

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 27～29 年度総合研究報告書

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： 分担研究として、A549 細胞の切片担体培養系を用いたナノリスクマテリアルの毒性評価系の構築及び磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞内動態と傷害機構の解明を目的とした。A549細胞の切片担体培養系の条件設定及び磁性体ナノ粒子(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。Integrin β -1 および EGFR の発現は 2 次元培養より切片担体上での細胞で、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、ナノ粒子曝露実験の結果からも、切片担体培養系が生体内の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。

電子顕微鏡、Flow cytometry 及び原子間力顕微鏡を用いて、磁性体ナノ粒子の局在及び取り込みを確認した。修飾の有無により、その局在や取り込み量が変わることを認めた。細胞傷害機構は、ROS の産生を起点として、細胞の生存シグナルとして重要な NF κ B の発現への影響による apoptosis や autophagy の誘導であることが判明した。一方、カルボキシル基修飾で、ROS の産生を抑制するも、細胞生存率の減少を若干抑制するのみで、apoptosis や autophagy を誘導することも判明した。磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)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と粒子側の複合的関わりと考えられた。

研究分担者：

林 幸孝朗 九州大学大学院歯学研究院 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

伊佐間 和郎 帝京平成大学 薬学部 教授

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。このような背景のもとに*in vitro*毒性評価に関して、われわれは、ナノマテリアルのDNA損傷性評価としてのDNA付加体網羅的解析(アダクトー

ム)法の有用性、3次元培養と切片担体培養系での幹細胞の分化促進、がん細胞の上皮間葉移行、ナノマテリアルの*in vitro*リスク評価に共培養が有効性を報告して来た。

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目的とした。本研究の生体模倣*in vitro*評価系およびmicroRNA等の新規マーカーの抽出は他に類を見ず独創的であり、*in vitro*および*in vivo*の短期毒性試験を補完し、かつ、長期毒性・発がん性試験への橋渡しの存在となり得ると考えられた。このようなシステムの構築で、動物実験代替法の可能性が生じ、化学産業界に有用な実用的研究のみならず、広く行政および社会へ貢献できると考えられた。

分担研究者の具体的な研究目的は、(1)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、エピジェネティクスマーカーの検索、ナノマテリアルの細胞内動態の解析(渡邊)、(2)ナノマテリアルの作製およびキャラクタリゼーション(林)、(3)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)、(4)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)、(5)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)、(6)ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析(花方)、

(7)細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析(河上)である。以下に平成27~29年度の各分担研究の成果の概要を記載するが、詳細は各分担研究報告書を参照されたい。

B. 研究方法及び結果

B1 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、ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析

エピジェネティクスマーカーの検索に関して、花方分担研究者の項目を参照されたい。

B1-1 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：SDラット(male, 21 week)より、各種臓器を採取し、組織切片を作製した。組織切片担体を4 well multidish(Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA)に入れ、4°Cで乾燥させた後に培養液を入れ、A549細胞を 7×10^4 cells/well播種、培養をした。24時間毎に細胞形態の観察および細胞接着数 [cells/cm²]を計測、A549細胞の組織切片担体培養に磁性体ナノ粒子を24時間曝露し、Alamar Blueを用いて、細胞生存率を測定した。また、組織切片担体上のA549細胞のROS産生をFlowcytometryにより測定を行った。曝露前後の細胞のIntegrin- β 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。

A549細胞を用いた切片担体培養系は、組織切片担体の条件は4 μ m厚で作製したアセトン固定担体で、適切な培養日数は3日間であると決定した。Fe₃O₄NPs曝露時の各組織切片担体上のA549細胞の生存率は、2次元培養の時と異なり、統計学的有意差を示す減少は認められなかった。同様に、Fe₃O₄NPs曝露時の各組織切片担体上のA549細胞のROS産生も上昇するも、統計学的な有意差は認められなかった。Integrin β -1およびEGFRの発現は2次元培養より有意差を持つ

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。

B1-2 ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析：

本実験では、アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株 LNCaP、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。使用したナノマテリアルは、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOH) である。生細胞の細胞数の変化を測定するために Alamar Blue (Alamar Bioscience, Sacramento, California, USA) を用いた。5- (and 6) -chloromethyl-2' , 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester CM-H₂DCFDA (Invitrogen 社) を用いて、活性酸素種(ROS)の測定を行った Flow cytometer (FCM) を用いて側方散乱光 (SSC) を測定することにより MNPs- Fe_3O_4 の細胞内取り込みの定量化を行った。AFM による細胞上の NPs 観察を行った。透過型電子顕微鏡(TEM)により、 Fe_3O_4 NPs と Fe_3O_4 NPs-COOH の細胞内の局在を観察した。細胞傷害の機構として、Apoptosis、autophagy の関与、NF- κ B の発現量の解析などを Flow cytometry や western blot 法により解析を行った。

細胞内に取り込まれた MNPs- Fe_3O_4 はエンドソームとみられる小胞内やミトコンドリアなどさまざまな細胞内小器官で観察された。また、多重膜を有する autophagosome とみられる小胞も確認された。表面修飾の有無で、局在が異なるのが確認された。特に非修飾の場合、細胞質での集積を顕著に認めた、修飾の場合は細胞内小器官への集積が認められた。Flow cytometer (FCM) を用いて側方散乱光 (SSC) を測定では、MNPs- Fe_3O_4 の濃度依存的に SSC が増大し、細胞内への取り込み量が増大することが確認された。被修飾の場合、やや取り込

