

- 酸化金属ナノマテリアルの A549 細胞に対する細胞毒性および遺伝毒性 日本薬学会第 134 年会 (2014.3、熊本)
- 14)伊佐間和郎、河上強志、児玉幸夫、中嶋富士雄、吉田緑、井上薫、西川秋佳、松岡厚子：家庭用品に用いられるナノ粒子の安全性評価、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7、横浜市)
- 15)Isama K, Kawakami T, Tsuchiya T, Matsuoka A: Osteoblast compatibility of calcium-incorporated Ti-Zr-Nb alloys, 24th European Conference on Biomaterials (2011.9, Dublin)
- 16)Isama K, Kawakami T, Matsuoka A: Adsorption behavior of ions on calcium-incorporated titanium in simulated body fluid, The 3rd Asian Biomaterials Congress (2011.9, Busan)
- 17)Isama K, Kawakami T, Sakai K, Miyajima A, Matsuoka A: Effect of nanoparticles on the cytotoxicity of coexisting metal salts. The 48th Congress of the European Societies of Toxicology (2012.6, Stockholm)
- 18)伊佐間和郎、河上強志、酒井恵子、宮島敦子、松岡厚子：金属塩の細胞毒性に及ぼすナノマテリアルの影響、第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012.7、仙台)
- 19)Isama K, Kawakami T, Sakai K, Miyajima A, Matsuoka A: Effect of SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the cytotoxicity of metal salts. European Society of Toxicology in Vitro 2012 International Conference (2012.10, Lisbon)
- 20)伊佐間和郎、河上強志、酒井恵子、宮島敦子、松岡厚子：金属塩の細胞毒性に及ぼすナノ粒子の影響、第 49 回全国衛生化学技術協議会年会 (2012.11、高松)
- 21)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—、日本薬学会第 133 年会 (2013.3、横浜)
- 22)伊佐間和郎、河上強志、宮島敦子、松岡厚子：金属塩の細胞毒性に及ぼす SiO<sub>2</sub> 及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の影響、第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013.6、千葉)
- 23)Isama K, Kawakami T, Miyajima A, Matsuoka A.: Effect of SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the cytotoxicity of metal chlorides, International Conference on Materials for Advanced Technologies (Singapore, 2013.7)
- 24)伊佐間和郎、河上強志、宮島敦子：金属塩の細胞毒性に及ぼす SiO<sub>2</sub> 及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の影響、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013.11、富山)
- 25)Totsuka Y, Kato T, Ishino K, Nakae D, Tada Y, Oyama K, Ogata A, Kawanishi M, Yagi T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H.: Genotoxicity induced by nanomaterials, 41th European Environmental Mutagen Society Annual Meeting, (2011.7, Barcelona)
- 26)戸塚ゆ加里：ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性、レドックスシンポジウム(2011.3、東京)
- 27)Totsuka Y, Kato T, Wakabayashi K, Watanabe T, Nakagama H.: Genotoxicity of aminobenzoazepinoquinolinone derivative formed from tryptophan and glucose by Maillard reaction, 日本癌学会第 70 回大会 (2011.10、名古屋)
- 28)Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H.: Differences in DNA damaging potency of differently-originated kaolins. 日本癌学会第 70 回大会 (2011.10、名古屋)
- 29)Ishino K, Totsuka Y, Kato T, Nakagama H: A comprehensive analysis of DNA adducts in mice exposed to nanomaterials. 日本癌学会第 70 回大会 (2011.10、名古屋)
- 30)Morohashi A, Sato A, Kawai K, Kasai H, Totsuka Y, Watanabe M.: Cytotoxicity and

- genotoxicity of magnetic nanoparticles in human lung cancer cell line, A549. 日本癌学会第70回大会 (2011.10、名古屋)
- 31) Ootsuka K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Nunoshiro T, Watanabe T, Nakagama H.: *In vivo* mutagenicity of aminobenzoazepinoquinolinone derivative (ABAQ) formed from L-tryptophan and glucose by the Maillard reaction, 日本環境変異原学会第40回大会 (2011.11、東京)
- 32) Ishino K, Kato T, Matsuda T, Totsuka Y, Nakagama H.: A comprehensive analysis of DNA adducts in lungs of mice exposed to nanomaterials using nanoLC-QToF MS 日本環境変異原学会第40回大会 (2011.11、東京)
- 33) Kato T, Ishino K, Toyooka T, Ibuki Y, Watanabe M, Wakabayashi K, Masuda S, Totsuka Y, Nakagama H.: Differences in DNA damaging potency and incorporation rate into cultured mammalian cells of differently-originated kaolins. 日本環境変異原学会第40回大会 (2011.11、東京)
- 34) Yamada M, Shimamura Y, Totsuka Y, Inaba N, Coulibaly S, Tamura Y, Hasei T, Watanabe T, Masuda S.: Formation of a novel mutagen, ABAQ under diabetic condition *in vivo*. 日本環境変異原学会第40回大会 (2011.11、東京)
- 35) Ikemoto M, Kawanishi M, Totsuka Y, Wakabayashi K, Yagi T.: Contribution of homologous recombination to nanomaterial-induced micronucleus induction. 日本環境変異原学会第40回大会 (2011.11、東京)
- 36) Totsuka Y, Kato T, Ishino K, Nakae D, Tada Y, Oyama K, Ogata A, Kawanishi M, Yagi T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H.: Genotoxicity induced by nanomaterials, The 6th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations. (2012.3, ドーハ)
- 37) 戸塚ゆかり、石野孔祐、若林敬二、渡辺哲志、中釜斉：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 (ABAQ)の *in vivo* 変異原性と生体内における生成、第71回日本癌学会学術総会 (2012.9、札幌)
- 38) 石野孔祐、戸塚ゆかり、武藤倫弘、中釜斉：ヒト白血球を用いた肥満関連 DNA 付加体の網羅的解析、第71回日本癌学会学術総会 (2012.9、札幌)
- 39) Ishino K, Sekine A, Goto S, Nakagama H, Totsuka Y.: Analysis of DNA damage induced by nanomaterials using comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis). 3rd Asian Conference on environmental mutagens (2012.10、杭州)
- 40) Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Watanabe T, Masuda S, Nakagama H.: *In vivo* mutagenicity and formation of a Maillard reaction product, aminobenzoazepinoquinoline derivative (ABAQ), (2012.10、杭州)
- 41) 戸塚ゆかり：ナノマテリアルの遺伝毒性 発言メカニズム、第41回大会 日本環境変異原学会 (2012.11、静岡)
- 42) 戸塚ゆかり、石野孔祐、松島芳隆、中釜斉：ハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体の解析、第41回大会 日本環境変異原学会 (2012.11、静岡)
- 43) 石野孔祐、関根彬弘、後藤純雄、中釜斉、戸塚ゆかり：DNA 付加体の網羅的解析による新規付加体の探索、第41回大会 日本環境変異原学会 (2012.11、静岡)
- 44) 堺澤絢、後藤純雄、若林敬二、渡辺徹志、中釜斉、戸塚ゆかり：トリプトファンとグルコースの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 *in vivo* 変異原性、第41回大会 日本環境

