

normalization した後にマージし、最後に Locally Weighted Scatter plot Smoother (LOWESS)補正を行った。

DNA マイクロアレイ実験は、異なる培養から得られた RNA を用いて 2 回行った。1 回目の実験は、コントロール培地で培養した細胞から得られた RNA を Cy3 で、ナノマテリアル含有培地および溶出イオン含有培地で培養した細胞から得られた RNA を Cy5 でラベルし、Cy3 に対する Cy5 の蛍光強度の比が 2 倍以上あるいは 0.5 倍以下の遺伝子を発現量に変動のあった遺伝子として抽出した。2 回目の実験は、Cy3 と Cy5 を入れ替え、コントロール細胞から得られた RNA を Cy5 でラベルし、Cy5 に対する Cy3 の蛍光強度の比から発現量に変動のあった遺伝子を抽出した。これらの抽出された遺伝子は、2 回の実験による発現量比の誤差が 2 倍以内の遺伝子のみを再現性のある遺伝子として同定した。これらの遺伝子の発現量比の値は、2 回の実験の平均値とした。

さらに、これらの遺伝子は、PANTHER program の Gene expression analysis / Compare gene lists (<http://www.pantherdb.org/tools/genexAnalysis.jsp>) により Gene Ontology(GO) の Biological Process の categories への分類を行い、over(+)かつ p-value < 0.001 の categories を significant changed categories とした。

C. 研究結果

C1. CuO NPs による細胞の分子応答

CuO NPs を 25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で細胞に添加すると 24 時間後の生細胞数は無添加のときの細胞数の 25-30%まで減少した。CuO NPs の細胞毒性の分子メカニズムを推測するために、25 $\mu\text{g/ml}$ の CuO NPs への曝露で生き残った細胞の網羅的遺伝子発現

解析を行い、コントロール細胞に比べて発現量が 2 倍以上変化した遺伝子を抽出した。その結果、CuO NPs は 648 遺伝子の発現を増加させ、562 遺伝子の発現を減少させた (DNA マイクロアレイによる遺伝子発現データは Gene Expression Omnibus database GE33278 に登録)。これらの遺伝子を Gene Ontology (GO)の functional categories へ分類し、統計的に有意と判断された p value < 0.001 のカテゴリーを得た (図 1)。CuO NPs で発現量が増加する遺伝子は "nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process" および "response to stress" に、一方、down-regulate する遺伝子は "cell cycle", "cytokinesis", "chromosome segregation", および "cellular component organization" に影響することが示唆された。"Stress to response" に分類された 31 個の発現量が減少した遺伝子リストには、多くのヒートショックタンパク質群 (HSPs) や、GADD45B/G および NR4A1/3 などの MAPK pathways に関与する遺伝子が含まれていた (図 1a および表 1)。多くの HSPs の up-regulation は CuO-NPs によってタンパク質の変性が起きていることを示唆する。GADD45B および GADD45G は、GADD45 family のメンバーで、様々な genotoxic stress や apoptotic cytokines によって誘導され、細胞周期停止、DNA 修復、細胞生存およびアポトーシスに関与することが知られている。これらの機能は、GO category の "cell cycle" に分類される PCNA、CDC2/CCNB1、CDKN1A (p21) などの相互作用するタンパク質によって仲介される。PCNA は DNA 修復と細胞周期の G1 期から S 期への移行に関与し、一方、CDKN1A は PCNA の働きを阻害し、G1 期から S 期への移行をブロックする。CDC2/CCNB1 は、G2 期から M 期への移行に必要である。CuO-NPs は、CDKN1A

の発現には影響しないが、PCNA, CDC2, CCNB1 を減少させた(図 1b および表 1)ことから、CuO-NPs は G1 期および G2 期で細胞周期を停止させることを示唆している。細胞周期の停止は、G2/M の移行期に発現がピークになり、紡錘糸の会合と維持に関与する AURKA/B および TPX2 の発現減少(図 1b および表 1)によっても支持される。

GADD45B/G は、MTK1 の活性化を介して JNK および p38 経路の活性化を導く。これらの経路の活性化はさらに、c-Jun, JunD および ATF2 など転写因子 AP-1 の構成タンパク質の活性化を誘導することが知られている。AP-1 はアポトーシスと細胞生存の両方に関与する。JNK あるいは p38 経路が CuO NPs に対する細胞応答にどのように関与しているのかを調べるために、細胞を CuO NPs とともに JNK の阻害剤である JIP-1 peptide および p38 の阻害剤である SB239063 で処理した。その結果、CuO-NPs と JIP-1 peptide で同時に処理したときの生細胞数は、CuO NPs を単独で与えたときの生細胞数と比べて変化は認められなかったが、CuO NPs と SB239063 で同時に処理したときの生細胞数は顕著に減少していた(図 2a, b)。また、GADD45B を siRNA によってノックダウンすると、SB239063 で細胞を処理したときと同様に、CuO NPs に対する感受性が高くなり生細胞数が減少した(図 2c,d)ことから、CuO NPs による GADD45B/G 遺伝子の発現増加は、p38 経路の活性化を介した細胞生存に関与していることが示唆された。p38 経路の活性化は ATF2 を活性化する。ATF2 は、FOS, FOSB, ATF3 とのダイマー形成によって転写因子 AP-1 となるが、CuO NPs はこれらの partner proteins の発現を増加させた(図 1a および表 1)ことも、p38 経路を介した細胞生存を強く示唆している。

CuO NPs は NR4A1/3 を up-regulate する

が、これらの核内レセプタータンパク質は MEK5/ERK5 経路によって活性化され、細胞生存とアポトーシスの両方にかかわっていることが報告されている。NR4A1 の発現を siRNA によってノックダウンすると、CuO NPs への感受性が大きくなり、生細胞数が減少した(図 2c,d)ことから、NR4A1 の発現量増加も細胞生存に関与していると考えられる。

p53 が DNA 損傷によって活性化し、細胞周期の G1 および G2/M 期のチェックポイントでの停止を誘導することはよく知られている。p53 はまた、DNA 損傷から回復できない細胞にアポトーシスを引き起こす。p53 のチェックポイント機能は、ATM, ATR および Chk1 によるリン酸化によって活性化し、活性化した p53 は GADD45A や CDKN1A 遺伝子の発現を誘導する。CuO NPs は ATR を減少させるが、GADD45A および CDKN1A の遺伝子発現には影響しなかった(表 1)。したがって、したがって、CuO NPs による細胞生存には、p53 は大きな関与はしていないと考えられる。これらの結果から、CuO NPs に曝露された細胞の分子応答モデルを作製した(図 3)。

