が観察されなかったことに対し、Ag+ は、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の刺激濃度で、非常に強い傷害性を有していることを確認している。Th1、Th2 型のサイトカイン産生については、いずれの群においても検出できなかった (data not shown)。一方で、nAg10 感作マウスの脾細胞において、IL-17A の産生が、nAg10 あるいは Ag+ の再刺激依存的に、また、非感作マウス由来の脾細胞と比べても有意に高く誘導されることが示された (Figure 36a)。さらに、nAg10 感作脾細胞を nAg50、nAg100 で再刺激した結果、nAg10 で再刺激した際よりも、IL-17A の誘導量が顕著に低いことも確認された。以上より、in vitro における検討でも、nAg10 で感作されたマウスの脾細胞は、Ag+ に対して高い応答性を示し、in vivo の結果と同様に、nAg10 により誘導される免疫応答は、少なくとも大部分が Ag+ に対するものであることが支持された。

ヒトの金属アレルギー病態では、CD4+T 細胞の浸潤が、CD8+T 細胞よりも圧倒的に多く

観察されること、IFN- γ や IL-17 産生細胞が多いことなどが報告されている。従って、少なくとも in vitro における検討で IL-17A の誘導が観察された nAg10 によるアレルギー応答は、ヒトの金属アレルギー病態で観察される免疫応答に近い可能性が示唆された。そこでさらに、nAg10 による病変形成に、IFN- γ あるいは IL-17A が与える影響を、中和抗体を用いて検討した。その結果、IFN- γ の中和抗体は、nAg10 に対するアレルギー応答にほとんど影響を与えないことが示された (Figure 36b)。一方で、IL-17A の中和抗体は、nAg10 に対するアレルギー応答を有意に減弱させることが示された。これまでの結果を勘案すると、nAg10 による耳介の腫れは、Th17 依存的な応答であることが示唆された。ヒトの金属アレルギー病態では、IFN- γ +T 細胞が観察されるにも関わらず、本モデルにおいては IFN- γ は重要ではないことが示唆された。本観点について、マウスでは、Th1 細胞と Th17 細胞は明確に異なる細胞群であり、それぞれ、IFN- γ 、IL-17A を多く産生することで特徴づけられるが、ヒトでは、Th1 と Th17 に可塑性があることや、IFN- γ と IL-17 を共産生する T 細胞の存在が指摘されている。従って、本モデルとヒト金属アレルギーにおける免疫学的差異は、T 細胞の性質における種差である可能性がある。本観点を踏まえると、本モデルは、種差による一定の差はあるものの、ヒトの金属アレルギーにおける免疫学的応答を模倣しており、また、ヒトと同様に、イオンに対するアレルギー応答が誘導されているため、金属アレルギーの病態モデルとして非常に有用である可能性が示された。

E. 結論

我が国のナノ産業は世界トップレベルの開発・実用化技術を誇っており、21 世紀の日本産業/経済の発展を牽引するものと期待されている。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。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。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。さらに、学会のシンポジウム、公開講座や班会議などを通じて、研究者、ナノ産業界、一般国民とのリスクコミュニケーションを多数図っており、国民が納得・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）の促進といった国際貢献も期待できる。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

① 論文発表

1. Yoshida T., Yoshioka Y., Takahashi H., Misato K., Mori T., Hirai T., Nagano K., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. :

Intestinal absorption and biological effects of orally administered amorphous silica particles., *Nanoscale Res Lett.*, 9:532, 2014.

2. Higashisaka K., Fujimura M., Taira M., Yoshida T., Tsunoda S., Baba T., Yamaguchi N., Nabeshi N., Yoshikawa T., Nasu M., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Asian dust particles induce macrophage inflammatory responses via mitogen-activated protein kinase activation and reactive oxygen species production., *J Immunol Res.*, 2014:856154, 2014.
3. 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.
4. 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.*, 9:668, 2014.
5. Isoda K., Kondoh M., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Imazawa T., Nishimura T., Ishida I., Yagi K. : Silica nanoparticle-induced toxicity in mouse lung and liver imaged by electron microscopy., *Fund. Toxicol. Sci.*, 2(1):19-23, 2015.

【総説・その他】

1. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 堤 康

央：非晶質ナノシリカがアレルギーの発症・悪化におよぼす影響～有効かつ安全なナノマテリアルの創製を目指して～., 臨床免疫・アレルギー科, 61(4), 352-6, 2014.

2. 東阪和馬, 吉岡靖雄, 堤 康央: 経皮曝露に着目したナノマテリアルの安全性評価., ファームテックジャパン, 30(6), 99-102, 2014.
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. 堤 康央: ナノマテリアルの安全性評価 (1)., MEDCHEM NEWS., 25(1), 45-6, 2015
6. 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 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 3 件】

1. 堤 康央: ナノマテリアルの安全性評価研究の現状と今後について., マンダム講演会, 大阪, 2014 年 9 月.
2. 堤 康央: アカデミア創薬の最前線～ライフサイエンスへの誘い～., 大阪府立三国丘高等学校., 吹田 (大阪) ., 2014 年 8 月.
3. 東阪和馬, 吉岡靖雄, 堤 康央: 安全かつ

有効なナノ医薬品の開発に向けたナノマテリアルの安全性評価研究 ., オミクス技術を活用した安全かつ有効な創薬の推進に向けて-若手からの発信-. , 日本薬学会第 135 年会, 神戸 (兵庫) , 2015 年 3 月.

【国内学会発表 : 合計 50 件】

1. 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 安全で魅力的な化粧品の開発に向けたナノ安全科学研究～ナノシリカとアレルギー抗原の共塗布による免疫影響評価～., 第 39 回日本化粧品学会., 東京, 2014 年 6 月.
2. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 市橋宏一, 森 宣瑛, 西島伸郎, 半田貴之, 高橋秀樹, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 金属ナノ粒子に対する獲得免疫応答誘導の可能性., 第 41 回日本毒性学会., 神戸, 2014 年 7 月.
3. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 瀧村優也, 野尻奈央, 高雄啓三, 田熊一徹, 吾郷由希夫, 角田慎一, 松田敏夫, 宮川 剛, 東阪和馬, 堤 康央: 母乳を介したナノ銀曝露が仔の情動機能へ与える影響評価., 第 41 回日本毒性学会., 神戸, 2014 年 7 月.
4. 瀧村優也, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 野尻奈央, 高雄啓三, 田熊一徹, 吾郷由希夫, 角田慎一, 松田敏夫, 宮川 剛, 東阪和馬, 堤 康央: 脆弱な個体の安全性確保に向けたナノ銀の母乳を介した乳仔への移行性評価., 第 41 回日本毒性学会., 神戸, 2014 年 7 月.
5. 田中康太, 東阪和馬, 國枝章義, 岩原有希, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノ銀の脳内移行性に関する基礎的検討., 第 41 回日本毒性学会., 神戸, 2014 年 7 月.
6. 西島伸郎, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 山口真奈美, 半田貴之, 角田慎一,