- 変異原学会 (2012.11、静岡)
- 45)大野絢、中野毅、中釜斉、松島芳隆、布柴達男、戸塚ゆ加里：ゲノム中に存在する DNA 付加体の免疫沈降法を用いた濃縮法、第 41 回大会 日本環境変異原学会(2012.11、静岡)
- 46)関根彬弘、石野孔祐、後藤純雄、中釜斉、戸塚ゆ加里：マグネタイト (MGT) により誘発される DNA 付加体のアダクトーム解析、第 41 回大会 日本環境変異原学会 (2012.11、静岡)
- 47)石野孔祐、戸塚ゆ加里、松島芳隆、鰐淵英機、魏民、山野荘太郎、中森正二、柴田龍弘、土原一哉、落合淳志、中釜斉：職業性胆管がんの原因候補物質であるハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体及び変異原性の解析、第 72 回日本癌学会学術総会 (2013.10、横浜)
- 48)中釜斉、戸塚ゆ加里、三牧幸代、中森正二、鈴木 穰、柴田龍弘、落合淳志、土原一哉；1,2-DCP, DCM 曝露歴のある印刷工胆管癌に認められた高頻度ゲノム変異、第 72 回日本癌学会学術総会 (2013.10、横浜)
- 49)戸塚ゆ加里、石野孔祐、中江大、渡辺昌俊、若林敬二、中釜斉：マグネタイトナノ粒子は炎症反応を介してマウス肺に遺伝毒性を誘発する、第 72 回日本癌学会学術総会 (2013.10、横浜)
- 50)Totsuka Y, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.: Mechanisms of genotoxicity in the lungs by nanomaterials, 11<sup>th</sup> ICEM (2013.11, Foz do Iguassu)
- 51)Totsuka Y, Ishino K, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.: Magnetite nanoparticles induce genotoxicity in the lung of mice via inflammatory response, NanOEH (2013.10、名古屋)
- 52)後藤正憲、松島芳隆、中釜斉、戸塚ゆ加里：ジクロロメタン由来の DNA 付加体を含むシャトルプラスミドを用いたヒト細胞内変異原性試験、第 42 回日本環境変異原学会 (2013.11、岡山)
- 53)馬場明、後藤純雄、松島芳隆、中釜斉、戸塚ゆ加里：職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性及び変異スペクトラムの解析、第 42 回日本環境変異原学会 (2013.11、岡山)
- 54)辻田俊寛、石野孔祐、加藤護、柴田龍弘、後藤純雄、魏民、松島芳隆、中釜斉、戸塚ゆ加里：職業性胆管がん発生に關与するハロゲン系炭化水素の DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析)、第 42 回日本環境変異原学会 (2013.11、岡山)
- 55)坂本義光、小縣昭夫、前野智和、西村哲治、広瀬明彦、大山謙一、中江大：腹腔内投与によるラット中皮腫の誘発性に対して多層カーボンナノチューブ (MWCNT)の性状が及ぼす影響、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7、横浜)
- 56)山口敦美、藤谷知子、大山謙一、広瀬明彦、西村哲治、小縣昭夫、中江大：多層カーボンナノチューブの投与による鉛法免疫系への影響 (II) 、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7、横浜)
- 57)高橋 省、坂本義光、大山謙一、小縣昭夫、中江大、広瀬明彦、西村哲治：多層カーボンナノチューブ腹腔投与マウスにおける急性的酸化ストレス、第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7、横浜)
- 58)山本行男、大貫 文、坂本義光、大山謙一、中江大、小縣昭夫：多層カーボンナノチューブ投与ラットの血清におけるプロテオーム解析、第 84 回日本生化学会大会 (2011.9、京都)

- 59) Sakamoto Y, Ogata A, Nishimura T, Hirose A, Nakae D: Influence of the product level physico-chemical property on the carcinogenicity of multi-wall carbon nanotube in rats, 第 70 回日本癌学会学術総会 (2011.10、名古屋)
- 60) 鈴木俊也、小杉有希、富士栄聡子、保坂三継、中江大、小縣昭夫：水試料中のカーボンナノチューブの分析法、第 48 回全国衛生化学技術協議会総会・研究会 (2011.11、長野)
- 61) 富士栄聡子、鈴木俊也、小杉有希、保坂三継、小縣昭夫、中江大：水試料中のフラーレンの分析法、第 48 回全国衛生化学技術協議会総会・研究会 (2011.11、長野)
- 62) 多田幸恵、齋藤育江、矢野範男、高橋博、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、大山謙一、小縣昭夫、中江大：気管内注入による磁性ナノ粒子マグネタイトの体内動態及び排泄について、第 28 回日本毒性病理学会年次学術集会 (2012.2、千代田)
- 63) 坂本義光、小縣昭夫、前野智和、西村哲治、広瀬明彦、大山謙一、中江大：ラットにおける多層カーボンナノチューブの発がん性に対して製品レベルの物理化学的特性が及ぼす影響、第 28 回日本毒性病理学会年次学術集会 (2012.2、千代田)
- 64) 坂本義光、小縣昭夫、前野智和、西村哲治、広瀬明彦、小杉有希、鈴木俊也、中江大：ラットによる 5 種の多層カーボンナノチューブの腹腔内中皮腫発生に関する検討、第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012.7、仙台)
- 65) 藤谷知子、大山謙一、広瀬明彦、西村哲治、中江大、小縣昭夫：マウスにおける多層カーボンナノチューブの催奇形性について、第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012.7、仙台)
- 66) 坂本義光、小縣昭夫、西村哲治、広瀬明彦、中江大：5 種の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のラット腹腔内投与による中皮腫の誘発、第 71 回日本癌学会学術総会 (2012.9、札幌)
- 67) 中江大、坂本義光、藤谷知子、多田幸恵、齋藤育江、保坂三継、猪又明子、小縣昭夫：ナノマテリアルの発がん性、日本環境変異原学会第 41 回大会 (2012.11、静岡)
- 68) 坂本義光、小縣昭夫、西村哲治、広瀬明彦、猪又明子、中江大：ラットにおける多層カーボンナノチューブによる中皮腫誘発性に繊維長が及ぼす影響、第 29 回日本毒性病理学会 (2013.1、つくば)
- 69) 多田幸恵、矢野範男、高橋 博、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、猪又明子、小縣昭夫、中江大： $\gamma$ -オリザノール/グリセロール併用投与が磁性ナノ粒子マグネタイト気管内スプレー投与によるラット肺病変に及ぼす影響、第 29 回日本毒性病理学会(2013.1、つくば)
- 70) 坂本義光、小縣昭夫、西村哲治、広瀬明彦、猪又明子、中江大：繊維長の異なる多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発性の検討、第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013.6、千葉)
- 71) 藤谷知子、安藤 弘、久保喜一、猪又明子、小縣昭夫、広瀬明彦、西村哲治、中江大：マウスにおけるナノマテリアルの催奇形性に関する研究、第 40 回日本毒性学会学術年会(2013.6、千葉)
- 72) 山本行男、坂本義光、大貫 文、小縣昭夫、猪又明子、広瀬明彦、中江大：多層カーボンナノチューブ投与により誘発したラット中皮腫におけるプロテオーム解析 (第三報)、第 86 回日本生化学会大会 (2013.9、横浜)
- 73) 坂本義光、小縣昭夫、西村哲治、広瀬明

