

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案

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、①共培養、切片担体培養、ヒト皮膚三次元再構成系などのナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化と *in vivo* 実験による当該評価法の検証、②自験、文献などのデータによる有害性発現経路の確立、③ナノマテリアル毒性試験データベースの作成：試験データ項目の収集・探索・精査、④それらの成果に機械学習などによる *in silico* 生体影響予測を組合せたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法を構築することが目的である。

ナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化に関して、共培養、切片担体培養、ヒト皮膚三次元再構成系を用いて、旧来の二次元培養とは異なる特性およびナノ粒子の性状による細胞反応性の差などを明らかにした。加えて、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験や小核試験と組み合わせる評価方法を試みた。有害性発現経路の確立に関して、microRNA の発現誘導に着目した。ナノ粒子の ROS 産生に関わる miRNA5787 を抽出し、その標的と思われるタンパク質 eIF5 を同定した。機械学習のための予備的準備やナノマテリアル毒性試験データベースの作成、ナノマテリアルの使用状況、安全性などの既存情報の収集・整理を行った。物理化学的性状と毒性を結びつけることが出来る可能性も得られたが、一方入手可能なデータの標準化などの問題も明らかになった。2 年目に向けて、ナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化グループからの自験データなどを組み合わせた *in silico* 生体影響予測を組合せたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法を構築することを目指す。

研究分担者：

林 幸吉郎 九州大学大学院歯学研究院 准教授
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
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
大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部 主任研究官
三宅 祐一 静岡県立大学食品栄養科学部 助教

研究協力者：

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

広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部 部長

A. 研究目的

開発・使用されているナノマテリアルの社会的受容には、十分な安全性評価と、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低減化が必要である。加えて、欧米では、これらの安全性評価やリスク低減が通商政策で戦略的に実施され、我が国でも同様の戦略が必須であり、安全性評価の高度化・標準化も必須である。このような背景で、一般化学物質と同様にナノマテリアルも作用メカニズムに基づいて

有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway, AOP) の確立や定量的構造活性相関 (Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR) ・リードアクロス (類推、Read-across) などの *in silico* 解析と、所謂「ウエット」な評価を組合せた統合的手法が求められる [Regul.Toxicol.Pharmacol., 71, S1-27, 2015]。また、動物愛護の3R (Replacement ・ Reduction ・ Refinement) 原則より、動物実験代替法としての *in vitro* 評価法も重視される。申請者らは、現在までに、動物代替法として、ナノマテリアル曝露経路として皮膚・肺を想定し、ヒト生体環境を反映した新規 *in vitro* 評価系を開発し、これにDNAアダクトーム法を組合わせ、ナノマテリアル誘導遺伝子変異頻度・様式を解析する統合的システムの構築を行い、また遺伝子などの生体応答を解析し、AOPを確立している。本研究 (図1) は、上記の成果を踏まえて、① 共培養、切片担体培養、ヒト皮膚三次元再構成系などのナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化と *in vivo* 実験による当該評価法の検証、② 自験、文献などのデータによる有害性発現経路の確立、③ ナノマテリアル毒性試験データベースの作成：試験データ項目の収集・探索・精査、④ それらの成果に機械学習などによる *in silico* 生体影響予測を組合せたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法を構築することが目的である。

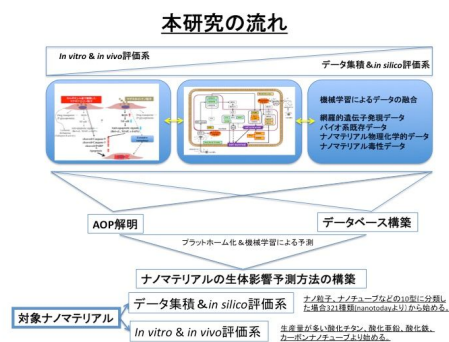


図1 本研究の流れおよび目的

B. 研究方法及び結果

B1 ナノマテリアルの特性評価 (林)

酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立と得られた酸化鉄ナノ粒子の物理化学的特性評価を行い、酸化鉄ナノ粒子の可能性を探った。詳細は林分担研究者の項目を参照されたい。

B1-1 酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立：

Fe(acac)₃ のエタノール溶液を作製した。この溶液にヒドラジーン水和物および 0.3% コラーゲン水溶液を添加し、80°C で 24 時間攪拌した。この作製方法では、酸化鉄ナノ粒子の粒径をナノメートルスケールで制御することができ、5~8 nm の酸化鉄ナノ粒子を作製することができた。また、得られた酸化鉄ナノ粒子は超常磁性を示すことを確認した。

B2 *in vitro* 評価系の高度化 (渡邊)

詳細は渡邊分担研究者の項目を参照されたい。

B2-1 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 細胞の組織切片担体培養に磁性体ナノ粒子を 24 時間曝露し、組織切片担体上の A549 細胞の磁性体ナノ粒子取り込みを Flowcytometry により測定を行った。曝露前後の細胞の Integrin-β1 および上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) の発現を、プロトコールに従い RNA 抽出、cDNA 合成後リアルタイム PCR (CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Labo., Hercules, California, USA) で解析をした。切片担体培養系を用いた A549 の磁性体ナノ粒子の取込みは、従来法の培養細胞のナノ粒子取込みに比べ有意に低下することが示され、細胞-細胞外マトリックス間の接着に關与する Integrin-β1 や細胞表面に発現する EGFR の発現解析より、二次元培養では Integrin-β1 は磁性体ナノ粒子により発現が減少することを認めた。一方、切片担体培養系では Integrin-β1

