

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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

およびリスク低減化に関する研究

平成 29 年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者 渡邊 昌俊

平成 30 (2018) 年 5 月

| | |
|--------|---|
| 渡邊 昌俊 | 国立大学法人三重大学大学院医学系研究科 教授 |
| 林 幸壱朗 | 国立大学法人九州大学大学院歯学研究院 助教 |
| 戸塚 ゆ加里 | 国立研究開発法人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 |

目次

I. 総括研究年度終了報告

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 1

渡邊 昌俊

II. 分担研究年度終了報告

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・エピジェネティックマーカーの検索・ナノマテリアルの細胞内動態および機能解析 15

渡邊 昌俊

2. ナノマテリアルの作製及びキャラクタリゼーション 19

林 幸壺朗

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 22

戸塚 ゆ加里

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 26

中江 大

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 45

宮島 敦子

6. ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析 57

花方信孝

7. 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析 65

河上 強志

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 76

I. 総括研究年度終了報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究年度終了報告書

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価及びリスク低減化に関する研究

研究代表者 渡邊 昌俊 三重大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：本研究は、ナノマテリアルの適切な物性解析、新規 *in vitro* 評価系の確立、細胞内応答機構等の解析で従来の評価系との比較検討、新たなマーカーの確立、適切な動物実験等による妥当性の検証を目的とした。平成29年度（3年計画の3年目）は、次のような成果を得た。ナノ粒子の合成条件を最適化することによる精密な形状制御およびサイズ制御できる方法、一次粒子径や二次粒子径と細胞毒性との関係から、溶出イオンや細胞内取り込みの重要性を示した。解決しなければならない問題もあるが、マウス肺より樹立した細胞株(GDL1細胞) とマクロファージ(RAW264.7)の共培養システムの可能性を示した。3D皮膚モデル(LabCyte EPI-MODEL)を用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築では、単層培養と比較しながら、病理学的、生化学的など多面的に解析し、皮膚組織のナノ粒子侵入に対するバリア機能などを明らかにし、*in vivo*に外装できる皮膚一般毒性評価系として使用できる事を示した。カーボンナノチューブ(CNT)のA549、DU145細胞への曝露実験で、網羅的遺伝子発現解析を行い、miRNA発現のクラスタリング解析から、ナノマテリアルによる特徴的なmiRNA変動、すなわちマーカー抽出の可能性を示した。加えて、ナノ粒子がエクソソームの放出に及ぼす影響を調べた結果、単球およびマクロファージがリン酸カルシウム粒子を取り込むと、放出するエクソソーム量が増加することを見出した。組織特異的な特徴を示すA549細胞の切片担体培養系の使用可能性を示した。また、酸化鉄ナノ粒子の細胞への影響は、粒子側の修飾によるROS産生の有無を起点とするautophagyの関与を明らかにし、有害性発現経路に関わる結果を示した。

研究分担者：

林 幸彦朗 名古屋大学未来材料・システム研究所 助教
戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所・発がん・予防研究分野 ユニット長
中江 大 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 教授
宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長
花方 信孝 国立研究開発法人物質・材料研究開発機構 技術開発・共用部門 副部門長
河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

研究協力者：

小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

比留間 瞳 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
加藤 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官
美谷島 克宏 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 准教授
煙山 紀子 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 助教

A. 研究目的

ナノマテリアルの社会的受容の実現には、十分なリスク評価を行い、仮にリスクがある場合、ベネフィット・リスクバランスを考慮した適切なリスク低減が必要である。また、動物愛護の3Rの観点から、動物実験代替法の開発も必要である。

本研究は、(i)ナノマテリアルのリスク評価のための新規 *in vitro* 評価系およびマーカーの開発(ナノマテリアルのDNA損傷性新規評価系およびマーカーの開発, 共培養及び3Dモデルを用いたナノマテリアルの気道毒性新規評価系の開発、共培養及び3Dモデルを用いたナノマテリアルの皮膚毒性新規評価系の開発)、(ii)従来の *in vitro* リスク評価系との比較検討、*in vivo* 動物実験による当該リスク評価系の検証、(iii)それらを用いたナノマテリアルのリスク評価、(iv)当該評価結果に基づくリスク低減化方策の考案と検証を柱とした。

平成29年度、(1)ナノマテリアルの作製及びキャラクタリゼーション(林)、(2)細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析(河上)、(3)ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析(宮島)、(4)共培養系及び3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築(戸塚)、(5)3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築(中江)、(6)ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索(花方)、(7)切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築およびナノマテリアルの細胞内動態の解析(渡邊)を行った。

以下に各分担研究の成果の概要を記載する。

B. 研究方法

(1)ナノマテリアルの作製及びキャラクタリゼーション：

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

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

(2)細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析：

Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル (NiO-Sigma) 及び Alfa Aesar 製の Ni ナノマテリアル (Ni-Alfa) を用いた。遊星ボールミル型湿式ナノ粉碎機を用いた法に従い懸濁液の調製を行った。NiO-sigma 及び Ni-alfa ナノマテリアルの 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.1 mg/mL) について、調製直後及び 37°C で 24 時間インキュベートしたものについて Ni イオン濃度を測定した。細胞毒性試験には A549 細胞 (JCRB 細胞バンク) を用いた。A549 細胞を 96-well プレートに播種 (5×10^3 cell/well) し、24 時間後に塩化ニッケルを含む液体培地を添加して 48 時間培養した。培地除去後、100 μL の Phenol Red-free MEM 培地及び 20 μL の Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Reagent (MTS 試薬、Promega) を添加し、5%CO₂ インキュベーターで 37°C、1 時間反応させた。その後、生成したフォルマザンをマイクロプレートリーダーにて測定 (波長 440 nm) した。

(3)ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析：

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

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

(4) 共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築：

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

共培養システムによる遺伝毒性試験法：GDL1 細胞を播種して 24 時間培養した後、ThinCertTM (pore size; 0.4 μm , high density: greiner bio-one) を各 well に入れ、インサート内に RAW264 を播種、24 時間培養した。BMSC-5 及び BMS-10 を RAW264 のみ、または RAW 264 と GDL1 の両方に 24 時間曝露させた後にトリプシン処理により GDL1 を回収し、一定期間培養した後に細胞から DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングによってトランスジーン λEG10 をファージ粒子として回収した。回収したファージを Cre 組換え酵素発現している大腸菌 YG6020 株に感染させると、 λEG10 上にある一組の loxP 配列に挟まれた領域が Cre 組換え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後の YG6020 菌液を 6-thioguanin (6-TG) と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地に播いて 37°C で培養すると、プラ

スミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TG を含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cm を含む M9 寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。

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

(5) 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築：

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

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

暴露及び解析：被験物質への曝露は、3D ヒト皮

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

(6) ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索:

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

なお、それぞれの曝露サンプルは、以下のようにサンプル名を付した:

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

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

A549 S200: A549 細胞に CNT(Short)を

200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

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

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

(7) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築およびナノマテリアルの細胞内動態の解析:

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

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

切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築: A549 細胞の切片担体培養の条件設定後、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の曝露実験を行った。曝露前後の細胞の Integrin- α 1 および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現をリアルタイム PCR で解析をした。

ナノマテリアルの細胞内動態および機能解析: 前立腺癌細胞株 DU145 において、 Fe_3O_4 NPs と Fe_3O_4 NPs-COOH を各濃度に調整し、24 時間あるいは 72 時間曝露を行った。その後、Autophagy 関連タンパク質の

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

(倫理面への配慮)

本研究グループでは、既に樹立された細胞株を用いる *in vitro* 実験主体である。また、遺伝子実験において、必要とする場合は各施設の遺伝子組換え実験の安全管理規則に従って行った。ナノマテリアルの取扱いに関して、「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第0331013号)に準じて行った。次年度以降の必要とされる動物実験は、各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行った。

C. 研究結果

(1) ナノマテリアルの作製及びキャラクターゼーション:

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

(2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析:

一次粒子径が異なり二次粒子径が同程度の NiO-Sigma 懸濁液及び Ni-Alfa 懸濁液では、一次粒子径サイズの小さい Ni-Alfa の方が Ni イオン濃度はやや高い傾向を示した。そして、Ni イオンの細胞毒性試験の結果から、Ni イオンの溶出が各ナノマテリアルの細胞毒性に影響している可能性が考えられた。一方で、先行研究で細胞毒性に違いが認められている一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる懸濁液では、懸濁液中の Ni イオン濃度に差は認められな

かった。

(3) ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析:

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

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 を用いて、コロニー形成試験法により NiO ナノマテリアルの細胞毒性を評価した。その結果、NiO (粉砕ジルコニアボールの直径 0.05mm)の IC_{50} は $29.5 \mu\text{g/mL}$ 、NiO (同直径 0.1mm)の IC_{50} は $13.3 \mu\text{g/mL}$ 、NiO (同直径 0.5mm)の IC_{50} は $2.7 \mu\text{g/mL}$ で、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL に、二次粒子径が異なる 3種類の NiO ナノマテリアル懸濁液を、100, 200 及び $400 \mu\text{g/mL}$ で 18 時間暴露し、MTT 試薬により細胞毒性について検討した。その結果、陽性対照の 1% SDS では強い細胞毒性を示したが、NiO では、ZnO 同様、

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

(4) 共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築：

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

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

表面修飾が遺伝毒性発現に何らかの影響を及ぼしていることを認めた。

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

(5) 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築：

フォルペット：

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

表面修飾マグネタイト：

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

表面非修飾マグネタイト:

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

mg/mL群において、FLGに関して低下し、CLDN1とTNF- α に関して変化しなかった。NKEK単層培養系で、表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 μ g/mLで24または72時間曝露した。Alamar Bule assayより、24時間培養では200 μ g/mL群で、72時間培養では100および200 μ g/mL群で用量依存性に、それぞれ強い細胞毒性を示した。HepG2単層培養系で、Alamar Bule assayより、24または72時間培養のいずれにおいても、いずれの用量でも明らかな細胞毒性を示さなかった。

(6)ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索:

マイクロアレイに搭載されている miRNA プローブ 2549 種類に対して、各曝露条件において検出された miRNA 数は 232~309 個であった。

各曝露条件において、いずれか 1 つ以上の条件でシグナル強度が得られた miRNA プローブは 188 個あり、これらについて階層的クラスタリングを行なった。この clustering tree において、A549 細胞に CNT (Short) 200 μ g/mL を曝露したサンプルが他と挙動が大きく異なっている。また、clustering tree の高さ方向の長さの違いから DU145 細胞は A549 細胞より CNT の影響を受けにくいことが分かる。さらに CNT (Long)の 20ug/mL と 200ug/mL が与える影響の差は小さく、濃度よりも CNT の形状の違い (Short か Long か) の方が細胞に与える影響が大きいと分かる。

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

続いて、CNT の影響で発現が変化する miRNA の同定を試みた。いずれかの条件で

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

(7) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築およびナノマテリアルの細胞内動態の解析：

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

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

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

D. 考察

(1) ナノマテリアルの作製及びキャラクターゼーション：

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

(2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析：

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

(3) ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析：

本研究では、物理化学的性質の異なる2種類のZnOナノマテリアル及び一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる3種類のNiOナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性試験を実施したが、ZnO、NiO共に最高濃度 400 µg/ml において細胞毒性を示さなかった。同試験液を用いたチャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 V79 細胞のコロニー法による細胞毒性試験では、IC₅₀ 値が 3-30 µg/ml であった。ZnO では ZnO(sigma) が ZnO(alfa)に比べて強い細胞毒性を示し、NiO では二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。LabCyte EPI-MODEL では、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。さらに、再構築ヒト皮膚モデルでは、皮膚のバリア機能があり、ナノマテリアルの細胞内への取り込みが異なり、細胞毒性が異なることが、サイトカインの産生へも影響を与えたと考えられた。

(4)共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築：

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

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

(5) 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築：

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

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

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

(6) ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索：

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

異なるナノマテリアルが共通した細胞の反応を引き起こす可能性が示された。

(7) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築およびナノマテリアルの細胞内動態の解析：

A549 細胞の切片担体培養系の条件設定後に、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の曝露実験を行った。これらの実験より、A549 細胞の切片担体培養系の毒性評価系としての使用可能性を認めた。また、酸化鉄ナノ粒子の細胞への影響は、粒子側の修飾による ROS 産生の有無を起点とした apoptosis や autophagy の関与という細胞側の複合的関わりを明らかにした。

E. 結論

ナノマテリアルの毒性評価において、ナノ粒子の物理化学的性状および形状・表面修飾は重要な因子である。また、*in vitro*実験系での二次粒子径あるいはコロナの形成等も重要な因子である。本研究グループにおいて、ナノ粒子の合成条件を最適化することによる精密な形状制御およびサイズ制御できる方法、一次粒子径や二次粒子径と細胞毒性との関係から、溶出イオンや細胞内取り込みの重要性を示した。共培養系や3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築では、それぞれの有用性が示された。CNTのA549、DU145細胞への曝露実験で、網羅的遺伝子発現解析を行い、miRNAのクラスタリング解析から、ナノマテリアルによる特徴的なmiRNA変動、すなわちマーカー抽出の可能性を示した。組織特異性を示すA549細胞の切片担体培養系の使用可能性を認めた。また、酸化鉄ナノ粒子の細胞への影響は、粒子側の修飾によるROS産生の有無を起点とするautophagyの関与を明らかにし、有害性発現経路に関わる結果を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, Y. Endo, T. Nittami, T. Nozaki, R.C. Sobti, M. Watanabe. Combined effects of Fe₃O₄ nanoparticles and chemotherapeutic agents on prostate cancer cells in vitro. *Appl. Sci.*, 8, 134, 2018.
- (2) T. Amemiya, K. Shibata, Y. Itoh, K. Itoh, M. Watanabe, T. Yamaguchi. Primordial oscillations in life: Direct observation of glycolytic oscillations in individual HeLa cervical cancer cells. *Chaos*. 27, 104602, 2017.
- (3) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Organic-inorganic hybrid hollow nanoparticles suppress oxidative stress and repair damaged tissues for treatment of hepatic fibrosis. *Adv. Funct. Mater.*, 28, 1706332, 2018.
- (4) K. Hayashi, S. Yamada, H. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Red blood cell-like particles with the ability to avoid lung and spleen accumulation for the treatment of liver fibrosis. *Biomater.*, 156, 45-55, 2018.
- (5) K. Hayashi, Y. Sato, H. Maruoka, W. Sakamoto, T. Yogo. Organic-inorganic hybrid nanoparticles for tracking the same cells seamlessly at the cellular, tissue, and whole body levels. *ACS Biomater. Sci. & Engin.*, 3, 1129–35, 2017.
- (6) K. Ishikawa, T. Arifta, K. Hayashi, K. Tsuru. Fabrication and evaluation of interconnected porous carbonate apatite from alpha tricalcium phosphate spheres. *J. Biomed. Mater. Res. Part B – Appl. Biomater.*, 2018. doi: 10.1002/jbm.b.34117.
- (7) H. Miki, S. Nakamura, A. Oda, H. Tenshin, J. Teramachi, M. Hiasa, A. Bat-Erdene, Y. Maeda, M. Oura, M. Takahashi, M. Iwasa, T. Harada, S. Fujii, K. Kurahashi, S. Yoshida, K. Kagawa, I. Endo, K. Aihara, M. Ikuo, K. Itoh, K. Hayashi, M. Nakamura, M. Abe. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by hyperthermia. *Oncotarget*, 9, 10307-16, 2018.
- (8) M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, M. Harada, K. Izumi, Y. Tsuruo, T. Yogo. Mesoscopic multimodal imaging provides new insight to tumor tissue evaluation: An example of macrophage imaging of hepatic tumor using organosilica nanoparticles. *Sci. Rep.*, 7, 3953, 2017.
- (9) M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, T. Kanadani, M. Harada, T. Yogo. Relaxometric property of organosilica nanoparticles internally functionalized with iron oxide and fluorescent dye for multimodal imaging. *J. Colloid Interface Sci.*, 49, 127–35, 2017.
- (10) E. Fukai, H. Sato, M. Watanabe, D. Nakae, Y. Totsuka. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 109, 1024-31, 2018.
- (11) T. Toyoda, Y. Totsuka, K. Matsushita, T. Morikawa, N. Miyoshi, K. Wakabayashi, K. Ogawa. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *J. Appl. Toxicol.*, 38, 537-43, 2018.
- (12) N. Akiba, K. Shiizaki, Y. Matsushima, O. Endo, K. Inaba, Y. Totsuka. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 32, 455-62, 2017.
- (13) T. Kato, T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, M. Watanabe, Y. Totsuka. Effect of

- physicochemical character differences on the genotoxic potency of kaolin. *Genes Environ.*, 39, 12, 2017.
- (14) K. Horibata, A. Ukai, A. Ogata, D. Nakae, H. Ando, Y. Kubo, A. Nagasawa, K. Yuzawa, M. Honma. Absence of *in vivo* mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 *gpt* delta rats. *Genes Environ.*, 39, 4, 2017.
- (15) 多田幸恵, 中江大, 北條幹, 湯澤勝廣, 安藤弘, 久保喜一, 長澤明道, 海鋒藤文, 長谷川悠子, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子. NNK イニシエートによる A/J マウスの肺における磁性ナノ粒子マグネタイト気管内投与の影響. 東京都健安研七研究年報 68, 277-84, 2017.
2. 学会発表
- (1) S. Takahashi, S. Saito, K. Kanako, T. Nittami, M. Watanabe. MicroRNAs profiling of cancer cells after iron oxide nanoparticles exposure. 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017 年 9 月.
- (2) K. Kojima, S. Saito, S. Takahashi, T. Nittami, M. Watanabe. Combination treatment of Iron oxide nanoparticles and docetaxel enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of Nuclear Factor kappa B- and PI3K/Akt pathway in prostate cancer cells. 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017 年 9 月.
- (3) S. Saito, S. Takahashi, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Application of the substrata made of tissue/organ sections for histopathology (TOSHI) based systems for toxicity of nanomaterials. 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017 年 9 月.
- (4) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagic cell death in prostate cancer cells treated with docetaxel *via* ROS generation and NFκB signaling. AACR annual meeting 2018, April.14-18, 2018, Chicago.
- (5) K. Hayashi. One-Pot Synthesis of Dual Stimulus-Responsive Degradable Organic-Inorganic Hybrid Hollow Nanoparticles for Fluorescence Image-Guided Trimodal Therapy. BIT's 7th Annual World Congress of Nano Science & Technology 2017, Oct. 24-26, 2017, Fukuoka. 招待講演
- (6) K. Hayashi. One-Pot Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Hollow Nanoparticles for Fluorescence Image-Guided Trimodal Therapy. *2nd International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development*, Sep. 29-Oct. 1, 2017, Nagoya. 招待講演
- (7) 林 幸壱朗. 多機能ナノ／マイクロ粒子の合成と診断・治療への応用. 第 7 回 ナノカーボンバイオシンポジウム, 2017 年 9 月 12 日, 京都大学. 招待講演
- (8) 林 幸壱朗. 多機能性ナノ・マイクロ粒子の作製と生物医学応用. 日本ゾルゲル学会第 15 回討論会, 2017 年 8 月 7 日-8 日, 大阪. 招待講演
- (9) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, H. Haishima, K. Isama. Effects of different secondary particle sized nickel oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune responses. (EUROTOX 2017, Bratislava, Slovak, Sep., 2017)
- (10) 宮島敦子・河上強志・小森谷 薫・加藤玲子・齋島由二・伊佐間 和郎: 物理化学的性質の異なる酸化亜鉛ナノマテリアルに対する THP-1 の細胞応答, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月.
- (11) 戸塚 ゆ加里: DNA 付加体形成と突然変異誘発 第 44 回日本毒性学会 (横浜 2017 年 7 月)
- (12) Y. Totsuka, Y. Lin, Y. He, H. Sato, T.

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

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

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

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

II. 分担研究年度終了報告

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

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

エピジェネティックスマーカーの検索

ナノマテリアルの細胞内動態および機能解析

研究代表者 渡邊 昌俊 三重大学大学院医学系研究科 教授

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およびナノマテリアルの細胞内動態および機能解析について報告する。A549細胞の切片担体培養系の条件設定後に、Integrin-β1および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現解析及び磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ 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Integrin-β1および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現を認め、曝露実験でも切片担体の種類に依存したIntegrin-β1および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現の変化を認めた。前立腺癌細胞株DU145に対して、Fe₃O₄ NPsとFe₃O₄ NPs-COOHを各濃度に調整し、24時間あるいは72 時間曝露を行った。蛍光顕微鏡にてMDC(Monodansylcadaverine)染色の観察及び定量化を行った結果、ナノ粒子が修飾にかかわらず、autophagyが誘導されることを認めた。酸化鉄ナノ粒子の細胞への影響は、粒子側の修飾によるROS産生の有無を起点としたapoptosisのみならずautophagyの関与という細胞側の複合的関わりを明らかにした。

A. 研究目的

本研究グループの目的は、ナノマテリアルの物性解析後、新規 *in vitro* 評価系の確立、細胞内応答機構等の解析で従来の評価系との比較検討、新たなマーカーの確立、適切な動物実験等による妥当性の検証である。

本研究での分担は、(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、(2) エピジェネティックスマーカーの検索、(3) ナノマテリアルの細胞内動態の解析である。(1)に関して、過去の切片担体培養の条件で、新たに作成された凍結切片を用いて、A549 細胞の切片担体培養を行った。細胞懸濁液の濃度を設定し、肺及び肝臓由来の組織切片担体をのせたスライドガラスを準備し、細胞を播種し、Integrin-β1および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現を

指標にして解析した。(2)に関して、物質・材料研究機構の花方分担研究者と共同研究のため、この分担研究報告書では割愛させていただく。(3)について、有害性発現経路の一つとして、autophagy に焦点を当てた。前立腺癌細胞株 DU145 に対して、非修飾磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs)とカルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs-COOH)を各濃度に調整し、24 時間あるいは72 時間曝露を行った。その後、蛍光顕微鏡にて MDC(Monodansylcadaverine)染色の観察及び定量化を行い、ナノ粒子の細胞への影響(autophagy)について解析を行った。

B. 研究方法

1) 使用細胞株と細胞培養

本実験ではアンドロゲン非依存性前立腺

癌細胞株 DU145 およびヒト肺上皮細胞由来 A549 を使用した。これら細胞株は ATCC (American Type Culture Collection) より入手した。LNCaP および DU145 は RPMI 1640 培養液(10 %FBS、1 % penicillin & streptomycin 含有)を用いて、また A549 は F12 培養液を用いて 37 °C、CO₂ 濃度 5 %加湿インキュベーターで培養した。

2) 使用した磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs、Fe₃O₄ NPs-COOH)

磁性体ナノ粒子の一次粒径は約 10 nm であり主成分は Fe₃O₄(マグネタイト)で構成されている。Fe₃O₄ は空気中の酸素によって酸化され粒子表面は γ-Fe₂O₃ へ成分に変化があるがどちらの場合も磁性を示す酸化物である。

非修飾磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs)は戸田工業株式会社より購入し、また、表面をカルボキシル基で修飾した磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs-COOH)は、Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS)、京都大学より購入した。各々 1 μg/mL、10 μg/mL、100 μg/mL で培養液に調整して、超音波破砕機 (Ultrasonic homogenizer VP-050、TAITEC 社)にて、分散処理を行い、Fe₃O₄ NPs の凝集を取り除き使用した。細胞への Fe₃O₄ NPs 曝露前には、培養液中における Fe₃O₄ NPs の大きさ、粒径の分布を濃厚系粒径アナライザー (Fiber-Optics Particle Analyzer FPAR-1000、大塚電子)にて測定を行った。

3) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築：A549 細胞の切片担体培養の条件設定後、磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs)の曝露実験を行った。曝露前後の細胞の Integrin-β1 および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現をリアルタイム PCR で解析をした。

4) ナノマテリアルの細胞内動態および機能解析：前立腺癌細胞株 DU145 において、

Fe₃O₄NPs と Fe₃O₄NPs-COOH を各濃度に調整し、24 時間あるいは 72 時間曝露を行った。その後、Autophagy 関連タンパク質の発現をウエスタンブロット解析および Monodansylcadaverine (MDC, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)を用いて、蛍光顕微鏡観察を行い、定量化した。

(倫理面への配慮)

本研究では、既に樹立された細胞株を用いる *in vitro* 実験が主体であるが、ラットより組織切片担体を得るために本学動物実験取扱い委員会に審査を受けている。また、遺伝子実験において、必要とする場合は各施設の遺伝子組換え実験の安全管理規則に従い行う。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)に準じて行う。

C. 研究結果

1) A549 細胞の切片担体培養系の条件設定後に、細胞の状態を示す Integrinβ-1 および EGFR の発現を確認した。肺及び肝臓からの組織切片を切片担体として使用した。Integrinβ-1 および EGFR の発現は 2 次元培養より有意差を持って発現量が上昇し、切片担体と細胞との相互関係が構築された状態で培養されていると考えられた(図 1)。ナノ粒子の暴露により、肝臓組織切片担体上では、その発現が低下し、ナノ粒子の影響を受けたが、肺組織切片担体上の細胞では、ナノ粒子の細胞への影響は認めなかった。この切片担体培養系が生体内の臓器特異的(あるいは組織特異的)環境を再現できる系である可能性が考えられた。

2) ナノ粒子の修飾にかかわらず、autophagy を誘導し(図 2)、また前年度の結果と合わせるとナノ粒子暴露により活性酸素種を産生する場合は、有意に apoptosis が加わり、細胞障害をもたらすと考えられた。

D. まとめ

A549 細胞の切片担体培養系の条件設定後に、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の曝露実験を行った。これらの実験より、A549 細胞の切片担体培養系の毒性評価系としての使用可能を認めた。また、酸化鉄ナノ粒子の細胞への影響は、粒子側の修飾による ROS 産生の有無を起点とした apoptosis や autophagy の関与という細胞側の複合的関わりを明らかにした。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.
- (2) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, Y. Endo, T. Nittami, T. Nozaki, R.C. Sobti, M. Watanabe. Combined effects of Fe_3O_4 nanoparticles and chemotherapeutic agents on prostate cancer cells in vitro. *Appl. Sci.*, 8, 134, 2018.
- (3) T. Kato, T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, M. Watanabe, Y. Totsuka. Effects of physicochemical character differences on the genotoxic potency of kaolin. *Genes Environ.*, 39, 12, 2017.
- (4) T. Amemiya, K. Shibata, Y. Itoh, K. Itoh, M. Watanabe, T. Yamaguchi. Primordial oscillations in life: Direct observantion of glycolytic oscillations in individual HeLa cervical cancer cells. *Chaos*. 27, 104602, 2017.

