

2013 29006B

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 **in vitro** 評価系構築に向けた基礎研究

平成 23～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 宮島 敦子

平成 26 (2014) 年 3 月

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**in vitro** 評価系構築に向けた基礎研究

平成 23～25 年度 総合研究報告書

平成 26 (2014) 年 3 月

| | |
|-------|---|
| 伊佐間和郎 | 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長 |
| 吉田 緑 | 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター病理部 室長 |
| 宮島 敦子 | 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長 |
| 花方 信孝 | 独立行政法人物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合ステーション ステーション長 |
| 河上 強志 | 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官 |
| 戸塚ゆ加里 | 独立行政法人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 |
| 中江 大 | 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 部長 |
| 渡邊 昌俊 | 国立大学法人横浜国立大学 工学研究院 教授 |

目 次

I. 総括研究報告

- ナノマテリアルのin vitro 評価系構築に向けた基礎研究 ----- 1
宮島 敦子

II. 分担研究報告

1. 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析 ----- 2 5
河上 強志
2. ナノマテリアルの細胞内動態の解析 ----- 4 6
吉田 緑
3. ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析 ----- 6 3
宮島 敦子
4. ナノマテリアル暴露による網羅的遺伝子発現解析 ----- 7 4
花方 信孝
5. ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価 ----- 8 8
伊佐間和郎
6. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究 -- 1 0 1
戸塚ゆ加里
7. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化のin vivo 評価 ----- 1 1 1
中江 大
8. 遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究 ----- 1 4 0
渡邊 昌俊

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 1 5 1

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 1 5 9

I . 総括研究報告

ナノマテリアルの *in vitro* 評価系構築に向けた基礎研究

研究代表者 宮島敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長

研究要旨： ナノマテリアルの生体影響については、試験法や評価基準などが定められていないため、現在は断片的な結果の集積に留まっている。特に、ナノマテリアルの化学組成、サイズ、物性等に依存した生体影響が確認されているものの、ナノマテリアルのキャラクタリゼーションが不十分であるため、毒性発現のメカニズム解明には至っておらず、ナノマテリアルの *in vitro* 試験法の開発が課題となっている。そこで、本研究では、単純化された培養細胞系において、十分にキャラクタリゼーションされたナノマテリアルによる細胞応答を捉え、ナノマテリアルの化学組成、サイズ、物性等が細胞応答に及ぼす影響を解明することを目的とする。さらに、有用ナノマテリアルの遺伝毒性を低減化する物理的及び化学的手法を検討する。平成 23～25 年度の研究では、次のような成果を得た。

(1) 細胞毒性および遺伝毒性に供試する 10 種類（11 試料）の金属酸化物ナノマテリアルについて、各種懸濁液中の平均粒子径、粒径分布および Zeta 電位を測定し、その物性を把握した。分散剤に Tween80 を用い、遊星ボールミル型粉碎機を使用することで、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズが異なる懸濁液の調製に成功した。二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液を A549 細胞に曝露して細胞毒性試験を行った結果、二次粒子径サイズが大きいほど細胞毒性が強くなる傾向を示した。(2) ZnO の曝露細胞標本を透過型電顕観察した結果、細胞質に種々の大きさのいびつな小胞が観察され、電子密度の高い箇所が散見された。高電子密度部位について EDS 解析を行ったが、細胞内に亜鉛の分布は認められなかった。NiO 曝露細胞ではいずれの粒子径群においても同程度の 0.4～0.6 μm の不整形高電子密度物質が観察され、粉碎用ジルコニアボール径 0.5 mm で調製した群では細胞突起が乏しい細胞が豊富な細胞突起を有する細胞と混在して観察された。(3) A549 細胞を用いて、10 種類の酸化金属ナノマテリアルを対象として、その物性について明らかにすると同時に、細胞毒性について検討した。細胞毒性が観察された 5 種類の酸化金属ナノマテリアルについて、小核試験により遺伝毒性を評価した。物理化学的性質の異なる 2 種類の ZnO において、細胞毒性強度と遺伝毒性強度との間に関連がなかった。THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。3 種類のナノマテリアルで細胞毒性が観察され、IL-8 の増加が観察された。(4) CuO NPs および ZnO NPs を曝露されたヒト肺上皮細胞の分子応答を DNA マイクロアレイによって調べた。CuO NPs 曝露細胞では、細胞周期関連遺伝子の発現低下と p38 経路の活性化が認められ、CuO NPs の毒性に対する防御機構であると考えられた。DNA マイクロアレイによる解析から、カルシウムは細胞周期関連遺伝子の発現を向上させ、ZnO NPs による増殖速度の低下を相殺した。ヒト肺上皮細胞に対する carbon nanotubes (CNTs) の細胞毒性において、前培養時間による CNTs に対する細胞の感受性の違いは細胞の増殖ステージによる生

理的状態の違いに依存すると考えられた。(5) SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらも金属塩化物の共存に伴ってゼータ電位が変化したが、平均粒子径は変化しなかった。水晶発振子マイクロバラン (QCM) 法による解析から、ゼータ電位の異なる SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらにも CuCl₂ が結合し、それらの結合量に差は認められなかった。SiO₂ ナノ粒子が共存すると、AlCl₃、CuCl 及び CuCl₂ の細胞毒性強度は増強した。SiO₂ ナノ粒子共存下で CuCl 及び CuCl₂ を曝露すると、V79 細胞内への銅の取り込み量は増加した。(6) マグネタイトの気管内投与によりマウス肺に生成する付加体の網羅的解析を行なったところ、マグネタイト投与群で付加体の総数が上昇し、それらの複数が酸化反応ならびに炎症反応由来であることが分かった。物理化学的性質が異なるカオリンをマウスに気管内投与し DNA 損傷性を比較したところ、Kaolin-K (韓国産) に比べ Kaolin-U (アメリカ産) の活性が高いことがわかった。マウス肺を模倣した *in vitro* アッセイ系を用いてカオリンの DNA 損傷性を検証したところ、マウス肺に取り込まれたカオリンは、近傍の上皮細胞に ROS 産生を促すことで DNA 損傷や変異を誘発していることが示唆された。(7) 磁性ナノ粒子マグネタイトをラットの気管内に単回投与して体内動態を検索したところ、主として肺に分布し、肺における生物学的半減期は 7 日であり、排泄は主として糞を介して行われることが判明した。マグネタイトの肺発がんイニシエータ活性及びプロモータ活性について、ラット 2 段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。その結果、マグネタイトは明らかな肺発がんイニシエータ活性を有しないものと示唆され、また、明らかな肺発がんプロモータ活性を有さず、むしろ DHPN の肺発がん性を抑制することが明らかとなった。(8) 磁性体ナノ粒子 (Magnetite, Fe₃O₄) 曝露による細胞への影響を *in vitro* 系で検討し、同ナノ粒子はヒト細胞の種類により細胞傷害の程度が異なる事が認められた。その理由として、抗酸化、修復にかかわる遺伝子発現の変化の関与が考えられた。表面修飾した Fe₃O₄ NPs を用いて、前立腺癌細胞株及び肺癌細胞株の *in vitro* 系で曝露実験を行った結果、ROS 産生量、8-OHdG 産生量に修飾の有無で差が認められた。カルボキシル基修飾により、ROS 産生、8-OHdG 産生は抑制された。前立腺癌細胞株では、PEI 表面修飾により 2 次粒子径が抑えられ、分散能の安定性が高まる事が確認された。

