

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究年度終了報告書

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価及びリスク低減化に関する研究

研究代表者 渡邊 昌俊 横浜国立大学大学院 工学研究院 教授

本研究は、ナノマテリアルの適切な物性解析、新規 *in vitro* 評価系の確立、細胞内応答機構等の解析で従来の評価系との比較検討、新たなマーカーの確立、適切な動物実験等による妥当性の検証を目的とする。また、本研究では、消費者が日常生活で曝露している、ある程度の安全性の知見が集積されているナノマテリアルである金・銀・酸化チタン・酸化亜鉛・酸化鉄等の金属ナノ粒子を対象とする。平成27年度（3年計画の1年目）は、次のような成果を得た。ナノマテリアルの毒性評価において、ナノ粒子の物理化学的性状および形状・表面修飾は重要な因子である。異なる1次粒子径のNi NPsを同程度の2次粒子径の懸濁液を作成に成功し、今後、2次粒子径の細胞毒性における役割の解明への準備を整えた。新規 *in vitro* リスク評価系として、*in vivo* 実験 (*gpt delta mouse*)-DNAアダクトーム-共培養系の解析の流れが出来、その有効性について解析する準備ができた。これに切片担体培養系(A549細胞あるいはGDL1細胞)を新たに加える準備中である。一方、2種類の再構成ヒト皮膚培養系の選定が終わり、合成に成功したAu NPsの再構成ヒト皮膚培養系への応用を始めた。これにより、ナノマテリアルの皮膚への影響を再構成ヒト皮膚培養系で解析し、*in vivo*系のデータで妥当性を評価する予定である。非修飾/カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子のA549細胞への曝露実験で、網羅的遺伝子発現解析を行い、miRNAのクラスタリング解析から、ナノマテリアルによる特徴的なmiRNA変動、すなわちマーカーとしての可能性を認めた。また、カルボキシル基修飾の有無により、細胞への取り込みやNFκB axisへの影響を明らかにした（概略図）。

研究分担者：

林 幸彦 名古屋大学未来材料・システム研究所 助教
戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所・発がんシステム研究分野 ユニット長
中江 大 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 教授
宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 分子毒理学（医療機器部）室長
花方 信孝 国立研究開発法人物質・材料研究開発機構 生物工学（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 衛生化学（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
小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
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
煙山 紀子 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 助教

A. 研究目的

ナノマテリアルの社会的受容の実現には、十分なリスク評価を行い、仮にリスクがある場合、ベネフィット・リスクバランスを考慮した適切なリスク低減が必要である。また、動物愛護の3Rの観点から、動物実験

代替法の開発も必要である。本研究は、ナノマテリアルの物性解析後、新規 *in vitro* 評価系の確立、細胞内応答機構等の解析で従来の評価系との比較検討、新たなマーカーの確立、適切な動物実験等による妥当性の検証を目的とする。

ナノマテリアルの気道毒性の *in vitro* リスク評価は主として肺胞上皮由来細胞の単独培養系によるが、当該毒性の発現機構には肺胞マクロファージの貪食と液性因子放出の関与が示唆されている (*Part.Fibre.Toxicol.*6(1),23, 2009; *Genes Environ.*,33,14-20,2011; *Nanotoxicology*,7,452-61, 2013)。本研究グループは、マクロファージ由来細胞 (RAW264) との共培養で、肺胞上皮由来細胞 (A549) に対するカオリンの遺伝毒性の増強を確認している。従って、本研究グループは、上皮細胞単独の *in vitro* 評価法が不十分であり、生体模倣の新規 *in vitro* 試験系の構築の必要性を考えた。本研究は、ナノマテリアルの新規 *in vitro* リスク評価系及びマーカーの確立とナノマテリアルリスク低減方策の策定を目指す。

