

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの
統合的健康影響評価方法の提案

平成 30 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡邊 昌俊

令和元 (2019) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告

- 生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案 1
渡邊 昌俊

II. 分担研究報告

1. ナノマテリアルの特性評価 16
林 幸彦朗
2. *in vitro* 評価系の高度化 19
渡邊 昌俊
3. 生体を模倣した *in vitro* 試験系を用いた遺伝毒性評価 27
戸塚 ゆ加里
4. *in vitro* 評価系の高度化、毒性病理学的研究監修 32
中江 大
5. ナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築および機械学習による生体影響予測の試み 40
花方 信孝
6. *in silico* 評価系に関する研究 50
大野 彰子
7. ナノマテリアルの使用状況、安全性などの既存情報の収集と整理 67
三宅 祐一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 76

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案

研究代表者 渡邊 昌俊 三重大学大学院医学系研究科 教授

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

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

研究分担者：

林 幸吉郎 九州大学大学院歯学研究院 准教授
戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所・発がん・予防研究分野 ユニット長
中江 大 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 教授
花方 信孝 国立研究開発法人物質・材料研究開発機構 技術開発・共用部門 副部門長
大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部 主任研究官
三宅 祐一 静岡県立大学食品栄養科学部 助教

研究協力者：

美谷島 克宏 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 准教授
煙山 紀子 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 助教

広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部 部長

A. 研究目的

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

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

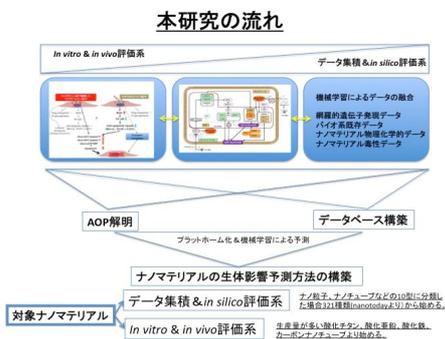


図1 本研究の流れおよび目的

B. 研究方法及び結果

B1 ナノマテリアルの特性評価 (林)

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

B1-1 酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立：

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

B2 *in vitro* 評価系の高度化 (渡邊)

詳細は渡邊分担研究者の項目を参照されたい。

B2-1 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築

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

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

B2-2 ナノマテリアルの傷害機構の解析：

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

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

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

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

B3-1 細胞毒性試験

各磁性体ナノ粒子 (MGT, BMS-10, BMSC-5) を単培養の GDL1 に 6.25~200 µg/ml で、RAW264.7 に 3.125~200 µg/ml で 24 時間曝露し、曝露した際の細胞生存率を NR assay

により測定した。GDL1 単培養では、MGT の表面修飾の有無に関わらず、いずれの濃度においても殆ど毒性を示さなかった。一方、RAW264 単培養では、BMS-10 は 200 µg/ml で BMSC-5 は 6.25 µg/ml で生存率が減少し、毒性が見られ、表面修飾の有無で毒性強度に差があることを認めた。

B3-2 共培養システムによる遺伝毒性試験法

共培養条件下の RAW 細胞または RAW 及び GDL1 の両細胞に各 MGT (BMS-10, BMSC-5) を 24 時間曝露し、6~7 日間培養した後、GDL1 細胞から DNA を抽出し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。MGT 曝露群では溶媒対照群と比較して変異頻度が増加する傾向が観察された。また、BMS-10 では、単培養に比較して RAW264.7 との共培養条件下で変異頻度が上昇する傾向が観察されたが、BMSC-5 では単培養条件下で高い変異頻度が観察されており、共培養条件下では MF が減少する傾向が観察された。また、両 MGT を比較すると、BMSC-5 の方が高い変異頻度を示していた。更に、変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MGT により誘発される変異スペクトルの解析を試みた。その結果、両者では観察された変異スペクトルが大きく異なることがわかった。これらのことから、ポリアクリル酸の表面修飾が遺伝毒性発現に何らかの影響を及ぼしていることを認めた。