2. 学会発表

- (1) S. Takahashi, S. Saito, K. Kanako, T. Nittami, M. Watanabe. MicroRNAs profiling of cancer cells after iron oxide nanoparticles exposure. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017年9月.

- (2) K. Kojima, S. Saito, S. Takahashi, T. Nittami, M. Watanabe. Combination treatment of Iron oxide nanoparticles and docetaxel enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of Nuclear Factor kappa B- and PI3K/Akt pathway in prostate cancer cells. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017年9月.
- (3) S. Saito, S. Takahashi, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Application of the substrata made of tissue/organ sections for histopathology (TOSHI) based systems for toxicity of nanomaterials. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017年9月.
- (4) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagic cell death in prostate cancer cells treated with docetaxel *via* ROS generation and NF κ B signaling. AACR annual meeting 2018, April.14-18, 2018, Chicago.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

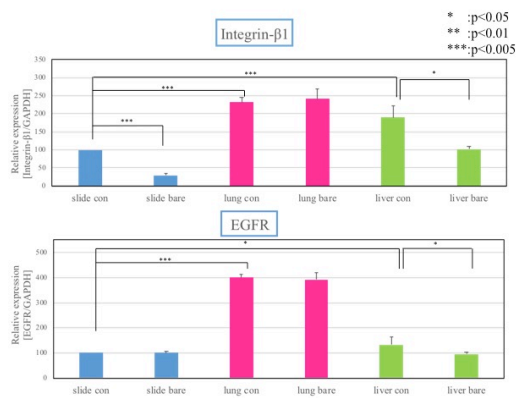


図1. 切片担体とIntegrin及びEGFR発現について

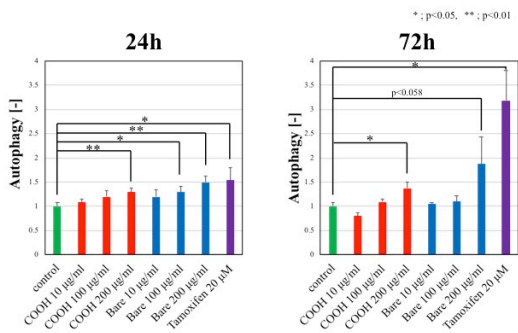


図2. 各ナノ粒子曝露によるAutophagyの出現について

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

ナノマテリアルの作製およびキャラクタリゼーション

研究分担者 林 幸壺朗 九州大学大学院歯学研究院 助教

酸化チタンの形状が毒性に与える影響を調査するために、多様な形状の酸化チタンナノ粒子の合成に取り組んだ。酸化チタンナノ粒子は様々なチタン源から、酵素（ウレアーゼ）と尿素存在下での反応により得られた。ウレアーゼはテンプレートとして働き、また、ウレアーゼと尿素との反応により生じたアンモニアは触媒として働くと考えられる。チタン源の種類や濃度、ウレアーゼおよび尿素の濃度を調整することにより、針状、ウニ状、中空状に形状を制御することができた。今後、合成条件を最適化することにより、より精密な形状制御およびサイズ制御が可能になると考えられる。

A. 研究目的

本研究分担者は、ナノマテリアルの *in vitro* リスク評価を実施するための、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、酸化チタンナノ粒子を作製することを目的とする。これまでに、細胞毒性試験に使用可能な高濃度金ナノ粒子および銀ナノ粒子分散液の調製には成功しており、すでに共同研究者に提供している。

平成 29 年度は酸化チタンナノ粒子（TiO₂ NPs）の合成に取り組んだ。特に、TiO₂ NPs の形状が細胞毒性に与える影響を調査するために、様々な形状の TiO₂ NPs を合成することを目的とした。

B. 研究方法

1) 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）

表 1 の条件で尿素とウレアーゼを蒸留水 10 mL に溶解した。この水溶液に TiCl₄ 230 μL をドラフト内で加え、発煙が収まったら溶液をよく攪拌し、60 °C の条件で 3 日間反応を行った。

各条件により得られた生成物を TiO₂ NPs-

1～10 とする。

表 1. TiO₂ NPs の合成条件

| サンプル | 尿素 (mg) | ウレアーゼ (mg) |
|-------------------------|---------|------------|
| TiO ₂ NPs-1 | 12 | 50 |
| TiO ₂ NPs-2 | 24 | 50 |
| TiO ₂ NPs-3 | 48 | 50 |
| TiO ₂ NPs-4 | 96 | 50 |
| TiO ₂ NPs-5 | 192 | 50 |
| TiO ₂ NPs-6 | 12 | 100 |
| TiO ₂ NPs-7 | 24 | 100 |
| TiO ₂ NPs-8 | 48 | 100 |
| TiO ₂ NPs-9 | 96 | 100 |
| TiO ₂ NPs-10 | 192 | 100 |

2) TiCl₄ 以外の原料からの TiO₂ NPs の作製

尿素 96 mg およびウレアーゼ 50 mg を水 10 mL に溶解させた。この水溶液に tetrabutyl orthotitanate 717 μL または bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium 1019 μL または tetrabutyl orthotitanate tetramer 1851 μL または tetraisopropyl orthotitanate 636 μL を加え溶液をよく攪拌し、60 °C の条件で 3 日間反応を行った。反応終了後、生成物を水で 3 回洗浄し最終的に 10 mL の水に分

散させた。Ti 原料の構造式を図 1 に示す。また、生成物を用いた原料によってそれぞれ TiO₂ NPs-11, 12, 13, 14 と記す。

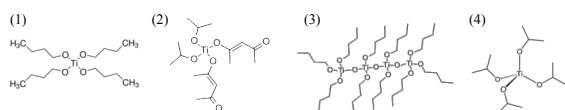


図 1. 原料の構造: (1) tetrabutyl orthotitanate, (2) bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium, (3) tetrabutyl orthotitanate tetramer, (4) tetraisopropyl orthotitanate

C. 研究結果

1) 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）
得られた粒子の TEM 像を図 2 に示す。TiO₂ NPs-1~3 は針状粒子の集合体を形成していた。TiO₂ NPs-4 と 5 は中空構造の中空ナノ粒子であり、それぞれ粒径が約 600 nm, 10 nm であった。TiO₂ NPs-6~8 は針状粒子からなる不規則な凝集体であった。TiO₂ NPs-9 と 10 は球状粒子であった。

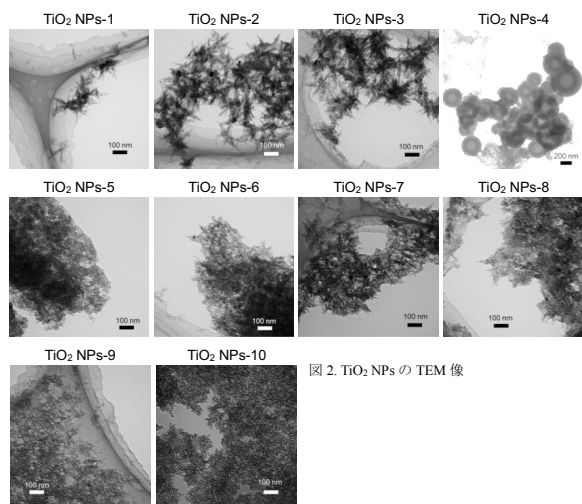


図 2. TiO₂ NPs の TEM 像

2) TiCl₄ 以外の原料からの TiO₂ NPs の作製

図 3 に生成物の TEM 像を示す。一次粒子の粒径は異なるが全て球状粒子の凝集体であった。TiO₂ NPs-13 において、一部中空粒子が確認された。

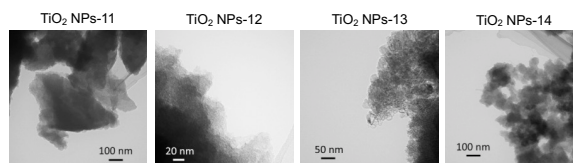


図 3. TiO₂ NPs-11~14 の TEM 像

以上の 1 および 2 の結果から、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。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) 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.
- (7) M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, T. Kanadani, M. Harada, T. Yogo. Relaxometric property of organosilica nanoparticles internally functionalized with iron oxide and fluorescent dye for multimodal imaging, *J. Colloid Interface Sci.*, 49, 127–35, 2017.
2. 学会発表
- (1) 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
- (2) 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
- (3) 林 幸壺朗. 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
- (4) 林 幸壺朗. 多機能性ナノ・マイクロ粒子の作製と生物医学応用. 日本ゾルゲル学会第15回討論会, 2017年8月7日–8日, 大阪. 招待講演
- E. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許出願
なし
3. その他
新聞報道“赤血球状の粒子 肝臓に薬剤運搬”, 日経産業新聞, 平成29年12月8日

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
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：昨年度より、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた *in vitro* 毒性評価システム確立の検討を行っており、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、この評価系の妥当性について、マグネタイトナノ粒子 (MGT)を用いて検証した。また、毒性の低減化も考慮して表面修飾の有無の状態が遺伝 毒性に対する影響についても観察した。MGT の細胞毒性を調べた結果、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、表面修飾を有さない MGT(BMS-10)は 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で表面修飾を有する MGT(BMSC-5)は 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で生存率が減少し、毒性が見られ、表面修飾の有無で毒性強度に差があることがわかった。次に RAW264 と GDL1 細胞を共培養し、BMSC-5 及び BMS-10 を両細胞に曝露し、誘発される変異頻度を解析した。その結果、MGT 曝露群では溶媒対照群と比較して変異頻度の増加が認められた。また、BMS-10 と比較して BMSC-5 の方が変異頻度が高い傾向が観察された。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。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。しかしながら、変異原性試験の結果では BMSC-5 の方が強い変異原性を示していたことから、ポリアクリル酸自身の細胞毒性や遺伝毒性への影響が考えられる。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。また、今後さらに、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。

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。これまで我々は、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確かめてきた。①

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。本年度は、マグネタイトナノ粒子 (MGT)を用いて検証した。また、毒性の低減化も考慮して表面修飾の有無の状態が遺伝 毒性に対する影響についても観察した。なお、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。

B. 研究方法

細胞毒性試験

96well plate に GDL1 及び RAW264.7 を 1.0×10^4 cells/well 及び 4.0×10^4 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 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 2 段階希釈で各 well に加え、24 時間曝露した後、培地を吸引除去し、基本培地を 100 μL

加えた。

- ② 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、② ThinCertTM (pore size; 0.4 μm , high density: greiner bio-one) を各 well に入れ、インサート内に RAW264 を播種し、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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

- ③ ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み
6 well plate に GDL1 及び RAW264.7 を 1.0×10^6 cells/well 及び 2.0×10^6 cells/well で播種し、24 時間前培養した。各細胞に BMS-10 及び BMSC-5 を 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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

- ① 細胞毒性試験
各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を単培養の GDL1 に 6.25~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、RAW264.7に 3.125~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で BMSC-5 は 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生存率が減少し、毒性が見られ、表

面修飾の有無で毒性強度に差があることがわかった(図 1)。

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。結果を図 2 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 2)。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。

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。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 4 に示す。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。

D. 考察

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。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。また、共培養系による *in vitro* 遺伝毒性試験系では、

BMS-10とBMSC-5で異なる変異頻度の増加が観察された。BMS-10は共培養条件下でMFが増加しており、対して、BMSC-5は単培養条件下でMFの増加が観察された。このことから、BMS-10はRAW264.7による間接的な影響が強くており、BMSC-5はGDL1への直接的な影響が強くているため、遺伝毒性メカニズムが異なり、遺伝毒性に違いが出たと考えられる。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。

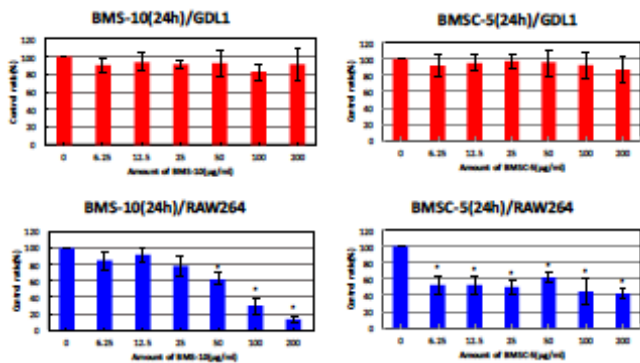


図1. 表面修飾の異なるMGTの細胞毒性

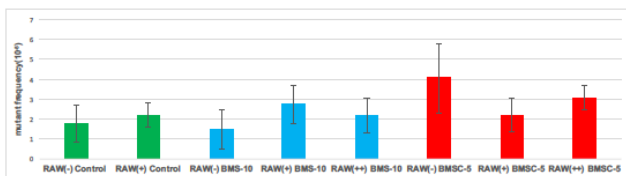


図2. GDL1細胞に観察された変異頻度

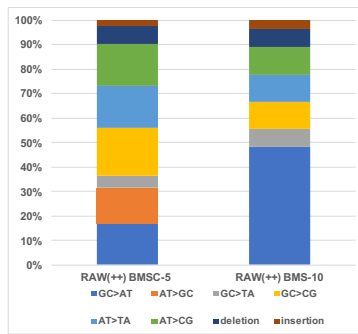


図3. 変異スペクトラム

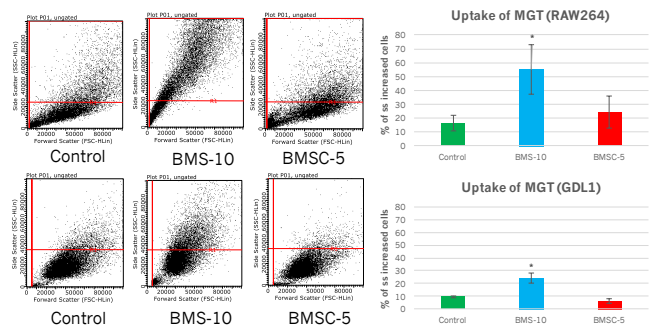


図4. 各MGTの細胞への取り込み

E. 結論

昨年度までに肺毒性試験系として、マウス肺より樹立した細胞株(GDL1細胞)とマクロファージ(RAW264.7)を共培養システムの構築を行った。本年度は、MGT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、表面修飾の違いに対する影響についても観察した。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は細胞種によって異なる細胞毒性を示し細胞内には取り込まれにくい、遺伝毒性は強く、また変異スペクトルは全く異なるという結果となった。貪食細胞に貪食されにくくなることから、表面修飾によりMGTの特性は変化した。遺伝毒性が強くでしまっているため、ポリアクリル酸自身の細胞毒性や遺伝毒性への影響が考えられる。現在、ポリアクリル酸修飾により毒性が強く観察されるメカニズムについて検討を行っている。

また、今後更に、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) 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.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) T. Kato T, 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.

2. 学会発表

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)

7. 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)
8. 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)
9. Y. Totsuka. Adductomics IWGT 2017 (東京、2017 年 11 月)
10. 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 ¹²ICEM-⁵th ACEM (仁川、2017 年 11 月)
11. 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)
12. 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。

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

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

研究分担者 中江 大 東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 教授

研究要旨：本分担研究の目的は、3D ヒト皮膚再構成系を利用して、ナノマテリアルの経皮毒性の新しい *in vitro* スクリーニング評価モデルを開発することである。本研究は、LabCyte EPI モデル（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）を用いた 3D ヒト皮膚再構成系においてフォルペット（農薬、陽性対照物質）とカルボキシル基による表面修飾をされた、またはされていないマグネタイトの表皮傷害性と表皮侵入性について、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 の単層培養系において、それら化学物質の細胞傷害性について、それぞれ解析した。その結果、再構成表皮は化学物質の皮膚毒性の強さに応じた傷害性を示し、マグネタイトは単層培養ケラチノサイトに対して弱い傷害性を示した。表皮の重層構造は化学物質の皮膚毒性に対する防御効果があり、（成熟した）角質層は当該防御効果を増強するものと判明した。したがって、皮膚一般毒性を *in vitro* で評価する目的に対して、単層培養系のみでは不十分であり、3D 皮膚再構成系を用いることが有用である可能性が示された。再構成系の表皮組織は化学物質の傷害性に対して一定の「バリア機能」を有しており、当該機能の発揮には成熟した角質層の存在が（少なくとも部分的に）関与している。表皮の重層構造や（成熟した）角質層の存在は、金属ナノ粒子の表皮通過を必ずしも防御できないことが判明した。しかし、金属ナノ粒子の表皮通過性には物理化学的性質（今回の場合はマグネタイトの表面修飾の有無）が関与し、その状況（今回の場合は、マグネタイトの表面修飾がないこと）によっては表皮の重層構造や（成熟した）角質層の存在が表皮通過を防御できることも判明した。マグネタイトの表面修飾は、単層培養ケラチノサイト傷害性を減弱させ、また、再構成系における表皮組織通過性を獲得させた。以上より、3D ヒト皮膚再構成系は、*in vivo* に外挿できる皮膚一般毒性評価系として有用である可能性が示された。

研究協力者：

美谷島 克宏 東京農業大学応用生物科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科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うことが必須であり、その結果仮にリスクがある場合にはベネフィット・リスクバ

ランスを考慮した適切なリスク低減を図ることが必要である。当該リスク評価に当たっては、動物愛護の3Rの観点から、動物実験代替法の開発も要求される。本研究は、全体として、ナノマテリアルの物性解析、新規 *in vitro* リスク評価系の確立、細胞内応答機構等を指標とした当該 *in vitro* リスク評価系と従来の評価系の比較、新たなリスク評価バイオマーカーの確立、適切な動

物実験等による当該*in vitro*リスク評価系の妥当性検証などを目的として行われている。その中で、本分担研究の目的は、3Dヒト皮膚再構成系を用いて、金属ナノ粒子の経皮毒性に関する新規*in vitro*評価系を構築することである。

B. 研究方法

1) 細胞

1-1) 3Dヒト皮膚再構成系

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)(図1)を、当該モデルに添付の培養液と共に用いた。実験時の培養条件は、温度37°C、受動湿潤、気相条件95%空気・5%二酸化炭素とした。なお、実験には、角質層が成熟した13日培養品のほか、角質層が未成熟の3日培養品および6日培養品を用いた。

1-2) 単層培養系

単層培養系としては、正常ヒト表皮由来ケラチノサイトNKEK(クラボウ)またはヒト肝癌由来細胞HepG2を、適宜継代したものを用いた。実験時の培養条件は、前項と同様とした。

2) 被験物質

2-1) 陽性対照物質

陽性対照物質としては、農薬として用いられるフタルイミド系殺菌剤で、皮膚毒性が報告されているフォルペット(*N*-(トリクロロメチルチオ)フタルイミド)(シグマ・アルドリッチ)を、ジメチルスルホキシド(DMSO)を溶媒として用いた。

2-2) 金属ナノ粒子

マグネタイト(酸化鉄ナノ粒子)は、本研究の研究代表者である渡邊 昌俊 博士(三重大学大学院医学系研究科)が、本研究班全体に分配したものである。詳細は、渡邊博士の報告書を参照されたい。マグネタイトは、一次粒径1-100 nmのマグヘマイト(Γ - Fe_2O_3)およびマグネタイト(Fe_2O_4)粒子から成り、蒸留水(pH 9.6)を媒体とし、表面をカルボキシル基で修飾されたもの(表面修飾マグネタイト)が2.2%、されていないもの(表面非修飾マグネタイト)が2%の濃度の懸濁

液として供給された。

3) 実験および解析

被験物質への曝露は、3Dヒト皮膚再構成系において表皮組織上面から(図1)、単層培養系において培地中へ、それぞれ行った。詳細な実験条件は、結果の項に記す。

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。

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。

3-1) ヘマトキシリン・エオジン(HE)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。

3-2) マグネタイトの表皮透過性について解析するため、培地を回収して鉄の含有量をICP-MSにより測定した(東海技術センター)。

3-3) 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。

(倫理面への配慮)

細胞生物学的研究に関する国際的・国内的・東京農業大学学内的な諸規則に基づき、必要な倫理的配慮を施した。

C. 研究結果

1) フォルペット

1-1) 3Dヒト皮膚再構成系

フォルペットは、最終濃度0・100・1000・2000(遺伝子発現解析のみ1500) $\mu\text{g}/\text{mL}$ で24時間

曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)では2000 µg/mLのみで、角質非成熟再構成系の6日培養品では1000 µg/mL以上で、それぞれ強い細胞毒性を示した(図2)。

病理組織学的解析では、角質層成熟再構成系(13日培養品)において、2000 µg/mL群のみで基底層細胞の配列の乱れと、有棘層・基底層細胞の肥大を観察した(図3)。

遺伝子発現については、角質層成熟再構成系(13日培養品)において、FLGとCLDN1に関して100 µg/mL以上で濃度依存的に減弱し、一方、TNF-αに関して1000 µg/mL以上で増強した(図4)。

1-2) NKEK単層培養系

フォルペットは、最終濃度0・1・10・30・60・100 µg/mLで24時間曝露した。MTTアッセイを試みた結果、30 µg/mL以上で強い細胞毒性を示した(図5)。

1-3) HepG2単層培養系

フォルペットは、最終濃度0・1・10・30・60・100 µg/mLで24時間曝露した。MTTアッセイを試みた結果、60 µg/mL以上で強い細胞毒性を示した(図5)。

2) マグネタイト

2-1) 表面修飾マグネタイト

2-1-1) 3D皮膚再構成系

表面修飾マグネタイトは、最終濃度0・2・6.7・20 mg/mLで24時間曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)(図6)・角質非成熟再構成系(6または3日培養品)のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった。

病理組織学的解析において、表面修飾マグネタイトは、角質層成熟再構成系(13日培養品)の表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった(図7)。

ICP-MS解析は、表面修飾マグネタイトの投与用量に依存して、角質層成熟再構成系(13日培養品)培地中に鉄を検出した(図8)。

遺伝子発現については、角質層成熟再構成系(13日培養品)の20 mg/mL群において、FLGに関して低下し、CLDN1とTNF-αに関して変化しなかった(図9)。

2-1-2) NKEK単層培養系

表面修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 µg/mLで24または72時間曝露した。Alamar Blueアッセイを試みた結果、24時間培養ではいずれの用量でも細胞毒性を示さなかったが、72時間培養では200 µg/mL群で強い細胞毒性を示した(図10)。

2-1-3) HepG2単層培養系

表面修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 µg/mLで24または72時間曝露した。Alamar Blueアッセイを試みた結果、24または72時間培養のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図11)。

2-2) 表面非修飾マグネタイト

2-2-1) 3D皮膚再構成系

表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・2・6.7・20 mg/mLで24時間曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)(図6)・角質非成熟再構成系(6または3日培養品)のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった。

病理組織学的解析において、表面非修飾マグネタイトは、角質層成熟再構成系(13日培養品)の表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった(図7)。

ICP-MS解析は、表面非修飾マグネタイトのいずれの用量でも、角質層成熟再構成系(13日培養品)培地中に鉄を検出なかった(図8)。

遺伝子発現については、角質層成熟再構成系(13日培養品)の20 mg/mL群において、FLGに関して低下し、CLDN1とTNF-αに関して変化しなかった(図9)。

2-2-2) NKEK単層培養系

表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 µg/mLで24または72時間曝露した。Alamar Blueアッセイを試みた結果、24時間培

養では200 µg/mL群で、72時間培養では100および200 µg/mL群で用量依存性に、それぞれ強い細胞毒性を示した(図12)。

2-2-3) HepG2単層培養系

表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 µg/mLで24または72時間曝露した。Alamar Blueアッセイを試みた結果、24または72時間培養のいずれにおいても、いずれの用量でも明らかな細胞毒性を示さなかった(図13)。

D. 考察

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時間曝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時間曝露で、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時間曝露では、細胞毒性が検出できない100 µg/mLの濃度より濃度依存性に角質層バリア機能を示すFLGと、基底層のタイトジャンクションに関わるCLDN1の発現が減弱し、炎症性サイトカインであるTNF- α の発現が増強した。加えて、フォルペットは、ケラチノサイト単層培養系において、3D皮膚再構成系より強い細胞毒性を示

す。以上より、表皮の重層構造はフォルペットの細胞毒性に対して防御効果を発揮し、(成熟した)角質層はさらに当該防御効果を増強する「バリア機能」を發揮することが示唆された。

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

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

E. 結論

成熟した角質または未成熟な角質を持つヒト3D皮膚再構成系は、ヒトケラチノサイト単層培養系と併用することにより、ナノマテリアルを含む化学物質の皮膚一般毒性を定量的に評価する系として有用である可能性が示された。

再構成表皮は化学物質の皮膚毒性の強さに応じた傷害性を示し、金属ナノ粒子はいずれも皮膚傷害性が低かったが、マグネタイトは単層培養したケラチノサイトに対して弱い傷害性を示した。

表皮の重層構造は化学物質の皮膚毒性に対する防御効果があり、(成熟した)角質層は当該防御効果を増強するものと判明した。したがって、皮膚一般毒性を*in vitro*で評価する目的に対して、単層培養系のみでは不十分であり、3D皮膚再構成系を用いることが有用である可能性が示された。

再構成系の表皮組織は化学物質の傷害性に対して一定の「バリア機能」を有しており、当該機能の発揮には成熟した角質層の存在が(少なくとも部分的に)関与している。

表皮の重層構造や(成熟した)角質層の存在は、金属ナノ粒子の表皮通過を必ずしも防御できないことが判明した。しかし、金属ナノ粒子の表皮通過性には物理化学的性質(今回の場合はマグネタイトの表面修飾の有無)が関与し、その状況(今回の場合は、マグネタイトの表面修飾がないこと)によっては表皮の重層構造や(成熟した)角質層の存在が表皮通過を防御できることも判明した。

マグネタイトの表面修飾は、単層培養ケラチノサイト傷害性を減弱させ、また、再構成系における表皮組織通過性を獲得させた。

以上より、3Dヒト皮膚再構成系は、*in vivo*に外挿できる皮膚一般毒性評価系として有用である可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.

