

Ag+のいずれもが鼻腔-脳経路を介して脳の嗅球まで直接的に移行していることが示唆された。嗅球以外の他の脳領域中の銀量は嗅球からの距離に関わらず、ほぼ一定の濃度であり、脳領域で濃度勾配が認められない原因には、嗅球から他の脳領域へ銀が到達する経路以外にも血液から脳への経路が関与している可能性が考えられる。そこで、nAg10 および Ag+の血液への移行性を評価するため、血液中の銀の濃度を ICP-MS により測定した。解析の結果、nAg10 投与群では、単回経鼻投与後には銀が検出されず、28 日間連日経鼻後に 5.5 ng/mL に増加していた一方で、Ag+投与群では、単回経鼻投与後には 9.5 ng/mL、28 日間連日経鼻後に 34.6 ng/mL となることが示された (Fig.13)。これらの結果から、nAg10 投与群の血液中には Ag+投与群の 1/6 以下しか存在しないことが示唆され、nAg10 は Ag+と比較して血液中に移行しにくい可能性が考えられた。以上の結果を加味すると、嗅球以外の他の脳領域への移行に関しては、nAg10 や Ag+が直接嗅球まで移行した後には他の脳領域に分布する経路以外に、血液を介して脳へ移行する経路の存在も否定できない。

10. ナノ銀粒子を経鼻曝露した際の脳への影響評価

銀の存在量の最も多かった嗅球に焦点を当て、脳神経への影響評価を実施した。nAg10、Ag+曝露による嗅球の脳神経系への影響を評価するために、嗅神経マーカーである Olfactory marker protein (OMP)、ドパミン細胞神経マーカーである Tyrosine hydroxylase (TH)、および、GABA 神経細胞マーカーである Glutamate decarboxylase (GAD) の変動をウエスタンブロットにより評価した。28 日間連日曝露の後、嗅球を回収し、嗅球中の 3 つの神経細胞のマーカーの発現を解析した。その結果、nAg10 投与群では対照群と比較して、嗅球中の OMP 量 (Fig.14)、TH 量 (Fig.15)、GAD 量 (Fig.16) に有意な変

動は認められなかった。一方で、Ag+投与群では、嗅球中の GAD 量には変動はなかったものの、OMP 量が約 30%減少し、TH 量は約 50%の顕著な減少を示した。nAg10、Ag+を 28 日間、連日経鼻曝露した後、嗅球中の神経伝達物質の 1 つであるドパミン (DA) と、DA の代謝産物である 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)、およびホモバニリン酸 (HVA) の変動を HPLC-ECD 法により測定した。解析の結果、nAg10 投与群では、DA、DOPAC、HVA のいずれも対照群と比較して変動は認められないことが明らかとなった。また、Ag+投与群では、DA、DOPAC、HVA のいずれもが 40-60%程度減少しており、嗅球中の TH 量の減少率と相関性があることが確認された (Fig.17)。

そこで次に、nAg10、Ag+曝露による嗅球中の神経マーカーや神経伝達物質の変動が、嗅覚機能にもたらす影響を評価するために、嗅覚機能試験 (buried food test) を実施した。nAg10 および Ag+を 28 日間連日経鼻投与した時点で試験を実施した結果、Ag+投与群のみならず、nAg10 投与群においても、対照群と比較して、ケージ内に隠したクッキーを発見するまでの時間が有意に短くなることが明らかとなった (Fig.18)。すなわち、nAg10、Ag+曝露により、嗅覚過敏が誘発されることが示唆された。嗅球中のドパミンは嗅覚機能を抑制することが報告されているため、Ag+は嗅球中のドパミンを減少させることで、嗅覚過敏を誘発していると考えられる。一方で、nAg10 曝露による嗅覚過敏誘導のメカニズムは不明であり、更なる解析が必要と考えられる。

11. 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 (Fig.19)。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、尿中に含まれる金の量を ICP-MS で定量した (Fig.20)。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、血液生化学検査 (ALT、AST、BUN) (Fig.21)、および血球検査 (Fig.22) を行い、各粒子径の金ナノ粒子の一般毒性を評価した。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。

12. ナノ粒子の母乳移行性評価

はじめに、血中から母乳中への銀ナノ粒子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 nAg100、nAg50、nAg10、Ag+ を 1.5 mg/kg で静脈内投与した。経時的に母体血液・母乳を回収し、ICP-MS により血中・母乳中銀濃度を測定した。なお、母乳中濃度を評価する際、乳幼仔が母体から母乳を摂取すると、母乳中の銀濃度が変動してしまうと共に、母乳量が減り、母乳の回収が困難となる。従って本検討では、母体と乳幼仔を隔離した後、母体に銀ナノ粒子を投与した。一方で、母体は乳幼仔と隔離され、母乳がたまり続けると、母乳を再吸収することが知られている。再吸収が始まると母乳中銀濃度が変動してしまうと考えられることから、本検討では、再吸収が生じるまでに母乳を回収するために、投与 12 時間後を上限として銀ナノ粒子の母乳移行性

を評価した。母乳中銀濃度を測定した結果、いずれの銀投与群においても、投与後 8 時間をピークとして母乳中に銀が検出され、銀ナノ粒子と Ag+ が血中から母乳中へ移行することが明らかとなった (Fig.23a)。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かった。投与 8 時間後における銀ナノ粒子、Ag+ 投与群の母乳中銀量は、母乳の全量を 1 mL と仮定すると、nAg100、nAg50、nAg10、Ag+ でそれぞれ投与量の 0.34%、0.63%、0.73%、1.29% に相当していた。また、母乳中における銀濃度の曲線下面積 (AUC) を算出したところ、nAg100、nAg50、nAg10、Ag+ でそれぞれ 667、1443、2119、4738 h・ng/mL であった (Fig.23c)。以上の結果から、銀ナノ粒子の粒子径が小さいほど母乳移行率が上昇すること、銀ナノ粒子の母乳移行率は 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、いずれの銀ナノ粒子も 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、銀ナノ粒子と Ag+ では血中での動態が大きく異なる可能性が示された (Fig.23b)。また、血中 AUC を算出したところ、nAg100、nAg50、nAg10、Ag+ でそれぞれ 1358、2222、3282、32652 h・ng/mL 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、nAg100、nAg50、nAg10、Ag+ でそれぞれ 0.491、0.649、0.646、0.145 であり、銀ナノ粒子の方が Ag+ と比較して高値を示した (Fig.23c)。従って、血中濃度が等しい場合には、銀ナノ粒子の方が Ag+ よりも母乳中へ移行しやすいと考えられた。また、M/P 比が銀ナノ粒子の粒径の減少に伴い増加傾向を示したことから、銀ナノ粒子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。