B3-3 ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み

各 MGT (BMS-10, BMSC-5) を 24 時間曝露した各細胞固定サンプルをフローサイトメーターで解析を行った。BMS-10 曝露群は溶媒対照群と比較してどちらの細胞も SS 値が増加した細胞数が増加し、細胞内取り込み量が増加した。また貪食細胞である RAW264.7 の方が GDL1 よりも取り込み量が多いことが観察された。対して BMSC-5 曝露群は溶

媒対照群と比較して、SS 値が増加した細胞数に変化がなく、細胞内に殆ど取り込まれていないことが観察された。

B3-4 マグネタイトナノ粒子処理による活性酸素種(ROS)産生

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

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

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

B3-6 Ferrozine assay を用いた培地中の鉄イオン濃度

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

B4 *In vitro* 評価系の高度化、毒性病理学的研究監修 (中江)

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

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

B4-1 単層培養系での評価

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

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

B4-2 3D ヒト皮膚再構成系での評価

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

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

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

詳細は花方分担研究者の項目を参照されたい。

B5-1 ナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築

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

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

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

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

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

B5-2 ZnO 曝露細胞のマイクロアレイ解析

機械学習を実施するためにコンピュータ環境に関する調査および実環境の整備、機械学習に用いる実測データを得るためにナノマテリアルを曝露した場合の遺伝子発現マイクロアレイ解析を実施することとした。これらのナノマテリアルの THP-1 細胞などへの影響を同様に解析した。

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

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

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

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

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

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

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

B6 *in silico* 評価系に関する研究（大野）

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B7 ナノマテリアルの使用状況、安全性などの既存情報の収集と整理 (三宅)

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

B7-1 ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報の調査方法

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

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

B7-2 ナノ粒子の毒性情報の調査方法

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

C. 結論

C1-1 酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立:

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

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

C2-1 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築：

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

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

C2-2 ナノマテリアルの傷害機構の解析：

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

C3 共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築

ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた肺の遺伝毒性評価系として共培養システムを構築した。今年度は、この評価系を用い、MGTの遺伝毒性を行い、同時に遺伝毒性に対する表面修飾（ポリアクリル酸）の有無の影響を観察した。

C3-1 細胞毒性試験

表面修飾の異なる MGT（BMS-10 及び BMSC-5）の RAW264.7 および GDL1 細胞に対する毒性は、GDL1 に対しては BMS-10 の方が強い毒性が見られ、RAW264.7 に対しては BMSC-5 の方が強い毒性が見られた。これは表面修飾の違いによってそれぞれの細胞に対する毒性メカニズムが異なっているのではないかと考えられる。

C3-2 共培養システムによる遺伝毒性試験法

共培養系による *in vitro* 遺伝毒性試験系の結果より、BMS-10 は RAW264.7 による間接的な影響が強くており、BMSC-5 は GDL1 への直接的な影響および間接的な影響との相乗効果が強く出ており、これは遺伝毒性メカニズムが異なり、遺伝毒性に違いが出たと考えられる。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MGT により誘発される変異スペクトルの解析を試みたところ、各 MGT で大きく異なる変異スペクトルが確認された。GC>CG や AT>CG といった酸化ストレスが増大することによって増える変異や、AT>GC といった BMS-10 曝露群では確認されなかった変異が確認された。表面修飾の違いにより大きく異なる変異スペクトルを示したことから、表面修飾が遺伝毒性発現に強い影響を示していると考えられる。

