

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
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

研究代表者 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

研究要旨：ナノマテリアルのより適切な安全性評価系の構築を目指し、DNA 付加体を網羅的に解析する方法（アダクトーム法）を用い、ナノマテリアルにより誘発される DNA 損傷のより詳細な評価を行なったところ、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。よってナノマテリアル投与により、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。この結果に基づき、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 を共培養する系の構築を行った。多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を用いて、本システムの妥当性の検証及び、毒性の低減化も考慮して、繊維長の違いに対する影響についても観察した。繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-S 及び MWCNT-L) を *gpt delta* マウス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 の曝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、共培養システムは、生体を模倣する試験系として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、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。これら MGT の細胞への取り込みを観察した結果、BMSC-5 は BMS-10 よりも細胞内への取り込みが低いことがわかった。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ったと考えられる。現在、ポリアクリル酸修飾により毒性が強くなるメカニズムについて検討を行なっている。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。引き続き、本解析システムの妥当性を更に検討するとともに、形状やサイズの異なるナノマテリアルや様々な表面修飾を施したナノマテリアルの毒性評価を行なうことが、有用なナノマテリアルのリスク低減化を検討する上で重要と思われた。

A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験（変異原性試験）、コメットアッセイ（DNA 損傷試験）、小核試験（染色体異常試験）などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは微粒子などの化学物質の遺伝毒性評価は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考えられる。そこで我々は、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法（アダク

トーム法）を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて検討を行った。

一方、ナノマテリアルの気道毒性の *in vitro* リスク評価は主として肺胞上皮由来細胞を単独で用いた系で為されているが、当該毒性の発現機構には肺胞マクロファージによる貪食と液性因子放出が関与することが示唆されている。そこで、我々は、生体を模倣した新規 *in vitro* 試験系の構築が必要であると考え、マクロファージ様細胞と肺由来の

細胞の共培養系を利用して、新しい *in vitro* 気道毒性試験系を開発することを試みている。本研究では、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)、マグネタイトナノ粒子 (MGT)を用いて共培養系を用いた *in vitro* 気道毒性試験系の妥当性検討を行った。また、毒性の低減化も考慮して表面修飾の有無やサイズ違いなどの物理化学的な状態変化が遺伝毒性に対する影響についても観察した。

B. 研究方法

● 使用したナノマテリアル

本研究では、繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-L; 85~200 nm, MWCNT-S; 40~70 nm)、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)を使用した。

◆ 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 ICR マウス(オス, 7 週齢)に曝露した。その際、同時に 0.05% Tween20 のみを投与したマウスを準備しコントロールとした。投与から 24 時間後に屠殺し、肺を摘出した。肺から DNaseI、ヌクレアーゼ P1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、水-メタノールの溶媒系を用い LC-QToF-MS で DNA 付加体を網羅的に分析した。得られたデータの主成分解析から複数の付加体が 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。

◆ 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

本研究では繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-L① 85~200 nm, MWCNT-S; 40~70 nm)を使用した。

① *in vivo* 遺伝毒性試験法

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。

② 共培養システムによる遺伝毒性試験法

本研究で用いた共培養システムを図 1 に示す。

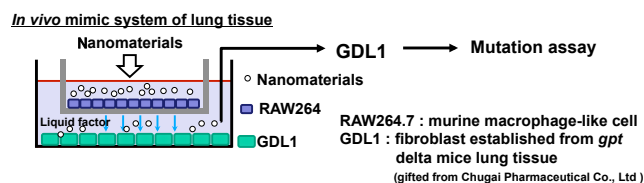


図 1 共培養システムによる *in vitro* 気道毒性試験

GDL1 細胞を播種して 24 時間培養した後、ThinCert™ (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(MGT)による共培養系 *in vitro* 気道毒性試験の妥当性検討

本研究では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)を使用した。

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、ThinCert™ (pore size; 0.4 μm, high density: greiner bio-one) を各 well に入れ、インサート内に RAW264 を播種し、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細胞から DNA を抽出し、前述の方法に従って *gpt* 遺伝子の変異を解析した。

