

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 三重大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：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した。平成29年度（3年計画の3年目）は、次のような成果を得た。ナノ粒子の合成条件を最適化することによる精密な形状制御およびサイズ制御できる方法、一次粒子径や二次粒子径と細胞毒性との関係から、溶出イオンや細胞内取り込みの重要性を示した。解決しなければならない問題もあるが、マウス肺より樹立した細胞株(GDL1細胞) とマクロファージ(RAW264.7)の共培養システムの可能性を示した。3D皮膚モデル(LabCyte EPI-MODEL)を用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築では、単層培養と比較しながら、病理学的、生化学的など多面的に解析し、皮膚組織のナノ粒子侵入に対するバリア機能などを明らかにし、*in vivo*に外装できる皮膚一般毒性評価系として使用できる事を示した。カーボンナノチューブ(CNT)のA549、DU145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、すなわちマーカー抽出の可能性を示した。加えて、ナノ粒子がエクソソームの放出に及ぼす影響を調べた結果、単球およびマクロファージがリン酸カルシウム粒子を取り込むと、放出するエクソソーム量が増加することを見出した。組織特異的な特徴を示すA549細胞の切片担体培養系の使用可能性を示した。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産生の有無を起点とするautophagyの関与を明らかにし、有害性発現経路に関わる結果を示した。

研究分担者：

林 幸彦郎 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、(i)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)、(ii)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、(iii)それらを用いたナノマテリアルのリスク評価、(iv)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した。

平成29年度、(1)ナノマテリアルの作製及びキャラクターゼーション(林)、(2)細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析(河上)、(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)、(4)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)、(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)、(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)、(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)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製及びキャラクターゼーション：

各種条件で尿素とウレアーゼを蒸留水 10 mL に溶解した。この水溶液に TiCl_4 230 μL をドラフト内で加え、発煙が収まったら溶液をよく攪拌し、60 °C の条件で 3 日間反応を行った。尿素 96 mg およびウレアーゼ 50 mg を水 10 mL に溶解させた。この水溶液に tetrabutyl orthotitanate 717 μL または bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)

titanium 1019 μL または tetrabutyl orthotitanate tetramer 1851 μL または tetraisopropyl orthotitanate 636 μL を加え溶液をよく攪拌し、60 °C の条件で 3 日間反応を行った。反応終了後、生成物を水で 3 回洗浄し最終的に 10 mL の水に分散させた。

(2)細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析：

Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル (NiO-Sigma) 及び Alfa Aesar 製の Ni ナノマテリアル (Ni-Alfa) を用いた。遊星ボールミル型湿式ナノ粉碎機を用いた法に従い懸濁液の調製を行った。NiO-sigma 及び Ni-alfa ナノマテリアルの 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.1 mg/mL) について、調製直後及び 37°C で 24 時間インキュベートしたものについて Ni イオン濃度を測定した。細胞毒性試験には A549 細胞 (JCRB 細胞バンク) を用いた。A549 細胞を 96-well プレートに播種 (5×10^3 cell/well) し、24 時間後に塩化ニッケルを含む液体培地を添加して 48 時間培養した。培地除去後、100 μL の Phenol Red-free MEM 培地及び 20 μL の Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Reagent (MTS 試薬、Promega) を添加し、5%CO₂ 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にて測定 (波長 440 nm) 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：

酸化亜鉛ナノマテリアル懸濁液は、Sigma-Aldrich 及び NanoTeK Alfa Aesar のナノ分散製品を用いた (以下、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)と略す)。注射用水にて 10 mg/mL に調製し、懸濁原液とした。NiO ナノマテリアル懸濁液は、Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル (一次粒子径 : <50 nm) を用い、サイズの異なる粉碎用ジルコニアボール (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) と遊星ボールミル型粉碎機 NP-100 (シンキー) にて、二次粒子径

の異なる NiO 懸濁原液 (10 mg/mL) を調製した。細胞毒性試験方法として、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 (JCRB) を用いたコロニー形成試験は、ISO 10993-5:2009 に従い、行った。また、培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (以下 J-TEC)) を用いて、細胞毒性試験を行った。培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL の培養上清中の Interleukin-8 (IL-8)、IL-1 β 、Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)、IL-1 α 、MIF を ELISA により測定した。

(4) 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：

細胞毒性試験：各マグネタイトナノ粒子 (BMS-10、ポリアクリル酸修飾なし；BMSC-5、ポリアクリル酸修飾あり) を単培養の GDL1 に 6.25 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ で、RAW264.7 に 3.125 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ で 24 時間曝露し、曝露した際の細胞生存率を NR assay により測定した。