み量が減少している傾向を認めた。AFM での観察では、非修飾に比べてカルボキシル基修飾の方が細胞表面に付着している粒子量が多いことが認められた。前立腺癌細胞株の細胞生存率は、 Fe_3O_4 NPs および Fe_3O_4 NPs-COOH の濃度依存的に細胞生存率は低下するも、両者の間に有意差は認めなかった。 Fe_3O_4 NPs 曝露では、濃度依存的に ROS 産生が確認されたが、 Fe_3O_4 NPs-COOH 曝露では、濃度に関係なく著大な上昇を認めなかった。NF- κ B の発現量の変化は、修飾により異なる挙動を認めた。磁性体ナノ粒子による細胞生存率の低下は、修飾の有無にかかわらず、apoptosis と autophagy が関与することが認められた。

B2 ナノマテリアルの作製およびキャラクターゼーション

B2-1 水中分散安定性の高い金ナノ粒子および銀ナノ粒子を合成

金ナノ粒子および銀ナノ粒子の毒性を評価するために、hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) 水溶液を用いた、水中分散安定性の高い金ナノ粒子および銀ナノ粒子を合成、すなわち金ナノ粒子水溶液および銀ナノ粒子水溶液の各粒子濃度は毒性試験が可能な 2 mg/mL を目指した。CTAB 水溶液の毒性を示すため、CTAB 非使用で、システインを用いた高濃度の金ナノ粒子および銀ナノ粒子分散液の作製を試みた。

CTAB 水溶液の使用で、作製した金ナノ粒子は 2 mg/mL という高濃度で蒸留水に分散させても、凝集や沈降なく安定的に分散できた。また、金ナノ粒子の粒径は 10~20 nm であった。一方、一般的方法による作製した銀ナノ粒子水溶液の濃度を 0.02 mg/mL 以上にすると凝集し、沈降してしまった。この凝集体を超音波処理により再分散させることは不可能であったが、銀錯体形成を経由する方法で、2 mg/mL 以上の濃度でも凝集・沈降が生じない銀ナノ粒子分散液を

得ることができた。この方法により得られた銀ナノ粒子は粒径が 10 nm 以下であった。これらは CTAB を使用するので、システインを使用得られた金ナノ粒子および銀ナノ粒子は 2 mg/mL 以上で蒸留水に分散させると時間が経過するにつれて凝集・沈降が生じたが、超音波で再分散させることができ、*in vitro* 評価での使用が可能であった。

B2-2 酸化チタンナノ粒子の合成

ナノマテリアルの形状が毒性に与える影響を調べるために、球状以外の形状のナノ粒子の作製を試みた。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: TiCl₄)では、針状粒子、中空構造の中空ナノ粒子、球状粒子の様々な形状のナノ粒子を得ることができた。TiCl₄以外の原料では、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、一部中空粒子が確認された。

B3 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

B3-1 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

非修飾マグネタイト (BMS-10, 0.05% Tween20 に懸濁)を経気道的に曝露した ICR マウス(オス, 7 週齢)の肺を対象に 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 MGT 投与群に特徴的なものとしてスクリーニングされた。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。その結果、vehicle 投与群と比べて、MGT 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 MGT 投与に特徴的なものとしてスクリーニングされた (図 3)。これら付加体の m/z 値を既知の DNA 付加体の標品と比較したところ、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唆された。

B3-2 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)による共培養系 *in vitro* 気道毒性試験の妥当性検討

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)を 2%カルボキシメチルセルロース(CMC)水に懸濁し、0.2 mg/body の用量で気管内反復投与 (1 回/週 x 4 週)を行った。最終投与 2 ヶ月後にマウスを屠殺後、肺を摘出し、突然変異の解析に用いた。gpt 遺伝子解析は、ゲノム DNA を抽出して行った。その結果、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。

共培養系 (GDL1 細胞及び RAW264 細胞)及び GDL1 細胞の単培養系に MWCNT を曝露させ、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 組替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。その結果として、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

B3-3 マグネタイト(MGT)による共培養系 *in vitro* 気道毒性試験の妥当性検討

ポリアクリル酸修飾を施したMGT(BMSC-5)と修飾を施していないMGT(BMS-10)を上記と同様の系に暴露し、解析を行った。解析の結果、MGT暴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。

また、GDL1及びRAW264細胞へのこれらナノ粒子の取り込みの解析を行った。BMS-10暴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。対してBMSC-5暴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。

B4 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

3Dヒト皮膚再構成系としては、LabCyte EPI 24モデル(株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)及び単層培養系