- 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルによる起炎性を規定する要因の探求～粒子径、表面積、粒子数との連関解析～., 第 41 回日本毒性学会., 神戸, 2014 年 7 月.
7. 山口真奈美, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 金ナノ粒子の曝露により誘導される血液毒性と長期的な安全性評価の必要性., 第 41 回日本毒性学会., 神戸, 2014 年 7 月.
 8. 石本里緒, 吉岡靖雄, 青山道彦, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの細胞外排出機構の解明に向けた基礎的検討., 第 41 回日本毒性学会., 神戸, 2014 年 7 月.
 9. 難波佑貴, 東阪和馬, 森下裕貴, 西川雄樹, 前田優子, 吾郷由希夫, 田熊一敬, 角田慎一, 松田敏夫, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノマテリアルの雄親曝露による次世代影響評価., 第 41 回日本毒性学会., 神戸, 2014 年 7 月.
 10. 西川雄樹, 東阪和馬, 森下裕貴, 難波佑貴, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノ銀曝露による細胞増殖能への影響評価: ナノ銀の脳内移行性に関する基礎的検討., 第 41 回日本毒性学会., 神戸, 2014 年 7 月.
 11. 半田貴之, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 市橋宏一, 森 宣瑛, 西嶋伸郎, 山口真奈美, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの粒子サイズと急性毒性との連関評価., 第 41 回日本毒性学会., 神戸, 2014 年 7 月.
 12. 小野寺章, 屋山勝俊, 武田直也, 矢埜みなみ, 米村重信, 堤 康央, 河合裕一: 心血管機能解析によるナノマテリアルの特性評価., 第 41 回日本毒性学会., 神戸, 2014 年 7 月.
 13. 東阪和馬, 國枝章義, 岩原有希, 田中康太, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: 安全なナノ医薬の開発に向けた非晶質ナノシリカのナノ安全科学研究., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
 14. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 大江知之, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の免疫抑制剤としての有効性評価～in vitro における評価～., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
 15. 高橋秀樹, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 青島央江, 上野 裕, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の体内動態解析に向けた基礎的検討., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京 (東京), 2014 年 7 月.
 16. 青山道彦, 吉岡靖雄, 新井由之, 石本里緒, 永井健治, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの細胞内挙動の理解に向けた基礎的解析., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
 17. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 宇高麻子, 大江知之, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の免疫抑制剤としての有効性評価～in vivo における評価～., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
 18. 佐上公一, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 大江知之, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の抗炎症メカニズムに関する基礎的検討., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
 19. 吉岡靖雄, 森下裕貴, 瀧村優也, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: ナノ粒子の母乳を介した乳幼仔への移行性及び生体影響評価., 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会., 徳島, 2014 年 9 月.

20. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 市橋宏一, 和泉夏実, 西嶋伸郎, 半田貴之, 高橋秀樹, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 金属アレルギー発症におけるナノ粒子の役割., 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会., 徳島, 2014 年 9 月.
21. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 和泉夏実, 市橋宏一, 西嶋伸郎, 半田貴之, 高橋秀樹, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 金属アレルギー発症における金属ナノ粒子の重要性., 第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2014., 富山, 2014 年 9 月.
22. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 瀧村優也, 野尻奈央, 高雄啓三, 田熊一敬, 吾郷由希夫, 山下富義, 角田慎一, 橋田 充, 松田敏夫, 宮川 剛, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの母乳移行性および母乳を介して仔に与える影響評価., 第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2014., 富山, 2014 年 9 月.
23. 青山道彦, 吉岡靖雄, 新井由之, 石本里緒, 角田慎一, 東阪和馬, 永井健治, 堤康央: 微粒子の細胞内挙動の定量的評価., 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 京都, 2014 年 10 月.
24. 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 植村瑛一郎, 高橋秀樹, 佐上公一, 角田慎一, 大江知之, 増野匡彦, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の炎症性腸疾患に対する医薬品応用に向けた検討～in vivo における獲得免疫抑制作用の検討～., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
25. 東阪和馬, 岩原有希, 田中康太, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノシリカ誘発性の好中球の増加が妊娠障害に及ぼす影響解析., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
26. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 市橋宏一, 和泉夏実, 西嶋伸郎, 半田貴之, 高橋秀樹, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 金属ナノ粒子による新たな金属アレルギー発症の可能性., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
27. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 瀧村優也, 難波佑貴, 清水雄貴, 角田慎一, 東阪和馬, 堤康央: ナノ銀粒子の母乳移行性および母乳を介した乳幼仔への移行性評価., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
28. 高橋秀樹, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 森 宣瑛, 山口真奈美, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 腸管免疫応答に及ぼす腸内細菌叢の影響評価., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
29. 青山道彦, 吉岡靖雄, 新井由之, 石本里緒, 角田慎一, 東阪和馬, 永井健治, 堤康央: 微粒子の細胞内挙動における輸送小胞の関与に関する検討., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
30. 岩原有希, 東阪和馬, 田中康太, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノシリカ粒子の好中球増加効果におよぼす粒子表面性状の影響., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
31. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 高橋秀樹, 佐上公一, 角田慎一, 大江知之, 増野匡彦, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の炎症性腸疾患に対する医薬品応用に向けた検討～in vitro における抗体産生抑制能のメカニズム解明～., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
32. 佐上公一, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 高橋秀樹, 植村瑛一郎, 角田慎一, 大江知之, 増野匡彦, 青島央江, 小久保

- 研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: MAPK に注目した C60 フラーレン誘導体による抗炎症作用メカニズムの検討., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
33. 瀧村優也, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 難波佑貴, 清水雄貴, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 経母乳曝露に着目したナノ銀粒子の乳幼仔への生体影響評価., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
34. 田中康太, 東阪和馬, 岩原有希, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノ銀粒子の脳内侵入性と生体影響に関する基礎検討., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
35. 西蔭伸郎, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 半田貴之, 和泉夏実, 高橋秀樹, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 粒子サイズに着目した非晶質シリカの免疫毒性解析., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
36. 山口真奈美, 吉岡靖雄, 高橋秀樹, 平井敏郎, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 安全な診断薬への応用に向けた金ナノ粒子の臓器蓄積性に関する基礎検討., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
37. 石本里緒, 吉岡靖雄, 青山道彦, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの細胞外排出機構の解明に向けた基礎的検討., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
38. 難波佑貴, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 瀧村優也, 清水雄貴, 吾郷由希夫, 田熊一徹, 松田敏夫, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 雄親曝露による非晶質ナノシリカの次世代影響評価., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
39. 西川雄樹, 東阪和馬, 真木彩花, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノマテリアルの慢性曝露による炎症誘発に関する基礎的検討., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
40. 半田貴之, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 西蔭伸郎, 和泉夏実, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 粒子サイズに着目した、非晶質ナノシリカの物性と急性毒性の連関解析., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
41. 熊谷文明, 関 剛幸, 松本亜紀, 古谷真美, 福永裕基, 等々力舞, 千坂亜希子, 白見憲司, 野口 聡, 丸茂秀樹, 斉藤義明, 吉岡靖雄, 堤 康央, 桑形麻樹子: 皮膚バリア破綻とナノ銀粒子皮膚透過性の検討., 第 31 回日本毒性病理学会総会及び学術集会., 東京, 2015 年 1 月.
42. 大坊萌美, 磯田勝広, 油科香里, 長谷川知也, 吉岡靖雄, 堤 康央, 石田功: ナノ白金粒子と医薬品成分・化学物質の相互作用に関する検討., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.
43. 青山道彦, 吉岡靖雄, 新井由之, 石本里緒, 角田慎一, 永井健治, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの細胞内輸送機構の解明に向けた検討., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.
44. 石本里緒, 吉岡靖雄, 青山道彦, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの ADMET 情報の集積を目指した細胞外排出機序における基礎的検討., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.
45. 難波佑貴, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 瀧村優也, 清水雄貴, 吾郷由希夫, 田熊一徹, 松田敏夫, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 雄親曝露に着目した非晶質ナノシリカの次世代影響評価., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.
46. 西川雄樹, 東阪和馬, 真木彩花, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノマテリアル

の慢性影響の理解に向けた、ナノ銀粒子による炎症誘発機構の解明., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.

