

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。平成28年度（3年計画の2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。異なる一次粒子径の酸化ニッケルナノ粒子を同程度の二次粒子径あるいは同程度の一次粒子径で異なる二次粒子径の懸濁液による細胞毒性への影響やナノ粒子の分散性に重要な役割を果たす分散剤の毒性を排除するナノ粒子の製造法の開発を行った。多層カーボンナノチューブに対する *in vivo* および共培養システムによる *gpt* 遺伝子を指標とした遺伝毒性試験より、*in vivo* 系のデータとの比較により共培養系の妥当性および多層カーボンナノチューブの長さに影響されない可能性がある事が認められた。さらに、3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築では、いくつかの考慮すべき点が存在するが、皮膚組織のナノ粒子侵入に対する抵抗性が認められた。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発現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が、酸化鉄ナノ粒子曝露マーカーとしての解析は検討を要する点も認めた。A549細胞の切片担体培養系の使用可能を認めた。また、酸化鉄ナノ粒子の細胞への影響は、粒子側の修飾によるROS産生の有無のみならず、細胞側の活性酸素種に対する抵抗性との複合的関わりを明らかにした。

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・予防研究分野 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 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 技術開発・共用部門 副部門長
河上 強志 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：

小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
比留間 瞳 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
美谷島 克宏 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 准教授
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、(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 28 年度、(1)毒性を有する界面活性剤を用いないナノ粒子の新規作製法及び形態変化をもたらす新規作製法の開発、(2)異なる一次粒子径のナノ粒子による同程度の二次粒子径の懸濁液の細胞毒性評価および一次粒子径が同じで二次粒子径が異なるナノ粒子の懸濁液による細胞毒性および免疫応答解析、(3)*in vivo* および共培養システムによる遺伝毒性試験、(4)3D ヒト皮膚再構成系におけるナノ粒子の表皮傷害性と表皮侵入性の解析、(5)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、(6)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)：

金(Au)、銀(Ag)ナノ粒子(NPs)の界面活性剤を使用しない作製法および酸化チタンの新しい形状の作製法の開発を行った。
hexadecyltrimethylammonium bromide

(CTAB)を用いずに塩化金酸水溶液または硝酸銀水溶液にシステインを溶解した。この溶液に氷浴で冷却した NaBH_4 水溶液を加え、超音波処理を行い、作製した。また、酸化チタンの合成では、加水分解・縮合速度や構造が異なる次の 5 つの化合物を用いて、尿素およびウレアーゼ水溶液に加え、60 以下で最長 3 日間反応させ、作製した。尿素濃度は、1.2 ~ 19.2 mg/mL とし、ウレアーゼ濃度は 5 ~ 10 mg/mL とした。

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 (NiO) NPs による同程度の二次粒子径の懸濁液の細胞毒性評価を行った。NiO NPs (Sigma、一次粒子径 < 50nm) および Ni NPs (Alfa Aesar 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。A549 細胞に 48 時間これら懸濁液を添加し、その後 MTS 法で毒性評価を行った。

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(宮島)：

一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる酸化ニッケル(NiO) NPs の懸濁液による A549、THP-1 の細胞毒性および THP-1 細胞の免疫応答解析を行った。酸化ニッケル NiO (Sigma-Aldrich)は粉碎用ジルコニアボールを用いて、二次粒子径の異なる懸濁液を作製した。MTS 法で、細胞毒性を評価した。THP-1 細胞の細胞表面マーカーの測定や培養液中のサイトカインの測定を Flow Cytometry で行った。

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) :

in vivo 遺伝毒性試験

10 週齢の雄性 *gpt delta* マウスに、繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-L; 85~200 nm, MWCNT-S; 40~70 nm)の懸濁液の気管内反復投与を行った。最終投与 2 ヶ月後にマウスを安楽死後、肺を摘出し、*gpt* 遺伝子解析に用いた。

共培養システムによる遺伝毒性試験

GDL1 細胞を播種して 24 時間培養した後、ThinCert™ を各 well に入れ、インサート内に RAW264 を播種し、24 時間培養した。MWCNT-L 及び MWCNT-S を RAW264 のみ、または RAW 264 と GDL1 の両方に 24 時間曝露させた後にトリプシン処理により GDL1 を回収し、一定期間培養した後に突然変異の解析に用いた。

gpt 遺伝子を指標とした変異原性試験

MWCNT-L 及び MWCNT-S を曝露した組織、細胞から DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングによってトランスジーン λ EG10 をファージ粒子として回収した。回収したファージを Cre 組替え酵素発現している大腸菌 YG6020 株に感染させると、 λ EG10 上にある一組の loxP 配列に挟まれた領域が Cre 組替え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後の YG6020 菌液を 6-thioguanin (6-TG) と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地に播いて 37°C で培養すると、プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TG を含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cm を含む M9 寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。