共培養システムによる遺伝毒性試験法：GDL1 細胞を播種して 24 時間培養した後、ThinCertTM (pore size; 0.4 μm , high density: greiner bio-one) を各 well に入れ、インサート内に RAW264 を播種、24 時間培養した。BMSC-5 及び BMS-10 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 λEG10 をファージ粒子として回収した。回収したファージを Cre 組換え酵素発現している大腸菌 YG6020 株に感染させると、 λEG10 上にある一組の loxP 配列に挟まれた領域が Cre 組換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。

マグネタイトナノ粒子の細胞への取り込み：6well plate に GDL1 及び RAW264.7 を 1.0×10^6 cells/well 及び 2.0×10^6 cells/well で播種し、24 時間前培養した。各細胞に BMS-10 及び BMSC-5 を 50 $\mu\text{g/mL}$ で 24 時間曝露した後、トリプシン処理により細胞を回収し、1mL の PBS で再懸濁した後、10%ホルマリン溶液を入れ細胞固定を行なった。フローサイトメーター (FCM) を用いて、得られた細胞固定サンプルの解析を行った。

(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：

培養系：3D ヒト皮膚再構成系として、LabCyte EPI 24MODEL (株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) を、当該モデルに添付の培養液と共に用いた。単層培養系としては、正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NKEK (クラボウ) またはヒト肝癌由来細胞 HepG2 を、適宜継代したものを用いた。

被験物質：陽性対照物質としては、農薬として用いられるフタルイミド系殺菌剤で、皮膚毒性が報告されているフォルペット (*N*-(トリクロロメチルチオ)フタルイミド) (シグマ・アルドリッチ) を、ジメチルスルホキシド (DMSO) を溶媒として用いた。マグネタイトナノ粒子は、一次粒径 1-100 nm のマグヘマイト ($\Gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) およびマグネタイト (Fe_2O_4) 粒子から成り、蒸留水 (pH 9.6) を媒体とし、表面をカルボキシル基で修飾されたもの (表面修飾マグネタイト) が 2.2%、されていないもの (表面非修飾マグネタイト) が 2% の濃度の懸濁液として供給された。

暴露及び解析：被験物質への曝露は、3D ヒト皮

膚再構成系において表皮組織上面から、単層培養系において培地中へ、それぞれ行った。細胞毒性は、細胞死による培養液中への乳酸脱水素酵素漏出(LDH assay)、生細胞によるニュートラルレッド取り込み(NR assay)、生細胞による3-(4,5-ジ-メチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム臭化物取り込み(MTT assay)、生細胞によるレサズリン取り込み(Alamar Blue assay)を指標として、それぞれ生化学的に解析した。3Dヒト皮膚再構成系においては、さらに、表皮傷害性および表皮内侵入性についての病理組織学的解析、培地の鉄含有量をICP-MSにより測定、フィラグリン(FLG)、クローディン1(CLDN1)、腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)遺伝子発現を解析した。

(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:

DU145 細胞及び A549 細胞にカーボンナノチューブ(CNT)を 24 時間暴露し、細胞から RNA を抽出したのち、Agilent G4870C SurePrint G3 Human v21 miRNA 8x60K Microarray Kit にて miRNA の発現を解析した。アレイ上の各スポットの蛍光強度は Agilent G2600D SureScan Microarray Scanner により計測し、Agilent Feature Extraction v11.5 によって数値化した。

なお、それぞれの曝露サンプルは、以下のようにサンプル名を付した:

- DU145 Ctrl: DU145 細胞のコントロール。
- DU145 L20: DU145 細胞に CNT(Long)を 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。
- DU145 L200: DU145 細胞に CNT(Long)を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。
- DU145 S200: DU145 細胞に CNT(Short)を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。
- A549 Ctrl: A549 細胞のコントロール。
- A549 L20: A549 細胞に CNT(Long)を 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。
- A549 L200: A549 細胞に CNT(Long)を

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

A549 S200: A549 細胞に CNT(Short)を

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

RAW264.7 および THP-1 細胞を 500 および 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のリン酸カルシウム粒子を含むエクソソーム枯渇 FBS (Thermo Fisher) を補充した培地で 1、2、4、6、24、48 および 72 時間培養し、細胞を遠心分離により培地から除去した。培地中のエクソソームは、Total Exosome Isolation Kit

(Thermo Fisher) を用いて集めた。エクソソームの数は、EXOCET エクソソーム定量アッセイキット (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) を用いて測定した。

(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:

使用細胞株と細胞培養: 本実験ではアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 DU145 およびヒト肺上皮細胞由来 A549 を使用した。これら細胞株は ATCC (American Type Culture Collection)より入手した。

使用した磁性体ナノ粒子: 非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)は戸田工業株式会社より購入し、また、表面をカルボキシル基で修飾した磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs-COOH)は、Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS)、京都大学より購入した。