- (2) 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.
- (3) 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, 海鉦藤文, 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.

2. 学会発表

- (1) 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).
- (2) 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).
- (3) 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).

- (4) 堀端克良, 鵜飼明子, 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).
- (5) 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).

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

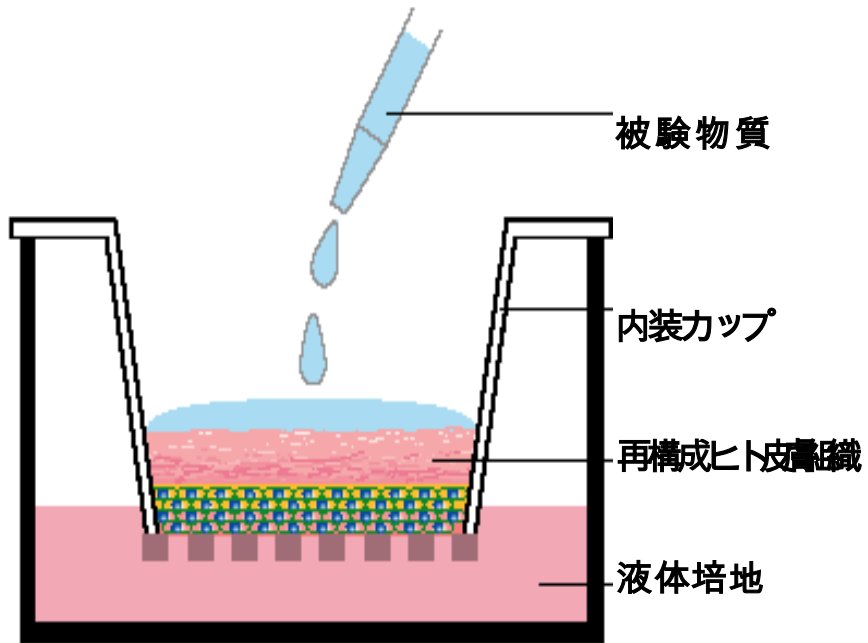
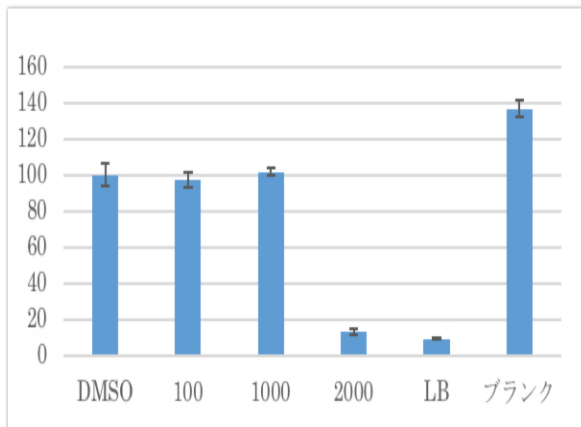
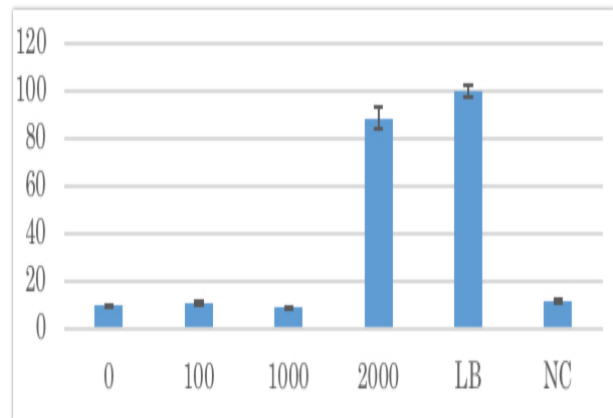


図 1. LabCyte EPI 24 モデル

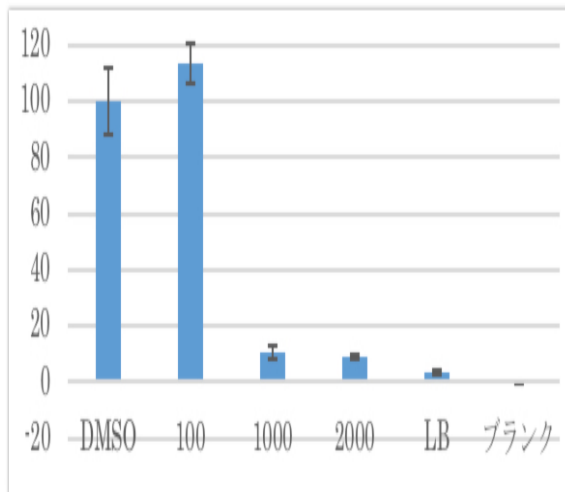
13 日培養品
MTT アッセイ



LDH アッセイ



6 日培養品
MTT アッセイ



LDH アッセイ

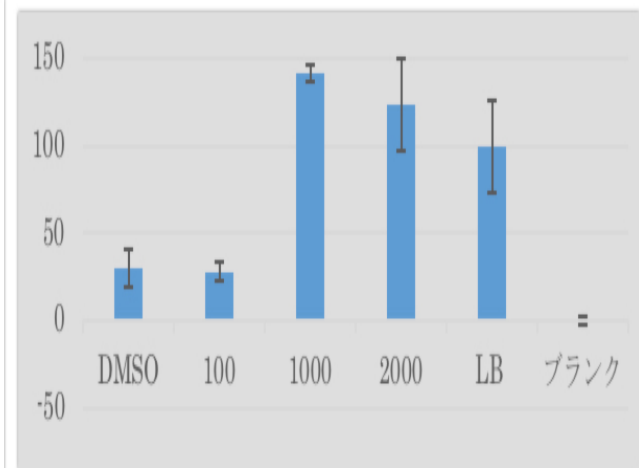


図 2. フォルペット, 3D 皮膚再構成系, 細胞毒性(縦軸, %;横軸, $\mu\text{g}/\text{mL}$)

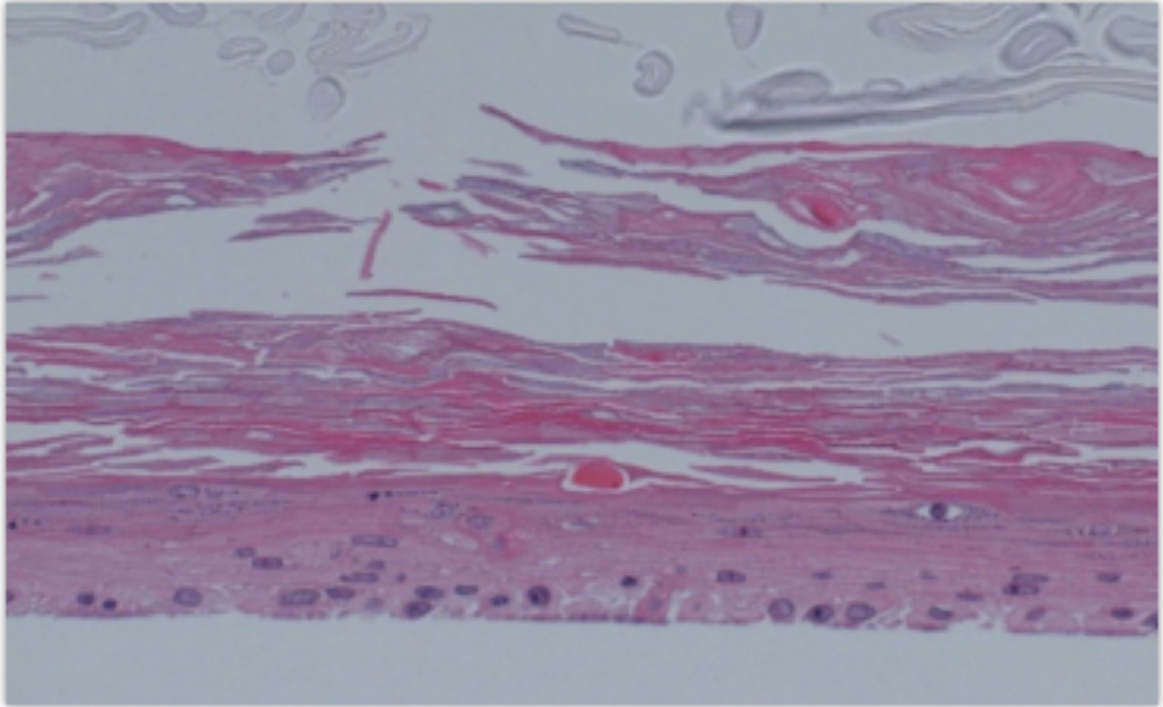
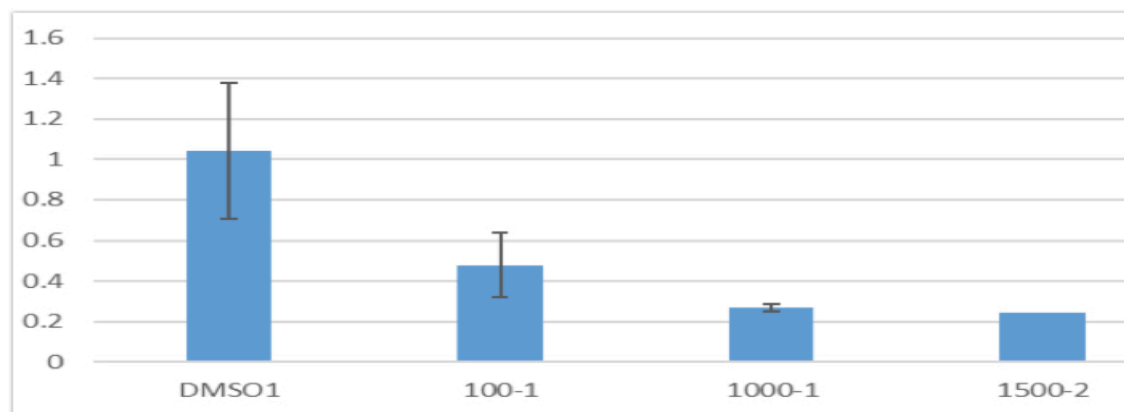


図 3. フォルペット, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 病理組織学的解析 (HE; 2000 $\mu\text{g/mL}$)

FLG
CLDN1



TNF- α

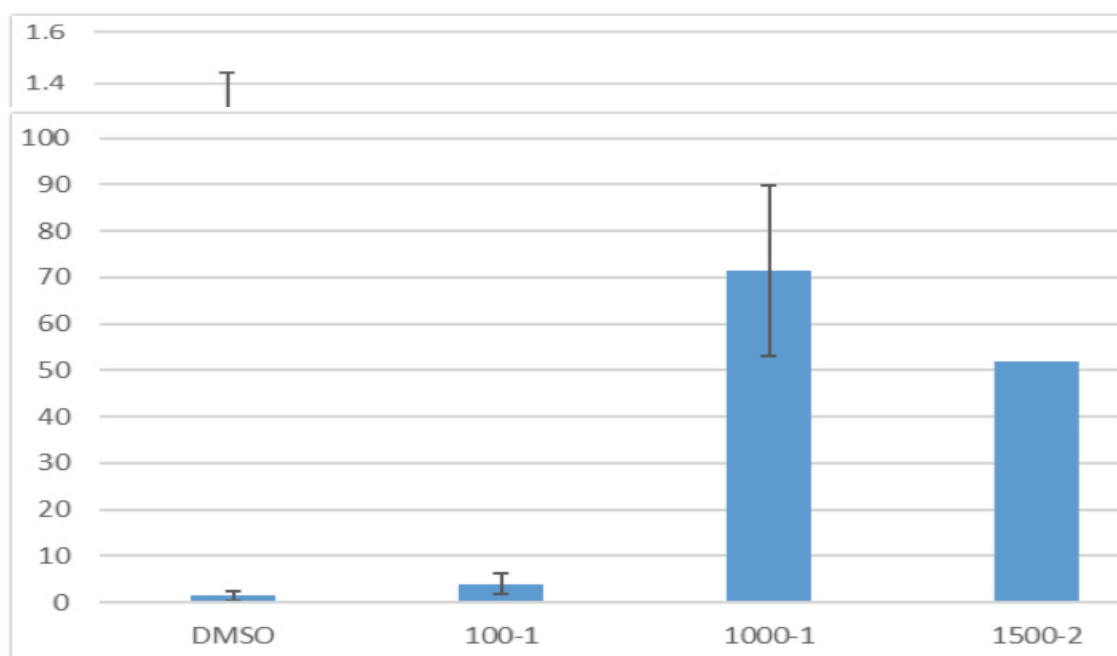
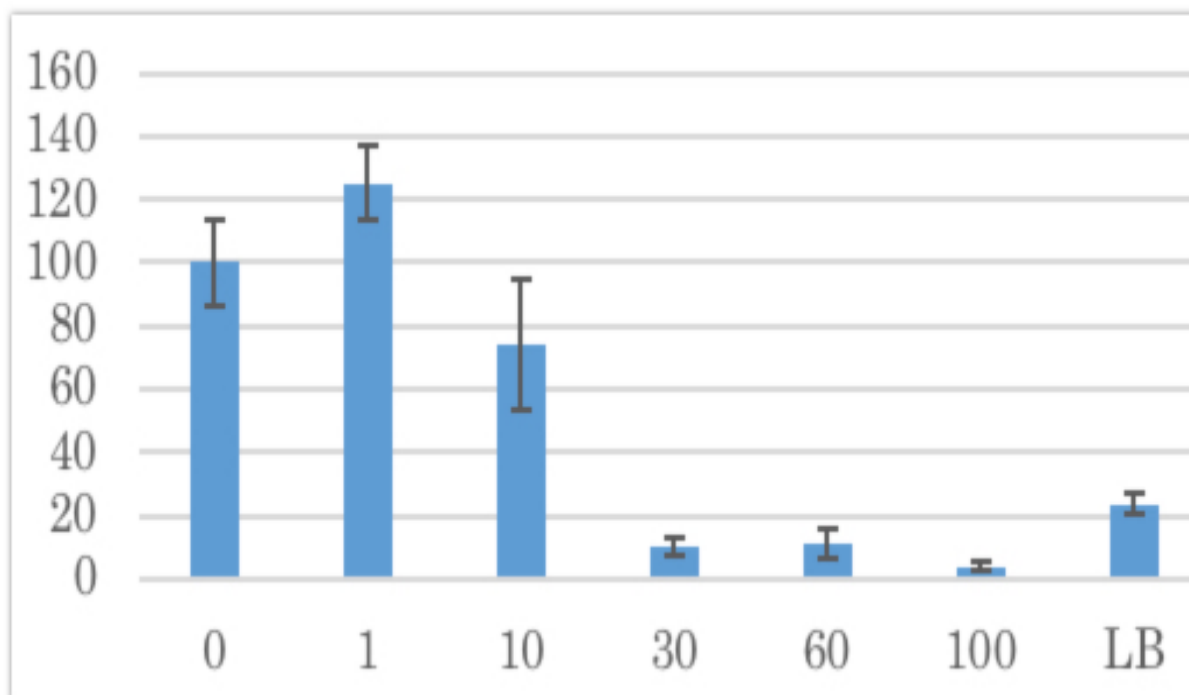


図 4. フォルペット, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 遺伝子発現(縦軸, 任意単位;横軸, $\mu\text{g/mL}$)

NKEK



HepG2

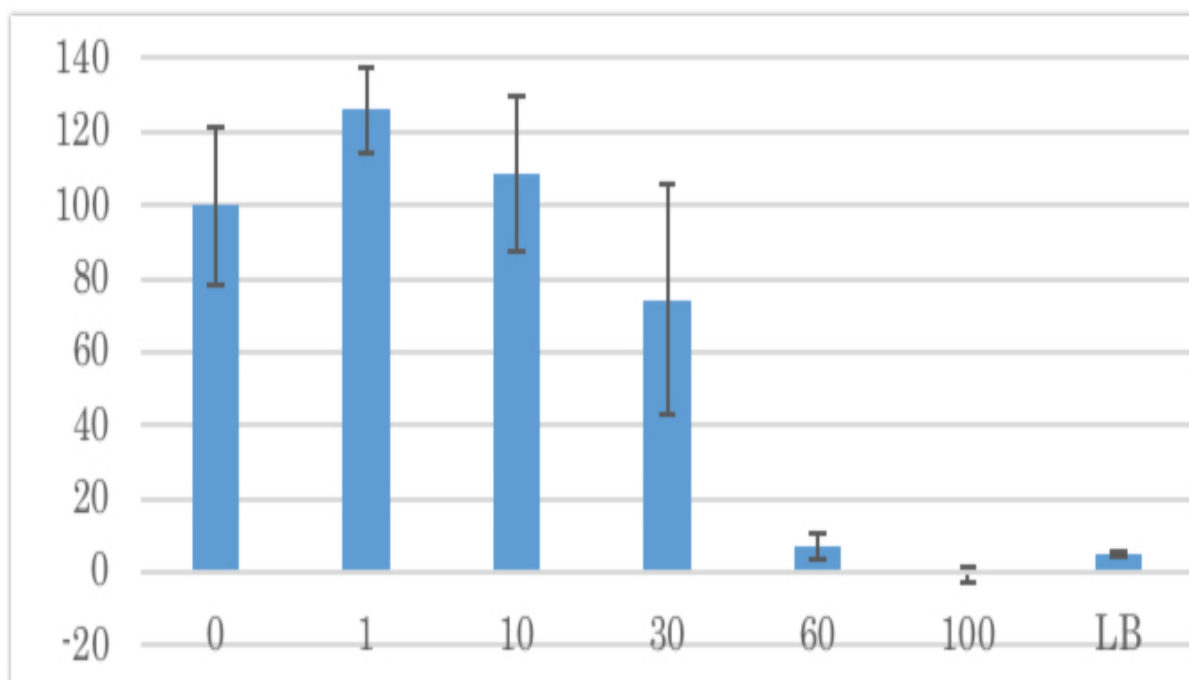
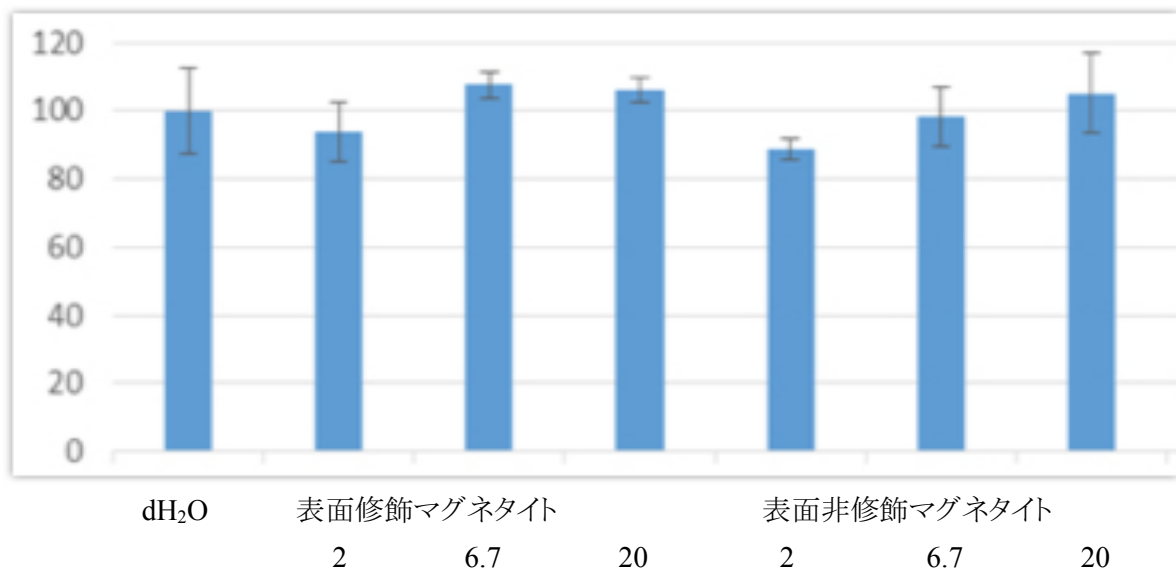


図 5. フォルペット, 単層培養系, 細胞毒性 (MTT アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

MTT アッセイ



LDH アッセイ

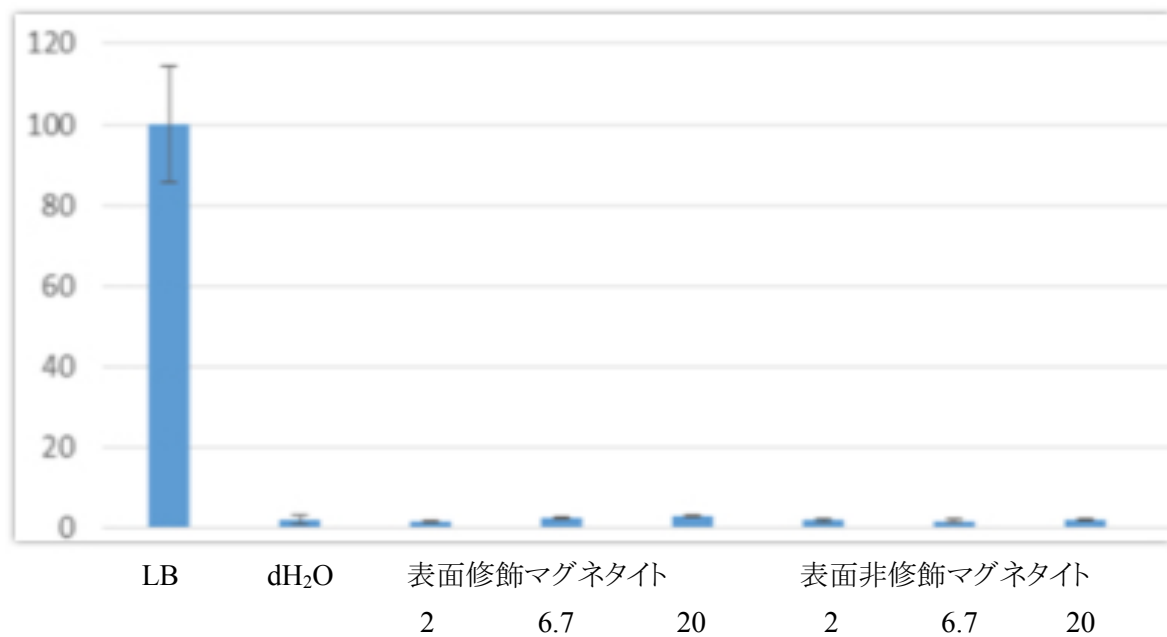
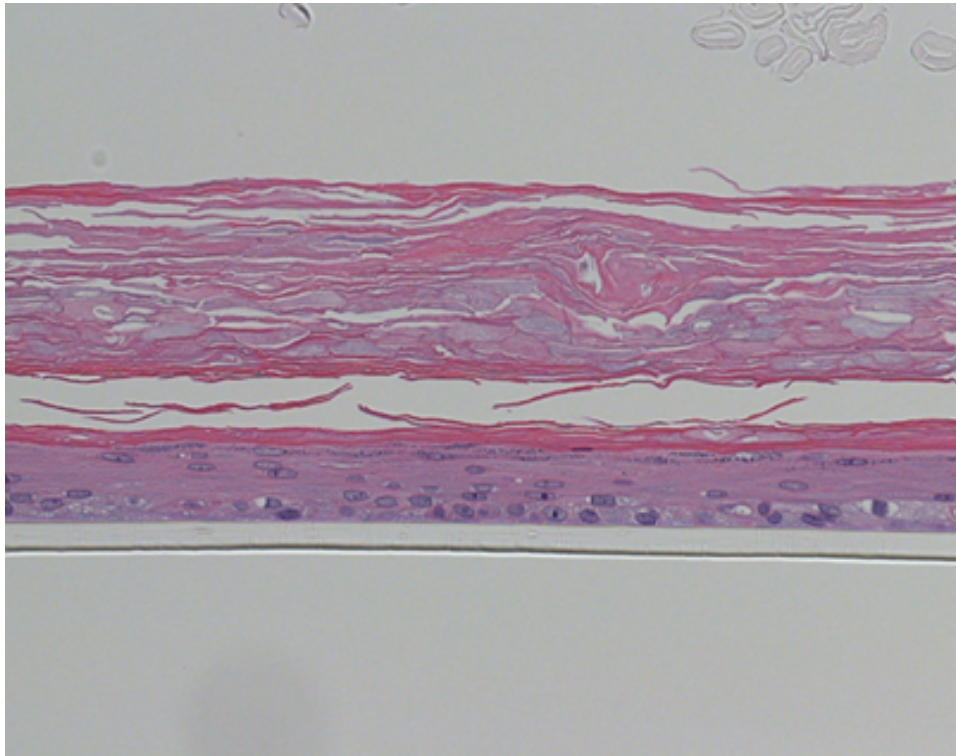


図 6. マグネタイト, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 細胞毒性 (縦軸, %; 横軸, mg/mL)