47. 半田貴之, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 西島伸郎, 和泉夏実, 角田慎一, 東阪和馬, 堤康央: ナノ最適デザインを目指した、非晶質ナノシリカによる急性毒性のメカニズム解析., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.
48. 和泉夏実, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 西島伸郎, 半田貴之, 角田慎一, 東阪和馬, 堤康央: 金属ナノ粒子により誘導される金属アレルギー病態の発症機序解析., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.
49. 清水雄貴, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 瀧村優也, 難波佑貴, 角田慎一, 東阪和馬, 堤康央: ナノ安全科学に資する、ナノ金粒子の胎盤関門透過性に与える影響評価., 日本薬学会第 135 年会., 神戸, 2015 年 3 月.
50. 真木彩花, 東阪和馬, 西川雄樹, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤康央: ナノ銀曝露による細胞の DNA メチル化酵素への影響評価., 日本薬学会第 135 年会., 神戸 (兵庫), 2015 年 3 月.

【国際学会発表 : 合計 20 件】

1. Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Namba Y., Nishikawa Y., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Biological assessment of silica nanoparticles focused on neutrophil for ensuring safety of nanomaterials., 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, Melbourne, 13-16 April, 2014.
2. Yoshioka Y., Yoshida T., Hirai T., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Intranasal exposure to amorphous nanosilica particles could activate intrinsic coagulation cascade and platelets in mice., NANOTOX 2014, 7th International Nanotoxicology Congress., Antalya, 23-26 April, 2014.
3. Morishita Y., Yoshioka Y., Nojiri N., Takimura Y., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Intratesticular distribution of intravenously administered amorphous nanosilica particles in mice., NANOTOX 2014, 7th International Nanotoxicology Congress., Antalya, 23-26 April, 2014.
4. Takahashi H., Yoshioka Y., Hirai T., Yamaguchi M., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Basic research to reveal the relationship between pharmacokinetics and the physical property of the nickel nanoparticles., NANOTOX 2014, 7th International Nanotoxicology Congress., Antalya, 23-26 April, 2014.
5. Yoshioka Y., Udaka A., Hirai T., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Ohe T., Mashino T., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Fullerene C60 derivatives suppress the acquired immune responses., Immunology 2014., Pittsburgh, 2-6 May, 2014.
6. Hirai T., Yoshioka Y., Ichihashi K., Mori T., Nishijima N., Handa T., Takahashi H., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles induce silver nanoparticle-specific allergic

- responses., Immunology 2014., Pittsburgh, 2-6 May, 2014.
7. Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Nano-Safety Science for ensuring safety of nanomaterials ~Biological assessment of silica nanoparticles focused on neutrophil~, Nanotech2014., Wasington DC, 15-19 June, 2014.
 8. Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : The contribution of silica nanoparticles-induced neutrophilia to pregnancy complications in mice., 50th Congress of the European Societies of Toxicology, Edinburgh, 7-10 September, 2014.
 9. Aoyama M., Yoshioka Y., Arai Y., Ishimoto R., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Single particle tracking method for the analysis of intracellular movement of the silica nanoparticles., 50th Congress of the European Societies of Toxicology, Edinburgh, 7-10 September, 2014.
 10. Iwahara Y., Higashisaka K., Tanaka K., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Depletion of neutrophil could exacerbate fetal death induced by silica nanoparticles., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah, 9-12 October, 2014.
 11. Uemura E., Yoshioka Y., Hirai T., Takahashi H., Sagami K., Tsunoda S., Ohe T., Mashino T., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Improvement of dispersibility of fullerene C60 derivative by Pluronic F-127 and the potential to enhance anti-inflammatory effect of C60 derivative., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah, 9-12 October, 2014.
 12. Sagami K., Yoshioka Y., Hirai T., Takahashi H., Uemura E., Tsunoda S., Ohe T., Mashino T., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Anti-inflammatory mechanism of C60 pyrrolidine tris-acid (C60-P) on Caco-2 cells., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah, 9-12 October, 2014.
 13. Takimura Y., Yoshioka Y., Morishita Y., Namba Y., Shimizu Y., Yamashita F., Tsunoda S., Hashida M., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Distribution of gold nanoparticles to the breast milk in mice., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah, 9-12 October, 2014.
 14. Tanaka K., Higashisaka K., Iwahara Y., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Analysis of neurological effects after exposure to silver nanoparticles via intranasal route., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah, 9-12 October, 2014.
 15. Nishijima N., Yoshioka Y., Hirai T., Handa T., Izumi N., Takahashi H., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Amorphous silica nanoparticles induce size-dependent inflammation.,

- Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah, 9-12 October, 2014.
16. Yamaguchi M., Yoshioka Y., Takahashi H., Hirai T., Yamashita F., Tsunoda S., Hashida M., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Size effects of gold nanoparticles on the tissue distribution and retention., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah, 9-12 October, 2014.
 17. Ishimoto R., Yoshioka Y., Aoyama M., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The basic analysis for the evaluation of nanomaterials' excretion., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah, 9-12 October, 2014.
 18. Namba Y., Yoshioka Y., Morishita Y., Takimura Y., Shimizu Y., Ago Y., Takuma K., Matsuda T., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Transgenerational effects of silica nanoparticles focused on paternal exposure., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah, 9-12 October, 2014.
 19. Nishikawa Y., Higashisaka K., Maki A., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles induced inflammatory response in human pulmonary cells., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah, 9-12 October, 2014.
 20. Handa T., Yoshioka Y., Hirai T., Ichihashi K., Mori T., Nishijima N., Yamaguchi M., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The

correlation analysis between the size of silica nanoparticles and their acute toxicity for making safer nanomaterials., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah, 9-12 October, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当無し

② 実用新案登録

該当無し

その他

該当無し

研究協力者

大阪大学薬学研究科毒性学分野（職員6名・大学院生/学生24名）：吉岡靖雄准教授、東阪和馬助教、吉田徳幸特任助教、三浦直樹研究員、村山香理、長橋里佐子、畑 勝友、平井敏郎、森下裕貴、今井峻司、小椋健正、高橋秀樹、永野貴士、三里一貴、青山道彦、森 宣瑛、岩原有希、植村瑛一郎、佐上公一、瀧村優也、田中康太、西島伸郎、山口真奈美、石本里緒、難波佑貴、西川雄樹、半田貴之、和泉夏実、清水雄貴、真木彩花