具体的には、(1)ナノマテリアルのリスク評価のための新規 *in vitro* 評価系およびマーカーの開発(ナノマテリアルの DNA 損傷性新規評価系およびマーカーの開発、共培養及び 3D モデルを用いたナノマテリアルの気道毒性新規評価系の開発、共培養及び 3D モデルを用いたナノマテリアルの皮膚毒性新規評価系の開発)、(2)従来の *in vitro* リスク評価系との比較検討、*in vivo* 動物実験による当該リスク評価系の検証、(3)それらを用いたナノマテリアルのリスク評価、(4)当該評価結果に基づくリスク低減化方策の考案と検証を柱とする。

平成 27 年度、主として各種細胞の共培養系、各種細胞と組織切片の共培養系(切片担体培養系)、再構成ヒト皮膚培養系 (3D-skin model) 構築の基礎的解析および microRNA 等の網羅的解析によるマーカーの抽出を行

った。

以下に各分担研究の成果の概要を記載する。

B. 研究方法

1)ナノマテリアルの作成及びキャラクタリゼーション(林) :

本年度は、金(Au)、銀(Ag)ナノ粒子(NPs)の合成および評価を行った。HAuCl₄ 水溶液と臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) 水溶液を攪拌混合し、冷却した NaBH₄ 水溶液を加え、遠心分離、水への再分散を繰り返し、Au NPs を合成した。クエン酸三ナトリウム水溶液に AgNO₃ 水溶液を攪拌混合し、冷却した NaBH₄ 水溶液を加え、Ag NPs を合成した。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察および動的光散乱 (DLS) にて粒径分布を評価した。

2)細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析(河上) :

異なる一次粒子径の酸化ニッケル (II)(NiO) NPs より同程度の二次粒子径の懸濁液の作成と評価を行った。NiO NPs (一次粒子径: 100 nm) および Ni NPs (一次粒子径: 5 ~ 20 nm) に Tween 80 含む Milli-Q 水を加え、サイズの異なる 3 種類のジルコニアボールを用いて、遊星ボールミル型粉碎機で懸濁液を調製した。粉碎後、10 mg/mL (または 1 mg/mL) の懸濁原液を作成した。懸濁原液を 10 % FBS-MEM で、毒性試験用ナノ粒子懸濁液を調製した。これらの懸濁原液について、平均粒子径 (流体力学粒径) および粒径分布を DLS にて測定した。

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(宮島) :

本年度は、酸化亜鉛(ZnO) NPs の懸濁液中の特性および細胞毒性・免疫応答解析を行った。酸化亜鉛 ZnO (Sigma-Aldrich と Alfa Aesar)の懸濁液中での粒径分布、ゼータ電位は、DLS により測定した。THP-1 細胞における細胞毒性は、ATP 法により評価した。Interleukin-8 (IL-8) 、 Tumor Necrosis

Factor- α (TNF- α)の測定は、ELISA Kit により測定した。THP-1 細胞の活性化マーカー CD86, 54 の測定は、FITC ラベルされた 3 種類の抗体にて細胞を染色後、Flow Cytometry により解析した。

4) ナノマテリアルによるDNAの直接及び間接的損傷性評価系の構築および共培養系及び3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築(戸塚)：

ナノマテリアルによるDNAの直接及び間接的損傷性評価系の構築：ICRマウスに非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)懸濁液の経気道的曝露実験を行い、摘出した肺組織の消化後、水-メタノールの溶媒系を用いLC-QToF-MSでDNA付加体を網羅的に分析した。得られたデータの主成分解析から複数の付加体が Fe_3O_4 NPs投与群に特徴的なものとしてスクリーニングされ、これら付加体の同定は既に構築済みのDNA付加体リストとの比較により行った。

共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築：GDL1 と RAW264 を共培養し、 Fe_3O_4 NPs を各細胞単独に、あるいは両細胞に 24 時間曝露した後、*gpt* 遺伝子の変異を解析した。