5) 3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築 (中江) :

LabCyte EPIモデル (株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) を用いた3Dヒト皮膚再構成系においてシステイン水溶液を媒体としたAu NPsおよびAg NPsの懸濁液を調整および曝露し、LDH assayにより表皮傷害性と病理組織学的に表皮侵入性について、ヒト肝細胞癌由来のHepG2細胞を用いた単層培養系において、LDH assayおよびNR assayにてAu NPsおよびAg NPsの細胞傷害性を解析した。

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):

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および機能解析(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 : A549細胞の切片担体培養の条件設定後、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の曝露実験を行った。曝露実験でのCM-H₂DCFDAの使用により活性酸素種(ROS)の発生及びAlamar Blue assayを用いて細胞生存率を測定した。

ナノマテリアルの細胞内動態および機能解析 : 前立腺癌細胞株DU145、LNCaP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、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、 Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOHの細胞内局在を観察した。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-H₂DCFDAを使用した。また、GSH-Glo™Glutathione assayを用いて、細胞内のGSHの検出、定量化を行った。

(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って行った。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)に準じて行った。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った。

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:

CTAB の代わりに低毒性アミノ酸であるシステインを用いることで 2 mg/mL の金ナノ粒子および銀ナノ粒子水分散液の作製に成功した。原料として titanium(IV)chloride を用い、ウレアゼ濃度 5.0 mg/mL、尿素濃度 9.6 mg/mL とし、アンモニア水、ドデカン、エタノール、hexadecyltrimethylammonium bromide 水溶液を混合し、超音波処理を行って作製したエマルジョン中の酸化チタンナノ粒子の合成反応は、水溶液中での反応と異なり、bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium を原料として用いた場合のみ、中空ナノ粒子が得られ、その他の原料では球状粒子が得られた。

2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析:

NiO-Sigma には、数 nm 程度の大きさの粒子と 10 ~ 50 nm 程度の大きさの粒子との 2 群が混在していた。Ni-Alfa は NiO-Sigma と異なり、一次粒子径が 10 nm 程度の比較的均一な粒子であった。NiO-Sigma の各試料の半数致死濃度 (IC_{50}) は、調製に用いたジルコニアボール径 0.5、0.1 及び 0.05 mm

の試料で 23.1、29.3 及び 39.0 $\mu\text{g/mL}$ であった。NiO-Sigma については、ジルコニアボール径が 0.1 mm 及び 0.05 mm の試料では差が認められず、0.5 mm の試料では他に比べてやや細胞毒性が強くなる傾向を示した。

Ni-Alfa に関しては、各試料の IC_{50} は調製に用いたジルコニアボール径が 0.5、0.1 及び 0.05 mm の試料で 18.9、24.0 及び 32.6 $\mu\text{g/mL}$ であった。Ni-Alfa については、各濃度でのデータのばらつきが大きく、二次粒子径サイズが細胞毒性に及ぼす影響については評価できなかった。

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:

A549 および THP-1 細胞に関する細胞毒性試験では、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。その傾向は、A549 細胞において顕著に認められた。CD54 の相対蛍光強度 (RFI) は、NiO 用量依存的に上昇が観察され、NiO 200 $\mu\text{g/mL}$ で 783~883 %であったが、NiO 二次粒子径による差異は認められなかった。一方、CD86 の RFI は NiO 処理により NiO 50~200 $\mu\text{g/mL}$ まで NiO 用量依存的な上昇が観察され、その RFI の程度は NiO 200 $\mu\text{g/mL}$ で 216~260 %であった。NiO 処理により培養上清中の IL-8、IL-1 β 、TNF の上昇が観察された。IL-6、IL-10、IL-12p70 は検出限界未満であった。IL-8 産生量は、NiO 200 $\mu\text{g/mL}$ 及び 400 $\mu\text{g/mL}$ で顕著に観察され、400 $\mu\text{g/mL}$ 処理群の方が産生量が多かった。IL-1 β 及び TNF 産生量は NiO 用量依存的に上昇が観察され、IL-1 β は、NiO (粉碎ジルコニアボールの直径 0.5mm) 400 $\mu\text{g/mL}$ において産生量が高かった。TNF 産生量は、NiO (直径 0.5 mm) 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ において、NiO (直径 0.05 mm) に比べると産生量が高かったが、IL-8, IL-1 β , TNF のいずれのサイトカインにおいても、NiO の二次粒子径の差異は影響しなかった。