独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト（職員7名・大学院生/学生2名）

角田慎一リーダー、鎌田春彦サブリーダー、長野一也研究員、國丸亜記、細野恵里佳、ソングラム プラニー、瀧慎太郎、安藤大介

独立行政法人医薬基盤研究所抗体スクリーニングプロジェクト（職員1名）

向 洋平サブリーダー

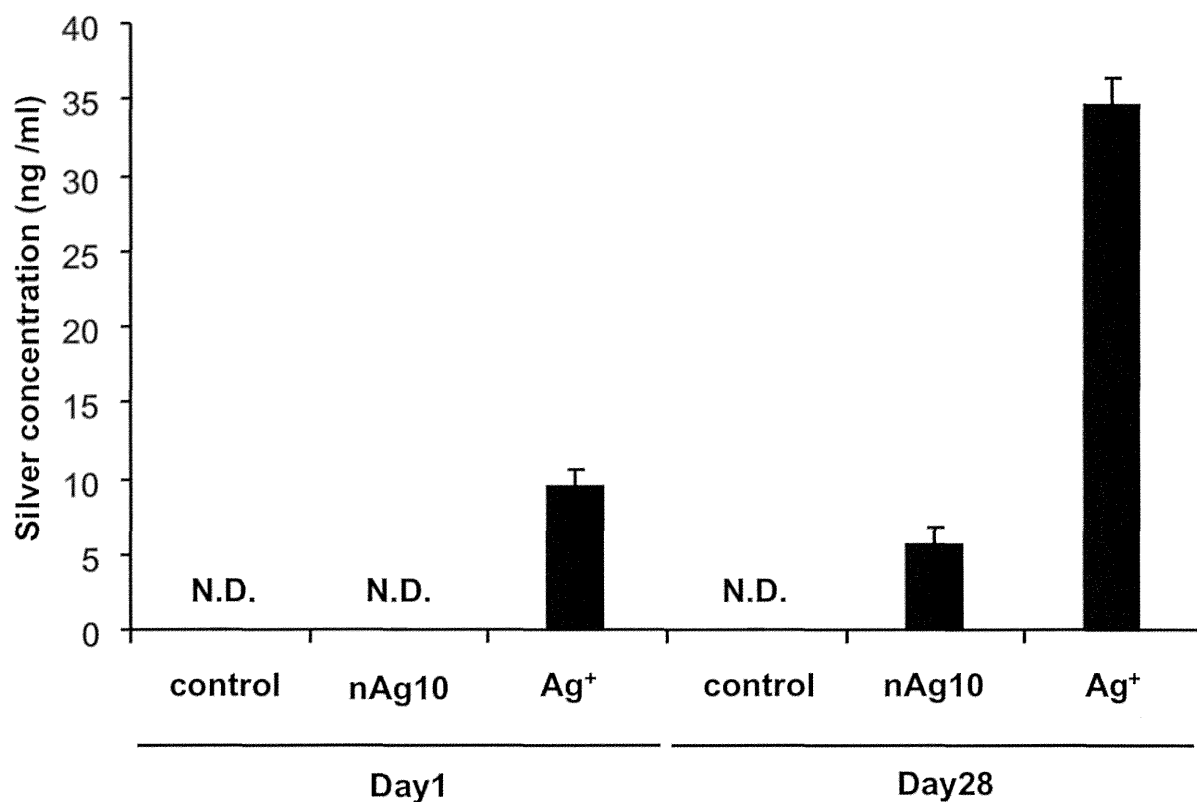


Figure 1. nAg10の経鼻投与後の血中への移行性. C57BL6/J マウス (8 週齢、雄性) に nAg10 を最大 28 日まで連日経鼻投与した。最終投与 24 時間後に、血中における銀量を誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により定量解析した。Data are expressed as the mean \pm SEMs. (n = 8). Silver content below the detection limit were expressed as Not detected (N.D.).

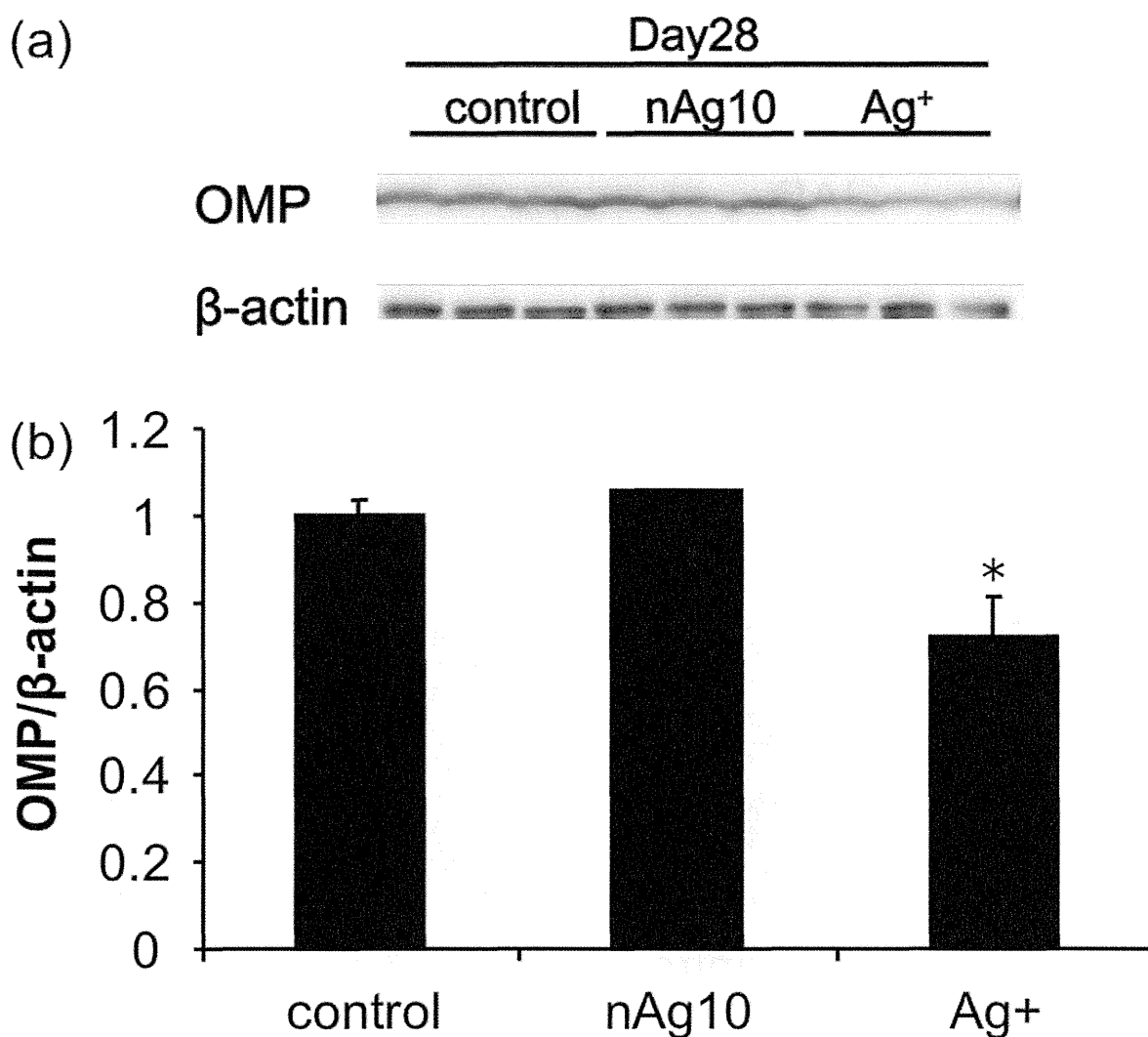


Figure 2. Western Blot による嗅球中の神経マーカーOMP の発現評価. マウスに nAg10 または Ag⁺ を最大 28 日まで連日経鼻投与し、最終投与 24 時間後に、嗅球を摘出した。(a) 嗅球中における OMP の発現をウェスタンブロットにより解析した。(b) Image J を用い、OMP、および、β-Actin のバンド強度を解析し、OMP のバンド強度を β-Actin のバンド強度で標準化することで、OMP の発現量を半定量化した。Data are expressed as the mean ± SEMs (n = 3).

