

銀ナノ粒子及び銀イオンの細胞内分布とメタロチオネインの動態

宮山貴光,^{*,a,†} 荒井裕太,^b 鈴木紀行,^b 平野靖史郎^{a,b}

Cellular Distribution and Behavior of Metallothionein in Mammalian Cells Following Exposure to Silver Nanoparticles and Silver Ions

Takamitsu Miyayama,^{*,a,†} Yuta Arai,^b Noriyuki Suzuki,^b and Seishiro Hirano^{a,b}^aResearch Center for Environmental Risk, National Institute for Environmental Studies; 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan; and ^bGraduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University; 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan.

(Received February 25, 2014)

Silver nanoparticles (AgNPs) are commercially used mainly as antibacterial reagents in wound dressing and deodorant powders. However, the mechanisms underlying Ag toxicity in mammals are not fully understood. In the present study, we assessed cellular distribution and toxicity of AgNPs and AgNO₃ in mouse macrophage cell line (J774.1) and those of AgNO₃ in human bronchial epithelial cell line (BEAS-2B) focusing on behavior of metallothionein (MT). J774.1 cells were exposed to 0–100 μg Ag/mL AgNPs or AgNO₃ and BEAS-2B cells were exposed to 0–100 μM AgNO₃ for 24 h. The cytotoxicity was assayed by a modified MTT method. The cellular concentration and distribution of Ag were evaluated by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and laser scanning microscopy. Distribution of Ag to MT and other proteins was determined using HPLC-ICP-MS. Most AgNPs were found in lysosomes in J774.1 at 3 h after post exposure. Ag was distributed to high molecular weight proteins in AgNPs-exposed cells, while most Ag was bound to MT in AgNO₃-exposed cells. In AgNO₃-exposed BEAS-2B cells cellular Ag concentration and Ag-bound MT (Ag-MT) were sharply increased up to 3 h and then decreased. ROS production appeared to cause relocation of MT-bound Ag to mitochondria, which evoked inhibition of electron transport chain. AgNPs were sequestered by high-molecular weight proteins rather than MT, probably because they were taken up by lysosomes before induction of MT.

Key words—silver nanoparticle; metallothionein; mitochondria; reactive oxygen species; inductively coupled plasma-mass spectrometry

1. はじめに

銀は古来より、装飾品・食器などの極めて身近な元素として利用されてきた。現在では、主に医療分野と産業分野で汎用されている。前者では、医薬品、手術器具や創傷被膜剤など抗菌性を目的としたものが多くを占め、また、後者においては、銀の特性である電気及び熱伝導率、可視光線の反射率を利用して、パソコンの半導体、テレビ、携帯電話の液

晶画面の素材など、私たちの生活環境に幅広く浸透している。現在、世界的なナノテクノロジーの発展・応用により、銀をナノ粒子として用いる方法が主流である。銀ナノ粒子は更なる応用性が期待されている一方で、環境中に放出された後どのような化学形態及び形状で存在し、ヒトの健康に影響を与えているかについては不明な点が多い。ここでは、筆者らが行ってきた銀ナノ粒子と銀イオンの細胞内分布に基づく毒性のメカニズムについて述べる。

2. 曝露形態における銀毒性と規制への取り組み

Edwardらは銀溶液を飲み水として与えたマウス、ラット、豚の臓器を、電子顕微鏡を用いて調べた。その結果、腎臓、肝臓、甲状腺そして膵臓の各組織において、銀の顆粒状沈着を確認している。¹⁾ この銀の沈着は、銀皮症 (argyria) と呼ばれているが、皮膚への不可逆的な沈着のみならず、組織や

The authors declare no conflict of interest.