② ナノマグネタイト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 μg/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。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

◆ 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

BMS-10 をマウスに経気道曝露し、投与後 24 時間後に肺を摘出し DNA を抽出後、HPLC-QToF-MS を用いて DNA 付加体を分析した。その結果、^① 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(図2)。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(ϵ dC)などであることが示唆された(表1)。

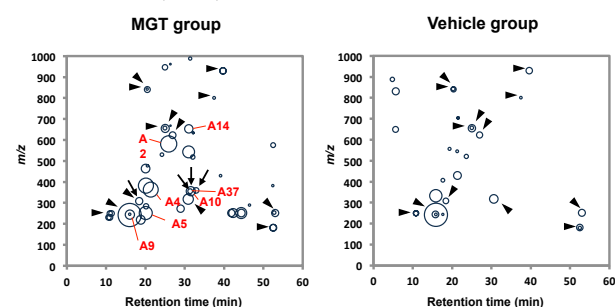


図2 MGT投与群及びコントロール群のDNA付加体マップ

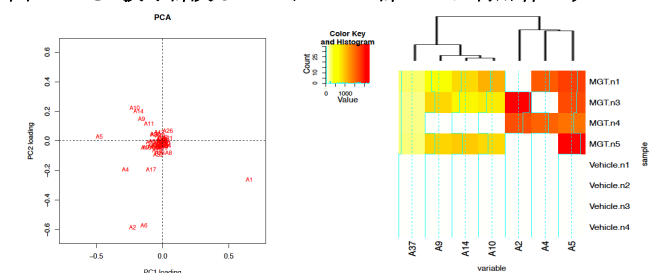


図3 PCA解析の結果

表1 MGT曝露に特徴的な付加体としてスクリーニングされたもの

Adducts	M/Z [M+H]	Comparing with DNA adduct database [M+H]	Derivation
A2	580.79	Unknown	
A4	363.17	B ϵ dA [363.1816 (+NH ₃)]	Lipid peroxidation (4-OHE), inflammation-related adduct
A5	252.11	ϵ dC [252.0984]	Lipid peroxidation (4-hydroperoxy-2-nonenal), inflammation-related adduct Induce C to T transition
A9	243.12	dT [243.0981], N ³ -MedC [243.1213]	5-mdC deamination (dT), Alkylating agent (MNU)
A10	355.23	Unknown adduct in model reaction [355.23]	DNA oxidation
A14	652.37	Unknown	
A37	356.24	Unknown adduct in model reaction [356.24]	DNA oxidation

◆ 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

in vivo 遺伝毒性試験法

繊維長の異なる MWCNT の遺伝毒性を *in vivo* 及び *in vitro* 共培養系で評価し、得られた遺伝毒性の結果を比較した。まず *in vivo* 遺伝毒性試験から検討を行った。MWCNT-L 及び MWCNT-S 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。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(図4)。次に、繊維長の異なる MWCNT による変異パターンを解析した。まだ、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(図5)。