C3-3 ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み

細胞への取り込みを観察した結果、BMSC-5 は BMS-10 よりも細胞内に取り込ま

れなかった。このことからポリアクリル酸の表面修飾を施すことによって、貪食細胞に認識されず貪食されにくくなり、細胞内に取り込まれにくくなったと考えられる。

C3-4 マグネタイトナノ粒子処理による活性酸素種(ROS)産生

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

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

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

C3-6 Ferrozine assay を用いた培地中の鉄イオン濃度

Ferozine assay によって鉄イオン濃度を定量した結果より、培地中の多量の鉄イオンが細胞内に直接取り込まれたのではないかと考えられる。実際に細胞には培養培地中に存在するトランスフェリンを介した鉄イオン取り込み機構が存在することや、MNPsの毒性は溶出した鉄イオンが Fenton 反応によってヒドロキシラジカルなどの ROS を生成することで発現するとされており、deferoxamineのような鉄キレート剤を使用することで MNPs の毒性を軽減させたという報告も知られている。またアスベストの細胞毒性において鉄 (Fe^{2+}) の含有量が多いほど毒性が強くなったという報告もある。このことから MNPs の毒性には鉄イオンが大きく関わっており、BMS-10 よりも強い BMSC-5 の毒性は鉄イオンの含有量が大きく関係していると考えられた。

C4 *in vitro* 評価系の高度化、毒性病理学的研究監修

C4-1 単層培養系での評価

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

C4-2 3D ヒト皮膚再構成系での評価

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

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

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

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

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

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

C6 *in silico* 評価系に関する研究

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

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

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

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

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

り BDM として再計算する必要があった。

C7 ナノマテリアルの使用状況、安全性などの既存情報の収集と整理

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

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

D. 健康危害情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K.Hayashi, A.Tokuda, W.Sakamoto. Hydroxyl Radical-Suppressing Mechanism and Efficiency of Melanin-Mimetic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(8), E2309, 2018.
- (2) K.Hayashi, S.Yamada, W.Sakamoto, E.Usugi, M.Watanabe, T.Yogo. Red Blood Cell-Shaped Microparticles with a Red Blood Cell Membrane Demonstrate Prolonged Circulation Time in Blood. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 4, 2729-2732, 2018.
- (3) K.Hayashi, H.Hayashi, S.Yamada, W.Sakamoto, T.Yogo. Cellulose-based molecularly imprinted red-blood-cell-like microparticles for the selective capture of cortisol. *Carbohydr. Polym.*, 193, 173-178, 2018.
- (4) E.Fukai, H.Sato, M.Watanabe, D.Nakae, Y.Tostuka. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 109(4), 1024-1031, 2018.
- (5) K.Ishii, S.Takahashi, Y.Sugimura, M.Watanabe. Role of stromal paracrine signals in proliferative diseases of the aging human prostate. *J. Clin. Med.*, 7(4), 7, 68, 20168
- (6) G.W. Lee, J.B. Park, S.Y.Park, J.Seo, S.H.Shin, J.W.Park, S.J.Kim, M.Watanabe, Y.S.Chun. The E3 ligase C-CBL inhibits cancer cell migration by neddylation of the proto-oncogene c-Src. *Oncogene*, 37(41), 5552-5568, 2018.
- (7) Y.Fujiwara, M.Nishida, M.Saito, A. IRobles, F.Takeshita, M.Watanabe, T.Ochiya, J.Yokota, T.Kohno, C.C.Harris, N.Tsuchiya. A nucleolar stress-specific p53-miR-101 molecular circuit functions as an intrinsic tumor-suppressor network. *EBioMedicine*, 33, 33-48, 2018.
- (8) Y.Kudo, Y.Sasaki, T.Onodera, J.Hashimoto, T.Nozaqi, K.Tamura, M.Watanabe. Measurement of poly(ADP-ribose) level with enhanced slot blot assay with crosslinking. *Challenges*, 9(2), 27, 2018.
- (9) Y.Nishimura, K.Kasahara, T.Shiromizu, M.Watanabe, M.Inagaki. Primary cilia as signaling hubs in health and disease. *Adv. Sci.*, 16(1), 1801138, 2018.
- (10) T.Toyoda, Y.Totsuka, K.Matsushita, T. Morikawa, N.Miyoshi, K.Wakabayashi, K.Ogawa. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *J. Appl. Toxicol.*, 38(4), 537-543, 2018.
- (11) Y. Sakamoto, M. Hojo, Y. Kosugi, K. Watanabe, A. Hirose, A. Inomata, T. Suzuki,