C2. ZnO NPs による細胞の分子応答

ZnO NPs の細胞毒性に及ぼす培地成分の影響を調べた。まず、FBS 濃度が ZnO NPs の毒性に及ぼす影響を調べるために、10% および 2%FBS を含む DMEM を調製した。これらの培地で 4 時間細胞を培養した後、ZnO NPs を添加し、24 時間後の毒性を調べた。しかしながら、いずれの FBS 濃度においても、ZnO NPs の毒性に及ぼす影響は観察されなかった(図 4a)。次に、10% FBS を含む DMEM とこれを 70%に希釈した培地を調製した。これらの培地で細胞を 4 時間培養し、その後、H₂O で分散した ZnO NPs で 24 時間曝露すると、70%

DMEM では、希釈していない DMEM に比べて大きな毒性を示した(図 4b)。これは、DMEM に含まれる成分が ZnO NPs の毒性に大きな影響を及ぼしていることを示唆している。そこで、DMEM に含まれている塩類の影響について調べた。DMEM には CaCl_2 が 1.8 mM 含まれているので、70% に希釈した DMEM における CaCl_2 濃度は 1.26 mM である。70% に希釈した DMEM に CaCl_2 を加えることによって濃度を段階的に高くしていくと、3.6 mM で ZnO NPs の毒性効果は見られなくなった(図 4c)。これは、Ca が ZnO NPs の毒性から細胞を救済することを意味している。このような救済効果は、DMEM に含まれる KCl や MgSO_4 などの他の塩では認められなかった(図 4d,e)。C1 で述べた CuO NPs の毒性は、Ca では救済されなかった(data not shown)。

ZnO NPs による毒性は、reactive oxygen species (ROS) によることが報告されている。しかしながら、Ca は、 H_2O_2 による ROS の毒性から細胞を救済することはできなかった(図 4f)。したがって、Ca は ROS の消去には関与していないと考えられる。この結果は、ZnO NPs の毒性の一部は ROS に起因するが、ROS が毒性のすべてではないことを示唆している。

Ca による ZnO NPs の毒性緩和メカニズムを調べるために、Ca によって発現量が増える遺伝子を DNA microarray によって調べた。1.26 mM の CaCl_2 を含む 70% DMEM と 3.6 mM CaCl_2 を含む 70%DMEM において 24 時間培養した細胞における遺伝子発現を比較すると、 CaCl_2 濃度を 3.6 mM に増加することによって 7 遺伝子が upregulation し、1 遺伝子が downregulation した。これらの遺伝子発現の変動によって変化する細胞機能を Gene Ontology (GO) によって予測した。しかしながら、有意に変

化する細胞機能は認められなかった。これは、 CaCl_2 濃度を 1.26 mM から 3.6 mM に増加しても、細胞機能には変化を及ぼさないことを意味している。1.26 mM の CaCl_2 を含む 70% DMEM と 3.6 mM CaCl_2 を含む 70%DMEM に ZnO NPs を 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加すると、 CaCl_2 を 1.26 mM 含む DMEM に比べて 3.6 mM 含む DMEM では、886 遺伝子が upregulation し、1155 遺伝子が downregulation した。また、ZnO NPs を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加すると、1055 遺伝子が upregulation し、1151 遺伝子が downregulation した。これらの発現量が増加した遺伝子によって変化する細胞機能を GO によって予測すると、細胞周期に関連する機能が大きく亢進していた(表 2)。すなわち、Ca は、ZnO NPs が存在するときのみ、細胞周期を進める効果を発揮している。

C3. CNTs による細胞の分子応答

A549 細胞の培養時間と CNTs の毒性の関係について調べた。A549 細胞を 8000 cells/cm² の密度で播種し、4 時間、24 時間、48 時間、および 72 時間、前培養した後、CNTs を 20-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように添加した。添加して 24 時間後に、WST assay によって細胞毒性を評価した(図 5)。4 時間および 24 時間前培養した細胞を SWCNT で曝露すると、60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ までは、濃度依存的に細胞毒性が大きくなったが、細胞の前培養時間の影響は、それほど大きくはなかった。48 時間前培養した細胞に SWCNT を曝露させると、やはり濃度依存的な細胞毒性が観察されたが、毒性の程度は、4 時間および 24 時間前培養した細胞に比べて小さかった。72 時間前培養した細胞では、SWCNT の毒性の影響は小さく、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でさえ、cell viability は 80% 以上であった。MWCNT の A549 細胞に対する毒性も、SWCNT と同様の傾向を

示した。4 時間および 24 時間前培養した細胞を MWCNT で曝露すると、40 $\mu\text{g/ml}$ までは、濃度依存的に細胞毒性が大きくなったが、これらの前培養時間による細胞毒性の差は観察されなかった。48 時間および 72 時間前培養した細胞も、MWCNT の細胞毒性は、濃度依存的であり、前培養時間が長くなるにしたがって毒性の程度は低くなった。すべての条件において、CNTs に対する曝露時間は 24 時間で一定であったので、この結果は、予め長時間培養した細胞ほど、CNTs の細胞毒性に対する感受性は低くなることを示している。

CNTs の細胞毒性は、合成および精製の時に混入した不純物に起因するという報告がある。本研究で使用した CNTs の毒性が不純物であるかどうかを調べるために、培地中に CNTs を 20-100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 24 時間浸漬した後、その培地から 150,000 g の遠心分離によって CNTs を除去した上澄みを調製した。新鮮培地で A549 細胞を前培養し、24 時間後に、この CNTs を 24 時間浸漬した上澄み培地に交換し、さらに 24 時間培養して WST assay を行った(図 6)。その結果、いずれの CNTs 濃度で浸漬した上澄み培地においても、細胞毒性は観察されなかった。したがって、CNTs の細胞毒性は、不純物の溶出によるものではないことが示唆された。4 時間前培養した細胞に SWCNTs および MWCNTs をそれぞれ 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加し、24 時間後に RNA を回収して DNA マイクロアレイにより網羅的な遺伝子発現解析を行い、GO 解析により変動する細胞機能の抽出を試みたが、有意な GO カテゴリーは見出せなかった。このことから、CNTs による毒性は分子レベルに影響はなく、細胞増殖を遅延させることに起因すると考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表