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。曝露前後の細胞の Integrin- α 1 および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現をリアルタイム PCR で解析をした。

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 において、 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、Autophagy 関連タンパク質の

発現をウエスタンブロット解析および Monodansylcadaverine (MDC, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)を用いて、蛍光顕微鏡観察を行い、定量化した。

(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製及びキャラクターゼーション:

酵素(ウレアーゼ)と尿素を用いた酸化チタンナノ粒子の合成(Ti 源: TiCl_4)では、針状粒子の集合体、中空構造の中空ナノ粒子、針状粒子からなる不規則な凝集体球状粒子が得られた。 TiCl_4 以外の原料からの TiO_2 NPs の作製では、一次粒子の粒径は異なるが全て球状粒子の凝集体が得られた。

(2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析:

一次粒子径が異なり二次粒子径が同程度の NiO-Sigma 懸濁液及び Ni-Alfa 懸濁液では、一次粒子径サイズの小さい Ni-Alfa の方が Ni イオン濃度はやや高い傾向を示した。そして、Ni イオンの細胞毒性試験の結果から、Ni イオンの溶出が各ナノマテリアルの細胞毒性に影響している可能性が考えられた。一方で、先行研究で細胞毒性に違いが認められている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では、懸濁液中の Ni イオン濃度に差は認められな

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:

細胞毒性の評価に汎用されているチャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 を用いて、コロニー形成試験法により ZnO ナノマテリアルの細胞毒性を評価した。その結果、ZnO(sigma)の IC_{50} は $9.8 \mu\text{g/mL}$ 、ZnO(alfa)の IC_{50} は $12.6 \mu\text{g/mL}$ で、ZnO(sigma)の方が ZnO(alfa)より細胞毒性が強かった。培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL (J-TEC)に、2種類の ZnO ナノ分散製品(sigma, alfa)を、100 及び $400 \mu\text{g/mL}$ で 18 時間暴露し、MTT 試薬により細胞毒性について検討した。その結果、陽性対照の 1% SDS では強い細胞毒性を示したが、ZnO では今回実施した最高濃度 $400 \mu\text{g/mL}$ においても細胞毒性を示さなかった。ZnO ナノマテリアルによる培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL(におけるサイトカインの産生について、ELISA kit により、5 種類のサイトカインを測定した。その結果、IL-8、IL-1 α 、MIF は、LabCyte EPI-MODEL においてサイトカインの産生が観察されたが、IL-1 β 及び TNF- α は検出限界以下であった。

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 を用いて、コロニー形成試験法により NiO ナノマテリアルの細胞毒性を評価した。その結果、NiO (粉砕ジルコニアボールの直径 0.05mm)の IC_{50} は $29.5 \mu\text{g/mL}$ 、NiO (同直径 0.1mm)の IC_{50} は $13.3 \mu\text{g/mL}$ 、NiO (同直径 0.5mm)の IC_{50} は $2.7 \mu\text{g/mL}$ で、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。培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL に、二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアル懸濁液を、100, 200 及び $400 \mu\text{g/mL}$ で 18 時間暴露し、MTT 試薬により細胞毒性について検討した。その結果、陽性対照の 1% SDS では強い細胞毒性を示したが、NiO では、ZnO 同様、

今回実施した最高濃度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても細胞毒性を示さなかった。NiO ナノマテリアルによる培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL におけるサイトカインの産生について、ELISA kit により 5 種類のサイトカインを測定した結果、IL-8、IL-1 α 、MIF は、LabCyte EPI-MODEL においてサイトカインの産生が観察されたが、IL-1 β 及び TNF- α は検出限界以下であった。

(4) 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：

細胞毒性試験：GDL1 単培養では、マグネタイトナノ粒子の表面修飾の有無に関わらず、いずれの濃度においても殆ど毒性を示さなかった。一方、RAW264 単培養では、BMS-10 は 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で BMSC-5 は 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で生存率が減少し、毒性が見られ、表面修飾の有無で毒性強度に差があることがわかった。

共培養システムによる遺伝毒性試験法：共培養条件下の RAW 細胞または RAW 及び GDL1 の両細胞に BMS-10 と BMSC-5 を 24 時間暴露し、6~7 日間培養した後、GDL1 細胞から DNA を抽出し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。マグネタイトナノ粒子曝露群では溶媒対照群と比較して変異頻度が増加する傾向が観察された。また、BMS-10 では、単培養に比較して RAW264.7 との共培養条件下で変異頻度が上昇する傾向が観察されたが、BMSC-5 では、単層培養条件下で高い変異頻度が観察されており、共培養条件下では MF が減少する傾向が観察された。また、両 MGT を比較すると、BMSC-5 の方が高い変異頻度を示していた。更に、変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MGT により誘発される変異スペクトルの解析を試みた。その結果、両者では観察された変異スペクトルが大きく異なることがわかった。これらのことから、ポリアクリル酸の