| | |
|----------------------|---------------------|
| 研究分担者 | 中江 大 東京都健康安全研究センター |
| 吉田 緑 国立医薬品食品衛生研究所 | 薬事環境科学部 部長 |
| 病理部 室長 | 渡邊 昌俊 横浜国立大学 工学研究院 |
| 花方 信孝 (独) 物質・材料研究機構 | 教授 |
| ナノテクノロジー融合ステーション | |
| ステーション長 | 研究協力者 |
| 伊佐間 和郎 国立医薬品食品衛生研究所 | 加藤 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 生活衛生化学部 室長 | 医療機器部 主任研究官 |
| 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所 | 小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 生活衛生化学部 主任研究官 | 医療機器部 |
| 戸塚ゆ加里 (独) がん研究センター研究 | 酒井 恵子 国立医薬品食品衛生研究所 |
| 所 発がんシステム研究分野 | 医療機器部 |
| ユニット長 | 多田 幸恵 東京都健康安全研究センター |

薬事環境科学部 生体影響研究科 主任研究員
齋藤 育江 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 生体影響研究科 主任研究員
小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 生体影響研究科 科長補佐
猪又 明子 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 生体影響研究科 科長
保坂 三継 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 環境衛生研究科 科長
大山 謙一 東京都健康安全研究センター
環境保健部 生体影響研究科 科長(当時)(平成23年度のみ)

A. 研究目的

ナノマテリアルの生体影響については、試験法や評価基準などが定められていないため、現在は断片的な結果の集積に留まっている。そのため、『ナノマテリアルの安全対策に関する検討会報告書』（2009）では、今後の具体的な対応のひとつとして、ナノマテリアルの*in vitro* 試験法の開発を挙げている。本研究班の伊佐間らは、平成20年度及び平成21年度の厚生労働省家庭用品規制基準調査事業において、家庭用品に使用されるシリカ、銀及び酸化亜鉛ナノ粒子の安全性評価を実施し、各々100 nm 前後に調製したナノ粒子について、細胞毒性試験、染色体異常試験及びラット気管内投与毒性試験を行った。その結果、*in vitro* では、シリカ < 酸化亜鉛 < 銀の順に強い細胞毒性を示し、酸化亜鉛ナノ粒子のみが染色体の構造異常を示した。また、*in vivo* では、いずれも泡沫細胞集簇や肺胞上皮の増生を伴う肉芽腫性炎症や慢性肺炎が認められ、酸

化亜鉛ナノ粒子のみで顕著な慢性肺炎だけでなく気管支上皮の増生を伴う肺の線維化が認められた。また、Karlsson ら（2009）は、数種の金属酸化物の内、酸化銅ナノ粒子のみがサイズ依存性の細胞毒性を示すことを報告した。また、Xu ら（2010）は、半導体酸化物ナノ粒子は絶縁体酸化物ナノ粒子より強い細胞毒性を示すことを報告した。さらに、Cho ら（2012）は、金属酸化物ナノ粒子のハザード評価において、可溶性金属イオンの寄与に重大な相違があることを指摘した。

このように、化学組成、サイズ、物性等に依存したナノマテリアルの生体影響が確認されているものの、試料のキャラクターゼーションが不十分であるため、毒性発現のメカニズム解明には至っていない。そこで、本研究は、単純化された培養細胞系において、十分にキャラクターゼーションされたナノマテリアルによる細胞応答を捉え、ナノマテリアルの化学組成、サイズ、物性等が細胞応答に及ぼす影響を解明することを目的とする。そのために、金属酸化物を対象に、物理化学的特徴を把握し、細胞内動態を明らかにした上で、細胞毒性・遺伝毒性、遺伝子発現及び相互作用を総合的に評価する。さらに、有用ナノマテリアルの遺伝毒性を低減化する物理的及び化学的な手法を検討する。以下に平成23～25年度の各分担研究の成果の概要を記載するが、詳細は各分担研究報告書を参照されたい。

B. 研究方法及び結果

1. 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

金属酸化物ナノマテリアルの培養細胞試験系における、細胞応答に及ぼすナノマテリアルの影響を解明すること目的として、培養細胞試験系に用いる金属酸化物ナノマテリアルの物性解析を行った。また、二次

粒子径サイズの異なる金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の調製法を開発し、二次粒子径サイズの違いが細胞毒性に与える影響を検討した。具体的には、細胞毒性および遺伝毒性に供試する 10 種類 (11 試料) の金属酸化物ナノマテリアルについて、各種懸濁液中の平均粒子径、粒径分布および Zeta 電位を測定し、その物性を把握した。

Tween 80 を分散剤として添加したり、直径の異なる粉砕用ジルコニアボールを用いた遊星ボールミル型湿式ナノ粉砕機を使用したりすることにより、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズが異なる懸濁液の調製に成功した。二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液を A549 細胞に曝露して細胞毒性試験を行った結果、二次粒子径サイズが大きいほど細胞毒性が強くなる傾向を示した。

