

201035007B

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究

平成20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者

戸塚 ゆ加里 (国立がん研究センター研究所)

平成23 (2011) 年 3月

目次

I. 総合研究報告

ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究 < 1 >

戸塚 ゆ加里

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

< 19 >

III. 研究成果の刊行物・別刷

< 27 >

総合研究報告書

ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性の解析

主任研究者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所 ユニット長

研究要旨 化粧品や商業用品等に使用されている種々のナノマテリアル [カーボンブラック (CB)、フラーレン (C60)、カオリン、マグネタイト、多層カーボンナノチューブ (MWCNT)、金属ナノマテリアル] の遺伝毒性について *in vivo* および *in vitro* 実験系を用いて検討した。ラットにおける気管内スプレー投与によるマグネタイトの急性および慢性毒性試験を行った。その結果、急性毒性試験の無影響量 (NOEL) は雌雄とも 5.0 mg/kg 体重未満で、慢性毒性試験の最大無毒性量 (NOAEL) は雌雄とも 0.2 mg/kg 体重であった。カオリン、C60、CB を、5 回気管内投与し、15 ヶ月目に屠殺した。その結果、生存マウスの肺の総腫瘍発生率は対照群が 37.8%、そのうち悪性腫瘍が 21.6% であったのに対し、各粒子投与群の腫瘍発生率はそれらを上回ることはなかった。また、各種ナノマテリアルをマウス気管内に投与して、肺における DNA 損傷性をコメットアッセイ法を用いて調べたところ、各ナノマテリアルはいずれも DNA 損傷性を示した。更に、産地の異なるカオリンでは遺伝毒性及び表面構造が異なることを確認した。各種ナノマテリアルの変異誘発能を、トランスジェニックマウスを用いて検討した結果、CB 投与群以外で *gpt* の変異頻度がコントロールと比較して顕著に上昇した。また、溶媒対象と比較して、ナノマテリアル投与マウスの肺における酸化ストレス関連 DNA 付加体が顕著に増加し、炎症マーカーである 3-ニトロチロシンの発現が認められ、ナノマテリアルにより引き起こされたマウス肺の遺伝毒性の一部が酸化ストレスと炎症により誘発されたことが示唆された。金属ナノマテリアル CuO、Fe₃O₄、Fe₂O₃、TiO₂、Ag は、組織 DNA 中や尿中の酸化ストレスマーカー 8-oxo-dG を有意に上昇した。また、繊維状、粒子状物質により誘発される炎症、酸化ストレスが引き金となってラジカル機構により DNA のメチル化、エピジェネティック異常が起こる可能性を見いだした。各種細胞におけるナノマテリアル曝露の影響について、細胞生存率、ROS 生成、8-oxo-dG 生成、apoptosis、細胞周期等について検討した。特にマグネタイトはヒト細胞の種類により細胞傷害が異なる事を明らかにした。MWCNT、C60、マグネタイト、カオリンは CHO 細胞に小核と姉妹染色分体交換を誘導した。抗酸化剤が小核頻度を減少させることから遺伝毒性に活性酸素種の関与が示唆された。DNA 修復欠損株を用い、MWCNT が塩基損傷や DNA 二重鎖切断をつくることが示唆された。上述のように、*in vivo* および *in vitro* 実験の結果から、ナノマテリアルにより酸化ストレスおよび炎症反応が惹起され、ROS などの内因性の活性種が DNA 損傷を生じることで遺伝毒性を誘発している可能性が示唆された。

分担研究者		渡邊 昌俊	横浜国立大学大学院 工学研究院 教授
中江 大	東京都健康安全研究センター 環境保健部 部長	市瀬 孝道	大分県立看護科学大学 看護学部 教授
川西 優喜	大阪府立大学 先端科学イノベーション センター 助教	増田 修一	静岡県立大学 食品栄養科学部 准教授
葛西 宏	産業医科大学 職業性腫瘍学 教授	戸塚ゆ加里	国立がん研究センター研究所 発がんシステム研究分野 ユニット長

A. 研究目的

近年、化粧品や医薬品、各種商業用品等にナノマテリアルが多用されている。それに伴い、私たちはこれらのナノマテリアルに直接的または間接的に曝露する機会が多くなってきている。これらナノマテリアルの粒径は非常に小さいことから、細胞内に容易に取り込まれ、長期にわたってそこに留まり、慢性的なストレスを与える可能性がある。また、これらナノマテリアルはその粒子径やコーティング、化学修飾等により大きく性質が変化することも知られている。ナノマテリアルに類似した形状をもつアスベストはヒトに中皮種及び肺癌を誘発することが指摘されており、社会的に大きな問題となっている。一方、チタン、珪素、炭素などの他のナノマテリアルのヒト健康への影響については知見が乏しく、とくに遺伝毒性および発がん性に関しては緊急に明らかにする必要がある。本研究では、化粧品や商業用品等に頻繁に用いられている種々のナノマテリアル[C60、カオリン、CB、酸化チタン、マグネタイト等] および将来的に商業用品等への応用が期待されるナノマテリアルである多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の遺伝毒性や発がん性について *in vivo* 及び *in vitro* 実験系を用いて検討する。すなわち、野生型およびトランスジェニック (*gpt delta*) マウスを用いた DNA 損傷や変異の検出、毒性試験の実施、培養細胞を用いた細胞毒性および形態学的な変化の観察、8-oxo-dG をマーカーとした酸化ストレスの測定、エピジェネティック異常の解析等を行う。さらに、これらナノマテリアルの長期発がん実験に関しても検討を行う。本研究を遂行することにより得られる基礎的研究資料は、ナノマテリアル製品への曝露による有害性、さらに遺伝毒性の評価に利用可能な手法の開発に極めて有用なものになると考えられる。

B. 研究方法

研究目的に基づき、本研究では以下の 7 項目について検討した。

①ラットにおけるマグネタイトの慢性毒性：

急性毒性試験は、F344/DuCrIj 系雌雄ラットに、0.5・15・45 mg/kg 体重の用量でマグネタイトを単回気管内スプレー投与し、2週間後に動物を屠殺して検索した。慢性毒性試験は、同様に 0.02・1.0・5.0 mg/kg 体重/回の用量で4週間に1回、計13回投与し、実験開始の52週間後に動物を屠殺して検索した。

②ナノマテリアルの発がん性：

カオリン、C60、CBを0.05% Tween80を含む生理食塩水に懸濁し、0.1 mg と 0.3 mg を ICR 系雄マウスに1ヶ月間隔で5回(総投与量としてマウス当り0.5 mg と 1.5 mg 量)気管内投与し、15～16ヶ月後の肺の腫瘍発生率を調べた。なお、対照群には0.05% Tween80を含む生理食塩水0.1 ml を投与した。

③ナノマテリアルにより誘発される毒性および DNA 損傷に関する研究：

各種ナノマテリアルを0.05及び0.2 mg/mouse となるように ICR マウスまたは C57BL/6J マウスの気管内に投与した後、両肺を摘出して細胞浮遊液を得た後、Fpg 処理または未処理のコメットアッセイを行った。解析ソフトとして Comet Assay IV を使い、1スライドにつき50個以上の細胞を観察して Tail Intensity を求めた。また、各カオリンの二次粒子径の測定を行うとともに、SEM 画像解析により表面構造を観察した。

④ナノマテリアルにより誘発される変異原性及び DNA 損傷に関する研究：

10週齢の雄性 *gpt delta* マウスに、被検物質を0.05% Tween 80を含む生理食塩水に懸濁し、0.2 mg/body の用量で気管内反復投与を行った。最終投与2ヶ月後にマウスを屠殺後、肺を摘出し、病理組織学的な診断と突然変異の解析に用いた。*gpt* 遺伝子および *Spi* 遺伝子変異の解析は、ゲノム DNA を抽出して行った。ナノマテリアルが DNA 付加体(8-oxo-dG、HedG、HedA、HedC)の生成量に与える

影響を検討するため、被検物質[MWCNT、マグネタイト、青石綿（陽性対象）]を0.2 mg/bodyの用量でICRマウスに単回気管内投与を行い、3、24、72、168時間後に屠殺解剖して、LC-MS/MSを用いて、肺のDNA付加体量を測定した。また、炎症反応のマーカーである3-ニトロチロシンに対する抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。