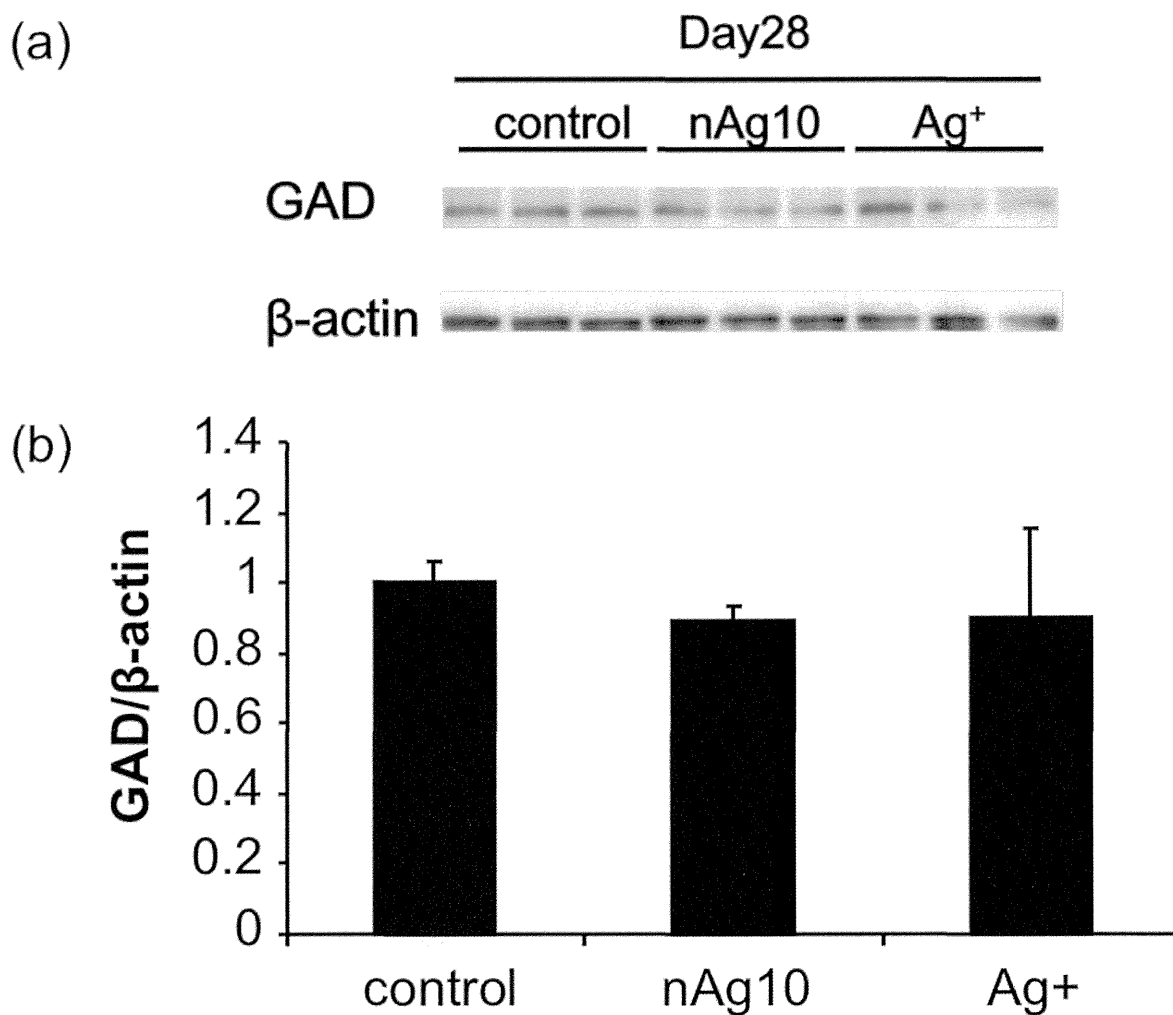


Figure 3. Western Blot による嗅球中の神経マーカーGAD の発現評価. マウスに nAg10 または Ag+ を最大 28 日まで連日経鼻投与し、最終投与 24 時間後に、嗅球を摘出した。(a) 嗅球中における GAD の発現をウェスタンブロットにより解析した。(b) Image J を用い、GAD、および、β-Actin のバンド強度を解析し、GAD のバンド強度をβ-Actin のバンド強度で標準化することで、GAD の発現量を半定量化した。Data are expressed as the mean ± SEMs (n = 3).