1.1 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)

1.2 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)

1.3 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)

1.4 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)

1.5 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)

1.6 Xu M., Li J., Hanagata N., Su H., Chen H., Fujita D. Challenge to assess the toxic contribution of metal cation released from nanomaterials for nanotoxicity: a case of ZnO nanoparticles. Nanoscale 5: 4763-4769 (2013)

1.7 Hanagata N. Biological interpretation of the in vitro assessment of nanotoxicity. Nano Biomedicine 5: 1-10 (2013)

1.8 Zang 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)

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表 1. DNA マイクロアレイおよび qPCR での遺伝子発現量比の変化

	Fold-change*					
	CuO-NP (25µg/ml)		Cu released from CuO-NPs (about 15 µg/ml)		CuCl ₂ (30µg/ml)	CuCl ₂ (60µg/ml)
	DNA microarray	qPCR	DNA microarray	qPCR	qPCR	qPCR
GADD45A	0.24	0.55	-0.76	0.68	0.14	1.07
GADD45B	2.96	3.00	-0.02	0.30	-0.42	1.52
GADD45G	3.59	3.22	NR	0.61	0.38	1.70
PCNA	-1.37	-0.87	NR	-0.28	-0.05	-0.23
CDC2	-1.41	-1.48	-1.16	-1.08	-1.40	-1.22
CCNB1	-1.74	-2.14	-1.33	-1.51	-1.27	-1.46
CDKN1A	0.30	0.78	-0.08	0.63	-0.07	-0.49
FOS	4.48	1.06	ND	-0.14	0.37	0.61
FOSB	5.70	3.97	ND	0.68	0.57	3.43
ATF3	4.22	1.23	ND	-0.01	0.07	1.14
JDP2	1.13	-0.67	ND	-0.19	-0.36	-0.41
ATR	-1.11	-0.83	-0.20	-0.48	-0.33	-0.51
TP53	ND	-1.10	ND	-1.12	-0.04	0.15
NR4A1	5.28	2.82	2.71	1.25	0.89	2.09
NR4A2	NR	-1.12	NR	-0.96	0.07	0.33
NR4A3	3.06	1.08	NR	0.94	1.55	2.96
AURKA	-1.21	-1.62	-0.91	-1.34	-0.59	-1.12
AURKB	-1.13	-1.76	-0.81	-1.18	-0.96	-1.37
TPX2	-1.25	-2.13	-1.17	-1.63	-1.16	-2.11

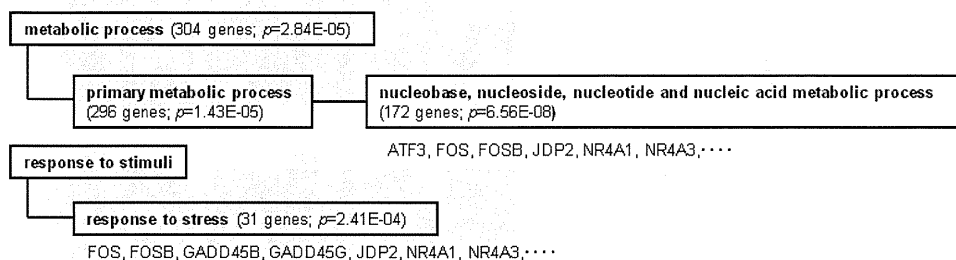
*

NR: Not reproducible ND: Not detected

表 2. 細胞を 3.6 mM CaCl₂ を含む培地で培養したときに発現量が増加する遺伝子によって変化する上位 10 位までの GO カテゴリー

ZnO NPs =25 µg/ml			ZnO NPs =100 µg/ml		
GO ID	GO term	p-value	GO ID	GO term	p-value
GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle	8.52E-44	GO:0022403	Cell cycle phase	5.10E-89
GO:0000280	Nuclear division	1.48E-43	GO:0000278	Mitotic cell cycle	2.23E-79
GO:0007067	Mitosis	1.48E-43	GO:0000279	M phase	3.81E-68
GO:0022403	Cell cycle phase	1.55E-43	GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle	2.71E-64
GO:0000278	Mitotic cell cycle	6.83E-43	GO:0000280	Nuclear division	3.24E-64
GO:0000279	M phase	3.26E-42	GO:0007067	Mitosis	3.24E-64
GO:0022402	Cell cycle process	7.95E-42	GO:0048285	Organelle fission	4.32E-62
GO:0048285	Organelle fission	2.41E-41	GO:0006259	DNA metabolic process	2.56E-51
GO:0007049	Cell cycle	2.43E-41	GO:0051301	Cell division	2.65E-50
GO:0051301	Cell division	2.11E-32	GO:0006260	DNA replication	5.72E-40

a. Up-regulated genes



b. Down-regulated genes

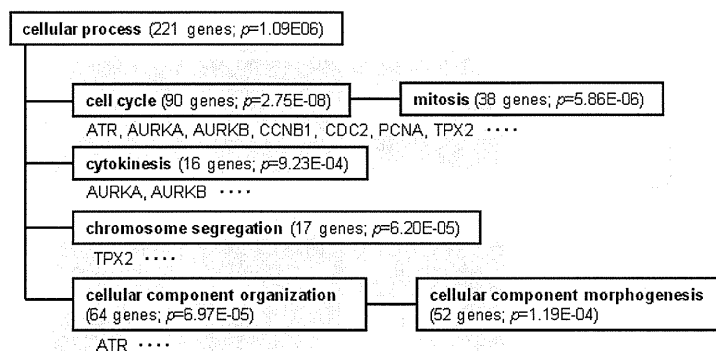


図 1. CuO NPs により up- および down-regulate した遺伝子の GO category への分類。CuO NPs で 24 時間曝露した細胞において、コントロール細胞よりも 2 倍以上発現量に変化した遺伝子を GO category へ分類し、 $p < 0.001$ の category を機能変化のあった category とした。(a) CuO NPs で up-regulate した遺伝子により変化すると推定される categories。カッコ内の数字はその category に分類された CuO NPs によって up-regulate した遺伝子数を表す。(b) CuO NPs で down-regulate した遺伝子により変化すると推定される categories。それぞれの category の下に、その category に分類された代表的な遺伝子名を記した。