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：

in vivo 遺伝毒性試験

繊維長の異なる MWCNT の *in vivo* 遺伝毒性試験から検討を行った。解析の結果、MWCNT 投与により肺の変異頻度は溶媒対象群(2% CMC)に比べて約 3~4 倍に上昇したが、繊維長の違いによる変異頻度に対する影響は観察されなかった。次に、繊維長の異なる MWCNT による変異パターンを解析した。また、変異クローンの解析数が少ないが、コントロールの変異パターンと比較して、MWCNT 投与により G:C→A:T 変異が上昇する傾向が観察された。また、変異頻度と同様に、繊維長の違いによる変異スペクトルへの影響はほとんど観察されなかった。

共培養システムによる遺伝毒性試験

MWCNT の RAW のみ、及び RAW と GDL1 の両細胞への暴露群ともに、コントロールと比較して変異頻度の上昇傾向が観察された。また、この時に観察された変異頻度に対して、MWCNT の繊維長の違いは影響していないことがわかった。

5) 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築：

金属ナノ粒子の表皮傷害性および表皮内侵入性

Au NPs については、最終濃度 1・3・7・15・31・62.5・125・250・500・1000 µg/mL (システイン最終濃度 2260 µg/mL) で 24 時間曝露した。LDH assay の結果、Au NPs は、いずれの用量でも有意な表皮傷害性を示さなかった。また、HE 染色および金染色の病理組織学的検索では、Au NPs は表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった(図 3)。

Ag NPs については、最終濃度 31・125・500・1000 µg/mL (システイン最終濃度

2260 µg/mL) で 24 時間曝露した。LDH assay の結果、Ag NPs は、いずれの用量でも有意な表皮傷害性を示さなかった。また、HE 染色および銀染色の病理組織学的検索を行った結果、Ag NPs は、表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった。

単層培養系における金属ナノ粒子の細胞傷害性

Au NPs については、最終濃度 0.3・0.7・1.5・3.1・6.2・12.5・25・50・100 µg/mL (システイン最終濃度 226 µg/mL) で 24 時間曝露した。LDH assay および NR assay による細胞毒性解析を行った結果、Au NPs は、いずれの用量でも有意な毒性を示さなかった。

Ag NPs については、最終濃度 0.3・0.7・1.5・3.1・6.2・12.5・25・50・100 µg/mL システイン最終濃度 226 µg/mL) で 24 時間曝露した。LDH assay および NR assay による細胞毒性解析を行った結果、Ag NPs は、いずれの用量でも有意な毒性を示さなかった。

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：

マイクロアレイに搭載されている miRNA プローブ 2549 種類に対して、各曝露条件において検出された miRNA 数は 103~166 個であった。各曝露条件において、いずれか 1 つ以上の条件でシグナル強度が得られた miRNA プローブは 68 個あり、この 68 個について階層的クラスタリングを行なった。培養 24 時間後において、磁性ナノ粒子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を示した。非修飾磁性ナノ粒子と修飾磁性ナノ粒子に暴露された細胞での miRNA 発現パターンは異なるが、これらの磁性ナノ粒子の濃度の違いは miRNA の発現パターンに大きな影響を及ぼさないことが推測された。培養後 72 時間に

において、修飾磁性ナノ粒子に暴露された細胞の miRNA 発現パターンは磁性ナノ粒子に暴露されていない細胞と大きな違いはないが、非修飾磁性ナノ粒子に暴露された細胞の miRNA 発現パターンは磁性ナノ粒子に暴露されていない細胞とは異なることを示した。磁性ナノ粒子の影響で発現が変化する miRNA の同定を試みた。いずれかの条件で発現量がコントロールに比べて変動した miRNA のリストを作成したが、磁性ナノ粒子の影響が顕著に反映されている miRNA を見出すことは困難であったが、昨年度のリストとの比較から miR-1260b が昨年度と同様の傾向を示すことが見出された。

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：

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

肝および肺組織切片担体培養における A549 の細胞密度の経時変化より、肝あるいは肺組織切片担体培養において、アセトン固定かつ切片の厚さが 4 μm で実験を行う事に決定した。吸光度の測定値から直接算出した生存率は、スライド上非曝露群が $100.0 \pm 2.96\%$ 、スライド上 100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群が $105.5 \pm 4.11\%$ 、肺切片担体上非曝露群が $97.0 \pm 3.57\%$ 、肺切片担体上 100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群が $104.5 \pm 5.28\%$ 、肝臓切片上非曝露群が $90.7 \pm 1.60\%$ 、肝臓切片担体上 100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群が $99.7 \pm 2.54\%$ であった。いずれも統計学的に有意差を示す減少は認められなかった。組織切片担体上の細胞を回収し、Flow cytometry によって細胞内 ROS 産生量を定量した。スライドガラス上では曝露群 $100 \pm 20.2\%$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群 $125.0 \pm 51.1\%$ 、肺切片担体上では非曝露群時 $100 \pm 39.6\%$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群 $122.3 \pm 22.1\%$ 、肝臓切片担体上では非曝