一般に、母乳へ分泌される物質は授乳時期の違

いにより変化することが知られていることから、次に、銀ナノ粒子が授乳期のどの時期に母乳へ移行しやすいかについて検討した。出産後 3 日、7 日、14 日、21 日の授乳期マウスに nAg10 を 1.5 mg/kg で静脈内投与した。経時的に母乳中銀濃度を測定した結果、出産後 3 日、7 日に銀ナノ粒子を投与した群では母乳中に銀が同定された一方、出産後 14 日、21 日に投与した群では同定されなかった (< 100 ng/mL、投与量の 0.27%程度未満) (Fig.24)。マウスの授乳期間は出産後約 3 週間であり、授乳期のマウスは出産後 14 日の時点においても母乳を産生し続けていることが知られている。従って、出産後 14 日以降に母乳中の銀濃度が減少したのは、母乳の産生量が低下したからではないと考えられることから、上記の結果により、銀ナノ粒子は授乳後期よりも授乳初期に、より母乳中へ移行しやすいことが明らかとなった。

ここまでは、ナノ粒子を静脈内投与後の母乳移行性を評価してきた。次に、現実の曝露実態を加味して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検討した。出産後 3 日の授乳期マウスに nAg10、Ag+ を単回経口投与した。nAg10 の投与量については、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数千倍と考えられる) とした。まず、母体・乳腺への影響を評価した結果、母体の血球細胞数 (Fig.25)、組織障害マーカー (Fig.26) はいずれも正常値範囲内であり、乳腺の病理所見 (Fig.27a, b)、乳清中蛋白質濃度 (Fig.27c) にも群間で有意な変化は認められなかった。従って本投与量において、nAg10、Ag+ は母体に血液毒性、肝・腎毒性、透過性の亢進を含めた乳腺傷害を誘発しないことが明らかとなった。次に、母乳中・血中銀濃度を測定した結果、母乳中 (Fig.28a)・血中 (Fig.28b) 共に銀が検出され、nAg10、Ag+ が経口投与後、腸管バリア、乳腺バリアを突破し、母乳中へ移行することが明らかと

なった。なお、母乳中濃度が最大となった時点 (nAg10: 投与 8 時間後、Ag+ : 投与 12 時間後) において、母乳中で同定された銀量は、nAg10、Ag+ でそれぞれ、投与量の 0.051%、0.12%であった。興味深いことに、銀を静脈内投与した際には、母乳中銀濃度が血中銀濃度より小さかったのに対し (Fig.23c)、銀を経口投与した際には、母乳中銀濃度の方が血中銀濃度より高値を示す傾向があり、特に投与 8 時間後、12 時間後においてその傾向は顕著であった (Fig.28c)。さらに、経口投与時の M/P 比を算出した結果、nAg10、Ag+ でそれぞれ、1.86、1.63 となり (Fig.28c)、静脈内投与時 (nAg10 : 0.646、Ag+ : 0.145、Fig.23c) と比較して高値であった。1 を超える M/P 比は、該当の物質が血中から母乳中へ能動的に移行することを示していると考えられる。従って以上の結果により、経口投与後に血中移行した銀ナノ粒子は、静脈内投与された銀ナノ粒子と比較して、血中から母乳へ移行しやすくなる可能性が示された。

13. ナノ粒子の母乳を介した仔への移行性評価

母親が銀ナノ粒子を静脈内投与された際の、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 nAg100、nAg50、nAg10、Ag+ を 1.5 mg/kg で静脈内投与した後、3 週間母乳育児させた。仔の血中銀濃度を測定した結果、いずれの銀投与群の乳幼仔の血中からも投与 72 時間後をピークとして銀が検出され、母体が曝露し、母乳に分泌された銀ナノ粒子は、仔の腸管バリアを突破し、体内へ吸収されることが明らかとなった (Fig.29)。仔の血液量を 72 mL/kg と仮定すると、投与 72 時間後の時点で仔の血中に同定された銀量は、nAg100、nAg50、nAg10、Ag+ でそれぞれ、母体への投与量の 0.067%、0.14%、0.14%、0.12%であった。仔は成長につれて血液量が増加するため、仔の血中銀濃度の低下は、体内から銀が排泄されたというだけでなく、血液量が増えたために銀濃度が薄まったという寄与

があると考えられる。また、徐々に曝露量は減っていると考えられるものの、仔は母乳を飲むたびに銀ナノ粒子に曝露し続けていると考えられる。

次に、現実の曝露実態を加味し、母親に経口投与した際の銀ナノ粒子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nAg10、Ag+を10 mg/kgで経口投与した後、3週間母乳育児させた。仔の血中銀濃度を測定した結果、静脈内投与の検討と同様に、投与72時間後をピークとして銀が検出された (Fig.30a)。投与72時間後の時点で仔の血中に同定された銀量は、nAg10、Ag+でそれぞれ、母体への投与量の0.0012%、0.0026%であった。さらに、仔の臓器中銀濃度 (ng/g tissue) を測定した結果、肝臓中 (Fig.30b)、脳 (Fig.30d) に銀が同定され、母乳を介してnAg10、Ag+を曝露すると、仔の血液脳関門を突破し、脳にまで到達することが明らかとなった。なお、臓器中銀濃度のデータにおいては、肝臓・脳共に日数の経過に伴い、銀濃度の減少傾向が認められた。一方で、乳幼仔の臓器重量が日数の経過と共に大きくなっていくため、臓器中銀濃度の低下は、臓器重量が増えたために銀濃度が薄まったという寄与があると考えられる。そこで、臓器中の銀の総量 (ng/tissue) を算出した結果、肝臓 (Fig.30c) においては日数の経過に伴い銀量の低下が認められる一方で (半減期は、nAg10 : 5.78 日、Ag+ : 6.68 日、Fig.30f)、脳 (Fig.30e) においては日数が経過してもほとんど減少しないことが明らかとなった (半減期算出不可)。従って、仔の脳に分布したnAg10、Ag+は、肝臓と比較して排泄されづらいことが明らかとなった。

14. ナノ粒子の母乳を介した曝露が仔へ与える影響評価

ここまでで、銀ナノ粒子が母乳中へ移行し、その母乳を飲んだ乳幼仔の体内に吸収されることが明らかとなった。曝露が有る限り、リスクが起り得ることから、銀ナノ粒子の母乳を介した曝