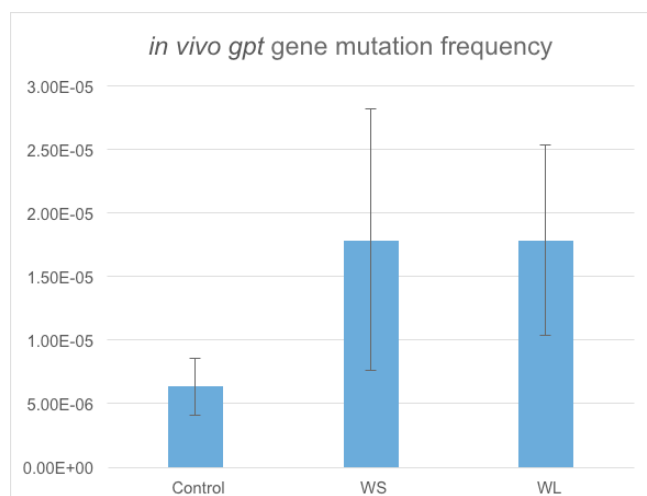


図4 繊維長の異なる MWCNT の *in vivo* 遺伝毒性

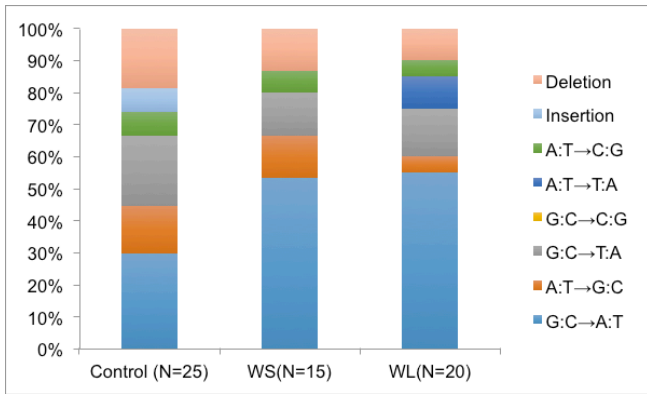


図5 *gpt delta* マウス肺に観察された変異スペクトル

② 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 の両細胞に繊維長の異なる MWCNT 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。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 (図 6)。

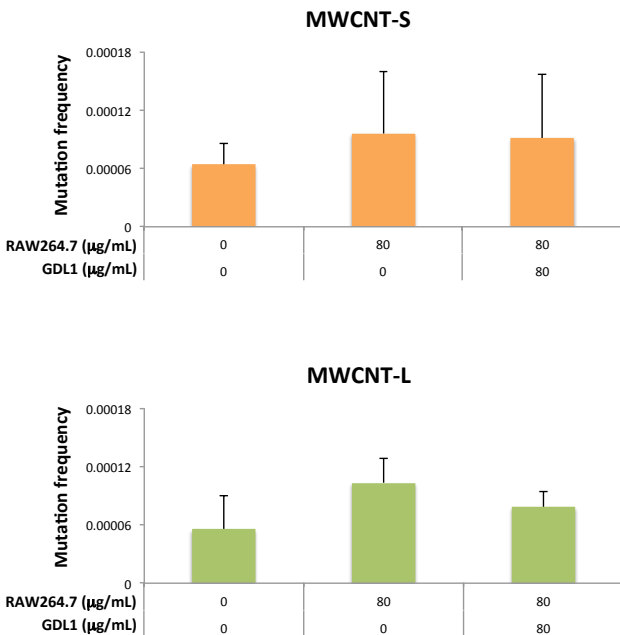


図6 単培養及び共培養下に GDL1 細胞に観察された *gpt* 変異頻度

次に、繊維長の異なる MWCNT による変異スペクトルを解析した。その結果、MWCNT-S ではコントロールと比較して G:C→C:G および A:T→C:G が、MWCNT-L では G:C→T:A および A:T→C:G が増加しており、繊維長の異なる MWCNT では変異スペクトルのパターンに違いが観察された (図 7)。

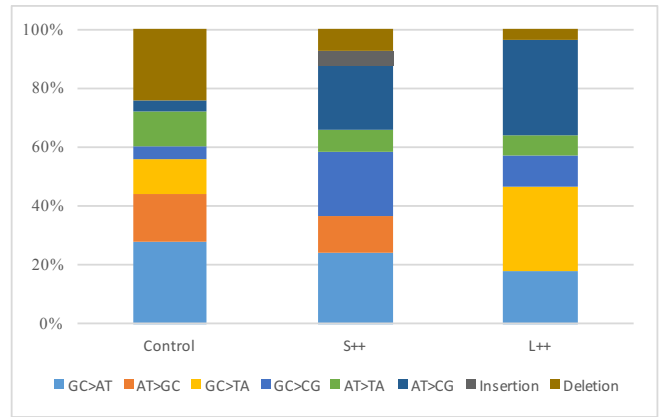


図7 GDL1 細胞に観察された変異スペクトル

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

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 の両細胞に各 MGT(BMS-10、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。結果を図 8 に示す。MGT 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 (図 9)。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かしらの影響を及ぼしていることがわかった。