2. ナノマテリアルの細胞内動態の解析

物理化学的特徴を十分に把握した種々のナノマテリアルに曝露された培養細胞における細胞内動態を透過型電子顕微鏡およびエネルギー分散型 X 線分析 (TEM-EDS) を用いて明らかにする基礎研究として、*in vivo* 材料を用いて TEM-EDS で検出可能か予備検討を経て、酸化亜鉛を曝露した細胞系を用いた *in vitro* 系の電子顕微鏡標本作製条件を検討した。次に培養細胞に酸化亜鉛を曝露した場合の超微形態学的な観察を行い、細胞内の TEM-EDS の解析を行った。*In vitro* 実験では、低および高濃度の酸化亜鉛および粒子径の大きさにより細胞毒性が異なるニッケルを曝露した。電顕観察の結果、1 および 10 μg 亜鉛曝露群、径の異なる粉砕用ジルコニアボールで調製した酸化ニッケル曝露群 (0.05、0.1 および 0.5 μm) とともに細胞壊死、アポトーシスの増加等は観察されず、曝露による明らかな細胞傷害像を特定することはできなかった。ニッケル

曝露細胞ではいずれの粒子径群においても同程度の 0.4~0.6 μm の不整形高電子密度物質が観察され、ジルコニアボール径 0.5 mm 群では細胞突起が乏しい細胞が豊富な細胞突起を有する細胞と混在して観察された。TEM-EDS 解析においては、細胞質内に亜鉛を検出することはできなかった。

3. ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析

ナノマテリアル *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト肺がん由来細胞株である A549 細胞を用いた細胞毒性及び遺伝毒性評価系を確立させ、その有用性を確認した。次に、10 種類の酸化金属ナノマテリアルを対象として、その物性について明らかにすると同時に、細胞毒性についてコロニー法及び MTT 法により検討した。細胞毒性が観察された ITO、CuO、 Y_2O_3 、ZnO、NiO の 5 種類の酸化金属ナノマテリアルについて、小核試験により遺伝毒性を評価した。その結果、明らかな遺伝毒性が観察されたのは ZnO のみであった。物理化学的性質の異なる 2 種類の ZnO において、細胞毒性強度と遺伝毒性強度との間に関連がなかった。ZnO の細胞毒性の発現について、MTT 法に加えて ATP 及び GSH 含量の変化を指標として、細胞毒性発現メカニズムについて解析を進めた。また、ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した結果、CuO、ZnO、NiO で毒性が観察された。細胞培養上清中のサイトカイン量は、CuO、ZnO、NiO 曝露により IL-8 が増加した。ナノマテリアルの細胞内への取り込みについて検討するため、A549 細胞を用いて、ZnO による細胞毒性に対するサイトカラシン D (CytoD) 処理の影響について検討した。CytoD 処理 3 時間後に ZnO (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を曝露させたところ、ZnO 曝露 24 時間後の細胞生存率

は CytoD の前処理により約 80%に回復した。

4. ナノマテリアル暴露による網羅的遺伝子発現解析

酸化銅ナノ粒子 (CuO NPs)および酸化亜鉛ナノ粒子(ZnO NPs)に曝露されたヒト肺上皮細胞の分子応答を DNA マイクロアレイによって調べた。CuO NPs に曝露された細胞では、細胞周期関連遺伝子の発現低下と p38 経路の活性化が認められた。また、ZnO NPs に曝露された細胞は、増殖速度が低下したが、これはカルシウムにより回復した。DNA マイクロアレイによる解析から、カルシウムは細胞周期関連遺伝子の発現を向上させ、ZnO NPs による増殖速度の低下を相殺することが明らかとなった。また、これら金属酸化物とは異なる炭素系ナノマテリアルとしてカーボンナノチューブの細胞毒性と遺伝子発現変化についても調べた。カーボンナノチューブは ZnO ナノ粒子と同程度の細胞毒性を示した。カーボンナノチューブの DNA マイクロアレイによる遺伝子発現では、細胞機能に変化を及ぼすような大きな遺伝子発現変化は認められなかった。カーボンナノチューブの毒性はヒト肺上皮細胞の前培養時間に依存し、前培養時間が長い細胞ほどカーボンナノチューブの毒性に対する感受性が低下していた。DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析から、前培養時間に依存した感受性の違いは細胞の生理状態の差に依存していた。

5. ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価

ナノ粒子の物理化学的性質に及ぼす共存する金属塩化物の影響を明らかにするため、金属塩化物の共存に伴うナノ粒子の粒子径及びゼータ電位の変化を解析した。さらに、水晶発振子マイクロバラン (QCM) 法によりナノ粒子に対する金属塩化物の吸着挙動

を解析した。次に、共存する金属塩化物の細胞毒性に及ぼすナノマテリアルの影響を明らかにするため、ナノ粒子共存下及び非共存下における金属塩化物の細胞毒性及び細胞内取り込み量を評価した。その結果、培地及び純水中で SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらも金属塩化物の共存に伴って平均粒子径は変化しなかった。また、純水中で SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらも金属塩化物の共存に伴ってゼータ電位が変化したが、SiO₂ ナノ粒子では共存前の負の値から共存後の正の値への反転を伴う大きな変化が認められた。さらに、QCM 法からゼータ電位の異なる SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらにも CuCl₂ が結合し、それらの結合量に差は認められなかった。SiO₂ ナノ粒子において金属塩化物の共存に伴うゼータ電位の特異な変化が認められた。次に、ナノ粒子の単独暴露条件で、100 µg/ml 以下の濃度の SiO₂ ナノ粒子は細胞毒性を示さなかったが、25 µg/ml 以上の濃度の TiO₂ ナノ粒子は弱い細胞毒性を示した。そこで、100 µg/ml の濃度の SiO₂ ナノ粒子並びに 10 µg/ml 及び 100 µg/ml の濃度の TiO₂ ナノ粒子の共存による金属塩化物の細胞毒性の変化を調べた。SiO₂ ナノ粒子が共存すると、AlCl₃、CuCl 及び CuCl₂ の細胞毒性強度は増強した。一方、TiO₂ ナノ粒子が共存しても、AlCl₃、CrCl₃、CuCl、CuCl₂、FeCl₂、FeCl₃、NiCl₂ 及び ZnCl₂ の細胞毒性強度は変化しなかった。また、SiO₂ ナノ粒子共存下で CuCl 及び CuCl₂ を曝露すると、V79 細胞内への銅の取り込み量は増加した。一方、TiO₂ ナノ粒子共存下で CuCl、CuCl₂ 及び ZnCl₂ を曝露しても、細胞内への銅及び亜鉛の取り込み量は変化しなかった。

6. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究

DNA 付加体を網羅的に解析する方法 (ア

ダクトーム法)を用いて、マグネタイトの気管内投与によりマウス肺に生成する付加体の解析を行なったところ、マグネタイト投与群で付加体の総数がコントロールと比べ上昇したこと、および、それらの複数が酸化反応ならびに炎症反応由来であることが分かった。この結果は、マグネタイトにより誘発される遺伝毒性には、酸化ストレスや炎症が関与する事を裏付けるものとなった。原料の産地やメーカーの違いによる形状や表面構造が異なる同種異型のナノマテリアルに注目し、これらの違いがナノマテリアルの遺伝毒性に及ぼす影響について明らかにするため、Kaolin-K (韓国産) 及び Kaolin-U (アメリカ産) の、①物理化学的性質、②*in vivo* DNA 損傷性、③細胞への取り込み、④ROS 産生能、⑤マクロファージとの培養による肺上皮細胞への影響、⑥マクロファージからの炎症性サイトカイン分泌について調べた。その結果、物理化学的性質においては、両者の粒子表面構造とゼータ電位に違いがあることがわかった。また、これら Kaolin を気管内投与したマウス肺において、Kaolin-U がより強い DNA 損傷性を示すことが明らかとなった。一方、培養細胞を用いた実験において、Kaolin-K に比べて Kaolin-U のほうが、実質細胞 (A549) およびマクロファージ (RAW264) のいずれの細胞内にも取り込まれやすい傾向がみられた。更に、ROS 産生能について検討してみたところ、A549 ではいずれの Kaolin においても ROS を産生している細胞はほとんどみられなかったのに対し、RAW264 では、細胞内への Kaolin の取込み量に相関して、ROS を産生している細胞が増加していた。また、A549 での ROS 産生および DNA 損傷性は RAW 264 の共存下で上昇した。RAW264 からの炎症性サイトカイン (IL-1 β 及び TNF- α) の分泌は kaolin を取り込む事により誘導され、その分泌量は

Kaolin-K に比べ Kaolin-U の方が高い傾向がみられた。

7. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の *in vivo* 評価

平成 23 年度はラットに気管内投与したマグネタイトの体内動態及び排泄について検索した。試験は、F344/DuCrIj 系ラット (10 週齢) に、マグネタイトを 0 (対照群) ・ 15.0 mg/kg 体重 (投与群) の用量でスプレー投与器により 1 回気管内投与し、その 1・3・7・21・50 日後に代謝ケージで 24 時間尿及び糞を採取し、エーテル麻酔下で採血後、肝・腎・肺・脳を摘出した。試料中のマグネタイト量は、誘導結合プラズマ質量分析装置により分析したマグネタイト由来の鉄の濃度を指標として評価した。肺の鉄濃度は、1 日に最高値を検出した後、7 日まで比較的速やかに減少し、21-50 日にピーク時のほぼ 3 分の 1 の濃度でプラトーに推移した。肺でのマグネタイトの生物学的半減期は、ほぼ 7 日間であると推定された。血液・肝・腎・脳の鉄濃度は、肺よりきわめて低値ながら、1 日から 50 日まで継続して増加する傾向を示した。一方、肉眼観察においては投与群のラットの肺及びリンパ節が灰黒色を呈する変化が見られ、組織病理学的観察によっては当該部位に黄褐色の顆粒を貪食したマクロファージの浸潤及び黄褐色顆粒の沈着が認められた。この顆粒は、マグネタイトの肺への沈着及びリンパ節への移行を示唆する所見であった。マグネタイトの体外への排泄は、尿と比較して糞による経路が主体であり、50 日においても排泄が続いていた。先行研究として行ったマグネタイトの気管内反復投与によるラット慢性毒性試験では、肺における慢性炎症と共に肺胞上皮過形成性の発生が観察され、マグネタイトが肺に対して発がん性を持つ可能性が示した。マグネタイトは

in vitro 試験において遺伝毒性を持つ可能性を示されていることから、その発がん性の有無に関する評価は喫緊の課題と考えられた。そこで、本研究においては、ラット2段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。平成24年度は、マグネタイトの肺発がんイニシエータ活性の有無について検索を行った。試験は、F344/DuCrIcrIj系ラット(10週齢)に、マグネタイトを0(対照群)・5 mg/kg体重(投与群)の用量でスプレー投与器により週1回計4回気管内投与した後、 γ -オリザノール(1%混餌)あるいはグリセロール(8%混水)による32週間の肺発がんプロモーション処置を施し、肺における腫瘍性病変の発生を病理組織学的に検索した。その結果、マグネタイト投与群ラットの肺においては、マグネタイトを食した肺胞マクロファージの肺胞腔への浸潤・炎症細胞浸潤・II型肺胞上皮の腫大などを認めたが、肺の増殖性病変の発生を認めなかった。 γ -オリザノールあるいはグリセロールは、これらの変化に対して顕著な影響を与えなかった。平成25年度は、マグネタイトの肺発がんプロモータ活性の有無について検索を行った。試験は、F344/DuCrIcrIj雄性ラット(6週齢)に*N*-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) (0.1%混水)による2週間の発がんイニシエーション処置を行った後、マグネタイトを0(対照群)・5.0・1.0 mg/kg体重の用量で4週間に1回、計7回の気管内投与を実施し、試験開始後30週の時点で肺における腫瘍性病変の発生を病理組織学的に検索した。その結果、肺の肉眼観察においては、DHPN投与により結節が多発性に観察されたが、マグネタイト5.0 mg併用群で結節数が減る傾向を示し、径3 mm以上の結節数に関して統計学的に有意な減少を示した。病理組織学的検索においては、DHPN投与により肺胞上皮過形成及び肺の腺腫・腺癌が発生し、マグネタ