- D. Nakae. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.*, 43(10), 587-600, 2018.
- (12) K. Imai, I. Nakanishi, K. Ohkubo, A. Ohno, M. Mizuno, S. Fukuzumi, K. Matsumoto, K. Fukuhara. Synthesis and radical-scavenging activity of C-methylated fisetin analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, 27(8), 1720-1727, 2018.
2. 学会発表
- (1) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, T. Nittami, E. Usugi, K. Ishii, Y. Hirokawa, M. Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagic cell death in prostate cancer cells treated with docetaxel via ROS generation and NF- κ B signaling. AACR annual meeting 2018, April.14-18, 2018, Chicago.
- (2) S. Takahashi, S. Saito, T. Nittami, Y. Totsuka, Y. Nakagawa, M. Watanabe. MicroRNAs profiling of cancer cells after Fe₃O₄ nanoparticles exposure (II). 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (3) S. Saito, S. Takahashi, T. Nittami, Y. Totsuka, Y. Nakagawa, M. Watanabe. Establishment of the substrate made of tissue/organ sections for histopathology based systems for nanotoxicity. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (4) Y-S. Chum, J.B. Park, G. Lee, S.Y. Park, M. Watanabe. Activation of c-Src by neddylation blockade enhanced cancer cell migration through Akt signaling pathway. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (5) K. Ishii, S. Kajiwara, K. Iguchi, M. Kato, Y. Hirokawa, K. Arima, M. Watanabe, Y. Sugimura. Characterization of human prostate cancer LNCaP sublines differing in androgen-sensitivity. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (6) M. Kato, K. Ishii, S. Kajiwara, Y. Hirokawa, K. Arima, M. Watanabe, Y. Sugimura. Fibroblasts disturb the expression of cancer-related genes in non-transformed human prostatic epithelial cell line BPH-1. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2018 年 9 月.
- (7) K. Ishii, I. Matsuoka, T. Sasaki, M. Kato, K. Nishikawa, H. Kanda, Y. Hirokawa, K. Iguchi, K. Arima, M. Watanabe, Y. Sugimura. Loss of fibroblasts-dependent androgen receptor activation in prostate cancer cells develops castration-resistant prostate cancer. AACR annual meeting 2019, March.29-April.3, Atlanta.
- (8) M. Watanabe, S. Takahashi, E. Usugi, K. Ishii, Y. Hirokawa. Crosstalk between apoptosis and autophagy induced by docetaxel-magnetic nanoparticles with different surface in prostate cancer cells. AACR annual meeting 2019, March.29-April.3, Atlanta.
- (9) Y. Totsuka: Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics (コルカタ, 2018 年 1 月)
- (10) 戸塚 ゆかり、秋場 望、佐藤 春菜、前迫 有也、松田 知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、十時 泰、柴田 龍弘、中釜 斉. 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第 33 回発がん病理研究会 (御殿場, 2018 年 8 月)

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

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

F．知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

生体影響予測を基盤としたナノ材料の統合的健康影響評価方法の提案
ナノ材料の特性評価

研究分担者 林 幸彦郎 九州大学大学院歯学研究院 准教授

研究要旨：鉄(III)アセチルアセトネートを出発原料として、コラーゲン溶液中で酸化鉄（マグネタイト）ナノ粒子の作製に成功した。この作製方法では、酸化鉄ナノ粒子の粒径をナノメートルスケールで制御することができ、5～8 nm の酸化鉄ナノ粒子を作製することができた。また、得られた酸化鉄ナノ粒子は超常磁性を示すことを確認した。

A. 研究目的

酸化鉄ナノ粒子の作製方法の確立と、得られた酸化鉄ナノ粒子の物理化学的特性評価を行い、酸化鉄ナノ粒子の可能性を広げる。

B. 研究方法

Fe(acac)₃ のエタノール溶液を作製した。この溶液にヒドラジン-水和物および 0.3% コラーゲン水溶液を添加し、80℃で 24 時間攪拌した。各原料の濃度を表 1 に示す。