露群 $100 \pm 12.9\%$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群 $114.1 \pm 33.0\%$ であった。いずれも統計学的に有意差を示す上昇は認められなかった。

ナノマテリアルの細胞内動態及び機能解析：細胞の種類に問わず、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ はミトコンドリアあるいは細胞質に存在し、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ はライソゾームと思われる構造物に集積するのを認めた。曝露 72 時間後の前立腺癌細胞株 LNCaP、DU145 の細胞生存率の結果では、LNCaP に関して、非曝露群と比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.001$ の有意差で低下が認められた。また、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ では $p < 0.01$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.001$ の有意差で低下が認められた。DU145 に関して、非曝露群と比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.05$ の有意差で低下が認められた。また、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.05$ の有意差で低下が認められた。

24 時間曝露後の細胞内 ROS 生成量を定量化した解析結果では、非曝露群と比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.05$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.01$ の有意差での低下が認められた。

細胞内 GSH を定量化した解析結果では、ナノ粒子の修飾の有無あるいは細胞の種類により、細胞内の GSH 量の変化は異なった。DU145 に関して、非曝露群と比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.05$ の有意差で低下が認められた。

D. 考察

1) ナノマテリアルの作成及びキャラクターゼーション：

システインは CTAB に比べて小さい分子であるため、ナノ粒子表面に結合する分子の数はシステインの方が多く、システインと Au NPs および Ag NPs は共有結合で結合するため、CTAB よりも強固に結合すると考えられる。これらのシステインの特性に

より、Au NPs および Ag NPs の分散性が向上したと考えられた。また、ウレアーゼの酵素活性を活用したエマルジョン中でのチタンアルコキシドの加水分解・縮合により、中空 TiO₂ ナノ粒子を 60 以下の低温で作製できることが明らかになった。

2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析：

同一条件で調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の細胞毒性試験結果より、ばらつきが大きい、Ni-Alfa の細胞毒性が強い傾向を認めた。この要因として、二次粒子径が同程度であれば、一次粒子径が小さいほど一つの二次粒子を構成している一次粒子の数は多くなり、表面積も大きくなる。そのため、細胞内に取り込まれるナノマテリアルの一次粒子の数が多くなったり、細胞との接触面積や溶出する Ni イオン量が多くなったりし、結果として細胞毒性に違いが生じたものと考えられた。

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：

細胞毒性試験の結果では、どちらの細胞株も懸濁液中の NiO の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められ、その傾向は、A549 細胞において顕著に観察された。これは、由来の組織によるナノマテリアルに対する感受性や応答が異なることや、細胞の接着と浮遊で異なるため、ナノマテリアルとの接触の状態が異なることが、細胞内への取り込み等へ影響を与えている可能性も考えられた。THP-1 細胞における細胞表面マーカー CD54 の発現変化は、NiO ナノマテリアルに対する応答においても Ni イオンが作用している可能性が考えられた。サイトカイン産生結果より、用量依存的なサイトカイン産生の増加は認められたが、NiO によるサイトカイン産生に二次粒子径は影響を及ぼさないと考えられた。

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：

コントロールと比較して両MWCNTともに変異頻度の上昇が観察されたものの、繊維長の違いによる変異頻度への影響は観察されなかった。同じMWCNTを用いて行った、共培養系による*in vitro*試験系でも、MWCNTの暴露による変異頻度の上昇は観察されたが、繊維長の違いによる変異頻度の影響は観察されず、*in vivo*変異原性試験の結果をサポートするものとなった。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いたMWCNTにより誘発される変異スペクトルの解析を試みた。現在のところ、*in vivo*試験で得られた一部の変異クローンの解析データのみではあるが、何のMWCNT投与でもG:C→A:T変異が増加しており、繊維長の違いによる変異スペクトルの影響は殆どないものと思われた。我々の以前の報告によると、本研究で用いたものとは異なるMWCNT (MWCNT-7)を用いて行った*in vivo*の遺伝毒性試験の結果では、MWCNT-7投与により、マウス肺ではG:C→C:G変異が上昇したことを見出している。このことは、変異誘発のメカニズムがMWCNT-7と本研究で用いたMWCNT-S/-Lでは異なる可能性が考えられる。その要因は不明である。おそらく、細胞内への取り込みやROS産生能などを介したものと推測されるので、今後は、これらの点についても検討を行う必要があると思われる。毒性誘発のメカニズムが明らかになれば、有用なナノマテリアルの毒性低減化方法の提言へとつながるとと思われる。