イト併用投与群で、腫瘍の発生頻度と個体当たりの腫瘍数がマグネタイトの用量に依存した減少傾向を示した。特に、マグネタイト5.0 mg併用群の個体あたりの全腫瘍数は、統計学的に有意に減少した。以上の結果から、マグネタイトは、明らかな肺発がんプロモータ活性を有さず、むしろDHPNの肺発がん性を抑制することが明らかとなった。

8. 遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究

遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾をテーマに、細胞株を利用した*in vitro*系での磁性体ナノ粒子の細胞毒性および遺伝毒性の解析する事を行ってきた。具体的には、(1)修飾・非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞・遺伝毒性の評価、(2)磁性体ナノ粒子の溶媒中における2次粒子径の評価を行った。アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株DU145、PC-3、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株LNCaP、ヒト肺癌細胞株A549を使用した。修飾・非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の培養液中の粒径分布の確認、同粒子の曝露した細胞における8-OHdG生成の定量、細胞生存率、活性酸素種(ROS)の測定、細胞周期、アポトーシス等の解析を行った。磁性体ナノ粒子の表面修飾はカルボキシル基修飾およびポリエチレンイミン(PEI)修飾を利用した。その結果、非修飾磁性体ナノ粒子の曝露濃度依存的に8-OHdG生成の増加、ROS産生の増加、細胞生存率の低下、apoptosisの誘導が認められた。しかし、曝露される細胞の種類によりその程度は異なり、細胞特異性があると考えられた。一方、非修飾磁性体ナノ粒子に比べ、カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子の曝露では、8-OHdG生成の増加、ROS産生の増加、細胞生存率の低下は軽減した。表面修飾も細胞への影響の重要な因

子である事が判明した。一方、ポリエチレンイミン(PEI)修飾はカルボキシル基修飾と異なる結果を得た。総じて、修飾により磁性体ナノ粒子曝露による 8-OHdG 生成の増加、ROS 産生の増加、細胞生存率の低下は軽減化されるも、高濃度曝露ではその細胞毒性・遺伝毒性は認められた。表面修飾を行った磁性体ナノ粒子の溶媒（培養液、PBS、蒸留水）における分散能を検討したところ、表面修飾により分散能の安定性が高まる場合もあるが、溶媒、とくにウシ胎児血清等の成分に影響される事が認められた。

C. 結論

細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析では、細胞毒性および遺伝毒性に供試する 10 種類（11 試料）の金属酸化物ナノマテリアルについて、各種懸濁液中の平均粒子径、粒径分布および Zeta 電位を測定し、その物性を把握した。分散剤に Tween80 を用い、遊星ボールミル型粉砕機を使用することで、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズが異なる懸濁液の調製に成功した。二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液を A549 細胞に曝露して細胞毒性試験を行った結果、二次粒子径サイズが大きいほど細胞毒性が強くなる傾向を示した。ナノマテリアルの細胞内動態の解析では、ZnO の曝露細胞標本を透過型電顕観察した結果、細胞質に種々の大きさのいびつな小胞が観察され、電子密度の高い箇所が散見された。高電子密度部位について EDS 解析を行ったが、細胞内に亜鉛の分布は認められなかった。NiO 曝露細胞では二次粒子径の異なるいずれの群においても同程度の 0.4~0.6 μm の不整形高電子密度物質が観察され、粉砕用ジルコニアボール径 0.5 mm 群では細胞突起が乏しい細胞が豊富な

細胞突起を有する細胞と混在して観察された。ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析では、A549 細胞を用いて、10 種類の酸化金属ナノマテリアルを対象として、その物性について明らかにすると同時に、細胞毒性について検討した。細胞毒性が観察された 5 種類の酸化金属ナノマテリアルについて、小核試験により遺伝毒性を評価した。物理化学的性質の異なる 2 種類の ZnO において、細胞毒性強度と遺伝毒性強度との間に関連がなかった。THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。3 種類のナノマテリアルで細胞毒性が観察され、IL-8 の増加が観察された。ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析では、CuO NPs および ZnO NPs を曝露されたヒト肺上皮細胞の分子応答を DNA マイクロアレイによって調べた。CuO NPs 曝露細胞では、細胞周期関連遺伝子の発現低下と p38 経路の活性化が認められ、CuO NPs の毒性に対する防御機構であると考えられた。DNA マイクロアレイによる解析から、カルシウムは細胞周期関連遺伝子の発現を向上させ、ZnO NPs による増殖速度の低下を相殺した。ヒト肺上皮細胞に対する carbon nanotubes (CNTs) の細胞毒性において、前培養時間による CNTs に対する細胞の感受性の違いは細胞の増殖ステージによる生理的状態の違いに依存すると考えられた。ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価では、SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらも金属塩化物の共存に伴ってゼータ電位が変化した。平均粒子径は変化しなかった。水晶発振子マイクロバラン (QCM) 法による解析から、ゼータ電位の異なる SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらにも CuCl₂ が結合し、それらの結合量に差は認められなかった。SiO₂ ナノ粒子が共存すると、AlCl₃、CuCl 及び CuCl₂ の細胞

毒性強度は増強した。SiO₂ ナノ粒子共存下で CuCl₁ 及び CuCl₂ を曝露すると、V79 細胞内への銅の取り込み量は増加した。ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究では、マグネタイトの気管内投与によりマウス肺に生成する付加体の網羅的解析を行なったところ、マグネタイト投与群で付加体の総数が上昇し、それらの複数が酸化反応ならびに炎症反応由来であることが分かった。物理化学的性質が異なるカオリンをマウスに気管内投与し DNA 損傷性を比較したところ、Kaolin-K (韓国産) に比べ Kaolin-U (アメリカ産) の活性が高いことがわかった。マウス肺を模倣した *in vitro* アッセイ系を用いてカオリンの DNA 損傷性を検証したところ、マウス肺に取り込まれたカオリンは、近傍の上皮細胞に ROS 産生を促すことで DNA 損傷や変異を誘発していることが示唆された。ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の *in vivo* 評価では、磁性ナノ粒子マグネタイトをラットの気管内に単回投与して体内動態を検索したところ、主として肺に分布し、肺における生物学的半減期は 7 日であり、排泄は主として糞を介して行われることが判明した。マグネタイトの肺発がんイニシエータ活性及びプロモータ活性について、ラット 2 段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。その結果、マグネタイトは明らかな肺発がんイニシエータ活性を有しないものと示唆され、また、明らかな肺発がんプロモータ活性を有さず、むしろ DHPN の肺発がん性を抑制することが明らかとなった。遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究では、磁性体ナノ粒子 (Magnetite, Fe₃O₄) 曝露による細胞への影響を *in vitro* 系で検討し、同ナノ粒子はヒト細胞の種類により細胞傷害の程度が異なる事が認められた。その理由として、抗酸化、修復にかかわる遺伝子発現の変化の関与が