^a独立行政法人国立環境研究所環境リスク研究センター (〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2), ^b千葉大学大学院薬学研究院 (〒260-8675 千葉市中央区亥鼻 1-8-1)

現所属: [†]東京女子医科大学医学部衛生学公衆衛生学 (一) (〒162-8666 東京都新宿区河田町 8-1)

*e-mail: t-miyayama@research.twmu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 133 年会シンポジウム S30-304 で発表した内容を中心に記述したものである。

器官などへの沈着を含めて広くこの名称が使われている。これまで、ヒトへの銀の慢性曝露により発症する代表的な疾患として、argyria や結膜銀症 (conjunctival argyrosis) が知られており、銀が不可逆的に沈着する例が多数報告されている。^{2,3)} これらの疾患は、経口、吸入、経皮の3つの曝露形態を通して引き起こされると考えられている。

経口曝露の例として、歯科治療で用いられるアマルガムからの銀溶出や、殺菌を目的とした銀フィルターを介した濾過飲料水を摂取するという事態が想定されている。実際に、アマルガムによる銀溶出の結果、軟部組織や血中、髪の毛、尿中において銀の存在が確認されている。^{4,5)} 天然水に含まれる銀の濃度は $0.2 \mu\text{g/L}$ であるが、これを銀製のフィルターを介して処理すると、飲料水中に含まれる銀濃度は $50 \mu\text{g/L}$ になるという報告もある。しかし、ほとんどの銀は不溶性の塩化銀として存在すると考えられるため、飲料水によるヒトへの健康影響は、問題はないと考えられている。⁶⁾

コロイド銀の製法過程や銀、酸化銀、硝酸銀など作業場における吸入曝露によっても、argyria や argyrosis が起こることが知られている。^{7,8)} 吸入曝露した銀や銀化合物は、ムコイドや肺胞界面活性物質に結合し肺胞上皮を通して吸収される。肺に沈着した銀は、肺胞マクロファージを介して体内に吸収されるという説⁹⁾と、肺胞マクロファージの貪食能により、体内への吸収を抑制するという説があるが、⁶⁾ この点については明白でない。

皮膚接触による曝露の例として、銀含有化合物の多くは、ヒトの皮膚表面における抗菌作用を有することから、やけどなどの創傷治療を目的とした医薬品の塗布が考えられる。しかし、皮膚表面に多く存在するケラチンやリン脂質が、皮膚からの銀流入に対するバリアーとして働くことが知られていることから、^{10,11)} argyria や argyrosis の多くは、吸入や経口によって引き起こされる可能性が高いと考えられる。

以上の報告例から、ヒトへの健康被害を軽減するため各国の政府機関によって銀制限量が提示されている。米国労働安全衛生局 (Occupational Safety and Health Administration; OSHA) と米国鉱山安全衛生局 (Mine Safety and Health Administration; MSHA) は銀及び水溶性銀化合物の許容曝露限界

値 (permissible exposure limit; PEL) を 0.01 mg/m^3 と設定している一方で、米国産業衛生専門家会議 (American Conference of Governmental Industrial Hygienists; ACGIH) は、職業上の許容濃度の勧告値 (threshold limit value; TLV) として、 0.1 mg/m^3 を設定している。各機関によって採用している数値は異なるが、わが国においては、現在のところ、職業上の許容曝露濃度として、 0.01 mg/m^3 という数値をすべての銀化合物において採用している。¹²⁾

3. 銀イオンの細胞毒性

細胞毒性レベルでは、増殖抑制や DNA 合成抑制、¹³⁾ マクロファージの形態変化や生存率の減少、¹⁴⁾ 脂質過酸化の上昇やチオール化合物の減少¹⁵⁾ など、様々な生体影響を及ぼすことが報告されている。しかしながら、生体に取り込まれた銀の分布と、その結果起こり得る毒性発現機構については不明な点が多い。In vitro 研究において、培養細胞に銀を曝露すると、濃度依存的に細胞毒性が増大することが知られており、その細胞毒性を引き起こす一因として活性酸素の産生が考えられている。¹⁶⁾ 活性酸素を産生する部位については様々な報告がある。¹⁷⁾ 銀は細胞内に取り込まれたのち、核、ミトコンドリア、リソソームなどの細胞内オルガネラに蓄積し、毒性を引き起こすことが報告されている。¹⁸⁻²⁰⁾ しかしながら、銀の分布と毒性発現を関連づける報告は少ない。核、ミトコンドリア、リソソームなど各オルガネラへの銀分布が、アポトーシスやネクローシスに代表される細胞死を引き起こすには、多くの細胞内イベントが存在すると想定される。²¹⁻²⁴⁾