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：

Au NPs・Ag NPs は、少なくとも本実験条件下において、3D ヒト皮膚再構成系・単層培養系いずれでも明らかな細胞傷害性を

示さず、また、3D ヒト皮膚再構成系で表皮内に侵入しないことが明らかとなった。Au NPs の細胞毒性量については、実験に供する Au NPs の物性や細胞の種類などに依存して異なるためばらつきが大きいですが、種々の哺乳類細胞培養系を用いて 1 nM から 300 μ M で有意に検出された例が報告されているが、本研究では、それら先行報告よりはるかに高い用量で細胞傷害性がみられていない。このことは、本研究が実験に供した Au NPs がそれら先行報告で使用されたものに比べて毒性が低いものであったか、肝（癌）細胞や再構成皮膚組織が Au NPs の毒性に対して感受性が低かったか、または、それらの両者であったことが示唆された。また、3D ヒト皮膚再構成系においては、5.08 mM という莫大な用量で曝露しても表皮傷害性を示さず、表皮内に侵入しなかった結果は金ナノ粒子が表皮細胞内に侵入できないことを明確に示したものであるが、本研究で用いた 3D ヒト皮膚再構成系は毛孔とその付属組織や汗腺などがいないため、それらを介した侵入の可能性については評価できない。

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：

miRNA マイクロアレイによる網羅的な解析から、本研究の問題点が明らかになった。すなわち、磁性ナノ粒子の影響は、培養の違いあるいは培養時間の違いによる細胞の生理的变化よりも小さいため、培養条件の影響により隠れてしまうことである。これは、磁性ナノ粒子の miRNA 発現に与える影響は、非常に小さいことを示唆している。磁性ナノ粒子の細胞活性に与える影響も 100 あるいは 200 μ g/ml という高い曝露量においても 10~20% 程度の低下であるため、細胞全体の平均として考えると、細胞機能あるいは細胞の生理状態にほとん

ど影響していないということができる。すなわち、磁性ナノ粒子でアポトーシスやネクローシスが誘導されても、あるいは細胞活性が低下しても、それは特定の細胞に起こった現象であり、全体から見ると無視してもよい程度のものであると考えることができる。

8) 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 細胞の切片担体培養系の条件設定後に、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の曝露実験を行った。これらの実験より、切片担体の種類に依存した細胞生着・増殖を認め、曝露実験での活性酸素種 (ROS) の発生及び細胞生存率の変化を認めたが、統計学的有意差は認められなかった。この培養系の評価は、GDL-1 細胞を使用した変異頻度・様式の解析が必要と考えられた。

同一腫瘍なるも活性酸素種に対する応答が異なる 2 つの前立腺癌に対する非修飾・カルボキシル基修飾の磁性体ナノ粒子の影響を調べた。修飾により、ナノ粒子の細胞内局在が異なり、ROS-dependent/independent の反応が生じることが明らかにされた。一方、その反応の程度は、細胞種により異なる可能性が示された。

E. 結論

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。また、*in vitro* 実験系での二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、一次粒子径と二次粒子径の関係が細胞毒性に影響を与える事やナノ粒子の分散性に重要な分散剤の毒性を排除する製造法に新たな知見が得られた。MWCNT に対する *in vivo* および共培養システムによる遺伝毒性試験より、共培養系の妥当性および M