の発現が有意に亢進した。またナノ粒子を曝露した状態でも、二次元培養と比較して Integrin-β1 の発現が維持されるのを確認した。EGFR の発現量は、肺切片担体上での発現が高い傾向が認められた。

B2-2 ナノマテリアルの傷害機構の解析：

国立研究開発法人物質・材料研究機構の花方分担研究者により、SurePrint G3 Human v16 miRNA 8x60K microarray kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて microRNA 網羅的解析を行った。miRNA Microarray 解析結果より、細胞種に関わらず発現が大きく上昇した miR-5787 を標的とした。100~400 µg/mL の磁性体ナノ粒子を曝露後 24~72 時間における miR5787 の発現を Real-Time PCR で解析を行った。濃度依存的に発現量は増加し、72 時間後まで発現量が増加した。また、N-acetylcystein (NAC) で活性酸素種 (ROS) 産生を抑制すると、miR5787 の発現量が抑制されるのを認めた。

miR5787 が線維芽細胞の細胞増殖や成長に関与する eukaryotic translation Initiation Factor 5 (eIF5) の発現を抑制するという報告 [BBRC, 415, 567-72, 2011]があることから、磁性体ナノ粒子曝露後の A549 細胞における eIF5 の mRNA 発現量・タンパク量を解析した。磁性体ナノ粒子曝露により、いずれも発現量が減少するのを認めた。

B3 生体を模倣した *in vitro* 試験系を用いた遺伝毒性評価 (戸塚)

詳細は戸塚分担研究者の項目を参照されたい。本研究ではポリアクリル酸修飾を施した磁性体ナノ粒子 (MGT, BMSC-5)と修飾を施していない磁性体ナノ粒子(MGT, BMS-10)を使用した。

B3-1 細胞毒性試験

各磁性体ナノ粒(MGT, BMS-10、BMSC-5)を単培養の GDL1 に 6.25~200 µg/ml で、RAW264.7 に 3.125~200 µg/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。GDL1 単培養では、MGT 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 µg/ml で BMSC-5 は 6.25 µg/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を認めた。

B3-2 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 の両細胞に各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を 24 時間曝露し、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。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。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。

B3-3 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。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。対して 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。

B3-4 マグネタイトナノ粒子処理による活性酸素種(ROS)産生

各 MGT (BMS-10、BMSC-5)を 2 時間曝露した各細胞ライセート用いて ROS 産生を評価した。各細胞の BMS-10 曝露群、BMSC-5 曝露群において非曝露群と比較して ROS 産生の増加が見られ、RAW264.7 では有意な増加が確認された。また BMS-10 曝露群と BMSC-5 曝露群を比較すると BMSC-5 曝露群の方が ROS が多く産生しており、より強い ROS 産生を誘導することを認めた。

B3-5 RAW264 細胞へのマグネタイトナノ粒子処理による炎症性サイトカイン放出

各 MGT (BMS-10、BMSC-5)を単培養 RAW264.7 に 25 $\mu\text{g/ml}$ 及び 50 $\mu\text{g/ml}$ で 24 時間曝露後、培養上清を回収し TNF- α を定量した。BMS-10 曝露群では 25 $\mu\text{g/ml}$ 及び 50 $\mu\text{g/ml}$ で TNF- α の有意な増加が見られ、BMSC-5 曝露群では 50 $\mu\text{g/ml}$ で有意な増加がみられた。また TNF- α 産生量は BMS-10 曝露群の方が BMSC-5 曝露群よりも多いということを認めた。

B3-6 Ferrozine assay を用いた培地中の鉄イオン濃度

各 MNPs において、BMS-10 を加えた培地からは 15.4 \pm 4.0 $\mu\text{g/dl}$ の鉄イオンが検出された。一方、BMSC-5 を加えた培地からは 138.4 \pm 9.89 $\mu\text{g/dl}$ の鉄イオンが検出され、BMS-10 と比較すると有意な差を認めた。

B4 *In vitro* 評価系の高度化、毒性病理学的研究監修 (中江)

詳細は中江分担研究者の項目を参照されたい。3D ヒト皮膚再構成系を用いた小核試験法を確立するための予備的検討を行った。陽性対照物質には、マイトマイシン C またはベンツピレンを、陰性対照物質には、蒸留水 (dH_2O) を用いた。ナノマテリアル

は、BMS-10 および BMSC-5 の 2 種類のマグネタイトを用いた。

B4-1 単層培養系での評価

単層培養系としては、チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞 CHL/IU または正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NKEK (クラボウ) を適宜継代して用いた。9mix 非存在下の CHL/IU においては、マイトマイシン C の 3 または 24 時間曝露により 2 核の「小核あり」が増加した。S9mix 存在下の CHL/IU においては、ベンツピレンの 3 時間曝露により、2 核の「小核あり」が若干増加したが、2 核細胞が少なく、それ以外が多かった。S9mix 非存在下の NHEK においては、マイトマイシン C の 3 または 24 時間曝露しても、主に 1 核が多く、細胞分裂が行われてないようで、細胞の数も少なかった。S9mix 非存在下の CHL/IU においては、BMS-10 の 10-200 $\mu\text{g/mL}$ で 24 時間曝露しても、2 核細胞中の小核出現頻度が陰性対照と同等であった。S9mix 非存在下の CHL/IU においては、BMSC-5 の 10-200 $\mu\text{g/mL}$ で 24 時間曝露しても、2 核細胞中の小核出現頻度が陰性対照と同等であった。

S9mix 非存在下または存在下の CHL/IU においては、3 時間曝露した BMS-10 で 2 核細胞中の小核出現頻度が陰性対照より高かった。3 時間曝露した BMSC-5 の 2 核細胞中の小核出現頻度は、S9mix 非存在下で陰性対照よりやや高く、存在下で同等であった。両マグネタイト共、S9mix 存在下の方が非存在下より、2 核細胞中の小核出現頻度が高かった。