露が仔へ与える影響の評価が必要不可欠である。そこで、銀ナノ粒子の母乳を介した曝露が仔へ与える影響について、一般毒性学的に解析した。授乳期のマウスに、出産日 (PND0) から離乳 (PND20) までの21日間、nAg10、Ag+を0.1 mg/kg、0.5 mg/kg (サプリメントとして経口摂取し得る量の数十~数百倍程度) で毎日経口投与し、その間、母乳育児させた。仔の体重推移を評価すると共に、PND21に血液生化学検査を実施した。その結果、群間の体重推移 (Fig.31a) と組織障害マーカー (肝障害マーカー: ALT・AST、腎障害マーカー: ALT・BUN) (Fig.31b) に有意な変化は認められなかった。一方で、0.5 mg/kgのnAg10、Ag+を投与された母体の雌仔において、対照群と比較して血小板容積と血小板分布幅の有意な低下が認められた (Fig.32)。上記の血小板容積と血小板分布幅の低下は、雄仔においては認められなかった。血小板容積と血小板分布幅の低下は血小板産生数の減少につながることから、血小板数を測定した結果、群間の血小板数には有意な変化は認められなかった (Fig.32)。従って、nAg10、Ag+の母乳を介した曝露は、仔の血小板容積と血小板分布幅を低下させるが、血小板産生に影響を与えるほど深刻なものではないと考えられる。以上により、nAg10、Ag+の授乳期曝露は、仔の成長抑制、臓器障害、顕著な血液毒性等は誘発しないことが明らかとなった。

さらに、仔の脳機能を行動試験により網羅的に評価した。その結果、本実験における母体の摂取量 (サプリメントとして経口摂取し得る量の数十~数百倍程度) においては、行動毒性等の点で顕著な毒性を認めないことを明らかとした。行動への影響評価は、実験手法の困難さから、本研究ほど網羅的に解析した例は、ナノ粒子の安全性研究において乏しいことから、貴重な安全性情報となると考えられる。

15. 成体と乳幼仔での腸管吸収性の違い

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、昨年度までに我々は、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仔への移行性に関して検討した。その結果、ナノ銀粒子が母乳中へ移行し、その母乳を飲んだ乳幼仔の体内に吸収されることを明らかとてきた。一般に、こどもは成体と比較して腸管バリアが緩く、化学物質が体内に侵入しやすいことが知られている。そこで、出生後3日（乳幼仔）もしくは6週齢（成体）のマウスに nAg10、Ag⁺を、出生後3日の仔に分散性を維持して投与できる最大用量である 2.5 mg/kg で単回経口投与した。経時的に血中銀濃度を測定した結果、nAg10、Ag⁺を投与した際ともに、最高濃度の時点で比較して、乳幼仔は成体マウスよりも14倍以上高い血中銀濃度を示した（Fig.33）。従って、乳幼仔は成体と比較して、銀ナノ粒子を体内に吸収しやすい可能性、銀ナノ粒子の血中からの排泄能が低い可能性が示された。

16. 非晶質ナノシリカ投与による好中球増加と生殖毒性との関連解析

nSP70投与による生殖毒性と好中球画分の増加との関連を解析する目的で、抗Ly-6G抗体を前処置して好中球をdepletionしたうえで、nSP70を投与し、母体体重の推移、胎盤・胎仔重量について評価した。まず、母体体重を経日的に測定したところ、これまでの筆者らの検討結果と同様に、nSP70を投与することで、対照群と比較し、母体体重が有意に減少することが示された。一方で、好中球をdepletionしたうえでnSP70を投与し

た群では、母体体重の低下が亢進することが示された（Fig.34A）。即ち、nSP70投与による生殖毒性の発現に好中球の増加、あるいは活性化が重要な役割を果たしており、好中球のdepletionがnSP70投与による生殖毒性を悪化させることが示唆された。

そこで次に、母体体重の低下が亢進する結果について精査する目的で、摘出した子宮の重量を測定した。その結果、母体体重の結果と同様に、nSP70を投与することで、nSP70未処置群と比較し、子宮重量が有意に減少することが確認された。この時、nSP70単独投与群では、死亡胎仔が認められることを確認している。また、母体体重の結果と同様に、抗Ly-6G抗体を前処置し、好中球をdepletionすることで、nSP70投与による子宮重量の低下が亢進することが示された（Fig.34B）。そこで、摘出した子宮を観察したところ、nSP70単独投与群と比較し、好中球非存在下でのnSP70投与群では、子宮中に含まれる胎仔数が減少している傾向が認められた（Fig.34C）。このことから、好中球をdepletionすることで、nSP70投与による生殖毒性が悪化することが示された。

また、子宮から胎仔・胎盤を摘出し、子宮中に含まれている胎仔数を計測したところ、子宮所見と同様に、好中球をdepletionしたうえでnSP70を投与した群において、nSP70単独投与群と比較し、胎仔数が有意に減少することが示された（Fig.35A）。この時、好中球存在下でのnSP70投与群と好中球非存在下でのnSP70投与群の胎仔、胎盤を観察したところ、肉眼的所見では顕著な差は認められず（Fig.35B）、胎盤重量（Fig.35C）、胎仔重量（Fig.35D）を測定した結果にも有意な変動は認められなかった。さらに、nSP70投与後、胎仔を出産させ、好中球の存在下、非存在下での生存新生仔数を比較解析した。その結果、帝王切開での検討結果（Fig.35A）と同様に、好中球非存在下でnSP70を投与した群において、出産胎仔数の減少傾向が認められた（Fig.36A）。この時、

産まれてきた仔の体重 (Fig.36B)、および体長 (Fig.36C) に各群間で有意な差は認められなかった。以上の結果から、nSP70 投与による母体への影響、特に、妊娠維持の破綻に対し、好中球が抑制的に働く可能性が示された。

17. 好中球が妊娠維持における胎盤機能におよぼす影響の解析

一般に、胎盤は胎仔への栄養・酸素供給、老廃物の排泄などの機能を担う重要な器官であり、胎盤構造の崩壊やその機能不全は、胎仔死亡や胎仔発育不全につながることで知られている。これまでに筆者らは、nSP70 が胎盤の栄養膜層への傷害により胎盤構造の崩壊を誘導することを見出してきた。そこで、以降の検討では、好中球が妊娠維持における胎盤機能にどのように関与しているかについて解析を進めた。HE 染色による病理組織学的解析を実施し、胎盤構造への影響を評価した。これまでの検討結果と同様に、nSP70 投与群において、胎盤全体の赤みが少なく、血流量が乏しくなっていることが確認できた (Fig.37A)。また、栄養膜層における実線で囲った範囲を拡大写真で観察してみたところ、抗 Ly-6G 抗体を前処置した nSP70 投与群の胎盤において、nSP70 投与による傷害が増大していることが明らかとなった (Fig.37B)。さらに、破線で囲った範囲で認められるように、好中球非存在下で nSP70 を投与した群において、顕著な辺縁部のうっ血が確認され、好中球存在下で nSP70 を投与した群、および、Isotype を前処置した nSP70 投与群と比較し、その程度が亢進することが示された (Fig.37C)。以上の結果から、好中球を depletion することが、nSP70 投与による胎盤傷害の亢進につながり、胎仔数の減少を誘導したことが示唆された。