WCNTの長さに影響されない可能性がある事が認められた。さらに、3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築では、いくつかの考慮すべき点が存在するが、皮膚組織のナノ粒子侵入に対する抵抗性が認められた。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が、酸化鉄ナノ粒子曝露マーカーとしての解析は検討を要する点も認めた。A549細胞の切片担体培養系の使用可能を認めた。また、酸化鉄ナノ粒子の細胞への影響は、粒子側の修飾によるROS産生の有無のみならず、細胞側の活性酸素種に対する抵抗性との複合的関わりを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Hayashi, Y. Sato, W. Sakamoto, T. Yogo. Theranostic nanoparticles for MRI-guided thermochemotherapy: Tight clustering of magnetic nanoparticles boosts relaxivity and heat-generation power, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2017, 3, 95–105.
- (2) M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, T. Kanadani, M. Harada, T. Yogo. Relaxometric property of organosilica nanoparticles internally functionalized with iron oxide and fluorescent dye for multimodal imaging. *J. Colloid Interf. Sci.*, 2017, 492, 127–35.
- (3) **林幸彦朗**. 光と生体物質に応答する有機 - 無機ハイブリッド中空ナノ粒子の新規合成法とイメージガイド下三種同時治療. *セラミックス*, 2017, 52,130-3.
- (4) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo. One-pot synthesis of dual stimulus-responsive degradable hollow hybrid nanoparticles for image-guided trimodal therapy. *Adv. Funct. Mater.*, 2016, 26, 8613–22.
- (5) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Smart ferrofluid with quick gel transformation in tumors for MRI-guided local magnetic thermochemotherapy. *Adv. Funct. Mater.*, 2016, 26, 1708–18.
- (6) N. Ozawa, K. Hayashi, S. Yamaura, W. Zhang, W. Sakamoto, T. Yogo. Synthesis of inorganic-organic hybrid membranes consisting of triazole linkages formed by the azide-alkyne click reaction. *J. Membr. Sci.*, 2016, 517, 21–9.
- (7) T. Hoshino, K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. One-pot synthesis of proton-conductive inorganic-organic hybrid membranes from organoalkoxysilane and phosphonic acid derivatives. *J. Membr. Sci.*, 2016, 502, 133–40.
- (8) K. Takahashi, J. Umeda, K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. One-pot synthesis of inorganic/organic hybrid membranes from organoalkoxysilane, hydroimidazole derivative, and cyclic sulfonic acid ester. *J. Mater. Sci.*, 2016, 51, 3398–407.
- (9) S. Zhukov, Y.A. Genenko, J. Koruza, J. Schultheiß, H. von Seggern, W. Sakamoto, H. Ichikawa, T. Murata, K. Hayashi, T. Yogo. Effect of texturing on polarization switching dynamics in ferroelectric ceramics. *Appl. Phys. Lett.*, 2016, 108, 012907.
- (10) R. Maruyama, W. Sakamoto, I. Yuitoo, T. Takeuchi, K. Hayashi, T. Yogo. Photocurrent enhancement of chemically synthesized Ag nanoparticle-embedded

- BiFeO₃ thin films. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 2016, 55, 10TA14-1.
- (11) K. Hayashi. Multifunctional hybrid nanoparticles for biomedical applications. *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 2016, 124, 855–62.
- (12) 松岡厚子, 児玉幸夫, 吉田緑, 伊佐間和郎, 中嶋富士雄, 井上薫, 河上強志, 松田良枝, 五十嵐良明. シリカ, 銀及び酸化亜鉛のナノ分散液の *in vitro* 及び *in vivo* 毒性学的評価. *国立衛研報*, 2016, 134, 33-41.
- (13) M. Usami, M Takamatsu, S. Kazama, K. Mitsunaga, A. Miyajima, T. Irie, O. Doi, T. Takizawa, T. Nagi, M. Sunouchi. Proteomic analysis of valproic acid-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2017, 4(1), 31-5.
- (14) S. Mimaki, Y. Totsuka, Y. Suzuki, C. Nakai, M. Goto, M. Kojima, H. Arakawa, S. Takemura, S. Tanaka, S. Marubashi, T. Matsuda, T. Shibata, H. Nakagama, A. Ochiai, S. Kubo, S. Nakamori, H. Esumi, K. Tsuchihara. Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis* 2016, 37, 817-26.
- (15) T. Kato, T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, M. Watanabe, Y. Totsuka. Effect of physicochemical character differences on the genotoxic potency of Kaolin. *Genes Environ.*, 2017, 39, 12.
- (16) 大久保智子, 保坂三継, 中江 大. ヒト肺上皮由来細胞 A549 における有機酸ばく露による細胞傷害に関する研究. *薬学雑誌*, 2016, 136 (10), 1433-38 .
- (17) K. Horibata, A. Ukai, A. Ogata, D. Nakae, H. Ando, Y. Kubo, A. Nagasawa, K. Yuzawa, M. Honma. Absence of *in vivo* mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 *gpt* delta rats. *Genes Environ.*, 2017, 39, 4.
- (18) Y. Xu, Y. Zhu, X. Li, H. Morita, N. Hanagata. Investigation of dendritic mesoporous silica nanoparticles for cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide delivery. *Mater. Express*, 2016, 6, 116-26.
- (19) S. Chinnathambi, N. Abu, N. Hanagata. Biocompatible CdSe/ZnS quantum dot micelles for long-term cell imaging without alteration to the native structure of the blood plasma protein human serum albumin. *RSC Adv.*, 2017, 7, 2392-402.
- (20) X. Yao, Z. Tian, J. Liu, Y. Zhu, N. Hanagata, Mesoporous silica nanoparticles capped with graphene quantum dots for potential chemo-photothermal synergistic cancer therapy. *Langmuir*, 2017, 33, 591-9.
- (21) X. Li, X. Wang, J. Zhang, N. Hanagata, X. Wang, Q. Weng, A. Ito, Y. Bando, D. Golberg, Hollow boron nitride nanospheres as boron reservoir for prostate cancer treatment. *Nat. Commun.*, 2017, 8, 13936.
- (22) H. Tone, S. Yoshioka, H. Akiyama, A. Nishimura, M. Ichimura, M. Nakatani, T. Kiyono, M. Toyoda, M. Watanabe, A. Umezawa. Embryoid body-explant outgrowth cultivation from induced pluripotent stem cells (iPSCs) in an automated closed platform, *BioMed Res. Int.*, 2016, 2016, 7098987.
- (23) 渡邊昌俊, 菅野純. 特集ナノトキシコロジー「はじめに」, *医学のあゆみ*, 2016, 259(3), 215.
- (24) 小島佳奈子, 齊藤春五, 渡邊昌俊. ナ