B4-2 3D ヒト皮膚再構成系での評価

マイトマイシン C を用いて 3 回実施したが、1 回目は、2 核細胞を確認するものの 500 個に満たず小核を確認できなかった。2 回目は、わずかに小核を認めたが、そもそも細胞数が極めて少なく、その中でも 1 核細胞が大多数を占め、2 核細胞が 500 個に満たなかつ

た。3 回目は、2 核細胞を確認するものの 500 個に満たず小核を確認できなかった。

B5 ナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築および機械学習による生体影響予測の試み

詳細は花方分担研究者の項目を参照されたい。

B5-1 ナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築

生命科学系データベースのカatalogである Integbio データベースカatalog (科学技術振興機構、<https://integbio.jp/dbcatalog/>) に登録された 1,684 件 (調査時) のデータベースを中心にインターネット上で公開されているデータベースの中から遺伝子発現や化学物質の暴露などに関するものなど本研究目的に適したものを検索して調査した。

また、使用するコンピュータの OS は MS Windows と Cent OS (Linux) の両方を用意した。ディープラーニング等の機械学習のライブラリとして Google の Keras / Tensor Flow を採用した。プログラムを組むための言語は Python を使用することとした。Python のディストリビューションとして Anaconda をインストールした。

Integbio データベースカatalogを中心に調査を行なったところ、本研究の目的に適するいくつかのデータベースが見出された。そのうち最大のものによく知られている NCBI 運営の Gene Expression Omnibus (GEO) であり、DataSets で 4,348 件、Series で 105,964 件、Samples で 2,783,483 件の遺伝子発現データが登録されている (2018/12/14 調査時点)。今後はこの GEO のデータを主に利用することとした。また、Integbio データベースカatalogには収録されていないが、化学物質の曝露と遺伝子や病気との関連をまとめたデータベースとしてノースカロライナ州立大学運営の Comparative Toxicogenomics Database (CTD) が存在し、補

足的に利用可能と思われる。なお、公開されている既存データベースの中でも、全データを一括ダウンロードして再利用可能なデータベースと、検索はできるものの一部データしかダウンロードできないデータベースが存在した。後者のタイプのデータベースからウェブスクレイピングにより全データをダウンロードすることは可能かもしれないが、当該データベースのライセンス条件的に問題がないかどうか慎重な検討が必要と思われる。

機械学習ライブラリ Keras / Tensor Flow をインストールしてプログラムが実行可能であることを確認した。マイクロアレイ発現データを用いた機械学習の前に、GEO データベース上のデータと実測したマイクロアレイ発現データを用いたデータマイニングを試みたが、まだ結果はまとまっていない。

B5-2 ZnO 曝露細胞のマイクロアレイ解析

機械学習を実施するためにコンピュータ環境に関する調査および実環境の整備、機械学習に用いる実測データを得るためにナノマテリアルを曝露した場合の遺伝子発現マイクロアレイ解析を実施することとした。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。

発現比 (生データ): 全 8 アレイおよびカラスワップ間で再現性が取れたデータの発現比の分布より、THP1 細胞の 24 時間後は ZnO の影響を大きく受け、A549 細胞の 6 時間後は、他の条件よりも遺伝子発現の変動が小さいものの ZnO の影響を明らかに受けている。

階層的クラスタリングその 1: 全 8 アレイのデータのうち 8 アレイとも発現比が求められたプローブ 20,090 個の発現比データで階層的クラスタリングより、それぞれのサンプル条件のカラスワップ間でクラスタが形成され、マイクロアレイのサンプル条件ごとの再現性が取れていることが確認さ

れた。続いて A549 細胞の 6 時間後と 24 時間後がクラスタを形成した。THP1 細胞の 24 時間後は他とは大きく異なる発現パターンであると示されており、やはり ZnO の影響が大きいことの表れだと考えられた。

階層的クラスタリングその 2：続いて、カラスワップ間で再現性を取ったデータのうち 4 つとも発現比が求まったプローブ 17,167 個の発現比データで階層的クラスタリングを行なった場合も同様にクラスタが形成された。やはり、THP1 細胞の 24 時間後は他とは大きく異なる。そして、THP1 細胞と A549 細胞では ZnO に対する感受性が異なると考えられた。

発現比（転写産物）：複数のプローブが 1 つの転写産物に対応する場合があるので、転写産物単位でまとめた発現比データのうち RefSeq (Reference Sequence) の分布を示した。なお、1 つの遺伝子から複数の転写産物が転写されるケースがある (transcript variant)。この分布からも THP1 細胞の 24 時間後は ZnO の影響を強く受けていることが分かる。

Gene Ontology 解析：転写産物単位の発現比について Gene Ontology 解析を行なった。ZnO の影響を最も受けた THP1 細胞の 24 時間後は発現が上昇する群において GO:0006954 inflammatory response (炎症反応) の転写産物が顕著に多かった。inflammatory response は THP1 細胞の 6 時間後でも有意に多かったことから、ナノマテリアル ZnO は THP1 細胞に対して早期から影響を与えていることが分かる。一方で、A549 細胞では inflammatory response の転写物が有意に増えているとは認められなかった。また、THP1 細胞の 6 時間後では GO:0006364 rRNA processing に分類される転写産物の発現が減少しており、ZnO を曝露した初期段階で rRNA 系が障害を受けていると考えられる。ただし、THP1 細胞の 24 時間後では rRNA

processing の転写物は有意に発現が減少しているとは言えず、時間の経過により rRNA processing は回復しているのかもしれない。一方で、A549 細胞では rRNA processing の転写物は特に発現が減少しておらず、障害を受けていないと考えられた。