5) *in vivo*動物実験による新規*in vitro*リスク評価系の有効性の検証(中江)：

本年度は、ナノ粒子の皮膚毒性に関する新規*in vitro*スクリーニング評価系を開発に着手した。市販の再構成ヒト皮膚培養系について情報収集・精査後、本研究で使用すべき再構成ヒト皮膚培養系を選定した。また、LabCyte EPIモデルを用い、Au NPs各濃度で24時間曝露し、細胞毒性をLDH assayで解析した。

6) ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索(花方、渡邊)：

本年度は、非修飾/カルボキシル基修飾磁

性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NPs-COOH)をA549細胞に24時間あるいは72時間曝露し、RNAを回収し、miRNA microarrayを用いて網羅的発現およびクラスター解析を行った。

7) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築およびナノマテリアルの細胞内動態の解析(渡邊)：

切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築：過去の切片担体培養の条件で、A549細胞の試行培養を行った。既に作成された凍結切片を用いて(本学動物実験取扱い委員会に過去提出済み)、担体培養を行った。細胞懸濁液の濃度を設定し、各臓器のスライドガラスを準備し、細胞を播種し、接着性と増殖性を解析した。

ナノマテリアルの細胞内動態の解析：前立腺癌細胞株DU145に対して、 Fe_3O_4 NPsと Fe_3O_4 NPs-COOHを各濃度に調整し、24時間あるいは72時間曝露を行った。その後、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、 Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NPs-COOHの細胞膜上の状態を観察した。また、Alamar Blue assayを用いて、生存率を求めた。活性酸素種(ROS)の測定はCM- H_2 DCFDAを使用した。また、Western blottingで、細胞内の基本的なシグナリングの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究グループでは、既に樹立された細胞株を用いる*in vitro*実験主体である。また、遺伝子実験において、必要とする場合は各施設の遺伝子組換え実験の安全管理規則に従い行う。ナノマテリアルの取扱いに関して、「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第0331013号)に準じて行う。次年度以降の必要とされる動物実験は、各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

1) ナノマテリアルの作成及びキャラクターゼーション：

Au NPs 濃度が 2 mg/mL の溶液を合成できた。Ag NPs 濃度が 0.02 mg/mL 以下では均一な溶液が得られたが、これ以上の濃度では Ag NPs が凝集・沈降を示した。

2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析：

作成した NiO NPs (一次粒子径: 100 nm) は、調製後速やかに凝集してしましたが、Ni NPs は、1 mg/mL では二次粒子径サイズの異なる懸濁液が調製できた。

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：

2 種類の ZnO NPs (Sigma 及び Alfa) は、一次粒子径が各 <35 nm, 40 nm、水懸濁液中 (10 mg/mL) での平均粒子径は各 66 nm, 165 nm 等と性状が異なり、血清含有培地懸濁液中での異なる二次粒径変化を認めた。THP-1 細胞に対する細胞毒性は、ZnO (Sigma) が ZnO (Alfa) より強かった。THP-1 細胞の産生サイトカイン量や CD54 の活性化も 2 種の Zn NPs で異なることが観察された。

4) ナノマテリアルによる DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築および共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築：

非投与群と比べて、Fe₃O₄ NPs 投与群においてより多くの DNA 付加体が生成されていた。PCA 解析の結果、幾つかの付加体が Fe₃O₄ NPs 投与に特徴的なものとしてスクリーニングされ、酸化ストレス及び炎症由来の付加体であるエテノ-dC(εdC) などであることが示された。

Fe₃O₄ NPs の GDL1 細胞単独曝露に比べ、RAW264 単独及び両細胞に曝露させた時の変異頻度が優位に上昇することがわかった。さらに、Fe₃O₄ NPs 曝露による変異スペクトラムの解析では、Fe₃O₄ NPs を両細胞に曝露時のスペクトルは、*gpt delta* マウスへの