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を利用し、金属ナノ粒子(金、銀、酸化鉄ナノ粒子)を暴露し、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アッセイ)、生細胞によるニュートラルレッド取り込み(NRアッセイ)、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アッセイ)、生細胞によるレザズリン取り込み(Alamar Blueアッセイ)を指標として、それぞれ生化学的に解析した。また、3Dヒト皮膚再構成系においては、さらに、以下の解析を行った。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色に加え、金染色・銀染色を行い、表皮傷害性および表皮内侵入性について病理組織学的に解析した。金属ナノ粒子の表皮透過性について解析するため、培地を回収して金・銀・鉄の含有量をICP-MSにより測定した(東海技術センター)。RNAを抽出し、表皮角質層の構成蛋白で皮膚の「バリア機能」に関与するとされるフィラグリン(FLG)、細胞接着因子で同じく皮膚の「バリア機能」に関与するクローディン1(CLDN1)、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)遺伝子発現をreal-time PCRで解析した。

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)を用いた。フォルペットは、3Dヒト皮膚再構成系において、MTT及びLDH assayで強い毒性を示し、また、組織学的変性像を認めた。LDN1に関して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で濃度依存的に減弱し、一方、TNF- α に関して1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で増強した。加えて、NKEK単層培養系やHepG2単層培養系でも毒性を認めた。

金ナノ粒子では、3D 皮膚再構成系において、毒性は認めず、ICP-MS 解析は、金ナノ粒子の投与用量に依存して、角質層成熟再構成系（13 日培養品）の培地中に金を検出した。HepG2 単層培養系でも、毒性は認めなかった。

銀ナノ粒子では、3D 皮膚再構成系において、毒性は認めず、ICP-MS 解析は、金ナノ粒子の投与用量に依存して、角質層成熟再構成系（13 日培養品）の培地中に銀を検出した。HepG2 単層培養系でも、毒性は認めなかった。

酸化鉄ナノ粒子では、3D 皮膚再構成系において、毒性は認めず、ICP-MS 解析は、金ナノ粒子の投与用量に依存して、角質層成熟再構成系（13 日培養品）の培地中に鉄を検出した。HepG2 単層培養系でも、毒性は認めなかった。しかしながら、NKEK 単層培養系では、強い毒性を示した。

B5 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

B5-1 2 種類の異なる ZnO ナノ粒子の THP-1 細胞などへの影響

物理化学的性状が異なる ZnO ナノ粒子の THP-1 細胞への影響を解析した。CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay 試薬を用いた細胞毒性評価、コロニー形成試験、THP-1 細胞表面マーカー(CD54, CD86)の測定、BD[™] Cytometric Bead Array (CBA) human inflammation kit (Becton Dickinson)による THP-1 細胞培養上清中のサイトカイン(IL-8, 1 β , 6, 10, TNF, 12p70)の測定、Flow cytometry を用いた細胞内への取り込みを測定した。

THP-1 細胞に対する細胞毒性は、A549 細胞同様、ZnO(sigma)が ZnO(alfa)より強いのを認めた。2 種類の ZnO は、CD54 を用量依存的に活性化し、ZnO(Sigma)の方が相対蛍光強度(RFI) は高かったが、CD86 においては ZnO による発現量の変化は認められな

かった。サイトカインの産生に関して、IL-8、IL-1 β 、TNF において産生の増加が認められ、その量は ZnO(Sigma)の方が多かった。IL-6、IL-10 は検出限界未満で、IL-12p70 は ZnO 50 μ g/mL 処理で僅かに検出できた程度であった。取り込みにかんして、SSC は、ZnO 処理により、用量依存的な増加が観察された。また、ZnO(sigma)と ZnO(alfa)を比較すると、ZnO(sigma)の方がより SSC が増加するのを認めた。

B5-2 一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアル懸濁液の THP-1 細胞などへの影響

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、サイズの異なる粉砕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砕機 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。

これらのナノマテリアルの THP-1 細胞などへの影響を同様に解析した。

A549 及び THP-1 細胞を用いて、細胞毒性試験を実施した結果、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。THP-1 細胞における細胞表面マーカー CD54、CD86 の発現量は、NiO の用量依存的に増加したが、二次粒子径による差異は認められなかった。細胞内への取り込みは、容量依存的に、そして懸濁液中の二次粒子径が大きいほど SSC の変化を大きく認めた。サイトカインの産生に関して、培養上清中の IL-8、IL-1 β 、TNF の上昇を認め、IL-6、IL-10、IL-12p70 は検出限界未満であった。TNF、IL-1 β 産生量は NiO の二次粒子径により差異が認められた。

B5-3 2 種類の ZnO ナノマテリアル及び 3 種類の NiO ナノマテリアルの再構築ヒト皮膚モデルへの影響

再構築ヒト皮膚モデル 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、2 種類の ZnO ナノマテリアル及び 3 種類の NiO ナノマテリアルの影響を解析した。細胞毒性は、MTT assay を使用し、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。

ZnO ナノ粒子では、細胞毒性は示さず、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、コントロールに比べて有意ではなく、また、IL-1 β 及び TNF- α は検出限界以下であった。

NiO ナノ粒子では、同様に毒性は示さず、IL-8、IL-1 α 、MIF 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。

B6 ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析

B6-1 ナノマテリアルによる曝露実験および microRNA マイクロアレイ解析

ヒト肺上皮細胞株 A549 を所定の濃度の非修飾磁性ナノ粒子あるいはカルボキシ修飾磁性体ナノ粒子で曝露し、24 時間後および 72 時間後に全 RNA を抽出した。同様に DU145 細胞及び A549 細胞にカーボンナノチューブ(CNT)を 24 時間曝露し、細胞から RNA を抽出した。Agilent G4870A SurePrint G3 Human v16 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。