表面修飾マグネタイト



表面非修飾マグネタイト

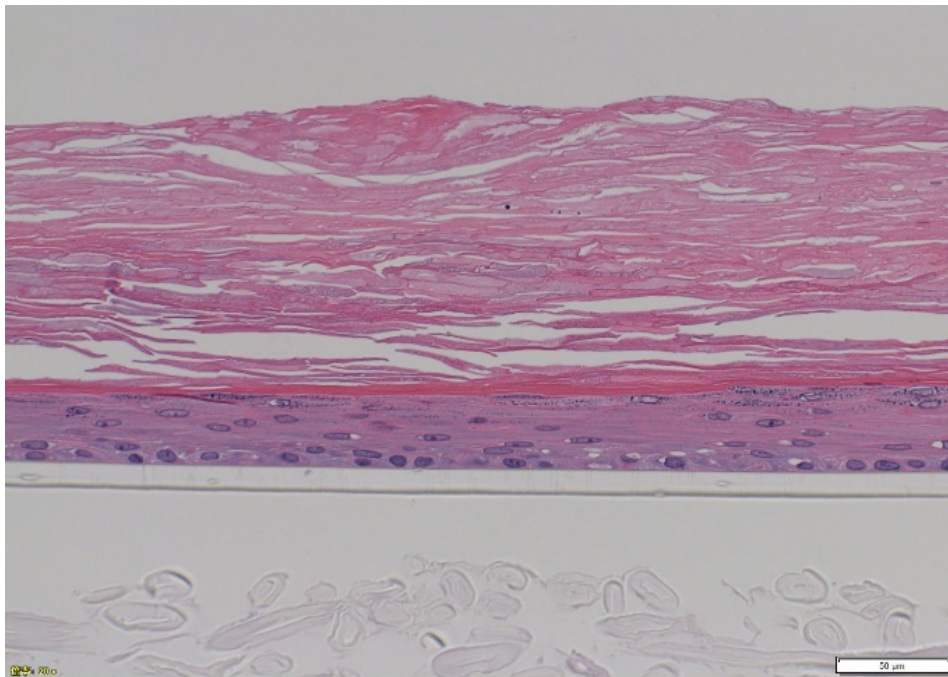


図 7. マグネタイト, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 病理組織学的解析 (HE; 20 mg/mL)

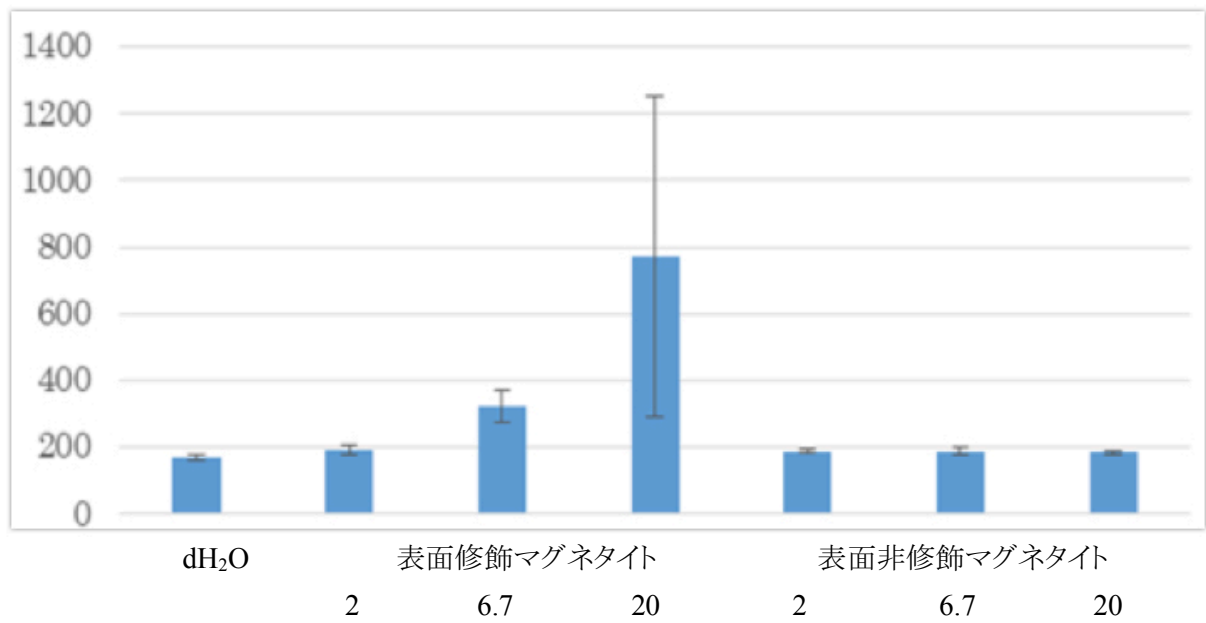
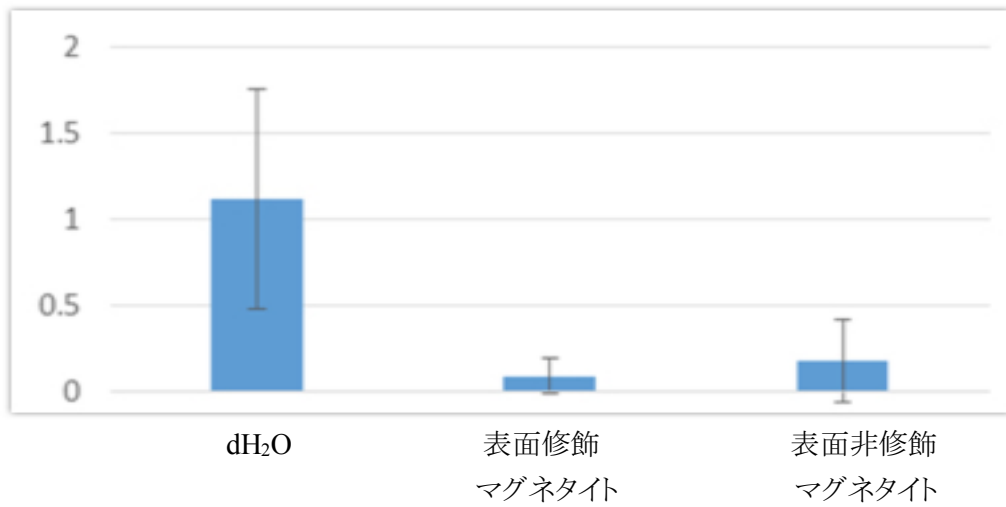
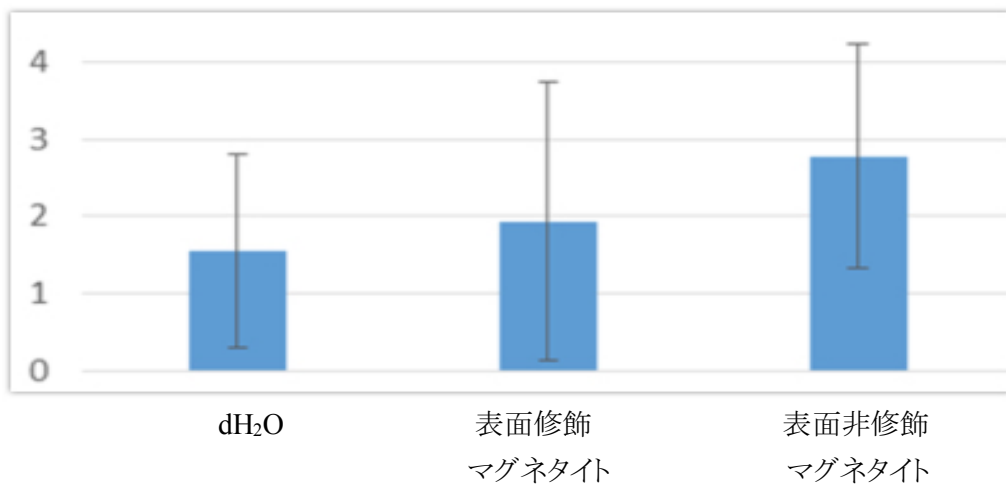


図 8. マグネタイト, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 培地中铁含有量(縦軸, µg/kg;横軸, mg/mL)

FLG



CLDN1



TNF- α

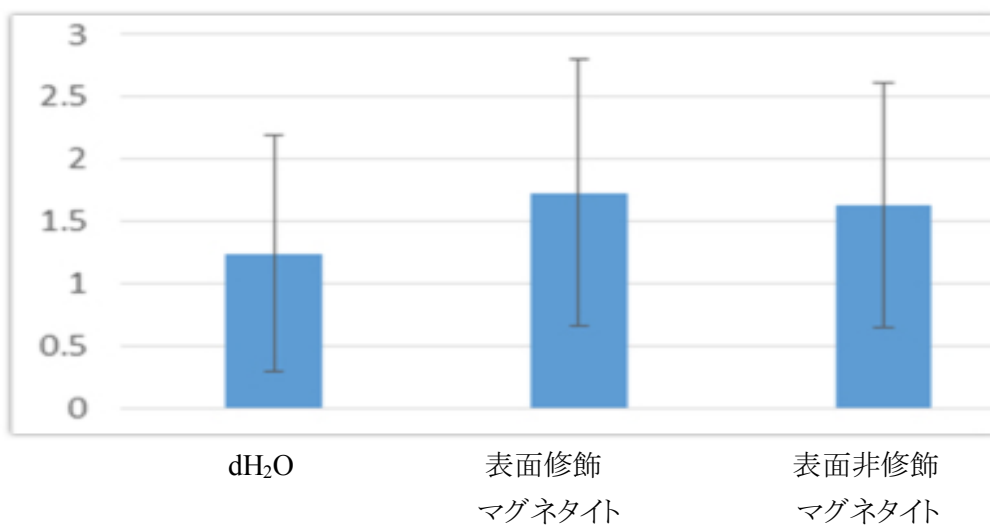
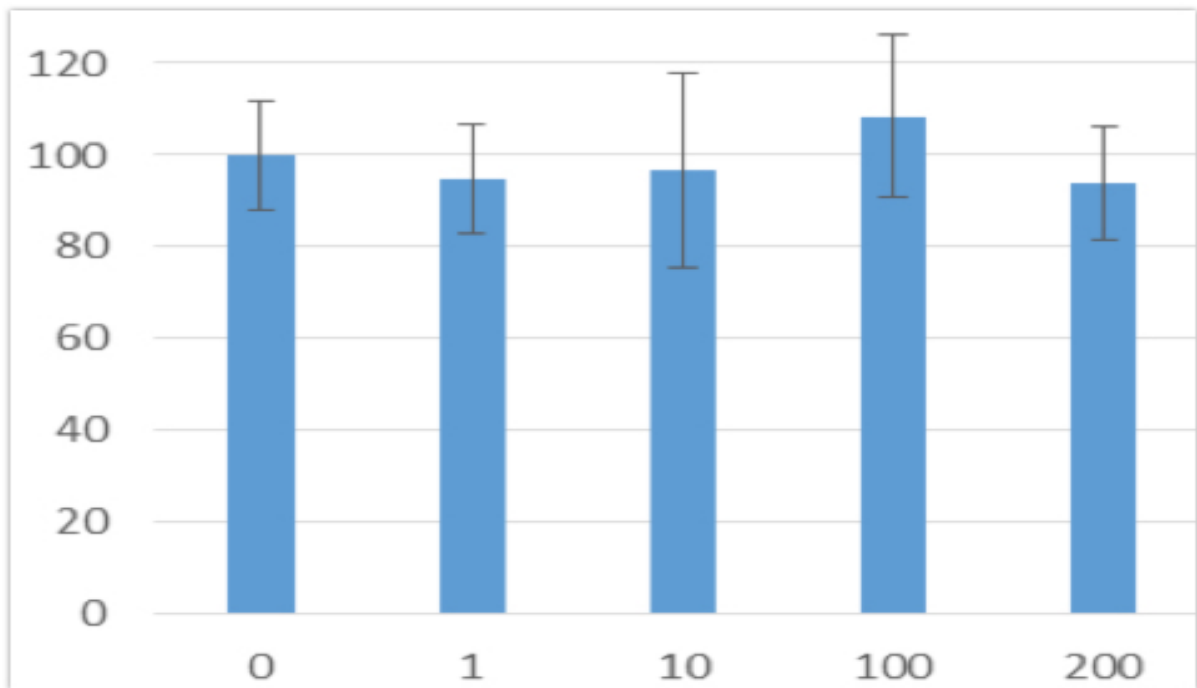


図 9. マグネタイト, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 遺伝子発現 (20 mg/mL; 縦軸, 任意単位; 横軸, $\mu\text{g/mL}$)

24 時間培養



72 時間培養

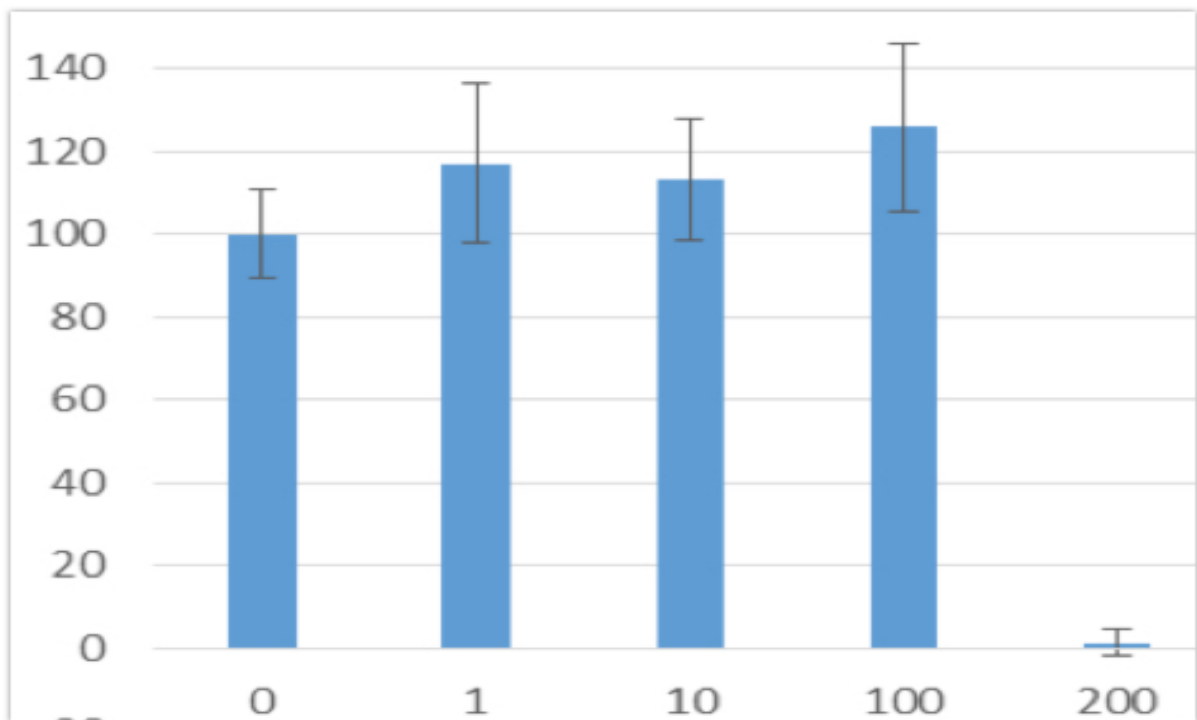
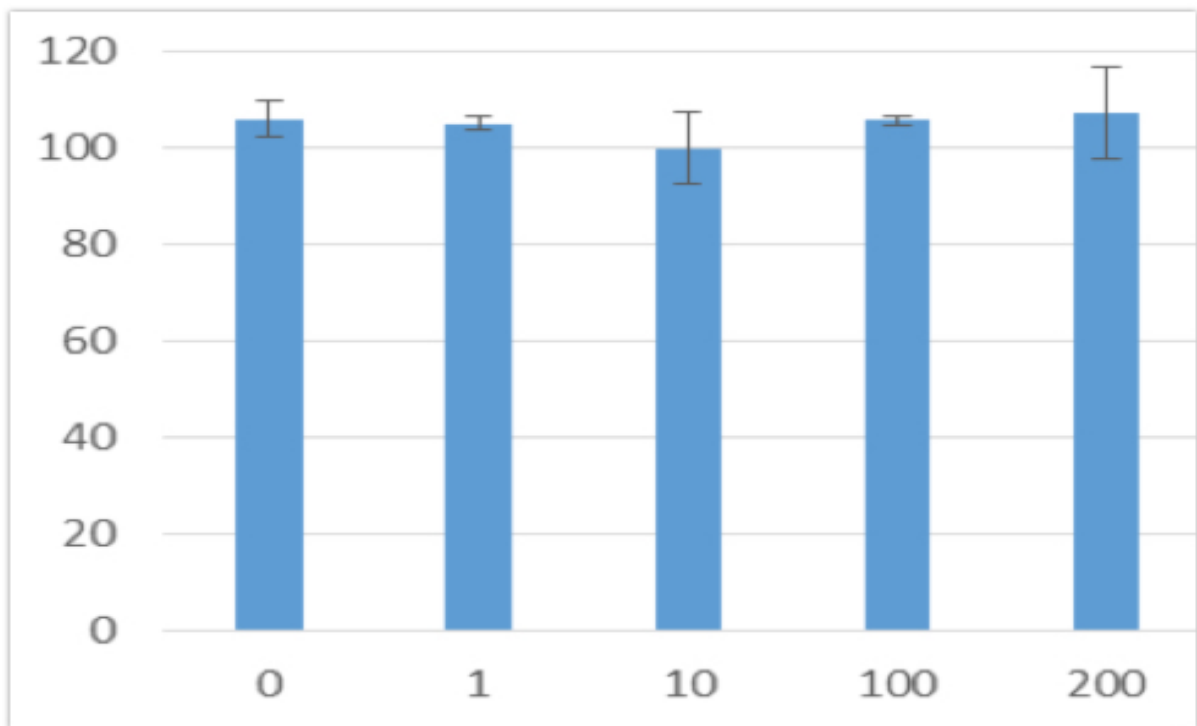


図 10. 表面修飾マグネタイト, NKEK 単層培養系, 細胞毒性 (Alamar Blue アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

24 時間培養



72 時間培養

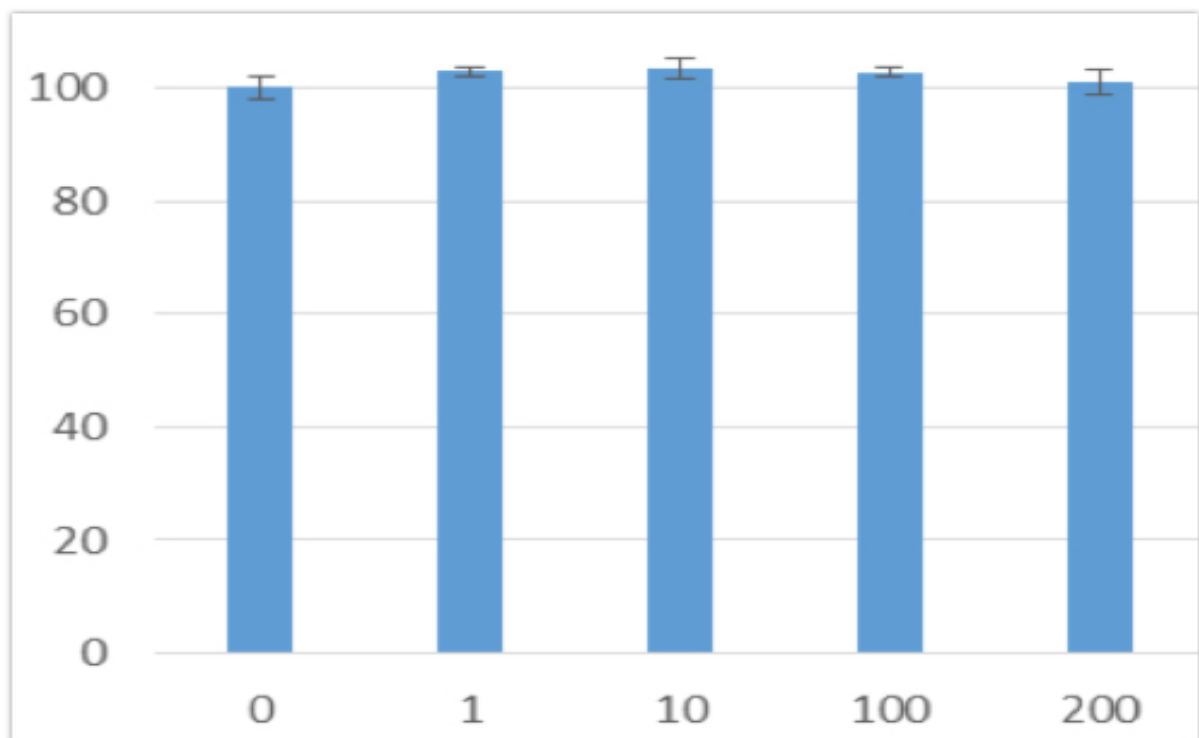
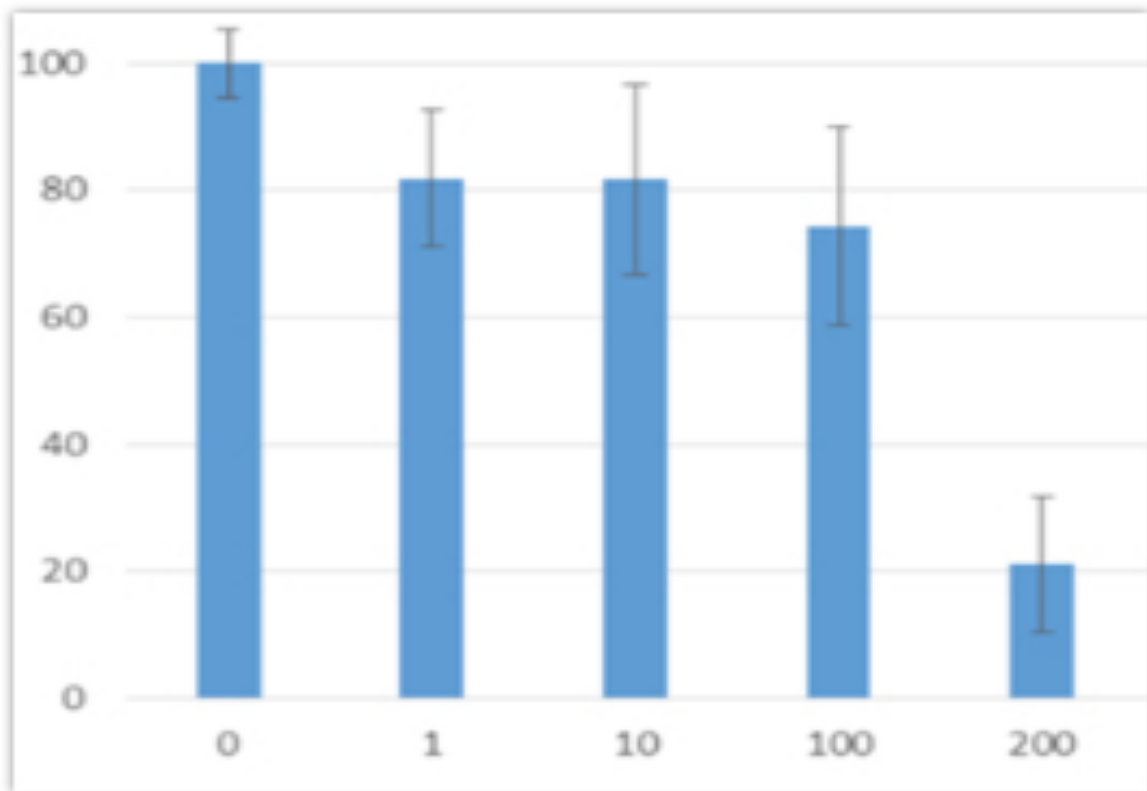


図 11. 表面修飾マグネタイト, HepG2 単層培養系, 細胞毒性 (Alamar Blue アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