18. 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 (Fig.38a)、精巣重量 (Fig.38b)、精嚢重量 (Fig.38c)、精巣上体重量 (Fig.38d) の観点から生殖関連組織への影響を評価した。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 (Fig.39a)。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。次に、雄親の投与開始 35 日後から交配させた際の交配率 (Fig.39b)、雌親 1 匹当たりの出生仔数 (Fig.40a)、雄仔の割合 (Fig.40b)、出生仔の体重 (Fig.40c) を評価したが、群間で変化は認められなかった。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。

さらに、ナノシリカを雄親に曝露することによる、次世代影響を解析した。その結果、ナノシリカを雄親に曝露した雄仔で、短期記憶能力 (Fig.41a) や不安様行動 (Fig.41b) の低下などが認められた。この結果を受けて、これらの再現性の取得と共に、性差や異なる環境下での飼育による影響を解析した。その結果、短期記憶能力低下の再現性は取得できなかったものの、ナノシリカの雄親曝露により、不安様行動が低下するという再現性が得られた (Fig.42)。また、この不安様行動の低下は、雌仔や異なる環境で飼育した仔にも認められたことから、性別や生育環境が異なっても誘発される可能性が示された。

19. 非晶質ナノシリカの急性毒性と粒子径の連

関解析

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。その結果、nSP30~nSP300の粒子において、およそ45分後をピークとする投与量依存的な体温低下が観察された一方で、nSP10とmSP1000では体温低下が観察されなかった。また、粒子径毎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(Fig.43)。また、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、粒子径の減少に伴って高くなる傾向が示された(Fig.44)。さらに、血球検査・血液生化学検査を行った結果、濃度依存的な血小板数の減少および肝障害マーカーであるALTの増加が観察された。また、これらに関しては生存率と同様に、粒子径の減少に伴って作用が増強されることを明らかとした(Fig.45)。即ち、ナノ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、致死毒性や血小板数の減少、肝障害のように、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。

以上の結果より、ナノシリカ誘導性の急性毒性には、従来の報告通り、粒子径の減少に依存している毒性(致死毒性、凝固障害、肝障害)だけでなく、興味深いことに、特定の粒子径においてのみ誘導・増強される毒性(体温低下)が存在することが明らかとなった。これは「小さい粒子ほど強いハザードを有する」という一般的な認識とは異なる傾向を持つハザードが存在することを明確に示した結果であると考えている。従って、NMの安全性を確保するためには、単にサイズの増減に従って増減するハザードだけでなく、生体によって特定のサイズの粒子が認識されることで引

き起こされるハザードにも焦点を当てて解析を行う必要があると考えられる。

20. 非晶質ナノシリカによる肝障害の誘導に対する血小板の関与

非晶質ナノシリカの急性毒性に粒子径の減少に依存して増強される毒性(急性致死毒性、肝障害、凝固障害)と、粒子径特異的に発現する毒性(体温低下)が存在することから、少なくとも「急性致死毒性・肝障害・凝固障害」と「体温低下」はそれぞれ異なるメカニズムで誘導されている可能性が高いと考えられた。そこで本検討では、肝障害と体温低下に着目し、誘導メカニズムの解明に向けた検討を行った。

まず初めに、ナノシリカの過剰量投与によって誘導される肝障害に着目した。肝障害と同様に粒子径依存的な減少が認められた血小板は、当研究室の過去の検討において明らかとなったナノシリカによる、消費性凝固障害と関連することから、ナノシリカによる肝障害の誘導メカニズム解明に向け、肝障害の誘導に対する血小板の関与を精査した。マウスへ事前に抗血小板血清を処置しておいた24時間後に、体温低下を誘導せず、本研究に供したナノシリカのうち、肝障害を最も強く誘導し得るnSP10と、体温低下を最も強く誘導し、かつ肝障害も十分に誘導可能であるnSP50を尾静脈内投与した。その後、前述の結果と同様に、ナノシリカ投与4時間後において血液を回収し、肝障害マーカーの測定を行った(Fig.46)。なお、抗血小板血清を前処置したマウスの血液を回収して血球検査を行うことにより、血小板数が定量下限以下の数値となっていることを確認済みである。その結果、nSP10投与群においては、抗血小板血清の投与により、ALTおよびAST活性の値が有意に減少する傾向が観察された。一方で、nSP50投与群に関してはその傾向が観察されず、抗血小板血清の投与によってALTおよびASTに変動は観察されなかった。従って、nSP10による肝障害の誘導については、血小板を介する経路

が関与している可能性が考えられた。一方で、nSP50 による肝障害に関しては、抗血小板血清処置によって軽減されなかったことから、血小板を介する誘導メカニズム以外にも、例えば直接的な細胞傷害や、上述した ROS 産生を介した DNA 傷害などといった、血小板を介さない肝障害の誘導メカニズムが存在し、その寄与が粒子径によって異なる可能性が考えられる。従って、本結果を踏まえると、より詳細な検討は必要あるものの、少なくとも一部の粒子径の粒子に関しては、血小板を介したナノシリカの生体影響を防ぐことで、同時に肝障害を回避することができると考えられる。

21. 非晶質ナノシリカによる体温低下の誘導に対するケミカルメディエーターの関与

次に、ナノシリカの過剰量投与によって誘導される、体温低下を伴う一過性のショックのメカニズム解明を試みた。一過性の体温低下を特徴とするのが、I 型アレルギー反応の一つであるアナフィラキシーショックである。アナフィラキシーショックが起こると、ヒスタミンや血小板活性化因子 (PAF) といったケミカルメディエーターの作用によって毛細血管拡張が引き起こされ、一過性の体温低下が誘導されることから、体温低下の誘導に対するケミカルメディエーターの関与を評価した。PBS または nSP50 の投与 20 分後に血漿を回収し、ELISA によってヒスタミンおよび PAF の定量を行った (Fig.47)。その結果、PBS 投与群と比較して、nSP50 投与群において血漿中のヒスタミン濃度には増加が観察されなかった。その一方で、血漿中の PAF 濃度に関しては、nSP50 投与群において、PBS 投与群と比較して有意な増加が確認された。