磁性体ナノ粒子による A549 の miRNA の変動に関して、ラスタリングの傾向から、磁性体ナノ粒子が miRNA 発現に及ぼす影響として、磁性体ナノ粒子の修飾の有無の方が、曝露濃度よりも影響が大きいことを認

めた。ヒートマップから特徴的な発現パターンを示す miRNA のクラスター (cluster-1, 2, 3, and 4) を抽出した。Cluster-1 は、has-miR-1274_v16.0, has-miR-4286, has-miR-1260b, および has-miR-1260a からなり、この cluster に含まれる miRNA は、M200-72h と NM200-72h で発現量が増加する傾向を示している。この傾向は has-miR-1260b において特に顕著であった。Cluster-2 は、has-miR-765 および has-miR-622 からなっている。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示している。Cluster-3 は、has-miR-513a-5p, has-miR-1181 および has-miR-3141 からなっている。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示すことは cluster-2 に含まれる miRNA の特徴と同じである。しかしながら、cluster-2 の miRNA は C-24h で発現していないか、あるいは若干しか発現していないのに対し、cluster-3 の miRNA は C-24h で発現が認められる。また、非修飾および修飾した NPs で 24 時間曝露した細胞 (NM100-24h, NM200-24h, M100-24h, M200-24h) におけるこれらの miRNA の発現量は C-24h よりも低い傾向を示している。Cluster-4 は 12 個の miRNA からなり、そのうちの 6 個は let-7 family の miRNA であった。この cluster に含まれる miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも C-72h で発現量が低下するが、NM200-72h および M200-72h では発現量が C-72h ほど低下しない傾向を示している。

CNT に関して、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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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ことを認めた。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。この中から DU145 細胞と A549 細胞で共通して、CNT (Short) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。

B6-2 リン酸カルシウムナノ粒子による曝露実験とエクソソームの解析

RAW264.7 及び THP-1 細胞を所定の濃度のリン酸カルシウムナノ粒子で曝露し、24 時間後および 72 時間後にエクソソームを Total Exosome Isolation Kit (Thermo Fisher) を用いて回収した。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。

リン酸カルシウム粒子がエクソソーム分泌を刺激するかどうかを調べるために、RAW264.7 および THP-1 細胞を 500 および 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の CaP 粒子で 72 時間処理し、エクソソームを回収した。500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリン酸カルシウム粒子で処理した RAW264.7 細胞から放出されたエクソソームの数は、非処理細胞の約 2 倍であった。しかし、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリン酸カルシウム粒子濃度において、エクソソーム

数に有意差は認められなかった。RAW264.7 細胞を 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリン酸カルシウム粒子で処理した場合、ほとんどのエクソソームは 24 時間以内に分泌された。一方、ほとんどのエクソソームは、リン酸カルシウム粒子非処理細胞において 6 時間以内に分泌された。72 時間培養した THP-1 細胞において、エクソソームの数は、非処理細胞と比較して、リン酸カルシウム粒子処理細胞において 2 倍以上高かった。さらに、大部分のエクソソームは、24 時間以内にリン酸カルシウム粒子処理細胞からも分泌されるのを認めた。

B7 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

2 種類の NiO ナノマテリアル (NiO-Sigma 及び NiO-Alfa) 及び 1 種類のニッケルナノマテリアル (Ni-Alfa) の計 3 種類を用いて、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の作製を試みた。試験に先立ち、各ナノマテリアルの表面状態及び形状等を観察した。これらのナノマテリアルについてその表面状態を X 線光電子分光法 (XPS) (島津製作所製 ESCA-3200) を用いた。透過型電子顕微鏡 (TEM) (日立ハイテクノロジー製 H-9500) にて粒子径及び形状観察を行った。遊星ボールミル型湿式ナノ粉砕機を用いた方法に従い懸濁液の調製を行った。これらの懸濁液について、大塚電子社製の ELSZ-2 を用い、ナノマテリアルの平均粒子径 (流体力学粒径) 及び粒径分布を動的な光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS) で、Zeta 電位は電気泳動光散乱法 (レーザー Doppler 法) にて測定した。細胞毒性試験には A549 細胞 (JCRB 細胞バンク) を用い、Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Reagent (MTS 試薬、Promega) を利用して、細胞生存率を算出した。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。

XPS分析より、Ni-Alfaを含め今回使用したナノマテリアルの表面はいずれも酸化ニッケルであることが確認できた。NiO-SigmaのTEM画像より、数nm程度の大きさの粒子と10~50nm程度の大きさの粒子との2群が混在して存在していた。Ni-AlfaはNiO-Sigmaと異なり、一次粒子径が10nm程度の比較的均一な粒子であった。平均粒子径が同程度のジルコニアボール径 ϕ 0.05mmで調製することにより、NiO-Sigma及びNi-Alfaの10%FBS-MEM懸濁液について、散乱強度分布及び個数分布共にほぼピークが一致したナノマテリアルの一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。