- ノトキシコロジーにおける *in vitro* 評価試験：現状と将来. 医学のあゆみ, 2016, 259(3), 255-60.
2. 学会発表
- (1) **林幸彦朗**. ハイブリッドナノ粒子のバイオメディカル応用. 平成 28 年度日本セラミックス協会東海支部学術研究発表会, 名古屋, 2016 年 12 月.
 - (2) **林幸彦朗**, 山田翔太, 坂本渉, 余語利信. 赤血球様粒子の作製と体内動態の解明. 第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 静岡, 2016 年 6 月.
 - (3) **K. Hayashi**, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Dual Stimulus-Responsive Degradable Hollow Organic-Inorganic Hybrid Nanoparticles for Image-Guided Trimodal Therapy. The 1st International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development (iLIM-1), Osaka, Oct. 17-18, 2016.
 - (4) **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. 二次粒子径の異なる酸化ニッケルナノ粒子に対する THP-1 細胞の応答. 第 43 回日本毒性学会学術年会, 名古屋市, 2016 年 6 月.
 - (5) **Y. Totsuka**, Y. Lin, M. Kato, A. Elzawahry, Y. Totoki, T. Shibata, Y. Matsushima, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis). 50th Anniversary Conference IARC, Lyon, 2016 年 6 月.
 - (6) **Y. Totsuka**, **M. Watanabe**, **K. Hayashi**, **D. Nakae**. Development of a novel *in vitro* mechanism-based evaluation system of the genotoxicity of nanomaterials. 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society, Copenhagen, 2016 年 8 月.
 - (7) **戸塚ゆ加里**, 林櫻松, 加藤護, 十時 泰, 柴田龍弘, 松島芳隆, 中釜斉. DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
 - (8) 伴野勸, 山地太樹, 岩崎基, 成島大智, 加藤護, **戸塚ゆ加里**, 三好規之, 今井俊夫. 血漿中 cis-4-decenal の大腸がんリスクマーカーとしての可能性, 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
 - (9) 三牧幸代, 中森正二, 久保正二, 木下正彦, **戸塚ゆ加里**, 中釜斉, 落合淳志, 江角浩安, 土原一哉. 職業性胆管がん 1 症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較, 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
 - (10) **戸塚ゆ加里**. ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索. 第 59 回日本放射線影響学会, 広島, 2016 年 10 月.
 - (11) 前迫裕也, 善家茜, 古川英作, 加藤 護, 椎崎一宏, 中釜斉, **戸塚ゆ加里**. 職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析), 第 45 回日本環境変異原学会, つくば, 2016 年 11 月.
 - (12) **戸塚ゆ加里**, 善家茜, 古川英作, 加藤護, 十時泰, 柴田龍弘, 中釜斉. 次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索, 第 45 回日本環境変異原学会, つくば, 2016 年 11 月.
 - (13) **Y. Totsuka**, H. Sato, N. Akiba, **D. Nakae**, N. Suzui-Kemuriyama, **M. Watanabe**, K. Hayashi. Construction of novel *in vitro* evaluation systems based on the genotoxic mechanisms of nanomaterials. International Council of Chemical Associations' Long-Range Research Initiative (ICCA-LRI) and Japan's National Institute of Health Sciences (NIHS)