表面修飾が遺伝毒性発現に何らかの影響を及ぼしていることを認めた。

ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み：BMS-10 と BMSC-5 を 24 時間曝露した各細胞固定サンプルをフローサイトメーターで解析を行った。FCM では、細胞の大きさの指標である前方散乱光(FS)と細胞内の複雑さの指標である側方散乱光(SS)を測定した。BMS-10 曝露群は溶媒対照群と比較してどちらの細胞も SS 値が増加した細胞数が増加し、細胞内取り込み量が増加した。また貪食細胞である RAW264.7 の方が GDL1 よりも取り込み量が多いことが観察された。一方、BMSC-5 曝露群は溶媒対照群と比較して、SS 値が増加した細胞数に変化がなく、細胞内に殆ど取り込まれていないことが観察された。

(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：

フォルペット：

3Dヒト皮膚再構成系で、フォルペット最終濃度 0・100・1000・2000 (遺伝子発現解析のみ1500) $\mu\text{g}/\text{mL}$ で24時間曝露した。MTT assayおよび LDH assayを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)では2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のみで、角質非成熟再構成系の6日培養品では1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、それぞれ強い細胞毒性を示した。病理組織学的解析では、角質層成熟再構成系(13日培養品)において、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 群のみで基底層細胞の配列の乱れと、有棘層・基底層細胞の肥大を観察した。遺伝子発現については、角質層成熟再構成系(13日培養品)において、FLGとCLDN1に関して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で濃度依存的に減弱し、TNF- α に関して1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で増強した。NKEK単層培養系では、MTT assayを試みた結果、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で強い細胞毒性を示した。HepG2単層培養系で、MTT assayを試みた結果、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で強い細胞毒性を示した。

表面修飾マグネタイト：

3D皮膚再構成系で、最終濃度0・2・6.7・20 mg/mLで24時間曝露した。MTT assayおよびLDH assayを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)・角質非成熟再構成系(6または3日培養品)のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった。病理組織学的解析において、表面修飾マグネタイトは、角質層成熟再構成系(13日培養品)の表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった。ICP-MS解析は、表面修飾マグネタイトの投与用量に依存して、角質層成熟再構成系(13日培養品)培地中に鉄を検出した。遺伝子発現については、角質層成熟再構成系(13日培養品)の20 mg/mL群において、FLGに関して低下し、CLDN1とTNF- α に関して変化しなかった。NKEK単層培養系では、表面修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 μ g/mLで24または72時間曝露した。Alamar Bule assayを試みた結果、24時間培養ではいずれの用量でも細胞毒性を示さなかったが、72時間培養では200 μ g/mL群で強い細胞毒性を示した。HepG2単層培養系では、表面修飾マグネタイトは、24または72時間培養のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった。

表面非修飾マグネタイト:

3D皮膚再構成系で、表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・2・6.7・20 mg/mLで24時間曝露した。MTTおよびLDH assayを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)・角質非成熟再構成系(6または3日培養品)のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった。病理組織学的解析において、表面非修飾マグネタイトは、角質層成熟再構成系(13日培養品)の表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった。ICP-MS解析は、表面非修飾マグネタイトのいずれの用量でも、角質層成熟再構成系(13日培養品)培地中に鉄を検出しなかった。遺伝子発現については、角質層成熟再構成系(13日培養品)の20

mg/mL群において、FLGに関して低下し、CLDN1とTNF- α に関して変化しなかった。NKEK単層培養系で、表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 μ g/mLで24または72時間曝露した。Alamar Bule assayより、24時間培養では200 μ g/mL群で、72時間培養では100および200 μ g/mL群で用量依存性に、それぞれ強い細胞毒性を示した。HepG2単層培養系で、Alamar Bule assayより、24または72時間培養のいずれにおいても、いずれの用量でも明らかな細胞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 232~309 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 188 個あり、これらについて階層的クラスタリングを行なった。この clustering tree において、A549 細胞に CNT (Short) 200 μ g/mL を曝露したサンプルが他と挙動が大きく異なっている。また、clustering tree の高さ方向の長さの違いから DU145 細胞は A549 細胞より CNT の影響を受けにくいことが分かる。さらに CNT (Long)の 20ug/mL と 200ug/mL が与える影響の差は小さく、濃度よりも CNT の形状の違い (Short か Long か) の方が細胞に与える影響が大きいと分かる。