そこで次に、PAF 受容体アンタゴニストを用いることで、ナノシリカ投与後の血中において産生されていた PAF の体温低下への関与を評価した。事前に PAF 受容体アンタゴニストである CV6209 をマウスへ処置しておき、その 30 分後

に nSP10 および nSP50 を投与した後、前節と同様に 75 分間の体温測定を行った (Fig.48)。なお、CV6209 の前処置によって、PAF を投与した際に誘導される体温低下が抑制されることは、事前に確認している。その結果、コントロールとして事前に PBS を処置しておいた群では、前節の検討と同様に体温低下が誘導されている一方で、CV6209 を事前に処置しておいた群においては、体温低下の誘導が有意に抑制された。よって、非晶質ナノシリカ投与後に血中で定量された PAF が、実際に体温低下の誘導に関与していることが示唆された。

そこで、PAF の産生に関わる細胞の同定を試みた。先ほどの検討結果より、本検討で観察されたアナフィラキシー様のショック症状は、ヒスタミン非依存性であることから、ヒスタミンに依存しない IgE 非依存性のアナフィラキシーと同様の機構で体温低下が誘導されている可能性が考えられた。そこで、IgE 非依存性アナフィラキシーショック時に PAF を産生する細胞として知られ、微粒子による炎症応答の誘導に関与していることも多く報告されているマクロファージに着目した。事前に Clophosome-A (クロドロン酸内包リポソーム) を処置してマクロファージを枯渇させておき、24 時間後に nSP10 および nSP50 を投与して、先ほどの検討と同様に体温測定を行った (Fig. 49a, b)。なお、Clophosome-A 投与 24 時間後におけるフローサイトメトリー解析により、脾臓中マクロファージが 90%程度減少していることを確認している。その結果、PBS および Control liposome を投与しておいた群では、体温低下が観察された一方で、Clophosome-A を投与した群においては、体温低下の誘導が有意に抑制された。つまり、マクロファージが枯渇している条件下で体温低下の誘導が抑制されたことから、ナノシリカによる体温低下の誘導に、マクロファージが関与している可能性が考えられた。そこで、各群に関して、ナノシリカ投与 20 分後において回収した血漿に関し、PAF 濃度の定量を行った。その結

果、体温低下と同様、Clophosome-A を投与しておいた群において PAF 濃度が低下する傾向が観察された (Fig.49c)。従って、ナノシリカ投与後の PAF 産生にマクロファージが関与している可能性が考えられた。一方で、本検討においては、Clophosome-A を投与しておくことで、体温低下が大幅に改善したにもかかわらず、PAF 濃度に関しては、部分的な減少に留まる結果となった。一般に、PAF は血小板凝集や炎症などに対して重要な働きを有する分子であり、血小板や好中球、好塩基球をはじめ、マクロファージ以外にも様々な細胞種によって産生されることが知られている。従って、本検討の結果を踏まえると、マクロファージ以外の PAF 産生細胞の関与にも焦点を当てて解析を行う必要があることが考えられる。

22. ナノシリカの事前反復投与がナノシリカ誘導性の急性毒性に与える影響評価

ナノシリカは食品や化粧品などの製品にも汎用されており、我々が複数回に渡って繰り返し曝露する可能性が考えられる。一方で、ナノシリカを繰り返し曝露した場合の、慢性的な生体影響を加味した検討は進められていない。そこで、ナノシリカの有効かつ安全な利用の促進に向け、ナノシリカを事前に反復投与した際の影響を、ナノシリカ誘導性の体温低下を指標として評価した。その結果、対照群と nSP50 投与群との間で変化は観察されなかった (Fig.50)。次に、投与 4 時間後において解剖し、回収した血液に関して血球検査・血液生化学検査を行った。その結果、血球数に関しては事前投与による影響の変化は観察されなかった一方で (Fig.51)、肝障害マーカーである ALT に関しては、nSP50 の事前投与によって変化する傾向が観察され、ナノシリカ誘導性の肝障害が増悪する傾向を示した (Fig.52)。この結果は、ナノシリカの反復投与により、ナノシリカに対する感受性が高まる可能性を示しているものであり、新たな安全性評価の視点が必要であると考えられた。

23. 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。

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 (Fig.53)。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 (Fig.54)。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 (Fig.53)。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 (Fig.55)。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、アレルギーと 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形成を観察した (Fig.56)。その結果、モデルアレルギーである 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ギーと 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、アレルギーと nSP30 の共皮膚曝露による IgG 抑制作用には、アレルギーと 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 (Fig.57)。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、皮膚からのアレルギー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た。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、アレルギーと nSP30 の凝集体形成により、アレルギー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 がアレルギーの皮膚動態へ与える影響を解析している。

IgE 性アレルギー患者の多くは、アレルギーに対する IgG があまり誘導されておらず、アレルギーに対する 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ギーが凝集することで、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。

24. 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 (Fig.58)。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、各粒子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 (Fig.59)。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。

25. 銀ナノ粒子の感作性評価

金属アレルギーでは、金属を曝露することで感作が成立した後、再度曝露した際に、金属が本来有する起炎性が獲得免疫依存的に増幅し、病態が発症する。本実験では、あらかじめ金属をナノ粒子あるいはイオンの状態で投与しておいたマウスに、再度同じ金属をナノ粒子あるいはイオンの状態で投与し (惹起投与)、それぞれに対する炎症応答の変化を指標として、ナノ粒子とイオンの感作における寄与を比較した。具体的には、nAg10、あるいは Ag+ を、足蹠に週 1 回、計 4 回投与した。なお近年、金属以外の接触過敏性皮膚炎における感作成立の条件として、自然免疫系の活性化が必須であることが明らかになっていることから、上記投与には、LPS を共投与した。最終投与の 1 週間後、今度は耳介に nAg10 あるいは Ag+ を皮内投与した。この後、nAg10 あるいは Ag+ による耳介の腫れを経時的に測定し、銀ナノ粒子あるいは銀イオンの前投与による銀への感作成立を評価した。溶媒のみを投与していた群において、nAg10、Ag+ の投与により、前述の通り一定の耳介の腫れが観察された (Fig.60a)。この腫れは、Ag+ を前投与していたマウスにおいては変動しなかった。従って、これまでの多くの報告と同様に、本実験系においても、イオンの前

投与では感作を成立させることはできなかった。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 (Fig.60a)。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 (Fig.60c, 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 (Fig.61)。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。