B6 *in silico* 評価系に関する研究 (大野)

ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データ項目および QSAR/Read-across 解析に向けた有用なナノマテリアルの安全評価に関する情報の項目について探索・精査する。今年度は、二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs) について、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムにおいて作成され評価文書等に収載された物理化学的性状情報と有害性情報について収集・整理し、解析に資するデータの資料作成を行った。さらに収集・整理した物理化学的性状データと有害性データとの関連性について解析を実施した。詳細は大野分担研究者の項目を参照されたい。

- (1) 調査・収集対象情報源：OECD 関連資料 (Summary dossier と関連する個別 dossier、ANNEX の情報)、その他の関連資料 (物理化学的性状の情報の情報源として、Case study on grouping and read-across for nanomaterials –Genotoxicity of nano-TiO₂ (以下、Case study report)、*in vitro* 細胞毒性試験の情報源として、eNanoMapper データベース)。収載された情報のうち原著文献の収集を行い、文献に記載された情報について収集・整理を実施した。
- (2) 物理化学的性状、有害性情報を情報整理の対象とした：物理化学的性状 (凝集、結晶子サイズ、比表面積、ゼータ電位、表面化学、酸化還元電位、その他のプロパティとして 168 項目)、有害性情報 (吸入曝露または気管内投与試験、*in vitro* 細胞毒性試験 (遺伝毒性試験を除く))。なお、eNanoMapper データベース

については、以下の4種類の試験についてデータの収集対象とした：LDH release assay、Cell viability assay (MST-1, MST-8)、MTT assay、その他の細胞毒性試験。

- (3) 収集した情報について MS-Excel のデータシートにて作成した：有害性情報に関しては、今後、HESS DB(「有害性評価支援システム統合プラットフォーム (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform、通称：HESS) :ラットを対象とした化学物質の反復投与毒性試験データ及び毒性にかかわる作用機序情報などを集積した毒性知識情報データベース」)に搭載できるように形式を整理し作成した。
- (4) 収集したデータについて多変量解析ソフトウェア SIMCA15 (Umetrix 社製)で以下の解析を実施した。これらの解析を行うことにより変動に寄与している物理化学的性状について同定した。

物理化学的性状データシートについては解析を実施するため、データマイニングを実施した。主に OECD からの情報に基づいて作成しており、それ以外のデータは Case study report の情報から得た。その結果、168 項目のデータを収集した。データマイニング後の物理化学的性状のエクセルシートについて階層的クラスタリング解析を行った。その結果、全 6 物質の TiO₂ NPs の 168 項目についてクラスター化させた類似性を示した。さらに PCA 解析の実施をしたスコアプロットの結果より、5 物質の TiO₂ NPs 間の変動について第一主成分 (PC1) および第二主成分 (PC2) によって特徴づけられた。

収集・整理したデータの中で OECD の TG412 に準拠して Fraunhofer Institute (Germany)で 3 物質の NPs (NM103、NM104、P25) を用いて吸入毒性試験が実施されていたことから、解析対象とした。これらの試

験では、肺間質の細胞浸潤・繊維化が認められ、気管支肺胞洗浄液 (BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid) 中の総細胞数、多形核白血球 (PMN: polymorphonuclear leukocytes) 数、マクロファージ数、総蛋白、酵素活性 (LDH, ALP, γ -GTP (GGT)等)、マクロファージの粒子の蓄積性 (Accumulation of particle-laden macrophages) の増加が認められたので、これらの Endpoint を中心に解析した。

その結果、毒性の強さは NM104 > NM103 > NM105 であった。物性値と関連づけるため各 NPs の BMD を用いて PCA 解析を実施した結果、最も強い毒性を示した NM104 は、Specific surface area (m²/g) の SAXS surface (m²/g) : 空孔、および BET surface (m²/g) : 比表面積等が寄与している事が示唆された。次に毒性が強かった NM103 は、Dustiness (粒子の巻き上がり性) での Number Dustiness index (1/mg) : 全体量に対する巻き上がり粒子数、Porosity : 多孔性等が主に寄与している事が示唆された。最も毒性の低かった NM105 は、Mass median aerodynamic diameter (MMAD)(μ m) : 半径順に並べて質量の和が全体の半分になるところの直径 : 値が大きいと沈着しにくい性質を示す)、Composition での impurity で Ti が主に寄与している事が示唆された。

異なる粒子径を有する二酸化チタン P25 による影響を比較した単一濃度の反復投与吸入毒性試験は、二箇所の機関 (University of Rochester と BASF) で実施された 6 試験 (University of Rochester : 5 試験、BASF : 1 試験) より得た。これらの亜急性試験の結果、TiO₂ 微粒子ではいずれの試験機関においても毒性を示す所見は認められなかった。一方、TiO₂ NPs を暴露した群では、試験毎による多少の違いはあるが肺間質の細胞浸潤・繊維化が認められ、BALF 中の総細胞数、多形核白血球数、マクロファージ数、

総蛋白、酵素活性 (LDH, ALP, γ -GTP (GGT), N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG), and/or β -glucuronidase)の増加が認められた。これらの試験結果から、TiO₂ NPs にのみ毒性が認められた。但し、対象とした TiO₂ 微粒子についての物理化学的性状のデータが揃っていないため、解析には至らなかった。