- International Workshop: Meeting the Global Challenge of Applying New Scientific Methods to Improve Environmental and Human Health Risk Assessments, 兵庫県淡路市, 2016年6月.
- (14) 北條幹, 坂本義光, 藤谷知子, 山本行男, 長谷川悠子, 多田幸恵, 久保喜一, 長澤明道, 海鉾藤文, 高橋博, 湯澤勝廣, 安藤弘, 田中和良, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大. MWCNTによるラット中皮腫誘発過程の経時的解析. 第43回日本毒性学会学術年会, 愛知県名古屋市, 2016年7月.
- (15) 坂本義光, 広瀬明彦, 中江大. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を経気管反復投与したラットに見られた肺胞過形成病変に対する病理組織学的解析. 第75回日本癌学会総会, 神奈川県横浜市, 2016年10月.
- (16) 佐藤春菜, 坂本義光, 中江大, 戸塚ゆ加里. 多層カーボンナノチューブの線維長の違いが遺伝毒性に及ぼす影響. 日本環境変異原学会第46回大会, 東京都千代田区, 2016年11月.
- (17) 坂本義光, 北條幹, 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(CNT)の発がん性とphenyl *N*-tert-butyl nitron (PBN)併用が及ぼす影響. 第33回日本毒性病理学会学術集会, 大阪府堺市, 2017年1月.
- (18) 北條幹, 坂本義光, 山本行男, 長谷川悠子, 多田幸恵, 湯澤勝廣, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大. 多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発過程の経時的観察. 第33回日本毒性病理学会学術集会, 大阪府堺市, 2017年1月.
- (19) S. Chinnathambi, N. Hanagata. Superparamagnetic CdSe/ZnS quantum dot micelles. International Symposium on Nanomedicine, Nov.24-26, 2016, Tsukuba, Japan.
- (20) Y-J. Shyong, F-H. Lin, N. Hanagata. Calcium phosphate induce exosome release of human monocyte for exosomal-based drug delivery systems. International Symposium on Nanomedicine, Nov.24-26, 2016, Tsukuba, Japan.
- (21) Y-J. Shyong, F-H. Lin, N. Hanagata. Calcium Phosphate Induce Exosome Release of Human Monocyte for Exosomal-based Drug Delivery Systems. Nano S&T-2016, Oct. 26-28, 2016, Singapore.
- (22) K. Kojima, S. Hashimoto, R. Sakamaki, S. Takahashi, R. Kasakura, R. Maruyama, H. Ishiguro, H. Uemura, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles enhance anti-tumor effect of docetaxel on prostate cancer cells *via* ROS generation and NF-kappa B signaling. April 16-20, 2016, New Orleans, LA.
- (23) S. Hashimoto, K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, W. Kobayashi, T. Nittami, M. Watanabe. Cytotoxicity of magnetic nanoparticles of Fe₃O₄: cell vision *versus* surface modification. 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.
- (24) K. Kojima, S. Saito, S. Takahashi, W. Kobayashi, S. Hashimoto, Y. Endo, T. Nittami, M. Watanabe. Iron oxide nanoparticles enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of Nuclear Factor kappa B and anti-apoptotic pathway in prostate cancer cells. 日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.
- (25) S. Takahashi, S. Saito, W. Kobayashi, S. Hashimoto, Y. Endo, T. Nittami, M.

Watanabe. MicroRNAs profiling of A549 cells after iron oxide nanoparticles exposure. 日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.

- (26) K. Kojima, S. Hashimoto, K. Yamamoto, S. Ota, Y. Takemura, M. Watanabe. Effect of carboxylated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells *via* NF- κ B-independent pathways. International Workshop on Magnetic Bio-Sensing 2016, Oct. 12-14, 2016, Fukuoka.

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 林幸彦朗, 坂本涉, 余語利信, 丸岡弘規, “フローサイトメトリー用蛍光プローブ及び蛍光標識細胞の選別方法” 出願番号 (国内: 特願 2016-91356, 2016年04月, 国際: 2017年2月10日, PCT/JP2017/4979), 名古屋大学, 倉敷紡績株式会社, 日本国.
- 2) 林幸彦朗, 坂本涉, 余語利信, 丸岡弘規, “蛍光プローブ、蛍光検出方法及び蛍光プローブの使用法”, 出願番号 (国内: 特願 2016-91359, 2016年04月, 国際: 2017年2月10日, PCT/JP2017/4981), 国立大学法人名古屋大学, 倉敷紡績株式会社, 日本国.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

林幸彦朗 “新ナノ粒子でがん狙い撃ち名大チーム”, 中日新聞. 2016年12月18日