- 彦、中江大：ラットにおける7種の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の腹腔内投与による中皮腫誘発性に関する検討、第72回日本癌学会学術総会(2013.10、横浜)
- 74)坂本義光、小縣昭夫、湯澤勝廣、久保喜一、安藤 弘、長澤明道、高橋 博、矢野範男、西村哲治、広瀬明彦、井上義之、橋爪直樹、猪又明子、中江大：ラットにおいて多層カーボンナノチューブの経気管噴霧反復投与が及ぼす影響、第30回日本毒性病理学会年次学術集会(2014.1、徳島)
- 75)多田幸恵、矢野範男、高橋 博、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、海鋒藤文、北條 幹、猪又明子、小縣昭夫、中江大：N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)でインシエートされたラットにおいて磁性ナノ粒子マグネタイトの気管内スプレー投与が及ぼす影響、第30回日本毒性病理学会年次学術集会(徳島、2014.1)
- 76)中江大：様々な発がん要因と最近の知見、食品・ナノマテリアル・化学物質、浜松毒性試験フォーラム2014(2014.1、徳島)
- 77)Watanabe M, Takagi A, Hirokawa Y, Shiraishi T.: A prostate cancer spheroid related gene and chemotherapy. 102<sup>nd</sup> Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Orange Country Convention Center, (2011.4, Orland)
- 78)Watanabe M, Kurioka D, Hamanaka Y, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y, Shiraishi T.: Tumor microenvironment and prostate cancer: Effects of adipocytes on prostate cancer development and progression. An AACR International Conference on New Horizons in Cancer Research: Biology to prevention to therapy. (2011.12, Delhi)
- 79)Watanabe M and Watanabe N.: Nanomedicine for targeted prostate cancer therapy. INSA, Recent updates on mutation and cancer research.(2011.12, Chandigarh)
- 80)渡邊昌俊、広川佳史、白石泰三：3次元培養におけるヒト前立腺癌細胞の抗癌剤抵抗性の獲得機構について、第100回日本病理学会総会、(2011.4、横浜)
- 81)渡邊昌俊：動物組織切片を利用した前立腺癌細胞の挙動の解析、第100回日本病理学会総会、(2011.4、横浜)
- 82)佐藤明子、諸橋彩香、米田操、白石泰三、渡邊昌俊：磁性体ナノ粒子の前立腺癌におけるドセタキセルによる治療への効果、第70回日本癌学会学術総会(2011.10、名古屋)
- 83)濱中祥弘、竹澤俊明、渡邊昌俊：前立腺癌細胞と細胞切片基質の相互作用 第70回日本癌学会学術総会、(2011.10、名古屋)
- 84)土屋直人、栗岡大輔、緒方広子、渡邊昌俊、中釜斉：がん抑制因子 miR-22 による、p53 非依存的細胞周期停止誘導機構。第70回日本癌学会学術総会、(2011.10、名古屋)
- 85)諸橋彩香、佐藤明子、河井一明、葛西宏、戸塚ゆ加里、渡邊昌俊：磁性体ナノ粒子のA549細胞株への影響。第70回日本癌学会学術総会、(2011.10、名古屋)
- 86)渡邊昌俊、白石泰三：脂肪細胞由来液性因子の前立腺癌細胞への影響の基礎的解析。第58回日本臨床検査医学会学術集会、(2011.11、岡山)
- 87)渡邊昌俊.N305腫瘍と腫瘍微小環境。化学工学会第43回秋季大会シンポジウム、(2011.9、名古屋)
- 88)Sato A, Kurioka D, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y, Watanabe M.: Synergistic effect of magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells *in vitro*. AACR (2012.3,

- Chicago)
- 89) Hamanaka Y, Nittami T, Takezawa T, Watanabe M.: Application of a culture model utilizing substrata made of tissue/organ sections for histopathology in cancer behavior diagnosis. A Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay. (2012.11, Tokyo)
- 90) Nittami T, Speirs L, Tucci J, Watanabe M, Seviour RJ.: False positive identification due to FISH probe hybridization to sites with single base deletions may overestimate the abundance of some filamentous Bacterial morphotypes, including those belonging to the candidate division TM7. The 14th International symposium on Microbial Ecology (ISME14), (2012.8, Copenhagen)
- 91) 渡邊昌俊：肝臓組織切片共培養における前立腺癌細胞 DU145 の挙動、第 101 回日本病理学会総会 (2012.4、東京)
- 92) 渡邊昌俊、広川佳史、白石泰三：ヒト前立腺癌細胞における *plk2* 遺伝子の機能について、第 101 回日本病理学会総会 (2012.4、東京)
- 93) 上大介、高橋慎、豊田雅士、関澤隆一、松原弘明、渡邊昌俊、梅澤明弘、五條理志：iPS 細胞の早期・効率的取得を目指したキャピラリー等電点電気泳動、第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6、横浜)
- 94) 濱中祥弘、竹澤俊明、渡邊昌俊：組織切片を利用した培養システムのがん研究への応用、第 31 回分子病理学研究会-恵那シンポジウム-、(2012.7、恵那)
- 95) 濱中祥弘、竹澤俊明、渡邊昌俊：組織切片基質での培養系における前立腺癌細胞の挙動について、第 71 回日本癌学会学術総会、(2012.9、札幌)
- 96) 佐藤明子、諸橋彩香、岩崎有由美、石黒斉、植村博司、窪田吉信、渡邊昌俊：磁性体ナノ粒子は前立腺癌に対するドセタキセルの効果を増強する、第 71 回日本癌学会学術総会、(2012.9、札幌)
- 97) 岡本大樹、深井瑛美、岩崎有由美、佐藤明子、白石泰三、河井伊一明、葛西宏、石黒斉、渡邊昌俊：前立腺癌におけるカルボキシル基就職磁性体ナノ粒子とドセタキセルの併用効果、第 71 回日本癌学会学術総会、(2012.9、札幌)
- 98) 諸橋彩香、佐藤明子、岩崎有由美、河井一明、葛西宏、石黒斉、古林直人、渡邊昌俊：磁性体ナノ粒子が曝露したがん細胞における抗酸化酵素遺伝子および活性酸素種酸性の変化について、第 71 回日本癌学会学術総会、(2012.9、札幌)
- 99) 讚良茂浩、菅原健太郎、石黒斉、白石泰三、高木陽光、古林直人、渡邊昌俊：前立腺がんの抗癌剤抵抗性への *Plk2* 遺伝子の関与について、第 71 回日本癌学会学術総会、(2012.9、札幌)
- 100) 工藤祐子、原田博美、藤森浩彰、小泉史明、田村研治、渡邊昌俊、益谷美都子：Dot-blot 法による薬力学的マーカーとしての PARP 活性測定系の基礎的検討、第 71 回日本癌学会学術総会、(2012.9、札幌)
- 101) 小坂俊仁、芳野純治、乾和郎、若林貴夫、小林隆、三好広尚、服部信幸、友松雄一郎、山本智支、成田賢生、鳥井淑敬、森智子、林 繁和、白石泰三、山本隆行、渡邊昌俊：潰瘍性大腸炎高齢発症例と *NQO1* 遺伝子多型との関連、第 51 回日本消化器病学会大会、(2012.10、神戸)
- 102) 渡邊昌俊、中野洋、白石泰三：病理組織片を用いた細胞培養法の応用、第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 (2012.11、京都)
- 103) 栗岡大輔、渡邊昌俊、横田淳、中釜斉、土屋直人：p53 変異大腸がん細胞における *NEK9* 抑制を介した *miR-22* 増殖抑制機構、第 35 回日本分子生物学会

- (2012.12、福岡)
- 104)西田百代、藤原優子、渡邊昌俊、横田淳、中釜斉、土屋直人：miR-101によるp53経路の選択的活性化機構、第35回日本分子生物学年会(2012.12、福岡)
- 105)渡邊昌俊、佐藤明子、岩崎有由美、深井瑛美、岡本大機、栗岡大輔：前立腺がん化学療法に置ける磁性体ナノ粒子の効果、日本磁気学会第187回研究会、(2012.12、東京)
- 106)濱中弘、岡本愛、渡邊昌俊、竹澤俊明：コラーゲンビトリゲル膜チャンバー内に再構築したヒト血管内皮組織シートのバリア機能、日本薬学会第133年会、(2013.3、横浜)
- 107)工藤祐子、原田博美、藤森浩彰、渡邊昌俊、益谷美都子：生体試料における
- 108)したヒト血管内皮組織シートのバリア機能、日本薬学会第133年会、(2013.3、横浜)
- 109)Watanabe M, Sato A, Okamoto D, Kurioka D, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y.: Synergistic effect of carboxyl-modified magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells in vitro No.784 AACR (2013.4, Washington DC)
- 110)Watanabe M, Endo Y, Kurioka D, Sato A, Iwasaki A, Okamoto D, Watanabe N.: Nanomedicine in prostate cancer therapy (Invited), in the Symposia entiteled “Genomics & Proteomics-, 101<sup>st</sup> Indian Science Congress, Jammu, (2014.2, India)
- 111)小坂俊仁、芳野純治、乾和郎、若林貴夫、小林隆、三好広尚、服部信幸、友松雄一郎、山本智支、成田賢生、鳥井淑敬、森智子、林繁和、白石泰三、山本隆行、渡邊昌俊：直腸型潰瘍性大腸炎と遺伝子多型との関連、第99回日本消化器病学会総会(2013.3、鹿児島)
- 112)渡邊昌俊：組織切片共培養における前立腺癌細胞DU145とLNCaPの挙動、第102回日本病理学会総会(2013.6、札幌)
- 113)渡邊昌俊、竹村泰司：医工連携の華、ナノメディシン、第36回日本がん疫学・分子疫学研究会総会、シンポジウム(2013.6、岐阜)
- 114)佐藤明子、堀恭樹、森田駿、菅原健太郎、讚良茂浩、新田見匡、竹澤俊明、渡邊昌俊：組織切片担体と前立腺がん細胞株DU-145との相互作用について、第72回日本癌学会学術総会(2013.10、横浜)
- 115)岡本大樹、古田奈緒、山口創、岩崎有由美、佐藤明子、河合一明、葛西宏、渡邊昌俊：前立腺癌細胞におけるカルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子とドセタキセルの併用効果、第72回日本癌学会学術総会(2013.10、横浜)
- 116)岩崎有由美、古田奈緒、山口創、岡本大樹、深井瑛美、佐藤明子、河合一明、葛西宏、石黒斉、上村博司、窪田吉信、渡邊昌俊：前立腺癌における磁性体ナノ粒子と各種化学療法の併用効果、第72回日本癌学会学術総会(2013.10、横浜)
- 117)諸橋彩香、佐藤明子、岩崎有由美、河井一明、葛西宏、石黒斉、古林直人、渡邊昌俊：P-1309磁性体ナノ粒子が曝露したがん細胞における抗酸化酵素遺伝子および活性酸素種酸性の変化について、第72回日本癌学会学術総会(2013.10、横浜)
- 118)堀恭樹、森田駿、新田見匡、遠藤宣広、石黒斉、上村博司、窪田吉信、渡邊昌俊：脂肪細胞由来の液生因子の前立腺がん挙動への影響について、第72回日本癌学会学術総会(2013.10、横浜)
- 119)落合雅子、渡邊昌俊、中釜斉、筆宝義隆：新規ACFを用いた異型性病変の検出と大腸がん早期病変の連続的評価、第72回日本癌学会学術総会(2013.10、横