Fe₃O₄ NPs 曝露時の肺の変異スペクトルに類似することを認めた。

5) *in vivo* 動物実験による新規 *in vitro* リスク評価系の有効性の検証：

2 種類の再構成ヒト皮膚培養系を用いることに決定した：POCA ヒト 3D HADA モデル (DS ファーマ・バイオメディカル；ヒト幹細胞由来のメラノサイト、ヒト・ケラチノサイト、ヒト線維芽細胞による表皮・真皮の構成)、LabCyte EPI モデル (J-TEC；ヒト正常皮膚細胞による表皮のみの構成)。Au NPs 曝露実験では、LDH assay により、最大用量でわずかな細胞死 (5%) を認めるのみであった。

6) ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索：

全 1374 個の miRNA のうち、1 つ以上のサンプルでシグナルが検出された miRNA は 118 個あった。これらについて階層型クラスタリングを行い、heat map と clustering tree を作成した。この miRNA 発現パターンの類似性から推測されたサンプルの clustering tree において、2 つの大きなグループが検出された。いずれのグループも NPs に暴露された細胞の miRNA の発現パターンが、暴露されていない細胞の発現パターンとは異なっていることや非修飾 NPs と修飾 NPs に暴露された細胞での miRNA 発現パターンは異なることを認めた。

7) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築およびナノマテリアルの細胞内動態の解析：

A549細胞の担体培養を行ったが、総じて細胞接着が悪く、その後の十分な増殖も認められなかった。

ナノマテリアルの細胞内動態の解析：
Fe₃O₄NPs , Fe₃O₄NPs-COOHのDU145細胞に対する細胞生存率は濃度依存的に減少し

たが、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曝露時には有意に低下した。また、ROS産生は $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ では濃度依存的に増加、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ は抑制されていた。AFMでは、細胞表面に付着している粒子凝集体の粒径については、非修飾、修飾粒子において顕著な違いは確認されなかった。また、細胞内の生存シグナルであるNF κ Bの発現量は、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ では抑制され、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ では増強されるのを認めた。

D. 考察

1) ナノ材料の作成及びキャラクターゼーション：

Au NPs は、本研究グループ内で供給出来るレベルであることを確認した。Ag NPs は約 2 mg/mL の銀ナノ粒子溶液を合成する必要があるため、新しい合成法を開発することになった。

2) 細胞応答に及ぼすナノ材料の物性解析：

NiO NPs について、調製方法の検討が必要と考えられた。一方、Ni NPs については、1 mg/mL では二次粒子径サイズの異なる懸濁液が調製できたが、10 mg/mL を懸濁原液の調製を検討する必要性を認めた。

3) ナノ材料の細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析：

2 種類の ZnO NPs 分散製品について、懸濁液及び培地懸濁液中での物理化学的性質を明らかにした。また、THP-1 を用いた評価系を用いた細胞毒性、免疫応答解析では、A549 細胞を用いた先行実験の結果と比較すると、両細胞株ともに ZnO(Sigma)が強い細胞毒性を示し、IL-8 産生量、CD54 発現量も共に高い結果を得た。材料の物理化学的性状の重要性を認めた。

4) ナノ材料による DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築および共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノ材料の遺伝毒性評価系の構築：

Fe_3O_4 NPs 投与により、マウス肺に炎症

及び酸化ストレスが誘発され、これにより変異原性が誘発されることが推測された。

変異頻度は RAW264 細胞の共存下で上昇することを認めた。変異スペクトル解析では、 Fe_3O_4 NPs の各細胞単独の曝露時と比べ、両細胞曝露時に *in vivo* におけるパターンと類似することを認めた。これらのことから、*in vitro* 共培養系を用いた遺伝毒性評価は生体を模倣した新たな遺伝毒性評価システムとしての有用である可能性が示された。