表 1. コラーゲン修飾酸化鉄ナノ粒子の合成条件

条件	溶媒	Fe ³⁺ 濃度 (mM)	ヒドラジン-水和物	0.3%コラーゲン水溶液
A	EtOH	0.45	6当量	72当量
B	EtOH	0.67	6当量	72当量
C	EtOH	0.9	6当量	72当量
D	EtOH	1.12	6当量	72当量

C. 研究結果

条件 A～D により得られたナノ粒子の TEM 像と粒度分布、平均粒径を図 1 に示す。鉄源濃度が高くなるにつれて平均粒径も増加した。鉄源濃度の調整により、ナノメートルオーダーで粒径を制御することができた。

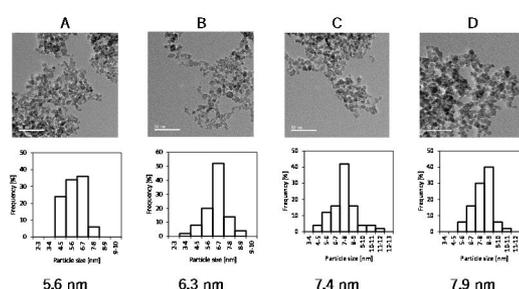


図 1. 条件 A～D で作製した酸化鉄ナノ粒子の TEM(上)、粒度分布(中)、平均粒径(下)

図 2 に条件 A～D で作製した酸化鉄ナノ粒子の XRD パターンを示す。どの条件においてもマグネタイト単相であった。また、鉄源の濃度が増加するにつれて、結晶子サイズが増大しており、TEM から見積もった粒径と同じ挙動を示した。

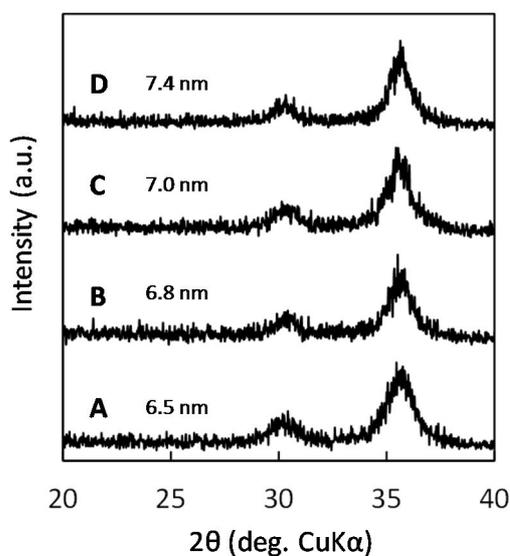


図 2. XRD パターン

図 3 に条件 A~D で作製した酸化鉄ナノ粒子とコラーゲン非修飾酸化鉄ナノ粒子の熱重量 (TG) 曲線を示す。酸化鉄ナノ粒子の粒径が小さくなるにつれて重量減少が大きくなり、酸化鉄ナノ粒子の表面積が増加するにつれてコラーゲン被覆量が増加することが明らかになった。

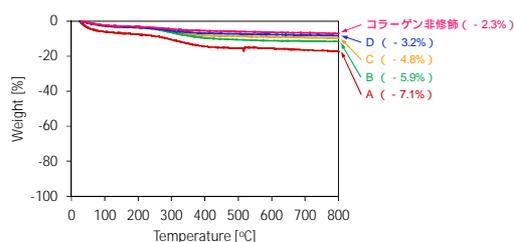


図 3. TG 曲線

最も粒径が大きかった条件 D で作製した酸化鉄ナノ粒子の磁気特性を図 4 に示す。室温では保磁力および残留磁化がゼロであったが (図左) 10 K では保磁力および残留磁化を有していた (図中)。また、ブロッキング温度は 245 K であった。以上より、この酸化鉄ナノ粒子は超常磁性を示すことが明らかになった。