径が0.05mmのジルコニアボールを用いて調製したNiO-Sigma及びNi-Alfaの細胞毒性試験の結果を比較したが、ばらつきが大きいものの、Ni-Alfaの方が若干、細胞毒性が強い傾向を示した。培地懸濁液中のNiイオン濃度について、NiO-Sigma懸濁液とNi-Alfa懸濁液では、後者の方がNiイオン濃度はやや高い傾向を示した。これは、Ni-Alfaの方が一次粒子径が小さいため、全体の表面積が大きくなり溶出しやすかったのではないかと推察された。

(倫理面への配慮)

本研究では、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、必要とする場合は当該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。動物実験に関しても、当該施設の委員会に申請を行い、動物愛護法などを遵守して行なった。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。

C. 結論

C1-1 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、磁性体ナノ粒子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。すなわち、2次元培養より抵抗性を示していると考えられた。Integrin β -1およびEGFRの発現は2次元培養より切片担体上での細胞で、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、ナノ粒子曝露実験の結果からも、切片担体培養系が生体内の組織特異的環境を再現している可能性が考えられた。この培養系の評価は、GDL-1細胞を使用した遺伝子変異頻度・様式の解析が必要と考えられた。

C1-2 ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析

電子顕微鏡、Flow cytometry及び原子間力顕微鏡を用いて、磁性体ナノ粒子の局在及び取り込みを確認した。修飾の有無により、その局在や取り込み量が変化することを認めた。文献的には、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)は、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、*in vitro*系での細胞傷害が報告されている。本研究での結果は、それと一致する。その機構は、ROSの産生の有無を起点として、細胞の生存シグナルとして重要なNF κ Bの発現への影響によるapoptosisやautophagyの誘導であることが判明した。一方、カルボキシル基修飾で、ROSの産生を抑制するも、細胞生存率の減少を若干抑制するのみで、同様にapoptosisやautophagyを誘導することも判明した。

磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞への影響は、粒子側の修飾によるROS産生の有無

を起点とした異なる signal を介するも apoptosis や autophagy が関与する細胞側と粒子側の複合的関わりと考えられた。

C2 ナノマテリアルの作製およ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を作製することができた。金ナノ粒子においては、2 mg/mL という高濃度条件下では、CTAB を用いた場合とシステインを用いた場合で分散性には大きな違いは見られなかった。このため、システインを使用することで分散性を低下させることなく、安全性を高めることができる。銀ナノ粒子に関しては、CTAB を用いた場合は、粒子濃度を 2 mg/mL にすると再分散させることができなかつたが、システインを用いることで 2 mg/mL でも分散させることが可能になり、毒性だけでなく分散性の面においてもシステインを用いることの有意性がみられた。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いと考えられる。また、システインと金ナノ粒子および銀ナノ粒子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、金ナノ粒子および銀ナノ粒子の分散性が向上したと考えられる。

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。

C3 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

MGTを投与したマウスの肺からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅的な解析を行なったところ、炎症及び

酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。よってMGT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。このようなナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた*in vitro*遺伝毒性評価法として、マウス肺由来のGDL1細胞とマクロファージ様のRAW264を共培養する系を考えた。本手法を用いてMWCNTの変異原性を評価してみた。まず、この評価系を用い、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の遺伝毒性に対する繊維長の影響を観察した。繊維長の異なるMWCNT(MWCNT-S及びMWCNT-L)を*gpt delta mouse*に気管内反復投与し、肺における点突然変異の解析をおこなった結果、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つた。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。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、ナノマテリアルなどの化学物質の毒性評価に有用であることが示唆された。

更に、この評価系を用い、遺伝毒性に対する表面修飾(ポリアクリル酸)の有無の影響を観察した。

表面修飾の異なるMGT(BMS-10及びBMSC-5)で異なる変異頻度の増加が観察された。BMS-10は共培養条件下で変異頻度が増加しており、対して、BMSC-5は単培養条件下で変異頻度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る。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る。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る。今後は、これらナノマテリアルによるROS産生や炎症性サイトカインの放出などについて検討を行う予定である。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思われる。

C4 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

本研究で用いた、ヒト3D皮膚再構成系は、培養カップの底にメンブレンフィルターがあり、その上に表皮細胞が培養されている。表皮細胞は、*in vivo*の場合と同様、上部に向かって増殖・分化し、培養時間経過と共に表層部に角質層を構築する。したがって、組織学的には、ヒト正常皮膚と類似する。J-TEC, LabCyte EPI-MODELは他の表皮組織のみタイプのヒト3D皮膚再構成系に類似し、OECD TG431 (*in vitro* 皮膚腐食性試験)には記載されていないものの、OECD TG439 (*in vitro* 皮膚刺激性試験)には後から記載された。なお、OECD TG431/439は、定量的評価ができないという欠点がある。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30 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。

金・銀ナノ粒子は角質層成熟再構成系の表皮組織を傷害せず、単層培養ヒトケラチノサイトも傷害しなかったが、角質層成熟再構成系の培地においては金・銀がそれぞれ検出された。したがって、金・銀ナノ粒子は、ケラチノサイトに対する毒性を示さないが、その一方で、(成熟した)角質層の存在や表皮の重層構造はこれらが表皮を通過することを防ぐことができないものと示唆された。

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發揮するものの、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。