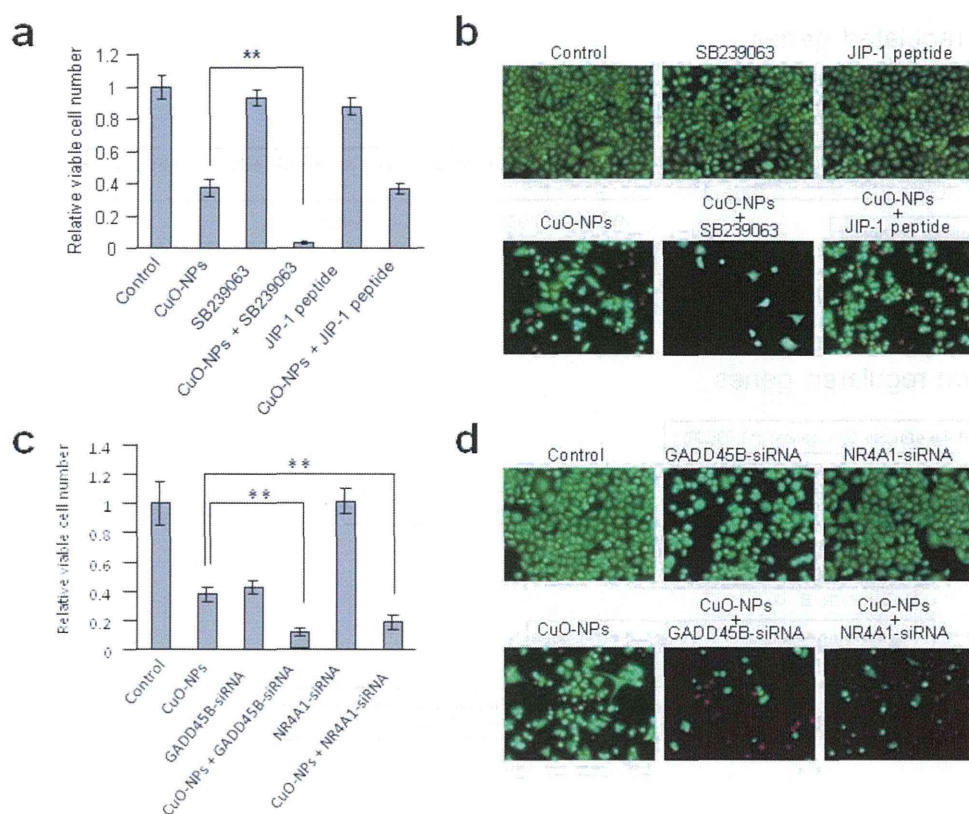


図 2. MAPK pathways の遮断による生細胞数の変化。A549 細胞を 42 時間培養した後、p38 および JNK の阻害剤、あるいは siRNA を添加。その 6 時間後に CuO NPs を 25 μ g/ml になるように添加して 24 時間培養したときの生細胞数をカウントし、コントロール、CuO NPs のみ添加および阻害剤のみ添加したときの生細胞数と比較した。(a) p38 および JNK の阻害剤である SB239063 および JIP-1 peptide の生細胞数に及ぼす影響。p38 の阻害剤である SB239063 は、CuO NPs の毒性をさらに大きくした。n=3. **, P<0.05. (b) Calcein-AM および PI の二重染色。SB239063 添加後に CuO NPs に曝露すると、生細胞数は減少する。SB239063 添加後に CuO NPs に曝露した細胞の多くはディッシュから剥離した。(c) siRNA による GADD45B および NR4A1 ノックダウンの影響。これらの遺伝子発現をノックダウンすると CuO NPs の毒性効果が増大した。n=3. **, P<0.05. それぞれの遺伝子のノックダウン効率は Supplementary Fig. 4 に示されている。(d) Calcein-AM および PI の二重染色。GADD45B および NR4A1 のノックダウン後に CuO NPs に曝露すると、生細胞数は減少する。ディッシュから遊離する死細胞がいるため、PI 染色は死細胞数を正確には表わしていない。

