

皮膚細胞を用いた化粧品中のナノマテリアルの安全性評価 ～ナノマテリアルの皮膚ランゲルハンス細胞に対する影響評価～

大阪大学薬学研究科毒性学分野

堤 康 央

Amorphous silica nanoparticles (nSPs), widely used in cosmetics, medicines, and foods, are thought to pose risks induced by changes in the biologic reactivity and kinetics of bulk materials due to the reduction of the particle size. In a previous study, we demonstrated that silica particles with a diameter of 70 nm penetrated the stratum corneum (SC) of mouse skin and were taken up by living cells such as keratinocytes and Langerhans cells. Here, to reveal the relationship among particle size, distribution, and cellular response, we evaluated size-dependent intercellular localization and cytotoxicity of silica particles in a mouse epidermal Langerhans cell line (XS52). Treatment with silica particles of various diameters (70, 300, or 1000nm) increased both the amount of silica particles taken up into the cells and cytotoxicity in accordance with the reduction of particle size. These findings suggest that smaller-sized silica particles induce greater cytotoxicity against Langerhans cells in association with a greater quantity of silica particles taken up by the cells.

1. 緒 言

近年のナノテクノロジーの発展に伴い、化粧品や食品、医薬品分野を中心として、ナノマテリアルを配合した数多くの製品が既に実用化・上市されている。ナノマテリアルは、サイズの減少に伴い、電気的・磁氣的・光学的特性や組織浸透性などといった点において、従来までのサブミクロンサイズ以上の素材とは異なる特徴的な機能を有することが明らかとなっている。そのため種々の産業に革命を起こす新素材として強く期待されている。化粧品産業においては、粒子サイズを小さくすることにより得られる使用感の向上や紫外線遮蔽能の向上といった利点から、ナノシリカやナノ酸化チタンなどのナノマテリアルが多くの製品に使用されており、その使用量は、世界で年間約2000トンにも達することが報告されている。

このようにナノマテリアルが我々の日常生活に欠かせない素材となっている一方で、ナノマテリアルは、これら特徴的な機能を反映して、サブミクロンサイズ以上の従来素材とは異なる生体内動態や生体影響を發揮する可能性が危惧され始めている。実際に近年、遺伝子改変マウスなどを用いた安全性試験から、カーボンナノチューブがアスベスト様の発がんリスクを有するなど、ヒトの健康を確保する上で軽視できない事実が続々と報告されている^{1), 2)}。事実、我々の研究グループの検討結果においても、直径が100nm以下の非晶質ナノシリカが、皮膚角質バリアを通過して体

内に吸収され得る可能性を見出している。しかしながら、ナノマテリアルの安全性研究は世界経済協力機構 (OECD) の主導のもとで進められているものの、ハザード情報が散在するばかりで具体的な安全性評価指針の策定や安全なナノマテリアルの設計指針に関する情報は皆無である。これは、従来までのサブミクロンサイズの素材の知見に基づき、ナノマテリアルの場合でも曝露されても吸収されないだろうという誤った認識にも大きく影響されている。このままでは、ナノマテリアルの体内吸収性/生体内動態に関する検討がなされぬまま、ハザード情報のみを鵜呑みにした科学的根拠に乏しい無闇な使用規制が施行されてしまい、ナノマテリアルの有用性を享受した豊かな社会の構築や産業発展が阻害されてしまいかねない。従って、ナノマテリアルと従来までのサブミクロンサイズ以上の素材との体内/細胞内動態や生体/細胞への影響における相違点を科学的根拠に基づいて立証し、ナノマテリアルの物性を反映した安全性を評価し、それらの情報を基盤としてより具体的な安全性評価の推進と情報発信、安全設計指針の提示が急務となっている。

本稿では、マウスランゲルハンス細胞株 (XS52細胞) を用いて、化粧品基材としての非晶質ナノシリカの粒子サイズと細胞内局在や細胞傷害性/酸化ストレス誘導との関連に焦点を絞って解析し、興味深い知見を得たので報告し、当該成果が、安全で安心、そして魅力的な化粧品/化粧品の創出に結びつくことを期待している。

2. 実 験

2.1 シリカ粒子

本研究では、赤色蛍光色素 (RedF) で標識された直径70nm (nSP70)、300nm (nSP300)、1000nm (mSP1000) の非晶質ナノシリカを使用した。