24 時間培養



72 時間培養

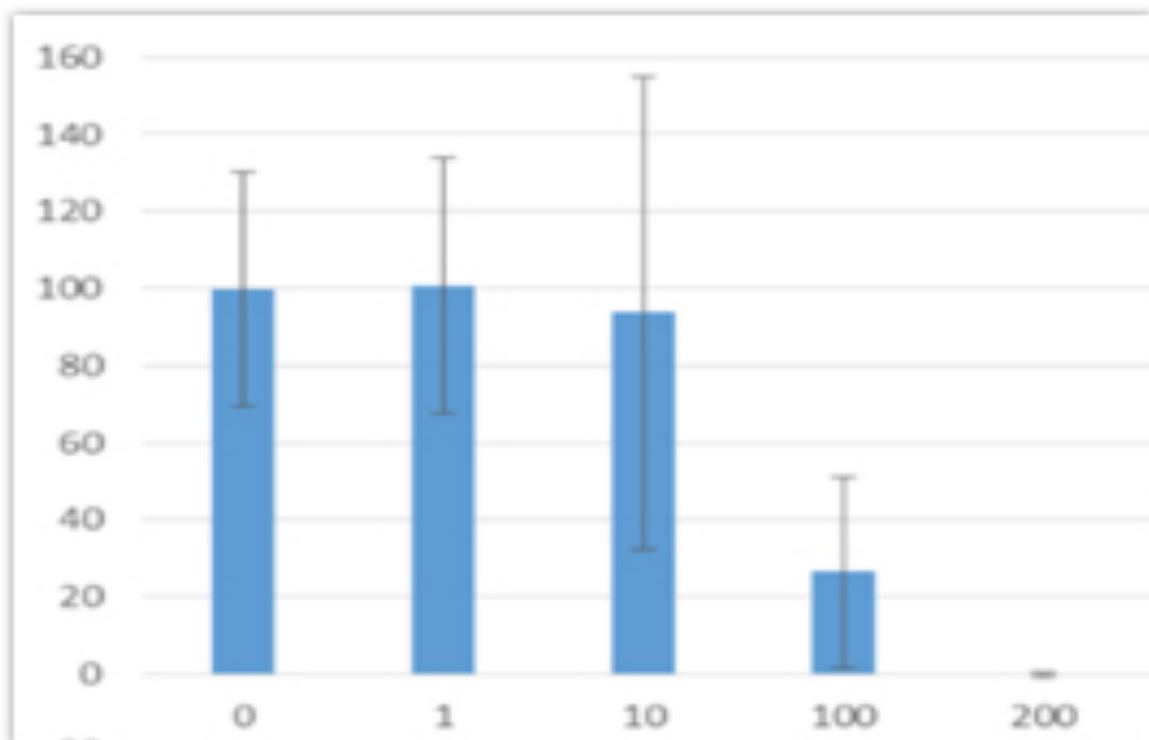
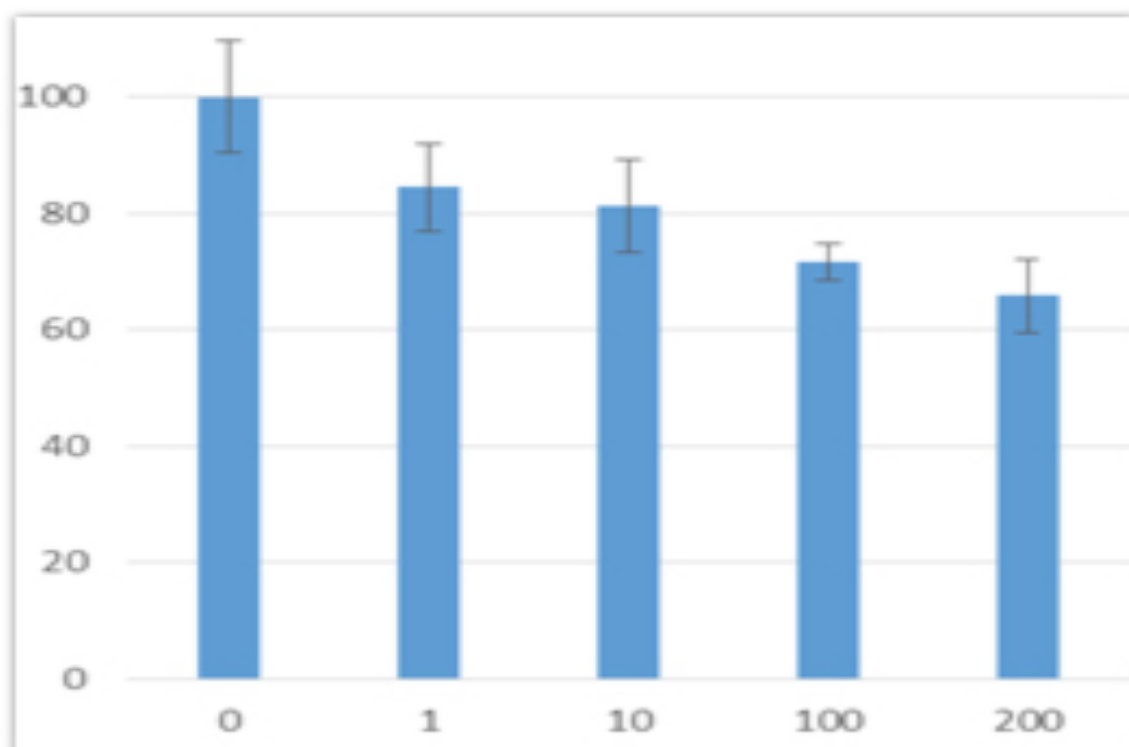


図 12. 表面非修飾マグネタイト, NKEK 単層培養系, 細胞毒性 (Alamar Blue アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

24 時間培養



72 時間培養

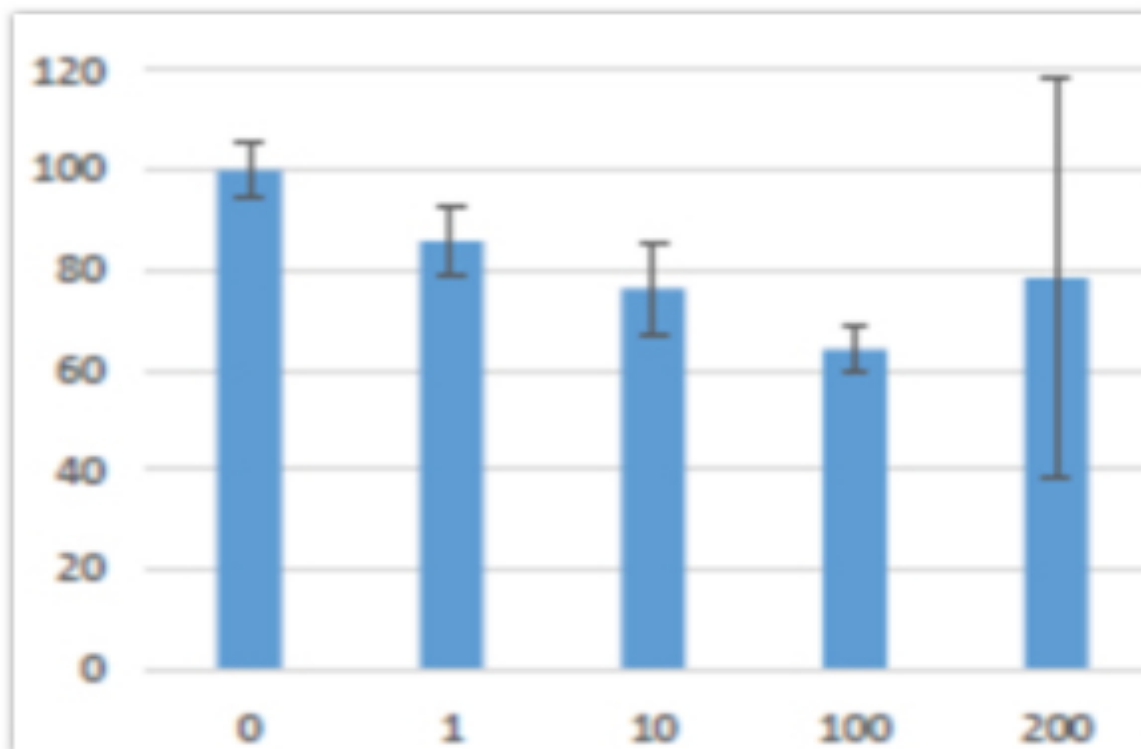


図 13. 表面非修飾マグネタイト, HepG2 単層培養系, 細胞毒性 (Alamar Blue アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

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およびリスク低減化に関する研究

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

研究分担者 宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長
研究協力者 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
研究協力者 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

研究要旨：物理化学的性質の異なる 2 種類の酸化亜鉛 (ZnO) ナノマテリアル及び 3 種類の二次粒子径が異なる酸化ニッケル (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 (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) に対する細胞毒性試験を実施した。まず、LabCyte EPI-MODEL による細胞毒性試験の実施方法について、OECD TG439 に記載されている LabCyte EPI-MODEL を用いた化学物質の皮膚刺激性評価法及び医療材料に対する皮膚刺激性 *in vitro* 試験方法 (EpiDerm EPI-200 RhE、SkinEthic RHE) を参照して、ナノマテリアルの評価に適する形に改良した。細胞毒性試験を実施した結果、LabCyte EPI-MODEL は、陽性対照の 1% SDS で細胞毒性を示したが、ZnO、NiO 共に最高濃度 400 µg/mL において細胞毒性を示さなかった。同試験液を用いたチャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 V79 細胞のコロニー法による細胞毒性試験では、IC₅₀ 値が 3-30 µg/mL であった。ZnO では、ZnO(sigma) が ZnO(alfa) に比べて強い細胞毒性を示し、NiO では二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。LabCyte EPI-MODEL のサイトカイン産生について確認した結果、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観察されなかった。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。

A. 研究目的

近年ナノマテリアルが我々の周りで広く使われるようになってきた。しかしながら、新規材料であるためその安全性は未知の部分が多く、生体影響の評価については、試験法や評価基準などが定められていない。ナノマテリアルの生体影響には、化学組成に加えて、形状、粒子径、凝集状態、表面

積、表面荷電など、様々な物理化学的要因が関与している。我々は、培養細胞を用い、十分にキャラクターゼーションされたナノマテリアルによる細胞応答を捉え、ヒト由来細胞を用いたナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系構築を目指すと共に、ナノマテリアルの細胞応答に及ぼす影響を解明するための基礎的検討を行ってきた。

平成 29 年度は、物理化学的性質の異なる 2 種類の酸化亜鉛 (ZnO) ナノマテリアル及び一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる 3 種類の酸化ニッケル (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 (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) に対する細胞毒性試験を実施した。また、培養上清中のサイトカインを測定し免疫応答への影響について検討した。

B. 研究方法

1) 材料及び物理化学的特性の測定

酸化亜鉛ナノマテリアル懸濁液は、Sigma-Aldrich 及び NanoTeK Alfa Aesar のナノ分散製品を用いた (以下、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)と略す)。注射用水にて 10 mg/mL に調製し、懸濁原液とした。NiO ナノマテリアル懸濁液は、Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル (一次粒子径 : <50 nm) を用い、サイズの異なる粉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。これらの懸濁原液を血清を含む液体培地で希釈した。懸濁原液及び培地懸濁液中での平均粒子径、粒径分布等を、動的光散乱光度計 ELSZ-2NPA (大塚電子) により測定した。

2) 細胞株及び培養方法、細胞毒性試験方法

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 (JCRB) は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS) を含む MEM (GIBCO) にて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。細胞株は、3-4 日ごとに継代培養した。コロニー形成試験は、ISO 10993-5:2009 に従い、24-well プレートに細胞を播種し (50 cells/well)、24 時間後に培地を除き、被験液を添加し、さらに 4 日間培養した。培養終了後、培地を除去し、

MeOH を添加して細胞を固定後、ギムザ染色液によりコロニーを染色した。陰性対照材料として PE シート、陽性対照材料として A (0.1% zinc diethyldithio-carbamate (ZDEC)-PU シート)、B (0.1% zinc dibutyldithio-carbamate (ZDBC) -PU シート) (食品薬品安全センター秦野研究所) を用いた。

3) 再構築ヒト皮膚モデル及び培養方法、細胞毒性試験方法

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (以下 J-TEC)) を用いた。前培養は、LabCyte EPI-MODEL を、維持培地が入った 4-well プレートへ移し、5% CO₂ インキュベーターで 15-30 時間、前培養した。試験液の添加は、溶媒コントロール、陽性対照、各試験液を 100 µL ずつ皮膚モデルの上に添加し、新しい維持培地が入った well へ皮膚モデルを移し、5% CO₂ インキュベーターで 18 時間、培養した。皮膚モデルを、維持培地が入った新しい 24-well プレートに移した後、培養上清を蛋白低吸着チューブに移し、液体窒素で凍結後、-80°C で保存した。皮膚モデルは、PBS で 10 回、ピペットを用いて洗浄し、MTT 溶液が入った 24-well プレートに移し、37°C、3 時間、反応させた。皮膚モデルを、0.5 mL のイソプロパノールが入った 1.5 mL tube に移し、2 時間、振とうしながら色素を抽出した。96-well プレートへ抽出液 200 µL を移し、OD 570 nm/ 650 nm を測定した。

4) 培養上清中のサイトカインの測定

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL の培養上清中の Interleukin-8 (IL-8)、IL-1β、Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)、IL-1α、MIF を ELISA により測定した。測定キットは、IL-8 (Human IL-8 ELISA Kit、Invitrogen)、

IL-1 β (Human IL-1 β ELISA Kit、Invitrogen), TNF- α (Human TNF- α ELISA Kit、Invitrogen)、IL-1 α (Human IL-1 α /IL-1F1 Quantikine ELISA kit、R&D systems)、MIF(Human MIF Quantikine ELISA kit、R&D systems)を用いた。(検出限界 IL-8 ; 1.0 pg/mL、IL-1 β ; 5.0 pg/mL、TNF- α ; 1.7 pg/mL、IL-1 α ; 1.0 pg/mL、MIF ; 0.068 ng/mL)

(倫理面への配慮)
該当なし。

C. 結果

1) 再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL を用いた細胞毒性試験系の構築

化学物質の皮膚刺激性評価については、ヒト正常表皮角化細胞から構成された再構築ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 試験法の検証が完了し、既に動物試験代替法として適用されている (OECD TG439) (表 1)。医療機器及び医用材料の刺激性はウサギを利用した皮膚刺激性試験及び皮内反応試験により評価されているが、動物愛護の観点より再構築ヒト皮膚モデルによる評価の検討が進められてきた。ISO/TC194/WG8 において、2 種類の皮膚刺激性 *in vitro* 試験法の性能を検証する国際ラウンドロビンスタディ(RRS)を実施することになり、当部は昨年度、EPI-200 を用いた RRS に参加し (MatTek 社製 EpiDermTM EPI-200 RhE モデル : 22 施設、EPISKIN 社製 SkinEthicTM RHE モデル : 7 施設が参加)、ISO 10993-23, Biological evaluation of medical devices -- Part 23: Determination of skin irritation of medical device extracts using Reconstructed human Epidermis (RhE)に収載準備中である。一方、医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価においても、ナノマテリアルに対する評価について ISO/TC194/WG17 におい

て検討がなされ、本年 4 月に、ISO 10993-22, Biological evaluation of medical devices -- Part 22: Guidance on nanomaterials が発出された。その中では、*in vitro* 評価法として従来の細胞毒性試験、遺伝毒性試験、刺激性試験法が引用されているが、今後、ナノマテリアルの *in vitro* 評価法についても、新規評価法の有用性が検証されれば、参照される可能性がある。

再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL は、J-TEC により開発された日本製の培養表皮モデルである。RRS で用いられたモデルにおいては、医療機器の皮膚刺激性試験用としてそれぞれ試験プロトコルの改良が行われたことから、当部と J-TEC で LabCyte EPI-MODEL 24 の医療機器試験用に向けたプロトコルの改良を行った。(表 2)。LabCyte EPI-MODEL は EpiDermTM EPI-200、SkinEthicTM に比べると細胞毒性の感受性が高い傾向があることから、被験物質暴露後の細胞の洗浄の際に、他のモデルと同様に洗浄瓶を用いて洗浄を行うと、陽性対照物質として用いた 1% SDS では、三次元皮膚モデルが剥がれ、組織がボロボロになってしまったため、ピペットを用いて洗浄を行う方法に変更した。

2) ZnO ナノマテリアルの物理化学的性質と A549 細胞、THP-1 細胞に対する細胞毒性評価

ナノマテリアルの気道及び皮膚毒性新規評価系およびマーカーの開発を目指すと共に、経気道及び経皮曝露を想定した毒性メカニズムを解明するための研究を進めるため、2 種類の ZnO ナノマテリアル分散製品を対象として、その物理化学的性質について明らかにすると同時に (ナノマテリアル溶液の物理化学的性質の測定に関しては、分担研究者・河上の報告参照。)、ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 細胞及びヒト血球系

細胞株 THP-1 細胞を用いた評価系を用いて細胞毒性を評価した (平成 27 年及び平成 28 年の報告書参照)結果を表 3 に示した。2 種類の ZnO ナノ分散製品(sigma 及び alfa)は、一次粒子径がそれぞれ <35 nm, 40 nm、水懸濁液中(10 mg/mL)での平均粒子径は、それぞれ 66 nm, 165 nm、ゼータ電位は 44.9 mV, -7.5 mV であった。血清含有培地懸濁液中 (0.2 mg/mL)では、ZnO(sigma)は粒径が変化したが、ZnO(alfa)は殆ど変化せず、ゼータ電位は共に血清含有培地に近い値を示した。A549 細胞、THP-1 細胞に対する細胞毒性は、共に ZnO(sigma)が ZnO(alfa)より強かった。

3) ZnO ナノマテリアル処理による V79 細胞の細胞毒性の検討

医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、細胞毒性の評価に汎用されているチャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 を用いて、コロニー形成試験法により ZnO ナノマテリアルの細胞毒性を評価した。その結果、ZnO(sigma)の IC₅₀ は 9.8 µg/mL、ZnO(alfa)の IC₅₀ は 12.6 µg/mL で、ZnO(sigma)の方が ZnO(alfa)より細胞毒性が強かった (図 1)。IC₅₀ の値は、V79 細胞を用いたコロニー形成試験法では、A549 細胞の MTS 法、THP-1 細胞の ATP 法に比べて小さかった。

4) ZnO ナノマテリアルの三次元皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性の検討

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL (J-TEC)に、2 種類の ZnO ナノ分散製品(sigma, alfa)を、100 及び 400 µg/mL で 18 時間暴露し、ピペットを用いて PBS で 10 回洗浄後、MTT 試薬により細胞毒性について検討した。陰性対照として PBS を暴露した細胞の生存率を 100%として示した。その結果、陽性対照の 1% SDS では強い細胞毒性を示したが、

ZnO では今回実施した最高濃度 400 µg/mL においても細胞毒性を示さなかった (図 2)。

5) 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL における ZnO ナノマテリアルによるサイトカイン産生

ZnO ナノマテリアルによる培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL(におけるサイトカインの産生について、今回、ELISA kit により、5 種類のサイトカインを測定した。その結果、IL-8、IL-1α、MIF は、LabCyte EPI-MODEL においてサイトカインの産生が観察されたが、IL-1β 及び TNF-α は検出限界以下であった (図 3)。IL-8 は、陰性対照 (PBS)、陽性対照(1% SDS)、ZnO(sigma)及び ZnO(alfa)の暴露により産生が観察されたが、PBS、1% SDS 間で産生量に差はなく、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)の暴露により陰性対照に比べて産生量の増加傾向が観察されたが、有意な差はなかった。IL-1α、MIF では、陽性対照 (1% SDS)において、各サイトカイン産生の上昇が観察されたが、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)では、産生量の上昇は観察されなかった。

6) NiO ナノマテリアルの物理化学的性質と A549 細胞、THP-1 細胞に対する細胞毒性評価

次に、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアル懸濁液を用いて、その物理化学的性質について明らかにすると同時に (ナノマテリアル溶液の物理化学的性質の測定に関しては、分担研究者・河上の報告参照。)、ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 細胞及びヒト血球系細胞株 THP-1 細胞を用いた評価系を用いて細胞毒性を評価した (平成 27 年及び平成 28 年の報告書参照)結果を表 4 に示した。3 種類のジルコニアボールを用いて調製した NiO 懸濁原液 (10 mg/mL)の平均粒子径は、それ

ぞれ 102, 172, 310 nm であった。培地中では懸濁原液より若干平均粒子径は大きくなったものの、同様の傾向を示した。粒径分布も同様の傾向を示した。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観察された。

7) NiO ナノマテリアル処理による V79 細胞の細胞毒性の検討

医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、細胞毒性の評価に汎用されているチャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 を用いて、コロニー形成試験法により NiO ナノマテリアルの細胞毒性を評価した。その結果、NiO (粉砕ジルコニアボールの直径 0.05mm) の IC₅₀ は 29.5 µg/mL、NiO (同直径 0.1mm) の IC₅₀ は 13.3 µg/mL、NiO (同直径 0.5mm) の IC₅₀ は 2.7 µg/mL で、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた (図 4)。IC₅₀ の値は、V79 細胞を用いたコロニー形成試験法では、A549 細胞の MTS 法、THP-1 細胞の ATP 法に比べて小さかった。

8) NiO ナノマテリアルの三次元皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性の検討

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL に、二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアル懸濁液を、100, 200 及び 400 µg/mL で 18 時間暴露し、ピペットを用いて PBS で 10 回洗浄後、MTT 試薬により細胞毒性について検討した。陰性対照として PBS を暴露した細胞の生存率を 100% として示した。その結果、陽性対照の 1% SDS では強い細胞毒性を示したが、NiO では、ZnO 同様、今回実施した最高濃度 400 µg/mL において

も細胞毒性を示さなかった (図 5)。

9) 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL における NiO ナノマテリアルによるサイトカイン産生

NiO ナノマテリアルによる培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL におけるサイトカインの産生について、今回、ELISA kit により 5 種類のサイトカインを測定した。その結果、IL-8、IL-1α、MIF は、LabCyte EPI-MODEL においてサイトカインの産生が観察されたが、IL-1β 及び TNF-α は検出限界以下であった (図 6)。IL-8 は、陰性対照 (PBS)、陽性対照 (1% SDS)、二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアルの暴露により産生が観察されたが、PBS、1% SDS 間で産生量に差はなく、二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルの暴露により陰性対照に比べて産生量の増加傾向が観察されたが、有意な差はなかった。IL-1α、MIF では、陽性対照 (1% SDS) において、各サイトカイン産生の上昇が観察されたが、二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルにより、産生量の上昇は観察されなかった。

D. 考察

ナノマテリアルの気道及び皮膚毒性新規評価系およびマーカーの開発を目指すと共に、経気道及び経皮曝露を想定した毒性メカニズムを解明するための研究を進める上で、再構築ヒト皮膚モデル用いた評価系は有用であると考えられる。化学物質の皮膚刺激性評価については、ヒト正常表皮角化細胞から構成された再構築ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 試験法の検証が完了し、OECD TG439 が、動物試験代替法として適用されている。一方、医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価においても、ナノマテリアルに対する評価について ISO/TC194/WG17 において検討がなされて

おり、今後、ナノマテリアルの *in vitro* 評価法についても、再構築ヒト皮膚モデルを用いた新規評価法の有用性が注目されている。再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL は国内の J-TEC により開発された培養表皮モデルで OECD TG439 に記載されている。LabCyte EPI-MODEL は、同じく OECD TG439 に記載されている EpiDerm™ EPI-200、SkinEthic™ に比べると細胞毒性の感受性が高い傾向があることから、LabCyte EPI-MODEL を用いた化学物質の皮膚刺激性評価法及び、医療材料に対する皮膚刺激性 *in vitro* 試験方法 (EpiDerm EPI-200 RhE、SkinEthic RHE) を参照して、ナノマテリアルの評価に適する形に改良し、今回ナノマテリアルの評価を行った。

本研究では、物理化学的性質の異なる 2 種類の ZnO ナノマテリアル及び一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性試験を実施した。その結果、LabCyte EPI-MODEL は、陽性対照の 1% SDS で細胞毒性を示したが、ZnO、NiO 共に最高濃度 400 µg/ml において細胞毒性を示さなかった。同試験液を用いたチャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 V79 細胞のコロニー法による細胞毒性試験では、IC₅₀ 値が 3-30 µg/ml であった。ZnO では、ZnO(sigma)が ZnO(alfa)に比べて強い細胞毒性を示し、NiO では二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められ、A549、THP-1 細胞と同様の結果を示した。LabCyte EPI-MODEL では、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。

また、LabCyte EPI-MODEL のサイトカイン産生について確認した結果、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観察

されず、IL-1β 及び TNF-α は検出限界以下であった。ヒト白血由来単球細胞株 THP-1 においては、ZnO ナノマテリアルの暴露では、IL-8、IL-1β、TNF において産生の増加が観察され、その量は、ZnO(sigma)の方が多かった。NiO ナノマテリアルの暴露では、IL-8、IL-1β、TNF において産生の増加が観察され、TNF、IL-1β 産生量は NiO の二次粒子径により差異が認められた。□ これらは、再構築ヒト皮膚モデルと血球系細胞株では、共にヒトの細胞由来であるが、由来の組織が異なるため、ナノマテリアルに対する感受性や応答が異なることが予想される。さらに、再構築ヒト皮膚モデルでは、皮膚のバリア機能があり、ナノマテリアルの細胞内への取り込みが異なり、細胞毒性が異なることが、サイトカインの産生へも影響を与えたと考えられた。

E. 結論

1. 物理化学的性質の異なる 2 種類の酸化亜鉛 (ZnO) ナノマテリアル及び 3 種類の二次粒子径が異なる酸化ニッケル (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、LabCyte EPI-MODEL は、陽性対照の 1% SDS で細胞毒性を示したが、ZnO、NiO 共に最高濃度 400 µg/ml において細胞毒性を示さなかった。同試験液を用いたチャイニーズハムスター肺由来繊維芽細胞 V79 細胞のコロニー法による細胞毒性試験では、IC₅₀ 値が 3-30 µg/ml であった。ZnO では、ZnO(sigma)が ZnO(alfa)に比べて強い細胞毒性を示し、NiO では二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。
2. LabCyte EPI-MODEL のサイトカイン産生について確認した結果、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観察されなかった。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 OECD TG439における各試験法のプロトコルパラメータ

| | EpiSkin™ (SM) | EpiDerm™ SIT (EPI-200) | SkinEthic RHE™ | LabCyte E PI-MODEL2 4 SIT |
|------------------------|--|---|---|---|
| A) インキュベーション前 | | | | |
| インキュベーションの時間 | 18~24 時間 | 18~24 時間 | 2 時間未満 | 15~30 時間 |
| 培地量 | 2 mL | 0.9 mL | 0.3 mL | 0.5 mL |
| B) 化学物質の適用 | | | | |
| 液体の場合 | 10 µL (26 µL/cm ²) | 30 µL (47 µL/cm ²) | 16 µL (32 µL/cm ²) | 25 µL (83 µL/cm ²) |
| 固体の場合 | 10 mg (26 mg/cm ²) + DW (5 µL) | 25 mg (39 mg/cm ²) + DPBS (25 µL) | 16 mg (32 mg/cm ²) + DW (10 µL) | 25 mg (83 mg/cm ²) + DW (25 µL) |
| ナイロンメッシュの使用 | 使用しない | 適宜使用する | 使用する | 使用しない |
| 総適用時間 | 15 分間 | 60 分間 | 42 分間 | 15 分間 |
| 適用温度 | 室温 | a) 室温で 25 分間 b) 37°C で 35 分間 | 室温 | 室温 |
| C) インキュベーション後の量 | | | | |
| 培地量 | 2 mL | 0.9 mL x 2 | 2 mL | 1 mL |
| D) 最大許容変動 | | | | |
| 連間の標準偏差 | SD ≤ 18 | SD ≤ 18 | SD ≤ 18 | SD ≤ 18 |