考えられた。表面修飾した Fe₃O₄ NPs を用いて、前立腺癌細胞株及び肺癌細胞株の *in vitro* 系で曝露実験を行った結果、ROS 産生量、8-OHdG 産生量に修飾の有無で差が認められた。カルボキシル基修飾により、ROS 産生、8-OHdG 産生は抑制された。前立腺癌細胞株では、PEI 表面修飾により 2 次粒子径が抑えられ、分散能の安定性が高まる事が確認された。

以上より、平成 23~25 年度の本研究において、金属酸化物ナノマテリアルについて、物理化学的性質の測定と培養細胞を用いた毒性評価試験を実施し、ナノマテリアルの物性と細胞応答について有用な知見を得ることができた。遊星ボールミル型粉砕機を用いて粒子径の異なるナノマテリアルの調製が可能となり、これらの試料を用いて培養細胞試験を実施し、物理化学的性質の解析と細胞応答について解析を行うことができた。同時に、細胞内動態に関しても、ナノマテリアルの物理化学的性質と細胞内動態について解析が進めることができた。また、酸化金属ナノマテリアルの物理化学的特徴を把握し、遺伝子発現及び相互作用を総合的に評価したデータは、*in vitro* 評価系構築に向けて有用な知見であると思われる。遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルに関する研究においては、*in vivo*, *in vitro* に関する有用なデータを集めることができた。本研究成果は、最終目標であるナノマテリアルの *in vitro* 安全性試験における評価指針の作成に役立つだけでなく、レギュラトリーサイエンスに資するデータとしても大変重要であり、厚生労働行政分野におけるナノマテリアルの安全性評価への活用が期待できる。

D. 健康危害情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 河上強志、伊佐間和郎、中島晴信、吉田仁、大嶋智子、大野浩之、上村仁、塩田寛子、菊地洋子、松岡厚子、西村哲治：有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（有害物質含有家庭用品規制法）におけるトリフェニル錫（TPT）及びトリブチル錫（TBT）の試験法改定に係わる検討、薬学雑誌、132、1197-1208 (2012)
- 2) Kawakami T, Isama K, Nishimura T.: Survey of primary aromatic amines originating from azo dyes in commercial textile products in direct contact with skin and in commercial leather products in Japan, *J. Environ. Chem.*, 22, 197-204 (2012)
- 3) Kawakami T, Isama K, Nishimura T.: Analysis of isothiazolinones and other preservatives in gel-products used for cooling in Japan. *J. Environ. Chem.*, 22, 205-211 (2012)
- 4) 大嶋智子、河上強志、山野哲夫、尾崎麻子、清水充、伊佐間和郎：有害物質含有家庭用品規制法のトリフェニル錫（TPT）およびトリブチル錫（TBT）分析法改定過程において観察された TPT の分解について、大阪市立環科研報告、74, 17-22 (2012)
- 5) 河上強志、伊佐間和郎、松岡厚子、西村哲治：防カビ剤として用いられたフマル酸ジメチルによる接触皮膚炎、*J. Environ. Dermatol. Cutan. Allergol.*, 6, 339-350 (2012)
- 6) 河上強志：フラーレンが植物による土壌中の疎水性化合物の吸収を促進させる？、*ファルマシア*、49, 252 (2013)
- 7) 河上強志、伊佐間和郎、五十嵐良明：EUにおける繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の違反事例の特徴、*国立衛研報*、131, 66-74 (2013)
- 8) Kitamura K, Maruyama K, Hamano S, Kishi T, Kawakami T, Takahashi Y, Onodera S.: Effect of hypochlorite oxidation on cholinesterase-inhibition assay of acetonitrile extracts from fruits and vegetables for monitoring traces of organophosphate pesticides. *J. Toxicol. Sci.*, 39, 71-81 (2014)
- 9) 味村真弓、中島晴信、吉田仁、吉田俊明、河上強志、伊佐間和郎：有害物質含有家庭用品規制法で規制されている繊維製品中のトリス（2,3-ジブロムプロピル）ホスフェイト分析法の改定に向けた検討、*薬学雑誌*、134, 259-268 (2014)
- 10) Kawakami T, Isama K, Nishimura T.: Survey of primary aromatic amines originating from azo dyes in commercial textile products in direct contact with skin and in commercial leather products in Japan, *Journal of Environmental Chemistry*, 22, 197-204 (2012)
- 11) Kawakami T, Isama K, Nishimura T.: Analysis of isothiazolinones and other preservatives in gel-products used for cooling in Japan, *Journal of Environmental Chemistry*, 22, 205-211 (2012)
- 12) 河上強志、伊佐間和郎、中島晴信、吉田仁、大嶋智子、大野浩之、上村仁、塩田寛子、菊地洋子、松岡厚子、西村哲治：有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（有害物質含有家庭用品規制法）におけるトリフェニル錫