Safety science for nanomaterials in cosmetics using skin-related cells

Yasuo Tsutsumi

Laboratory of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

2.2 細胞培養

マウスランゲルハンス細胞株 (XS52細胞) はマウス GM-CSF (2 ng/ml)、10% マウス皮膚由来繊維芽細胞 (NS47細胞) の培養上清、10% 非働化ウシ胎児血清、1% 非必須アミノ酸、1% L-グルタミン、1mM ピルビン酸ナトリウム、1% 2-メルカプトエタノール、10mM HEPES 緩衝液、1% 抗生物質を含む RPMI-1640 medium (ナカライテスク) を用いて、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

2.3 透過型電子顕微鏡観察

1×10⁴ 個の XS52細胞 を 8穴チャンバースライドに播種し、24時間後に終濃度が 100µg/ml になるように nSP70、nSP300、mSP1000 を添加した。ナノシリカを添加して 24 時間培養した XS52細胞 を PBS で洗浄した後に、氷冷した 2.5% グルタルアルデヒド液で 1 時間固定した。続いて 0.1M リン酸緩衝液で洗浄した後に 1% 四酸化オスmium で 30 分間後固定し、さらに上昇エチルアルコールで脱水した。常法に従ってこれらの標本をエポキシ樹脂で包埋し、熱重合により硬化させた。この標本からダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作製し、無染色あるいは酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛の二重電子染色を施した後に、透過電子顕微鏡を用いて観察した。

2.4 細胞増殖試験 (³H) チミジン取り込み試験)

1×10⁴ cells の XS52細胞 を 96穴プレートに予め播種し、24時間後に種々の濃度に調製した nSP70、nSP300、mSP1000 を添加した。各ナノシリカを添加して 18 時間後に、1 µCi/well となるように [³H] チミジンを添加し、さらに 6 時間培養した。培養終了後に細胞内に取り込まれた [³H] チミジンの放射活性 (cpm) を液体シンチレーションカウンター (TopCounter, PerkinElmer, MA, USA) を用いて測定した。

2.5 細胞膜傷害性試験 (LDH release assay)

ナノシリカの細胞膜傷害性は、ナノシリカを曝露した XS52細胞 の上清中に放出された Lactate dehydrogenase (LDH) 量を指標として評価した。1×10⁴ cells の XS52細胞 を 96穴プレートに予め播種し、24時間後に種々の濃度に調製した nSP70、nSP300、mSP1000 を添加した。各ナノシリカを添加して 24 時間後、細胞上清を回収し、上清中の LDH 量を LDH cytotoxicity test (WAKO, Osaka, Japan) を用いて定量した。尚、細胞膜傷害性 (% of control) は 0. % Tween を添加群の LDH 放出量を 100 % として算出した。

2.6 非晶質ナノシリカ添加時の活性酸素種 (ROS) の測定

活性酸素種 (ROS) 量の評価には蛍光プローブである

2',7'-dichlorofluorescein (DCFH-DA) を用いた。DCFH-DA は、細胞内において ROS と反応して DCFH となり、蛍光を発する。3×10⁴ 個の XS52細胞 を 96 プレートに予め播種し、24 時間後に種々の濃度に調製した nSP70、nSP300、mSP1000 を添加した。各シリカを添加して 3 時間後、phenol red free の RPMI-1640 培地 (ナカライテスク) で 3 回洗浄操作を行い、10µM に調製した DCFH-DA を含有した phenol red free の RPMI-1640 培地を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。30 分培養後、DCFH の蛍光強度を励起波長 485nm、蛍光波長 530nm で蛍光プレートリーダーを用いて測定した。

3. 結果

これまでに我々は、化粧品基材として粒子径 70nm の非晶質ナノシリカをマウスの皮膚に塗布したところ、角質層を通過し、角化細胞やランゲルハンス細胞などの細胞内に取り込まれることを明らかとしている。これらの結果は、直径が数百 nm 以上の従来素材では見られない現象であり、従来素材では予想もしなかった想定外の生体影響を誘発する可能性を示している。これらの結果を踏まえて、本論文ではマウスランゲルハンス細胞株 (XS52細胞) の *in vitro* 培養系を用いて、ナノシリカの粒子径と細胞内動態や細胞影響との関連を解析した。初めに、非晶質ナノシリカの粒子径が細胞内局在に与える影響について評価する為に、100µg/ml の nSP70、nSP300、mSP1000 を 24 時間処理した XS52細胞 を透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、Fig. 1 に示すように、nSP300 あるいは mSP1000 を適用したいずれの群において各シリカが細胞内に侵入した像が認められた (Fig. 1c, d)。それに対して、nSP70 は、細胞内に侵入するばかりか核膜を透過して核内に侵入していた (Fig. 1a, b)。更に、粒子サイズの減少に伴い、細胞に取り込まれる粒子量の増加が認められた。これらの結果は、直径 70nm の非晶質ナノシリカが従来までのサブミクロンサイズ以上のシリカとは異なる細胞内動態特性を示すことを示唆している。更に、nSP70 は、nSP300、mSP1000 とは異なる細胞内局在を示すことから、細胞に対する反応性も異なる可能性が示された。