- 浜) .
- 120) 讚良茂浩、菅原健太郎、堀恭樹、森田駿、栗岡大輔、新田見匡、高木陽光、渡邊昌俊：前立腺がんスフェロイドの抗癌剤抵抗性への *plk2* 遺伝子の関与について、第 72 回日本癌学会学術総会（2013.10、横浜）
- 121) 古田奈緒、山口創、岩崎有由美、岡本大樹、深井瑛美、佐藤明子、河合一明、葛西宏、戸塚ゆ加里、渡邊昌俊：磁性体ナノ粒子は高濃度曝露で A549 細胞における抗酸化システムを阻害し、細胞毒性をもたらす、第 72 回日本癌学会学術総会（2013.10、横浜）
- 122) 渡邊昌俊、中野洋、白石泰三：脂肪細胞由来液生因子の前立腺癌細胞 spheroid 形成への影響の基礎的解析、第 60 回日本臨床検査医学会学術集会（2014.10、神戸）
- 123) 栗岡大輔、渡邊昌俊、横田淳、中釜齊、土屋直人：マイクロ RNA 標的遺伝子スクリーニングによる *p53* 変異がん細胞の増殖制御因子の同定、第 36 回日本分子生物学年会（2013.12、神戸）
- 124) 藤原優子、西田百代、渡邊昌俊、河野隆志、中釜齊、土屋直人：がん抑制的 *miR-101* による *p53* 依存的チェックポイントの活性化機構、第 36 回日本分子生物学年会（2013.12、神戸）
- 125) 上大介、木谷友哉、大多哲史、富田あさひ、渡邊昌俊、竹村泰司、五條理志：磁性ナノ粒子を用いた *ex vivo gene therapy* の開発、第 13 回日本再生医療学会総会（2014.3、京都）

### 3. その他

- 1) Isama K, Kawakami T, Tsuchiya T, Matsuoka A: Osteoblast compatibility of calcium-incorporated Ti-Zr-Nb alloys. Proceedings of

- 24th European Conference on Biomaterials, Medimond S.r.l., pp.57-60 (2012)
- 2) 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, Medimond S.r.l., pp.87-90 (2012)
- 3) 伊佐間和郎：金属系材料の細胞毒性の評価、佐藤章弘企画編集「体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件」、技術情報協会、東京、pp.303-307（2013）

### F. 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  
なし



## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
平成 23～25 年度 分担研究総合報告書

ナノマテリアルの in vitro 評価系構築に向けた基礎研究

細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

研究分担者	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
研究協力者	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
研究協力者	宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	室長
研究協力者	酒井 恵子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	
研究協力者	小森谷 薫	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	
研究協力者	加藤 玲子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	主任研究官

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。Tween80 を分散剤として添加したり、直径の異なる粉碎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碎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。この要因としては、細胞内 Ni 量の測定より、二次粒子径サイズが大きいほど細胞内への取り込み量が多く、細胞毒性が強くなったと考えられた。

A. 研究目的

一般的にナノマテリアルは一次粒径が 100 nm 未満と定義されており<sup>1)</sup>、様々な種類のナノマテリアルが開発され、工業製品、化粧品、触媒、塗料など様々な製品に使用されるようになってきた。これら、ナノテクノロジー領域の市場規模の拡大は、2015 年までに 1 兆ドル<sup>2)</sup>とも、3.1 兆ドル<sup>3)</sup>とも言われている。我が国のナノマテリアル国内使用量は、2006 年の段階でカーボンブラックが約 100 万トンと圧倒的に多く、次いでシリカ（結晶質および非晶質）が約 13,500 トン、酸化チタン（TiO<sub>2</sub>）（ルチル

およびアナターゼ型）が約 1,250 トンと続き、この他にも、酸化亜鉛（ZnO）が約 480 トン、ナノクレイが約 250 トン、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）が約 60 トン、銀および無機微粒子が約 50 トンなどとなっている<sup>4)</sup>。

一方で、ナノマテリアルを用いた製品の製造時にナノマテリアルに作業員が曝露される可能性や、製品中に含有されるナノマテリアルに消費者が曝露され、ナノマテリアルに特有の毒性（Nanotox）が発現する可能性が懸念されている<sup>5,6)</sup>。実際に、中国では 2007 年 1 月から 2008 年 4 月にかけて

て、塗料製造工場の不十分な防護条件下での作業環境下で7名の女性工員(18~47歳)がナノ材料に持続的に曝露され肺障害を発症し、2名が死亡するという事例<sup>7)</sup>が報告されており、肺組織から観察されたナノシリカがその原因と考えられている<sup>8)</sup>。このような背景から、様々な *in vivo* ならびに *in vitro* 試験系において、ナノ材料の安全性が研究され、一部のナノ材料では、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<sup>9)</sup>。しかし、これまでに行われてきたナノ材料の生体影響に関する研究について、ナノ材料のキャラクタリゼーションが不十分なために、研究者の経験則 (rules of thumb) に基づいた試験が行われ、異なる実験室間で得られた結果の比較が難しい事が指摘されている<sup>10)</sup>。そして、ナノ材料の安全性評価については、試験法や評価基準などが明確にされておらず、断片的な試験結果の集積に留まっている。そこで、厚生労働省は今後の具体的な対策の一つとして、ナノ材料の *in vitro* 試験法の開発の必要性を挙げている<sup>4)</sup>。

金属酸化物ナノ材料は工業材料や消費生活製品材料としての開発が盛んに行われ、ZnO や TiO<sub>2</sub> 等については化粧品や塗料等に用いられている<sup>4)</sup>。これら金属酸化物ナノ材料に関して、様々な *in vitro* 試験が行われている。例えば、Yuanらは一次粒子径サイズの異なる SiO<sub>2</sub> ナノ粒子を作製し細胞毒性試験を行い、一次粒子径が 20~80 nm で細胞毒性が認められ、140 nm 以上では細胞毒性は認められなかったと報告している<sup>11)</sup>。一方で、一次粒子径サイズが同程度でも化学組成が異なると細胞毒性が異なることが報告されており<sup>12,13)</sup>、金属酸化物ナノ材料の化学組成が毒性に影響していることが考えられている。また、*in vivo* 試験ではあるが、一次

粒子径が同じで二次粒子径が異なる TiO<sub>2</sub> ナノ粒子によるラット気管内投与試験では、二次粒子径サイズの違いによる炎症反応の差異は認められないと報告されている<sup>14)</sup>。