OECD の *In vitro* 細胞毒性結果の収集データ (NM102 を除く 5 物質の TiO₂ NPs) では、いずれの試験データからも EC₅₀ は算出されず、細胞毒性は認められなかった。一方、eNanoMapper データベースからの収集データ ((NM100 を除く 5 物質の TiO₂ NPs) の細胞毒性試験結果について、曝露 (時間)、アッセイ法、細胞種および EC₅₀ (μ g/mL) の項目について収集した。さらに、eNanoMapper データベースにおいて NM103 のみ EC₅₀ (μ g/mL) > 100 が記載されていた。曝露 (時間) と細胞アッセイ法および細胞腫において同一条件を満たすものはなかった。

B7 ナノマテリアルの使用状況、安全性などの既存情報の収集と整理 (三宅)

ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データ項目の探索・精査を行った。具体的には、国内省庁のリスク評価書および報告書や文献情報を収集・整理し、ナノマテリアルに関する物性 (サイズ、形態、表面修飾など)、物理化学的特性、用途情報などのデータベースの構築を行った。詳細は三宅分担研究者の項目を参照されたい。

B7-1 ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報の調査方法

経済産業省が行っているナノマテリアル情報収集・発信プログラムおよび産業技術総合研究所 化学物質リスク管理研究センターが編集したナノテクノロジー消費者製品一覧より、製品名やナノマテリアルの種類、製造元などについての情報を収集した。カーボンナノチューブは 4 社、カーボンブラ

ック 5 社は、アセチレンブラックは 1 社、二酸化チタンは 7 社、フラーレンは 1 社、酸化亜鉛は 3 社、シリカは 3 社、酸化鉄は 1 社、非磁性 α -Fe³⁺酸化鉄ナノ粒子は 1 社からのナノマテリアルに関する情報を収集した。

B7-2 ナノ粒子の毒性情報の調査方法

2011 年 7 月 22 日に報告された産業技術総合研究所の NEDO プロジェクト (P06041) 「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」にてまとめられた「ナノ材料リスク評価書-二酸化チタン-」より、二酸化チタンに関する毒性情報を収集した。また、厚生労働省の有害性評価書および上述の経済産業省のナノマテリアル情報収集・発信プログラムより二酸化チタンの毒性情報を収集した。使用動物、被験物質、投与期間、投与濃度が試験ごとに異なるために、試験結果を単純に比較することは困難であるが、経口投与された二酸化チタンはナノおよび顔料グレードに関わらず、吸収され、全身に分布すると考えられる。二酸化チタンナノ粒子の LD50 は 5000 mg/kg 以上であった。80 nm および 155 nm 二酸化チタン投与群において、海馬領域の細胞減少、肝臓に中心静脈周囲の水腫性変性および肝細胞の散在性壊死が観察された。マウスに腹腔内投与し、骨髄細胞を観察した。染色体異常試験や姉妹分体交換試験では陰性であった。ラットの経口投与による LD50 は 10,000 mg/kg 以上との記述を認めた。

C. 結論

C1-1 酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立:

今回使用した Fe(acac)₃ は空気中で安定であり、加水分解を受けにくく、空気中で取り扱うことが容易である。従って、同じ特性を有する酸化鉄ナノ粒子を安定的に作製することが可能であった。また、添加剤の濃度により、加水分解 - 縮合速度を制御することができた。これにより、粒径をシグ

ルナノメートルオーダーで制御することができた。ナノ粒子の場合、結晶子サイズや粒径が 1 nm 異なると磁気特性も大きく変化するため、シングルナノメートルオーダーで粒径を制御できたことは有意義である。

C2-1 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：

Integrin- β 1 や EGFR は細胞の物質取込み経路に係わることが報告されている[EMBO J, 33(18), 2098-2112, 2014]。細胞の物質取込み経路の一つであるエンドサイトーシスは複数のシステムにより進行するが、そのうちの一つにクラスリン介在性エンドサイトーシスがある。このエンドサイトーシスは切断タンパク質 Dynamin 2 が小胞の切断を行うが、切断には Girdin という制御因子と相互作用を起こす必要がある。しかし、Girdin は Integrin- β 1 あるいは EGFR の存在下ではこの二因子と結合し、Dynamin 2 とは相互作用を起こすことができなくなり、結果としてエンドサイトーシスによる物質の取込みが抑制される。

以上より、通常の *in vitro* 培養系とは異なる切片担体培養系は細胞外マトリックスを含む組織の微小環境を培養細胞に提供することで、細胞-組織間の接着を担う接着因子や表面に発現する増殖因子受容体を制御し、生体内での環境を模している可能性があると考えられた。

C2-2 ナノマテリアルの傷害機構の解析：

磁性体ナノ粒子の暴露により、miR5787 の発現上昇、その標的遺伝子である eIF5 の発現減少が認められた。また、miR5787 は ROS を減少させると発現量が減少することを認めた。磁性体ナノ粒子による ROS 産生が miR5787 発現を誘導するという経路が想定された。今後、miRNA5787 の抑制による eIF5 の発現制御および eIF5 の機能、特に細胞傷害への関与について解析する必要がある。

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

ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた肺の遺伝毒性評価系として共培養システムを構築した。今年度は、この評価系を用い、MGTの遺伝毒性を行い、同時に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。

C3-1 細胞毒性試験

表面修飾の異なる MGT（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る。

C3-2 共培養システムによる遺伝毒性試験法

共培養系による *in vitro* 遺伝毒性試験系の結果より、BMS-10 は RAW264.7 による間接的な影響が強くており、BMSC-5 は GDL1 への直接的な影響および間接的な影響との相乗効果が強く出ており、これは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。GC>CG や AT>CG といった酸化ストレスが増大することによって増える変異や、AT>GC といった BMS-10 曝露群では確認されなかった変異が確認された。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。