C5 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ナノマテリアル分散製品について、物理化学的性質について明らかにすると同時に、THP-1を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答（細胞表面マーカーCD54及びCD86の発現、培養上清中のサイトカイン量）について検討した結果、物理化学的性状が異なるZnOは、細胞毒性、細胞表面マーカーの発現、サイトカインの産生などTHP-1細胞に対して異なる影響を与えることが示された。

一次粒子径が同じで二次粒子径が異なるNiOナノマテリアル懸濁液を用いて、物理化学的性質について明らかにすると同時に、A549及びTHP-1の細胞毒性に対する影響を検討した結果、細胞毒性や細胞表面マーカーの変化、サイトカインの産生などにナノ粒子の二次粒子径が重要な要素であることを示した。

2種類のZnOナノマテリアル分散製品及び3種類の二次粒子径が異なる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結果、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。サイトカイン産生については、1% SDSでIL-1α、MIFの増加が観察されたが、ZnO、NiOによるサイトカイン産生の変化は認められなかった。以上より、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。

C6-1 ナノマテリアルによる曝露実験およびmicroRNAマイクロアレイ解析

磁性体ナノ粒子の曝露に対する影響よりも播種した細胞の初期状態や培養時間の経過に伴う発現変動の方が大きく、データの詳

細な信頼性に関する保証が得られなかった。異なる培養において再現性の実験を数度行った結果、miR-1260aおよびmiR-1260bに関しては比較的再現性が高いことが判明した。miR-1260bは72時間曝露されると修飾の有無にかかわらず、24時間曝露のときよりも発現量が高くなる傾向を示す。miR-1260bほどではないが、miR-1260aも同様な傾向を示した。miR-1260bの機能に関しては、SFRP1、DKK2、およびSMAD4がmiR-1260bの標的遺伝子であり、癌細胞の増殖と浸潤に関与している可能性があることが報告されている。また、miR-1260bの発現が、正常な腎臓組織と比較して腎臓癌組織において亢進しており、そして発現の上昇が患者の生存率に有意に関連していることが指摘されている。さらに、このmiRNAが非小細胞性肺癌のリンパ節への転移に関与する可能性も報告されている。本研究に用いられた細胞が肺癌由来のA549であることを考えると、磁性体ナノ粒子がmiR-1260bの発現のトリガーになることも考えられるが、正常な細胞でものmiRNAが発現するのかどうかは今後の検討が必要である。

A549細胞でCNT (Short) 200 µg/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 µg/mL >> Long 200 µg/mL > Long 20 µg/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 µg/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。

上記の実験においてリン酸カルシウム粒子は、細胞から分泌されたエクソソームの数を増加させた。さらに、大部分のエクソソームは、リン酸カルシウム粒子による処理後24時間以内に細胞から分泌された。リン酸カルシウム粒子は分泌されたエクソソ

ームの数を増加させたが、リン酸カルシウム粒子処理細胞から分泌されたエクソソーム中のカルシウム濃度は、未処理細胞とは有意に異ならなかった。この結果は、細胞質ゾルに放出されたリン酸カルシウム粒子またはリン酸カルシウム粒子由来カルシウムイオンの排泄に対してエクソソーム分泌が増強されないことを示唆している。エクソソームは、エンドソーム膜の内方発芽によって形成される小胞内小胞 (ILV) に由来する。これは、エクソソームの内容物が細胞質ゾル成分に由来することを意味する。リン酸カルシウム粒子で処理した細胞から単離したエクソソーム中のカルシウム濃度の増加を示さない結果は、後期エンドソームまたはリソソームの破裂に起因する細胞質ゾル中のカルシウム濃度の増加前に ILV が形成されたことを示唆する。

C7 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の作製を試みた。各ナノマテリアルの表面状態及び形状等を観察し、試験に使用した Ni-Alfa 表面は酸化皮膜に覆われていることを確認した。φ 0.05 mm のジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa について、10%FBS-MEM 培地中で一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。このナノマテリアル懸濁液について細胞毒性試験を実施したところ、Ni-Alfa の方が細胞毒性はやや強い傾向を示し、二次粒子径が同程度の場合には一次粒子径が小さいほど毒性が強くなる可能性が示唆された。懸濁液に溶出している Ni イオンについては、Ni-Alfa の方が NiO-Sigma よりも Ni イオン濃度がやや高い傾向を示した。Ni イオンの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が、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 NiO-Sigma 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。

以上より、平成 27~29 年度の本研究において、ナノマテリアルの物理化学的性状の測定とその細胞への影響、様々な形状のナノマテリアル作製の制御、新規 *in vitro* 独紙絵評価系の構築、細胞内の局在及び有害性発現経路(Adverse Outcome Pathway)の解明につながる細胞内シグナリング、さらにそれに連関する可能性があり、またナノマテリアル暴露のバイオマーカーの可能性を示すことができた。本研究は、科学的根拠のある新規 *in vitro* リスク評価系とリスク低減方策を提示することにより、ナノマテリアルのリスク評価/管理に関する厚生労働行政に対して、最善の選択肢の提示に役立つと期待できる。また、これらの成果は、安全なナノマテリアルの普及を可能とすることで、市民の健康の維持に貢献すると共に、特に論文及び学会発表などはリスクコミュニケーションに利用することにより、市民の不安解消にも有用である。