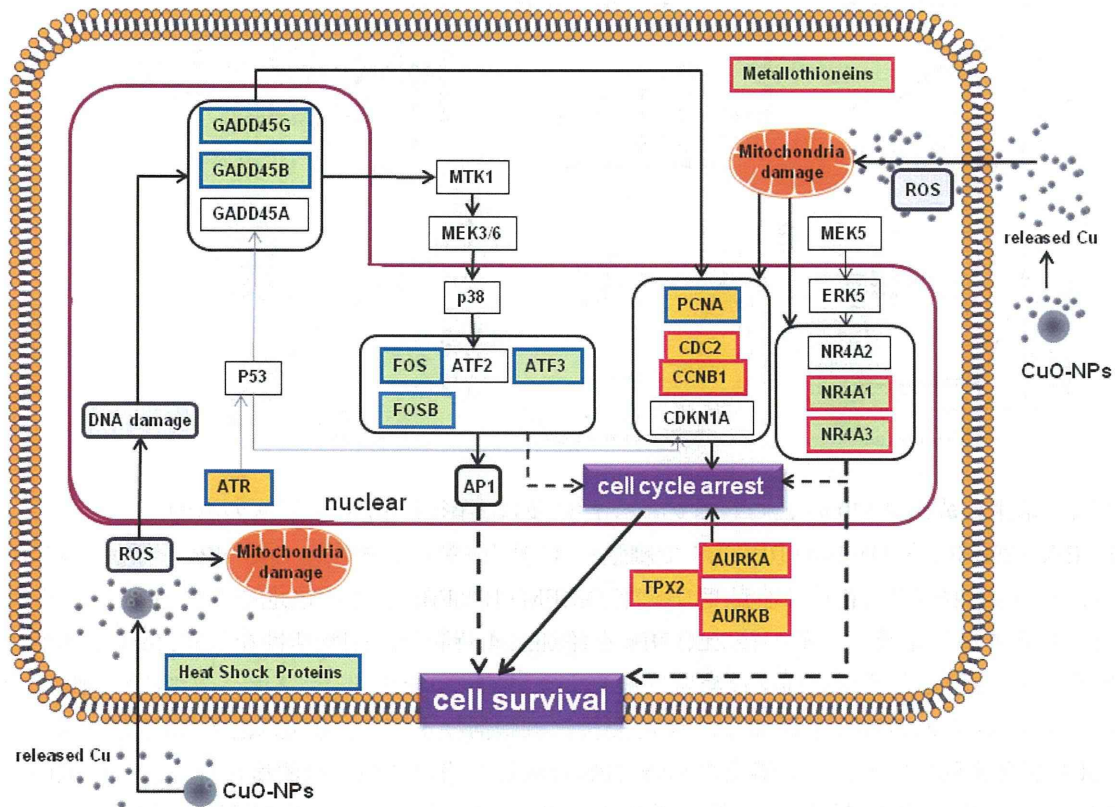


図 3. CuO NPs に対する細胞の分子応答モデル。赤枠は溶出 Cu で誘導された遺伝子を、青枠は CuO NPs で誘導された遺伝子を、また、枠内がオレンジ色の遺伝子は down-regulation を、枠内が黄緑色の遺伝子は up-regulation を表す。黒の実線は CuO NPs および溶出 Cu で誘導される pathways を、点線は推測される pathways を、灰色の線は CuO NPs では誘導されない pathways を表す。CuO NPs の曝露により生存した細胞は、PCNA、CDC2、CCNB1、TPX2、AURKA および AURKB の発現を抑制することによって cell cycle arrest を導き、また NR4A1、NR4A3、GADD45B および GADD45G の発現を誘導することによって細胞死を回避する。CDC2、CCNB1、TPX2、AURKA および AURKB の発現抑制は、培地中に溶出した Cu による。また、NR4A1 および NR4A3 の発現誘導も、培地中に溶出した Cu によってもたらされる。PCNA の発現抑制は、CuO NPs そのものに起因する。GADD45B および GADD45G の発現は p38 pathway を活性化し、細胞死を回避する。さらに CuO NPs は FOS、FOSB、ATF3 を up-regulate するが、これらは p38 経路によって活性化した ATF2 とダイマーを形成し AP-1 となる。p38 pathway の活性化および NR4A1/3 の up-regulation が cell cycle arrest を介して cell survival に関与するのかどうかは不明である。GADD45B および GADD45G の発現誘導は、細胞内に取り込まれた CuO NPs から溶出した Cu に起因していると考えられる。

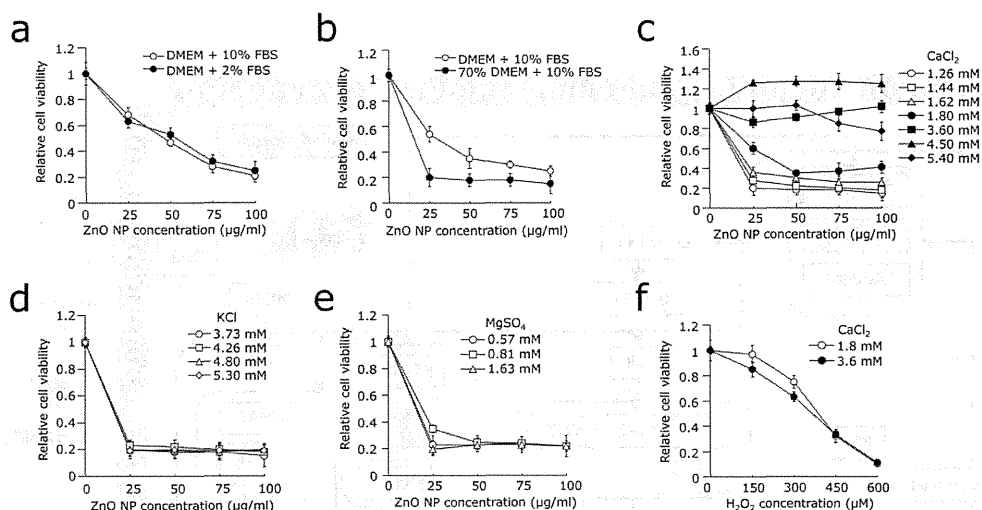


図4 培地組成が A549 の ZnO NPs の感受性に及ぼす影響. (a) FBS 濃度の影響.

DMEM+2%FBS と DMEM+10%FBS で細胞を 4 時間培養し、その後 ZnO NPs を添加. 24 時間後に細胞活性を測定. (b) 培地濃度の影響. DMEM+10%FBS とこの培地を 70%希釈した培地で細胞を 4 時間培養し、その後 ZnO NPs を添加. 24 時間後に細胞活性を測定. (c) Ca 濃度の影響. 70%希釈した培地に様々な濃度になるように CaCl_2 を添加し、それらの培地で細胞を培養. 4 時間後に ZnO NPs を添加し、24 時間後に細胞活性を測定. 70%DMEM には 1.26 mM の CaCl_2 が含まれている. (d) K 濃度の影響. 70%希釈した培地に様々な濃度になるように KCl 添加し、それらの培地で細胞を培養. 4 時間後に ZnO NPs を添加し、24 時間後に細胞活性を測定. 70%DMEM には 3.73 mM の KCl が含まれている. (e) Mg 濃度の影響. 70%希釈した培地に様々な濃度になるように MgSO_4 を添加し、それらの培地で細胞を培養. 4 時間後に ZnO NPs を添加し、24 時間後に細胞活性を測定. 70%DMEM には 0.57 mM の MgSO_4 が含まれている. (f) Ca が H_2O_2 の毒性に及ぼす影響. 70%希釈した培地に 1.8 mM および 3.6 mM CaCl_2 を添加し、それらの培地で細胞を培養. 4 時間後に H_2O_2 を添加し、24 時間後に細胞活性を測定.

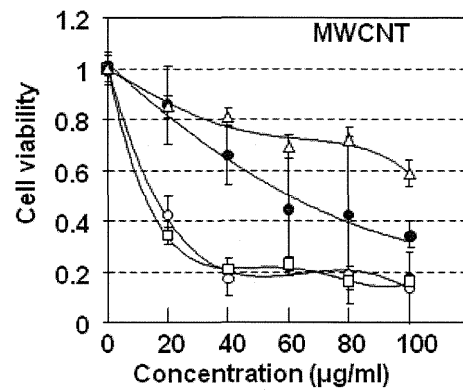
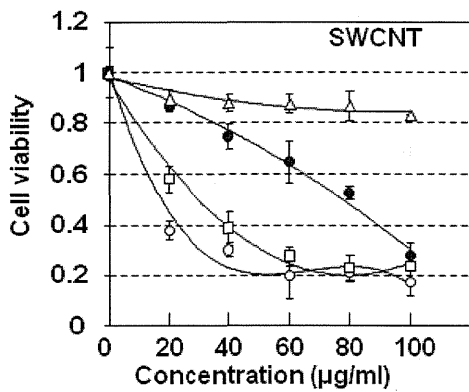