このような背景の中、銀の細胞内分布、銀結合タンパク質の挙動や局在を詳細に解析する必要があると考え、ヒト上皮細胞である BEAS-2B 細胞に AgNO_3 を曝露した際の細胞内の銀分布に着目して研究を行った。 AgNO_3 の細胞毒性は用量依存的に増大し、 IC_{50} は $2.5 \mu\text{M}$ と算出された。細胞培養液



宮山貴光

2009年千葉大学大学院医学薬学府博士課程修了。博士課程在学中、米国・Duke University Medical Centerに留学。帰国後、博士号(医薬学)を取得し、日本学術振興会特別研究員PD、国立環境研究所特別研究員を経て、現在、東京女子医科大学医学部衛生学公衆衛生学第一講座・助教。

中の銀濃度は0時間から12時間の範囲で時間依存的に減少したが、その後は一定値を示した。細胞内の銀分布は、時間依存的に可溶性画分から不溶性画分に移行していくことが分かった。可溶性画分中に存在する金属結合タンパク質と銀分布を詳細に比較するため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に、誘導結合プラズマ質量分析装置 (inductively coupled plasma mass spectrometry; ICP-MS) を組み合わせた HPLC-ICP-MS による解析手法を用いたところ、銀の多くはメタロチオネイン (MT) に結合した状態で存在していることがわかった。MT は、分子量 6000–7000 Da の低分子タンパク質であり、哺乳動物では 60 前後のアミノ酸残基により構成されている。4 種類のアイソフォームの存在が知られており、MT-I 及び MT-II は、哺乳類の組織中に普遍的に存在する一方で、MT-III は神経細胞、MT-IV は舌や食道などの重層扁平上皮細胞など組織特異的な発現を示す。MT の構成アミノ酸の 30% は、システイン残基で構成されており、必須元素である亜鉛や銅と結合し、これらの必須金属元素のホメオスタシスに関与していると考えられている。その一方で、MT は有害金属であるカドミウム、水銀、銀、鉛にも親和性を持つことから、生体防御因子としての役割も併せ持つ。^{25,26)} これまで、やけどの治療目的で銀を塗布した際の創傷部位における MT の発現が報告されていたものの、^{27,28)} 銀の分布と毒性発現において MT の関与を決定的に結論づけた報告はなかった。筆者らはこの MT の細胞内動態に着目し、細胞内に取り込まれた銀は、曝露後 3 時間までに MT の存在する可溶性画分中に分布し、以後は不溶性画分中へ移行することを見い出した。曝露初期において、可溶性画分中に存在する銀の 90% は MT と結合していたが、以後、銀を結合した MT は減少し、MT の mRNA 量も同様の発現パターンを示すことが分かった。

次に、不溶性画分へと移行した銀が、ミトコンドリアの呼吸鎖に影響を与えているのではないかと考え、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、オルガネラマーカーと活性酸素プローブ (CMH₂-DCFDA) の二重蛍光染色による評価を行った。この結果、活性酸素 (reactive oxygen species; ROS) はミトコンドリアで発生していることが分かった。これまでも毒性の高いヒ素やカドミウムがミトコンドリアの電子