⑤ナノマテリアルにより誘発される酸化ストレスおよびジェネティックな変化の解析：

ナノマテリアルを気管内投与したマウス血清中の8-oxo-Gua、ならびに肺DNA中の8-oxo-dG、またマグネタイト、酸化チタンナノ粒子を処理した培養細胞DNAの8-oxo-dGレベルをHPLC-ECD法により測定した。さらに、金属ナノ粒子を腹腔内投与したマウスの末梢血小核、尿中8-oxo-dGの測定を行った。酸化ストレスによって生じるエピジェネティック異常は、dCのメチル化を指標に検討した。

⑥ナノマテリアルにより誘発されるジェネティックおよびエピジェネティックな変化を含む細胞傷害に関する研究：

ヒト細胞株培養系を用い、ナノ粒子等曝露群および非曝露群を設定した。ナノ粒子等として、二酸化チタン、C60、CB、マグネタイト、カオリンを使用。各細胞を生存率の測定、8-oxo-dG測定、reactive oxygen species (ROS)生成測定量、細胞膜損傷検出(LDH assay)等を行った。

⑦ほ乳類培養細胞におけるナノマテリアルの遺伝毒性機構に関する研究：

遺伝毒性はチャイニーズハムスター(CHO)細胞株・ヒト肺がん由来細胞株(A549)を用いた小核試験・姉妹染色分体交換試験で評価した。活性酸素種の関与を調べるため抗酸化剤(N₂アセチルシステイン)を添加した小核試験を実施した。DNA二重鎖切断誘発をヒストンH2AXリン酸化を指標に蛍光免疫染色法で評価した。どのようなDNA損傷が生じたかを各種DNA修復系欠損CHO株を用いた増殖阻害試験で評価した。

(倫理面への配慮)

本研究で行った動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行った。また、ヒト由来試料を用いて研究する場合は、各研究者の所属施設の倫理委員会の承諾を得た。細胞株は公的細胞バンク由来で規定を遵守した。ナノマテリアルに対する曝露防止等のための予防的対応について(平成21年4月21日文科科学省からの通知)に遵守した。環境への配慮などは施設内規定に則った。

C. 研究結果

①ラットにおけるマグネタイトの慢性毒性：

急性毒性試験においては、雌雄中・高用量群の肺重量と雄低用量群の精巣重量増加、雌雄全投与群肺の腫大・浮腫・黒色物質沈着、雌雄高用量群の気管支上皮軽度腫大・気管支粘膜杯細胞増加、雄高用量群の肺血管周囲浮腫、雌全投与群の炎症細胞浸潤、雌雄全投与群のマグネタイト食食マクロファージ浸潤・II型肺胞上皮増生、雌雄の中・高用量群の肺胞腔内マグネタイトの沈着・肉芽形成、雌雄高用量群の異物巨細胞浸潤、雌雄全投与群胸腺リンパ節の褐色粒子沈着を認めた。慢性毒性試験においては、雌雄高用量群の肺絶対/相対重量増加、雌雄中・高用量群肺の黒色物質沈着、雌雄高用量群肺の軽度腫大、雌雄中・高用量群胸腺リンパ節の軽度腫大・灰黒色化、雌雄全投与群肺のマグネタイト食食肺胞マクロファージの肺胞腔浸潤、雌雄中・高用量群肺のマグネタイト食食マクロファージ間質浸潤、雄中・高用量群/雌高用量群肺の血管周囲/気管周囲/間質炎症細胞浸潤が、雌雄中・高用量群肺の肉芽形成・II型肺胞上皮腫大・肺胞/細気管支上皮過形成を認めた。

②ナノマテリアルの発がん性：

15～16ヶ月後の生存率は、対照群：66%、カオリン0.1 mgと0.3 mg群：48%と42%、C60 0.1 mgと0.3 mg

群：74%と54%、CB 0.1 mgと0.3 mg群：62%と68%であった。肺の総腫瘍発生率は、対照群：37.8%、カオリン 0.1 mgと0.3 mg群：35.7%と16.7%、C60 0.1 mgと0.3 mg群：23.1%と20.7%、CB 0.1 mgと0.3 mg群：28.1%と21.1%であった。腫瘍の組織型は腺腫と腺がんであり、腺がんの発生率は対照群：21.6%、カオリン 0.1 mgと0.3 mg群：13.2%と14.3%、C60 0.1 mgと0.3 mg群：20.5%と17.2%、CB 0.1 mgと0.3 mg群：21.6%と18.8%であった。ナノマテリアル投与群の総腫瘍発生率、悪性腫瘍（腺がん）の発生率は対照群と比較すると増加することはなかった。

③ナノマテリアルにより誘発される毒性およびDNA損傷に関する研究：

各ナノマテリアルを気管内投与したマウス肺組織におけるDNAの損傷性をコメントアッセイを用いて調べたところ、いずれも対照群に比べて用量依存的に有意なDNA損傷性を示した。また、Fpg処理することにより、DNA損傷性が増大する傾向が確認できた。各種カオリンをマウス気管内に投与したところ、いずれも肺に対して有意なDNA損傷を誘発した。産地の異なるMPSI（米国産）およびJP（韓国産）のDNA損傷性を比較したところ、JPに比べMPSIは2~3倍高いDNA損傷性を示した。二次粒子径ではいずれのカオリンも平均1300~1500 nmの凝集塊を形成しており、一次粒子径が異なるEH0.2及びEH4.8の間に顕著な差はみられなかった。しかしながら、SEM画像解析を行ったところ、MPSI、EH0.2及びEH4.8は細かい鱗片状粒子が集合した形状をしており、JPとは異なっていた。

④ナノマテリアルにより誘発される変異原性及びDNA損傷に関する研究：

CB、C60、カオリン、マグネタイト及びMWCNTの遺伝毒性を、トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、コントロールと比較して、CB投与群以外の肺で変異頻度が上昇した。肺におけるSpi-変異を解析したところ、カオリンおよびCB投与群で変異頻度の上昇が認めら

れたが、C60、マグネタイトおよびMWCNT投与群ではコントロール群とほぼ同程度の変異頻度であった。変異スペクトラムを解析した結果、CB、カオリンおよびマグネタイト投与群でG:C → A:T変異が顕著に増加していたのに加え、全てのナノマテリアル投与群でG:C → C:G変異が誘発された。また、肺のDNA付加体量を測定したところ、ナノマテリアル投与群で酸化ストレス関連DNA付加体が増加傾向にあった。さらに肺組織で貪食したマクロファージおよび炎症性細胞浸潤が散見され、3-ニトロチロシンの発現もナノマテリアル投与群で認められた。

⑤ナノマテリアルにより誘発される酸化ストレスおよびジェネティックな変化の解析：

C60、カオリン、MWCNTは、酸化ストレスマーカーであるマウス血清中8-oxo-Guaあるいは肺DNA中の8-oxo-dGの有意な増加を誘導しなかった。これに対し、マグネタイト（酸化鉄）はマウス肺のDNA中8-oxo-dGレベルを有意に増加した。培養細胞に対しては、マグネタイト、二酸化チタンがDNA中の8-oxo-dGレベルを増加した。金属ナノマテリアルCuO、Fe₃O₄、Fe₂O₃、TiO₂、Agの腹腔内投与によって、マウス小核の誘発ならびに酸化的DNA損傷の誘導がみられ、特にCuOが最も強い作用を示した。メチオニンスルホキシドとOHラジカル等のメチルラジカル発生系とDNAの生理的条件下での反応により5-メチルdCならびに8-メチルdGが生成した。

⑥ナノマテリアルにより誘発されるジェネティックおよびエピジェネティックな変化を含む細胞傷害に関する研究：

マグネタイト、二酸化チタン、カオリンは10 μg/mlより、有意にA549の細胞生存率が低下した。特にカオリンでは200 μg/mlで50%の死滅を認めた。一方、前立腺癌細胞株DU-145に対しては、マグネタイトは1 μg/mlから有意に細胞生存率が低下した。8-oxo-dGの測定では、マグネタイトは10 μg/mlより、有意にA549での8-oxo-dGの生成量の増加を認めた。DU-145では、1 μg/mlより、8-oxo-dGの

生成量の増加を認めた。ROS 生成について、マグネタイトは $10 \mu\text{g/ml}$ より、有意に A549 での ROS の生成量の増加を認めた。DU-145 では、 $1 \mu\text{g/ml}$ より、ROS の生成量の増加を認めた。特に ROS 生成が著高な DU-145 では、*SOD1*、*SOD2*、*catalase* の発現が抑制された。同様に修復酵素遺伝子では、DU-145 では *hMTH*、A549 では *hOGG1* 遺伝子発現の抑制を認めた。メチル化について、RAPD-PCR を用いた解析では、細胞全体に特異的な変化は認めなかった。