図5 前培養時間による SWCNT および MWCNT の細胞毒性の違い. A549 細胞を DMEM に 5000 cells/cm² の密度で播種し、4 時間 (○)、24 時間 (□)、48 時間 (●) および 72 時間 (△) 前培養した。これら前培養時間が異なる細胞に SWCNT および MWCNT を 20-100 µg/ml の濃度になるように添加し、さらに 24 時間培養後、細胞毒性を WST assay により求めた。

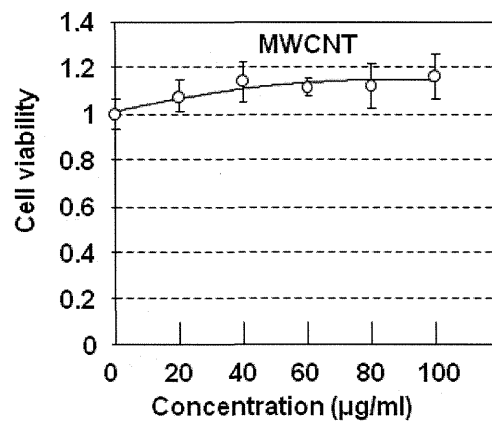
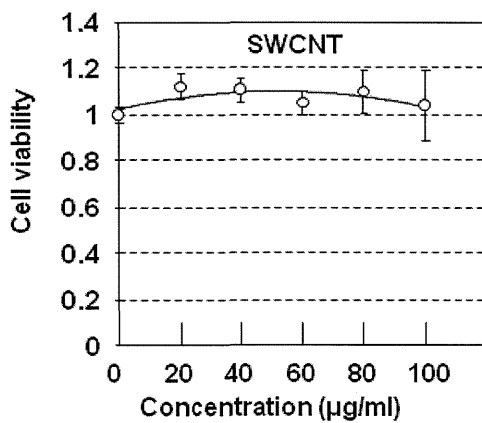


図6 SWCNT および MWCNT を様々濃度で DMEM に添加し、37°C で 24 時間インキュベーション後、遠心分離した。遠心分離で得られた上澄みを、A549 を 4 時間前培養した培地と交換し、さらに 24 培養後、WST assay により細胞毒性を求めた。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究総合報告書

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

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

ナノマテリアルは産業界において様々な用途に使用されているものの、ナノマテリアルの安全性はまだ十分には解明されていない。近年、ナノマテリアル単独の毒性は徐々に明らかになりつつあるが、ナノマテリアルと他の化学物質との相互作用は不明である。ここではじめに、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 SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 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 SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 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、 SiO_2 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 SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 ナノ粒子のどちらにも CuCl_2 が結合し、それらの結合量に差は認められなかった。このように、 SiO_2 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、 $100 \mu\text{g/ml}$ 以下の濃度の SiO_2 ナノ粒子は細胞毒性を示さなかったが、 $25 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度の TiO_2 ナノ粒子は弱い細胞毒性を示した。そこで、 $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度の SiO_2 ナノ粒子並びに $10 \mu\text{g/ml}$ 及び $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度の TiO_2 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。 SiO_2 ナノ粒子が共存すると、 AlCl_3 、 CuCl 及び CuCl_2 の細胞毒性強度は増強した。一方、 TiO_2 ナノ粒子が共存しても、 AlCl_3 、 CrCl_3 、 CuCl 、 CuCl_2 、 FeCl_2 、 FeCl_3 、 NiCl_2 及び ZnCl_2 の細胞毒性強度は変化しなかった。また、 SiO_2 ナノ粒子共存下で CuCl 及び CuCl_2 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、 TiO_2 ナノ粒子共存下で CuCl 、 CuCl_2 及び ZnCl_2 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。これらのことから、 SiO_2 ナノ粒子は、共存する一部の金属塩化物の細胞内取り込み量を増加させることによって、細胞毒性を増強させることが明らかになった。

A. 研究目的

ナノマテリアルは産業界において様々な

用途に使用されているばかりか、一般消費者向け製品にも幅広く使用されている。し

かしながら、これまでにナノマテリアルの *in vivo* 及び *in vitro* 毒性試験が実施されているものの、ナノマテリアルの安全性はまだ十分には解明されていないのが現状である。近年、一部のナノマテリアルについて、化学組成、粒子サイズ、物性等に依存した生体影響が確認され、ナノマテリアル単独の毒性は徐々に明らかになりつつある¹。しかしながら、ナノマテリアルと他の化学物質との相互作用による生体影響は不明である。そこで、本研究では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。

ナノマテリアルは化学組成が同じでも、一次粒子及び二次粒子のサイズやその分布、結晶構造、形態、比表面積、表面電荷、溶解度、分散性、凝結／凝集状態などの物理化学的性質が異なることによって生体影響が変化する可能性が指摘されている¹。そのため、同一のナノマテリアルを安全性試験に用いても、曝露条件によって試験の結果が異なることが容易に予測できる。したがって、ナノマテリアルの生体影響を評価するための試験では、ナノマテリアルの物理化学的性質を正確に把握することが必須である²。そこではじめに、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、ナノ粒子を固定化した水晶発振子マイクロバラン (QCM) センサーを作製し、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。

B. 研究方法

1. 試料

二酸化ケイ素 (SiO₂) ナノ粒子 (一次平均粒子径 25 nm) 及び二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子 (一次平均粒子径 36 nm) の 10% 水懸濁液を CIK ナノテック株式会社から入手した。なお、これらのナノ粒子水懸濁液は、分散剤その他の添加物等を含まない。

金属塩化物として、塩化アルミニウム (AlCl₃)、塩化クロム (III) (CrCl₃)、塩化銅 (I) (CuCl)、塩化銅 (II) (CuCl₂)、塩化鉄 (II) (FeCl₂)、塩化鉄 (III) (FeCl₃)、塩化ニッケル (II) (NiCl₂) 及び塩化亜鉛 (ZnCl₂) (いずれも和光純薬工業株式会社) を使用した。