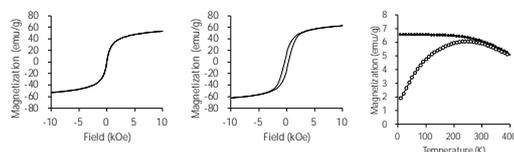


図 4. 条件 D で作製した酸化鉄ナノ粒子の磁気特性：室温での磁化曲線 (左)、10 K での磁化曲線 (中)、ZFC-FC 曲線 (右)

D. 考察

一般的に鉄 - アルコキシドは加水分解を受けやすいため、空気中で扱うことは困難である。一方、今回使用した $\text{Fe}(\text{acac})_3$ は空気中で安定であるため、加水分解を受けにくく、空気中で取り扱うことが容易である。このような利点から、同じ特性を有する酸化鉄ナノ粒子を安定的に作製することが可能であった。また、添加剤の濃度により、加水分解 - 縮合速度を制御することができた。これにより、粒径をシングルナノメートルオーダーで制御することができた。ナノ粒子の場合、結晶子サイズや粒径が 1 nm 異なると磁気特性も大きく変化するため、シングルナノメートルオーダーで粒径を制御できたことは有意義である。

E. まとめ

$\text{Fe}(\text{acac})_3$ を鉄源とすることで、サイズが精密に制御された酸化鉄ナノ粒子を制御することができた。この酸化鉄ナノ粒子は超常磁性を示した。 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ を鉄源とする Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) の作製に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) [K.Hayashi](#), A.Tokuda, W.Sakamoto.

Hydroxyl Radical-Suppressing Mechanism and Efficiency of Melanin-Mimetic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 2309,

2018.

- (2) K.Hayashi, S.Yamada, W.Sakamoto, E.Usugi, M.Watanabe, T.Yogo. Red Blood Cell-Shaped Microparticles with a Red Blood Cell Membrane Demonstrate Prolonged Circulation Time in Blood. ACS Biomater. Sci. Eng. 4, 2729, 2018.
- (3) K.Hayashi, H.Hayashi, S.Yamada, W.Sakamoto, T.Yogo. Cellulose-based molecularly imprinted red-blood-cell-like microparticles for the selective capture of cortisol. Carbohydr. Polym. 193, 173, 2018.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
in vitro 評価系の高度化

研究分担者 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、A549 細胞等の切片担体培養系を用いたナノリスクマテリアルの毒性評価系の構築及び磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs/MNPs)の細胞傷害機構の解明を目的とした。まず、A549 細胞の切片担体培養系を利用して、磁性体ナノ粒子の曝露実験を行い、切片担体培養系の特性を評価した。A549 細胞における Integrin β -1 および EGFR の発現が通常の 2 次元培養より切片担体上で有意差を持って発現量が上昇し、また、切片担体上の A549 細胞は磁性体ナノ粒子の取り込みの減少が認められた。これらの結果より、一般的に *in vitro* 毒性評価系に用いられる 2 次元単細胞培養系とは異なる切片担体と細胞との相互関係が新たに構築され、切片担体培養系が生体内の組織特異的環境の再現系の一つである可能性が考えられた。

細胞における磁性体ナノ粒子の細胞傷害機構を microRNA 発現の観点から明らかにするために、A549 細胞に磁性体ナノ粒子を曝露し、microarray を用いて、microRNA の網羅的発現解析を行った。磁性体ナノ粒子により発現が誘導された microRNA 群より miR5787 を抽出し、さらなる発現解析および標的遺伝子の解明を行った。miR5787 は濃度依存的に誘導され、活性酸素種(ROS)による誘導であることを明らかにした。さらに、この miR5787 の標的遺伝子が eIF5 である可能性を見出した。磁性体ナノ粒子による microRNA の発現誘導という epigenetics への影響が細胞傷害機構に関与する可能性が考えられた。