そこで次に、シリカの粒子サイズが XS52細胞 の増殖能に与える影響について評価した。その結果、Fig. 2 に示すように、ナノシリカ処理により、XS52細胞 の増殖は粒子径依存的に阻害されることが示された。nSP70、nSP300、mSP1000 の IC₅₀ 値は、それぞれ 4.2µg/ml、32.6µg/ml、75.0µg/ml であり、粒子サイズの小さいシリカほど、より低濃度で XS52細胞 の増殖阻害を示すことが明らかになった。以上の結果は、粒子サイズが、細胞内局在と同様に細胞に対する反応性に対しても大きく影響を及ぼすことを示唆している。続いて、ナノシリカによる粒子径依存的な細胞

胞傷害性の機構解明を目的に、膜傷害性による細胞傷害性の指標である Lactate dehydrogenase (LDH) 量の測定を行った。ナノシリカを XS52 細胞に添加し、24 時間後に回収した培養上清中の LDH 放出量は、Fig. 3 に示すように、nSP300、nSP70 添加群では濃度依存的な LDH の放出量の増加が認められた。特に 30 μ g/ml の nSP70 添加群において非常に高い LDH 放出量 (193 \pm 6.8% of the control) が認

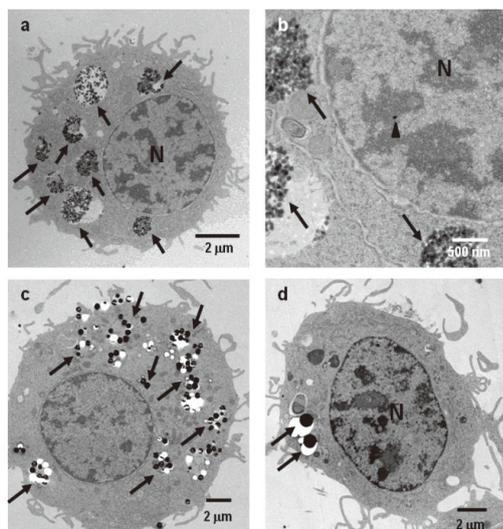


Fig.1 Localization of each silica particles in XS52 cells (arrows).

XS52 cells were treated for 24 hr with nSP70 (a and b), nSP300 (c) and mSP1000 (d). nSP300 and mSP1000 were only located cytoplasm. On the other hands, nSP70 was located in nucleus as well as cytoplasm (b, arrow head). Scale bars; 2 μ m (a, c and d), 500 nm (b)

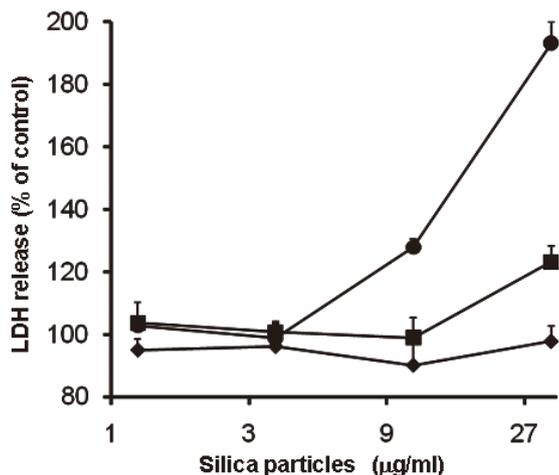


Fig. 3 Effect of silica particles against membrane damage of XS52 cells.

Cellular membrane damage on XS52 cells after incubation with nSP70 (circle), nSP300 (square) and mSP1000 (diamond) for 24 hr were evaluated by LDH release assay. The percentage of cellular membrane damage rate was relative data as compared to the negative (medium) and positive (0.2% Tween20) control. The data were presented with means \pm SD.