次に、各条件のコントロールに対する発現比 (2 を底とする対数で表現した Log₂ 値) を求めた。その分布を表 1 に示す。DU145 細胞は A549 細胞よりも CNT の影響を受けにくいことから分布の幅が狭くなっている。

続いて、CNT 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 (Log2 値が 1 以上もしくは -1 以下) miRNA は 129 個あった。そのうちの一部を表 2 に示す。このリストから DU145 細胞と A549 細胞で共通して、CNT (Short) 200 μ g/mL により発現が亢進する miRNA として hsa-miR-5787, hsa-miR-7110-5p, hsa-miR-3679-5p の 3 つが見出された。hsa-miR-5787 は細胞増殖や細胞分化に関与する遺伝子 ELF5 をターゲット遺伝子とする。昨年度の研究で非修飾ナノ粒子を曝露したときも hsa-miR-5787 の発現が亢進した。このため、hsa-miR-5787 は CNT やナノ粒子以外のナノマテリアルに対しても発現が亢進する可能性がある。また、A549 細胞で CNT (Short) 200 μ g/mL により発現が亢進する miRNA は計 68 個あったが、このうち多くで発現量が Short 200 μ g/mL \gg Long 200 μ g/mL $>$ Long 20 μ g/mL の関係にあり、バイオマーカーの候補としてスクリーニングから外す理由はない。バイオマーカーの発見のためには、Short 200 μ g/mL での発現量が多い順になるべく多くの miRNA について定量 PCR によりスクリーニングを行なうのが良いかもしれない。

(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：A549 細胞の切片担体培養系の条件設定後に、細胞の状態を示す Integrin α -1 および EGFR の発現を解析した。肺及び肝臓からの組織切片を切片担体として使用した。Integrin β -1 および EGFR の発現は 2 次元培養より有意差を持って発現量が上昇し、切片担体と細胞との相互関係が構築された状態で培養されていると考えられた。ナノ粒子の暴露により、肝臓組織切片担体上では、その発現が低下し、ナノ粒

子の影響を受けたが、肺組織切片担体上の細胞では、ナノ粒子の細胞への影響は認めなかった。この切片担体培養系が生体内の臓器特異的 (あるいは組織特異的) 環境を再現できる系である可能性が考えられた。

ナノマテリアルの細胞内動態および機能解析：ナノ粒子の修飾の有無に関係なく、autophagy が誘導され、また以前の結果と合わせると活性酸素種を産生する場合は、apoptosis が加わり、細胞障害をもたらすと考えられた。

D. 考察

(1) ナノマテリアルの作製及びキャラクターゼーション：

原料や合成条件、またはこれらに依存する反応速度の違いが生成物の形状に影響を与えることが明らかになった。現在、新たな合成方法を検討している最中であり、安定的に中空構造のナノ粒子が得られつつある。今後、さらなる条件検討により、この方法を確立することを計画している。

(2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析：

NiO-Sigma 及び Ni-Alfa ナノマテリアルについて、液体培地中の Ni イオン濃度測定及び Ni イオンの細胞毒性試験を実施した。NiO-Sigma 懸濁液と Ni-Alfa 懸濁液では、Ni-Alfa の方が Ni イオン濃度はやや高い傾向を示した。Ni イオン細胞毒性試験の結果から、Ni イオンの溶出が細胞毒性に影響している可能性が考えられた。一方で、先行研究で細胞毒性に違いが認められている、二次粒子径サイズの異なる懸濁液では、懸濁液中の Ni イオン濃度には差は認められなかったそのため、一連の細胞毒性について、溶出した Ni イオンの影響だけでなく、各ナノマテリアルの細胞への取り込み量も影響しているものと考えられた。

(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：

本研究では、物理化学的性質の異なる2種類のZnOナノマテリアル及び一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる3種類のNiOナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性試験を実施したが、ZnO、NiO共に最高濃度400 µg/mlにおいて細胞毒性を示さなかった。同試験液を用いたチャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 V79 細胞のコロニー法による細胞毒性試験では、IC₅₀値が3-30 µg/mlであった。ZnOではZnO(sigma)がZnO(alfa)に比べて強い細胞毒性を示し、NiOでは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。LabCyte EPI-MODELでは、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。さらに、再構築ヒト皮膚モデルでは、皮膚のバリア機能があり、ナノマテリアルの細胞内への取り込みが異なり、細胞毒性が異なることが、サイトカインの産生へも影響を与えたと考えられた。