5) *in vivo* 動物実験による新規 *in vitro* リスク評価系の有効性の検証：

再構成ヒト皮膚培養系の選定を行い、ナノ粒子の皮膚浸潤を病理組織学的および ICP 測定を準備する段階とした。

6) ナノ材料曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索：

カルボキシル基による修飾の有無が、miRNA の発現変動に最も大きな影響を与える因子であることがわかった。また、 Fe_3O_4 NPs のカルボキシル基修飾の有無、暴露時間、および暴露濃度の 3 つの条件に基づく miRNA のクラスタリングから、特徴的な発現パターンを示す 4 つのクラスターを抽出した。これらの結果より、ナノ材料による特徴的な miRNA 変動、すなわちマーカーとしての可能性を認めた。

8) 切片担体培養系を用いたナノ材料のリスク評価系の構築およびナノ材料の細胞内動態の解析：

A549細胞の細胞接着不良および十分な増殖が認められなかった原因は、担体の劣化が考えられ、次年度に新たに申請後に、新しい担体を作成する予定である。

細胞の種類によりNPsの取り込まれる状況は異なり、またNPsの表面修飾によっても異なることを明らかにした。一方、取

り込まれたNPsのNFκB axisへの影響を認めた。

E. 結論

ナノ材料の毒性評価において、ナノ粒子の物理化学的性状および形状・表面修飾は重要な因子である。また、*in vitro*実験系での2次粒子径あるいはコロナの形成等も重要な因子である。本研究グループにおいて、培養液中などにおいて粒径分布、ゼータ電位の基礎的なデータを収集した。異なる1次粒子径のNi NPsを同程度の2次粒子径の懸濁液を作成に成功し、今後2次粒子径の細胞毒性における役割の解明への準備を整えた。新規*in vitro*リスク評価系として、*in vivo* 実験 (*gpt delta* mouse)-DNAアダクトーム-共培養系の解析の流れが出来、その有効性について解析する準備ができた。これに切片担体培養系(A549細胞あるいはGDL1細胞)を新たに加える準備中である。一方、2種類の再構成ヒト皮膚培養系の選定が終わり、合成に成功したAu NPsの再構成ヒト皮膚培養系への応用を始めた。これにより、ナノ材料の皮膚への影響を再構成ヒト皮膚培養系で解析し、*in vivo*系のデータで妥当性を評価する予定である。非修飾/カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子のA549細胞への曝露実験で、網羅的遺伝子発現解析を行い、miRNAのクラスタリング解析から、ナノ材料による特徴的なmiRNA変動、すなわちマーカーとしての可能性を認めた。また、カルボキシル基修飾の有無により、細胞への取り込みやNFκB axisへの影響を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, Smart Ferrofluid with Quick Gel Transformation

in Tumors for MRI-Guided Local Magnetic Thermochemotherapy, *Adv. Funct. Mater.* in press.

- (2) M. Komiya, G. Fujii, S. Miyamoto, M. Takahashi, R. Ishigamori, W. Onuma, K. Ishino, Y. Totsuka, K. Fujimoto, M. Mutoh. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci.* 2015, 106(11), 1499-1505.
- (3) N. Hanagata, H. Morita, Calcium ions rescue human lung epithelial cells from the toxicity of zinc oxide nanoparticles, *J. Toxicol. Sci.*, 2015, 40(5), 625-35.
- (4) L. Xu, M. Dan, A. Shao, X. Cheng, C. Zhang, R. A. Yokel, T. Takemura, N. Hanagata, M. Niwa, D. Watanabe, Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood-brain barrier primary triple coculture model. *Int. J. Nanomed.*, 2015, 10, 6105-19.
- (5) A. Iwasaki, K. Sakai, K. Moriya, T. Sasaki, D. R. Keene, R. Akhtar, T. Miyazono, S. Yasumura, M. Watanabe, S. Morishita, T. Sakai. Molecular mechanism responsible for fibronectin-controlled alterations in tissue stiffness in advanced chronic liver fibrogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2016, 291(1), 72-88.
- (6) T. Kondo, K. Mori, M. Hachisu, T. Yamazaki, D. Okamoto, M. Watanabe, K. Gonda, H. Tada, Y. Hamada, M. Takanoto, N. Ohuchi, Y. Ichianagi. AC magnetic susceptibility and heat dissipation by Mn_{1-x}Zn_xFe₂O₄ nanoparticles for hyperthermia treatment. *J. Appl. Phys.*, 2015, 117, 17D157.