表2 ISO/TC194 WG8 Round Robin Studyにおける各試験法のプロトコルパラメータ

| | MatTek | Episkin | J-TEC |
|-----------------|---|---|---|
| | EPI-200-SIT | SkinEthic | LabCyte |
| | 0.63 cm ² | 0.5 cm ² | 0.32 cm ² |
| 前培養 | preincubation 1 : 60 ± 5 min | 2 hr / 0.3 ml or -24 hr / 1 ml | 15-30 hr |
| | preincubation 2 : 18-24 hr | | |
| 被験物質容量 | 100 µl | 100 ± 2 µl | 100 µl |
| 共培養時間 | 18 hr ± 30 minutes | 24 hr ± 1 hr | 18 hr ± 1 hr |
| 適用温度 | 37 ± 1°C | 37°C | 37°C |
| CO ₂ | 5 ± 1% | 5% | 5% |
| RH | 95% | 95% | high humidity |
| MTT | 1mg/ml, 0.3 ml/ well of 24 well plate | 1mg/ml, 0.3 ml/ well of 24 well plate | 1mg/ml, 0.3 ml/ well of 24 well plate |
| | 37 ± 1°C, 5 ± 1% CO ₂ , 95% RH | 37°C, 5 % CO ₂ , 95% RH | 37°C, 5 % CO ₂ , high humidity |
| | 3 hr ± 5 minutes | 3 hr ± 15 minutes | 3 hr |
| Extraction | 2 ml isopropanol/well of 24 well plate | 1.5 ml isopropanol/well of 24 well plate | 0.5 ml isopropanol in 1.5 ml tube |
| | 2 hr at RT with shaking (-120 rpm) | 2 hr ± 5min at RT with shaking (-150 rpm) | 2 hr at RT with shaking |

表3 ZnOナノマテリアルの物理化学的特性とA549細胞、THP-1細胞に対する細胞毒性、遺伝毒性

| 種類 | 製造(販売)元 | 懸濁液中平均粒子径* (nm ± SD) [°] 1次粒子径 [°] (nm) | 懸濁液中平均粒子径* (nm ± SD) [°] | | Zeta電位* (mV ± SD) [°] | | 細胞毒性 (IC50) | | 遺伝毒性 |
|------------------|---------------|---|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|--|------|
| | | | 注射用水 (10 mg/ml) | 10%FBS-MEM培地 (0.2 mg/ml) | 注射用水 (10 mg/ml) | 10%FBS-MEM培地 (0.2 mg/ml) | A549細胞 MTS法 (48h) (μ g/ml) | THP-1細胞 ATP法 (48h) (μ g/ml) | |
| ZnO [°] | Sigma-Aldrich | <35 | 65.8 ± 0.7 | 184.9 ± 0.8 | 44.9 ± 0.5 | -13.9 ± 0.6 | 31.7 | 49.4 | 陽性 |
| ZnO | Alfa Aesar | 40 | 164.9 ± 0.5 | 163.9 ± 1.8 | -7.5 ± 0.5 | -10.7 ± 0.5 | 72.5 | 63.0 | 陽性 |

*測定機器: 大塚電子ELSZ-2NPA [°]カタログより [°] cumulant法より算出 [°] 10%FBS-MEM培地のZeta電位 (-9.6 ± 1.6 mV) [°] 2%の3-Aminopropyltriethoxysilane含有

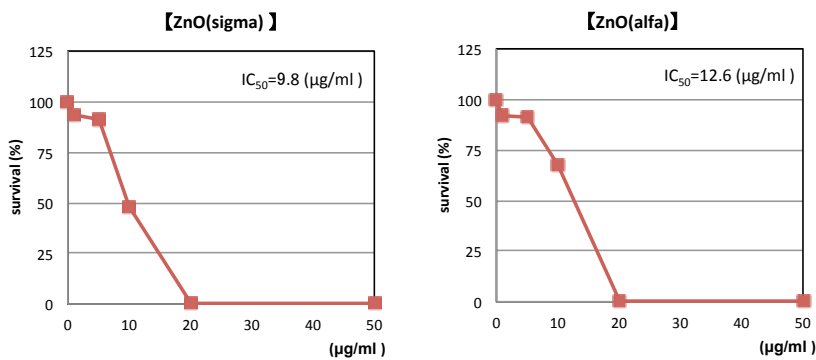


図1 ZnO処理によるV79細胞の細胞毒性(コロニー法)

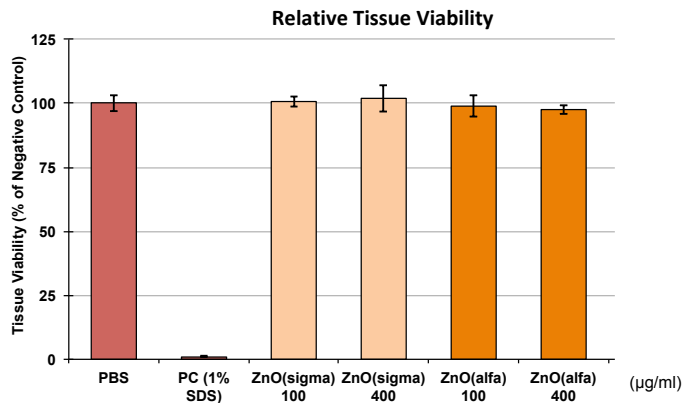
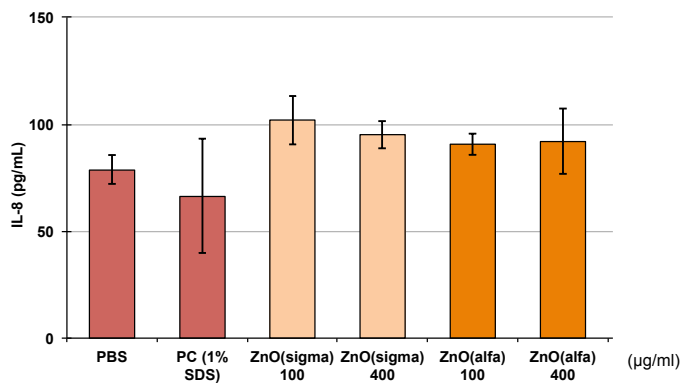
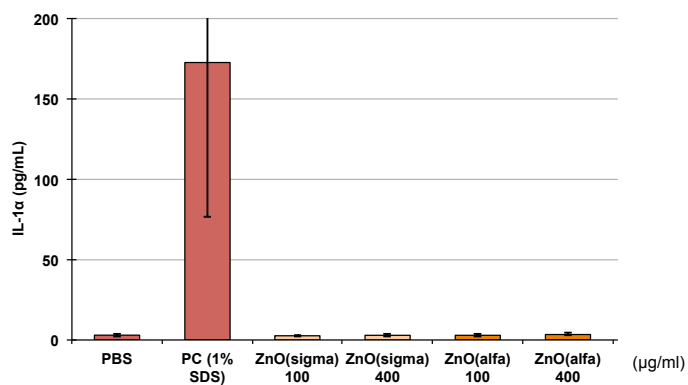


図2 ZnO処理による再構築ヒト皮膚モデルの細胞毒性(MTT法)

(A) IL-8



(B) IL-1α



(C) MIF

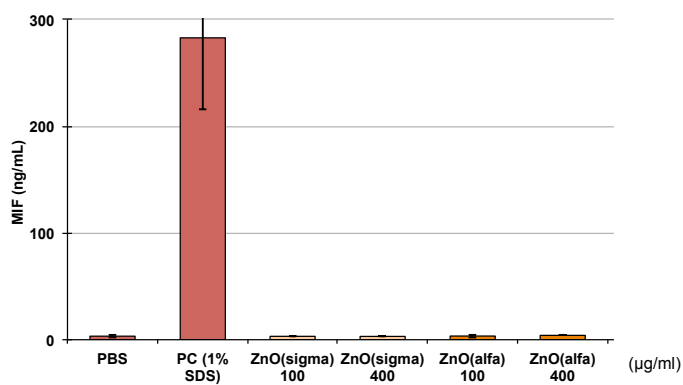


図3 ZnO処理による再構築ヒト皮膚モデルのサイトカイン産生

表4 NiOナノマテリアルの物理化学的特性とA549細胞、THP-1細胞に対する細胞毒性、遺伝毒性

| | 懸濁液中平均粒子径 ^a (nm ± SD) ^c | | | | | 細胞毒性 (IC50) | |
|--|---|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | 注射用水 | 10%FBS-MEM培地 | | | | A549細胞 | THP-1細胞 |
| | (10 mg/ml) | (0.4 mg/ml) | (0.2 mg/ml) | (0.1 mg/ml) | (0.05 mg/ml) | MTS法 (48h) ($\mu\text{g/ml}$) | MTS法 (48h) ($\mu\text{g/ml}$) |
| NiO (ϕ0.05nm)^b | 102.0 ± 0.5 | 154.8 ± 1.2 | 152.6 ± 2.5 | 151.2 ± 3.0 | 135.2 ± 1.5 | 147.5 | 35.8 |
| NiO (ϕ0.1nm)^b | 172.0 ± 2.8 | 234.7 ± 2.2 | 249.9 ± 4.2 | 258.0 ± 1.5 | 234.5 ± 17.8 | 83.5 | 34.2 |
| NiO (ϕ0.5nm)^b | 310.4 ± 6.7 | 373.1 ± 0.6 | 411.9 ± 13.1 | 345.1 ± 15.4 | 414.2 ± 5.8 | 33.4 | 30.0 |

^a測定機器: 大塚電子ELSZ-2NPA ^b粉体を秤量後、各サイズのジルコニアボールを用い遊量ボールミル型湿式破砕処理により調製。Tween80(0.1%(w/v)含有。
^ccumulant法より算出

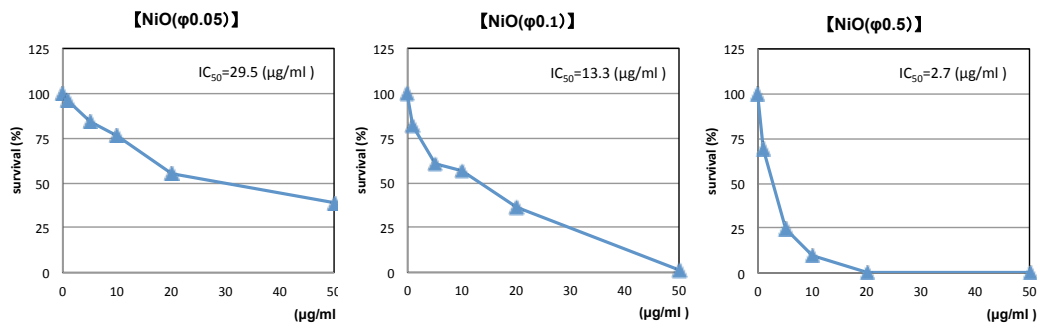


図4 NiO処理によるV79細胞の細胞毒性(コロニー法)

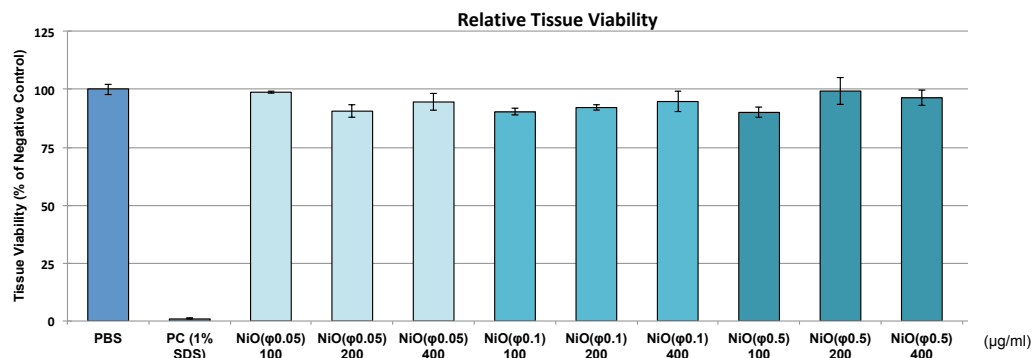
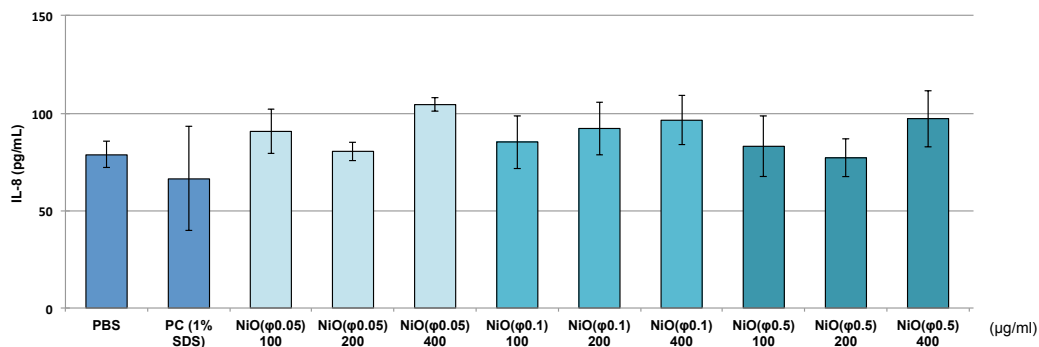
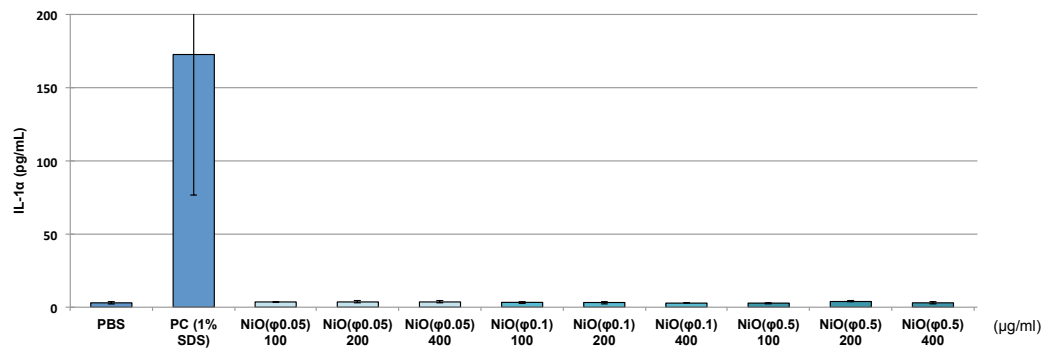


図5 NiO処理による再構築ヒト皮膚モデルの細胞毒性(MTT法)

(A) IL-8



(B) IL-1α



(C) MIF

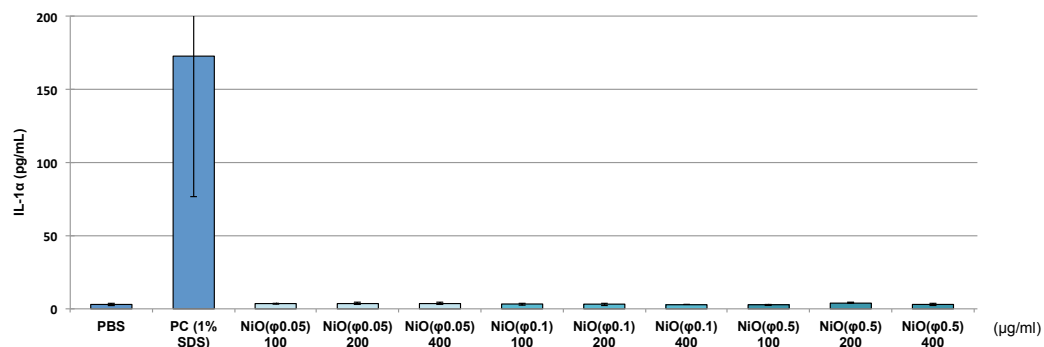


図6 NiO処理による再構築ヒト皮膚モデルのサイトカイン産生

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

ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析

研究分担者 花方 信孝 国立研究開発法人 物質・材料研究機構 技術開発・共用部門 副部門長

本研究では、カーボンナノチューブのヒト肺上皮細胞 A549 またはヒト前立腺がん細胞 DU145 への曝露実験において、マイクロ RNA (miRNA) の網羅的発現解析を行い、そのクラスタリング解析からナノマテリアルにより変動する特徴的な miRNA の同定を試みた。miRNA の発現挙動は、細胞株の違いに大きく依存し、カーボンナノチューブの形状の違いも発現に影響することが明らかとなった。また、ナノカーボンチューブにより変動する miRNA として hsa-miR-5787, hsa-miR-7110-5p, hsa-miR-3679-5p などが同定された。特に hsa-miR-5787 は昨年度の昨年度の研究でナノ粒子を曝露したときも発現が亢進しており、ナノマテリアルのバイオマーカーとなる可能性がある。

近年、エクソソーム中の miRNA が遠隔細胞の制御に関与していることが示唆されている。様々なナノ粒子がエクソソームの放出に及ぼす影響を調べた結果、単球およびマクロファージがリン酸カルシウム粒子を取り込むと、放出するエクソソーム量が増加することを見出した。リン酸カルシウム粒子はこれらの細胞にファゴサイトーシスで取り込まれるが、取り込まれた直後からエンドソームでの多胞体形成が促進されることが示唆されたが、今後、多胞体形成のトリガーの解明が必要である。

A. 研究目的

ナノマテリアル曝露の *in vitro* における影響に関しては、細胞の生死あるいは細胞内の特定酵素の活性が細胞毒性の指標となっている。しかしながら、ナノマテリアル曝露に細胞毒性が観察された場合、その毒性がどのような細胞機能に影響するのか、その分子機構に関する詳細な解析は行われていない。たとえば、ナノマテリアルが細胞内で活性酸素を発生させ、その活性酸素が細胞毒性を誘導するという報告は多いが、活性酸素が細胞機能にどのような影響を及ぼし、どのように生理状態が変化するのかに関しては詳しくわかっていない。

本研究では、近年、様々な遺伝子の制御因子として注目されている microRNA (miRNA) が、ナノマテリアルに曝露された細胞でどのように変化するのかを解析することによって、ナノマテ

リアル曝露のマーカーとしての miRNA を探索するとともに、同定された miRNA が制御する遺伝子を探索し、ナノマテリアルの細胞毒性に関する分子応答機構についての情報を得ることを目的とする。昨年度はナノマテリアルとして磁性体粒子を検討したが、本年度はカーボンナノチューブ (CNT) について、検討を行った。

B. 研究方法

B.1 CNT と miRNA の関係について:

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

Feature Extraction v11.5 によって数値化した。

なお、それぞれの曝露サンプルは、以下のよう
にサンプル名を付した。

DU145 Ctrl: DU145 細胞のコントロール。

DU145 L20: DU145 細胞に CNT(Long)を
20 µg/mL の濃度で曝露。

DU145 L200: DU145 細胞に CNT(Long)を
200 µg/mL の濃度で曝露。

DU145 S200: DU145 細胞に CNT(Short)を
200 µg/mL の濃度で曝露。

A549 Ctrl: A549 細胞のコントロール。

A549 L20: A549 細胞に CNT(Long)を
20 µg/mL の濃度で曝露。

A549 L200: A549 細胞に CNT(Long)を
200 µg/mL の濃度で曝露。

A549 S200: A549 細胞に CNT(Short)を
200 µg/mL の濃度で曝露。

B2. リン酸カルシウム粒子とエクソソームについて:

180ml の 11mM CaCl₂ 溶液 (pH = 9) を 20mL の 66mM Na₂HPO₄ 溶液 (pH = 11) に毎分 1mL の速度で添加した。混合物の pH を NaOH の添加により 10 を超えて維持した。この操作で得られたリン酸カルシウムの沈殿を、8000×g で 30 分間の遠心分離によって回収し、0.1mM NaOH 溶液、続いてアセトンで洗浄した。その後、リン酸カルシウムを再び水で 3 回洗浄し、次いで凍結乾燥した。

RAW264.7 および THP-1 細胞を、5×10⁴ 細胞 / mL の密度で、12 ウェルプレート中の 2mL 培地に播種した。24 時間後、培地を、500 および 1000µg/ mL の濃度のリン酸カルシウム粒子を含むエクソソーム枯濁 FBS (Thermo Fisher) を補充した培地と交換した。別の 1、2、4、6、24、48 および 72 時間培養した細胞を、遠心分離によって培地から除去した。培地中のエクソソームは、Total Exosome Isolation Kit (Thermo Fisher) を用いて集めた。エクソソームの数は、EXOCET エクソソーム定量アッセイキット (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) を

用いて測定した。

収集したエクソソーム (1×10⁶ 個のエクソソーム) または細胞 (3×10⁵ 個の細胞) に 70% HNO₃ 3500 µL、37% HCl 200 µL および 30% H₂O 2100 µL を Ca フリー PBS -) (Thermo Fisher) を添加し、次いで混合物をマイクロ波 (1000W) で 2 時間処理し、次いで ICP-OES でカルシウム濃度を測定した。

C. 研究結果

C1. CNT による miRNA 発現の変動:

miRNA マイクロアレイから得られたデータにおいて、シグナルが検出されなかった miRNA は発現していないと仮定して、シグナル強度を 0 とした。シグナル強度はサンプル間の誤差が含まれている可能性があるため、75 パーセントイルシフトで各サンプルのシグナル強度をノーマライゼーションした。

マイクロアレイに搭載されている miRNA プローブ 2549 種類に対して、各曝露条件において検出された miRNA 数は 232~309 個であった。条件は少し異なるが昨年度は同じバージョンのマイクロアレイを使って検出数が 103~166 個であったので、今年度の検出数は 2 倍くらいに増えている。これは、細胞からの RNA 抽出条件の最適化ができたためと考えられる。

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。得られた clustering tree を図 1 に示す。この clustering tree において、A549 細胞に CNT (Short) 200 µg/mL を曝露したサンプルが他と挙動が大きく異なっている。また、clustering tree の高さ方向の長さの違いから DU145 細胞は A549 細胞より CNT の影響を受けにくいことが分かる。さらに CNT (Long) の 20ug/mL と 200ug/mL が与える影響の差は小さく、濃度よりも CNT の形状の違い (Short か Long か) の方が細胞に与える影響が大きいと分かる。

次に、各条件のコントロールに対する発現比

(2 を底とする対数で表現した Log₂ 値)を求めた。その分布を表 1 に示す。DU145 細胞は A549 細胞よりも CNT の影響を受けにくいことから分布の幅が狭くなっている。

続いて、CNT の影響で発現が変化する miRNA の同定を試みた。いずれかの条件で発現量がコントロールに比べて変動した(Log₂ 値が 1 以上もしくは -1 以下)miRNA は 129 個あった。そのうちの一部を表 2 に示す。このリストから DU145 細胞と A549 細胞で共通して、CNT (Short) 200µg/mL により発現が亢進する miRNA として hsa-miR-5787, hsa-miR-7110-5p, hsa-miR-3679-5p の 3 つが見出された。hsa-miR-5787 は細胞増殖や細胞分化に関与する遺伝子 ELF5 をターゲット遺伝子とする。昨年度の研究で非修飾ナノ粒子を曝露したときも hsa-miR-5787 の発現が亢進した。このため、hsa-miR-5787 は CNT やナノ粒子以外のナノマテリアルに対しても発現が亢進するかもしれない。また、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。

C2. ナノ粒子がエクソソームに及ぼす影響

次に、全エクソソーム単離試薬を用いて 500µg/ml のリン酸カルシウム粒子で処理した RAW264.7 細胞から分泌された小胞を回収した。リン酸カルシウム粒子で処理された細胞から集められた小胞は、エクソソームマーカー分子 CD9 を発現し(図 2A)、これらの小胞はエクソソームであることが示唆された。回収された小胞はまた、後期エンドソームおよびリソソームのマーカーである LAMP-1 を発現した(図 2B)。

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 1000µg/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。500µg/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(図 3A)。しかし、500µg/ml~1000µg/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 500µg/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(図 3B)。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、CaP 粒子処理細胞において 2 倍以上高かった(図 3C)。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た(図 3D)。これらの結果は、リン酸カルシウム粒子が RAW264.7 および THP-1 細胞の両方においてエクソソーム分泌を刺激する可能性を有することを示唆している。

本実験においてリン酸カルシウム粒子で曝露した細胞から分泌されたエクソソームは、リン酸カルシウム粒子由来のカルシウムイオンを含むかどうかを調べた。その結果、リン酸カルシウム粒子で処理した細胞と処理していない細胞の間で、エクソソーム中のカルシウム濃度に有意差は観察されなかった(図 4A、B)。すなわち、リン酸カルシウム粒子もリン酸カルシウム粒子から放出されたカルシウムイオンも、リン酸カルシウム粒子で曝露された細胞から分泌されたエクソソームには含まれていない。細胞内のカルシウム濃度を分析すると、細胞内カルシウム濃度はリン酸カルシウム粒子濃度依存的に増加したことから(図 4C)、リン酸カルシウムあるいはリン酸カルシウム粒子から溶出したカルシウムイオンは細胞内にとどまっていることが示唆された。

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本発明者らの結果は、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。ILV の形成は、リン酸カルシウム粒子による処理後 4 時間で後期エンドソームまたはリソソームが破裂し始めたので、リン酸カルシウム粒子での処理後 4 時間以内に起こると考えられる。

D. 考察

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

エクソソームは、エンドソーム膜の陥入によって形成され、エンドソームに保持された ILV に由来する。ILV を含むエンドソームは、多胞体

(MVB) と呼ばれる。ILV は MVB と細胞膜との融合により細胞からエクソソームとして放出される。リン酸カルシウム粒子による処理による分泌されたエクソソームの数の増加は、MVB 形成の促進およびまたは MVB と細胞膜との融合に起因する。細胞質 Ca^{2+} 濃度の増加は、MVB と細胞膜の融合を促進することが報告されている。大部分のエクソソームはリン酸カルシウム粒子非処理細胞で 6 時間以内に分泌されたが、リン酸カルシウム粒子処理細胞ではエクソソーム分泌は 24 時間まで続き、大部分のエクソソームは処理後 6 時間から 24 時間に分泌された。上記のように、リン酸カルシウム粒子処理細胞における細胞質カルシウム濃度は、後期エンドソームまたはリソソームの破裂のために 6 時間後に増加すると考えられ、これは、リン酸カルシウム粒子処理細胞におけるエクソソーム分泌レベルの増加が促進に起因することを示唆する細胞質カルシウム濃度の増加による MBV の細胞膜との融合の可能性がある。上記のように、カルシウムを含まない ILV は、リン酸カルシウム粒子処理細胞において 4 時間前に形成されると考えられているが、リン酸カルシウム粒子が ILV および MBV の形成を刺激するかどうかの直接の証拠はない