C3-3 ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み

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。

C3-4 マグネタイトナノ粒子処理による活性酸素種(ROS)産生

各MGT曝露細胞の活性酸素種産生を評価した結果、BMSC-5は活性酸素種をより多く産生していたため突然変異頻度が増加したと考えられる。

C3-5 RAW264細胞へのマグネタイトナノ粒子処理による炎症性サイトカイン放出

RAW264.7から産生された炎症性サイトカインTNF- α の定量より、50 μ g/ml曝露ではどちらのMGTもTNF- α の有意な増加が見られ、BMS-10の方がBMSC-5よりも多くのTNF- α を産生していた。このことからBMS-10曝露群で間接的な影響が強く出ていたのは炎症性サイトカインが原因であると考えられる。

C3-6 Ferrozine assay を用いた培地中の鉄イオン濃度

Ferrozine assay によって鉄イオン濃度を定量した結果より、培地中の多量の鉄イオンが細胞内に直接取り込まれたのではないかと考えられる。実際に細胞には培養培地中に存在するトランスフェリンを介した鉄イオン取り込み機構が存在することや、MNPsの毒性は溶出した鉄イオンがFenton反応によってヒドロキシラジカルなどのROSを生成することで発現するとされており、deferoxamineのような鉄キレート剤を使用することでMNPsの毒性を軽減させたという報告も知られている。またアスベストの細胞毒性において鉄(Fe²⁺)の含有量が多いほど毒性が強くなったという報告もある。このことからMNPsの毒性には鉄イオンが大きく関わっており、BMS-10よりも強いBMSC-5の毒性は鉄イオンの含有量が大きく関係していると考えられた。

C4 *in vitro* 評価系の高度化、毒性病理学的研究監修

C4-1 単層培養系での評価

BMS-10については、代謝活性化を必要としないが、それによって増強される遺伝毒性がある可能性がある。しかしながら、24時間曝露で陰性であることを考え合わせると、この非修飾マグネタイトの「遺伝毒性」については、この段階で結論できず、Ames試験など他の*in vitro*試験や*in vivo*試験の結果と併せて総合的に評価すべきである。一方、BMSC-5については、S9mix非存在下3時間培養で陽性であったが、当該陽性の程度が弱く、S9mix存在下、また、その非存在・存在にかかわらず24時間培養で陰性であったことから、総合的に遺伝毒性を有しないと考える。もちろん、このカルボキシル基修飾マグネタイトの「遺伝毒性」については、前述のBMS-10の場合と同様、他の*in vitro*試験や*in vivo*試験の結果と併せて総合的に評価すべきである。

C4-2 3D ヒト皮膚再構成系での評価

本年度の実験条件においては、3Dヒト皮膚再構築系への小核試験導入ができなかった。要因として、現在のところ細胞の大きさと細胞増殖活性の2点が関係しているものと考えている。3Dヒト皮膚再構成系では、細胞の大きさが単層培養系よりも小さく、光学顕微鏡の40倍程度の倍率では、2核細胞や小核の観察が困難である。また、共焦点顕微鏡を用いてみたが、問題の解決に至らなかった。来年度は、油浸レンズを用いて高高倍率での観察を試みるほか、細胞回収方法についても検討する予定である。

C5 ナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築および機械学習による生体影響予測の試み

既存の生命科学系データベースは多種多様であったが、本研究に最も適しているのはマイクロアレイ解析の生データが登録さ

れている GEO データベースであると考え、補足的に CTD データベースが利用可能と思われる。これらのデータを利用して機械学習を行なう場合に一番の問題になると思われることは、サンプル条件などのラベル付けである。人間が手動でラベルを付けるのは困難なため、データのメタ情報からうまくラベルを生成する方法を検討する必要がある。また、Gene Ontology 解析の結果をラベルとして利用することも検討する価値があると思われる。

機械学習を実行するコンピュータ環境として小規模な Windows ワークステーションおよび Linux サーバーを整備したが、演算能力が不足して現実的な実行速度が得られないことが今後発生した場合にはスパコンの利用も検討するべきかもしれない。

遺伝子発現マイクロアレイ解析の実測データとして ZnO を曝露した細胞の解析を実施したが、mRNA 発現だけでなく microRNA 発現も測定したり、化学物質の毒性のモデルとして ZnO 以外の金属酸化物なども測定したりして、機械学習に利用するデータの幅を広げたいことを検討したい。

C6 *in silico* 評価系に関する研究

本研究では、TiO₂ ナノ粒子に着目し、OECD 関連資料およびその他の関連資料（Case study report、eNanoMapper データベース）を調査・収集対象の情報源として、物理化学的性状情報および有害性情報（反復投与毒性：吸入暴露および気管内投与試験、遺伝毒性情報を除く *in vitro* 細胞毒性）を収集した。

TiO₂ NPs（NM100-NM105）の物理化学的性状の全データから階層的クラスタリング解析を実施した結果、クラスタ化による類似性を示すことが出来た。さらに PCA 解析の実施をしたスコアプロットの結果より、5 物質の TiO₂ NPs 間の変動について第一主成分（PC1）および第二主成分（PC2）によ

って特徴づけることが出来た（Figure 2）。PC1 では、Crystal type の Anatase 型の Crystal size (nm) や Primary particle diameter (nm) の物理化学的性状の項目が特徴づけられ、PC2 は Crystal type の Rutile 型や不純物として多く含まれている元素等が特徴付けられた。反復投与吸入毒性試験の結果から、肺の所見として毒性影響が明らかに認められた Endpoint について BMD による暴露濃度を再算出し、3 物質間の毒性の強さは NM104>NM103>NM105 となった。物理化学的性状と毒性と関連性について PCA 解析を実施し、解析した結果、NM104 の毒性の強さを特徴づける物理化学的性状は、空孔が大きく、かつ比表面積が大きいことで生体への吸着能が高くなり、さらに、MMAD の値が小さいことで生体へ沈着率が高まることが示唆された。