2. 粒子径及びゼータ電位

金属塩化物共存下及び非共存下におけるナノ粒子の流体力学的粒子径及びゼータ電位は、ゼータ電位・粒径測定システム ELSZ-2 (大塚電子株式会社) を用いて、動的光散乱法及び電気泳動光散乱法 (レーザードップラー法) により測定した。なお、粒子径測定には粒子径セルユニットを使用し、ゼータ電位測定にはゼータ電位標準セルユニット又はゼータ電位微量ディスプレイセルユニットを使用した。

3. 吸着挙動

電極表面にナノ粒子を固定化した QCM センサーを作製した。作製したナノ粒子固定化 QCM センサーセルを分子間相互作用解析装置 AFFINIX QNμ (株式会社イニシウム) に設置した。QCM センサーセルに超純水 490 μL を加えて安定した後、500 mmol/L の CuCl₂ 水溶液を 10 μL ずつ添加し、水晶振動子の共振振動数を 1 sec ごとに測定した。データ解析ソフトウェア AQUA Version 2.0 (株式会社イニシウム)

を用いて、解離定数 (K_d) 及び結合定数 (K_a) を算出した³。

4. 細胞毒性試験

細胞毒性は、ISO 10993-5:2009; Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity に準じて、コロニー形成法を用いて評価した。細胞株は、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞由来 V79 細胞 (JCRB 0603) を使用した。培地は、牛胎児血清 (10%)、ペニシリン (100 U/ml) 及びストレプトマイシン (100 µg/ml) を含有する Earle 組成の Eagle's MEM 培地 (Invitrogen Corp.) を使用した。24 ウェルマルチプレート各ウェルに 50 個の V79 細胞を播種した。24 時間後に培地を捨て、予め試料を溶解又は懸濁させた培地 1 ml を各ウェルに加え、6 日間静置培養した。細胞を固定し、コロニーをギムザ染色した。ウェル内に形成したコロニー数を数え、対照群のコロニー数に対する割合 (%) を求めた。

5. 細胞内取り込み量の測定

ナノ粒子共存下及び非共存下において CuCl、CuCl₂ 及び ZnCl₂ を暴露した細胞について、銅及び亜鉛の細胞内取り込み量を測定した。細胞毒性試験と同様に、V79 細胞及び 10% 牛胎児血清を含有する MEM 培地を使用した。6 ウェルマルチプレート各ウェルに 5×10^5 個の V79 細胞を播種した。48 時間後、培地を予め試料を溶解又は懸濁させた培地 2 ml と交換した。24 時間及び 48 時間静置培養した後、トリプシン処理にて細胞を回収し、細胞数を数えた。回収した細胞塊に 2% 塩酸を加え、60°C で 2 時間加温し、細胞内の銅及び亜鉛を抽出した。抽出液中の銅及び亜鉛の濃度は、オクタポールリアクションシステムを搭載した誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-

MS) Agilent 7500ce (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いて測定した。

6. 統計学的検定

ナノ粒子の粒子径及びゼータ電位について、一元配置分散分析及び金属塩化物非共存群を対照群とした Dunnett の多重比較を行った。ナノ粒子単独暴露の細胞毒性試験では、一元配置分散分析及び対照群との Dunnett の多重比較を行った。ナノ粒子と金属塩との同時暴露の細胞毒性試験では、二元配置分散分析及び Tukey-Kramer 法を用いて多重比較を行った。細胞内取り込み量の測定では、F 検定及び Student の t 検定を行った。いずれの検定においても有意水準は危険率 5% 未満とした。

C. 研究結果及び考察

1. 培地中の粒子径及びゼータ電位

100 µg/ml の濃度で培地に懸濁させた SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子の金属塩共存下及び非共存下における個数分布粒子径を表 1 に示した。SiO₂ ナノ粒子の第一ピークの粒子径は、AlCl₃ 及び ZnCl₂ 共存下で変化しなかったが、CuCl₂ 共存下で小さくなった。また、SiO₂ ナノ粒子の第二ピークの粒子径は、AlCl₃ 共存下で変化しなかったが、CuCl₂ 共存下で大きくなり、ZnCl₂ 共存下で小さくなった。一方、TiO₂ ナノ粒子の粒子径は、AlCl₃ 及び ZnCl₂ 共存下で変化しなかったが、CuCl₂ 共存下で大きくなった。ただし、いずれの条件でも、SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子の粒子径は、100 nm を下回った。

SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子の金属塩共存下及び非共存下におけるゼータ電位の解析値を表 2 に示した。いずれの条件でも、SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のゼータ電位は負電荷を示し、培地に含まれるリン酸イオンがナノ粒子表面に吸着してい

るためであると考えられる。また、培地中で金属塩を共存させても、 SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 ナノ粒子のゼータ電位に大きな変動は認められなかった。

2. 純水中での粒子径及びゼータ電位

金属塩化物共存下及び非共存下における SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 ナノ粒子の粒子径個数分布を図 1 に示した。どちらも金属塩化物の共存に伴う顕著な分布の差は認められなかった (図 1)。Cumulant 法により金属塩化物共存下及び非共存下における SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 ナノ粒子の平均粒子径を算出したが、金属塩化物共存群と非共存群との間に有意な差は認められなかった (表 3)。純水中においても SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 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 (表 1)。したがって、1 mmol/L 程度の金属塩化物の共存は、ナノ粒子の粒子径に影響しないと考えられる。

金属塩化物共存下及び非共存下における SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 ナノ粒子のゼータ電位の分布を図 2 に示した。 SiO_2 ナノ粒子において、金属塩化物の共存に伴う顕著な分布の差が認められた (図 2)。さらに、いずれの金属塩化物においても、金属塩化物共存群と非共存群との間に SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 ナノ粒子のゼータ電位に有意な差が認められた (表 4)。 SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 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。それらのゼータ電位の変化量は、 TiO_2 ナノ粒子に比べて、 SiO_2 ナノ粒子の方が大きかった。さらに、 TiO_2 ナノ粒子では共存前後とも正の値であったのに対して、 SiO_2 ナノ粒子では共存前の負の値から共存に伴って正の値に反転していた (表 4)。このように SiO_2 ナノ粒子は、金属塩化物との共存によってゼータ電位が負から正への反転を