A. 研究目的

本研究の目的は、新しい *in vitro* 評価系として考えられる切片担体培養系を用いたナノリスクマテリアルの毒性評価系の構築及び磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs/MNPs)の細胞傷害機構の解明である。本研究の分担者は、細胞株を利用した *in vitro* 系での各種ナノ粒子の細胞毒性、遺伝毒性の解析、およびその細胞傷害機構の解明を報告してきた。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) 磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs/MNPs)の細胞傷害機構の解明およびエピジェネティクス

マーカーの検索である。(1)に関して、DU145 細胞の切片担体培養の条件を基に、A549 細胞の切片担体培養系を用いたナノリスクマテリアルの毒性評価系の構築を目的とした。(2)に関して、物質・材料研究機構の花方分担研究者との共同研究のデータをもとに、さらなる解析を行った。

B. 研究方法

切片担体培養系を用いたナノマテリアルの毒性評価系の構築、ナノマテリアルの傷害機構の解析の研究方法について以下に示す。

1) 使用細胞株と細胞培養：

本実験では、ヒト肺上皮細胞由来細胞株 A549 を使用した。細胞株は ATCC (American Type Culture Collection)より入手した。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/MNPs) :

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。

磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs/MNPs)は戸田工業株式会社および Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS)、京都大学より購入した。所定の濃度に培養液で調整して、超音波破碎機 (Ultrasonic homogenizer VP-050、TAITEC 社) にて、分散処理を行い、磁性体ナノ粒子の凝集を取り除き使用した。細胞への磁性体ナノ粒子の曝露前には、培養液中における大きさ、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) で測定を行った。

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

3) 切片担体培養系の準備 :

SD ラット(male, 21 week) 2 匹をプロトコールに則り、麻酔下で安楽死させた。臓器(肺、肝臓など)を摘出し、Tissue-Tek cryomold(フナコシ株式会社, Tokyo, Japan)に OCT コンパウンド(フナコシ株式会社, Tokyo, Japan)を入れ、コンパウンド内に適当な大きさに切った組織を包埋した。組織を包埋した cryomold をドライアイス上で冷却した n-ヘキサン上に浮かべて OCT コンパウンドが固まるまで静置した。OCT コンパウンドが凍結し次第-80 °Cで保存した。凍結した組織を

OCT コンパウンドでクライオスタット用のステージに貼り付けてセットしたのち、クライオスタット内(-20 °C ~ -30 °C)で組織を薄切した。切り出された切片は MAS コートスライドガラス(松浪硝子工業株式会社, Osaka, Japan)へ貼り付けた。組織を貼り付けたスライドガラスをアセトンに浸漬し固定、あるいは固定せず風乾し、アセトン固定したものは風乾したのち-80 °Cで保存した。組織切片担体を 4 well multi dish(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)に入れたのち、乾燥材と共に密閉容器に収納して 4 °Cの暗所で一晩静置し、組織切片を乾燥させた。これらの過程は、戸塚分担研究者が所属する国立がん研究センターの動物実験の機関承認を受け、国立がん研究センター研究所で行われた。

4) 切片担体培養 :

組織切片担体 (肺および肝臓) を 4 well multi dish (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA)に入れ、4°Cで乾燥させた後に培養液を入れ、A549 細胞を 7x10⁴ cells/well 播種、培養をした。

5) 切片担体培養系による A549 細胞の毒性関連評価 :

A549 細胞の組織切片担体培養に磁性体ナノ粒子を 24 時間曝露し、組織切片担体上の A549 細胞の磁性体ナノ粒子取り込みを Flowcytometry により測定を行った。曝露前後の細胞の Integrin- β 1 および上皮成長因子受容体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)の発現を、プロトコールに従い RNA 抽出、cDNA 合成後リアルタイム PCR (CFX Connect Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Labo., Hercules, California, USA) で解析をした。所定の条件で、Integrin β 1(5'-CAAAGGAACAGCAGAGAAG C-3', 5'-ATTGAGTAAGACAGGTCCATAAG G-3')、EGFR (5'-CTATAGGATGGAGGA AGACG-3', 5'-CAGAGGAGGAGTATGTGT