このように、金属酸化物ナノ材料の物性が毒性試験の結果に影響を及ぼすため、毒性試験にはナノ材料の物性情報として、①状態(粒子径・粒径分布・凝集体・形状)、②材料(化学組成・結晶性・表面組成・純度)、③周囲に影響する因子(表面積・表面化学特性・表面荷電)の3点に加え、さらに包括的に考慮すべき内容として、安定性、培地の影響および適切な用量計測(dose-metrics)での評価が求められている<sup>10)</sup>。そこで、本研究では金属酸化物ナノ材料の培養細胞試験系における、細胞応答に及ぼすナノ材料の影響の解明を目的として、培養細胞試験に用いる金属酸化物ナノ材料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材料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。

本研究では大きく3つの事を実施している。始めに、細胞毒性および遺伝毒性試験に用いる10種類(11試料)の金属酸化物ナノ材料懸濁液について、動的光散乱法(Dynamic Light Scattering: DLS)を用いて細胞培養試験時の液体培地中の平均粒子径、粒径分布および Zeta 電位、ならびに各金属イオン濃度を測定した。次に、9種類(10試料)の金属酸化物ナノ材料について、Tween80を分散剤として用いたり、遊星ボールミル型粉碎機の粉碎ボール径を変えたりして、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製を試みた。また、金属酸化物ナノ材料の分散状態に対する Tween80 添加の影響について検討した。最後に、一次粒子径サイズが同じ NiO ナノ材料

について、二次粒子径サイズの異なる懸濁液を調製し、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。

## B. 研究方法

### B.1 金属酸化物ナノマテリアル

試験に用いた金属酸化物ナノマテリアルの入手先や性状を表 1 に示した。CIK ナノテック社製の金属酸化物ナノマテリアルについては、無償提供して頂いた。その他の金属酸化物ナノマテリアルは表 1 に示した会社から購入した。用いた金属酸化ナノマテリアルの一次粒子径は全て 50 nm 以下であった。

### B.2 細胞毒性および遺伝毒性試験に供試した 10 種類 (11 試料) の金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の調製および物性等の測定

$\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{CeO}_2$ 、ITO、 $\text{SiO}_2$ 、 $\text{TiO}_2$  および CuO については、提供元より日本薬局方注射用水 (大塚製薬製) に懸濁させた状態で入手した。また、2 社から購入した ZnO についても、それぞれ水に懸濁させた状態の製品を購入したが、Sigma-Aldrich 製の ZnO (ZnO-Sigma) は、分散剤として 2% の 3-aminopropyltriethoxysilane を含有していた。これらの金属酸化物ナノマテリアル懸濁液を、注射用水を用いてクリーンベンチ内で 10 mg/mL に調製した。

その他の金属酸化物ナノマテリアル (CuO、 $\text{SnO}_2$ 、 $\text{Y}_2\text{O}_3$ 、NiO) は、50 mg を滅菌済み 15 mL チューブ (CORNING®) に秤量し、クリーンベンチ内で 10 mg/mL となるように注射用水を 5 mL 加えた。その後、破碎ホーンにスタンダードマイクロチップを装着したプローブ型超音波破碎機 Q700 (QSONICA 社製) を用いて、発振出力 (Amplitude) を 30 に設定し、氷冷しながら 1 分間ずつ 5 回に分けて 1 分間のインターバルをとりながら超音波処理を行った。

その際、破碎ホーンおよびその周囲をエタノール滅菌し、消音箱 (ソノボックス) 内でコンタミネーションが起きないように注意して処理した。また、懸濁液中の破碎ホーンの先端位置は処理毎に同じ所になるように注意した。

各金属酸化物ナノマテリアルが 10 mg/mL となるように調製した懸濁液 (懸濁原液) について、大塚電子社製 ELSZ-2 を用いて、平均粒子径 (流体力学粒径) および粒径分布を動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS)、Zeta 電位を電気泳動光散乱法 (レーザードップラー法) で測定した。その際、平均粒子径は Cumulant 法、粒径分布は Marquardt 解析法を用いたヒストグラム法でそれぞれ求めた。また、平均粒子径および粒径分布は同一試料を繰り返し 3 回、Zeta 電位は、平均粒子径を測定した後に同一試料を繰り返し 4 回測定して求めた。さらに、その金属ナノマテリアル懸濁液を 10% のウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS) を含む GIBCO 製 Minimum Essential Medium (MEM) (10%FBS-MEM) を用いて希釈し、同様に各項目を測定した。この 10%FBS-MEM で希釈した試料を共同研究者が細胞毒性および遺伝毒性試験に使用した。

このように調製した NiO、ZnO および CuO ナノマテリアル懸濁原液と 10%FBS-MEM を用いて希釈した懸濁液 (0.2 および 0.05 mg/mL) について、金属イオン濃度測定を行った。金属イオン濃度測定の前処理として、懸濁原液および 10%FBS-MEM 懸濁液を冷却超遠心機 (himac CP65 $\beta$ 、日立工機製) にてアングルローター (P70AT2) を用いて、20°C、50000 rpm (約 170000 $\times$ g) で 1 時間遠心した。その上清 0.5 mL を採取し、5%硝酸水溶液 4.5 mL を加えて試験溶液とした。なお、5%硝酸水溶液は、和光純薬工業製の有害金属測



定用硝酸を Milli-Q 水で希釈して調製した。超遠心処理により得られた試験溶液を、5%硝酸水溶液により適切な濃度に希釈した後、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター（ザルトリウス）を用いてろ過してから金属イオン濃度を測定した。金属イオン濃度の測定には、誘導結合プラズマ質量分析計（Inductively Coupled Plasma Mass spectrometry: ICP-MS）を用いた。また、金属酸化物ナノマテリアルを含まない 10%FBS-MEM について、同様の操作を行ったものを対照試料として測定した。試験は 2 連（ $n=2$ ）で実施した。

ICP-MS には Agilent 7500ce（Agilent Technologies, Inc.）を用いた。測定条件は、高周波出力: 1500W、プラズマガス: Ar 15 L/min、キャリアガス: Ar 0.7 L/min、メイクアップガス: 0.33 L/min、コリジョンガス: He 5mL/min、サンプリング位置: 8 mm、スプレーチャンバー温度: 2°C、積分時間 0.1 sec/element、測定回数: 3 times とした。Zn、Cu および Ni の各 1000 mg/L 標準液（和光純薬工業製）を、5%硝酸溶液で段階希釈し標準溶液とした。また、Ag の 1000 mg/L 標準液（和光純薬工業製）を 5%硝酸で 5  $\mu\text{g/L}$  に希釈したものを内部標準液として用いた。Zn、Cu、Ni および Ag の測定質量電荷比（ $m/z$ ）は、66、63、60 および 107 とした。各元素のバックグラウンド濃度は、Zn: 1.36  $\mu\text{g/L}$ 、Cu: 4.47  $\mu\text{g/L}$  および Ni: 0.536  $\mu\text{g/L}$  であった。

### B.3 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

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を調製するため、2 種類の方法を検討した。

1 つ目は、金属酸化物ナノマテリアル懸濁液に分散剤を添加する方法を検討した。この検討には、懸濁液として入手した

$\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{CeO}_2$ 、ITO、 $\text{SiO}_2$ 、 $\text{TiO}_2$  および ZnO-Sigma および ZnO-Alfa を用いた。これらを、10 mg/mL となるように、分散剤に Tween80（ICN Biomedical Inc.）を 0.1%（w/v）含む Milli-Q 水で調製した（懸濁原液）。この各懸濁原液について、平均粒子径（流体力学粒径）、粒子径分布および Zeta 電位を測定した。また、この金属酸化物ナノマテリアル懸濁液を 10%FBS-MEM を用いて 0.2 mg/mL となるように希釈し、同様に各項目を測定した。