められた。一方で、mSP1000 添加群では LDH の放出は確認できなかった。この結果より、ナノシリカによる XS52 細胞に対する粒子サイズ依存的な細胞傷害性は細胞膜に対する傷害性の違いに起因していることが示された。

安全なナノシリカの創出や開発支援を念頭に、ROS 産生の観点から XS52 細胞の細胞傷害性をはじめとした細胞毒性の発現メカニズムの解明を試みた (Fig. 4)。各粒子サ

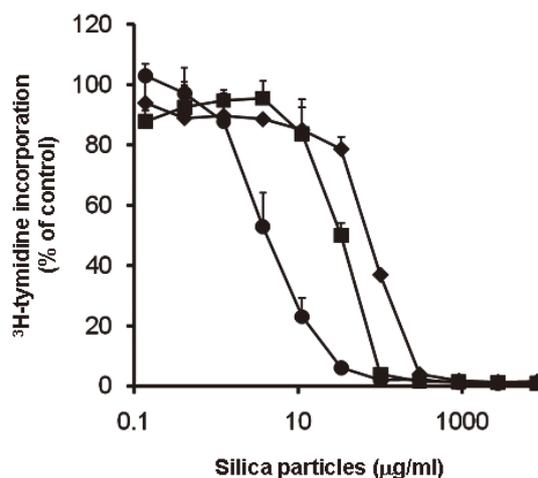


Fig. 2 Effect of various sized silica particles against the proliferation of XS52 cells.

The proliferation of XS52 cells after incubation with nSP70 (circle), nSP300 (square) and mSP1000 (diamond) for 24 hr were evaluated using tritium thymidine uptake assay. The percentage of cell proliferation rate was relative data as compared to the negative control. The data were presented with means \pm SD.

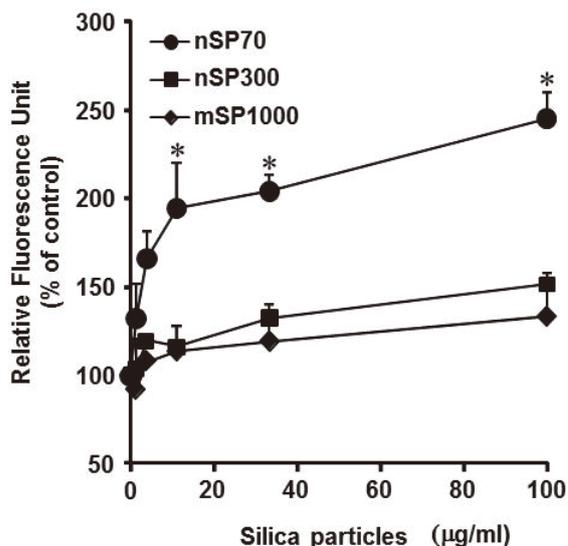


Fig. 4 Detection of reactive oxygen species (ROS) induced by silica particle treatment in XS52 cells.

XS52 cells were incubated with various concentrations of nSP70 (circles), nSP300 (squares), and mSP1000 (diamonds) for 3 h. Total ROS induced by silica particles were expressed as relative fluorescence units in the DCFH assay. Data are presented as means \pm SD (n=4). *P < 0.01 vs same dose of nSP300 and mSP1000.

イズのシリカをXS52細胞に添加し、3時間後のROS産生量をDCFH-DAを用いて測定した結果、全てのサイズの非晶質シリカにおいて、作用濃度に依存したROS産生が認められた。特にnSP70添加群では、nSP300、mSP1000ではROS産生が認められなかった低濃度添加時においても、コントロール群と比較して約2倍のROS産生が認められており、サブミクロンサイズのシリカよりも高いROS産生能を有することが明らかとなった。ROSは、DNA傷害や炎症反応の起点となり得る。従って、直径100nm以下の素材を対象として安全性を評価するに当たっては、ROSを起点とした遺伝毒性や免疫毒性について特に精査する必要があるものと考えられた。また、これらの事実、ナノシリカにROS産生を誘導しない何らかの修飾を施すことが出来れば、安全かつ有用なナノシリカを創製できることを示すものである。現在、ナノ材料に加え、サブナノ材料の経皮安全性の解析やアトピーといった皮膚疾患との関係など、さらなる追求を始めている。