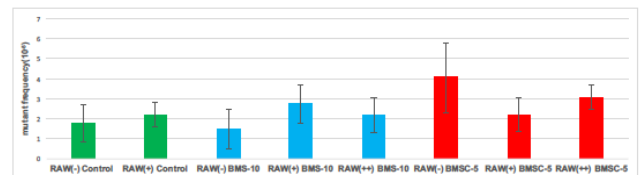


図8 GDL1細胞に観察された変異頻度

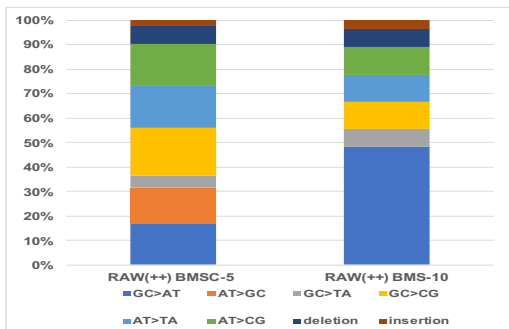


図9 MGT 暴露により GDL1 細胞に観察された変異スペクトル

② ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み

各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を 24 時間暴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。結果を図 10 に示す。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。

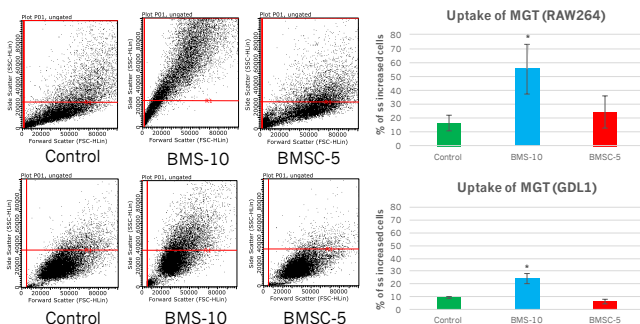


図 10 各 MGT の細胞への取り込み

D. 考察

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。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しているため、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暴露群ではBMS-10暴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。

E. 結論

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。この結果に基づき、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を共培養する系の構築を行った。この手法を用いて、MWCNTを用いて、本システムの妥当性の検証及び、毒性の低減化も考慮して、繊維長の違いに対する影響についても観察した。繊維長の異なるMWCNT (MWCNT-S及びMWCNT-L) を *gpt delta* マウス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の曝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、共培養システムは、生体を模倣する試験系として有用であることが示唆された。

更に同システムを用い、遺伝毒性に対する表面修飾の違いが及ぼす影響についても観察した。表面修飾を施していないMGTと比較して、ポリアクリル酸の表面修飾を施したMGTは細胞内には取り込まれにくい、遺伝毒性は強く、また観察された変異スペクトルは両者で全く異なるという結果となった。現在、ポリアクリル酸修飾により毒性が強くなるメカニズムについて検討を行っている。

今後は更に、本解析の妥当性を検討するとともに、形状やサイズの異なるナノマテリアルや様々な表面修飾を施したナノマテリアルの毒性評価を行なうことで、有用なナノマテリアルのリスク低減化を検討する。

F. 健康危険情報

特になし。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.

- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) 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.

2. 学会発表

- (1) 戸塚ゆ加里、中釜 齊. 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.
- (2) Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi 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.
- (3) 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.
- (4) 秋場 望、椎崎一宏、遠藤 治、三牧幸代、土原一哉、中釜 齊、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.
- (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.
- (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) 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. 1.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) 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.
- (20) 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.
- (21) 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.
- (22) Y. Totsuka. Adductomics IWGT 2017 (東京、2017年11月)
- (23) 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.
- (24) 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.
- (25) 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.

H.知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。