⑦ほ乳類培養細胞におけるナノマテリアルの遺伝毒性機構に関する研究：

小核試験(A549)では概ね処理濃度依存的に小核を誘導した。200 $\mu\text{g/mL}$ の 6 時間処理で小核頻度が溶媒対照の 2~20 倍に上昇した($P<0.05$)。SCE 試験(CHO)でも濃度依存的に SCE 頻度が上昇した。1 細胞あたりの SCE 数は、2 $\mu\text{g/mL}$ の処理で溶媒対照の 2~10 倍に上昇した($P<0.05$)。抗酸化剤(10 mM の N-アセチルシステイン)添加で、20 $\mu\text{g/mL}$ のカオリン、C60、マグネタイト、MWCNT による小核頻度は抗酸化剤なしの時に比べ順に 30%、45%、55%、65%に低下した。DNA 二重鎖切断を調べたところカオリン、C60、マグネタイト処理細胞は溶媒対照細胞に比べ γH2AX フォーカス量が増加した($P<0.01$)。塩基除去修復欠損株、非同末端結合欠損株は 20 $\mu\text{g/mL}$ 以上の MWCNT 処理で細胞の増殖が野性株に対して有意に($P<0.05$)抑制された。

D. 考察

①ラットにおけるマグネタイトの慢性毒性：

マグネタイトの毒性に関して、Zhu らは、サブミクロンサイズ(直径 280 nm)とナノサイズ(直径 22 nm)の酸化鉄 Fe_2O_3 を雄の SD ラットに単回気管内投与し、7 日後及び 30 日後の影響を比較した結果、サブミクロンタイプのものに比べ、ナノサイズの酸化鉄の方が、肺の炎症反応及び血液凝固系に及ぼす影響が顕著であったと報告している。ナノサイズのマグネタイトを用い

た本研究の急性毒性試験では、肺において、異物曝露に対する非特異的な局所の急性反応を観察した。一方、ミクロンサイズのマグネタイトの発がん性に関しては、これまでに Slesinski らと Steinhoff らが陰性、Pott らが陽性の報告を行っており、未だ明らかにされていない。ナノサイズマグネタイトを用いた本研究の慢性毒性試験では、肺胞/細気管支上皮の過形成が発生した。肺胞上皮過形成については、腫瘍への進展がない再生性か腺腫及び腺がんに進展する前がん性変化である原発性かの鑑別が重要となる。本試験の過形成は、異物への反応性炎症を伴っていたが、肺胞上皮の壊死を認めなかったため、その前がん性について、さらなる検索が必要である。

②ナノマテリアルの発がん性：

IARC Monograph Working Group は CB と二酸化チタンの発がん性に関して、マウスやハムスターにおいてはネガティブ、ラットにおいてはポジティブであり、ヒトにおいては疫学調査の結果からポジティブである可能性を報告している。ラットではほかに Quarts や amorphous 二酸化シリカにおいても発がん性が示唆されている。本試験の ICR マウスの生存率が低く、検査匹数は少なかったものの、CB の発がん性に対しては先行研究と同様にネガティブであった。また、カオリンや C60 の発がん性に関してもネガティブであった。このような結果から、マウスはこれらのナノマテリアルの発がん性に対して感受性が低い動物種と考えられる。今回試験したナノマテリアルのヒトに対する発がん性を明らかにするには、今後、ヒトに近い感受性を示すラットを用いた発がん実験を行う必要があると考えられる。

③ナノマテリアルにより誘発される毒性および DNA 損傷に関する研究：

各種ナノマテリアルをマウス気管支に投与して、肺組織における DNA 損傷性を、コメットアッセイを用いて評価したところ、いずれのナノマテリアルも強い DNA 損傷性を示した。Fpg 処理コメットアッセイにより、ナノマテリアルが酸化的 DNA 損傷性を誘発することが明らかになった。

また、産地の異なるカオリンである MPSI と JP の DNA 損傷性を比較したところ、MPSI は有意な DNA 損傷性を示した。SEM 画像より MPSI は小さな鱗片が重なった形状をしており、生体内では JP に比べ小さな粒子になる可能性が示唆された。同一産地で一時粒子径の異なる EH0.2 と EH4.8 の DNA 損傷性を比較したところ、有意な差は認められなかった。両カオリンの溶媒内での二次粒子径にはほとんど差がみられず、MPSI 同様、どちらも鱗片状の粒子が集合した形状をしており、二次粒子径よりも細かな鱗片状の形状がカオリンの DNA 損傷性に寄与していることが示唆された。

④ ナノマテリアルにより誘発される変異原性及び DNA 損傷に関する研究：

各種ナノマテリアル投与群において G:C → C:G が共通してコントロール群よりも上昇していた。G:C → C:G の変異は、自然突然変異及び変異原・がん原物質により誘発される変異の中でも非常に稀である。カオリンはおもに珪酸アルミニウムで、C60、CB および MWCNT は炭素元素、マグネタイトは酸化鉄と構成成分が異なるにも関わらず、稀な G:C → C:G 変異を共通して誘発することは、ナノマテリアルに共通の DNA 傷害が生成されていることを示唆する。今回、免疫組織化学染色により 3-ニトロチロシンの生成が見られた。このことから、G>A の突然変異は、炎症反応により生成された NO が DNA と反応し脱アミノ化を引き起こした結果生じたものと推察された。G>A の変異は、カオリン及びマグネタイトで有意に増加したスペクトルであったことから、これらナノマテリアルの遺伝毒性に炎症反応の関与が強く疑われた。今回定量した DNA 付加体のうち 8-oxo-dG と HedC の突然変異スペクトルは G>T である。HedG、HedA の突然変異スペクトルは報告されていない。G>T はわずかに増加が認められた突然変異スペクトルであったことより、これら酸化ストレス由来の付加体の関与も示唆された。一方で、ナノマテリアルを貪食したマクロファージや好中球により ROS が産生され、DNA を傷害した可

能性も考えられる。ナノマテリアルによる遺伝毒性を減弱するためにも、DNA が損傷されるメカニズムの検討が望まれる。

⑤ ナノマテリアルにより誘発される酸化ストレスおよびジェネティックな変化の解析：

マグネタイトや酸化チタン、酸化銅などナノマテリアルの中に、酸化的傷害をもたらす素材が見つかったことから、今後、遺伝毒性及び発がん性への関与を解明し、発がん予防に繋がるよう期待したい。また、生体では炎症や老化が原因でメチルラジカルが生じ、シトシンのメチル化を起こす可能性が考えられる。DNA に直接反応する場合と、ヌクレオチドプール中に m5dCTP が生じ DNA 中に取り込まれる機構が考えられる。今後細胞レベルでこの反応が起こるかどうかが、更にメチオニンスルホキシド等の物質と酸化ストレスにより実際にエピジェネティック変化が起こるかどうかを証明したい。これらの結果は粒子状・繊維状物質の吸入による肺組織の炎症、酸化ストレス誘発に伴う肺発癌にも関連すると思われる。一方 8-メチル dG はラジカル機構による DNA のメチル化を研究するための良いマーカーになるであろう。

⑥ ナノマテリアルにより誘発されるジェネティックおよびエピジェネティックな変化を含む細胞傷害に関する研究：

各種ナノ粒子等の中で、マグネタイトに特異的結果を認めた。細胞生存率は濃度依存的に二つの異なる細胞株に対して影響を与えるも、A549 に比較して、DU-145 はより低濃度での曝露で低下した。DU-145 は A549 に比べて低濃度で DNA 損傷や ROS の生成を認めた。その結果として、apoptosis が誘導された。これらの一連の事象が細胞生存率の低下に結びついたと考える。一方、A549 では、高曝露濃度で ROS の生成や DNA 損傷を認めた。同一のナノ粒子であっても、その細胞がもつ修復機構等がその表現型に重要な影響を与えると考えられ、抗酸化酵素遺伝子あるいは修復遺伝子の発現について解析すると、特に DU-145 ではそれらの発現の低下が認められた。前立腺がん細胞は正常前