4. 考 察

化粧品分野において、ナノ材料は紫外線遮蔽能の向上や使用感の向上といった利点から我々の生活に多大なる恩恵をもたらす新素材として大きな期待が寄せられている。しかし一方で、ナノ材料のリスク評価に関する情報開示は極めて少なく、本邦におけるナノ材料の安全性評価研究は欧米諸国に比べると圧倒的に立ち遅れている。従って、これまで殆ど検討されていなかったナノ材料の体内吸収性やハザードの明確化およびメカニズムの解明を積極的に推進すると共に、ナノシリカの物性が体内/細胞内動態や生体/細胞に対する反応性に与える影響について精査する必要がある。そこで我々は、非晶質ナノシリカに関して物性-動態-安全性の連関解析を進めており、これまでの検討において、粒子サイズが皮膚透過性に与える影響について解析を行い、nSP70のみがマウスの角質層を通過し皮膚ランゲルハンス細胞に取り込まれることを明らかとしている。そこで本検討においては、マウスランゲルハンス細胞を用いて粒子サイズが細胞内局在と細胞に対する反応性に与える影響について評価するために、nSP70、nSP300、mSP1000それぞれの細胞内局在と細胞傷害性を解析した。その結果、粒子径依存的に細胞内への取り込み量・細胞傷害性が増加すること、更に、核内移行性という点において、nSP70のみが独自の細胞内動態を示すことを明らかとした。そこで次に、安全なナノシリカの創出や開発支援を念頭に、XS52細胞を用いて、非晶質ナノシリカによる細胞傷害性の発現をROS産生の観点から解析した。その結果、粒子径依存的なROS産生の増大が認められ、細胞傷害性の発現と同様の傾向を示すものであった。ROSは、生体内のエネルギー代謝や感染症防御過

程において発生する一連の活性分子種 (O_2^- 、 H_2O_2) である。実際に、動脈硬化などの生活習慣病や代謝疾患性疾患、アルツハイマー病など様々な疾患の発症・悪化や、細胞レベルにおいてもアポトーシスやDNA損傷などの多くの細胞内ストレス応答に関与していることが知られている。我々はこれまでに、ヒト皮膚角化細胞を用いた検討において、非晶質ナノシリカによるDNA損傷には、ROS産生の関与が関与していることを見出している。この事実を踏まえると、貪食能を有するランゲルハンス細胞においても同様に、エンドサイトーシスによる非晶質ナノシリカの細胞内取り込みを介したROS産生により、DNA損傷などの細胞毒性を誘発していることが予想され、これが細胞傷害性の発現につながる可能性を考えている。ROS産生と細胞応答性の関係について、未だ不明な点は多くあるが、近年、ROS産生経路の一つであるNADPH oxidaseが、異物が細胞内に取り込まれる際にエンドソーム膜にリクルートされ、ROS産生を通じて異物の除去に寄与することが明らかとなっている。例えば、アスベストや結晶性シリカなどの微粒子状の異物が炎症を引き起こす際に、粒子が細胞に侵入することにより発現するNADPH oxidaseの関与が報告され、これらの報告ではNADPH oxidaseから産生されたROSがNALP3を活性化することが明らかとされている。以上の点を踏まえ、現在我々はROS産生経路と細胞毒性の発現についてROS産生経路の観点から解析を進めている。また、ランゲルハンス細胞や皮膚上皮細胞のROS産生を介して、皮膚免疫系の攪乱が誘発されることも報告されており、この点も加味すると、非晶質ナノシリカが皮膚免疫系に対する影響も精査する必要があると考えている。一方で我々は、これまでの検討において、ナノシリカの粒子表面をアミノ基やカルボキシル基で修飾することで、ナノシリカの細胞毒性を軽減できることを見出している。今後、Nano-Safety Science研究の推進の観点からナノ材料の安全性確保と社会受容の促進を実現するためには、曝露実態とハザード情報を詳細に収集し、ナノ材料のリスクを把握すると共に、これらのハザードを回避するための方法論の確立が必須であろう。

以上、本研究では非晶質ナノシリカがランゲルハンス細胞に対して細胞傷害性を発現すること、ならびにその細胞傷害性にはROS産生が関与している可能性を見出した。ランゲルハンス細胞は、皮膚の抗原提示細胞として免疫応答に大きく関与している細胞である。そのため、ランゲルハンス細胞の機能不全は免疫応答の攪乱を引き起こすことが報告されている^{3)~6)}。そのため、我々の今回明らかとした事実^{7)~10)}は、免疫応答が攪乱される可能性を示唆するものである。また、nSP70が細胞の核内にまで侵入していることから、既にナノシリカによって引き起こされることが報告されている核内蛋白質の凝集、RNA転写阻害¹¹⁾