今回、P25 単用量の反復投与毒性試験（吸入試験）の収集データから、TiO₂ のナノ粒子の対象物質となる TiO₂ 微粒子の物理化学的性状の情報が多かったため、物理化学的性状と毒性を関連付ける解析に至らなかった。解析を実施するためには両者の同様な物理化学的性状の項目の測定値が必要となるため、今後の収集課題の一つと考えられた。

本研究で課題となった点として、物理化学的性状に関しては、単位の統一や桁数の調整、結晶型への分類など、適正な形式に変換が必要であった。一方、有害性情報（*in vivo*）に関しては、HESS DB に搭載するために、規格化されたシートをひな形として、情報収集した TiO₂ NPs のデータコンテンツに特化した項目を追加することで新たな規格データシートを作成する必要があった。さらに、物理化学的性状と Endpoint からの毒性影響について関連付ける解析を実施するにあたり、より正確な毒性濃度の値を算出するため、LOEL 値を参照して原典⁴⁸に戻

り BDM として再計算する必要があった。

C7 ナノマテリアルの使用状況、安全性などの既存情報の収集と整理

ナノマテリアルはすでに実用化され、身の回りの製品に含まれていることが明らかとなった。しかし、詳細な情報は公開されていないため、リスク評価に必要な情報の公開が望まれる。

来年度も引き続きナノマテリアルの安全性評価に関わる情報の探索・精査を行っていく。特に、既存の文献データなどから QSAR/Read-across 解析を行うために有用なナノマテリアルの安全評価に関する情報の探索・精査を行っていく

D. 健康危害情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K.Hayashi, A.Tokuda, W.Sakamoto. Hydroxyl Radical-Suppressing Mechanism and Efficiency of Melanin-Mimetic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(8), E2309, 2018.
- (2) K.Hayashi, S.Yamada, W.Sakamoto, E.Usugi, M.Watanabe, T.Yogo. Red Blood Cell-Shaped Microparticles with a Red Blood Cell Membrane Demonstrate Prolonged Circulation Time in Blood. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 4, 2729-2732, 2018.
- (3) K.Hayashi, H.Hayashi, S.Yamada, W.Sakamoto, T.Yogo. Cellulose-based molecularly imprinted red-blood-cell-like microparticles for the selective capture of cortisol. *Carbohydr. Polym.*, 193, 173-178, 2018.
- (4) E.Fukai, H.Sato, M.Watanabe, D.Nakae, Y.Tostuka. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 109(4), 1024-1031, 2018.
- (5) K.Ishii, S.Takahashi, Y.Sugimura, M.Watanabe. Role of stromal paracrine signals in proliferative diseases of the aging human prostate. *J. Clin. Med.*, 7(4), 7, 68, 20168
- (6) G.W. Lee, J.B. Park, S.Y.Park, J.Seo, S.H.Shin, J.W.Park, S.J.Kim, M.Watanabe, Y.S.Chun. The E3 ligase C-CBL inhibits cancer cell migration by neddylation of the proto-oncogene c-Src. *Oncogene*, 37(41), 5552-5568, 2018.
- (7) Y.Fujiwara, M.Nishida, M.Saito, A. IRobles, F.Takeshita, M.Watanabe, T.Ochiya, J.Yokota, T.Kohno, C.C.Harris, N.Tsuchiya. A nucleolar stress-specific p53-miR-101 molecular circuit functions as an intrinsic tumor-suppressor network. *EBioMedicine*, 33, 33-48, 2018.
- (8) Y.Kudo, Y.Sasaki, T.Onodera, J.Hashimoto, T.Nozaiki, K.Tamura, M.Watanabe. Measurement of poly(ADP-ribose) level with enhanced slot blot assay with crosslinking. *Challenges*, 9(2), 27, 2018.
- (9) Y.Nishimura, K.Kasahara, T.Shiromizu, M.Watanabe, M.Inagaki. Primary cilia as signaling hubs in health and disease. *Adv. Sci.*, 16(1), 1801138, 2018.
- (10) 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(4), 537-543, 2018.
- (11) Y. Sakamoto, M. Hojo, Y. Kosugi, K. Watanabe, A. Hirose, A. Inomata, T. Suzuki,