立腺細胞と比較して、抗酸化酵素遺伝子の発現欠如あるいは低下が報告されている。これらの事より、マグネタイト曝露による ROS 除去経路への影響が示唆された。

⑦ほ乳類培養細胞におけるナノマテリアルの遺伝毒性機構に関する研究：

MWCNT、C60、マグネタイト、カオリンをほ乳類培養細胞に処理することで、小核頻度、SCE 頻度ともに溶媒対照に比べ有意に上昇したことから、これらナノマテリアルがほ乳類細胞に対して遺伝毒性を示すことがわかった。抗酸化剤を添加すると小核誘導頻度は低下したため、その遺伝毒性発現には活性酸素種が関与していることが示唆された。 γ H2AX フォーカス量の増加はカオリン、C60、マグネタイトが細胞に DNA 二重鎖切断を誘発していることを示唆している。また DNA 修復欠損株を用いた実験の結果は、MWCNT が細胞に DNA 二重鎖切断および DNA 塩基損傷（酸化的塩基損傷など）を与えたことを示唆している。以上のことは、これらナノマテリアルが誘発する活性酸素種や DNA 鎖切断が染色体の異常を起こしている可能性を示唆している。

E. 結論

急性毒性試験では、全用量の雌雄のラットの肺について、重量の増加ないし増加傾向が認められ、組織学的に、マグネタイトの蓄積と、異物曝露に対する非特異的な局所の急性反応と評価できる変化を観察した。以上の結果から、本条件下におけるマグネタイトの急性毒性試験の無影響量 (NOEL) は、雌雄とも 5.0 mg/kg 体重未満と考えられた。慢性毒性試験では、雌雄の 5.0 mg/kg 体重群ラットで肺重量が増加し、雌雄の 1.0 mg/kg 体重群以上のラットでマグネタイトの肺への沈着を観察し、組織検索において、用量依存性の炎症反応、肉芽形成、II 型肺胞上皮の腫大及び肺胞/細気管支上皮の過形成が認められた。以上の結果から、本試験条件下におけるマグネタイトの最大無毒性量 (NOAEL) は、雌雄とも 0.2 mg/kg 体重であると考えられる。

発がん試験における ICR マウスの生存率が低く、検査匹数は少なかったものの、CB の発がん性に対しては先行研究と同様にネガティブであった。また、カオリンや C60 の発がん性に関してもネガティブであった。DEP をはじめ、CB、二酸化チタン、タルク、Quartz や amorphous 二酸化シリカ等の発がん性についてはラットにおいて指摘されていることから、今後、ラットを用いた発がん実験が望まれる。

各種ナノマテリアルを気管支内に投与することで、肺組織において DNA 損傷性を誘発することが明らかになった。また、FPG 処理コメットアッセイを用いて、各ナノマテリアルの酸化的 DNA 損傷誘導性を調べたところ、DNA 損傷性は酸化的損傷により誘導されることが示唆された。また、ナノマテリアルの一種であるカオリンに着目し、マウス気管内に投与した際に肺で誘発される DNA 損傷性に各カオリンの粒子径や形状の違いが及ぼす影響を検討した。その結果、鱗片状の粒子が集合した形状をもつカオリンが強い DNA 損傷性を誘発する傾向を確認できた。今後は *in vitro* 試験において、カオリン等のナノマテリアルの細胞内取込み量や粒子表面電位の違いを検討し、遺伝毒性を誘導するナノマテリアルの特徴を明らかにするとともに、粒子表面を置換基で修飾するなど、ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化手法の開発を目指す。

CB、C60、カオリン、マグネタイト及び MWCNT の遺伝毒性を、トランスジェニックマウスを用いて検討した結果、カオリン投与群では、*gpt* および *Sp1* の変異頻度ともにコントロールと比較して顕著に上昇した。C60、マグネタイト、MWCNT 投与群では、肺の *gpt* 変異頻度はコントロールに比べて優位に上昇したが、*Sp1* の変異の上昇は認められなかった。一方、CB 投与群では、*gpt* および *Sp1* 遺伝子変異がわずかに上昇したが、統計学的に有意ではなかった。また、変異スペクトラム解析の結果、全ての微粒子投与群で G:C → C:G がコントロール群と比べて増加していた。これらのことから、今回用いた 5 種の微粒子は実験動物に対して変異原性を誘発する事が分かった。また、微

粒子の構成成分に係らず、共通の DNA 損傷が誘発されていることが示唆された。ナノマテリアル投与マウスの肺における DNA 付加体、8-oxo-dG、HedG、HedA、HedC が溶媒対象と比較して顕著に増加していた。C60、カオリン、マグネタイトおよび MWCNT 投与マウスの肺における 3-ニトロチロシンの発現が認められた。ナノマテリアル投与群で酸化ストレス関連 DNA 付加体の生成量増加ならびに、炎症反応に由来するマーカーが検出されたため、ナノマテリアルにより引き起こされたマウス肺の遺伝毒性の一部が酸化ストレスと炎症により誘発されたことが示唆された。

マグネタイト (酸化鉄) のマウス気管内投与により、肺組織 DNA 中の 8-oxo-dG が有意に上昇した。また、マグネタイト、酸化チタンを培養細胞に作用させた場合にも、添加量に依存して細胞 DNA 中の 8-oxo-dG の増加がみられた。市販の金属ナノ粒子 CuO、Fe₃O₄、Fe₂O₃、TiO₂、Ag で、マウス小核の誘発や酸化的 DNA 損傷の誘導がみられ、特に CuO が最も高い小核誘発性、酸化的 DNA 損傷誘導能を示した。ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性への関与を解明する必要がある。環境化学物質、内因性物質が関与する化学反応により DNA 中シトシン 5 位のメチル化が起きることが判った。ヒト発癌におけるエピジェネティック異常の原因として、炎症、喫煙、老化と関係してメチルラジカルによる DNA メチル化が起こる可能性が考えられる。またこの反応は繊維状、粒子状物質の発癌機構にも関連すると思われる。

細胞における各種ナノ粒子曝露の影響について、細胞生存率、ROS 生成、8-oxo-dG 生成、apoptosis、細胞周期等について検討した。特にマグネタイトはヒト細胞の種類により細胞傷害が異なる事を明らかにした。マグネタイトが前立腺がん細胞株に ROS を産生させ、塩基除去修復能や抗酸化能を抑制させるために、前立腺がん細胞に特異的に細胞毒性や遺伝毒性を与えると推測された。マグネタイト自体の毒性評価に関しての論文は少なく、比較的安全と考えられている。現在、毒性に関する論文が集積し始めている。細胞特異

性を加味した評価が必要と考える。

MWCNT、C60、マグネタイト、カオリンはほ乳類培養細胞に小核と姉妹染色分体交換を誘導し、遺伝毒性を示すことが明らかになった。抗酸化剤が小核頻度を減少させることから、この遺伝毒性発現には活性酸素種が関与していると思われる。DNA 修復欠損株を用いた実験から、MWCNT は塩基損傷(酸化的塩基損傷など)や DNA 二重鎖切断をつくることが示唆された。カオリン、C60、マグネタイトが細胞に DNA 二重鎖切断を誘発していることが γ H2AX フォーカス観察の結果から分かった。従ってこれらナノマテリアルは、活性酸素種や DNA 二重鎖切断を誘発し、これらが染色体の異常につながっている可能性があることがわかった。しかし活性酸素種発生のメカニズムや DNA 二重鎖切断生成機構は未解明である。更に DNA を標的としない、例えば有糸分裂のたんばく質阻害などで遺伝毒性を誘発している可能性も否定できず、更なる研究が必要である。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

2008

- 1) 竹澤俊明、竹内朋代、落谷孝広、柳原佳奈、寺田聡、鈴木尚真、渡邊昌俊. 組織病理学用の切片を動物細胞の培養担体に利用した先端研究. *Organ Biol.* 15, 107-114, 2008.
- 2) Hirata, A., Tsukamoto, T., Sakai, H., Takasu, S., Ban, H., Imai, T., Totsuka, Y., Nishigaki, R., Wakabayashi, K., Yanai, T., Masegi, T., Tatematsu, M. Carcinogenic risk of heterocyclic amines in combination - Assessment with a liver initiation model. *Food Chem Toxicol.*, 46, 2003-2009, 2008.
- 3) Deguchi, Y., Wu, N. X., Toyozumi, T., Masuda, S., Nagaoka, H., Watanabe, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Kinae, N.