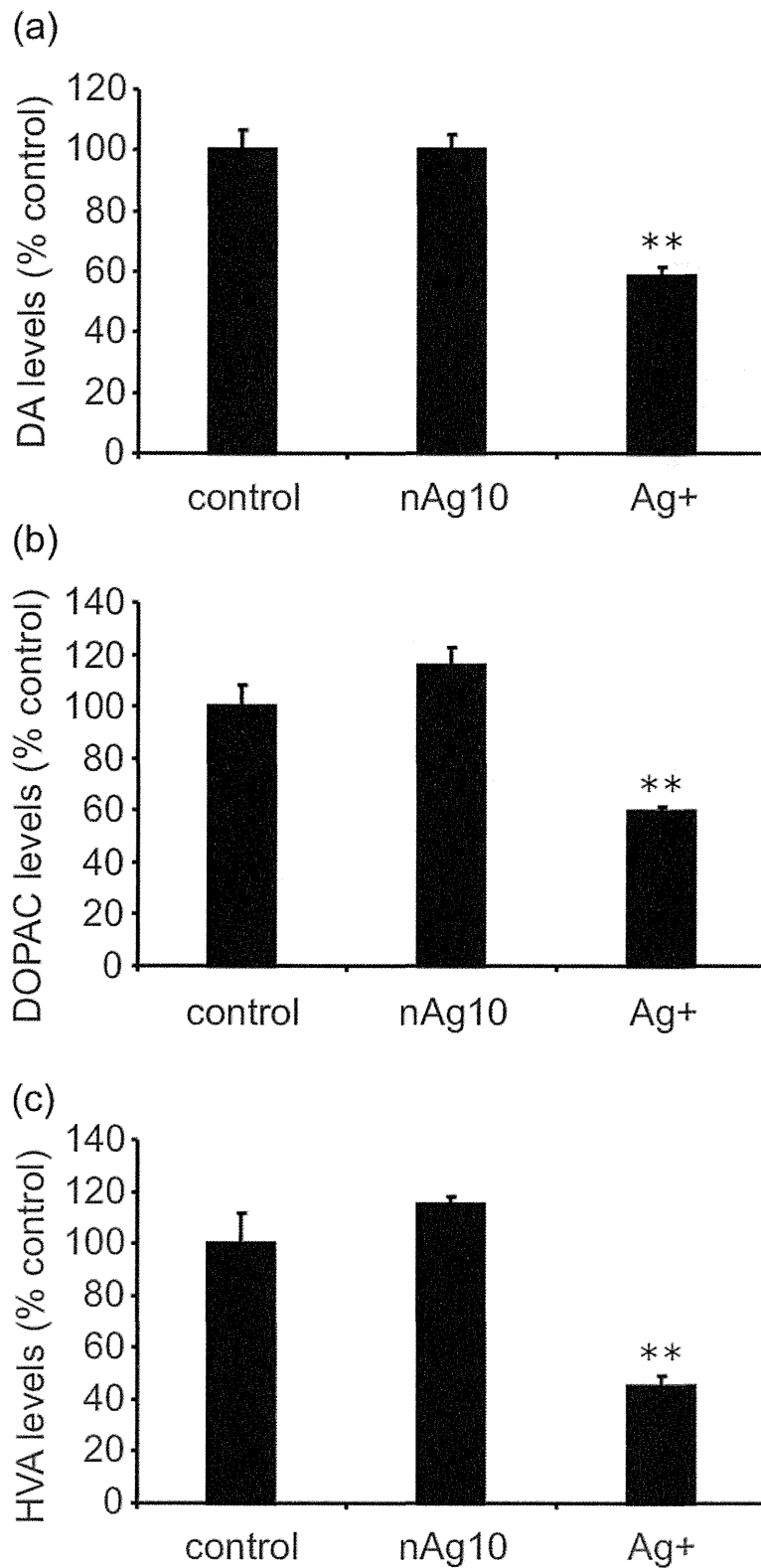


Figure 4. HPLCによる神経伝達物質の測定. マウスに nAg10 または Ag+ を最大 28 日まで連日経鼻投与し、最終投与 24 時間後に嗅球を摘出した。嗅球中の (a) ドパミン (DA)、(b) DOPAC、(c) HVA 量を HPLC-ECD により解析した。Data are expressed as the mean \pm SEMs (n = 4).

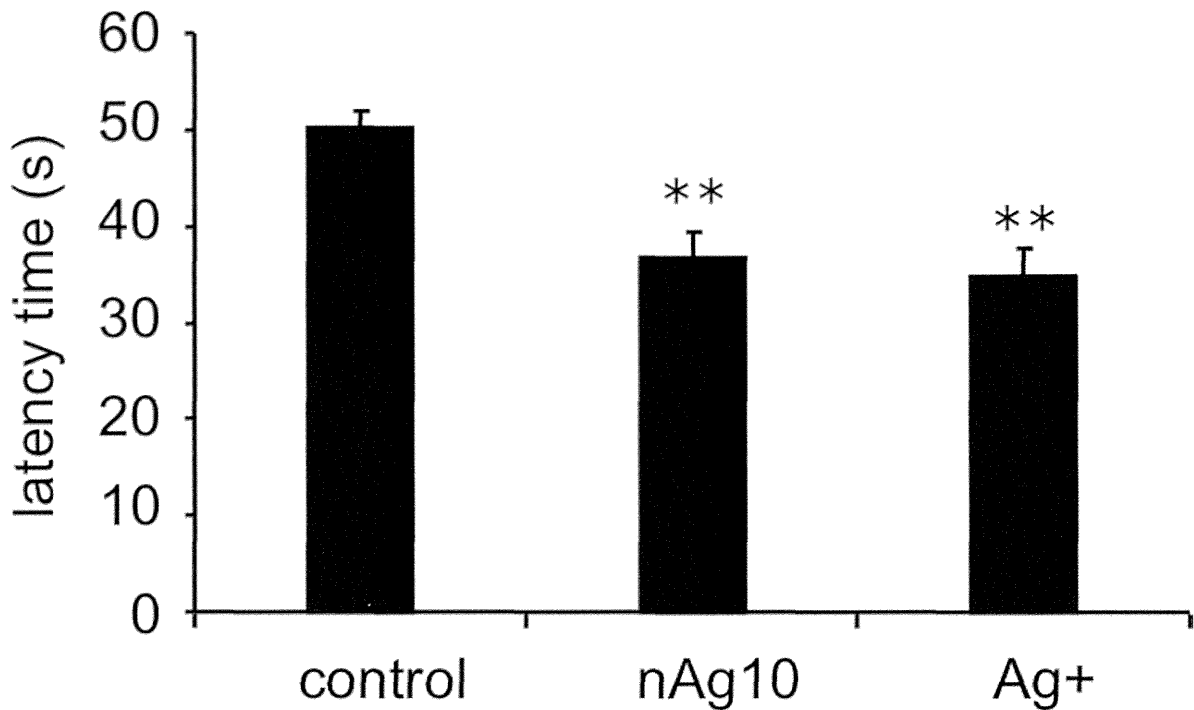


Figure 5. 嗅覚試験 (buried food test) . 試験の3日前から、マウスを飼育しているケージ内にクッキーを設置した。試験の18-24時間前の時点で、ケージから餌とクッキーを取り除いた。試験開始の30分前に飼育室から実験室に移し、20分間馴化させた。20分後、試験用のケージ (testing cage) にマウスを移し、5分間ケージ内で馴化させた。5分後に temporary holding cage にマウスを移した後に、クッキーを testing cage 内の床敷きの表面から 1.5 cm 程度のところに隠した。マウスを temporary holding cage から testing cage に再び戻し、マウスがクッキーを発見するまでの時間を最大 900 秒まで測定した。Data were presented as means \pm SEMs (n = 8).