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) なし

2. 学会発表

(1) なし

F. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

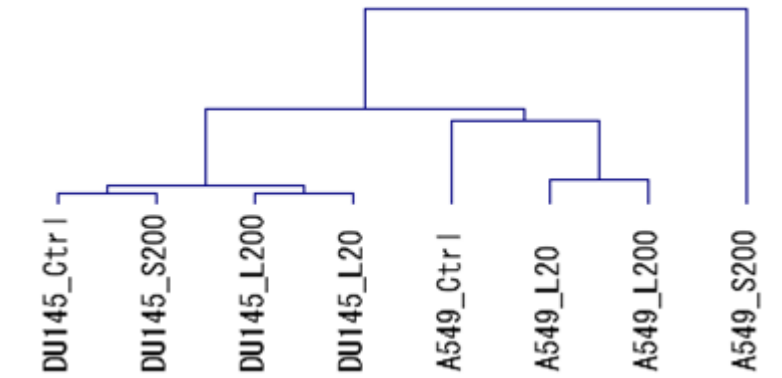


図 1. miRNA の網羅的解析から得られたクラスタリングツリー

表 1. 各条件のコントロールに対する発現比の分布

| Sample / Sample | DU145 Long20 /Ctrl | DU145 Long200 /Ctrl | DU145 Short200 /Ctrl | A549 Long20 /Ctrl | A549 Long200 /Ctrl | A549 Short200 /Ctrl |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 検出miRNA数 | 236 | 259 | 258 | 228 | 222 | 202 |
| 平均値 | -0.237 | 0.185 | 0.022 | 0.512 | 0.371 | 0.517 |
| 標準偏差 | 0.495 | 0.500 | 0.393 | 0.836 | 1.044 | 1.679 |
| 最小値 | -2.129 | -1.715 | -1.378 | -1.307 | -1.646 | -2.174 |
| 第一四分位値(25% percentile) | -0.581 | -0.089 | -0.164 | 0.037 | -0.436 | -0.760 |
| 中央値(50% percentile) | -0.156 | 0.225 | 0.005 | 0.290 | -0.064 | -0.141 |
| 第三四分位値(75% percentile) | 0.076 | 0.472 | 0.194 | 0.989 | 1.028 | 1.792 |
| 最大値 | 1.071 | 1.586 | 2.162 | 3.583 | 3.848 | 6.390 |
| 頻度(-3超過 -2以下) | 1 | | | | | 3 |
| 頻度(-2超過 -1以下) | 16 | 6 | 5 | 5 | 2 | 27 |
| 頻度(-1超過 0以下) | 141 | 71 | 123 | 48 | 112 | 76 |
| 頻度(0超過 1以下) | 76 | 172 | 125 | 120 | 52 | 28 |
| 頻度(1超過 2以下) | 2 | 10 | 4 | 45 | 32 | 21 |
| 頻度(2超過 3以下) | | | 1 | 7 | 21 | 31 |
| 頻度(3超過 4以下) | | | | 3 | 3 | 10 |
| 頻度(4超過 5以下) | | | | | | 3 |
| 頻度(5超過 6以下) | | | | | | 1 |
| 頻度(6超過 7以下) | | | | | | 2 |

表 2. 発現がコントロールに比べて変動した (Log2 値が 1 以上または -1 以下) miRNA のリスト(一部)

| SystematicName | DU145 Long20 /Ctrl | DU145 Long200 /Ctrl | DU145 Short200 /Ctrl | A549 Long20 /Ctrl | A549 Long200 /Ctrl | A549 Short200 /Ctrl | Target Gene (m RTaBase) Strong evidence | | |
|------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---|------|-------|
| hsa-m R-7110-5p | -0.818 | 0.367 | 1.080 | 3.583 | 3.753 | 6.390 | --- | | |
| hsa-m R-5787 | -1.239 | 1.586 | 2.162 | 3.273 | 3.848 | 6.193 | ELF5 | | |
| hsa-m R-7107-5p | -0.688 | -0.150 | 0.716 | 2.518 | 2.990 | 5.466 | --- | | |
| hsa-m R-4281 | -0.313 | 0.514 | 0.862 | 1.765 | 2.096 | 4.345 | --- | | |
| hsa-m R-3679-5p | -0.247 | 0.282 | 1.019 | 2.271 | 2.761 | 4.313 | --- | | |
| hsa-m R-1207-5p | -0.644 | 0.084 | 0.759 | 1.826 | 2.208 | 4.159 | TERT | | |
| hsa-m R-6088 | -0.576 | 0.147 | 0.586 | 1.921 | 2.184 | 3.975 | --- | | |
| hsa-m R-642a-3p | -1.159 | -0.504 | 0.192 | 1.051 | 1.398 | 3.966 | --- | | |
| hsa-m R-4687-3p | -0.457 | 0.251 | 0.338 | 3.101 | 3.153 | 3.939 | --- | | |
| hsa-m R-4466 | -0.723 | -0.233 | -0.168 | 2.574 | 2.856 | 3.723 | --- | | |
| hsa-m R-1225-5p | -0.687 | 0.072 | 0.499 | 1.762 | 1.866 | 3.567 | --- | | |
| hsa-m R-1973 | -0.699 | 0.277 | -0.358 | 2.170 | 2.234 | 3.401 | --- | | |
| hsa-m R-642b-3p | -0.884 | -0.329 | 0.440 | 0.731 | 1.173 | 3.167 | --- | | |
| hsa-m R-3960 | -0.460 | 0.431 | 0.166 | 2.055 | 2.131 | 3.165 | --- | | |
| hsa-m R-4516 | -0.773 | -0.094 | 0.081 | 1.424 | 1.742 | 3.060 | STAT3 | | |
| hsa-m R-6090 | -0.678 | 0.228 | 0.061 | 1.846 | 1.982 | 3.023 | --- | | |
| hsa-m R-4485-5p | -0.623 | 0.229 | -0.049 | 1.490 | 1.709 | 2.989 | --- | | |
| hsa-m R-1268a | -0.882 | 0.119 | 0.226 | 1.575 | 2.090 | 2.963 | --- | | |
| hsa-m R-6769b-5p | | | | 0.708 | 1.333 | 2.911 | --- | | |
| hsa-m R-4485-3p | -0.976 | -0.433 | -0.382 | 1.710 | 1.825 | 2.870 | --- | | |
| hsa-m R-4530 | -0.440 | 0.119 | 0.453 | 1.516 | 2.097 | 2.829 | --- | | |
| hsa-m R-1246 | -0.483 | 0.504 | 0.426 | 2.760 | 2.174 | 2.345 | DYRK1A | | |
| hsa-m R-3656 | -0.580 | -0.233 | -0.018 | 1.156 | 1.894 | 2.757 | --- | | |
| hsa-m R-1275 | 0.253 | 0.867 | 0.523 | 0.994 | 1.340 | 2.742 | --- | | |
| hsa-m R-762 | -1.101 | 0.254 | 0.066 | 1.580 | 1.753 | 2.739 | AMD1 | FTM5 | |
| hsa-m R-6869-5p | -0.585 | 0.164 | 0.193 | 2.707 | 2.577 | 2.661 | --- | | |
| hsa-m R-6749-5p | 0.163 | 0.674 | 0.744 | 1.052 | 1.134 | 2.613 | --- | | |
| hsa-m R-4515 | -1.078 | 0.141 | 0.147 | 1.853 | 1.778 | 2.568 | --- | | |
| hsa-m R-1915-3p | -0.487 | 0.310 | 0.076 | 1.759 | 2.056 | 2.534 | BCL2 | | |
| hsa-m R-5006-5p | -0.633 | -0.237 | -0.533 | 1.759 | 2.013 | 2.520 | --- | | |
| hsa-m R-6821-5p | -0.552 | 0.195 | 0.051 | 1.681 | 1.903 | 2.485 | --- | | |
| hsa-m R-3135b | | 0.390 | -0.195 | 1.849 | 2.086 | 2.423 | --- | | |
| hsa-m R-6724-5p | -1.504 | -0.307 | -0.274 | 1.796 | 1.939 | 2.419 | --- | | |
| hsa-m R-6740-5p | -0.730 | 0.148 | 0.045 | 1.087 | 1.041 | 2.377 | --- | | |
| hsa-m R-2861 | -0.632 | 0.034 | 0.163 | 1.735 | 2.372 | 2.214 | --- | | |
| hsa-m R-5001-5p | 0.069 | 0.072 | 0.072 | 1.429 | 2.260 | 1.917 | --- | | |
| hsa-m R-1202 | 0.116 | 0.436 | 0.519 | 0.681 | 0.894 | 2.232 | GRM4 | | |
| hsa-m R-3198 | -0.917 | -0.133 | -0.118 | 1.839 | 1.595 | 2.225 | --- | | |
| hsa-m R-638 | -0.477 | -0.236 | 0.097 | 1.623 | 2.221 | 2.213 | OSCP1 | SP2 | SOX2 |
| hsa-m R-6800-5p | -0.288 | 0.327 | 0.062 | 1.874 | 2.065 | 2.188 | --- | | |
| hsa-m R-6780b-5p | -0.625 | 0.280 | 0.292 | 1.230 | 1.132 | 2.158 | --- | | |
| hsa-m R-494-3p | -0.588 | 0.551 | 0.182 | 1.050 | 1.368 | 2.117 | PTEN | CDK6 | ARN1L |
| hsa-m R-1268b | -0.300 | 0.145 | 0.138 | 1.665 | 2.046 | 2.111 | --- | | |
| hsa-m R-6879-5p | -0.651 | 0.033 | 0.057 | 1.425 | 1.204 | 2.102 | --- | | |
| hsa-m R-7704 | -0.359 | 0.158 | 0.158 | 1.722 | 2.025 | 2.065 | --- | | |
| hsa-m R-4728-5p | -0.982 | 0.003 | -0.072 | 1.392 | 1.499 | 2.048 | --- | | |
| hsa-m R-4459 | -0.729 | -0.136 | 0.195 | 0.543 | 1.109 | 2.045 | --- | | |
| hsa-m R-6089 | -0.275 | 0.485 | 0.292 | 1.651 | 1.917 | 2.024 | --- | | |
| hsa-m R-455-3p | | | | -0.195 | -1.646 | -2.058 | --- | | |
| hsa-m R-1260b | 0.358 | 0.319 | -0.245 | -1.307 | -0.861 | -2.107 | --- | | |
| hsa-m R-4763-3p | -2.129 | -0.949 | -0.290 | | | | --- | | |
| hsa-m R-1260a | 0.105 | -0.587 | -0.643 | -0.766 | -0.843 | -2.174 | --- | | |

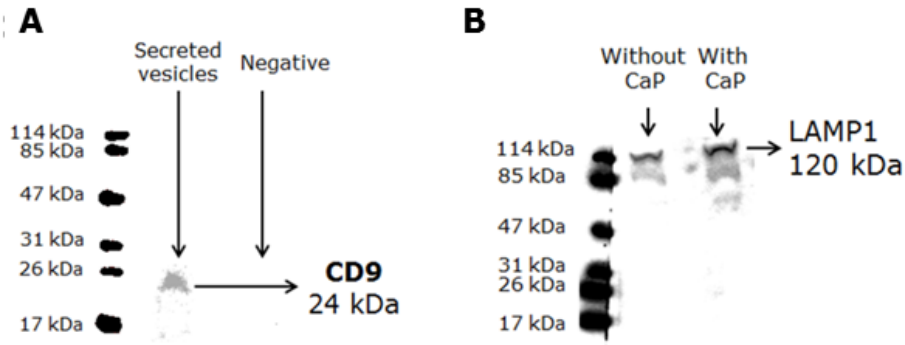


図 2. ウェスタンブロット A.リン酸カルシウム粒子(500 μ g/ml)で処理した RAW264.7 細胞から分泌されたエクソソーム中の CD9 の発現. ネガティブ、メディアムだけ. B.リン酸カルシウム粒子(500 μ g/ml)または未処理の RAW264.7 細胞から分泌されたエクソソーム中の LAMP-1 の発現.

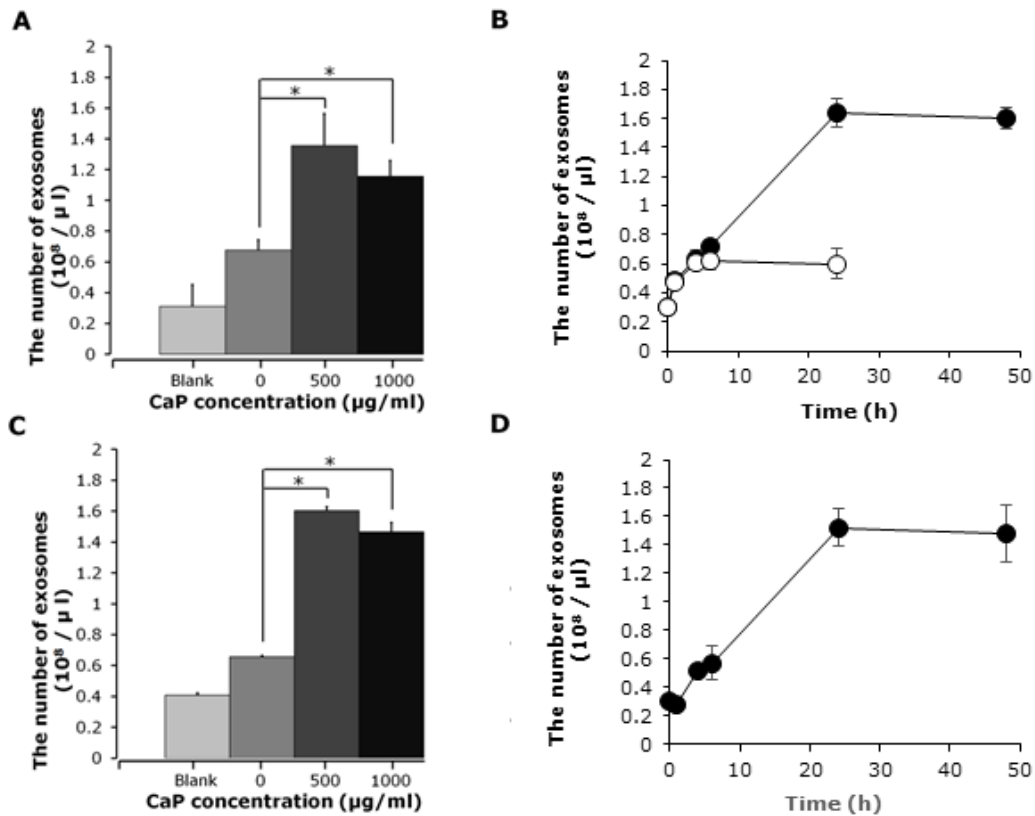


図 3. エクソソームの分泌 A. 72 時間の培養後に RAW264.7 細胞から分泌されたエクソソームの数. ブランク、培地のみ. B.500 μ g/L のリン酸カルシウム粒子で処理(黒丸)および非処理(白丸)の RAW264.7 細胞からのエクソソーム分泌の時間経過. C. 72 時間の培養後に THP-1 細胞から分泌されたエクソソームの数. B.500 μ g/L のリン酸カルシウム粒子で処理した THP-1 細胞からのエクソソーム分泌の時間経過.

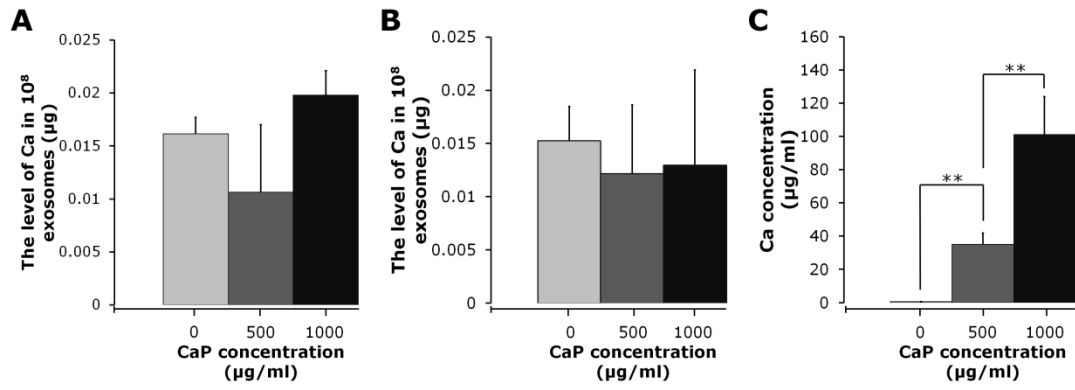


図 3. エキソソームおよび細胞におけるカルシウム含量 A.リン酸カルシウム粒子の 0、500、および 1000µg/ mL で処理した RAW264.7 細胞から分泌された 1×10^8 個のエキソソーム中のカルシウムの量. B.リン酸カルシウム粒子の 0、500、および 1000µg/ mL で処理した THP-1 細胞から分泌された 1×10^8 個のエキソソーム中のカルシウムの量. C. 0、500、および 1000µg/ mL のリン酸カルシウム粒子で 72 時間処理した RAW264.7 細胞のカルシウムの量.

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

細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

| | | | | |
|-------|-------|--------------|---------|-------|
| 研究分担者 | 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 | 宮島 敦子 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 医療機器部 | 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 | |
| 研究協力者 | 比留間 瞳 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 医療機器部 | |
| 研究協力者 | 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 |

本研究では、一次粒子径が異なり二次粒子径が同程度の NiO 及び Ni ナノマテリアル懸濁液を用いて、細胞毒性に対する一次粒子径の影響を評価することを目的としている。これまでに、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を作製し細胞毒性試験を行った。そして、二次粒子径サイズが同程度の場合には、一次粒子径サイズが小さいほど毒性が強くなる可能性を見出した。今年度は、それらの懸濁液中 Ni イオンの濃度測定及び Ni イオンの細胞毒性試験を実施し、各ナノマテリアルの細胞毒性に対する Ni イオンの影響を評価した。その結果、一次粒子径が異なり二次粒子径が同程度の NiO-Sigma 懸濁液及び Ni-Alfa 懸濁液では、一次粒子径サイズの小さい Ni-Alfa の方が Ni イオン濃度はやや高い傾向を示した。そして、Ni イオンの細胞毒性試験の結果から、Ni イオンの溶出が各ナノマテリアルの細胞毒性に影響している可能性が考えられた。一方で、先行研究で細胞毒性に違いが認められている一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる懸濁液では、懸濁液中の Ni イオン濃度に差は認められなかった。そのため、一連の細胞毒性について、溶出した Ni イオンだけでなく、細胞への各ナノマテリアルの取り込み量も影響しているものと考えられた。

の発現が懸念されている^{2,3)}。

A. 研究目的

ナノマテリアルは一次粒径が 100 nm 未満と一般的に定義される¹⁾。そして、これまでに種々のナノマテリアルが開発され、工業製品、塗料、化粧品、触媒など様々な分野の製品に使用されてきた。

一方で、ナノマテリアルまたはナノマテリアルを用いた製品の製造時に、作業員がナノマテリアルに曝露される可能性や、製品中に含有されるナノマテリアルに消費者が曝露され、ナノマテリアルに特有の毒性

このような背景から、様々な *in vivo* ならびに *in vitro* 試験系において、ナノマテリアルの安全性が研究され、一部のナノマテリアルについては、化学組成、サイズ、物性等に依存した生体影響が確認されている⁴⁾。しかし、これまでに行われてきたナノマテリアルの生体影響に関する研究について、ナノマテリアルのキャラクタリゼーションが不十分なために、研究者の経験則に基づいた試験が行われ、異なる実験室間で得られた結果を比較することが難しい事

が指摘されている⁵⁾。そして、ナノマテリアルの安全性評価については、試験法や評価基準などが明確でなく断片的な試験結果の集積に留まっているとして、ナノマテリアルの *in vitro* 試験法の開発が必要とされている⁶⁾。このような背景から、欧州委員会の共同研究センターではコロニー形成試験法によるナノマテリアルの細胞毒性試験について多機関共同試験による評価が実施されており、ナノマテリアルの統一的な毒性試験方法の検討が進んでいる⁷⁾。

金属酸化物ナノマテリアルは工業材料や消費生活製品材料として開発されており、ZnO、SiO₂ 及び TiO₂ 等は化粧品や塗料等に用いられている⁶⁾。これら金属酸化物ナノマテリアルに関して、様々な *in vitro* 試験が行われている。例えば、Yuan らは一次粒子径サイズの異なる SiO₂ ナノ粒子による細胞毒性試験を行い、一次粒子径の違いが細胞毒性に影響を及ぼすことを明らかにしている⁸⁾。また、*in vivo* 試験では、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる TiO₂ ナノ粒子によるラット気管内投与試験で、二次粒子径サイズが異なっても炎症反応に差異は認められないことが報告されている⁹⁾。

このように、個々の金属酸化物ナノマテリアルの物性が毒性試験の結果に影響を及ぼすことから、毒性試験にはその物性情報として、①状態（粒子径・粒径分布・凝集体・形状）、②材料（化学組成・結晶性・表面組成・純度）、③周囲に影響する因子（表面積・表面化学特性・表面荷電）の3点に加え、安定性、培地の影響及び適切な用量計測量での評価が求められている⁵⁾。

我々はこれまでに、金属酸化物ナノマテリアルの培養細胞試験系における細胞応答に及ぼすナノマテリアルの影響の解明を目的として、培養細胞試験系に用いる金属酸

化物ナノマテリアル懸濁液の調製方法の検討とその物性解析を行ってきた¹⁰⁾。そして、NiO ナノマテリアルについて、遊星ボールミル型粉砕機の粉砕ボール径を変えることで、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製法を開発した。

さらに、それらの懸濁液について A549 細胞（ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞）を用いた細胞毒性試験を実施し、二次粒子径サイズが大きいほど細胞毒性が強くなることや、その要因が NiO ナノマテリアルの細胞内への取り込み量に起因する可能性を明らかにしてきた。

一方で、前述のように金属酸化物ナノマテリアルの細胞毒性に一次粒子径サイズが影響していることが報告されている⁸⁾。そこで、本研究では NiO ナノマテリアルの A549 細胞に対する細胞毒性について、一次粒子径サイズの影響を評価することを目的とした。

これまでに、一次粒子径サイズの異なる2種類の NiO ナノマテリアル及び表面が酸化被膜でおおわれている Ni ナノマテリアルの3種類について、二次粒子径サイズが同程度のナノマテリアル懸濁液の調製を検討した。そして、NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の2種類について、濃度 1 mg/mL で懸濁原液の調製が可能であることを見出した¹¹⁾。次に、それら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、二次粒子径サイズが同程度の場合には一次粒子径サイズが小さいほど毒性が強くなる可能性が認められた¹²⁾。今年度は、それらの懸濁液中の Ni イオン濃度測定及び Ni イオンの細胞毒性試験を実施し、各ナノマテリアルの細胞毒性に対する懸濁液中の Ni イオン濃度の影響を評価した。

B. 研究方法

B.1 ナノマテリアル

試験には Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル (NiO-Sigma) 並びに Alfa Aesar 製の Ni ナノマテリアル (Ni-Alfa) を用いた。それらの性状等を表 1 に示した。Ni-Alfa については、メーカーのデータシートによれば、表面から深さ 0.5~1.0 nm まで酸化被膜に覆われているとされており、一昨年度に酸化皮膜の存在を確認し、NiO と同等に扱えるものと考えた¹¹⁾。これらのナノマテリアルの一次粒子径は、NiO-Sigma (<50 nm) 及び Ni-Alfa (5~20 nm) であった。

B.2 ナノマテリアル懸濁液の調製

これまでに我々が開発した、遊星ボールミル型湿式ナノ粉砕機を用いた方法¹⁰⁾に従い懸濁液の調製を行った。粉砕機は NP-100 (シンキー製) を用い、粉砕容器はジルコニア製であった。粉砕には、直径が 0.5、0.1 及び 0.05 mm の三種類のジルコニアボールを用いた。金属酸化物ナノマテリアル試料 10 mg をジルコニア容器に量り採り、そこに Tween80 を 0.1% (w/v) 含む Milli-Q 水を 2.5 mL 加えた。次に、ジルコニアボールを 2.5 g 加えた後、MILL/MIX モードで公転速度 2000 rpm の条件で 2 分間粉砕を行った。その後、Milli-Q 水を 7.5 mL 加えた後、MILL/MIX モードで公転速度 400 rpm の条件で 1 分間混合し、懸濁原液 (1 mg/mL) を作製した。また、そのナノマテリアル懸濁液を 10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、1% non-essential amino acid (NEAA) (GIBCO) を含む Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO) (以降: 10%FBS-MEM) を用いて希釈し、培地懸濁液を作製した。これらの懸濁液中の各ナノマテリアルの平均粒子径及び Zeta 電位を表 2 に示した¹¹⁾。

B.3 培地懸濁液中の Ni イオン濃度測定

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。

また、先行研究で細胞毒性試験を実施した一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズが異なる NiO-sigma ナノマテリアル懸濁液 (懸濁原液の調製濃度 10 mg/mL) についても、比較検討のため、培地中の Ni イオン濃度を測定した。