伴う大きな変化が認められた。

3. 吸着挙動

SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 ナノ粒子を固定化した QCM センサーセルに CuCl_2 水溶液を添加した際の QCM センサーグラムを図 3 に示した。 SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 ナノ粒子のどちらも添加直後から QCM センサーの振動数が減少し、 CuCl_2 がどちらのナノ粒子にも結合することが確認され、 SiO_2 ナノ粒子と TiO_2 ナノ粒子との間に CuCl_2 の結合量に顕著な差は認められなかった (図 3)。さらに、 SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 ナノ粒子に結合する CuCl_2 の解離定数 (K_d) 及び結合定数 (K_a) を表 5 に示した。ゼータ電位の異なる SiO_2 ナノ粒子と TiO_2 ナノ粒子との間で CuCl_2 の結合量に差がなかったのは、粒子径及びゼータ電位の測定時に比べて、 CuCl_2 の濃度が高かったことが影響していた可能性が考えられる。

4. ナノ粒子の細胞毒性

SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 ナノ粒子の単独暴露における V79 細胞のコロニー形成率を図 4 に示した。 SiO_2 ナノ粒子は、100 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度において、対照群と比べてコロニー形成率に変化はなかった。一方、 TiO_2 ナノ粒子は、50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度において、対照群と比べてコロニー形成率が有意に低下し、25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においてコロニー形成率の低下傾向を示した。以上の結果から、 SiO_2 ナノ粒子には細胞毒性が認められず、 TiO_2 ナノ粒子には弱い細胞毒性が認められた。そこで、次のナノ粒子と金属塩との共存実験におけるナノ粒子の暴露濃度は、細胞毒性を示さなかった SiO_2 ナノ粒子については、最高濃度の 100 $\mu\text{g/ml}$ とした。また、細胞毒性を示した TiO_2 ナノ粒子については、コロニー形成率が低下しなかった 10 $\mu\text{g/ml}$ 及びコロニー形成率が

61% に有意に低下した 100 µg/ml とした。

5. ナノ粒子共存下における金属塩化物の細胞毒性

ナノ粒子共存下における AlCl₃ 及び CuCl のコロニー形成率を図 5 に、CuCl₂ 及び ZnCl₂ のコロニー形成率を図 6 示した。100 µg/ml の SiO₂ ナノ粒子共存下で AlCl₃、CuCl 及び CuCl₂ のコロニー形成率は有意に低下し、10 µg/ml 及び 100 µg/ml の TiO₂ ナノ粒子共存下で AlCl₃、CuCl 及び CuCl₂ のコロニー形成率は変化しなかった (図 5 及び図 6 左)。一方、100 µg/ml の SiO₂ ナノ粒子並びに 10 µg/ml 及び 100 µg/ml の TiO₂ ナノ粒子共存下で CrCl₃、FeCl₂、FeCl₃、NiCl₂ 及び ZnCl₂ (図 6 右) のコロニー形成率は変化しなかった。すなわち、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することが分かった。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いことが分かった。

6. 細胞内取り込み量

SiO₂ ナノ粒子の共存下においてコロニー形成率が低下した CuCl 及び CuCl₂ 並びに SiO₂ 及び TiO₂ ナノ粒子の共存下においてコロニー形成率が変化しなかった ZnCl₂ について、細胞内の銅及び亜鉛の取り込み量を測定した (図 7)。ナノ粒子共存下で CuCl を曝露すると、細胞内の銅濃度は、曝露 48 時間においてナノ粒子非共存群に比べて、SiO₂ ナノ粒子共存群では有意に増加し、TiO₂ ナノ粒子共存群では変わらなかった (図 7 上)。ナノ粒子共存下で CuCl₂ を曝露すると、細胞内の銅濃度は、曝露 48 時間においてナノ粒子非共存群に比べて、SiO₂ ナノ粒子共存群では有意に増加し、TiO₂ ナノ粒子共存群では変わらなかった

(図 7 中)。ナノ粒子共存下で ZnCl₂ を曝露すると、細胞内の亜鉛濃度は、曝露時間に関わらずナノ粒子非共存群と SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子共存群との間に有意な差は認められなかった (図 7 下)。これらから、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することが分かった。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いことが分かった。

D. 結論

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。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。このように、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。

ナノ粒子の単独曝露条件で、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。これらのことから、SiO₂ ナノ粒子は、共存する一部の金属塩化物の細胞内取り込み量を増加させることによって、細胞毒性を増強させることが明らかになった。

謝辞 本研究に用いた SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子の水懸濁液をご提供いただきました CIK ナノテック株式会社に深謝いたします。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 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, *日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌*, 6, 339-350 (2012)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)

- 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(2)、259-268（2014）
 - 11) 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(6)、印刷中（2014）
 - 12) 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.
 - 13) 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.
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 Technologies* (Singapore, 2011.6)
 - 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（横浜市、2011.7）
 - 3) Isama K, Kawakami T, Tsuchiya T, Matsuoka A: Osteoblast compatibility of calcium-incorporated Ti-Zr-Nb alloys, *24th European Conference on Biomaterials* (Dublin, 2011.9)
 - 4) 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* (Dublin, 2011.9)
 - 5) Isama K, Kawakami T, Matsuoka A: Adsorption behavior of ions on calcium-incorporated titanium in simulated body fluid, *The 3rd Asian Biomaterials Congress* (Busan, 2011.9)
 - 6) 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（札幌市、2012.3）
 - 7) 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* (Stockholm, 2012.6)
 - 8) 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（仙台、2012.7）

- 9) Isama K, Kawakami T, Sakai K, Miyajima A, Matsuoka A: Effect of SiO₂ and TiO₂ nanoparticles on the cytotoxicity of metal salts. European Society of Toxicology in Vitro 2012 International Conference (Lisbon, 2012.10)
 - 10) 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 (高松, 2012.11)
 - 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 (San Antonio, 2013.3)
 - 12) 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 (横浜, 2013.3)
 - 13) 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 on the Society of Toxicologic Pathology (2013.6, Portland)
 - 14) 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 SiO₂ 及び TiO₂ ナノ粒子の影響、第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013.6, 千葉市)
 - 15) Isama K, Kawakami T, Miyajima A, Matsuoka A: Effect of SiO₂ and TiO₂ nanoparticles on the cytotoxicity of metal chlorides, International Conference on Materials for Advanced Technologies (2013.7, Singapore)
 - 16) 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 SiO₂ 及び TiO₂ 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, 富山市)
 - 17) 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 年会 (2014.3, 熊本市)
 - 18) 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: 酸化金属ナノマテリアルに対する A549 細胞の細胞毒性および遺伝毒性、日本薬学会第 134 年会 (2014.3, 熊本市)
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
1. 特許取得
なし