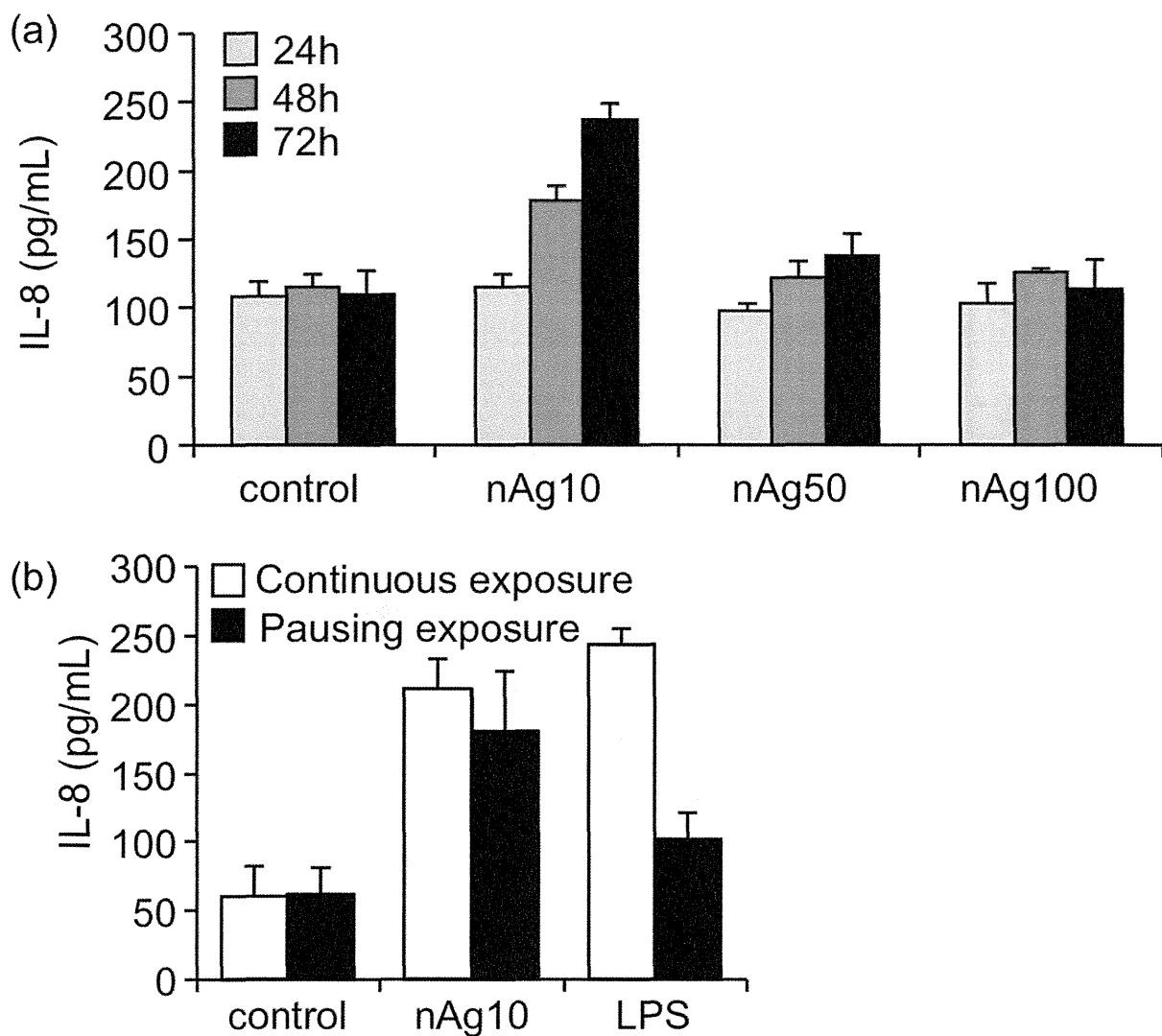


Figure 6. ナノ銀粒子添加後の IL-8 の産生量の評価. (a) A549 細胞に、nAg10、nAg50、nAg100 を添加し、24、48、72 時間培養後、ELISA により上清中の IL-8 量を解析した。(b) nAg10 および LPS を 48 時間まで曝露させた後、その後 24 時間ナノ銀粒子を含まない培地で培養した際の IL-8 産生量を測定した。Data are reported as means \pm S.D. (n = 5).

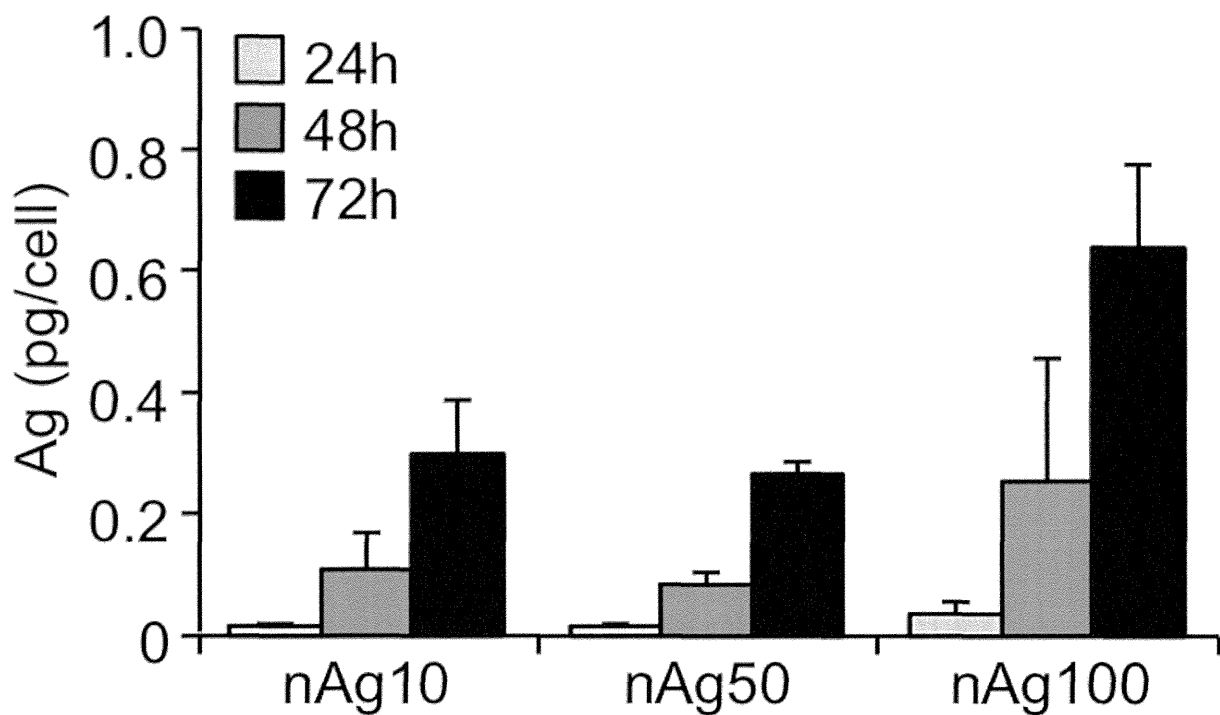


Figure 7. ナノ銀を連日曝露した際の細胞内移行量の解析. A549 細胞に、nAg10、nAg50、nAg100 を添加し、24、48、72 時間培養後、細胞内への銀の移行量を、ICP-MS により定量した。Data are reported as means \pm S.D. (n = 3).