(4)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：

表面修飾の異なるマグネタイトナノ粒子(BMS-10及びBMSC-5)のRAW264.7およびGDL1細胞に対する毒性は、GDL1に対してはBMS-10の方が強い毒性が見られ、RAW264.7に対してはBMSC-5の方が強い毒性が見られた。これは表面修飾の違いによってそれぞれの細胞に対する毒性メカニズムが異なっているのではないかと考えられた。また、共培養系による*in vitro*遺伝毒性試験系では、BMS-10とBMSC-5で異なる変異頻度の増加が観察された。BMS-10は共培養条件下でMFが増加しており、BMSC-5は単培養条件下でMFの増加が観察された。このことから、BMS-10はRAW264.7による間接的な影響が強くており、BMSC-5はGDL1への直接的な影響が強くているため、

遺伝毒性メカニズムが異なり、遺伝毒性に違いが出たと考えられた。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いたMGTにより誘発される変異スペクトルの解析を試みたところ、各MGTで大きく異なる変異スペクトルが確認された。特にBMSC-5曝露群ではBMS-10曝露群では見られなかったGC>ATの変異が見られた。表面修飾の違いにより大きく異なる変異スペクトルを示したことから、表面修飾が遺伝毒性発現に強い影響を示していると考えられた。さらに、細胞への取り込みを観察した結果、BMSC-5はBMS-10よりも細胞内に取り込まれなかった。このことからポリアクリル酸の表面修飾を施すことによって、貪食細胞に認識されず貪食されにくくなり、細胞内に取り込まれにくくなったと考えられた。

(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：

フォルペットは、フタルイミド系殺菌剤(農薬)で、皮膚傷害性がある。角質層成熟再構成系(13日培養品)では2000 µg/mLの24時間暴露で細胞毒性を示したが、角質層未熟再構成系(6日培養品)では1000 µg/mL、単層培養ヒトケラチノサイトでは3 µg/mLから細胞毒性を示した。病理組織学的には、角質層成熟再構成系・2000 µg/mLの24時間暴露で、表皮細胞の変性がみられた。角質層成熟再構成系・2000 µg/mLの24時間暴露では、細胞毒性が検出できない100 µg/mLの濃度より濃度依存性に角質層バリア機能を示すFLGと基底層のタイトジャンクションに関わるCLDN1の発現が減弱し、炎症性サイトカインであるTNF-αの発現が増強した。加えて、フォルペットは、ケラチノサイト単層培養系において、3D皮膚再構成系より強い細胞毒性を示す。以上より、表皮の重層構造はフォルペットの細胞毒性に対して防御効果を発揮し、(成熟した)角質層はさらに当該防御効果を増強する「バリア機能」を發揮することが示唆された。

表面修飾マグネタイトは角質層成熟再構成系で表皮組織を傷害しなかったが、単層培養ケラチノサイトを傷害し、角質層成熟再構成系の培地においては鉄が検出された。角質層成熟再構成系で、FLGの発現が減少した。したがって、表面修飾マグネタイトは、ケラチノサイトに対する毒性があるが、表皮の重層構造はその細胞毒性に対して防御効果を発揮するものの、角質層の存在や表皮の重層構造はこの物質の表皮通過を防ぐことができないものと示唆された。表皮通過性については、後述の通り表面非修飾マグネタイトが培地に検出されなかったことから、表皮とカップの間をすり抜けたことによるアーティファクトでないことが担保されている。表皮通過性は、表面修飾マグネタイトが真皮細胞を傷害したり、*in vivo*なら脈管に入って全身影響を発揮したりする恐れを否定できないことを示唆している。

表面非修飾マグネタイトは角質層成熟再構成系で表皮組織を傷害しなかったが、単層培養ケラチノサイトを表面修飾マグネタイトより強く傷害し、しかし、角質層成熟再構成系の培地においては鉄が検出されなかった。したがって、表面非修飾マグネタイトはケラチノサイトに対する毒性が表面修飾マグネタイトより強く、表皮の重層構造はその細胞毒性に対して防御効果を発揮し、また、角質層の存在や表皮の重層構造は「バリア機能」を発揮して、この物質の表皮通過を防ぐことができるものと示唆された。

(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：

miRNA マイクロアレイによる網羅的な解析から、カーボンナノチューブの細胞にあたる影響は細胞株により大きく異なることが明らかになった。また、昨年度までの結果も考慮するとナノマテリアルの種類によっても細胞に与える影響は異なるが、一方でカーボンナノチューブとナノ粒子に共通して変動を示す miRNA も見い出されて、

異なるナノマテリアルが共通した細胞の反応を引き起こす可能性が示された。

(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：

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、A549 細胞の切片担体培養系の毒性評価系としての使用可能性を認めた。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 産生の有無を起点とした apoptosis や autophagy の関与という細胞側の複合的関わりを明らかにした。