金属イオン濃度測定の前処理として、懸濁原液および 10%FBS-MEM 懸濁液を冷却超遠心機 (himac CP65 β 、日立工機製) にてアングルローター (P70AT2) を用いて、20°C、50000 rpm (約 170000 \times g) で 1 時間遠心した。その上清 0.5 mL を採取し、5% 硝酸水溶液 4.5 mL を加えて試験溶液とした。なお、5%硝酸水溶液は、和光純薬工業製の有害金属測定用硝酸を Milli-Q 水で希釈して調製した。超遠心処理により得られた試験溶液を、5%硝酸水溶液により適切な濃度に希釈した後に、孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルター (ザルトリウス) を用いてろ過してから金属イオン濃度を測定した。金属イオン濃度の測定には、誘導結合プラズマ質量分析計 (Inductively Coupled Plasma Mass spectrometry: ICP-MS) を用いた。また、金属酸化物ナノマテリアルを含まない 10%FBS-MEM について、同様の操作を行ったものを対照試料として測定した。試験は 4 連 (n=4) で実施した。

ICP-MS には Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Inc.) を用いた。測定条件は、高周波出力: 1500W、プラズマガス: Ar 15 L/min、キャリアガス: Ar 0.7 L/min、メイクアップガス: 0.33 L/min、コリジョンガス: He 5mL/min、サンプリング位置: 8 mm、

スプレーチャンバー温度: 2°C、積分時間 0.1 sec/element、測定回数: 3 times とした。Ni の 1000 mg/L 標準液 (和光純薬工業製) を、5%硝酸溶液で段階希釈し標準溶液とした。また、Ag の 1000 mg/L 標準液 (和光純薬工業製) を 5%硝酸で 5 µg/L に希釈したものを内部標準液として用いた。Ni および Ag の測定質量電荷比 (m/z) は、60 および 107 とした。Ni のバックグラウンド濃度は、0.536 µg/L であった。

B.4 Ni イオンの細胞毒性試験

細胞毒性試験には A549 細胞 (JCRB 細胞バンク) を用いた。細胞は 10%FBS-MEM を用いて、37°C、5%CO₂ インキュベーターで培養したものを用いた。試験には和光純薬工業製の塩化ニッケル六水和物を用いた。

始めに、A549 細胞を 96-well プレートに播種 (5×10³ cell/well) し、24 時間後に塩化ニッケルを含む液体培地を添加して 48 時間培養した。培地除去後、100 µL の Phenol Red-free MEM 培地及び 20 µL の Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Reagent (MTS 試薬、Promega) を添加し、5%CO₂ インキュベーターで 37°C、1 時間反応させた。その後、生成したフォルマザンをマイクロプレートリーダーにて測定 (波長 440 nm) した。

C. 結果及び考察

C.1 培地懸濁液中の Ni イオン濃度

NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 濃度を 0.1 mg/mL に調製した 10%FBS-MEM 培地懸濁液中の Ni イオン濃度を表 3 に示した。

NiO-Sigma 懸濁液中の Ni イオン濃度は 2.2 ~ 4.2 µg/mL (直後) 及び 6.1 ~ 8.4 µg/mL (1 日後) で溶出率は 2.8 ~ 5.4% (直後) 及び 7.8 ~ 11% (1 日後) であった。一方、Ni-Alfa 懸濁液中の Ni イオン濃度は

13 ~ 18 µg/mL (直後) 及び 23 ~ 25 µg/mL (1 日後) で溶出率は 13 ~ 18% (直後) 及び 23 ~ 25% (1 日後) であった。なお、ナノマテリアル無しで同じ操作を行ったブランク試料中の Ni イオン濃度は、定量下限値以下 ~ 0.15 µg/mL であった。

調製直後と 1 日後では、NiO-Sigma 及び Ni-Alfa とともに 1 日後の方が Ni イオン濃度は高く、培地中で継時的に Ni イオンが溶出していることが明らかとなった。NiO-Sigma 懸濁液と Ni-Alfa 懸濁液では、Ni-Alfa の方が Ni イオン濃度はやや高い傾向を示した。これは、NiO-Sigma よりも 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 でないかと推察された。

先行研究¹⁰⁾条件 (懸濁原液の調製濃度: 10 mg/mL) における NiO-Sigma 懸濁液の Ni イオン濃度を表 4 に示した。調製直後の Ni イオン濃度は 0.82 ~ 19 µg/mL で溶出率は 1.0 ~ 24% であった。また、調製から 1 日後では Ni イオン濃度は 3.3 ~ 36 µg/mL で溶出率は 4.2 ~ 46% であった。懸濁液中の NiO-Sigma 濃度が高くなるほど、懸濁液中に溶出した Ni イオン濃度も高くなっていった。一方で、一次粒子径が同じで二次粒子径サイズの異なる各ナノマテリアル懸濁液について、ナノマテリアルの濃度が同じ懸濁液同士を比較すると、Ni イオン濃度に差は認められなかった。

C.2 細胞毒性と Ni イオン濃度

これまでに、径が 0.05 µm のジルコニアボールを用いることで、二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた¹¹⁾。そして、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ナノマテリアル懸濁液では、一次粒子径サイズが小さいと細胞毒性が強い可能性が示唆されている¹²⁾。この懸濁液中の Ni イオン濃度を比較すると、前述

のように一次粒子径が小さい Ni-Alfa の方が Ni イオン濃度は高い傾向を示した (表 3 及び図 1)。また、塩化ニッケルを用いて、Ni イオンの細胞毒性を評価したところ、IC₅₀ 値は 43 µg/mL であった (図 2)。そのため、Ni イオンの溶出が細胞毒性に影響している可能性が考えられた。一方で、NiO-Sigma の二次粒子径サイズの異なる懸濁液では、細胞毒性には違いが認められているが¹⁰⁾、懸濁液中の Ni イオン濃度に差は認められなかった (表 4 及び図 3)。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。

D. まとめ

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

E. 謝辞

株式会社シンキーから湿式粉碎に用いた直径 0.05 mm のジルコニアボールを提供して頂きました。ここに謝意を表します。

F. 引用文献

- 1) Whatmore R.W.: Nanotechnology - what is it ? Should we be worried? *Occup. Med.*, 56, 295-299, 2006
- 2) Ema M., Kobayashi N., Naya M., Hanai S., Nakanishi J.: Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials, *Reprod. Toxicol.*, 30, 343-352, 2010
- 3) Schmidt C.W.: Nanotechnology-related environment, health, and safety research: examining the national strategy, *Environ. Health Perspect.*, 117, A158-A161, 2009
- 4) Dhawan A., Sharma V.: Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 589-605, 2010
- 5) Boverhof D.R., David R.N.: Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 953-961, 2010
- 6) ナノマテリアルの安全対策に関する検討会: ナノマテリアルの安全対策に関する検討会報告書, <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2009/03/dl/h0331-17c.pdf>, 2009
- 7) European Commission: JRC SCIENCE AND POLICY REPORTS “Interlaboratory comparison study of the colony forming efficiency assay for assessing cytotoxicity of nanomaterials”, 2014
- 8) Yuan H., Gao F., Zhang Z., Miao Ledu, Yu R., Zhao H., Lan M.: Study on controllable preparation of silica nanoparticles with multi-sizes and their size-dependent cytotoxicity in pheochromocytoma cells and human embryonic kidney cells, *J. Health Sci.*, 56, 632-640, 2010
- 9) Kobayashi N., Naya M., Endoh S., Maru J., Yamamoto K., Nakanishi J.: Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and

long-term post-instillation results,
Toxicology, 264, 110-118, 2009

- 10) 河上強志・伊佐間和郎・宮島敦子・酒井恵子・小森谷薫・加藤玲子: 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析, 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究総合報告書 (H23-化学-一般-006)
- 11) 河上強志・伊佐間和郎・宮島敦子・小森谷薫・加藤玲子: 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析, 平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (H27-化学-一般-008)
- 12) 河上強志・宮島敦子・小森谷薫・比留間瞳・加藤玲子: 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析, 平成 28 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (H27-化学-一般-008)

G. 研究発表

G.1 論文発表

なし

G.2 学会発表

- (1) 宮島敦子・河上強志・小森谷薫・加藤玲子・齋島由二・伊佐間和郎: 物理化学的性質の異なる酸化亜鉛ナノマテリアルに対する THP-1 の細胞応答, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月.
- (2) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, H. Haishima, K. Isama. Effects of different secondary particle sized nickel oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune responses. (EUROTOX 2017, Bratislava, Slovak, Sep., 2017)

H. 知的財産権の出願・登録状況

H.1 特許取得

なし

H.2 実用新案登録

なし

H.3 その他

なし

表1. 実験に用いたナノマテリアルの製造 (販売) 先、一次粒子径および外観 (色)

| 試料 | 略名 | 製造 (販売) 先 | 一次粒子径 ^a (nm) | 外観 (色) ^a |
|--------|-----------|---------------|----------------------------|---------------------|
| 酸化ニッケル | NiO-Sigma | Sigma-Aldrich | < 50 | 黒色 |
| ニッケル | Ni-Alfa | Alfa Aesar | 5-20 | シルバーグレー |

^a 各メーカーカタログより (エアロダイナミックパーティクルサイザー (APS) によるデータ)

表2. ナノマテリアル懸濁液中の平均粒子径 (流体力学径) およびZeta電位¹⁾

| ナノマテリアル ^b | 平均粒子径 (nm) | | Zeta電位 (mV) | | |
|----------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------|-------------|
| | 懸濁原液 (1 mg/mL) | 10%FBS-MEM (0.2 mg/mL) | 懸濁原液 (1 mg/mL) | 10%FBS-MEM (0.2 mg/mL) | |
| NiO-Sigma | (φ0.05 mm) | 149.9 ± 3.2 | 249.1 ± 9.1 | 19.8 ± 0.1 | -11.7 ± 0.6 |
| | 1日後 ^a | — | 229.2 ± 19.6 | — | — |
| | (φ0.1 mm) | 216.7 ± 8.7 | 266.1 ± 4.5 | 24.8 ± 0.4 | -10.7 ± 0.2 |
| | 1日後 ^a | — | 323.7 ± 13.3 | — | — |
| Ni-Alfa | (φ0.5 mm) | 329.2 ± 5.8 | 405.6 ± 22.0 | 19.4 ± 0.5 | -9.7 ± 0.7 |
| | 1日後 ^a | — | 424.3 ± 57.7 | — | — |
| | (φ0.05 mm) | 192.4 ± 6.4 | 246.9 ± 22.0 | 22.8 ± 0.6 | -8.4 ± 0.4 |
| | 1日後 ^a | — | 176.7 ± 2.2 | — | — |
| Ni-Alfa | (φ0.1 mm) | 280.0 ± 4.7 | 361.2 ± 33.5 | 23.6 ± 0.7 | -13.8 ± 0.4 |
| | 1日後 ^a | — | 262.3 ± 15.5 | — | — |
| | (φ0.5 mm) | 357.7 ± 17.2 | 436.2 ± 89.4 | 22.1 ± 1.4 | -10.8 ± 0.2 |
| | 1日後 ^a | — | 313.8 ± 16.7 | — | — |

^a 37°Cで一日放置後

^b カッコ内は粉碎に用いたジルコニアボールの粒子径

表3. ND-S gma及びNi-A lfa懸濁液 (0.1 mg/mL) 中のNiイオン濃度及び溶出率

| ナノマテリアル ^a | | 直後 | | 1日後 ^b | |
|----------------------|-------------------------|------------------------------|---------|------------------|---------|
| | | Niイオン濃度 ($\mu\text{g/mL}$) | 溶出率 (%) | 平均値 | 溶出率 (%) |
| ND-S gma | $\phi 0.05\text{ mm}$) | 4.2 ± 0.15 | 5.4 | 8.4 ± 0.27 | 11 |
| | $\phi 0.1\text{ mm}$) | 3.3 ± 0.066 | 4.2 | 6.1 ± 0.28 | 7.8 |
| | $\phi 0.5\text{ mm}$) | 2.2 ± 0.17 | 2.8 | 7.0 ± 0.46 | 8.9 |
| Ni-A lfa | $\phi 0.05\text{ mm}$) | 18 ± 0.58 | 18 | 25 ± 0.58 | 25 |
| | $\phi 0.1\text{ mm}$) | 16 ± 0.84 | 16 | 23 ± 1.6 | 23 |
| | $\phi 0.5\text{ mm}$) | 13 ± 0.64 | 13 | 23 ± 0.90 | 23 |

^a カッコ内は粉碎に用いたジルコニアボールの粒子径

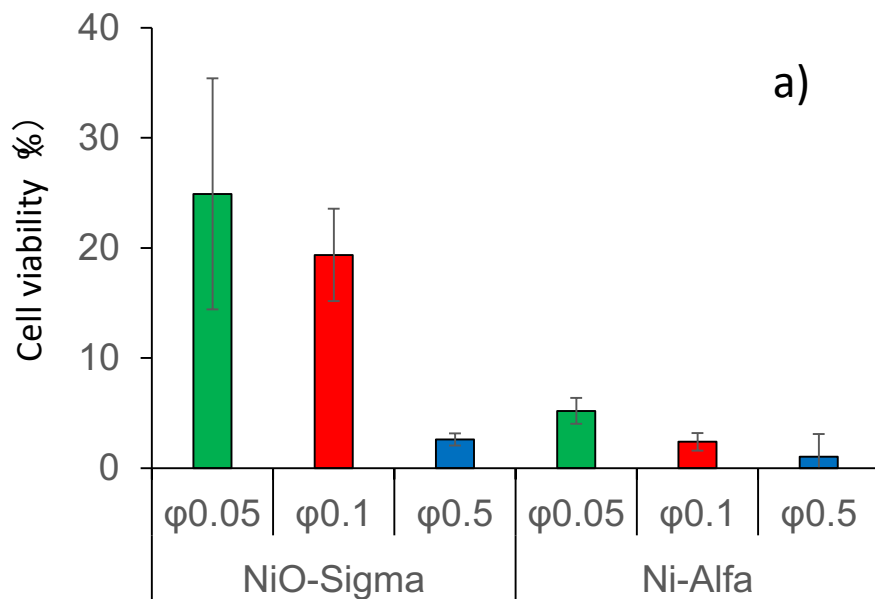
^b 37°Cで一日放置後

表4. 先行研究¹⁰⁾条件におけるND-S gma懸濁液中のNiイオン濃度及び溶出率^a

| 粉碎ジルコニア ボール径 | ナノマテリアル 濃度 | 直後 | | 1日後 ^b | |
|-----------------------|---------------|------------------------------|---------|------------------------------|---------|
| | | Niイオン濃度 ($\mu\text{g/mL}$) | 溶出率 (%) | Niイオン濃度 ($\mu\text{g/mL}$) | 溶出率 (%) |
| $\phi 0.5\text{ mm}$ | 0.05 mg/mL | 0.82 ± 0.084 | 1.0 | 3.9 ± 0.27 | 5.0 |
| | 0.1 mg/mL | 1.8 ± 0.19 | 2.3 | 5.7 ± 1.5 | 7.3 |
| | 0.2 mg/mL | 4.5 ± 0.15 | 5.7 | 14 ± 0.85 | 18 |
| | 0.4 mg/mL | 8.0 ± 0.46 | 10 | 30 ± 2.2 | 38 |
| $\phi 0.1\text{ mm}$ | 0.05 mg/mL | 1.5 ± 0.71 | 1.9 | 3.3 ± 0.50 | 4.2 |
| | 0.1 mg/mL | 4.1 ± 0.89 | 5.2 | 6.1 ± 0.63 | 7.8 |
| | 0.2 mg/mL | 5.3 ± 0.77 | 6.8 | 11 ± 0.95 | 14 |
| | 0.4 mg/mL | 11 ± 1.0 | 14 | 25 ± 2.2 | 32 |
| $\phi 0.05\text{ mm}$ | 0.05 mg/mL | 2.4 ± 0.043 | 3.1 | 4.7 ± 0.41 | 6.0 |
| | 0.1 mg/mL | 4.9 ± 0.23 | 6.3 | 8.8 ± 0.49 | 11 |
| | 0.2 mg/mL | 8.0 ± 0.35 | 10 | 18 ± 1.6 | 23 |
| | 0.4 mg/mL | 19 ± 1.4 | 24 | 36 ± 2.2 | 46 |

^a 懸濁原液濃度は10 mg/mL

^b 37°Cで一日放置後



ナノマテリアル濃度を100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した
各懸濁液の細胞毒性結果 (48時間後)

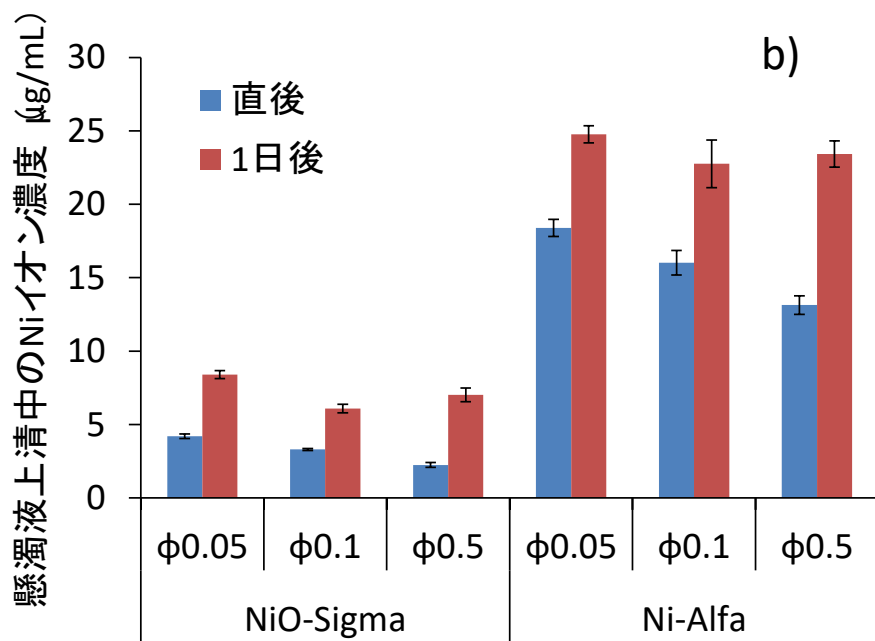


図1. ナノマテリアル濃度を 0.1 mg/mL に調製した各懸濁液の
a)細胞毒性結果¹²⁾ (48 時間後) 及び b)上清中の Ni イオン濃度

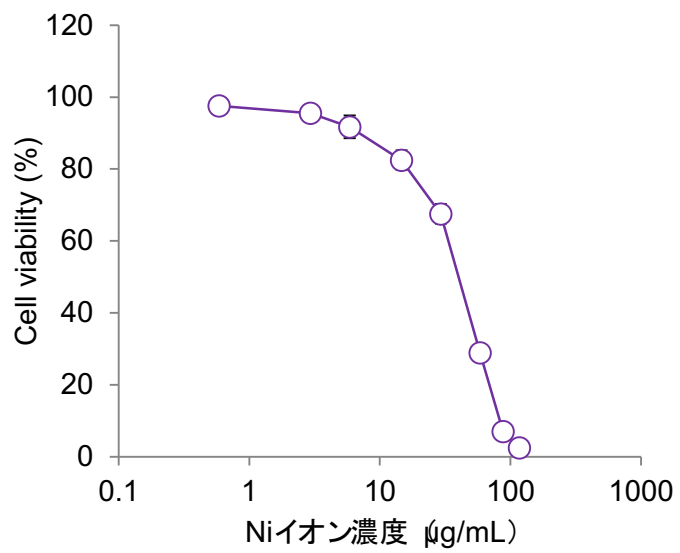


図 2. Ni イオンの細胞毒性試験結果

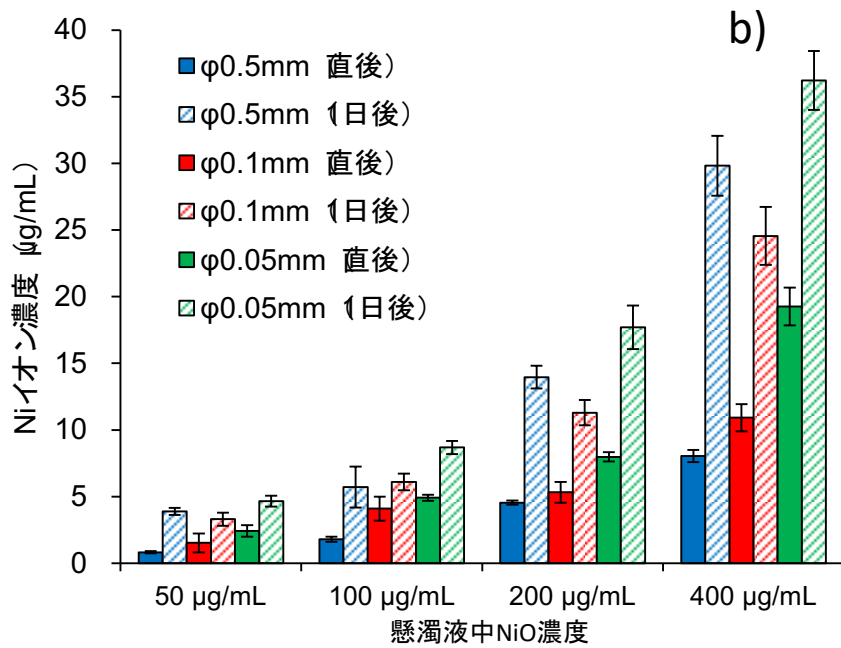
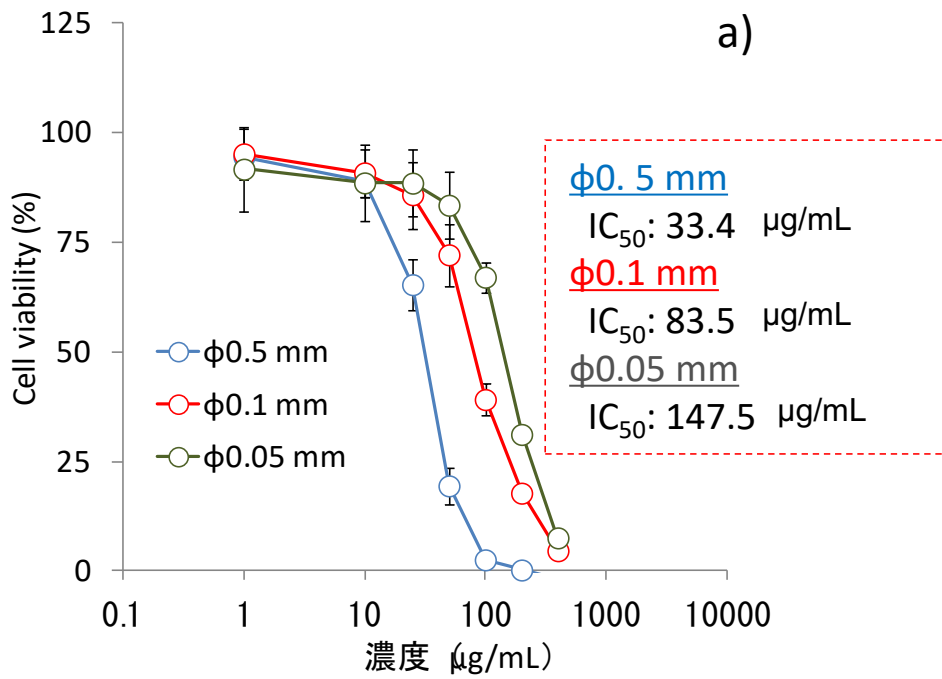


図3. 二次粒子径の異なる NiO-Sigma 懸濁液を用いた a) 細胞毒性試験 (A549 細胞、48 時間 MTS アッセイ)¹⁰⁾及び b) 懸濁液中 Ni イオン濃度

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|---|-----|--------------------------|------|
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| K. Ishikawa, T. Arifita, 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. | | doi: 10.1002/jbm.b.34117 | 2018 |
| 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, | Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by hyperthermia. | Oncotarget | 9 | 10307-16 | 2018 |

| | | | | | |
|--|--|---------------------------|-----|---------|------|
| S. Fujii, K. Kurahashi, S. Yoshida, K. Kagawa, I. Endo, K. Aihara, M. Ikuo, K. Itoh, <u>K.</u> <u>Hayashi</u> , M. Nakamura, M. Abe. | | | | | |
| M. Nakamura, <u>K.</u> <u>Hayashi</u> , 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 |
| M. Nakamura, <u>K.</u> <u>Hayashi</u> , H. Kubo, T. Kanadani, M. Harada, T. Yogo. | Relaxometric property of organosilica nanoparticles internally functionalized with iron oxide and fluorescent dye for multimodal imaging. | J. Colloid Interface Sci. | 49 | 127-35 | 2017 |
| E. Fukai, H. Sato, <u>M.</u> <u>Watanabe</u> , <u>D. Naka</u> , <u>Y. Totsuka</u> . | Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. | Cancer Sci. | 109 | 1024-31 | 2018 |
| T. Toyoda, <u>Y. Totsuka</u> , 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 |

| | | | | | |
|---|--|-------------------|----|--------|------|
| N. Akiba, K. Shiizaki, Y. Matsushima, O. Endo, K. Inaba, <u>Y. Totsuka</u> . | Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. | Mutagenesis | 32 | 455-62 | 2017 |
| T. Kato, T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, <u>M. Watanabe</u> , <u>Y. Totsuka</u> . | Effect of physicochemical character differences on the genotoxic potency of kaolin. | Genes Environ. | 39 | 12 | 2017 |
| K. Horibata, A. Ukai, A. Ogata, <u>D. Nakae</u> , H. Ando, Y. Kubo, A. Nagasawa, K. Yuzawa, M. Honma. | Absence of <i>in vivo</i> mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 <i>gpt</i> delta rats. | Genes Environ. | 39 | 4 | 2017 |
| 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, 海鉦藤 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 |
| K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, Y. Endo, T. Nittami, T. Nozaki, R.C. Sobti, <u>M. Watanabe</u> . | Combined effects of Fe ₃ O ₄ nanoparticles and chemotherapeutic agents on prostate cancer cells <i>in vitro</i> . | Appl. Sci. | 8 | 134 | 2018 |
| T. Amemiya, K. Shibata, Y. Itoh, K. Itoh, <u>M. Watanabe</u> , T. Yamaguchi. | Primordial oscillations in life: Direct observation of glycolytic oscillations in individual HeLa cervical cancer cells. | Chaos | 27 | 104602 | 2017 |