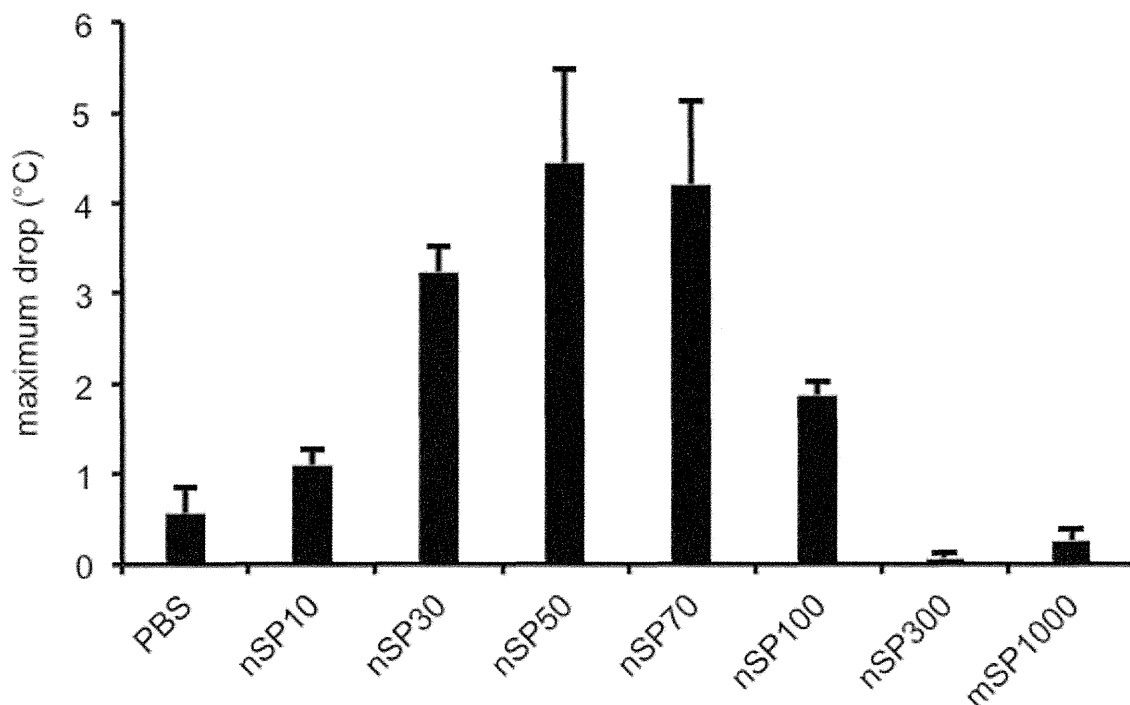


Figure 8. 非晶質シリカ投与時のサイズと最大体温低下値の比較解析。マウスに nSP10、30、50、70、100、300、および mSP1000 (70 mg/kg)を尾静脈投与し、投与直後から 15 分毎に直腸体温を測定した。最大体温低下値を示した 75 分後の結果を示す。 Data are reported as means \pm SEMs (n = 5).

survival rate (%)	0 mg/kg	17.5 mg/kg	35 mg/kg	70 mg/kg	140 mg/kg	280 mg/kg
PBS	100					
nSP10		0	0	0		
nSP30		100	0	0		
nSP50		100	66.7	0		
nSP70		100	100	0		
nSP100			100	100	0	
nSP300				100	100	100
mSP1000				100	100	100

Figure 9. 非晶質シリカ投与時のサイズと生存率の比較解析。マウスに nSP10、30、50、70 (17.5、35、70 mg/kg)、100 (35、70、140 mg/kg)、300、および mSP1000 (70、140、280 mg/kg) を尾静脈投与し、投与 24 時間後におけるマウス生存率を解析した。(n = 3).

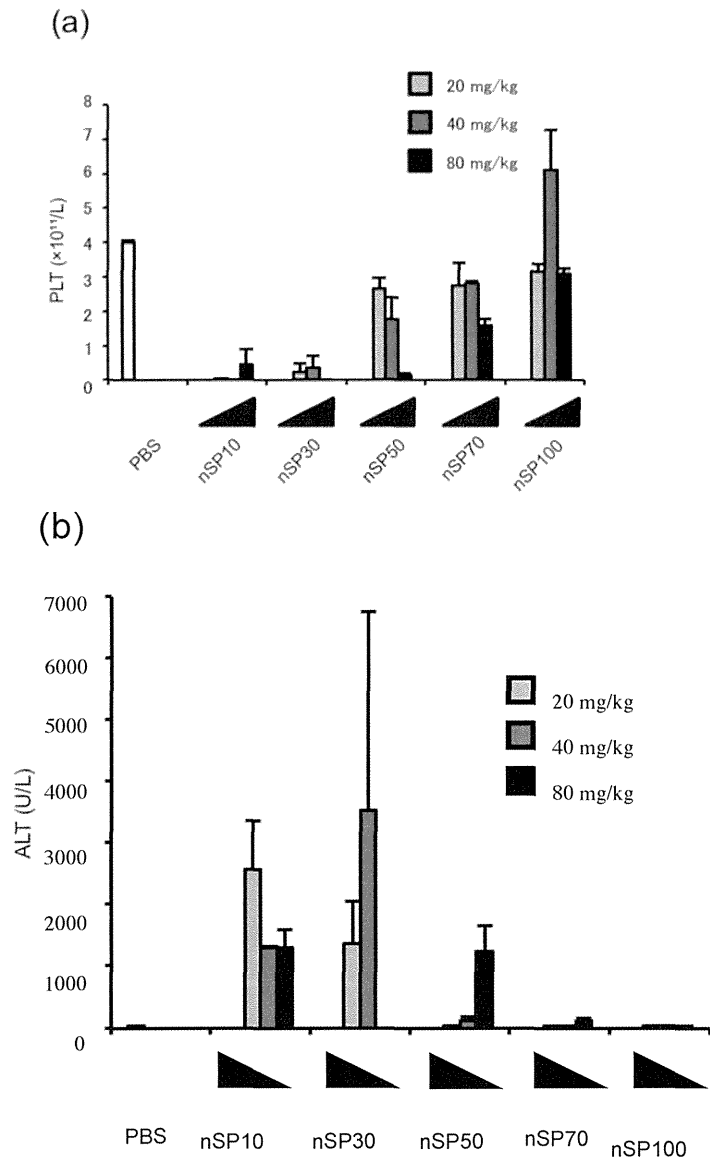


Figure 10. 非晶質ナノシリカ投与時のサイズと血小板数および肝障害誘発との比較解析. マウスに nSP10、30、50、70、100 (20、40、80 mg/kg) を尾静脈投与し、投与 4 時間後において、血液を回収した。(a) 血液検査により血小板数を、(b) 生化学検査により血中 ALT 量を測定した。Data are reported as means \pm SEMs ($n = 1-5$).

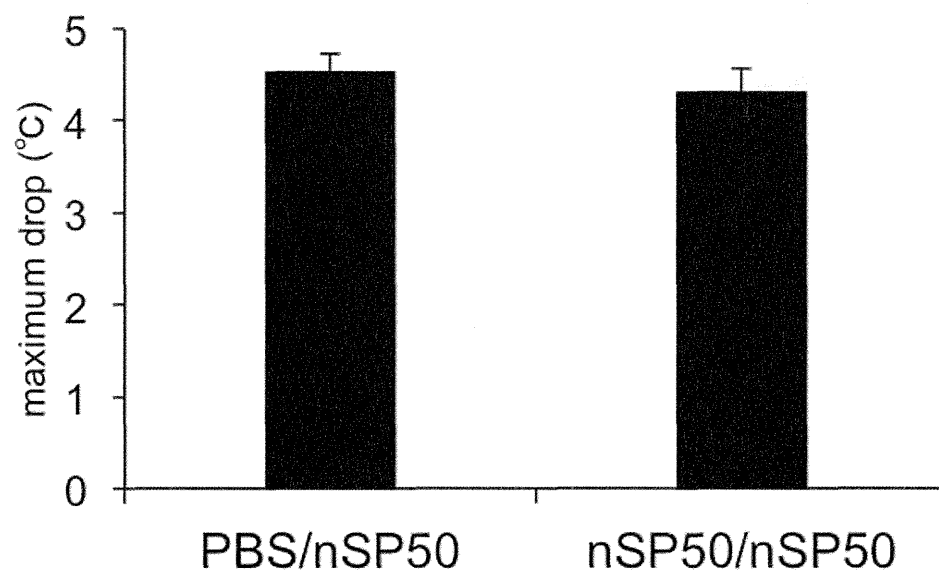


Figure 11. ナノシリカの事前反復投与がナノシリカ誘導性の体温低下に与える影響評価。マウスに nSP50 (12.5 mg/mL) を週 1 回、計 4 週にわたって耳介部皮内へ事前投与した。最終投与の 1 週間後、nSP50 を尾静脈より投与した (80 mg/kg)。投与直後から 15 分毎に直腸体温を測定した。最大体温低下値を示した 75 分後の結果を示す。Data are reported as means \pm SEMs (n = 7).