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、ナノ粒子の合成条件を最適化することによる精密な形状制御およびサイズ制御できる方法、一次粒子径や二次粒子径と細胞毒性との関係から、溶出イオンや細胞内取り込みの重要性を示した。共培養系や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、それぞれの有用性が示された。CNTのA549、DU145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、すなわちマーカー抽出の可能性を示した。組織特異性を示すA549細胞の切片担体培養系の使用可能性を認めた。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産生の有無を起点とするautophagyの関与を明らかにし、有害性発現経路に関わる結果を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, Y. Endo, T. Nittami, T. Nozaki, R.C. Sobti, M. Watanabe. Combined effects of Fe₃O₄ nanoparticles and chemotherapeutic agents on prostate cancer cells in vitro. *Appl. Sci.*, 8, 134, 2018.
- (2) T. Amemiya, K. Shibata, Y. Itoh, K. Itoh, M. Watanabe, T. Yamaguchi. Primordial oscillations in life: Direct observation of glycolytic oscillations in individual HeLa cervical cancer cells. *Chaos*. 27, 104602, 2017.
- (3) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Organic-inorganic hybrid hollow nanoparticles suppress oxidative stress and repair damaged tissues for treatment of hepatic fibrosis. *Adv. Funct. Mater.*, 28, 1706332, 2018.
- (4) K. Hayashi, S. Yamada, H. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Red blood cell-like particles with the ability to avoid lung and spleen accumulation for the treatment of liver fibrosis. *Biomater.*, 156, 45-55, 2018.
- (5) K. Hayashi, Y. Sato, H. Maruoka, W. Sakamoto, T. Yogo. Organic-inorganic hybrid nanoparticles for tracking the same cells seamlessly at the cellular, tissue, and whole body levels. *ACS Biomater. Sci. & Engin.*, 3, 1129–35, 2017.
- (6) K. Ishikawa, T. Arifta, K. Hayashi, K. Tsuru. Fabrication and evaluation of interconnected porous carbonate apatite from alpha tricalcium phosphate spheres. *J. Biomed. Mater. Res. Part B – Appl. Biomater.*, 2018. doi: 10.1002/jbm.b.34117.
- (7) H. Miki, S. Nakamura, A. Oda, H. Tenshin, J. Teramachi, M. Hiasa, A. Bat-Erdene, Y. Maeda, M. Oura, M. Takahashi, M. Iwasa, T. Harada, S. Fujii, K. Kurahashi, S. Yoshida, K. Kagawa, I. Endo, K. Aihara, M. Ikuo, K. Itoh, K. Hayashi, M. Nakamura, M. Abe. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by hyperthermia. *Oncotarget*, 9, 10307-16, 2018.
- (8) M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, M. Harada, K. Izumi, Y. Tsuruo, T. Yogo. Mesoscopic multimodal imaging provides new insight to tumor tissue evaluation: An example of macrophage imaging of hepatic tumor using organosilica nanoparticles. *Sci. Rep.*, 7, 3953, 2017.
- (9) 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 Interface Sci.*, 49, 127–35, 2017.
- (10) E. Fukai, H. Sato, M. Watanabe, D. Nakae, Y. Totsuka. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 109, 1024-31, 2018.
- (11) T. Toyoda, Y. Totsuka, K. Matsushita, T. Morikawa, N. Miyoshi, K. Wakabayashi, K. Ogawa. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *J. Appl. Toxicol.*, 38, 537-43, 2018.
- (12) N. Akiba, K. Shiizaki, Y. Matsushima, O. Endo, K. Inaba, Y. Totsuka. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 32, 455-62, 2017.
- (13) 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.*, 39, 12, 2017.
- (14) 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.*, 39, 4, 2017.
- (15) 多田幸恵, 中江大, 北條幹, 湯澤勝廣, 安藤弘, 久保喜一, 長澤明道, 海鋒藤文, 長谷川悠子, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子. NNK イニシエートによる A/J マウスの肺における磁性ナノ粒子マグネタイト気管内投与の影響. 東京都健安研七研究年報 68, 277-84, 2017.
2. 学会発表
- (1) S. Takahashi, S. Saito, K. Kanako, T. Nittami, M. Watanabe. MicroRNAs profiling of cancer cells after iron oxide nanoparticles exposure. 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017 年 9 月.
- (2) K. Kojima, S. Saito, S. Takahashi, T. Nittami, M. Watanabe. Combination treatment of Iron oxide nanoparticles and docetaxel enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of Nuclear Factor kappa B- and PI3K/Akt pathway in prostate cancer cells. 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017 年 9 月.
- (3) S. Saito, S. Takahashi, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Application of the substrata made of tissue/organ sections for histopathology (TOSHI) based systems for toxicity of nanomaterials. 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017 年 9 月.
- (4) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagic cell death in prostate cancer cells treated with docetaxel *via* ROS generation and NFκB signaling. AACR annual meeting 2018, April. 14-18, 2018, Chicago.
- (5) K. Hayashi. One-Pot Synthesis of Dual Stimulus-Responsive Degradable Organic-Inorganic Hybrid Hollow Nanoparticles for Fluorescence Image-Guided Trimodal Therapy. BIT's 7th Annual World Congress of Nano Science & Technology 2017, Oct. 24-26, 2017, Fukuoka. 招待講演
- (6) K. Hayashi. One-Pot Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Hollow Nanoparticles for Fluorescence Image-Guided Trimodal Therapy. *2nd International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development*, Sep. 29-Oct. 1, 2017, Nagoya. 招待講演
- (7) 林 幸壱朗. 多機能ナノ/マイクロ粒子の合成と診断・治療への応用. 第 7 回 ナノカーボンバイオシンポジウム, 2017 年 9 月 12 日, 京都大学. 招待講演
- (8) 林 幸壱朗. 多機能性ナノ・マイクロ粒子の作製と生物医学応用. 日本ゾルゲル学会第 15 回討論会, 2017 年 8 月 7 日-8 日, 大阪. 招待講演
- (9) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, H. Haishima, K. Isama. Effects of different secondary particle sized nickel oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune responses. (EUROTOX 2017, Bratislava, Slovak, Sep., 2017)
- (10) 宮島敦子・河上強志・小森谷 薫・加藤玲子・齋島由二・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に対する THP-1 の細胞応答, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月.
- (11) 戸塚 ゆ加里: DNA 付加体形成と突然変異誘発 第 44 回日本毒性学会 (横浜 2017 年 7 月)
- (12) Y. Totsuka, Y. Lin, Y. He, H. Sato, T.