2 つ目は、遊星ボールミル型湿式粉碎機を用いる方法を検討した。この方法では、金属酸化物ナノマテリアルは粉体として入手した CuO、NiO および  $\text{Y}_2\text{O}_3$  を検討した。粉碎機は NP-100（シンキー製）を用い、粉碎容器はジルコニア製であった。粉碎には、直径が 0.5、0.1 および 0.05 mm の三種類のジルコニアボールを用いた。始めに、金属酸化物ナノマテリアル試料 100 mg をジルコニア容器に量り採り、そこに Tween80 を 0.1%（w/v）含む Milli-Q 水を 2.5 mL 加えた。次に、ジルコニアボールを 2.5 g 加えた後、MILL/MIX モードで公転速度 2000rpm の条件で 2 分間粉碎を行った。その後、Milli-Q 水を 7.5 mL 加えた後、MILL/MIX モードで公転速度 400rpm の条件で 1 分間混合した。この溶液の上清について平均粒子径（流体力学粒径）、粒径分布および Zeta 電位を測定した。

さらに Tween80 が金属酸化物ナノマテリアルの分散に与える影響を検討するため、次の試験を行った。 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、 $\text{CeO}_2$ 、ITO、 $\text{TiO}_2$ 、ZnO-Sigma および ZnO-Alfa の 5 種類（6 試料）を 10 mg/mL（懸濁原液）の濃度になるように、Milli-Q 水で調製した。その際に、Tween80 を 0.1%（w/v）含むように添加したものと、非添加の 2 種類を調製した。これらの金属酸化物ナノマテリアル懸濁液について、ELSZ-2 および pH タ

イトレーターシステム ELSZ-PT を用いて、懸濁液中の各 pH 条件下での平均粒子径および Zeta 電位を測定した。

#### B.4 二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液の細胞毒性

試験には A549 細胞（ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞: JCRB 細胞バンク）を用いた。細胞は、10% heat-inactivated fetal bovine serum（非働化 FBS）、1% non-essential amino acid (NEAA) (GIBCO 製) を含む MEM にて、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養したものをを用いた。試験液には、NiO ナノマテリアル懸濁原液を前述の液体培地で希釈したものをを用いた。

始めに、A549 細胞を 96-well プレートに播種 ( $5 \times 10^3$  cell/well) し、24 時間後に試験液を添加して 48 時間培養した。培地除去後、100  $\mu$ L の Phenol Red-free MEM 培地および 20  $\mu$ L の Cell Titer 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Reagent (MTS 試薬、Promega) を添加し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 37°C、1 時間反応させた。その後、生成したフォルマザンをマイクロプレートリーダー ( $\lambda=490$  nm) で測定した。そして、培地のみで細胞を培養した well を対照として、細胞生存率を算出した。

細胞毒性試験とは別に、細胞内への NiO ナノマテリアルの取り込み量を測定するために、A549 細胞を 6-well プレートに播種 ( $2 \times 10^5$  cells/well) し、24 時間後に試験液を添加して NiO ナノマテリアルを 24 および 48 時間曝露させた。曝露濃度は 1~25  $\mu$ g/L とし、比較対象として、塩化ニッケル (NiCl<sub>2</sub>) および培地のみ条件でも検討した。培養後、培地を除去し、各 well を PBS で繰り返し洗浄した後、トリプシン処理して細胞を回収した。回収した細胞を PBS で繰り返し洗浄後、細胞数を計測した。細胞内の Ni 量の測定は、伊佐間ら

の報告<sup>15)</sup>に従って行った。すなわち、回収した細胞に 2%塩酸を加えて 60°C で 2 時間加温し、細胞内の Ni を抽出した。抽出液は 5%硝酸水溶液により適切な濃度に希釈した後に、孔径 0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルター (ザルトリウス) を用いてろ過した。この溶液中の Ni 濃度を、前述の方法と同様に ICP-MS にて Ni 量を測定した。

### C. 結果および考察

#### C.1 細胞毒性および遺伝毒性試験に供試した 10 種類 (11 試料) の金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の調製および物性等

各金属酸化物ナノマテリアルの懸濁液中の平均粒子径を表 2 に示した。また、散乱強度分布から得られた粒径分布を図 1 に個数分布から得られた粒径分布を図 2 に示した。金属酸化物ナノマテリアル非存在下でも、液体培地由来のナノサイズの粒子が DLS 分析によって検出されることが報告されている<sup>16)</sup>が、今回 10%FBS-MEM のみでは散乱強度が弱く測定できなかった。

注射用水中での平均粒子径は、TiO<sub>2</sub> および SnO<sub>2</sub> を除くいずれの金属酸化物ナノマテリアルも一次粒子径よりも大きく、注射用水中ではこれらは凝集し、二次粒子として存在していた。これらの二次粒子の平均粒子径については CeO<sub>2</sub>、ITO、TiO<sub>2</sub>、ZnO-Sigma では 100 nm 以下、それ以外は NiO の 256.8 nm が最大であった。TiO<sub>2</sub> については、一次粒子径と注射用水中で観察された平均粒子径は同程度と考えられた。SnO<sub>2</sub> については凝集性が高く、超音波処理後の注射用水中で速やかに凝集・沈降し測定が出来なかった。

10%FBS-MEM 中では、ZnO-Alfa を除く全ての金属酸化物ナノマテリアルの平均粒子径が、注射用水中よりも大きくなっていた。一方、SnO<sub>2</sub> は注射用水中では速やかに凝集し測定不能であったが、10%FBS-

MEM 中では平均粒子径は 1000 nm を超えているものの、分散状態を保ち測定可能であった。また、CuO、Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> および NiO は注射用水中よりも 10%FBS-MEM 中でピーク形状がシャープになっていた。培地中の血清がこれらの金属酸化物ナノマテリアルの分散剤として働いている<sup>17)</sup>と考えられた。ZnO-Alfa では平均粒子径サイズに変化は無く、そのピーク形状も散乱強度分布 (図 1) および個数分布 (図 2) のどちらでも一致し、10%FBS-MEM 中で凝集していないと考えられた。

各金属酸化物ナノマテリアルの懸濁液中の Zeta 電位を表 2 に示した。注射用水中の SiO<sub>2</sub> および ZnO-Alfa の Zeta 電位は、それぞれ -54.4 mV および -7.5 mV を示した。一方、これら二種類以外の金属酸化物ナノマテリアルの注射用水中の Zeta 電位は 41.9~62.1 mV を示した。ZnO については、メーカーの異なる 2 種類の懸濁液で Zeta 電位の電荷が逆転しており、ZnO-Sigma に分散剤として用いられている 3-aminopropyltriethoxysilane の影響があるものと思われる。

Murdock et al は一次粒子径が 30 nm の Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> および 35 nm の SiO<sub>2</sub> の脱イオン水中 (超音波処理後) での Zeta 電位がそれぞれ 43.0 mV および -23.1mV を示したと報告している<sup>17)</sup>。この傾向は本研究と同傾向であった。一方で、彼らは一次粒子径が 39 nm と同一でアナターゼ型の割合が異なる TiO<sub>2</sub> について、脱イオン水中の Zeta 電位がアナターゼ型 100%で -4.95 mV、60%は 13 mV、39%は 17.7 mV と異なることを報告している<sup>17)</sup>。今回用いた TiO<sub>2</sub> は一次粒子径が 36 nm でアナターゼ型の割合が 80%であったが、Zeta 電位は 49.5 mV と大きく正に傾いていた。Murdock らの TiO<sub>2</sub> 懸濁液の pH は 7.0 であり、今回用いた TiO<sub>2</sub> 懸濁液の pH (10%懸濁液、表 1) は

2.4 と大きく異なっている。Zeta 電位は pH によって変化し、TiO<sub>2</sub> (一次粒子径 ~27 nm、結晶系不明) の Milli-Q 水懸濁液での等電点 (Point of Zero Charge: PZC) が 5.19 であることから<sup>18)</sup>、懸濁液中の pH が大きく影響しているものと考えられた。