26. 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 (Fig.62a)。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 (Fig.62b)。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 (Fig.62c)。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 (Fig.62d)。

27. 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(Fig.63a)。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 による病態形成に、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 (Fig.63b)。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。

28. 金属ナノ粒子によるアレルギー誘導の普遍性

金属アレルギーは、体内に侵入した金属イオンに対する獲得免疫応答によって発症する病態であり、銀は金属アレルギーの原因となる金属であることが知られている。金属アレルギーの誘導機序としては、接触した金属からイオンが溶けだし、このイオンが自己のタンパクに結合することで獲得免疫応答の対象として認識される。一方で、金属イオンを単に投与するのみでは、金属アレルギーの動物モデルを作成することが困難であることが知られるなど、金属に対する感作成立の機

序は、ほとんど明らかになっていない。近年、金属から、イオンのみならず、ナノ粒子が放出されることや、体内の金属イオンから、ナノ粒子が形成される可能性が報告された。ナノ粒子の体内・細胞内動態が、イオンを含めた低分子とは大きく異なることや、ナノ粒子からイオンが徐放される機序を考え合わせると、金属アレルギーの発症が、ナノ粒子を介在として誘導される可能性が想起された。そこで、これまでに我々は、高い分散性を有するナノ銀粒子をモデル金属ナノ粒子として用い、金属アレルギー発症に金属ナノ粒子が与える影響を評価した。BALB/c マウスの足蹠に nAg10 あるいは Ag⁺を週一回、四週間投与した。最終投与の一週間後に、耳介部に再度 nAg、あるいは Ag⁺を投与し、耳介部の腫脹を経時的に測定した。この結果、事前に nAg10 を投与したマウスでは、nAg10 による耳介部の腫脹が増強することが示された。一方で、nAg10 に対する耳介部の腫脹の増強は、Ag⁺を事前に投与していたマウスでは観察されなかった。また、nAg10 事前投与マウスにおいて、Ag⁺を再度投与した場合にも、Ag⁺に対する耳介部の腫脹に変動は観察されなかった。以上の結果により、金属アレルギーの感作成立、および、病態発症において、金属ナノ粒子が重要な役割を果たしている可能性を見出してきた。

そこで、金属ナノ粒子が金属の感作成立に関わる普遍性を評価するため、金属アレルギー最大の要因であるニッケルを用いた検討を実施した。本検討では、一次粒子径が 3 nm のニッケル粒子である nNi3 と、イオンの対照群として塩化ニッケル溶液 (II) (Ni²⁺)を用いた。銀における検討と同様に、nNi3 を前投与しておいたマウスにおいて、nNi3 あるいは Ni²⁺による耳介の腫れ、病理標本における炎症細胞の浸潤などを指標として、感作成立を評価した。その結果、溶媒前投与群と Ni²⁺前投与群では、nNi3、Ni²⁺のいずれに対する耳介の腫れにも差は検出されなかった (Fig.64a)。一方で、nNi3 前投与マウスにおいて、

nNi3 および Ni²⁺による耳介の腫れが、溶媒前投与マウスと比べて有意に増幅し、感作が成立していることが示された。また病理所見の結果も同様に、nNi3 の前投与により、nNi3、Ni²⁺いずれに対する炎症応答も増幅していることが示された (Fig.64b)。以上より、銀と同様にニッケルにおいても、イオンではなく、ナノ粒子を曝露することで、ニッケルに対する感作が成立することが示された。ここで、金属アレルギー患者において、特定の金属に対するアレルギーを有している場合であっても、パッチテスト上、しばしば複数の金属へ陽性反応が現れることが知られている。即ち、金属アレルギーでは、感作金属以外に対する交差反応性が観察されることがある。そこで、本モデルにおける金属間の交差性を、nAg10 感作における nNi に対する起炎性、並びに nNi 感作マウスにおける nAg10 の起炎性を指標として評価した。その結果、nAg10 感作マウスでは、nNi に対する起炎性は増強されず、nNi マウスにおける nAg10 に対する起炎性も同様であった (Fig.65)。従って、本モデルでは、ニッケルと銀の間には交差性がないことが示された。

29. 金属ナノ粒子による金属アレルギー発症機序解明に向けた情報収集

ナノ粒子への曝露により、イオンに対する免疫応答が効率的に誘導されることが明らかとなった。その機序として、ナノ粒子がイオンのキャリアとして働いている可能性が考えられた。即ち、①接触性皮膚炎などで感作が成立する場合は皮膚の所属リンパ節であること、②一般にナノ粒子は、免疫誘導に必須のリンパ節への移行性・滞留性、あるいは樹状細胞などによる取り込みといった面で、低分子よりも優れることが知られていることを考慮すると、イオン単体よりも、ナノ粒子の状態の方が、免疫誘導に必要な場へ効率的にイオンを届けられる可能性が考えられる。以上の可能性を検証するため、まず、その前提となるイオン共存の必要性を、最も安定な金属である 10 nm

の金ナノ粒子 (nAu10) と、非金属のナノ粒子である 10 nm の非晶質ナノシリカ (nSP10) を用いて評価した。nAu10、nSP10 の感作性を、銀やニッケルと同様の実験系にて評価した。その結果、nAu10 あるいは nSP10 の前投与により、それぞれに対する耳介の腫れは増強されなかった (Fig.66)。従って、本実験系において、nAu10、nSP10 の感作性はない、あるいは非常に弱いことが示された。従って、銀やニッケルナノ粒子における感作性は、イオンを放出する性質によって担われていることが示唆された。

30. ICP-MS によるリンパ節中金属量の定量

次に、銀ナノ粒子の所属リンパ節への移行性並びに滞留性と、感作成立の関連を評価した。各粒子径の銀ナノ粒子あるいは Ag^+ 投与後の所属リンパ節における局在を、ICP-MS を用いて定量的に評価した。この結果、銀ナノ粒子は、 Ag^+ と比較して顕著にリンパ節移行性、あるいは滞留性が優れることが示された (Fig.67)。nAg10 がイオンに対して強い免疫応答を誘導する事実を考慮すると、 Ag^+ と比べて nAg10 の感作性が高い理由の一つとして、以下のような可能性が考えられる。即ち、①感作成立の場への移行・滞留性の面で優れる nAg10 は、リンパ節へ効率的に局在し、②その場でイオンを放出することで、樹状細胞へ効率的にイオンを引き渡し、③その結果として、樹状細胞による効率のよいイオンの抗原提示が可能となるため、それを認識する金属特異的 T 細胞が強く誘導される (活性化、増殖し、金属特異的な炎症応答を誘導できるようになる)、という機序の可能性である。今後は、リンパ節でのイオン放出の可能性をより詳細に追及すると共に、ナノ粒子である点が、樹状細胞内への取り込みなどの点においても利点を有する可能性を追求することで、ナノ粒子が高い感作性を発揮する機序を明らかにできると考えられる。