D. 健康危害情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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 ch

- ronic liver fibrogenesis. *J. Biol. Chem.*, 291(1), 72-88, 2016.
- (2) T. Kondo, K. Mori, M. Hachisu, T. Yamazaki, D. Okamoto, M. Watanabe, K. Gonda, H. Tada, Y. Hamada, M. Takan o, N. Ohuchi, Y. Ichiyangi. AC magnetic susceptibility and heat dissipation by Mn_{1-x}Zn_xFe₂O₄ nanoparticles for hyperthermia treatment. *J. Appl. Phys.*, 117, 17D157, 2015.
- (3) Y. Ito, H. Ishiguro, N. Kobayashi, H. Hasumi, M. Watanabe, M. Yao, H. Uemura. Adipocyte-derived monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*. 75(10), 1009-19, 2015.
- (4) D. Kami, M. Toyoda, M. Watanabe, S. Gojo. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer and cell transplantation therapy. Chapter 22, 547-55, *Nano Based Drug Delivery*, 2015, IAPC-OBP.
- (5) 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*, 252(4), 303-8, 2015.
- (6) 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, 7098987, 2016.
- (7) 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*. 259(3) 215, 2016.
- (8) 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*. 259(3), 255-60, 2016.
- (9) 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.
- (10) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, Y. Endo, T. Nittami, T. Nozaki, R.C. Sobti, M. Watanabe. Combined effects of Fe₃O₄ nanoparticles and chemotherapy agents on prostate cancer cells in vitro. *Appl. Sci.*, 8, 134, 2018.
- (11) 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.*, 26, 8613–22, 2016.
- (12) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Smart ferrofluid with quick gel transformation in tumors for MRI-guided local magnetic thermochemotherapy. *Adv. Funct. Mater.*, 26, 1708–18, 2016.
- (13) 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.*, 517, 21–9, 2016.
- (14) 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.*, 502, 133–40, 2016.
- (15) 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.*, 51, 3398–407, 2016.
- (16) 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.*, 108, 012907, 2016.
- (17) 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.*, 55, 10TA14-1, 2016.
- (18) K. Hayashi. Multifunctional hybrid nanoparticles for biomedical applications. *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 124, 855–62, 2016.
- (19) 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.*, 3, 95–105, 2017.
- (20) 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.*, 492, 127–35, 2017.
- (21) 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.
- (22) 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.
- (23) 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.
- (24) 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.
- (25) 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.
- (26) 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.
- (27) 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.*, 106(11), 1499-505, 2015.

- (28) 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*, 37, 817-26, 2016.
- (29) 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.
- (30) 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.
- (31) 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.
- (32) 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.
- (33) Y. Nakagawa, A. Inomata, A. Ogata, D. Nakae. Comparative effects of sulfhydryl compounds on target organellae, nuclei and mitochondria, of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated hepatocytes. *J. Appl. Toxicol.*, 35, 1465-72, 2015.
- (34) J. Xu, D.B. Alexander, M. Iigo, H. Hamano, S. Takahashi, T. Yokoyama, M. Kato, I. Usami, T. Tokuyama, M. Tsutsumi, M. Tamura, T. Oguri, A. Niimi, Y. Hayashi, Y. Yokoyama, K. Tonegawa, K. Fukamachi, M. Futakuchi, Y. Sakai, M. Suzui, M. Kamijima, N. Hisanaga, T. Omori, A. Hirose, J. Kanno, D. Nakae, H. Tsuda. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos. A patient-based study. *Cancer Sci.*, 106, 825-32, 2015.
- (35) T. Okubo, M. Hosaka, D. Nakae. In vitro effects induced by diesel exhaust at an air-liquid interface in a human lung alveolar carcinoma cell line A549. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 67, 383-8, 2015.
- (36) T. Fujitani, A. Inomata, A. Ogata, Y. Sakamoto, A. Hirose, T. Nishimura, R. Ikeda, D. Nakae. Comparison of fetal toxicity of various multi-wall carbon nanotubes in mice. *Toxicol. Rep.*, 2, 1404-8, 2015.
- (37) 多田幸恵、高橋 博、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、矢野範男、猪又明子、中江 大、栗田雅行. 磁性ナノ粒子マグネタイト気管内スプレー投与によるラット肺病変に及ぼす γ -オリザノールあるいはグリセロール投与の影響. *東京都健安研セ研究年報* 66, 315-21, 2015.
- (38) 田山邦昭、坂本義光、安藤 弘、海鉾藤文、久保喜一、高橋 博、長澤明道、湯澤勝廣、小縣昭夫、中江 大、猪又明子、栗田雅行. ナノ物質の腹腔内投与によるマウス雄性生殖器への影響. *東京都健安研セ研究年報* 66, 323-9, 2015.
- (39) 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 136, 1433-8, 2016.
- (40) 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.
- (41) 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、海鉾藤文、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. 東京都健安研セ研究年報 68, 277-84, 2017.
- (42) 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.*, 4, 31-35, 2017.
- (43) N. Hanagata, H. Morita. Calcium ions rescue human lung epithelial cells from the toxicity of zinc oxide nanoparticles. *J. Toxicol. Sci.* 40(5), 625-35, 2015.
- (44) 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.* 10, 6105-19, 2015.
- (45) Y. Xu, Y. Zhu, X. Li, H. Morita, N. Hanagata. Investigation of dendritic mesoporous silica nanoparticles for cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide delivery. *Mater. Express*, 6, 116-26, 2016
- (46) 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.*, 7, 2392-402, 2017.
- (47) 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*, 33, 591-9, 2017.
- (48) 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.*, 8, 13936, 2017.
- (49) 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, 134, 33-41, 2016.
2. 学会発表
- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 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。
- (4) 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。
- (5) 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。
- (6) 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。
- (7) 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。
- (8) 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.
- (9) 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。
- (10) 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。
- (11) 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。
- (12) 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* NFκB-independent pathways. International Workshop on Magnetic Bio-Sensing 2016, Oct.12-14, 2016, Fukuoka.
- (13) 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。
- (14) 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。
- (15) 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。