10%FBS-MEM 中での各金属酸化物ナノマテリアルの Zeta 電位はすべて負電荷を示した。また、10%FBS-MEM のみの状態で Zeta 電位を測定したところ、-9.6 ± 1.6 mV であった。既存の報告<sup>13)</sup>でも、液体培地中の金属酸化物ナノマテリアルの Zeta 電位は値の大小の違いはあるが負側を示しており、本研究の値と同傾向であった。金属酸化物ナノマテリアルが存在しない状態での 10%FBS-MEM の Zeta 電位は、主に培地中の血清由来のタンパク質に起因すると考えられ、注射用水中で Zeta 電位が正を示した金属酸化物ナノマテリアルは、それらのタンパク質を吸着する<sup>19)</sup>ことで Zeta 電位が大きく変化したと考えられた。

ZnO、CuO および NiO ナノマテリアル懸濁原液および 10%FBS-MEM 中の金属イオン濃度を測定し、その結果を表 3 に示した。10%FBS-MEM のみのブランクについて、各金属イオンが低濃度 (0.29~0.96 µg/mL) で検出され、それらは主に培地または血清由来と考えられた。

ZnO-Alfa および ZnO-Sigma について、各懸濁液中の Zn イオン濃度は 10~26 µg/mL、Zn イオンの溶出率は 0.25~35% であった。一方、懸濁原液では Zn イオン溶出率は 0.25~0.33% で、10%FBS-MEM 中ではその数十から百倍程度 Zn イオンの溶出率が高かった。そのため、懸濁液を 10%FBS-MEM で調製する過程で、ZnO から Zn イオンが溶出したと考えられた。懸濁液を 37°C で 24 時間インキュベートした後の懸濁液中 Zn イオン濃度には変化はなかった。一方、ZnO を 0.2 mg/mL および

0.05 mg/mL 含む懸濁液の Zn イオン濃度は同程度であり、Zn イオンの溶出率は 0.05 mg/mL の方が数倍高くなった。同傾向が NiO について報告<sup>20)</sup>されているが、この要因は不明であり、今後検討が必要である。

CuO および NiO については、各金属酸化物を 0.2 mg/mL 含む懸濁液では、各金属イオンが 89 µg/mL および 30 µg/mL 検出され、その溶出率は 56% および 19% であった。一方、各金属酸化物を 0.05 mg/mL 含む懸濁液では Cu および Ni イオンはそれぞれ 19 µg/mL および 7.7 µg/mL 検出され、その溶出率は 47% および 20% と、0.2 mg/mL の時とほぼ同じであった。そのため、10%FBS-MEM で調製直後の CuO および NiO 懸濁液では、酸化物ナノマテリアルから各イオンが一定の割合で溶出しているものと考えられた。

## C.2 分散剤の添加および湿式ナノ粉碎機使用による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

Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、SiO<sub>2</sub>、CeO<sub>2</sub>、ITO、TiO<sub>2</sub>、ZnO-Sigma および ZnO-Alfa 懸濁液に分散剤として Tween80 を添加する方法によって調製した懸濁原液 (10 mg/mL) と、それを 10%FBS-MEM で希釈して調製した懸濁液 (0.2 mg/mL) 中の平均粒子径および Zeta 電位を表 4 に示した。

懸濁原液について、Tween80 添加の有無による平均粒子径および粒径分布の差異は認められなかった。一方で、10%FBS-MEM 中ではいくつかの金属酸化物ナノマテリアルで、Tween80 添加の有無により平均粒子径および粒径分布に違いが認められた。特に、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、TiO<sub>2</sub> および CeO<sub>2</sub> では Tween80 の添加により、平均粒子径が 50~300 nm ほど小さくなることが認められた。この傾向は粒径分布でも確認することができた (データ未掲載)。一方、

10%FBS-MEM 中の ITO では、平均粒子径は Tween80 の添加により若干小さくなったが、粒径分布では違いは認められなかった (データ未掲載)。また、SiO<sub>2</sub>、ZnO-Sigma および ZnO-Alfar では、10%FBS-MEM 中の平均粒子径および粒径分布に対する Tween80 添加の影響は認められなかった。Zeta 電位については、Tween80 非添加時に懸濁原液中で正の電荷を示した金属酸化物ナノマテリアルは、Tween80 添加により若干の低下が認められた一方で、10%FBS-MEM では全ての金属酸化物で、Tween80 添加の影響は認められなかった。

Tween80 が懸濁液中の金属酸化物ナノマテリアルの分散状態に及ぼす影響を評価するために、Tween80 添加および非添加条件下での Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、CeO<sub>2</sub>、ITO、TiO<sub>2</sub>、ZnO-Sigma および ZnO-Alfa 懸濁液 (10 mg/mL) の各 pH における Zeta 電位 (図 3) および平均粒子径 (図 4) を測定した。また、図 3 に示した Zeta 電位変化から Zeta 電位がゼロとなる pH を PZC として求め表 5 に示した。Tween80 添加および非添加条件ともに、pH が大きくなると、Zeta 電位は低下する傾向が認められた。ただし、ZnO-Sigma では、Zeta 電位は Tween80 非添加時に pH3 から 6 にかけて低下後、pH7 にかけて大きく上昇した。その後、pH の上昇と共に Zeta 電位は低下し、PZC は 10.51 と他に比べて大きい値となり、分散剤の 3-aminopropyltriethoxysilane の影響と考えられた。また、ZnO-Alfa を除き、各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の PZC は Tween80 添加条件下の方が非添加条件下よりも低い値を示し、各金属酸化物ナノマテリアル間における PZC 値の差は小さくなっていた。

Tween80 非添加条件下での各 pH における金属酸化物ナノマテリアルの平均粒子径は、ZnO-Alfa を除き、PZC よりも少し低



い pH から PZC にかけて、粒子径が増大し凝集していた。一方、Tween80 添加条件下では ZnO-Sigma を除き、どの pH 条件下においても平均粒子径サイズに変化は認められなかった (図 4)。前述のように、10%FBS-MEM で調製した各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液について、Tween80 を添加したほうが凝集しにくく平均粒子径サイズが小さくなることが認められている (表 4)、その要因の一つとして、Tween80 による金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の pH 変化による凝集を抑制する効果が影響していると考えられた。ZnO-Sigma で Tween80 添加による凝集抑制効果が認められなかった理由の一つとして、分散剤の 3-aminopropyltriethoxysilane が影響していると考えられた。

NiO、CuO および  $Y_2O_3$  について、遊星ボールミル型湿式粉碎機を用いて二次粒子径サイズの異なる懸濁原液の調製を行い、懸濁原液 (10 mg/mL、0.1% (w/v) の Tween80 を含む) と、それを 10%FBS-MEM 懸濁液で 0.2 mg/mL に調製した懸濁液中の平均粒子径および Zeta 電位を表 4 に示した。懸濁原液では、ジルコニアボールの直径が 0.5、0.1 および 0.05 mm の順に平均粒子径が小さくなった。また、各金属酸化物ナノマテリアルの 10%FBS-MEM 中の平均粒子径は、ジルコニアボール直径 0.05 mm 使用時と、それよりも直径の大きいジルコニアボール使用時とで差が認められており、二次粒子径の異なる金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の調製が可能であると考えられた。

このように、分散剤として Tween80 を用いたり、直径の異なるジルコニアボールを用いた湿式粉碎を組み合わせたりすることで、一次粒子径が同じで二次粒子径の異なる懸濁液の調製が出来る。

### C.3 二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液の細胞毒性試験

前項で示した方法に基づき、二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁原液 (10 mg/mL) および 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.05、0.1、0.2 および 0.4 mg/mL) を調製した。その平均粒子径を表 5 に、懸濁原液および 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.2 mg/mL) の粒径分布の様子を散乱強度分布 (図 5. 左) および個数分布 (図 5. 右) としてそれぞれ示した。ジルコニアボール径が小さくなるにつれて、懸濁原液および 10%FBS-MEM 懸濁液ともに平均粒子径が小さくなり、ジルコニアボール径の異なる懸濁液間では、どの濃度でも平均粒子径サイズが異なっていた。懸濁原液と 10%FBS-MEM 懸濁液では、後者の方が平均粒子径は大きくなったが、10%FBS-MEM 懸濁液の各濃度間では、どの濃度でも同程度の平均粒子径であった。また、37°C で 24 時間静置した各懸濁液の平均粒子径を測定したところ、ほとんど変化がなかった (表 6)。粒径分布では、懸濁原液および 10%FBS-MEM とともに、散乱強度分布および個数分布どちらも、ジルコニアボール径が小さくなるほど、ピークが粒径の小さい側にシフトしていた。