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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Yoshida T., Yoshioka Y., Morishita Y., Aoyama M., Tochigi S., Hirai T., Tanaka K., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Protein corona changes mediated by surface modification of amorphous silica nanoparticles suppress

- acute toxicity and activation of intrinsic coagulation cascade in mice., *Nanotechnology.*, 26(24):245101, 2015.
12. Hirai T., Yoshioka Y., Takahashi H., Ichihashi K., Uda A., Mori T., Nishijima N., Yoshida T., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Takagi T., Ishii K., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Cutaneous exposure to agglomerates of silica nanoparticles and allergen results in IgE-biased immune response and increased sensitivity to anaphylaxis in mice., *Part. Fibre. Toxicol.*, 12(1):16, 2015.
 13. Wakimoto T., Uchida K., Mimura K., Kanagawa T., Mehandjiev TR., Aoshima H., Kokubo K., Mitsuda N., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Kimura T., Yanagihara I. : Hydroxylated Fullerene: a potential anti-inflammatory and anti-oxidant agent for preventing mouse preterm birth., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 213(5):708, 2015.
- 【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. 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.
 3. 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.
 4. Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Recent topics on development of nanomaterials and nano-safety science., *Yakugaku Zasshi.*, 134(6), 721-2, 2014.
 5. Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Nano-safety Science for Sustainable Nanotechnology., *Yakugaku Zasshi.*, 134(6), 737-42, 2014.
 6. 堤 康央: ナノマテリアルの安全性評価(1) ., *MEDCHEM NEWS.*, 25(1), 45-6, 2015
 7. 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.
 8. Hirai T., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Potential hazards of skin exposure to nanoparticles., *Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances.*, Springer., 123-35, 2015.
 9. Morishita Y., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Reproductive and developmental effects of nanomaterials., *Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances.*, Springer., 77-101, 2015.
 10. 堤 康央: ナノマテリアルの安全性評価(2) ., *MEDCHEM NEWS.*, 25(2), 109-10, 2015.
 11. Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Applications and safety of nanomaterials used in the food industry., *Food Safety.*, 3(2), 39-47, 2015.
 12. 堤 康央 : ナノマテリアルの安全性評価 (最終回) ., *MEDCHEM NEWS.*, 25(3), 158-59, 2015.
 13. 堤 康央 : 「安全と安心」を強みにした、付加価値の高い化粧品への期待., *日本化粧品学 40 周年記念誌 (寄稿)* ., 39, 76-8, 2015.
 14. Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi

- Y. : Biocompatibility of nanomaterials., Nanomaterials in Pharmacology., Springer., 185-99, 2015.
15. 東阪和馬 : ナノ医薬の安全性確保に向けたナノ安全科学研究の推進. Drug Delivery System. 31(2): 168-9, 2016.
- ② 学会発表
- 【シンポジウム等 : 合計 20 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 回日本毒性学会., 千葉 (千葉) , 2013 年 6 月.
 2. 吉岡靖雄, 堤 康央 : ナノマテリアルの物性-動態-生体影響の連関評価., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉) , 2013 年 6 月.
 3. Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : The importance of systemic nanotoxicological and toxicokinetic analysis for ensuring the safety of nanomaterials., The XIII International Congress of Toxicology, Seoul (Korea), 30 June-4 July, 2013.
 4. 堤 康央 : ナノとバイオを融合した創薬基盤技術～安全かつ有用な最先端医薬の開発を目指して～., シオノギ講演会., 大阪., 2013 年 7 月.
 5. 堤 康央 : ナノマテリアルの ADMET 研究の現状と創薬への展開., 創薬動態フォーラム 2013., 金沢 (石川) , 2013 年 7 月.
 6. 堤 康央 : 薬学への招待., 大阪府立三国丘高等学校., 大阪., 2013 年 8 月.
 7. 堤 康央 : 医薬品・化粧品・食品素材の毒性・安全性評価～ナノマテリアルを一例に～., 株式会社林原., 2013 年 9 月.
 8. Yoshioka Y., Hirose A. : Recent developments in risk assessment of nanomaterials and nano safety science., 49th Congress of the European Societies of Toxicology, Interlaken (Switzerland), 1-4 September, 2013.
 9. 吉岡靖雄, 堤 康央 : ナノマテリアルの安全性確保に資する微粒子の免疫毒性評価., 第 20 回日本免疫毒性学会学術大会., 東京 (東京) , 2013 年 9 月.
 10. 堤 康央 : 薬学への招待状～創薬の最前線と阪大薬学の挑戦～., 三丘セミナー., 大阪., 2013 年 12 月.
 11. 堤 康央 : ナノ安全科学研究の現状と今後～トキシコ・バイオマーカー探索から代替法開発を含めて～., 日本動物実験代替法学会第 26 回大会., 京都 (京都) , 2013 年 12 月.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 吉岡靖雄、東阪和馬、堤 康央 : 金属系ナノ粒子の免疫毒性評価～ナノ安全科学研究による Sustainable Nanotechnology を目指して～., 第 26 回日本微量元素学会学術集会., 札幌 (北海道) , 2015 年 7 月.
 16. Higashisaka K. : Promotion of sustainable nanotechnology by fusion between nano-safety science and nano-safety design., The ceremony presentation at College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University., Hangzhou (China), 12 October, 2015.
 17. 堤 康央 : ナノマテリアルの安全性研究の現状と今後., 大阪府立公衆衛生研究所創立記念講演会., 大阪 (大阪) ., 2015 年 11 月.
 18. Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi

Y. : Elucidation of immunotoxicity of nanoparticles for developing the sustainable nanotechnology., The international chemical congress of pacific basin societies., Hawaii (USA), 15-20 December, 2015.