- Matsuda, Y. Matsushima, M. Kato, EA. Izawahry, Y. Totoki, T. Shibata, B. Shan, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS (ノースカロライナ、2017年9月)
- (13) Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis 第76回日本癌学会学術総会 (横浜 2017年9月)
- (14) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚 ゆ加里、筆宝義隆. マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系 第76回日本癌学会学術総会 (横浜 2017年9月)
- (15) 佐藤春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚 ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第46回日本環境変異原学会 (東京、2017年11月)
- (16) 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚 ゆ加里. 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46回日本環境変異原学会 (東京、2017年11月)
- (17) 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤治、稲葉一穂、戸塚 ゆ加里. モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第46回日本環境変異原学会 (東京、2017年11月)
- (18) 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚 ゆ加里. 生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立 第46回日本環境変異原学会 (東京、2017年11月)
- (19) Y. Totsuka. Adductomics IWGT 2017 (東京、2017年11月)
- (20) Y. Totsuka, Y. Lin, Y. He, H. Sato, T. Matsuda, Y. Matsushima, M. Kato, A. Elzawahry, Y. Totoki, T. Shibata, B. Shan, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis ^{12th}ICEM-^{5th}ACEM (仁川、2017年11月)
- (21) Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017 (つくば、2017年12月)
- (22) Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics (コルカタ、2018年1月)
- (23) 坂本義光、広瀬明彦、中江 大. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の経気管投与ラットに見られた肺胞過形成病変の免疫組織学的性状. 第76回日本癌学会学術総会(2017年9月29日, 神奈川県横浜市).
- (24) 堀端克良, 鶴飼明子, 小縣昭夫, 中江 大, 安藤 弘, 久保喜一, 長澤明道, 湯澤勝廣, 本間正充. F344 *gpt delta* ratsを用いた多層カーボンナノチューブ単回気管内投与による *in vivo* 遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第46回大会(2017年11月6-7日東京都千代田区).
- (25) H. Sato, Y. Sakamoto, D. Nakae, M. Watanabe, Y. Totsuka. Differences in physicochemical characteristics on genotoxic potency of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). The 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens with

33rd Annual Meeting of Korean Society of Toxicology/Korean Environmental Mutagen Society (2017年11月12-16日, 大韓民国仁川広域(Incheon)市).

- (26) 北條 幹, 坂本義光, 山本行男, 長谷川悠子, 村上詩歩, 前野 愛, 広瀬明彦, 中江大. ラットにおける多層カーボンナノチューブおよびクリソタイル誘発中皮腫の病理学的性状の比較. 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2018年1月25日, 沖縄県那覇市).
- (27) 坂本義光, 北條 幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 広瀬明彦, 中江 大. 多層カーボンナノチューブの経気管反復投与によりラット肺に誘発された増殖性病変の免疫組織化学解析. 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2018年1月26日, 沖縄県那覇市).

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

林 幸壱朗 新聞報道“赤血球状の粒子肝臓に薬剤運搬”, 日経産業新聞, 平成29年12月8日