等、核の機能不全に繋がる可能性が示唆される。そこで今後は、ナノシリカの細胞内局在情報を基盤とした各種ハザード評価を実施中であると共に、皮膚ケラチノサイト等の他の細胞種を対象として同様の検討を進めると共に、アトピーや皮膚炎との関係などを精査しているところである。

5. 総括

以上、本検討において我々は、70nmの非晶質ナノシリカは、XS52細胞に対して、細胞内動態・細胞に対する反応性という点においてサブミクロン以上のサイズのバルクマテリアルとは異なる性質を発揮することを明らかとした^{7), 8), 9), 10)}。即ち、ナノマテリアルの安全性確保と社会受容の促進を実現するためには、ナノマテリアルをバルクマテリアルとは別個の新素材として捉え、細胞内動態や組織浸透性/蓄積性といった生体内動態をより慎重に解析し、免疫応答や遺伝毒性等といった安全性情報を収集する必要があることを示している。更に、動態と細胞に対する反応性が相関しているという本検討の結果は、ナノマテリアルの動態情報を基盤とした安全性評価がNanoTox研究において重要であることを示している。我々は現在、ナノシリカの粒子サイズが動態-安全性に影響を与える機構を解明するために、細胞内への取り込み機構やストレス応答の観点から解析を進めている。これによって、ナノマテリアルの物性と安全性の因果関係を明確化することが可能になるものと考えている。これら物性-動態-安全性の連関解析から得られる情報が安全なナノマテリアルの設計指針の提示、さらには安全性評価法の確立に繋がり、安全なナノマテリアルの開発とその支援、そして安全・安心で魅力的な化粧品/化粧品の誕生と豊かな社会への展開に寄与することを期待している。

6. 成果発表(コスメトロジー研究振興財団への謝辞記載)

- 1) Nabeshi H, Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., **Tsutsumi Y.** : Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application., *Biomaterials.*, 32(11):2713-2724, 2011.
 - 2) Nabeshi H, Yoshikawa T., Arimori A., Yoshida T., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshioka Y., **Tsutsumi Y.** : Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages., *Nanoscale Res. Lett.*, 6 (1) : 93-98, 2011.
 - 3) Nabeshi H, Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., **Tsutsumi Y.** : Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes., *Part. Fibre. Toxicol.*, 8 (1) : 1-10, 2011.
 - 4) Nabeshi H, Yoshikawa T., Akase T., Yoshida T., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Ichihashi K., Yamashita T., Higashisaka K., Morishita Y., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshioka Y., **Tsutsumi Y.** : Effect of amorphous silica nanoparticles on in vitro RANKL-induced osteoclast differentiation in murine macrophages., *Nanoscale Res. Lett.*, 6 (1) : 464-468, 2011.
- (引用文献)
- 1) Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., *et al.*: Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci.*, 33: 105-16, 2008.
 - 2) Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., *et al.*: Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol.*, 3: 423-8, 2008.
 - 3) Bennett, C.L., van Rijn, E., Jung, S., *et al.*: Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol.*, 169: 56 x 9-576, 2005.
 - 4) Tinkle, S., Antonini, J.M., Rich, B.A., *et al.*: Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect.*, 111: 1202-120814, 2003.
 - 5) Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, *et al.*: Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol.*, 173: 3148-3154, 2004.
 - 6) Palucka, K., and Banchereau, J.: How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol.*, 14: 420-431, 2002.
 - 7) Nabeshi H, Yoshikawa T., Arimori A., Yoshida T., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshioka Y., **Tsutsumi Y.** : Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular

- distribution in murine macrophages., *Nanoscale Res. Lett.*, in press.
- 8) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Matsuo K., Arimori A., Isobe M., Tochigi, S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., **Tsutsumi Y.** : Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application, *Biomaterials.*, in press.
- 9) Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., **Tsutsumi Y.** : Safety evaluation study of nanomaterials aimed at the promotion of the social reception., *Genes and Environment*, in press.
- 10) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., **Tsutsumi Y.** : Amorphous nanosilica induce endocytosis-dependent ROS generation and DNA damage in human keratinocytes., *Part. Fibre. Toxicol.*, in press.
- 11) Chen, M., and von Mikecz, A.: Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp Cell Res.*, 305: 51-62, 2005.