19. 堤 康央、広瀬明彦 : Conclusion., 日本薬学会第 136 年会., 横浜 (神奈川県), 2016 年 3 月. (シンポジウム: ナノマテリアルの社会受容に向けた安全性評価の最新動向)
20. 東阪和馬 : ナノ安全科学研究とナノ最適デザイン研究の融合による sustainable nanotechnology の推進., 日本薬学会第 136 年会., 横浜 (神奈川県), 2016 年 3 月. (シンポジウム: ナノマテリアルの社会受容に向けた安全性評価の最新動向)

【国内学会発表 : 合計 132 件】

1. 吉岡靖雄, 宇治美由紀, 山口真奈美, 森 宣瑛, 三里一貴, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央 : 食品中サブナノマテリアルの経口投与後動態に関する基礎解析 Part 1~サブナノ白金を用いた検討~, 第 105 回日本食品衛生学会学術講演会., 東京 (東京), 2013 年 5 月.
2. 東阪和馬, 宇治美由紀, 山口真奈美, 森 宣瑛, 三里一貴, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央 : 食品中サブナノマテリアルの経口投与後動態に関する基礎解析 Part 2~サブナノ白金を用いた検討~, 第 105 回日本食品衛生学会学術講演会., 東京 (東京), 2013 年 5 月.
3. 吉岡靖雄, 平井敏郎, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央 : 微粒子に対する生体応答 1—ナノマテリアルの自然免疫活性化機構の解明に向けて—., 第 60 回日本生化学会近畿支部例会., 吹田 (大阪), 2013 年 5 月.
4. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 高橋秀樹, 市橋宏一, 西島伸郎, 吉田徳幸, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央 : 微粒子に対する生体応答 2—非晶質ナノシリカによる経皮アレルギー感作促進作用—., 第 60 回日本生化学会近畿支部例会., 吹田 (大阪), 2013 年 5 月.
5. 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 平井敏郎, 三里一貴, 高橋秀樹, 市橋宏一, 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 Part 1~サブナノ銀の経皮体内動態解析~, 第 38 回日本化粧品学会., 東京 (東京), 2013 年 6 月.
6. 東阪和馬, 吉田徳幸, 平井敏郎, 三里一貴, 高橋秀樹, 市橋宏一, 角田慎一, 吉岡靖雄, 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 Part 2~サブナノ銀の経皮体内動態解析~, 第 38 回日本化粧品学会., 東京 (東京), 2013 年 6 月.
7. 東阪和馬, 宇治美由紀, 山口真奈美, 三里一貴, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央 : サブナノマテリアルの安全性評価に向けた ADMET 基礎解析., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
8. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 高橋秀樹, 市橋宏一, 西島伸郎, 吉田徳幸, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央 : ナノ微粒子と抗原との相互作用は経皮曝露を介して未知のアレルギー反応を促進する., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
9. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 高雄啓三, 吉岡靖雄, 吾郷由希夫, 佐藤宏祐, 野尻奈央, 田中智大, 田熊一徹, 角田慎一, 松田敏夫, 宮川 剛, 東阪和馬, 堤 康央 : 非晶質ナノシリカの妊娠期曝露が仔の情動機能へ及ぼす影響探索., 第 40 回日本毒性学会学術年会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
10. 高橋秀樹, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 市橋宏一, 西島伸郎, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央 : 遺伝的背景に着目したナノマテリアルの生体影響探索., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
11. 三里一貴, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 宇高麻子, 森 宣瑛, 平井敏郎, 角田慎一, 東

- 阪和馬, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経口摂取による食物抗原に対する免疫応答変動., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
12. 青山道彦, 吉岡靖雄, 山下浩平, 平 菜由, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: プロテインコロナに着目したナノ・サブナノマテリアルの安全性に関する基礎評価, 第 40 回日本毒性学会学術年会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
 13. 市橋宏一, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 西 島伸郎, 吉田徳幸, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: サブナノ白金の経皮リスク解析に資する基礎的検討., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
 14. 國枝章義, 東阪和馬, 永野貴士, 岩原有希, 田中康太, 畑 勝友, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: 非晶質ナノシリカ曝露が宿主生体防御システムにおよぼす影響解析., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
 15. 野尻奈央, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 佐藤宏祐, 田中智大, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: サブナノ白金の母乳移行性に関する安全科学的検討., 第 40 回日本毒性学会学術年会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
 16. 森 宣瑛, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 宇高麻子, 平井敏郎, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 食品中ナノマテリアルの安全性確保に向けた腸内細菌叢への影響解析., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
 17. 田中康太, 東阪和馬, 永野貴士, 國枝章義, 岩原有希, 畑 勝友, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: 環境中微粒子曝露による脳疾患の発症・悪化に関する基礎的検討～ナノ銀の経鼻曝露による脳内移行性の定量評価～., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
 18. 山口真奈美, 吉岡靖雄, 吉田徳幸, 宇治美由紀, 三里一貴, 宇高麻子, 森 宣瑛, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: サブナノ白金の経口曝露後動態に関する基礎解析., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
 19. 森村智美, 関 剛幸, 高岡 裕, 青木聡子, 又吉 健, 西垣嘉人, 吉岡靖雄, 堤 康央, 桑形麻樹子: 粒子径の異なるナノ白金の LLNA 試験., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
 20. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 高雄啓三, 吾郷由希夫, 佐藤宏祐, 野尻奈央, 田中智大, 田熊一徹, 角田慎一, 松田敏夫, 宮川 剛, 東阪和馬, 堤 康央: 妊娠期の非晶質ナノシリカ曝露が次世代の情動機能へ及ぼす影響探索., 第 36 回日本神経科学大会., 京都 (京都), 2013 年 6 月.
 21. 吉岡靖雄, 平 菜由, 山下浩平, 青島央江, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: 新規経口ナノ DDS 医薬の開発に向けた C₆₀ フラーレン誘導体の Nano-Safety Design., 第 29 回日本 DDS 学会学術集会., 京都 (京都), 2013 年 7 月.
 22. 山本麻記子, 小野寺章, 石橋孝文, 岡 若奈, 武田直也, 弘内淳美, 峯松真梨, 矢埜みなみ, 米倉玲奈, 米村重信, 堤 康央, 河合裕一: 銀ナノ粒子による細胞毒性はミトコンドリアからの ROS 産生に関連する., 第 86 回日本生化学会大会., 横浜 (神奈川), 2013 年 9 月.
 23. 武田直也, 小野寺章, 屋山勝俊, 古田拓也, 石橋孝文, 岡 若奈, 弘内淳美, 峯松真梨, 山本麻記子, 矢埜みなみ, 米倉玲奈, 岡本博, 米村重信, 堤 康央, 河合裕一: インビトロ血管機能解析によるナノシリカ・ナノ酸化亜鉛の特性評価., 第 86 回日本生化学会大会., 横浜 (神奈川), 2013 年 9 月.
 24. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 高橋秀樹, 市橋宏一, 西島伸郎, 吉田徳幸, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経皮免疫毒性は抗原との凝集体形成を介して発揮される.,