- (16) 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 NF κ B signaling. AACR annual meeting 2018, April.14-18, 2018, Chicago.
- (17) 林 幸壱朗, 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.
- (18) 林 幸壱朗, 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.
- (19) 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.
- (20) 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. 日本ゾルーゲル学会第 15 回討論会, 2017 年 8 月 7 日-8 日, 大阪. 招待講演
- (21) 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
- (22) 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
- (23) 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
- (24) 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. 日本ゾルーゲル学会第 15 回討論会, 2017 年 8 月 7 日-8 日, 大阪. 招待講演
- (25) 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. 2015 年 7 月.
- (26) 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. 2015 年 10 月.
- (27) 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. 2015 年 12 月.
- (28) 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. 2015 年 12 月.
- (29) 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.

- (30) 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.
- (31) 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.
- (32) 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.
- (33) 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.
- (34) 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.
- (35) 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関与する 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.
- (36) 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.
- (37) 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.
- (38) 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.
- (39) 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.
- (40) 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.
- (41) 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.
- (42) 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.

- (43) 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. 次世代シークエンサーと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.
- (44) 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.
- (45) 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.
- (46) Y. Totsuka. Adductomics IWGT 2017、東京、2017年11月.
- (47) 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. 12thICEM-5thACEM、仁川、2017年11月.
- (48) 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.
- (49) 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.
- (50) 坂本義光、小縣昭夫、北條 幹、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、高橋 博、広瀬明彦、井上義之、橋爪直樹、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及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl *N-tert-butyl nitron* (PBN)の影響. 第42回日本毒性学会学術年会、2015年6月、石川県金沢市.
- (51) 藤谷知子、猪又明子、小縣昭夫、中江 大、安藤 弘、久保喜一、広瀬明彦、西村哲治、池田玲子. マウスにおける多層カーボンナノチューブの胎仔毒性の製品間差. 第42回日本毒性学会学術年会、2015年6月、石川県金沢市.
- (52) 坂本義光、広瀬明彦、中江 大. 多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl *N-tert-butyl nitron* (PBN)の影響. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月、愛知県名古屋市.
- (53) A. Hirose, Y. Sakamoto, A. Ogata, T. Nishimura, A. Inomata, D. Nakae. Chronic toxicity by repeated intratracheal administration of MWCNT in rat. 7th International Symposium on Nanotechnology. Occupational and Environmental Health (NanOEH 2015, 2015年10月、南アフリカ共和国 Limpopo州 Waterberg郡 Legend Safari Lodge.
- (54) 坂本義光、北條 幹、広瀬明彦、猪又明子、中江 大. 多層カーボンナノチューブを経気管投与したラットに見られた肺過形成病変. 第32回日本毒性病理学会学術総会、2016年1月、香川県高松市.
- (55) 多田幸恵、高橋 博、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、海銚藤文、北條 幹、猪又明子、中江 大、栗田雅行. ラットにおける DHPN の発がん性に対して磁性ナノ粒子マグネタイトが

- 及ぼす影響. 第 32 回日本毒性病理学会学術総会、2016 年 1 月、香川県高松市.
- (56) 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、2016 年 7 月、愛知県名古屋市.
- (57) 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、2016 年 10 月、神奈川県横浜市.
- (58) 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、2016 年 11 月 6 日、東京都千代田区.
- (59) 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、2017 年 1 月 27 日、大阪府堺市.
- (60) 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、2017 年 1 月 27 日、大阪府堺市.
- (61) 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.
- (62) 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.
- (63) 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.
- (64) 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.
- (65) 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.
- (66) 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

- (67) 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
- (68) 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, The 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, USA, March, 2016
- (69) 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 細胞の細胞応答，第43回日本毒性学会学術大会，名古屋，2016年6月
- (70) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, Y. Haishima, K. Isama. Effects of different secondary particle sized nickel oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune responses, EuroTOX 2017, ブラチスラヴァ，2017年9月
- (71) S. Chinnathambi, N. Hanagata, Superparamagnetic CdSe/ZnS quantum dot micelles, International Symposium on Nanomedicine, Nov.24-26, 2016, Tsukuba, Japan.
- (72) 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.
- (73) 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.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) 林 幸壱朗，坂本 渉，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 幸壱朗，坂本 渉，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方法”，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

- 1) 林 幸壱朗. “新ナノ粒子でがん狙い撃ち名大チーム”，中日新聞. 平成28年12月18日
- 2) 林 幸壱朗. “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