- D. Nakae. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.*, 43(10), 587-600, 2018.
- (12) K. Imai, I. Nakanishi, K. Ohkubo, A. Ohno, M. Mizuno, S. Fukuzumi, K. Matsumoto, K. Fukuhara. Synthesis and radical-scavenging activity of C-methylated fisetin analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, 27(8), 1720-1727, 2018.
2. 学会発表
- (1) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, T. Nittami, E. Usugi, K. Ishii, Y. Hirokawa, 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.
- (2) S. Takahashi, S. Saito, T. Nittami, Y. Totsuka, Y. Nakagawa, M. Watanabe. MicroRNAs profiling of cancer cells after Fe₃O₄ nanoparticles exposure (II). 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (3) S. Saito, S. Takahashi, T. Nittami, Y. Totsuka, Y. Nakagawa, M. Watanabe. Establishment of the substrate made of tissue/organ sections for histopathology based systems for nanotoxicity. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (4) Y-S. Chum, J.B. Park, G. Lee, S.Y. Park, M. Watanabe. Activation of c-Src by neddylation blockade enhanced cancer cell migration through Akt signaling pathway. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (5) K. Ishii, S. Kajiwara, K. Iguchi, M. Kato, Y. Hirokawa, K. Arima, M. Watanabe, Y. Sugimura. Characterization of human prostate cancer LNCaP sublines differing in androgen-sensitivity. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (6) M. Kato, K. Ishii, S. Kajiwara, Y. Hirokawa, K. Arima, M. Watanabe, Y. Sugimura. Fibroblasts disturb the expression of cancer-related genes in non-transformed human prostatic epithelial cell line BPH-1. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (7) K. Ishii, I. Matsuoka, T. Sasaki, M. Kato, K. Nishikawa, H. Kanda, Y. Hirokawa, K. Iguchi, K. Arima, M. Watanabe, Y. Sugimura. Loss of fibroblasts-dependent androgen receptor activation in prostate cancer cells develops castration-resistant prostate cancer. AACR annual meeting 2019, March.29-April.3, Atlanta.
- (8) M. Watanabe, S. Takahashi, E. Usugi, K. Ishii, Y. Hirokawa. Crosstalk between apoptosis and autophagy induced by docetaxel-magnetic nanoparticles with different surface in prostate cancer cells. AACR annual meeting 2019, March.29-April.3, Atlanta.
- (9) 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)
- (10) 戸塚 ゆかり、秋場 望、佐藤 春菜、前迫 有也、松田 知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、十時 泰、柴田 龍弘、中釜 斉. 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第 33 回発がん病理研究会 (御殿場, 2018 年 8 月)

- (11) 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二. 芳香族アミン類の代謝物分析と DNA 付加体 第 33 回発がん病理研究会 (御殿場、2018 年 8 月)
- (12) Y.Totsuka, T.Matsuda, M.Kato, A.Elzawahry, Y.Totoki, T.Shibata, H.Nakagama. Whole genome sequencing analysis elucidates the interaction between environmental factors and causes of human cancer. 第 77 回日本癌学会総会 (大阪、2018 年 9 月)
- (13) 戸塚ゆ加里、佐藤春菜、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、遠藤治. 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
- (14) 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 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
- (15) 前迫侑也、椎崎一宏、高村岳樹、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 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
- (16) 神尾翔真、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里. ナノマテリアルの表面修飾が及ぼす遺伝毒性への影響 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
- (17) 斎藤春吾、渡邊昌俊、戸塚ゆ加里. ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
- (18) 石野孔祐、前迫侑也、内藤善哉、戸塚ゆ加里. 質量分析データに基づく DNA 付加体データベースの整備 第 47 回日本環境変異原学会 (京都、2018 年 11 月)
- (19) 坂本義光、北條 幹、鈴木俊也、猪又明子、守安貴子、広瀬明彦、中江 大. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を単回経気管噴霧投与した後終生飼育したラットの肺および中皮組織における増殖性病変の発生. 第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018 年 7 月 19 日、大阪府大阪市).
- (20) 北條 幹、小林憲弘、長谷川悠子、安藤 弘、久保喜一、海鉾藤文、田中和良、五十嵐海、村上詩歩、多田幸恵、生嶋清美、湯澤勝廣、坂本義光、前野愛、鈴木俊也、猪又明子、守安貴子、高橋祐次、広瀬明彦、中江 大. 多層カーボンナノチューブのマウス気管内投与による発生毒性と肺の炎症との関連性. 第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018 年 7 月 19 日、大阪府大阪市).
- (21) M.Hojo, N.Kobayashi, Y.Hasegawa, Y.Sakamoto, S.Murakami, Y.Yamamoto, Y.Tada, A.Maeno, Y.Kubo, H.Ando, M.Shimizu, Y.Taquahashi, T.Suzuki, D.Nakae, A.Hirose. Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018) (2018 年 9 月 2 日、Belgium 王国 Brussels 市).
- (22) 坂本義光、多田幸恵、北條 幹、前野愛、鈴木俊也、猪又明子、守安貴子、中江 大. ラットにおいて DHPN で誘発されたメソテリン陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性状. 第 35 回日本毒性病理学会学術集会 (2019 年 2 月 1 日、東京都江戸川区).
- (23) 前野 愛、坂本義光、北條 幹、湯澤

- 勝廣，長谷川悠子，鈴木俊也，猪又明子，守安貴子，煙山紀子，美谷島克宏，中江 大．高齡 F344 ラットに自然発生した退形成ジンバル腺癌（anaplastic Zymbal's gland carcinoma）を疑う 2 例．第 35 回日本毒性病理学会学術集会（2019 年 1 月 31 日，東京都江戸川区）．
- (24) 福原 潔、今井耕平、中西郁夫、松本謙一郎、大野彰子．金属イオン配位により活性化する抗酸化物質の開発、日本農芸化学会 2019 年度大会、東京（2019.3）
- (25) 福原 潔，今井耕平，中西郁夫，松本謙一郎，大野彰子．金属錯体形成をトリガーとした新規抗酸化物質の開発：、第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム、京都（2018.11）
- (26) K.Fukuhara, T.Arai, A.Ohno, K.Mori, M.Shibanuma, N.Miyata, H.Nakagawa. Potential lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease: a peptide that blocks amyloid β induced neurotoxicity, ACS Fall 2018 National Meeting, Boston, 2018 August 19
- (27) T.Yamada, M.Kurimoto, M.Miura, T.Kawamura, K.Jojima, N.Taira, H.Ohata, S.Tsujii, A.Ohno, A.Hirose. Establishing mechanistic key event information of repeated dose toxicity to support category-based read-across assessment. 58th Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2019, Baltimore, USA)

F．知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし