

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2年目として、①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 AOP の確立、③自験、文献などのデータによる生体影響に関するワールドワイドなデータの集積に基づくデータベースの構築、④それらの成果に機械学習などによる *in silico* 生体影響予測を組み合わせたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案の4点を引き続き目標とした。①に関して、ヒト3D皮膚再構成系による金属ナノマテリアルの一般毒性評価系の確立し、共培養系を用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価の構築および二酸化チタンでの評価準備を行った（中江、戸塚、林、渡邊）。②に関して、microRNAの挙動から、ナノマテリアル依存性、非依存性の経路で細胞毒性を誘発する可能性及び新規評価項目を見出した（渡邊、花方、林）。③に関して、ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データおよび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項目について精査を行った（大野、三宅）。④に関して、マイクロアレイ解析の一色法と二色法のデータ変換法の開発、機械学習における学習用サンプル情報のラベリング方法および入力特徴量の調整と検討、機械学習に用いる実測データを取得するために酸化亜鉛、二酸化チタンを曝露した細胞毒性を含めた条件の決定を実施した（花方）。

研究分担者：

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
戸塚 ゆかり 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
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
三宅 祐一 静岡県立大学 食品栄養科学部 助教
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
林 幸志朗 九州大学大学院歯学研究院 准教授

研究協力者：

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
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 教授
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。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み合わせ、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。

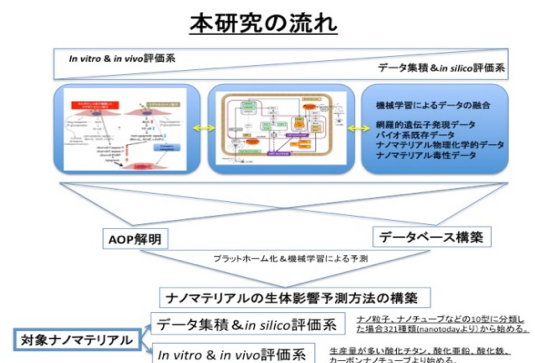


図1. 本研究の流れ

本研究は、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（図1）。以下に平成31/令和元年度の研究報告の概要を記載する。

B. 研究方法、結果および考察

B1. 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

B1-1. 共培養システムによる遺伝毒性試験法（戸塚）：始めに被験物質の調整を行なった。

BMSC-5（カルボキシル基修飾マグネタイトナノ粒子）を4°C、10000 rpm、10 minで遠心分離をし、上清と沈殿に分けた。沈殿したBMSC-5は超純水で再懸濁して遺伝毒性試験に供した。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。

GDL1 単独および共培養条件下のRAW264細胞またはRAW264及びGDL1の両細胞にBMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁を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。結果を図2に示す。BMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁画分曝露群のいずれも溶媒

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。

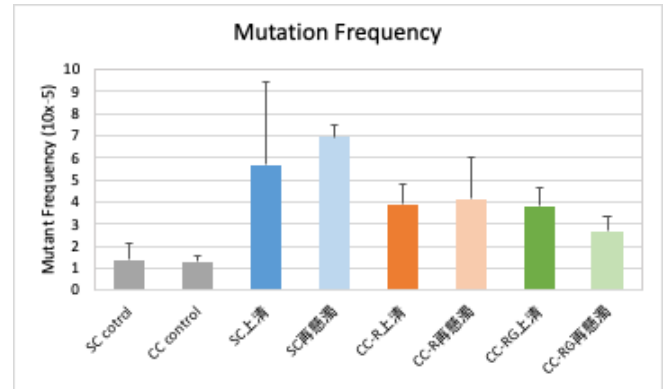


図2. BMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁画分の遺伝毒性評価(SC：単層培養、CC：共培養)

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、その妥当性の評価を行ってきた。先行研究において、表面修飾を有するBMSC-5は表面修飾を有さないBMS-10（非修飾マグネタイトナノ粒子）に比べ細胞への取り込みが悪いにも関わらず、細胞毒性や変異原性が強いことを認めている。このことは、BMSC-5懸濁液内の鉄イオン濃度がBMS-10に比べ高く、鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと推測した。今年度は、この推測を検証するために、BMSC-5を遠心して鉄イオンを含む上清を取り除き、BMSC-5を再懸濁して、*gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べた。GDL1 単独および共培養条件下のRAW264細胞またはRAW264及びGDL1の両細胞にBMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁を曝露し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行ったところ、BMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁画分のGDL1 単独曝露群のいずれも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。

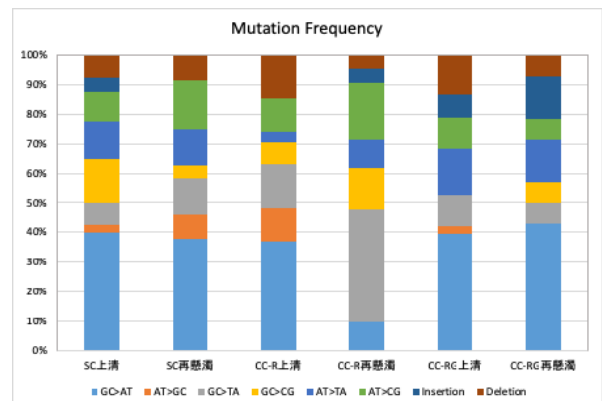


図3. BMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁画分における変異スペクトラム

さらに、さらに、変異原性誘発のメカニズム探索のため、各条件下で誘発される変異スペクトラ

ムの解析を行ったところ、共培養条件下における再懸濁画分曝露群でGC>TA変異の上昇が確認された(図3)。

このことは、GDL1単培養に対する遺伝毒性は鉄イオンと関係がないか、もしくは、遠心分離では完全に鉄イオンが除去されていないか、BMSC-5から常に鉄イオンが放出されているなどの可能性が示唆された。

今後は、再懸濁画分の鉄イオン濃度の測定を行い、鉄イオンが変異に及ぼす影響について検討する。さらに、酸化チタンナノ粒子においても、細胞毒性の有無を確認し、それを基に共培養系での曝露実験、遺伝毒性試験へと進めていく予定である。

B1-2. 共培養システムを用いて二酸化チタンナノ粒子の遺伝毒性評価における各種条件検討(戸塚、林、渡邊) :今年度は、③自験、文献などのデータによる生体影響に関するワールドワイドなデータの集積に基づくデータベースの構築と①ナノ材料の *in vitro* 安全性評価法の高度化という目的に合わせて共通のナノ粒子: 二酸化チタンナノ粒子を用いることにした。すなわち、JRCから標準品である二酸化チタン2種類(JRC ID: JRCNM01005a (NM-105), JRC ID: JRCNM01001a (NM-101))の利用である。先行研究では、細胞毒性試験にニュートラルレッド(NR)を用いていたが、ナノ材料が凝集した際にNRがナノ物質の凝集塊に吸着する問題点があった。二酸化チタンナノ粒子は特に凝集しやすいことから、WST-1法を用いて細胞毒性試験を行うこととし、その条件検討から開始した。実験に供した細胞は、*gpt delta* マウスより樹立されたGDL1、マクロファージ様細胞のRAW246の2種類。96wellプレートにそれぞれ 1×10^4 cells/well、 4×10^4 cells/wellの濃度で播種し、一晚培養した。その後、二酸化チタンナノ粒子を1mg/mLから2段階希釈の濃度で24時間曝露させた。培養液にWST-1試薬を加え、37°Cで2時間インキュベートし、分光光度計にて450 nmの吸光度を測定した。この細胞数で実験したところ、細胞数が多かったため0 mg/mLで分光光度計の検出限界を超えていた。そのため最適な細胞数を決めるために、2段階希釈で細胞濃度を変えて同様の実験をした。その結果、GDL1では 5×10^3 cells/well、RAW246では 1×10^4 cells/wellが最適であることが観察された。今後は、分散性の確認された濃度を含む二酸化チタンナノ粒子溶液に曝露させて細胞毒性を調べ、それを基に共培養系での曝露実験、遺伝毒性試験へと進めていく予定である。

B1-3. ヒト3D皮膚再構成系によるナノ材料の一般毒性評価系の確立(中江) : 昨年までに確立したJ-TEC製LabCyte EPI-MODELを用いたヒト3D皮膚再構成系による金属ナノ材料の一般毒性評価系を用いて、二酸化チタンナノ粒子の評価を行った。ナノ材料二酸化チタンは、JRCNM01001a・01005a共に、125 µg/mL以上の濃度になると、著しく凝集した。

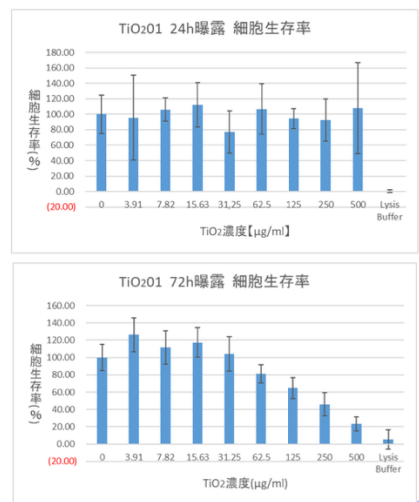


図4. JRCNM01001a01, NHEK 単層培養系, 細胞毒性(WST-8アッセイ;縦軸, %;横軸, µg/mL)

JRCNM01001aは、NHEK細胞(正常ヒトケラチノサイト)単層培養系で72時間培養では62.5 µg/mL群より濃度依存的に強い細胞毒性を示した(図4)。JRCNM01001a05は、72時間培養では濃度依存的に細胞毒性を示す傾向にあった。一方、ヒト3D皮膚再構成系において、いずれの二酸化チタンナノ粒子は、MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった。このことは、本研究で用いた二酸化チタンナノ粒子JRCNM01001a01・001a05は表皮の重層構造を通過しないと考えられ、そのことが表皮の重層構造が二酸化チタンナノ粒子の細胞傷害作用に対する防御効果に関与する可能性が示唆された。また、ヒト3D皮膚再構成系の培地中の二酸化チタン濃度測定と、表皮組織の病理組織学的評価を行った。JRCNM01001a01・001a05は、接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった。

B1-4. ヒト3D皮膚再構成系を用いた遺伝毒性評価系の開発(中江) : 遺伝毒性評価法としては小核試験およびコメットアッセイを候補とし、本年度はまず小核試験から作業を開始した。ヒト3D皮膚再構成系であるLabCyte EPI-MODELを用いた小核試験系の開発に向け、まず、NHEK細胞単層培養系への小核試験導入を試行した。その結果、常法であるCHL/IU細胞を用いた小核試験は

24時間培養で行うが、NHEK細胞では72時間培養を行う必要があることが判明した。現在までに、陽性コントロールであるMMC処置では、小核誘発が成功している(表1)。

表1. NHEK細胞を用いた小核試験における培養時間の検討

培養時間 (h)	被験物質	暴露時間 (h)	1核細胞	2核細胞	3核以上細胞	CBPI	2核細胞		小核細胞比率 (%)
							小核有り	小核無し	
24	MMC	3	478	29	0	1.1	-	-	-
72	DMSO	3	332	130	39	1.4	134	882	13.2
	MMC	3	420	227	27	1.4	298	703	29.8*
	DMSO	6	319	232	19	1.5	92	960	8.7
	MMC	6	320	166	15	1.4	226	776	22.6*

(MMC曝露ではS9mix非使用、*p<0.01、空欄は2核細胞が少数のため実施せず)

B2. 有害性発現経路の確立

B2-1. microRNAの挙動からの酸化鉄ナノ粒子(Fe₃O₄-NPs)の細胞への影響解析(渡邊・林・花方) : 酸化鉄ナノ粒子(Fe₃O₄-NPs)のA549細胞への影響をmicroRNA(miR)の発現とその標的について、前年度に引き続き解析を行った。酸化鉄ナノ粒子(Fe₃O₄-NPs)を各濃度でA549細胞に24時間の曝露後、リアルタイムPCRを用いてmiR-5787、494-3p、1207-5pの発現解析を行った(図3)。miR-1207-5pにおいて、濃度依存的に発現量は増加し、miR-5787、miR-494-3pでは、400 µg/mLより200 µg/mLにおいて、発現量が増加した。また、N-acetylcystein (NAC)で活性酸素種(ROS)発生を抑制すると、いずれもの発現量が抑制されるも、完全には抑制されなかった。過酸化水素で処理した場合、いずれも発現量が上昇し、なおかつNAC処理において、発現がほぼ抑制されるのを認めた。これら3種類のmicroRNAはROSを減少させると発現量が減少するが、必ずしも完全には抑制されなかった。これはナノ粒子によるROS依存的な発現制御のみならず、ナノ粒子自体の細胞への影響による可能性も考えられた。miR-1207-5pの発現はROS依存的と考えられた。

miRの標的遺伝子であるeIF5の発現が抑制されることを報告してきたが、過酸化水素では抑制されず、eIF5の挙動は活性酸素種非依存的と考えられた。

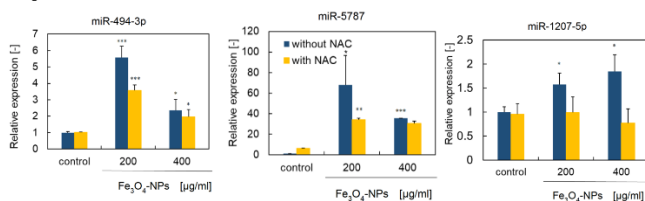


図5. 酸化鉄ナノ粒子24時間曝露後のmiRの発現

磁性体ナノ粒子曝露により、特に200 µg/mLにおいて、eIF5の発現量は半分程度まで減少するも、NAC処理によりコントロール程度まで回復す

るのを認めた。ROS依存的eIF5発現の変化が確認された。

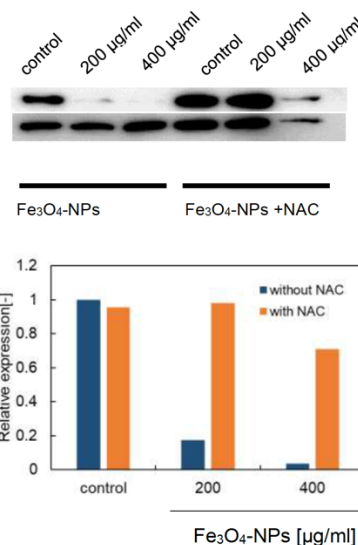


図6. 酸化鉄ナノ粒子曝露後のeIF5の発現

B2-2. 新規ナノマテリアル毒性評価指標の探索

今年度は、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に関して、新規ナノマテリアル毒性評価指標の可能性について、解析を始めた。その指標は、一次線毛動態である。一次線毛は細胞膜上に生じる不動性の突起物であり、この出現は中心体の消失とともに細胞周期を停止させる。比較的容易に観察できることより、A549細胞での一次線毛を特異的な抗体で確認をした(図6)。同細胞に障害を与えると、消失することより、細胞への障害と一次線毛の動態が関係する可能性を考え、ナノマテリアルの毒性との関係を探る予定である。

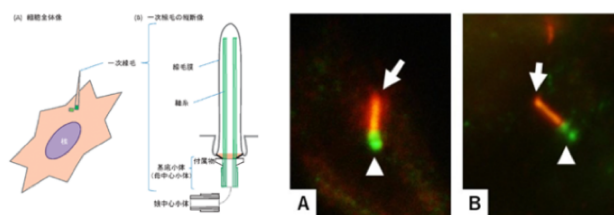


図7. 一次線毛について

B2-3. 本研究グループが使用する酸化チタンナノ粒子の物性評価と細胞毒性評価(林、渡邊) :

B1-2と同様に新たに追加の共通のナノ粒子: 二酸化チタンナノ粒子を用いることにした: 二酸化チタンナノ粒子 (AMT100, AMT600, MT150, MT500, TKP102, テイカ株式会社, 大阪)。ゼータ電位・ナノ粒子径測定装置 (DelsaMax PRO, Beckman Coulter, Inc., Georgia) を用いて、これら二酸化チタンナノ粒子の超純水中およびFBS含有DMEM中での粒度分布およびゼータ電位を測定した。測定は酸化チタンナノ粒子濃度15.6, 31.3,

62.5 µg/mLで行った。

AMT100, AMT600, MT150, MT500, TKP102の一次粒子径は6, 30, 15, 35, 15 nmである。しかし、超純水中での粒度分布（図7）をみると、いずれのナノ粒子も凝集しており、一次粒子径のピークは存在せず、サブミクロン～ミクロンサイズ領域にピークがみられた。つまり、これらの酸化チタンナノ粒子は超純水中でサブミクロン～ミクロンサイズの凝集体として存在していることが明らかになった。

図8にFBS含有DMEM中での粒度分布を示す。超純水中よりも大きな凝集体を形成していた。また、FBS含有DMEM中では、超純水中に比べて、凝集体の粒度分布が広いことが明らかになった。

表2に超純水中およびFBS含有DMEM中でのゼータ電位を示す。超純水中およびFBS含有DMEM中ではいずれの二酸化チタンナノ粒子もネガティブチャージであったが、超純水中においてその絶対値が大きくなった。

表2. FBS含有DMEM培養液と超純水中での二酸化チタンナノ粒子のゼータ電位

TiO ₂ サンプル名	濃度 (µg/mL)	DMEM+FBS中でのゼータ電位 (mV)	超純水のゼータ電位 (mV)
AMT100	15.6	-4.9	-64.4
AMT100	31.3	-5.6	-75.9
AMT100	62.5	-6.4	-56.6
AMT600	15.6	-6.2	-24.9
AMT600	31.3	-4.6	-99.5
AMT600	62.5	-6.9	-89.6
MT150	15.6	-1.4	-45.3
MT150	31.3	-7.2	-77.6
MT150	62.5	-5.8	-68.4
MT500	15.6	-3.0	-30.3
MT500	31.3	-4.8	-32.0
MT500	62.5	-6.7	-22.8
TKP102	15.6	-2.3	-25.9
TKP102	31.3	-0.4	-26.1
TKP102	62.5	-3.1	-27.8

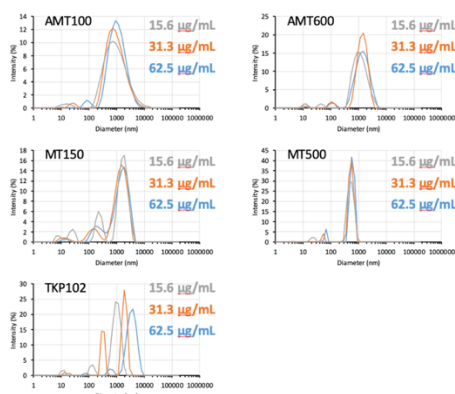


図8. 超純水中での二酸化チタンナノ粒子の粒度分布

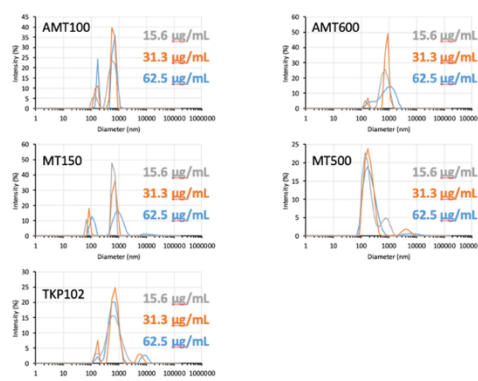


図9. FBS含有DMEM中の二酸化チタンナノ粒子の粒度分布

二酸化チタンナノ粒子は超純水中およびFBS含有DMEM中では一次粒子としては存在しておらず、サブミクロン～ミクロンサイズの凝集体として存在していた。特にFBS含有DMEM中において、凝集の程度が強く、大きな凝集体を形成していた。FBS含有DMEM中では超純水中に比べてゼータ電位の絶対値が小さくなっていった。以上より、FBS含有DMEM中ではFBSがナノ粒子に吸着し、ゼータ電位の絶対値が小さくなることから、凝集しやすくなり、超純水中に比べて大きな凝集体が形成されたと考えられる。また、FBS間の相互作用も、酸化チタンナノ粒子の凝集を引き起こした原因であると考えられる。

一次粒子径が等しいMT150とTKP102を比較すると、これらは異なる粒度分布を示していた。これは各ナノ粒子の表面処理の違いが反映されていると考えられる。具体的な表面処理方法は不明であるが、MT150は有機酸により表面処理されているため、TKP102よりも超純水中での粒子径が小さく、ゼータ電位の絶対値が大きくなったと考えられる。酸化チタンナノ粒子濃度が高くなるにつれて、二次粒子径が増大する傾向がみられた。これは濃度が高くなるにつれて、粒子間距離が短くなり、凝集しやすくなることが原因であると考えられる。

また、これらの二酸化チタンナノ粒子をA549細胞に曝露し、細胞毒性の評価を行った。不溶性の二酸化チタンナノ粒子の評価方法を新たに作成した。結果的には、既存報告と同様にいずれもControl群（非曝露群）に対して曝露群の多くにおいて、細胞増殖が促進するのを認め、MT150やAMT100などでは、細胞増殖は低濃度域ではControl群と同等程度か以下である可能性を認めた。

B3. 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

B3-1. ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データの探索・精査（三宅）：ナノマテリアルを含むスプレー等の消費者製品を使用した際、使用者へのナノマテリアルのリスクを評価するためには、曝露量を調査することが必要である。ただし、ナノマテリアルの曝露量を実測することは困難であるため、一般的に曝露評価ツールを使用して曝露量の推算が行われている。消費者製品からの化学物質や粒子の曝露評価ツールとしては、産業技術総合研究所（AIST）が開発した室内製品曝露評価ツールAIST-ICET（Indoor Consumer Exposure Assessment Tool）とオランダ国立公衆衛生環境研究所（RIVM）が開発したConsExpo-nanoがよく知られており、この2種のツールについてナノマテリアル曝露評価に必要な情報を調査した。AIST-ICETは、消費者製品を含む室内製品に含まれる化学物質のヒトへの経気道・経口曝露量に加え、経皮曝露量を推定するために開発されたツールである。混合物（例えば、洗剤や殺虫剤など）だけでなく、成形品（例えば、家電や家具など）からの曝露量の推定も可能であり、製品開発時の安全性評価や製品事故時のリスク評価への活用が想定されている。一方、ConsExpo-nanoは、塗料や洗剤、パーソナルケア製品などの消費者製品からの化学物質の曝露量を評価するツールである。ConsExpoをナノマテリアルの評価に特化したツールである。スプレー型の消費者製品に含まれるナノマテリアルの消費者への曝露量を推定することが可能なツールである。ナノマテリアルを含むスプレー型の消費者製品を使用した際、使用者へのナノマテリアルの曝露量を推定するために必要なパラメータを、AIST-ICETおよびConsExpo-nanoごとに列挙し、まとめた。AIST-ICETの場合は、噴霧時間（sec）、噴霧量（g/sec）、化学物質比率（wt%）、気中画分（%）、10 μm以下粒子比率（%）、初期クラウド体積（m³）が推定に必要なパラメータであった。このうち1秒あたりの噴霧量（製品の分類と方式によってそれぞれデフォルト値が用意されている）、対象成分比率、気中比率、粒径が10 μm以下の粒子比率、初期クラウド体積は、デフォルト値が用意されており、それぞれ0.028–2.0 g/sec、0.4–9%、100%、0.1–38%、0.0625 m³であった。ただし、化学物質の曝露評価が主な目的であるために、ナノマテリアルの性状に関するパラメータは設定できず、ナノマテリアルの曝露評価を適切に行えるのかの検証が必要であると考えられる。一方、ConsExpo-nanoで設定できるパラメータは、曝露時間（min）、エアロゾル粒子密度（g/cm³）、製品に含まれる対象物質の重量割合（-）、エアロゾルの直径（μm）、変動係数（-）、最大粒径

（μm）、噴霧速度（g/sec）、製品に含まれる不



図10. ConsExpo-nanoを用いた評価結果例

揮発性物質の重量割合（-）、気中比率（%）、噴霧時間（sec）、部屋の体積（m³）、部屋の高さ（m）、換気速度（h⁻¹）、ナノマテリアル密度（g/cm³）、ナノ粒子直径（nm）、ナノ粒子高さ（nm）、ナノ粒子厚み（nm）、ナノ粒子表面積（nm²）、溶解率（day）、曝露頻度（year）、シミュレーション時間（day）、呼吸速度（m³/h）、噴霧1秒後の雲の体積（m³）、平均粒径（μm）であり、ナノマテリアルの性状を条件設定することが可能であった。ほとんどのパラメータにおいてデフォルト値が設定されていたが、ナノマテリアル密度（g/cm³）、ナノ粒子直径（nm）、ナノ粒子高さ（nm）、ナノ粒子厚み（nm）、ナノ粒子表面積（nm²）のようなナノマテリアルの性状については入力する必要があった。これらの情報を収集・整理しておくことができれば、効果的に曝露評価することが可能となる。ConsExpo-nanoを用いた評価結果例を図7示す。

今後、ナノマテリアルの曝露量の推定に必要なパラメータの感度解析を行うことで、各パラメータのアウトプットに対する影響を定量的に評価し、曝露量評価に重要なパラメータを特定する。これらの結果から、推定に必要なパラメータをより効率的に収集し、実用的なデータベースの構築を行う。また、行政関係者および事業者などが効率的にナノマテリアルの曝露・リスク評価を行えるようにするために、ナノマテリアルを含むスプレーを使用した際の曝露量推定などをケーススタディとして、上記ツールのテクニカルガイダンスを作成する予定である。

B3-2. ナノマテリアルの各種毒性試験に基づく有害性情報のデータベースの作成（大野）：

本研究で実施する対象化合物は、6種の二酸化チタンナノ粒子（TiO₂ NPs：NM100-NM105, P25）とした。

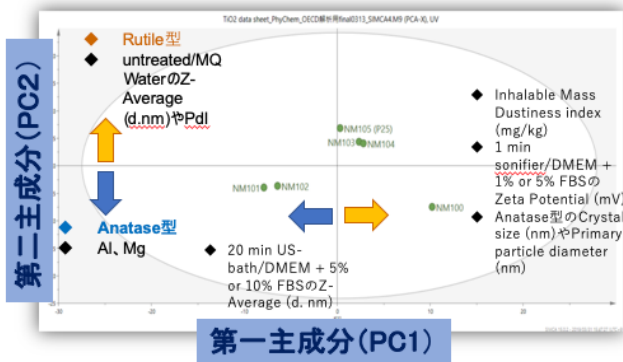


図 12. PCA 解析の結果

[3 種類の二酸化チタンナノ粒子の反復投与吸入毒性試験の多変量解析]

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、エンドポイントとして肺の毒性結果が明らかとなっていたことから、本データを解析対象とし、LC20 の算出と多変量解析を行った。

LC20 : Endpoint として毒性影響が明らかな総細胞数 (LOEL 値 : NM103(12 mg/m³)、NM104(12 mg/m³)、NM105(48 mg/m³))、多形核白血球数 (LOEL 値 : NM103(48 mg/m³)、NM104(12 mg/m³)、NM105(48 mg/m³) について、原典に戻り細胞数から推定される対照群から高用量群で増加する細胞数の約 20% 付近 (0 mg/m³ を control とした Total cell numbers : 3 倍、PMN : 100 倍付近の値) の曝露濃度を LC20 として曝露濃度を再算出した結果、毒性の強さは NM104 > NM103 > NM105 であった。

多変量解析の結果は表 5 に示す。

表 5 多変量解析の結果

NM104	NM103	NM105
強	> 毒性の強さ >	弱
毒性に主に寄与している物理化学的性状項目		
Specific surface area (m ² /g) の SAXS surface (m ² /g) : 空孔	Number Dustiness index (1/mg) : 全重量に対する巻き上がり粒子数	Mass median aerodynamic diameter (MMAD)(μm) : 空気力学的重量中位径 (主に二次粒子径)
BET surface (m ² /g) : 比表面積	Porosity : 多孔性等	Composition : 珪の含有量

[in vitro 細胞毒性試験について]

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 (ug/mL) の項目について収集した。①同一アッセイ条件 (曝露時間、アッセイ法、細胞種) の組み合わせにおいて、統一されたデータ条件と、②TiO₂ NPs 間で横断的に細胞毒性評価の試験データが揃っていない (アッセイ法や細胞種の違いにより毒性の結果が異なる) ことから、今後、体系的な実験的データの収集が必要であった。

eNanoMapper データベース : NM103 のみ EC50 (ug/mL) >100 が記載されていた項目について収集した。しかしながら、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。

[二酸化チタンナノ粒子の HESS DB 搭載に向けた情報整理及びデータシートの作成]

有害性情報に関しては、今後、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、規格化されたシートをひな形として用い、今回情報収集した 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した (図 13)。

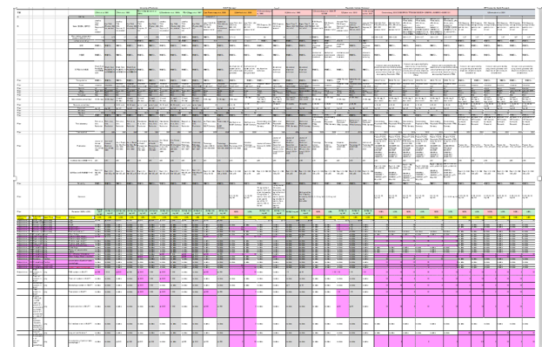


図 13. HESS DB 搭載に向けたデータシートの作成

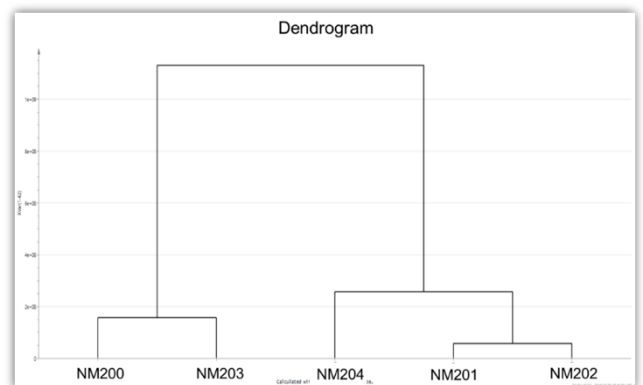


図 14. デンドログラム

現在、同様に二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NPs) も解析を行った。SiO₂ NPs の情報収集は、試験データ項目 (特に有害情報) が多く揃っている 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た評価文書 (dossier) より 5 種の SiO₂ NPs (NM200-NM204) および EU FP7 eNanoMapper project で開発されたナノマテリアルの毒性データベース <https://data.enanomapper.net/> (以下、「eNanoMapper」と記載) とし、これらに収載された物理化学的性状データと有害性情報についてデータシートの作成を行った。有害性情報は、ナノマテリアルの投与試験で、特に肺への毒

性所見をエンドポイントとした吸入毒性試験および気管内投与試験法の反復投与毒性試験、*in vivo/in vitro* 遺伝毒性試験、*in vitro* 細胞毒性試験を対象としている。

階層的クラスタリング解析を実施し、全5物質のSiO₂ NPsの62項目についてクラスタ化し類似性が示された(図14)。以下、詳細は分担報告書を参照いただきたい。

B4. 機械学習などによる*in silico*生体影響予測の準備 (花方) :

B4-1. ZnO曝露細胞の一色法マイクロアレイ解析及び一色法と二色法の比較: マイクロアレイ解析の既存の遺伝子発現データベースを利用するには一色法と二色法のデータをコンバートする必要がある、その手法の開発、機械学習においてはサンプル情報をラベリングしなければならないが、その方法の検討、および機械学習における入力特徴量についての調整を目指した。

THP-1細胞およびA549細胞に対して、酸化亜鉛(ZnO) 300 µg/mL (THP-1細胞) または 60 µg/mL (A549細胞) で、6時間または24時間曝露し、Agilent SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60K Ver. 3.0 (G4851C; GEO platform: GPL21185) を用いてマイクロアレイ解析を行った。また、前年度に行った二色法のデータを利用し、比較を行った。一色法のデータから二色法のデータに変換した結果、4つのケースのうち3つでは良好な対応関係が見られた。しかしながら、残り1つのケースでは適切な対応関係が得られなかった。原因は実験サンプルの問題と思われるが、データ変換について良好な対応が見られる場合でもピアソンの相関係数は高々0.76~0.90となっており、一色法から二色法にデータ変換した場合にはこれくらいの誤差を含むことに留意する必要がある。一方で二色法から一色法への変換についても考えると、二色法における2つのサンプルのうち1方の発現強度について既知であれば、変換は可能と思われる。

同一RNAサンプルに対する一色法と二色法のマイクロアレイ解析データからコンバート手法の開発に関して、遺伝子発現データベースは主にGEOデータベースを利用した。機械学習におけるサンプル情報のラベリングを手動で行うのは大量のデータについては困難なので、サンプルのディスクリプション情報から自動でラベリングしてみたが、精度に問題があることが判明した。入力特徴量については計算機の能力からある程度削減する必要があり、変動の小さい遺伝子を除く方向で検討している。

B4-2. 二酸化チタンの毒性試験: 標準ナノマテリアルとして7種類の酸化チタン (MT-150A, MT-500B, AMT-100, AMT-600, TKP-102, TiO₂-1001, TiO₂-1005) を細胞に曝露した時の遺伝子発現マイクロアレイ解析の前段階としてこれらの二酸化チタンの毒性をCCK-8法により評価した。使用した細胞はTHP-1細胞とRAW264細胞の2種類で、96ウェルプレートを使用。THP-1細胞は500,000 cells/mLを50 µL/wellで播種し、酸化チタンは1 mg/mLに調製し、1時間のソニケーションで分散させて、0, 500, 1000 µg/mLになるように加えて、ウェルの終量は100 µLとした。37°Cで24時間培養した後、CCK-8を10 µL/well加えて4時間後に450 nmの吸光度を測定した。RAW264細胞は70,000 cells/mLを100 µL/wellで播種し、37°Cで24時間培養した後、二酸化チタンを同様に加えて、さらに24時間培養してから、CCK-8で同様に吸光度を測定した。

7種類の酸化チタンについてCCK-8による毒性試験を実施した結果、THP-1細胞に対しては7種類とも顕著な影響は認められなかった(図15)。

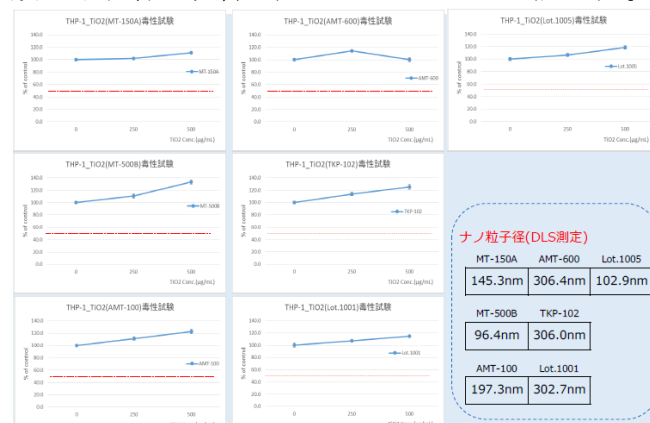


図15. THP-1への影響

一方でRAW264細胞においては、MT-150A, MT-500B, TiO₂-1005の3種類では影響がみられなかったものの、AMT-100, AMT-600, TKP-102, TiO₂-1001の4種類では毒性が認められた(図16)。今回は7種類に酸化チタンについて毒性評価を行なったが、THP-1細胞とRAW264細胞で異なる結果を示すナノ粒子もあった。これらについてマイクロアレイ解析も実測し、機械学習のモデルを検証するデータとして利用したい。

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と機械学習による生体影響予測を目指しており、機械学習のモデルについて検討を続けているが、データ量を増やしていく必要がある。標準ナノマテリアルとしての二酸化チタンは種類によっては細胞毒性を示しており、マイクロアレイ解析を行って実測データとして利用す

る予定である。

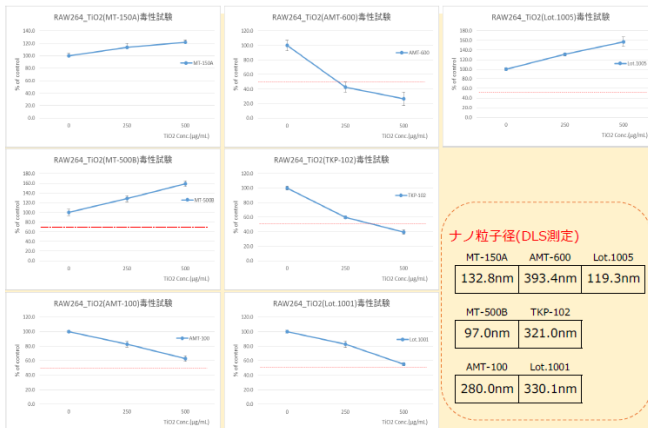


図16. RAW264への影響

C. 結論

本年度の研究のまとめを図15に示す。*in vitro*系と*in silico*系の統合を図るべく、共通のナノ粒子（二酸化チタンナノ粒子など）を用い、①ナノマテリアルの*in vitro*安全性評価法の高度化、③自験、文献などのデータによる生体影響に関するワールドワイドなデータの集積に基づくデータベースの構築の実現化を目指した。特に、③に関しては、6種の二酸化チタンナノ粒子（TiO₂ NPs）及び5種類の二酸化ケイ素ナノ粒子（SiO₂ NPs）を利用し、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たドシエの評価文書およびナノマテリアルのデータベースeNanoMapperに収載されている物性データと有害性情報の試験データについて収集し、可能な限りの物性について、様々な統計方法による特性解析および毒性評価を行い本解析手法の有用性について検討した。ナノマテリアルの安全性評価において、多変量解析法は物性と有害性の関連性について有用な解析手法であることが示唆された。この手法を用いて、酸化鉄、二酸化ケイ素ナノ粒子についても解析を進める。酸化鉄（マグネタイト）で構築された*in vitro*系評価系について、自験データを③に組み込むように、また本研究の*in vitro*評価系の有用性についての評価のために二酸化チタンナノ粒子などを用いた解析をさらに進める。

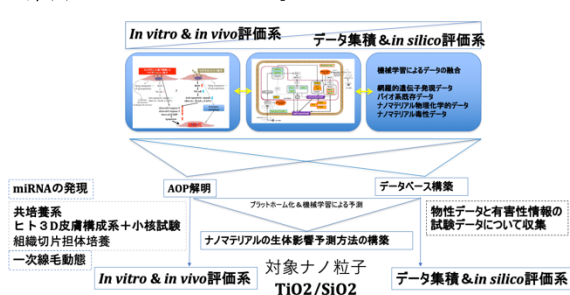


図15 本研究のまとめ

（倫理面の配慮）

本研究においては、樹立培養細胞株を使用する。遺伝子実験の必要性が出た場合に関しては、大学を含む各施設における組換えDNA実験安全管理規則に則って行い、必要に応じて所属研究機関の関連委員会に計画を申請、審査を受けた上で研究を進める。動物実験を行う場合には、動物愛護の観点から、実験動物に無用の苦痛を与える実験計画を避け、動物に対する苦痛が最小となるように努め、所属研究機関の関連委員会の承認を得る。また、ヒト由来試料を用いて研究する場合は、各研究者の所属施設の倫理委員会の承諾を得るものとする。

通達「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」（厚生労働省労働基準局，基発第0207004号，平成20年2月7日）に基づいて、実験環境管理を行う。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. [Hayashi K](#), Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Carbonate Apatite Micro-Honeycombed Blocks Generate Bone Marrow-Like Tissues as well as Bone. *Adv Biosys*, 3, 1900140, 2019.
2. [Hayashi K](#), Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Honeycomb blocks composed of carbonate apatite, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite for bone regeneration: effects of composition on biological responses. *Mater Today Bio*, 4, 100031, 2019.
3. [Hayashi K](#), Munar ML, Ishikawa K. Carbonate apatite granules with uniformly sized pores that arrange regularly and penetrate straight through granules in one direction for bone regeneration. *Ceram Int*, 45, 15429-15434. 2019.
4. Shi R, [Hayashi K](#), Bang LT, Ishikawa K. Effects of surface roughening and calcite coating of titanium on cell growth and differentiation. *J Biomater Appl*, 34, 917-927, 2019.
5. Ishikawa K, Arifta T, [Hayashi K](#), Tsuru K. Fabrication and Evaluation of Interconnected Porous Carbonate Apatite from Alpha Tricalcium Phosphate Spheres. *J Biomed Mater Res B*, 107, 269-277, 2019.
6. Sakemi Y, [Hayashi K](#), Tsuchiya A, Nakashima Y, Ishikawa K. Fabrication and Histological Evaluation of Porous Carbonate Apatite Block from Gypsum Block Containing Spherical Phenol Resin as a Porogen. *Materials*, 12, 3997, 2019.
7. [Hayashi K](#), Munar L.M, Ishikawa K. Effects of macropore size in carbonate apatite honeycomb

- scaffolds on bone regeneration. *Mat Sci Eng C*, 111, 110848, 2020.
8. Hayashi K, Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Granular Honeycombs Composed of Carbonate Apatite, Hydroxyapatite, and β -Tricalcium Phosphate as Bone Graft Substitutes: Effects of Composition on Bone Formation and Maturation. *ACS Appl Bio Mater*, 3, 1787-1795, 2020
 9. Putri TS, Hayashi K, Ishikawa K. Bone regeneration using β -tricalcium phosphate (β -TCP) block with interconnected pores made by setting reaction of β -TCP granules. *J Biomed Mater Res A*, 108A, 625-632, 2020.
 10. Swe TT, Shariff KA, Mohamad H, Ishikawa K, Hayashi K, Bakar MHA. Behavioural response of cells and bacteria on single and multiple doped Sr and Ag S53P4 Sol-Gel Bioglass. *Ceram Int* <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.04.094>
 11. 林幸壱朗, “骨髄様組織を形成するハニカムスキャフォールド” *BIO INDUSTRY*, シーエムシー出版, 2月号, 24-33, 2020.
 12. K.Ishii, T.Sasaki, K.Iguchi, M.Kato, H.Kanda, Y.Hirokawa, K.Arima, M.Watanabe, Y.Sugimura. Pirfenidone, an anti-fibrotic drug, suppresses the growth of human prostate cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest. *J Clin Med*, 8(1), 44, 2019.
 13. E.Usugi, K.Ishii, Y.Hirokawa, K.Kanayama, C.Matsuda, K.Uchida, T.Shiraishi, M.Watanabe. Anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses proliferation of human pancreatic cancer cells by inducing G0/G1 cell cycle arrest. *Pharmacology*, 103(5-6), 250-256, 2019.
 14. K.Kanayama, H.Imai, E.Usugi, T.Shiraishi, YS Hirokawa, M.Watanabe. Letter to the editor: reply to Antonio Ieni “Intratympanic HER2 heterogeneity in early gastric carcinoma: potential bias in therapeutic management”. *Virchow Arch*, 474(3), 403-404, 2019.
 15. Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. 2019 Jun 20.
 16. Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats. *Mutagenesis*. 34 (3): 279-287, 2019.
 17. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Kato M, Nagai M, Elzawahry A, Totoki Y, Nakamura H, Hosoda F, Shibata T, Matsuda T, Matsushima Y, Song G, Meng F, Li D, Liu J, Qiao Y, Wei W, Inoue M, Kikuchi S, Nakagama H, Shan B. DNA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China. *Chem Res Toxicol*, 32 (8),1515-1527, 2019.
 18. ○Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL. High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Res.* 847, 403022, 2019.
 19. Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res.* 2019 in press.
 20. Imai K, Nakanishi I, Ohkubo K, Ohno A, Mizuno M, Fukuzumi S, Matsumoto K, Fukuhara K. Synthesis and Radical-Scavenging Activity of C-Methylated Fisetin Analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, 27 (8), 1720–1727, 2019.
- ## 2. 学会発表
- (1) ○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.30-April.3, 2019, Atlanta.
 - (2) 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.30-April.3, 2019, Atlanta.
 - (3) ○渡邊昌俊. 酸化鉄ナノ粒子はドキシソルビシンの前立腺癌細胞への細胞毒性に対してパラドキシカルな影響を示す. 第 108 回日本病理学会総会, 東京国際フォーラム, 2019 年 5 月.
 - (4) ○渡邊昌俊, 中野洋. カーボンナノチューブ曝露における癌細胞株の microRNA 網羅的発現解析. 第 66 回日本臨床検査医学会学術集会, 岡山コンベンションセンター, 2019 年 11 月.
 - (5) ○渡邊昌俊. 腫瘍に対するビオミメティックなマテリアルのプラットフォーム構築. 第 9 回日本泌尿器病病理研究会学術集会, 日本橋ライフサイエンスビル, 東京, 2020 年 2 月.
 - (6) 渡邊昌俊, 上村博司. 前立腺癌の遊走・浸潤への Zyxin の関与について. 第 78 回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019 年 9 月.
 - (7) 中川泰久, 石井健一朗, 藤原雅也, 臼杵恵梨,

- 広川佳史, 杉村芳樹, 渡邊昌俊. 粘性基質上培養でのヒト前立腺癌細胞と線維芽細胞の3次元構造形成に関わる評価. 第78回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019年9月.
- (8) ○大塩里紗, 中川泰久, 渡邊昌俊, 飯島一智. 磁性体ナノ粒子の抗前立腺癌活性におけるmiRNA発現の解析. 第78回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019年9月.
- (9) 臼杵恵梨, 石井健一郎, 広川佳史, 金山和樹, 松田知世, 渡邊昌俊. 抗線維化薬ピルフェドニンは細胞周期のG0/G1期停止を誘導することによってヒト膀胱癌細胞の増殖を抑制する. 第78回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019年9月.
- (10) Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS (東京, 2019年11月)
- (11) Iwamura K, Shimada H, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Endo O, Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 6th ACEM-48th JEMS (東京, 2019年11月)
- (12) ○Ono H, Nagai M, Narushima D, Hamamoto R, Totsuka Y., Kato M. Detection of DNA adducts by nanopore sequencing using deep learning. 6th ACEM-48th JEMS (東京, 2019年11月)
- (13) Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 日本癌学会学術総会シンポジウム. (京都, 2019年9月)
- (14) Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using Comprehensive DNA Adduct Analysis (DNA Adductome Analysis) 2nd Hebei International Forum on Theory and Oractice of Cancer Prevention and Control (石家庄, 2019年7月)
- (15) Totsuka Y. How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting (リヨン, 2019年7月)
- (16) ○戸塚ゆ加里. ナノマテリアルの遺伝毒性評価の動向—JRC会議に参加して— MMS定例会 (京都, 2019年6月)
- (17) ○戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としてのDNAアダクトーム解析の展望 日本毒性学会シンポジウム (徳島, 2019年6月)
- (18) ○政所陽菜 他. ヒト3D皮膚再構成系によるfolpetの経皮毒性評価法の検討. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2020年2月13日, 東京都世田谷区).
- (19) ○小川秀治 他. ヒト3D皮膚再構成系を用いた金属ナノマテリアルの経皮膚毒性評価. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2020年2月14日, 東京都世田谷区).
- (20) ○大野彰子, 山田隆志, 広瀬明彦. 「データベースを活用した神経毒性の*in silico*予測手法の開発」第46回日本毒性学会学術年会 (徳島, 2019年6月)
- (21) 福原 潔, 今井耕平, 中西郁夫, 大久保 敬, 大野彰子, 水野美麗, 福住俊一. 「C-メチルフィセチンのラジカル消去活性」第72回日本酸化ストレス学会学術集会 (北海道, 2019年6月)
- (22) 福原 潔, 中西郁夫, 今井耕平, 松本謙一郎, 大野彰子. 「鉄錯体形成をトリガーとした新規抗酸化物質の開発」第43回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (京都, 2019年9月)
- (23) ○大野彰子, 渡邊昌俊, 広瀬明彦. 「多変量解析手法を用いた二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状に基づく毒性評価への応用」 (京都, 2020年3月)
- (24) 福原 潔, 中西郁夫, 大久保敬, 今井耕平, 水野美麗, 松本謙一郎, 大野彰子. 「C-メチルフラボノイドのラジカル消去作用」日本農芸化学会2020年度大会 (東京, 2020年3月)
- (25) Fukuhara K., Imai K., Nakanishi I, Matsumoto K., Ohno A. Planar catechin conjugated with DTPA as a promising antioxidant triggered by Fe³⁺ coordination, 258th ACS National Meeting, (August, 2019, San Diego, USA)
- (26) ○大野彰子. 「薬学研究分野 (医薬品・食品・化学物質) への多変量解析法の活用例」 Umetrics 日本ユーザー会 2019 (東京国際フォーラム, 2019年12月)

E. 知的所有権の取得状況

1. 石川 邦夫, 林 幸壺朗, 土谷 享, 岸田 良, 中島 康晴, 医用ハニカム構造体, 成形型, および製造方法, 特願 2020-38167, 2020年3月5日
2. 石川 邦夫, 林 幸壺朗, 土谷 享, 岸田 良, 中島 康晴, 炭酸アパタイト被覆材料およびその製造方法, 特願 2020-063503, 2020年3月31日