- Application of a new bioassay technique using goldfish for assessment of water toxicity. *Environ Toxicol.* 23, 720-727, 2008.
- 4) Murai, T., Mori, S., Kang, J. S., Morimura, K., Wanibuchi, H., Totsuka, Y., Fukushima, S. Evidence of a Threshold-Effect for 2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline Liver Carcinogenicity in F344/DuCrj Rats. *Toxicol Pathol.* 36, 472-477, 2008.
 - 5) Terasaki, M., Totsuka, Y., Nishimura, K., Mukaisho, K. I., Chen, K. H., Hattori, T., Takamura-Enya, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Detection of endogenous DNA adducts, *O*⁶-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine and 3-ethanesulfonic acid-2'-deoxycytidine, in the rat stomach after duodenal reflux. *Cancer Sci.* 99, 1741-1746, 2008.
 - 6) Amanuma, K., Tone, S., Nagaya, M., Matsumoto, M., Watanabe, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Aoki, Y. Mutagenicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)aminol]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and benzo[a]pyrene (BaP) in the gill and hepatopancreas of rpsL transgenic zebrafish. *Mutat Res.* 656, 36-43, 2008.
 - 7) Katoh, T., Yamano, Y., Tsuji, M., Watanabe, M.. Genetic polymorphisms of human cytosol glutathione S-transferases and prostate cancer. *Pharmacogenomics.* 9, 93-104, 2008.
 - 8) Fukuta, K., Kohri, K., Fukuda, H., Watanabe, M., Sugimura, T., Nakagama, H.. Induction of multinucleated cells and apoptosis in the PC-3 prostate cancer cell line by low concentrations of polyethylene glycol 1000. *Cancer Sci.* 99, 1055-1062, 2008.
 - 9) Onsory, K., Sobti, R.C., Al-Badran, A.I., Watanabe, M., Shiraishi, T., Krishan, A., Mohan, H. Kaur, P. Hormone receptor-related gene polymorphisms and prostate cancer risk in North Indian population. *Mol Cell Biochem.* 314, 25-35, 2008.
 - 10) Watanabe, M., Hirokawa, Y., Tsuji, M., Yanagawa, M., Murata, T., Suzuki, H., Ichikawa, T., Katoh, T., Sugimura, Y., Shiraishi, T. Lack of involvement of the GNAS1 T393C polymorphism in prostate cancer risk in the Japanese population. *Anticancer Res.* 28, 3711-3716, 2008.
 - 11) Nakashima, T., Okada, T., Asahi, J., Yamashita, A., Kawai, K., Kasai, H., Matsuno, K., Gamou, S., Hirano, T. 8-Hydroxydeoxyguanosine generated in the earthworm *Eisenia fetida* grown in metal-containing soil. *Mutat Res.* 654, 138-144, 2008.
 - 12) Oya-Ito, T., Naitou, H., Masuda, S., Kinai, N., Ohashi, N. Functional analyses of neutrophil-like differentiated cell lines under a hyperglycemic condition, *Mol Nutr Food Res.* 52, 360-369, 2008.
 - 13) Toyozumi, T., Deguchi, Y., Masuda, S., Kinai, N. Genotoxicity and estrogenic activity of 3,3'-dinitrobisphenol A in goldfish, *Biosci Biotechnol Biochem.* 72, 2118-2123, 2008.
 - 14) Kinai, N., Oguni, I., Takabayashi, F., Masuda, S. Effect of tea extracts on gastric mucosal erosion and hemorrhage in *Helicobacter pylori* infected *Mongolian Gerbils*. *J Clin Biochem Nutr.* 43, 22-23, 2008.
- 2009**
- 15) 上大介, 石井隆雅, 梅澤明弘, 渡邊昌俊. マイクロアレイと NIA array analysis を用いた心筋分化誘導因子の探索. *医学のあゆみ*, 229, 1085-86, 2009.
 - 16) 渡邊昌俊. ナノ粒子メディシン はじめに *医学のあゆみ*, 230, 493, 2009.
 - 17) 上大介, 梅澤明弘, 渡邊昌俊. 磁性ナノ粒子を用いた iPS 細胞の誘導. *医学のあゆみ* 230, 495-499, 2009.
 - 18) 小坂俊仁, 芳野純治, 乾和郎, 若林貴夫, 奥嶋一武, 小林隆, 三好広尚, 渡邊真也, 服部昌志, 林繁和, 白石泰三, 山本隆行, 渡邊昌俊, 中澤三郎. 潰瘍性大腸炎と

- DNA メチル化との関連-one-carbon metabolism 関連遺伝子多型を中心に-消化器医学、7、74-80、2009.
- 19) Ohe, T., Suzuki, A., Watanabe, T., Hasei, T., Nukaya, H., Totsuka, Y., Wakabayashi, K. Induction of SCEs in CHL cells by dichlorobiphenyl derivative water pollutants, 2-phenylbenzotriazole (PBTA) congeners and river water concentrates. *Mutat Res.* 678, 38-42, 2009.
- 20) Yamamoto, M., Nakano, T., Matsushima-Hibiya, Y., Totsuka, Y., Takahashi-Nakaguchi, A., Matsumoto, Y., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Molecular cloning of apoptosis-inducing Pierisin-like proteins, from two species of white butterfly, *Pieris melete* and *Aporia crataegi*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 154, 326-333, 2009.
- 21) Nishigaki, R., Watanabe, T., Kajimoto, T., Tada, A., Takamura-Enya, T., Enomoto, S., Nukaya, H., Terao, Y., Muroyama, A., Ozeki, M., Node, M., Hasei, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K. Isolation and identification of a novel aromatic amine mutagen produced by the maillard reaction. *Chem Res Toxicol.* 22, 1588-1593, 2009.
- 22) Totsuka, Y., Higuchi, T., Imai, T., Nishikawa, A., Nohmi, T., Kato, T., Masuda, S., Kinoshita, N., Hiyoshi, K., Ogo, S., Kawanishi, M., Yagi, T., Ichinose, T., Fukumori, N., Watanabe, M., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2009) Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. *Part Fibre Toxicol.* 6, 23, 2009.
- 23) Nishimura, K., Totsuka, Y., Higuchi, T., Kawahara, N., Sugimura, T., Wakabayashi, K. Analysis of an RNA adduct formed from aminophenylnorharman. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 53, 211-212, 2009.
- 24) Kosaka, T., Yoshino, J., Inui, K., Wakabayashi, T., Kobayashi, T., Watanabe, S., Hayashi, S., Hirokawa, Y., Shiraishi, T., Yamamoto, T., Tsuji, M., Katoh, T., Watanabe, M. Involvement of NQO1 and SOD2 polymorphisms in ulcerative colitis. *DNA and Cell Biology.* 28, 625-631, 2009.
- 25) Osada, T., Kakazu, N., Watanabe, M., Yamane, H., Yagi, T. The chromosomal constitution of postmitotic neurons, assessed by neuronal nuclear transfer into oocytes and in ES cell lines derived from them. *Cytogenet Genome Res.* 125, 201-212, 2009.
- 26) Yoneda, M., Hirokawa, Y. S., Ohashi, A., Uchida, K., Kami, D., Watanabe, M., Yokoi, T., Shiraishi, T., Wakusawa, S. RhoB enhances migration and MMP1 expression of prostate cancer DU145. *Exp Mol Pathol.* 88, 90-95, 2010.
- 27) Morimoto, Y., Hirohashi, M., Kasai, T., Oyabu, T., Ogami, A., Myojo, T., Murakami, M., Nishi, K., Kadoya, C., Todoroki, M., Yamamoto, M., Kawai, K., Kasai, H., Tanaka, I. Effect of polymerized toner on rat lung in chronic inhalation study. *Inhal Toxicol.* 21, 898-905, 2009.
- 28) Kasai, H., Kawai, K. DNA methylation at the C-5 position of cytosine by methyl radicals: a possible role for epigenetic change during carcinogenesis by environmental agents. *Chem Res Toxicol.* 22, 984-989, 2009.
- 29) Tamae, K., Kawai, K., Yamasaki, S., Kawanami, K., Ikeda, M., Takahashi, K., Miyamoto, T., Kato, N., Kasai, H. Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci.* 100, 715-721, 2009.
- 30) Song, M. F., Li, Y. S., Ootsuyama, Y., Kasai, H., Kawai, K., Ohta, M., Eguchi, Y., Yamato, H., Matsumoto, Y., Yoshida, R., Ogawa, Y. Urea, the most abundant component in urine, cross-reacts with a commercial 8-OH-dG ELISA kit and contributes to overestimation of urinary 8-OH-dG. *Free Radic Biol Med.* 47, 41-46, 2009.
- 2010
- 31) 荒木里香, 三崎盛治, 町野由佳, 中山茂穂, 渡辺昌俊, 渡辺典子, 成瀬光栄. 長期経

- 過中に多彩な合併症を呈した McCune-Albright syndrome の1例. ホルモンと臨床 春季増刊号, 58, 192-197, 2010.
- 32) 中江 大. ナノ材料の健康影響. 保健医療科学 59, 256-261, 2010.
- 33) Murakami, Y., Imai, N., Miura, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Totsuka, Y., Hada, N., Yokoyama, Y., Suzuki, H., Mitsunaga, K. Chemical confirmation of the structure of a mutagenic aminophenylnorharman, 9-(4'-aminophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole: an authentic synthesis of 9-(4'-nitrophenyl)-9H-pyrido[3,4-b]indole as its relay compound. *Heterocycles*. 80, 455-462, 2010.
- 34) Teranishi, M., Toyooka, T., Ohura, T., Masuda, S., Ibuki, Y. Benzo[a]pyrene exposed to solar-simulated light inhibits apoptosis and augments carcinogenicity, *Chem. Biol. Interact.*, 185, 4-11, 2010.
- 35) Watanabe M. Editorial Comment on Article (Maspin expression in renal cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic parameters). (Invited) *Urology*, 76, e1, 2010.
- 36) Shiizaki, K., Asai, S., Ebata, S., Kawanishi, M., Yagi, T. Establishment of yeast reporter assay systems to detect ligands of thyroid hormone receptors alpha and beta. *Toxicol in Vitro*. 24, 638-644, 2010.
- 37) Kawai, K., Li, Y. S., Song, M. F., Kasai, H. DNA methylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications. *Bioorg Med Chem Lett*. 20, 260-265, 2010.
- 38) Kawai, K., Chou, P. H., Matsuda, T., Inoue, M., Aaltonen, K., Savela, K., Takahashi, Y., Nakamura, H., Kimura, T., Watanabe, T., Sawa, R., Dobashi, K., Li, Y., Kasai, H. DNA modifications by the ω -3 lipid peroxidation-derived mutagen 4-oxo-2-hexenal in vitro and their analysis in mouse and human DNA. *Chem Res Toxicol*. 23, 630-636, 2010.
- 39) Chou, P. H., Kageyama, S., Matsuda, S., Kanemoto, K., Sasada, Y., Oka, M., Shinmura, K., Mori, H., Kawai, K., Kasai, H., Sugimura, H., Matsuda, T. Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2(E)-nonenal and 4-oxo-2(E)-hexenal in human autopsy tissue. *Chem Res Toxicol*. 23, 1442-1448, 2010.
- 40) Yasuniwa, Y., Izumi, H., Wang, K. Y., Shimajiri, S., Sasaguri, Y., Kawai, K., Kasai, H., Shimada, T., Kashiwagi, E., Hirano, G., Kidani, A., Akiyama, M., Han, B., Ieiri, I., Higuchi, S., Kohno, K. Circadian disruption accelerates tumor growth and angiostromagenesis through a Wnt signaling pathway. *PLoS ONE*. 5, e15330, 1-12, 2010.
- 41) Toyozumi, T., Sekiguchi, H., Takabayashi, F., Deguchi, Y., Masuda, S., Kinae, N. Induction effect of coadministration of soybean isoflavones and sodium nitrite on DNA damage in mouse stomach. *Food Chem Toxicol*. 48, 2585-2591, 2010.
- 42) Sekiguchi, H., Takabayashi, F., Deguchi, Y., Masuda, H., Toyozumi, T., Masuda, S., Kinae, N. Leaf extract of *Wasabia japonica* relieved oxidative stress induced by *Helicobacter pylori* infection and stress loading in *Mongolian gerbils*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 74, 1194-1199, 2010.
- 43) Hori, A., Mizoue, T., Kasai, H., Kawai, K., Matsushita, Y., Nanri, A., Sato, M., Ohta, M. Body iron store as a predictor of oxidative DNA damage in healthy men and women. *Cancer Sci*. 101, 517-522, 2010.
- 44) Koyama, N., Yasui, M., Oda, Y., Suzuki, S., Satoh, T., Suzuki, T., Matsuda, T., Masuda, S., Kinae, N., Honma, M. Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard *in vitro* systems. *Environ Mol Mutagen*. 2010. *In press*.
- 2011
- 45) 一町直樹, 栗岡大輔, 河井一明, 葛西宏,

松本幹治, 渡邊昌俊. 各種ナノ粒子の細胞への影響: 細胞特異性とその応用. 粉体工学会誌 48: 145-151, 2011.

- 46) Wei, M., Wanibuchi, H., Nakae, D., Tsuda, H., Takahashi, S., Hirose, M., Totsuka, Y., Tatematsu, M., Fukushima, S. Low-dose carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline in rats: Evidence for the existence of no-effect levels and a mechanism involving p21(Cip/WAF1). *Cancer Sci.* 102, 88-94, 2011.
 - 47) Totsuka, Y., Kato, T., Masuda, S., Ishino, K., Matsumoto, Y., Goto, S., Kawanishi, M., Yagi, T., Wakabayashi, K. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity induced by fullerene (C60) and kaolin. *Genes Environ.* 33, 14-20, 2011.
 - 48) Kurioka, D., Takagi, A., Yoneda, M., Hirokawa, Y., Shiraiishi, T., Watanabe, M. Multicellular spheroid culture models: Applications in prostate cancer research and therapeutic *J Cancer Sci Ther.* 3, 60-65, 2011.
 - 49) Kato, K., Yamamura, Y., Kawanishi, M., Yagi, T., Matsuda, T., Sugiyama, A., Uno, Y. Application of the DNA adductome approach to assess the DNA-damaging capability of *in vitro* micronucleus test-positive compounds. *Mutat Res.* 721, 21-26, 2011.
 - 50) Kami, D., Takeda, S., Hatsune, M., Toyoda, M., Itakura, Y., Gojo, S., Kyo, S., Umezawa, A., Watanabe, M. Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine-coated magnetic nanoparticles. *J Artif Organs.* 2011. *In press.*
 - 51) Matsubara, S., Takasu, S., Tsukamoto, T., Mutoh, M., Masuda, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Totsuka, Y. Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-infected *Mongolian Gerbils* by 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile. *Int J Cancer.* 2011. *In press.*
- 1) Totsuka Y., Ichinose T., Hiyoshi K, Kato T, Masuda S., Nohmi T, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nanoparticles in *in vivo* mutation assay systems. International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes" (ISNT2008), Sapporo (2008年6月)
 - 2) Totsuka Y., Ichinose T., Hiyoshi K, Kato T, Masuda S., Nohmi T, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nanoparticles in *in vivo* mutation assay systems. 38th Annual Meeting European Environmental Mutagen Society, Croatia (2008年9月)
 - 3) Totsuka Y., Kato T, Masuda S., Nohmi T, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nanoparticles in *in vivo* assay systems. 第37回 日本環境変異原学会、沖縄 (2008年12月)
 - 4) 鈴木尚真、渡邊昌俊ら. 再生肝由来の切片担体を利用して幹細胞を肝細胞様細胞へ分化誘導する培養技術 第15回肝細胞研究会、静岡市 (2008年6月)
 - 5) Takezawa, T., Takeuchi, T., Suzuki, N., Teratani, T., Ochiya, T., and Watanabe, M. A novel strategy to extrapolate toxicity *in vivo*: A cell culture system utilizing TOSHI (tissue/organ sections for histopathology)-substrata derived from animals after drug administration, 15th International Congress on *In Vitro Toxicology*, Stockholm, スウェーデン (2008年9月).
 - 6) 鈴木尚真、渡邊昌俊ら. 動物組織片の切片担体を利用した培養モデルの可能性. 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2008年10月).
 - 7) 上大介, 渡邊昌俊ら. 抗癌剤感受性試験モデルとしての前立腺癌スフェロイド 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋 (2008年10月).
 - 8) 小山直己、増田修一ら. ライフステージを考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価 第37回大会日本環境変異原学会、沖縄 (2008年12月)

2. 学会発表

2008

- 9) 豊泉友康、増田修一ら。イソフラボン類と亜硝酸塩の同時投与によるマウス胃粘膜における DNA 損傷性の評価 第 37 回大会日本環境変異原学会、沖縄 (2008 年 12 月)
- 10) 加藤竜也、増田修一ら。静岡県内における居住地域及び工業地域の表層土壌抽出物の変異原性と変異原物質の検索 第 37 回大会日本環境変異原学会、沖縄 (2008 年 12 月)
- 11) 平野元美、増田修一ら。糖尿病発症時におけるアクリルアミドの遺伝毒性の変動 第 37 回大会日本環境変異原学会、沖縄 (2008 年 12 月)
- 12) 田里李奈、増田修一ら。糖尿病誘発ラットにおけるニトロソアミンの生成と毒性変動に関する基礎的研究 第 37 回大会日本環境変異原学会、沖縄 (2008 年 12 月)
- 13) 益森勝志、増田修一ら。コメットアッセイおよび小核試験の同時実施に関する検討 第 37 回大会日本環境変異原学会、沖縄 (2008 年 12 月)
- 14) Kinae N, Masuda S, et al. Formation of Genotoxic Compounds under Physiological Conditions and their Relationship to Diabetic mellitus. The Eighth China-Japan International Symposium on Health Sciences, Zhejiang, China (2008 年 11 月)
- 15) 増田修一。ナノ物質の遺伝毒性 第 27 回生命科学若手フォーラム特別セミナー、静岡 (2008 年 9 月)
- 16) 木苗直秀、増田修一ら。Biomonitoring of aquatic environment by genotoxicity tests using goldfish. 第 4 回国際海洋生物工学シンポジウム、韓国 (2008 年 6 月)
- 17) 小山直己、増田修一ら。ヒト CYP 高発現細胞を用いた代謝活性における AA の遺伝毒性 日本薬学会第 128 年会、横浜 (2008 年 3 月)
- 2009
- 18) Totsuka Y, et. al., Genotoxicity of Nanoparticles In *In Vitro* Micronuclei, *In Vivo* Comet and Mutation Assay Systems. 10th ICEM, フィレンツェ (2009 年 8 月)
- 19) Totsuka Y, Masuda S, et al. Biological activities of endogenous mutagens/carcinogens, aminophenylnorhartman and N-nitrosobile acid conjugates. 10th ICEM, フィレンツェ (2009 年 8 月)
- 20) 戸塚ゆ加里、増田修一ら。ナノ粒子により誘発される遺伝毒性: *in vitro* 小核、*in vivo* コメットおよび変異原性の解析 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
- 21) 山本真史、戸塚ゆ加里ら。メソテリンプロモーターを用いたピエリシン-1 遺伝子発現による抗がん活性 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
- 22) 樋口孝、戸塚ゆ加里ら。内因性変異原・がん原物質アミノフェニルノルハルマンの RNA 付加体形成による miRNA 機能の修飾 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
- 23) 西村興一、戸塚ゆ加里ら。アミノフェニルノルハルマン由来の DNA リン酸付加体の解析 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
- 24) 松本陽子、戸塚ゆ加里ら。ナノ粒子により誘発される *in vivo* 遺伝毒性 第 38 回日本環境変異原学会大会、静岡 (2009 年 11 月)
- 25) 小林沙衣、戸塚ゆ加里ら。メイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝子毒性評価 第 38 回日本環境変異原学会大会、静岡 (2009 年 11 月)
- 26) 桐谷英昌、戸塚ゆ加里ら。アミノフェニルノルハルマン (APNH) 由来の DNA リン酸付加体の構造解析 第 38 回日本環境変異原学会大会、静岡 (2009 年 11 月)
- 27) 尾後早耶佳、戸塚ゆ加里ら。微細粒子状物質の DNA 損傷性の評価 第 38 回日本環境変異原学会大会、静岡 (2009 年 11 月)
- 28) 加藤竜也、戸塚ゆ加里ら。 *In vivo* における 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene の遺伝毒性 第 38 回日本環境変異原学会大会、静岡 (2009 年 11 月)

- 29) 西村興一、戸塚ゆ加里ら. ニトロソ胆汁酸抱合体由来タンパク質付加体の解析 第38回日本環境変異原学会大会、静岡(2009年11月)
- 30) 一町直樹、渡邊昌俊ら. 前立腺癌に対するドセタキセルと磁性体ナノ粒子の併用による治療の基礎的研究 第68回日本癌学会学術総会、横浜(2009年10月)
- 31) 森田城次、上大介、米田操、広川佳史、白石泰三、渡邊昌俊. 前立腺癌スフェロイドの解析 第68回日本癌学会学術総会、横浜(2009年10月)
- 32) 渡邊昌俊、広川佳史、加藤貴彦、鈴木啓悦、市川智彦、杉村芳樹、白石泰三. 1.炭素代謝に関わる遺伝子多型と前立腺癌リスクについて 第68回日本癌学会学術総会、横浜(2009年10月)
- 33) 渡邊昌俊、上大介、米田操、広川佳史、白石泰三. ヒト前立腺癌細胞の3次元培養における抗癌剤抵抗性の獲得とその機構について 第98回日本病理学会総会、京都(2009年5月)
- 34) 上大介、渡邊昌俊、長嶋洋治、青木一郎. ヒト前立腺癌細胞と脂肪細胞との相互作用について 第98回日本病理学会総会、京都(2009年5月)
- 35) 広川佳史、渡邊昌俊、内田克典、西村啓介、今井啓、杉本寛子、福留寿生、刀根小百合、白石泰三. RhoB高発現前立腺がん細胞のMMP1発現抑制 第98回日本病理学会総会、京都(2009年5月)
- 36) 渡邊昌俊、今井裕、中野洋、村田哲也、白石泰三. 前立腺癌におけるReduced Folate Carrierx遺伝子多型の解析 第56回日本臨床検査医学会学術集会、札幌(2009年8月)
- 37) 中江 大、坂本義光、福森信隆、斎藤育江、栗田雅行、大橋則雄、矢口久美子、小縣昭夫. ナノ材料の医療への応用とリスク評価 社団法人 資源・素材学会平成21年度春季大会、千葉(2009年3月)
- 38) 葛西 宏、河井 一明. 化学反応によるDNA中シトシン5位のメチル化:エピジェネティック変化に関与する可能性 第68回日本癌学会学術総会、横浜(2009年10月)
- 39) 河井 一明、葛西 宏ら. 尿素は市販8-OH-dG ELISA kitにおいて陽性反応を示す 第68回日本癌学会学術総会、横浜(2009年10月)
- 40) 増田修一ら. 糖尿病発症時における変異・発がん物質の遺伝毒性の変動 第63回日本栄養・食糧学会大会、長崎(2009年5月)
- 41) 平野元美、増田修一ら. 糖尿病状態及びアルコール摂取時におけるアクリルアミドの遺伝毒性の変動 第19回日本メイラード学会、金沢市(2009年11月)
- 42) 小山直己、増田修一ら. ライフステージ(週齢)を考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価 第38回日本環境変異原学会大会、静岡(2009年11月)
- 43) 加藤竜也、増田修一ら. 3, 6-dinitrobenzo[el]pyreneの遺伝毒性と造血組織への影響 日本薬学会 第129年会、京都(2009年3月)
- 2010**
- 44) 戸塚ゆ加里. 微粒子により誘発されるin vitroおよびin vivo遺伝毒性 第99回日本病理学会総会、東京(2010年4月)
- 45) 戸塚ゆ加里. ナノ粒子による突然変異原性 第17回日本がん予防学会、札幌市(2010年7月)
- 46) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性 第20回格子欠陥フォーラム、大阪(2010年9月)
- 47) Totsuka, Y., et al. Genotoxicity induced by nanoparticles. 第69回日本癌学会学術総会、大阪(2010年9月)
- 48) Kato, T., Totsuka, Y., et al. Increased formation of lipid peroxide (LPO)-derived DNA adducts in obese model mice. 第69回日本癌学会学術総会、大阪(2010年9月)
- 49) Yamamoto, M., Totsuka, Y., et al. Anti-cancer activity of DNA ADP-ribosylating protein using mesothelin promoter-mediated gene expression. 第69回日本癌学会学術総会、大阪(2010年9月)