- (7) Y. Ito, H. Ishiguro, N. Kobayashi, H. Hasumi, M. Watanabe, M. Yao, H. Uemura. Adipocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*, 2015, 75 (10), 1009-19.
- (8) D. Kami, M. Toyoda, M. Watanabe, S. Gojo. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer and cell transplantation therapy. Chapter 22, 547-555, *Nano Based Drug Delivery*, 2015, IAPC-OBP.
- (9) 岩崎有由美、岡本大樹、遠藤宣弘、渡邊昌俊. 前立腺癌治療へのナノ粒子の応用. *医学のあゆみ*, 2015, 252(4), 303-8.
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 ナノ粒子の二次粒子径が細胞毒性に及ぼす影響, 第 24 回環境化学討論会, 札幌市, 2015 年 6 月.
- (2) 宮島敦子、河上強志、小森谷薫、加藤玲子、新見伸吾、伊佐間和郎. 物理化学的性質の異なる酸化亜鉛ナノマテリアルの細胞応答, 第 42 回日本毒性学会学術大会, 石川, 2015 年 6 月.
- (3) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, S. Niimi, K. Isama. Effects of zinc oxide nanomaterials on the cellular responses in THP-1 cells, 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, USA, March, 2016 (予定).
- (4) 戸塚ゆ加里、中釜斉: 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明. 第 42 回日本毒性学会学術大会、金沢、2015 年 7 月.
- (5) Y. Totsuka, Y. Lin, M. Kato, Y. Totoki, T. Shibata, Y. Matsushima, H. Nakagama. Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis), 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (6) 戸塚ゆ加里. ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索, 第 44 回日本環境変異原学会、福岡、2015 年 12 月.
- (7) 秋場望、椎崎一宏、遠藤治、三牧幸代、土原一哉、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に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響、第 44 回日本環境変異原学会、福岡、2015 年 12 月.
- (8) M. Watanabe. Application of nanoparticles in prostate cancer theranostics (Invited Lecture). International symposium on innovation in animal sciences for food security, health security and livelihood-2015, Oct.29-31, 2015, Lucknow, India.
- (9) M. Watanabe, N. Furuta, S. Hashimoto, K. Kojima, Y. Endo, T. Nittami, R. C. Sobti. Nanomedicine for prostate cancer therapy. Global Cancer Summit-2015, Nov.18-20, 2015, Bengaluru, India.
- (10) 渡邊昌俊、中野洋、白石泰三. 各種方法を用いた前立腺癌細胞株 DU145 における磁性体ナノ粒子の取り込みの解析について. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会、岐阜、2015 年 11 月.
- (11) N. Furuta, S. Hashimoto, J. Seo, K. Kojima, S. Yamaguchi, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic nanoparticles affect expression of cancer stem cell-related surface antigens in malignant cells. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (12) K. Kojima, S. Hashimoto, S. Yamaguchi, N.

Furuta, Y. Endo, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, H. Ishiguro, H. Uemura, M. Watanabe. Combined effect of carboxylated magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月.

(13) S. Hashimoto, S. Yamaguchi, K. Kojima, N. Furuta, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, M. Watanabe. Cellular effects of magnetic nanoparticles as determined by cell type and surface coating. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月.

(14) S. Yamaguchi, S. Hashimoto, N. Furuta, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Effects

of magnetic nanoparticles on doxorubicin-based chemotherapy in prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月.

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