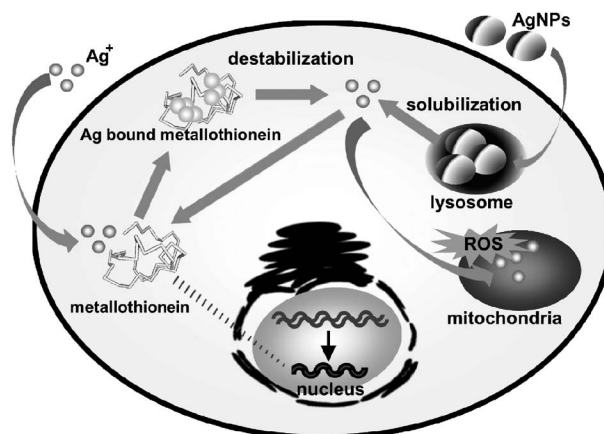


Fig. 1. Distribution and Behavior of Silver in Human Bronchial Epithelial Cells

伝達系に作用し、ROS の産生を促すという報告がされていたため、^{29,30)} 銀による電子伝達系への作用を調べるため、ラット肝臓よりミトコンドリアを抽出し、電子伝達系の酸素消費活性と呼吸鎖複合体 (complex I-IV) 活性を調べた。²⁹⁾ この結果、銀は、電子伝達系の酸素消費を抑制し、その原因が complex の阻害によって引き起こされ、結果として ROS を発生させるというメカニズムが明らかとなった (Fig. 1)。これらの結果から、細胞内に取込まれた銀は、早期の段階で MT によって捕捉されるが、同時に捕捉しきれなかった銀による直接的な ROS 産生により、いったん結合した銀がメタロチオネインの捕捉を逃れ、ミトコンドリアに再分布することで電子伝達系を阻害し、これが大量の ROS 産生を増大させ、細胞死を誘導するのではないかと考えられた。³¹⁾

4. 銀ナノ粒子の細胞毒性

ナノ材料は 21 世紀に入り、科学技術の進歩とともに多くの製品に使用されるようになってきた。2008 年の時点で、現在上市されているナノ含有製品は少なくとも 600 品目を超え、現在でも週に 3–4 品目が新たに作られている。この 600 品目のうち 140 品目が銀含有製品であり、銀ナノ粒子含有製品は他のナノ含有製品よりも多い。その多くは、デオドラントスプレーや消臭作用を謳った衣料品、抗菌性を目的とした医療器具、殺菌・殺虫を目的とした洗濯機や農薬である。

これまでに報告されている銀ナノ粒子の有害情報は多岐に渡るが、ここでは生殖・発生毒性、神経毒

性、肺毒性、遺伝毒性の4項目について紹介する。

生殖・発生毒性について銀ナノ粒子の毒性を *in vitro* 試験にて示唆した報告がなされた。この中で、Braydich-Stolle らは、マウス生殖細胞に $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の銀ナノ粒子を曝露させた結果、ミトコンドリア機能の低下、細胞生存率の減少、細胞毒性マーカーの指標酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) の漏出が起きることを報告している。^{21,32)} Li らは、マウス桑実胚と胚盤胞を用いて、銀ナノ粒子と銀イオンを曝露した際の影響を調べた。その結果、*in vitro* 試験での胚発育は、銀ナノ粒子の曝露により、着床後の発育率低下が示されたほか、*in vivo* 試験でも、着床率が有意に減少し、胎盤や胎仔の重量は対照より減少することが分かった。また、この現象の背景に、銀ナノ粒子が、マウス胚盤胞にアポトーシスを誘導することや、内部細胞塊と栄養外胚葉の細胞増殖を抑制しアポトーシスを誘導すると考えられている。すなわち、銀ナノ粒子は、着床後の胚の発育における胚盤胞や着床にも影響を示すことが示された。³³⁾

神経毒性について、Tang らは、ラットに銀ナノ粒子 ($50\text{--}100 \text{ nm}$) と銀マイクロ粒子 ($2\text{--}20 \mu\text{m}$) を単回皮下投与し、2-24 週間後の各組織を調べた。その結果、銀ナノ粒子は血液循環を介して、腎臓、肝臓、脾臓、脳、肺に分布することが分かった。さらに、血液脳関門の破壊やアストロサイトの膨化を誘導し、ニューロン変性を引き起こすことが明らかとなった。なお、銀マイクロ粒子は血流及び臓器組織に侵入していなかったことから、銀ナノ粒子の生物医学的アプリケーション、特に長期間使用の際には、標的臓器の機能評価や神経毒性に注意する必要性が示された。³⁴⁾

肺毒性については、Sung らは、 $49 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.6×10^6 個/ cm^3)、 $133 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (1.4×10^6 個/ cm^3)、 $515 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (3.0×10^6 個/ cm^3) の濃度の銀ナノ粒子を、ラットに1日6時間、週5日間で90日間、OECD 413 ガイドラインに基づき全身吸入曝露を行った結果を報告している。その結果、銀ナノ粒子曝露群はコントロール群 (新鮮な空気に曝露) と比較して、雌雄ラットの肝臓において用量に応じた胆管の過形成がみられ、肺においても銀の用量に応じた血管周囲の炎症性細胞浸潤、肺胞の慢性炎症、肉芽腫性病変、肺胞マクロファージの滞留が観察された。臓器

中の銀濃度は、高用量で雌雄ラットともに肺、肝臓、脳、嗅球、腎臓において蓄積がみられ、中用量では、雄の肺、腎臓、脳、雌の肺、脳において蓄積がみられた。特に腎臓においては、雌が雄に比べて2-3倍増加しており、性差がみられた。これらの結果を経口投与における臓器中の銀の蓄積データと比較し、肺は経口投与した銀の主たる分布臓器ではないものと考えられた。また、トロンボプラスチンとプロトロンビン時間を指標とした赤血球凝集検査と尿中 *N*-アセチル β -D-グルコサミニダーゼを指標とした腎機能検査において、高用量の雌においてコントロールに比較して、赤血球凝集の有意な変化がみられ、高用量の雄においては尿中タンパク質の有意な上昇がみられていることから、雌雄ラットにおける肝臓胆管の過形成、肺胞の慢性炎症、肺胞マクロファージの滞留、雌における赤血球凝集を考慮して、NOAEL は $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ と報告されている。³⁵⁾

遺伝毒性については、2009年 Kim らは、ヒト hepatoma HepG2 細胞に、 $0\text{--}10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の銀ナノ粒子を処理した実験結果を報告している。その結果、銀ナノ粒子及び銀イオンは、濃度依存的に細胞中で細胞質と核に凝集し、細胞内酸化ストレスを誘導しDNAを損傷させた。また、このDNA損傷は、酸化剤である *N*-アセチルシステインで阻止された。つまり、銀ナノ粒子のDNA損傷は主に酸化ストレスの結果起こることが推測された。本実験に供した銀ナノ粒子は銀イオンの含有を無視できるものとしていることから、銀ナノ粒子の毒性は銀イオンには依存していないことが報告されている。²⁰⁾ その他、銀ナノ粒子の毒性として、血液脳関門に炎症を引き起こして透過性を上昇させる可能性や、³⁶⁾ 細胞周期をG2/M期で停止させる作用³⁷⁾などの遺伝毒性が報告されているほか、³⁸⁻⁴⁰⁾ アポトーシスの起因やがん進展への影響を調べた研究が報告されている。

筆者らは、マウスマクロファージ細胞であるJ774.1細胞を用いて、銀ナノ粒子の細胞内取り込みの評価を行った。銀ナノ粒子は、クエン酸により粒子表面を化学処理した nanoComposix 社製 (San Diego, CA, USA) のものを用いた。毒性評価に汎用されている Polyvinylpyrrolidone (PVP) で化学処理された銀ナノ粒子は、安定性や分散性が向上しているが、^{41,42)} 銀ナノ粒子単体が具体的にどのよう

なタンパク質と相互作用するのかということに着目するため前者を用いた。まず、銀ナノ粒子の凝集を回避するため、¹⁶⁾ 終濃度にして1%ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) の水溶液で分散処理を行った。実際に、高塩濃度である細胞培地で分散処理後の銀ナノ粒子を細胞曝露濃度に希釈したところ、20, 60 及び 100 nm の各サイズの銀ナノ粒子は、 10.7 ± 0.8 , 74.8 ± 18.3 , 118.7 ± 29.0 nm であり、それぞれの銀ナノ粒子の一次粒径を保つという結果を得た。

ナノ粒子表面の荷電状態は、粒子の安定性を反映している。¹⁶⁾ そこで、今回用いた銀ナノ粒子を動的散乱法 (dynamic light scattering; DLS) で測定したところ、20, 60 及び 100 nm の各粒子において -16.6 , -49.1 及び -48.7 mV を示し、その安定性を確認できた。以上の条件で、細胞毒性を評価したところ、銀ナノ粒子の毒性は AgNO_3 を曝露した場合と同様に用量依存的に増大し、粒径が小さいほど毒性が強いことが示された。 AgNO_3 との毒性発現濃度の比較では、 AgNO_3 曝露群が 10 倍低濃度であった。この結果は、ヒト肺細胞である A549 細胞と BEAS-2B 細胞においても同様に報告されている。⁴³⁾ 次に、硝酸銀と銀ナノ粒子における細胞内の銀分布を比較するため、それぞれ $1 \mu\text{g Ag/mL}$ の濃度で、3 時間曝露し、可溶性画分における銀の化学形態を HPLC-ICP-MS で調べた。その結果、 AgNO_3 を曝露した場合、銀は MT に結合していることが分かったが、銀ナノ粒子を曝露した場合は、銀は高分子画分に分布している様子が観察された。この結果から、銀イオンと銀ナノ粒子では曝露後の細胞内での分布が異なり、銀ナノ粒子は細胞内で経時的に溶出していることが確認された。

銀の細胞内分布をさらに詳細に検討するため、オルガネラマーカーを併用して解析したところ、銀ナノ粒子の凝集体とライソソームマーカーが一致していることが確認された。間葉系幹細胞において、銀ナノ粒子はクラスリンに依存するエンドサイトーシスやマクロピノサイトーシスにより取り込まれていると報告されている。¹⁹⁾ 今回用いた J774.1 細胞は、マクロファージ由来であるため、エンドサイトーシスやマクロピノサイトーシスに加え、銀ナノ粒子を異物と認識し食作用により取り込んでいる可能性もある。また、これまでの報告から、ナノ粒

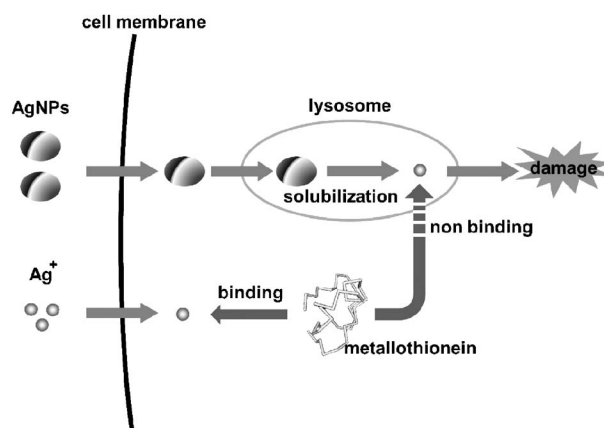


Fig. 2. Cellular Distribution of Silver Nanoparticles in Mouse Macrophages

子の毒性は溶出が考え難い金ナノ粒子⁴⁴⁾や酸化チタンナノ粒子⁴⁵⁾でも確認されているが、具体的にどのようなタンパク質との相互作用が毒性に起因しているのか不明であった。今回の実験結果から、銀ナノ粒子の毒性発現は、細胞内分布が銀イオンとは異なることや、銀ナノ粒子から溶出された銀イオンが、MTの防御機構を逃れることによって発揮されるものと考えられた (Fig. 2)。

5. おわりに

近年における銀ナノ粒子の毒性報告においては、分散性や安定性を向上させる目的で、さらに多種多様な銀ナノ粒子が用いられている。銀ナノ粒子の溶解性や凝集性に配慮した報告例も年々増加の一途をたどっており、最新の情報収集が必要不可欠となっている。新たな銀ナノ粒子の出現に伴い、毒性を評価する研究者自身も、既存の分析手法や毒性評価手法にとらわれることなく、様々な実験手法を積極的に採用していく必要がある。⁴⁶⁾ 粒子本体の物理化学的性状を考慮しつつ、タンパク質の発現や転写解析、防御因子の細胞内局在などの評価を得意とする分子生物学的手法、生きた細胞をリアルタイムに評価するイメージング手法、さらには、粒子から溶出した金属を正確に追跡評価する HPLC-ICP-MS など、これらの実験手法を組み合わせることで銀ナノ粒子の毒性を正確に評価する上で重要と考えられる。今後の銀ナノ粒子の毒性評価にこれらの包括的な評価手法が、あたらしいナノ材料の評価法のさきがけになることを期待したい。

REFERENCES

- 1) Dempsey E. W., Wislocki G. B., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **1**, 111–118 (1955).
- 2) Atiyeh B. S., Costagliola M., Hayek S. N., Dibo S. A., *Burns*, **33**, 139–148 (2007).
- 3) Lansdown A. B., *Curr. Probl. Dermatol.*, **33**, 17–34 (2006).
- 4) Drasch G., Gath H. J., Heissler E., Schupp I., Roider G., *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **9**, 82–87 (1995).
- 5) Viala A., Gilles G., Sauve J. M., Alibert J. P., *Toxicol. Eur. Res.*, **2**, 47–53 (1979).
- 6) Lansdown A. B., *Adv. Pharmacol. Sci.*, **2010**, 910686 (2010).
- 7) Fung M. C., Weintraub M., Bowen D. L., *JAMA*, **274**, 1196–1197 (1995).
- 8) Bleehen S. S., Gould D. J., Harrington C. I., Durrant T. E., Slater D. N., Underwood J. C., *Br. J. Dermatol.*, **104**, 19–26 (1981).
- 9) Takenaka S., Karg E., Roth C., Schulz H., Ziesenis A., Heinzmann U., Schramel P., Heyder J., *Environ. Health Perspect.*, **109** (Suppl. 4), 547–551 (2001).
- 10) Lansdown A. B., *Crit. Rev. Toxicol.*, **25**, 397–462 (1995).
- 11) Hostýnek J. J., Hinz R. S., Lorence C. R., Price M., Guy R. H., *Crit. Rev. Toxicol.*, **23**, 171–235 (1993).
- 12) Drake P. L., Hazelwood K. J., *Ann. Occup. Hyg.*, **49**, 575–585 (2005).
- 13) Hidalgo E., Domínguez C., *Toxicol. Lett.*, **98**, 169–179 (1998).
- 14) Rungby J., Hultman P., Ellermann-Erikson S., *Arch. Toxicol.*, **59**, 408–412 (1987).
- 15) Baldi C., Minoia C., Di Nucci A., Capodaglio E., Manzo L., *Toxicol. Lett.*, **41**, 261–268 (1988).
- 16) Foldbjerg R., Olesen P., Hougaard M., Dang D. A., Hoffmann H. J., Autrup H., *Toxicol. Lett.*, **190**, 156–162 (2009).
- 17) Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D., Misra C., Sempf J., Wang M., Oberley T., Froines J., Nel A., *Environ. Health Perspect.*, **111**, 455–460 (2003).
- 18) Teodoro J. S., Simoes A. M., Duarte F. V., Rolo A. P., Murdoch R. C., Hussain S. M., Palmeira C. M., *Toxicol. in Vitro*, **25**, 664–670 (2011).
- 19) Greulich C., Diendorf J., Simon T., Eggeler G., Epple M., Köller M., *Acta Biomater.*, **7**, 347–354 (2011).
- 20) Kim S., Choi J. E., Choi J., Chung K. H., Park K., Yi J., Ryu D. Y., *Toxicol. in Vitro*, **23**, 1076–1084 (2009).
- 21) Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T., Schlager J. J., *Toxicol. in Vitro*, **19**, 975–983 (2005).
- 22) Upadhyay D., Panduri V., Ghio A., Kamp D. W., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **29**, 180–187 (2003).
- 23) Hiura T. S., Li N., Kaplan R., Horwitz M., Seagrave J. C., Nel A. E., *J. Immunol.*, **165**, 2703–2711 (2000).
- 24) Hiura T. S., Kaszubowski M. P., Li N., Nel A. E., *J. Immunol.*, **163**, 5582–5591 (1999).
- 25) Kabziński A. K., *Talanta*, **46**, 335–346 (1998).
- 26) Kägi J. H., Kojima Y., *Experientia Suppl.*, **52**, 25–61 (1987).
- 27) Lansdown A. B., *Wound Repair Regen.*, **10**, 130–132 (2002).
- 28) Lansdown A. B., Sampson B., Laupattarakasem P., Vuttivirojana A., *Br. J. Dermatol.*, **137**, 728–735 (1997).
- 29) Naranmandura H., Xu S., Sawata T., Hao W. H., Liu H., Bu N., Ogra Y., Lou Y. J., Suzuki N., *Chem. Res. Toxicol.*, **24**, 1094–1103 (2011).
- 30) Wang Y., Fang J., Leonard S. S., Rao K. M., *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 1434–1443 (2004).
- 31) Miyayama T., Arai Y., Suzuki N., Hirano S., *Toxicology*, **305**, 20–29 (2013).
- 32) Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J. J., Hofmann M. C., *Toxicol. Sci.*, **88**, 412–419 (2005).
- 33) Li P. W., Kuo T. H., Chang J. H., Yeh J. M., Chan W. H., *Toxicol. Lett.*, **197**, 82–87 (2010).
- 34) Tang J., Xiong L., Wang S., Wang J., Liu L., Li J., Yuan F., Xi T., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **9**, 4924–4932 (2009).
- 35) Sung J. H., Ji J. H., Park J. D., Yoon J. U., Kim D. S., Jeon K. S., Song M. Y., Jeong J., Han B. S., Han J. H., Chung Y. H., Chang H. K., Lee J. H., Cho M. H., Kelman B. J., Yu I. J., *Toxicol. Sci.*, **108**, 452–461 (2009).
- 36) Trickler W. J., Lantz S. M., Murdock R. C.,

- Schrand A. M., Robinson B. L., Newport G. D., Schlager J. J., Oldenburg S. J., Paule M. G., Slikker W. Jr., Hussain S. M., Ali S. F., *Toxicol. Sci.*, **118**, 160–170 (2010).
- 37) Lee Y. S., Kim D. W., Lee Y. H., Oh J. H., Yoon S., Choi M. S., Lee S. K., Kim J. W., Lee K., Song C. W., *Arch. Toxicol.*, **85**, 1529–1540 (2011).
- 38) AshaRani P. V., Low Kah Mun G., Hande M. P., Valiyaveettil S., *ACS Nano*, **3**, 279–290 (2009).
- 39) Asharani P. V., Hande M. P., Valiyaveettil S., *BMC Cell Biol.*, **10**, 65 (2009).
- 40) Foldbjerg R., Dang D. A., Autrup H., *Arch. Toxicol.*, **85**, 743–750 (2011).
- 41) El Badawy A. M., Scheckel K. G., Suidan M., Tolaymat T., *Sci. Total Environ.*, **429**, 325–331 (2012).
- 42) Tejamaya M., Romer I., Merrifield R. C., Lead J. R., *Environ. Sci. Technol.*, **46**, 7011–7017 (2012).
- 43) Cronholm P., Karlsson H. L., Hedberg J., Lowe T. A., Winnberg L., Elihn K., Wallinder I. O., Moller L., *Small*, **9**, 970–982 (2013).
- 44) Haase A., Manton A., Graf P., Plendl J., Thuenemann A. F., Meier W., Taubert A., Luch A., *Arch. Toxicol.*, **86**, 1089–1098 (2012).
- 45) Carlson C., Hussain S. M., Schrand A. M., Braydich-Stolle L. K., Hess K. L., Jones R. L., Schlager J. J., *J. Phys. Chem. B*, **112**, 13608–13619 (2008).
- 46) Miyayama T., Arai Y., Hirano S., *Nihon Eiseigaku Zasshi*, **67**, 383–389 (2012).