- 50) 松本陽子, 戸塚ゆ加里ら. ナノ粒子である多層カーボンナノチューブ(MWCNT)及びマグネタイト(MGT)により誘発される in vivo 遺伝毒性 第 39 回日本環境変異原学会、つくば (2010 年 11 月)
- 51) 石野孔祐, 戸塚ゆ加里ら. ナノマテリアルにより誘発される DNA 付加体の解析 第 39 回日本環境変異原学会、つくば (2010 年 11 月)
- 52) 越田英史, 戸塚ゆ加里. DNAADP-リボシル化蛋白質、ピエリシン-1 による変異原性と制がん性 第 39 回日本環境変異原学会、つくば (2010 年 11 月)
- 53) Totsuka, Y., Masuda, S., et al. Genotoxicity induced by nanoparticles., 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya (2010 年 12 月)
- 54) 渡邊昌俊ら. 前立腺癌に対する磁性体ナノ粒子の併用化学療法の基礎的研究 第 99 回日本病理学会総会、東京 (2010 年 4 月)
- 55) 上大介, 渡邊昌俊ら. 磁性体ナノ粒子を用いた遺伝子導入法の開発-非ウイルス性の iPS 細胞作製を目指して- 第 99 回日本病理学会総会、東京 (2010 年 4 月)
- 56) 一町直樹, 渡邊昌俊ら. ドセタキセルによる前立腺癌治療における磁性体ナノ粒子の効果 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪 (2010 年 9 月)
- 57) 野口堯悟, 葛西宏, 戸塚ゆ加里, 渡邊昌俊ら. マクロ・ナノ粒子の A549 細胞への影響 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪 (2010 年 9 月)
- 58) 渡邊昌俊ら. 炭素代謝に関わる遺伝子多型と前立腺癌のリスクについて 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪 (2010 年 9 月)
- 59) 米田操, 渡邊昌俊ら. 前立腺がんスフェロイド形成にかかわる遺伝子の解析 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪 (2010 年 9 月)
- 60) 一町直樹, 渡邊昌俊ら. 各種ナノ粒子の細胞への影響-細胞特異性とその応用- 第 46 回夏期シンポジウム 粉体工学会、京都 (2010 年 8 月)
- 61) 渡邊昌俊ら. 前立腺癌における 1 炭素単位転移機構関連酵素遺伝子多型の解析 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会、東京 (2010 年 9 月)
- 62) 武田祥吾, 渡邊昌俊. 磁性体ナノ粒子を用いた遺伝子導入法の開発とその展開 化学工学会第 42 回秋季大会、京都 (2010 年 9 月)
- 63) 一町直樹, 渡邊昌俊. 磁性体ナノ粒子を用いた前立腺癌治療法の開発 化学工学会第 42 回秋季大会、京都 (2010 年 9 月)
- 64) Kami, D., Watanabe, M., et al. Targeting gene delivery by magnetic force and magnetic nanoparticles. BIT's 1st Annual World Congress of Nanomedicine, Beijing, China (2010 年 10 月)
- 65) 中江 大. 多層カーボンナノチューブの発がんハザードを中心としたナノマテリアルの安全性評価 平成 22 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム、東京 (2010 年 5 月)
- 66) 中江 大ら. 多層カーボンナノチューブの発がん性など、ナノ材料の安全性評価の試み 第 25 回発癌病理研究会、宮城 (2010 年 8 月)
- 67) 中江 大. ナノ材料の安全性評価について 第 17 回岐山毒性病理セミナー、岐阜市 (2010 年 10 月)
- 68) 川西優喜. DNA 変異から RNA へ～異常 RNA と RNA サーベイランス機構研究の最前線 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 69) 加藤杏子, 川西優喜ら. CHL/IU 細胞を用いた in vitro 小核試験における DNA アダクトーム解析(第 2 報) 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 70) 藤川芳宏, 川西優喜ら. ヒト細胞株における 3-ニトロベンズアントロン由来の DNA 付加体の TLS および変異解析 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)

- 71) 椎崎一宏、川西優喜ら. ベンゾ[a]ピレンの付加体形成における CYP1 ファミリー酵素の役割 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 72) 山田りな、川西優喜ら. 核内受容体リガンドアッセイ酵母の樹立と河川水のアッセイ 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 73) 大西佳奈、川西優喜ら. ミネラルコルチコイド受容体・プロゲステロン受容体発現酵母の樹立 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 74) 小林沙衣、戸塚ゆ加里、川西優喜ら. メイラード反応生成物ベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝毒性評価 日本環境変異原学会第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 75) Fujikawa Y, Kawanishi M, et al. Mutation spectra of translesion DNA synthesis produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts in human cells. 日本分子生物学会第 33 回大会、神戸 (2010 年 12 月)
- 76) 河井一明、葛西 宏ら. 金属ナノ粒子によるマウス末梢血小核誘発と酸化的DNA損傷 平成22年度日本産業衛生学会九州地方会学会、北九州市 (2010年6月)
- 77) 宋 明芬、葛西 宏ら. 金属ナノ粒子のマウスにおける遺伝毒性と酸化ストレス誘導作用 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪市 (2010 年 9 月)
- 78) Kawai, K., Kasai, H., et al. Effects of nanoparticles on urinary 8-OH-dG in rats. Nanotoxicology、イギリス (2010 年 6 月)
- 79) Kawai, K., Kasai H., et al. Metal nanoparticle induced genotoxicity and oxidative stress in mice. 第 2 回アジア環境変異原学会、タイ (2010 年 12 月)
- 80) 森上三穂、増田修一. メイラード反応生成物および日常食品の亜硝酸処理による変異原性の発現に関する研究 第 64 回日本栄養・食糧学会大会、徳島 (2010 年 5 月)
- 81) 董 蓓蓓、増田修一ら. 各種食品中のトランス脂肪酸及び脂肪酸エステル類の分析 第 100 回日本食品衛生学会学術講演会、熊本 (2010 年 9 月)
- 82) 加藤竜也、戸塚ゆ加里、増田修一ら. 肥満モデルマウスにおける酸化損傷に関する DNA 付加体生成の増加 日本環境変異原学会 第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 83) 京谷恭弘、増田修一ら. *In vivo* コメントアッセイにおける手法および解析装置間差の検討 日本環境変異原学会 第 39 回大会、つくば (2010 年 11 月)
- 84) Kato, T., Masuda, S., et al. Evaluation of genotoxicity induced by nanoparticles in *in vitro* and *in vivo* systems. The 3rd International Conference on Health and Longevity Sciences, Shizuoka (2010年10月)
- 85) Kato T, Masuda S, et al. Increased formation of lipid peroxide (LPO)-derived DNA adducts in obese mice. 2nd Asian Conference on Environmental Mutagens, Pattaya (2010年12月)
- 2011
- 86) 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性、レドックス・ライフイノベーション シンポジウム、東京 (2011 年 3 月)
- 87) 多田幸恵、中江 大ら. ナノ磁性粒子マグネタイトの気管内反復注入による Fischer 344 ラット肺への影響 第 27 回日本毒性病理学会学術集会、大阪市 (2011 年 1 月)
- 88) 小林沙衣、川西優喜ら、メイラード反応生成物ベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝毒性評価、日本薬学会年会、静岡 (2011 年 3 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

出願番号 2011-16671 癌治療用組成物
発明者 渡邊昌俊，一町直樹，博多俊行
(平成 23 年 1 月 28 日) 渡邊先生

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
増田修一	加工食品に含まれる化学物質の安全性	米谷民雄	食品の安全性と対策	社団法人日本食品衛生協会	東京	2009	105-113
増田修一、木苗直秀	わさび辛子油の抗菌作用を用いた特殊用途・利用法について	—	AROMA RESEARCH	FRAGRANCE JOURNAL	東京	2010	102-106
増田修一、木苗直秀	細菌を用いた変異原性試験、食品中のアクリルアミドの分析試験	中村好志、松浦寿喜	健康と食の安全を考えた食品衛生学実験	アイ・ケイコーポレーション	東京	2011	86-93
増田修一	食品中に存在する変異原・発がん物質と抗変異原性・抗発がん物質	那須正夫 和田啓爾	食品衛生学	南江堂	東京	2011	183-211

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
竹澤俊明, 竹内朋代, 落谷孝広, 柳原佳奈, 寺田聡, 鈴木尚真, 渡邊昌俊.	組織病理学用の切片を動物細胞の培養担体に利用した先端研究	Organ Biol.	15	107-114	2008
Hirata A, Tsukamoto T, Sakai H, Takasu S, Ban H, Imai T, Totsuka Y, Nishigaki R, Wakabayashi K, Yanai T, Masegi T, Tatematsu M.	Carcinogenic risk of heterocyclic amines in combination · Assessment with a liver initiation model.	Food Chem Toxicol.	46	2003-2009	2008
Deguchi Y, Wu NX, Toyoizumi T, Masuda S, Nagaoka H, Watanabe T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Kinae N.	Application of a new bioassay technique using goldfish for assessment of water toxicity.	Environ Toxicol.	23	720-727	2008
Murai T, Mori S, Kang JS, Morimura K, Wanibuchi H, Totsuka Y, Fukushima S.	Evidence of a Threshold-Effect for 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline Liver Carcinogenicity in F344/DuCrj Rats.	Toxicol Pathol.	36	472-477	2008