- 化合物 (TPT) 及びトリブチル錫化合物 (TBT) の試験法改定にかかわる検討、薬学雑誌、132,1197-1208(2012)
- 13) 河上強志、伊佐間和郎、松岡厚子、西村哲治：防カビ剤として用いられたフマル酸ジメチルによる接触皮膚炎、日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会雑誌、6, 339-350 (2012)
- 14) 大嶋智子、河上強志、山野哲夫、尾崎麻子、清水充、伊佐間和郎：有害物質含有家庭用品規制法のトリフェニル錫 (TPT) およびトリブチル錫 (TBT) 分析法改定過程において観察された TPT の分解について、大阪市立環境科学研究所報告、74, 17-22 (2012)
- 15) 河上強志、伊佐間和郎、五十嵐良明：EU における繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の違反事例の特徴、国立医薬品食品衛生研究所報告、131, 66-74 (2013)
- 16) 味村真弓、中島晴信、吉田仁、吉田俊明、河上強志、伊佐間和郎：有害物質含有家庭用品規制法で規制されている繊維製品中のトリス (2,3-ジブロモプロピル) ホスフェイト分析法の改定に向けた検討、薬学雑誌、134, 259-268 (2014)
- 17) Haishima Y, Kawakami T, Hasegawa C, Tanoue A, Yuba T, Isama K, Matsuoka A, Niimi S.: Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride, *Journal of Biomedical Materials Research Part B - Applied Biomaterials*, in press
- 18) Haishima Y, Hasegawa C, Nomura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K, Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, Niimi S.: Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing, *Journal of Biomedical Materials Research, Part B - Applied Biomaterials*, in press
- 19) Matsuoka A, Kodama Y, Yoshida M, Isama K, Inoue K, Kawakami T, Nishikawa A.: Toxicological studies of nano-suspensions of silica, silver and zinc oxide *Proceedings of 24th European Conference on Biomaterials*, 87-90 (2011)
- 20) Kikura-Hanajiri R, Kawamura M, Miyajima A, Sunouchi M, Goda Y.: Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.*, 400, 165-174 (2011)
- 21) Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Miyajima A, Doi O.: Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos, in press
- 22) Hanagata N, Zhuang F, Connolly S, Li J, Ogawa N, Xu M.: Molecular Responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis, *ACS Nano*, Vol.5 No.12, 9326-9338 (2011)
- 23) Xu M, Li J, Fujita D, Su H, Chen H, Hanagata N.: Formation of nano-bio-complex as nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interaction, *Scientific Reports* 2, 406 (2012)
- 24) Xu L, Li X, Takemura T, Hanagata N, Wu G, Chou LL.: Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel, *Journal of Nanotechnology* 10, 16 (2012)
- 25) Zhuang F, Hanagata N.: Synergic toxicity of solid particles and released zinc from zinc oxide nanoparticles to human lung

- epithelial cells, *Nano Biomedicine* 4, 85-97 (2012)
- 26) Li X, Xu L, Shao A, Wu G, Hanagata N.: Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on primary Syrian hamster embryo (SHE) cells, *Journal of Nanotechnology and Nanoscience*, 13, 161-170 (2013)
- 27) Xu M, Li J, Hanagata N, Su H, Chen H, Fujita D.: Challenge to assess the toxic contribution of metal cation released from nanopaterials for nanotoxicity, a case of ZnO nanoparticles, *Nanoscale*, 5, 4763-4769 (2013)
- 28) Hanagata N.: Biological interpretation of the in vitro assessment of nanotoxicity, *Nano Biomedicine*, 5, 1-10 (2013)
- 29) Zhang J, Zhu Y, Li J, Zhu M, Tao C, Hanagata N.: Preparation and characterization of multifunctional magnetic mesoporous calcium silica materials, *Science and Technology of Advanced Materials*, 14, 055009 (2013)
- 30) 伊佐間和郎、河上強志、西村哲治：乳幼児が誤飲する可能性のある金属製アクセサリーからの有害8元素の溶出、*薬学雑誌*、132, 959-968 (2012)
- 31) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A.: The effect of calcium ions incorporation into titanium surface by chemical treatment on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 101, 2573-2585 (2013)
- 32) Haishima Y, Isama K, Fukui C, Yuba T, Matsuoka A.: A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 101, 2630-2643 (2013)
- 33) 伊佐間和郎：ナノマテリアルの in vitro 安全性評価のための基礎研究—金属酸化物ナノ粒子に対する細胞応答—、*薬学雑誌*、134 (2014) 印刷中
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) Kato T, Totsuka Y, Hasei T, Watanabe T, Wakabayashi K, Kinai N, Masuda S.: In vivo examination of the genotoxicity of the urban air and surface soil pollutant, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, with intraperitoneal and intratracheal administration, *Environ, Mutagen* (2012) in press
- 37) 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*, 130: 259-266 (2012)
- 38) Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Toda Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K.: Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems, *Nanotoxicology*,

- 7, 452-461 (2013)
- 39) Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Yamamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Fukuda H, Ono M, Takamura-Enya T, Kinashi H, Totsuka Y.: ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*, *Toxicon* (2012) in press
- 40) Ishino K, Mutoh M, Totsuka Y, Nakagama H.: Metabolic syndrome: A novel high-risk state for colorectal cancer, *Cancer Lett* (2012) in press
- 41) Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H.: Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China, *J Epidemiol* (2012) in press
- 42) 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*, 130, 259-266 (2012)
- 43) Kato T, Totsuka Y, Hasei T, Watanabe T, Wakabayashi K, Kinae N, Masuda S.: In vivo examination of the genotoxicity of the urban air and surface soil pollutant, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, with intraperitoneal and intratracheal administration, *Environ., Toxicol.*, 28, 588-594 (2013)
- 44) Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H.: Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China, *J Epidemiol*, 23, 233-242 (2013)
- 45) Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K.: Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems, *Nanotoxicology*, 7, 452-461 (2013)
- 46) Kawanishi M, Ogo S, Ikemoto M, Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Yagi T.: Genotoxicity and reactive oxygen species production induced by magnetite nanoparticles in mammalian cells, *J Toxicol Sci*, 38, 503-511, (2013)
- 47) Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, Kurioka D, Nittami T, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kawai K, Kasai H, Totsuka Y.: Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells, *Int J Mol Sci*, 14, 15546-15560, (2013)
- 48) Totsuka Y, Watanabe T, Coulibaly S, Kobayashi S, Nishizaki M, Okazaki M, Hasei T, Wakabayashi K, Nakagama H.: In vivo genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinolinone-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and l-tryptophan, *Mutat Res* (2014) in press
- 49) Totsuka Y, Ishino K, Kato T, Goto S, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.: Magnetite Nanoparticles Induce Genotoxicity in the Lung of Mice via Inflammatory Response, *Nanomaterials* (2014) in press
- 50) 広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、津田洋幸、坂本義光、小縣昭夫、中江大、樋野興夫、菅野純：ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性、*薬学雑誌*、131, 195-201 (2011)
- 51) Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A.: Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice, *J Toxicol Sci*, 37, 81-89, 2012
- 52) Yamaguchi A, Fujitani T, Ohyama K, Nakae D, Hirose A, Nishimura T, Ogata A.: Effects