この NiO ナノマテリアル懸濁液を用いて細胞毒性試験を行った結果、ジルコニアボール径サイズが大きい、すなわち懸濁液中の NiO 二次粒子径サイズが大きいほど、細胞毒性曲線は低濃度側にシフトした (図 6)。また、細胞毒性曲線より各懸濁液の  $IC_{50}$  値は、 $\phi 0.05$  mm (147.5  $\mu\text{g/mL}$ )、 $\phi 0.1$  mm (83.5  $\mu\text{g/mL}$ ) および  $\phi 0.5$  mm (33.4  $\mu\text{g/mL}$ ) と算出された。このように、一次粒子径サイズが同じ NiO ナノマテリアル懸濁液において、二次粒子径サイズが大きいほど細胞毒性が強くなった。

次に、二次粒子径サイズの異なる NiO

ナノマテリアル懸濁液曝露後の A549 細胞中 Ni 量の測定結果を図 7 に示した。その結果、各懸濁液ともに、曝露量が多くなるほど細胞内 Ni 量が多くなった。また、二次粒子径サイズの異なる試料間で比較すると、そのサイズが大きいほど、細胞内 Ni 量は多くなった。一方で、対照とした培地のみの場合と、Ni イオンの影響を評価するために NiCl<sub>2</sub> 溶液を曝露した場合には、懸濁液を曝露した試料に比べて細胞内の Ni 量は非常に少なかった。

今回行った試験では、NiO 懸濁液中の Ni 濃度は 0.786~19.6 µg/mL であり、NiCl<sub>2</sub> 溶液中の Ni 濃度は 0.0587~2.94 µg/mL である。超音波処理により調製した NiO 懸濁液中の Ni イオンの溶出量は 20%程度であった (表 3)。懸濁液の調製方法が異なるが、Ni の溶出率が同程度 (20%) と仮定すると、その懸濁液中 Ni イオン濃度は 0.1572~3.92 µg/mL となる。この濃度は曝露した NiCl<sub>2</sub> 溶液中の Ni イオン濃度とほぼ同じであるが、細胞内 Ni 量は大きく異なっていた。そのため、NiO 懸濁液を曝露した A549 細胞から検出された Ni は、Ni イオンとして取り込まれたものではなく、NiO として細胞内に取り込まれた可能性が高いと考えられた。また、二次粒子径サイズが大きいほど毒性が強くなり、細胞内 Ni 量も多かったことから、細胞内への NiO ナノマテリアルの取り込みに二次粒子径サイズが影響し、そのサイズが大きいほど細胞内に取り込みやすく、細胞毒性が強くなったと考えられた。

#### D. まとめ

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。Tween80 を分散剤として

添加したり、直径の異なる粉碎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碎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。細胞内 Ni 量の測定より、二次粒子径サイズが大きいほど細胞内への取り込み量が多く、細胞毒性が強くなったと考えられた。

#### E. 謝辞

CIK ナノテックから試験に供試した金属酸化物ナノマテリアルを、株式会社シンキーから湿式粉碎に用いた直径 0.05 mm のジルコニアボールを提供して頂きました。ここに謝意を表します。

#### F. 引用文献

- 1) Whatmore R.W.: Nanotechnology - what is it? Should we be worried? *Occup. Med.*, 56, 295-299, 2006
- 2) Aitken R.J., Chaudhry M.Q., Boxall A.B.A., Hull M.: Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends, *Occup. Med.*, 56, 300-306, 2006
- 3) Lux Report.: Nanomaterials State of the Market Q3 2008: Stealth Success, Broad Impact, [https://portal.luxresearchinc.com/research/document\\_excerpt/3735](https://portal.luxresearchinc.com/research/document_excerpt/3735), 2008"
- 4) ナノマテリアルの安全対策に関する検討会: ナノマテリアルの安全対策に関する検討会報告書, <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2009/03/dl/h0331-17c.pdf>, 2009
- 5) Ema M., Kobayashi N., Naya M., Hanai S., Nakanishi J.: Reproductive and developmental toxicity studies of

- manufactured nanomaterials, *Reprod. Toxicol.*, 30, 343-352, 2010
- 6) Schmidt C.W.: Nanotechnology-related environment, health, and safety research: examining the national strategy, *Environ. Health Perspect.*, 117, A158-A161, 2009
- 7) Song Y., Li X., Du X.: Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma, *Eur. Respir. J.*, 34, 559-567, 2009
- 8) Song Y., Li X., Wang L., Rojanasakul Y., Castranova V., Li H., Ma J.: Nanomaterial in humans: Identification, characteristics, and potential damage, *Toxicol. Pathol.*, 39, 841-849, 2011
- 9) Dhawan A., Sharma V.: Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 589-605, 2010
- 10) Boverhof D.R., David R.N.: Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 953-961, 2010
- 11) Yuan H., Gao F., Zhang Z., Miao Ledu, Yu R., Zhao H., Lan M.: Study on controllable preparation of silica nanoparticles with multi-sizes and their size-dependent cytotoxicity in pheochromocytoma cells and human embryonic kidney cells, *J. Health Sci.*, 56, 632-640, 2010
- 12) Karlsson H.L., Gustafsson J., Cronholm P., Möller L.: Size-dependent toxicity of metal oxide particles - A comparison between nano- and micrometer size, *Toxicol. Lett.*, 188, 112-118, 2009
- 13) Xu M., Fujita D., Kajiwara S., Minowa T., Li X., Takemura T., Iwai H., Hanagata N.: Contribution of physicochemical characteristics of nano-oxides to cytotoxicity, *Biomaterials*, 31, 8022-8031, 2010
- 14) Kobayashi N., Naya M., Endoh S., Maru J., Yamamoto K., Nakanishi J.: Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO<sub>2</sub> particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results, *Toxicology*, 264, 110-118, 2009
- 15) 伊佐間和郎・河上強志: 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, 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (H23-化学-一般-006)
- 16) Hanagata N., Zhuang F., Connolly S., Li Je., 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*, 5, 9326-9338, 2011
- 17) Murdock R.C., Braydich-Stolle L., Schrand A.M., Schlager J.J., Hussain S.M.: Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique, *Toxicol. Sci.*, 101, 239-253, 2008
- 18) Berg J.M., Romoser A., Banerjee N., Zebda R., Sayes C.M.: The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to *in vitro* toxicological evaluations, *Nanotoxicology*, 3, 276-283, 2009
- 19) Horie M., Nishio K., Fujita K., Endoh S., Miyauchi A., Saito Y., Iwahashi H., Yamamoto K., Murayama H., Nakano H., Nakashima N., Niki E., Yoshida Y.: Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells, *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 543-553, 2009
- 20) Horie M., Nishio K., Fujita K., Kato H., Nakamura A., Kinugasa S., Endoh S., Miyauchi A., Yamamoto K., Murayama H.,

Niki E., Iwahashi H., Yoshida Y., Nakanishi J.: Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity in vitro by cellular uptake and subsequent Ni(II) release, *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 1415-1426, 2009

## G. 研究発表

### G.1 論文発表

1. Matsuoka, A., Kodama, Y., Yoshida, M., Isama, K., Inoue, K., Kawakami, T., Nishikawa, A. Toxicological studies of nanosuspensions of silica, silver and zinc oxide. *Proceedings of 24th European Conference on Biomaterials*, 87-90, 2011
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)
8. 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)
9. 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)
10. 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)

### G.2 学会発表

1. Matsuoka A., Kodama Y., Yoshida M., Isama, K., Inoue K., Kawakami T., Nishikawa A.: *In vitro* and *in vivo* toxicity studies of nanomaterials used in household products, *International Conference on Materials for Advanced Technology*, Suntec City, Singapore, Jun 2011.
2. 伊佐間和郎・河上強志・児玉幸夫・中嶋富士雄・吉田緑・井上薫・西川秋佳・松岡厚子, 家庭用品に用いられる