- of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotube on immune and inflammatory responses in mice, *J Toxicol Sci*, 37, 177-189, 2012
- 53) Xu J, Futakuchi M, Shimizu H, Alexander DB, Yanagihara K, Fukamachi K, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Ogata A, Sakamoto Y, Nakae D, Omori T, Tsuda H.: Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats, *Cancer Science* 103, 2045–2050 (2012)
- 54) Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Ogata A, Nakae D.: Acute phase pulmonary responses to the single intratracheal spray instillation of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in Fischer 344 rats, *Journal of Toxicologic Pathology* 25, 233-239 (2012)
- 55) Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Inomata A, Ogata A, Nakae D.: Long-term pulmonary responses to quadweekly intermittent intratracheal spray instillations of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles for 52 weeks in Fischer 344 rats, *Journal of Toxicologic Pathology* 26, 393-403 (2013)
- 56) Nakagawa Y, Suzuki T, Nakajima K, Inomata A, Ogata A, Nakae D.: Effects of *N*-acetyl-L-cysteine on target sites of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes, *Archives of Toxicology* 88, 115-126 (2014)
- 57) Kami D, Takeda S, Itakura Y, Gojo S, Watanabe M, Toyoda M.: Application of the Magnetic Nanoparticles to Gene Delivery, *Int. J. Mole Sci*, 12, 3705-3722, (2011)
- 58) 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. and Ther*, 3, 60-65 (2011)
- 59) 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*, 14, 215-222 (2011)
- 60) 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(3), 145-151, (2011).
- 61) 一町直樹、佐藤明子、栗岡大輔、米田操、広川佳史、白石泰三、渡邊昌俊：前立腺癌化学療法における磁性体ナノ粒子の併用効果の基礎研究（総説）*泌尿器外科* 24, 1267-1269, (2011)
- 62) 渡邊昌俊、佐藤明子、岩崎有由美、深井瑛美、岡本大樹、栗岡大輔：前立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果、*日本磁気学会第187回研究会資料*、7-11 (2012)
- 63) 栗岡大輔、佐藤明子、岩崎有由美、深井瑛美、岡本大樹、渡邊昌俊：前立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果、*化学工業*、64, 67-73 (2013)
- 64) Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Toda Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K.: Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems, *Nanotoxicology*, 7, 452-461 (2013)
- 65) Sato A, Itcho N, Ishiguro H, Okamoto D, Kobayashi N, Kawai K, Kasai H, Kurioka D, Uemura H, Kubota Y, Watanabe M.: Magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death.

- Int. J. Nanomed, 8, 3151-3160 (2013)
- 66) Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, Kurioka D, Nittami T, Hirokawa H, Shiraishi T, Kawai K, Kasai H, Y. Totsuka.: Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. Int. J. Mol. Sci. 14, 15546-15560 (2013)
- 67) Ota S, Takahashi Y, Tomitaka A, Yamada T, Kami D, Watanabe M, Takemura Y.: Transfection efficiency influenced by aggregation of DNA/polyethylenimine max/magnetic nanoparticle complexes. J. Nanopart. Res, 15, 1653-1664 (2013)
2. 学会発表
- 1) 河上強志、宮島敦子、小森谷薫、加藤玲子、伊佐間和郎：NiO ナノ粒子の細胞毒性に及ぼす懸濁液中の二次粒子径の影響、日本薬学会第 134 回年会 (2014.3、熊本)
- 2) Matsuoka A, Kodama Y, Yoshida M, Isama K, Inoue K, Kawakami T, Nishikawa A. : In Vitro and Vivo Toxicity Studies of Nanomaterials Used in Household Products., ICAMT 2011 (2011.6, Singapore)
- 3) Matsuoka A, Kodama Y, Yoshida M, Isama K, Inoue K, Kawakami T, Nishikawa A. : Toxicological Studies of Nano-suspensions of silica, silver and zinc oxide., 24th European Conference on Biomaterials (2011.9, Dublin)
- 4) Yoshida M, Inoue K, Isama K, Kawakami T, Kadama Y, Matsuoka A. Comparison of Lung Lesions in Rat Treated with Nano-suspensions of Silica, Silver and Zinc oxide. 32nd Annual Symposium, Society of Toxicologic Pathology (2013.6, Portland)
- 5) 宮島敦子、加藤玲子、酒井恵子、松岡厚子：チタン系金属、合成高分子等の医用材料上で培養した CHL 細胞の細胞毒性および遺伝毒性、第 33 回バイオマテリアル学会 (2011.11、京都)
- 6) 酒井恵子、宮島敦子、加藤玲子、岡田恵里、尾崎正康、松岡厚子：ナノ材料の安全性評価における A549 細胞と CHL 細胞の感受性の比較、日本環境変異原学会第 40 回大会 (2011.11、東京)
- 7) Miyajima-Tabata A, Kato R, Sakai, K, Okada E, Matsuoka A.: Cytotoxicity studies in A549 cells cultured on 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers., The 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (2012.3, San Francisco)
- 8) 宮島敦子、酒井恵子、河上強志、加藤玲子、松岡厚子、尾崎正康、宇佐見誠、伊佐間和郎：A549 細胞を用いたナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系の検討、日本薬学会第 132 年会 (2012.3、札幌)
- 9) Miyajima-Tabata A, Sakai, K, Kato R, Matsuoka A.: Studies on cytotoxicity and genotoxicity in CHL cells cultured on MPC polymers., EUROTOX 2012 (2012.6, Stockholm)
- 10) 宇佐見誠、満長克祥、入江智彦、宮島敦子、関野祐子：培養ラット胚におけるエタノールによる発生毒性のプロテオミクス解析、第 52 回日本先天異常学会学術集会 (2012.7、東京)
- 11) Miyajima-Tabata A, Sakai K, Kato R, Kawakami T, Matsuoka A, Isama K.: Cytotoxicity and genotoxicity studies in A549 cells cultured with metal oxide nanoparticles., The 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2013.3, San Antonio)
- 12) Miyajima-Tabata A, Kato R, Sakai K, Matsuoka A.: Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (2013.9, Interlaken)
- 13) 宮島敦子、河上強志、加藤玲子、酒井恵子、小森谷薫、新見伸吾、伊佐間和郎：