GA-3')、GAPDH (5'-AGGTGAAGGTCG GAGTCA-3', 5'-GGTCATTGATGGCAACAA-3')のプライマーを利用した。

ナノマテリアルの傷害機構の解析

6)網羅的 microRNA 発現解析:

国立研究開発法人物質・材料研究機構の花方分担研究者により、microRNA 網羅的解析は、SurePrint G3 Human v16 miRNA 8x60K microarray kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて行われた。

7)候補 microRNA 発現解析

細胞は100 mm dishで予め培養を行い、細胞密度が曝露24時間の場合は 1.0×10^5 cells/well、48時間の場合は 8.0×10^4 cells/well、72時間の場合は 6.0×10^4 cells/well となるように6 well plateに播種した。細胞接着後、各ナノ粒子をControl (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の各濃度で曝露した。曝露24、48、72時間後にまず培養液を除去し、PBSを用いてナノ粒子をウォッシュアウトした後、Trypsin/EDTA 200 μL を用いて細胞を剥離して回収した。回収したすべての細胞を1000 rpm、5分の条件で遠心分離して細胞を洗浄した。続いて、上清を吸引除去し、再度PBS 1 mLに懸濁し、1.5 mLチューブへ移した。さらに、15000 \times g、3分の条件で遠心分離を行い、上清を吸引除去し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存し、これを回収操作とした。

次に、miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherland) を用いてプロトコルに従って total RNA の抽出を行った。抽出した total RNA はキットおよびプロトコルに従い、cDNA を合成した。合成した cDNA の濃度を測定し、cDNA 濃度が 4000 ng/mL となるように DEPC 水を加えて 20 μL に希釈した。それぞれのサンプル 1 μL と、ハウスキーピングとして用いる GAPDH を測定する際は濃度 Primer F/R それぞれ 0.24 μL 、THUNDER BIRDTM SYBER[®]qPCR Mix 10 μL

(TOYOBO, Osaka, Japan)、蒸留水 (DW) 8.52 μL を測定用 96 well プレートに入れ、miRNA を定量したいサンプルに関しては、それぞれのサンプル 1 μL と、特定の miRNA を定量化する各 miRNA 特有の TaqMan[®]MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) 0.8 μL 、Sso Advanced[™] Universal Probes Supermix (BIORAD, California, USA) 10 μL 、DEPC 水 8.2 μL を測定用 96 well プレートに入れ、GAPDH はインターカレーター法で、miRNA は TaqMan プローブ法で、CFX Connect[™] Real-Time System (BIORAD, California, USA) を用いて 95 $^{\circ}\text{C}$ 10分加熱後、95 $^{\circ}\text{C}$ 15秒、60 $^{\circ}\text{C}$ で1分加温しそれを55サイクル繰り返した。定量化は、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用いて行った。miRNA Microarray 解析結果より、細胞種に関わらず発現が大きく上昇した miR5787 を標的とした。

7) eIF5 の発現解析:

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

回収したサンプルに RIPA Buffer (ATTO, New York, USA) を 30 μL 、Protease Inhibitor (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を 0.3 μL を加え、ホモジナイザーペッスル (AS ONE, Osaka, Japan) を用いて細胞塊が見えなくなるまでホモジナイズした後、15000 \times g 30分 で遠心した。上清を回収し、サンプルとした。保存は-20 $^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。調製したサンプルを Bradford 法により濃度を測定した。20 μg にタンパク量を調製したサンプル 10 μL に 2 \times sample buffer を 10 μL 加え、95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間加熱した。sample buffer は 2 \times Laemmli Sample Buffer (BIORAD, California,

USA) を 950 μ L の 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を 50 μ L で調製した。1 \times Running buffer を泳動槽 (ATTO, NewYork, USA) に入れ、ウェルを洗浄後、サンプルを 20 μ L アプライし AE-6531 パジエラン (ATTO, NewYork, USA) を用いて 80 分間泳動した。Instruction Manual 記載のプロテイング用溶液を 3 種 (A,B,C) 調製した (下記参照)。A 液に 2 枚, B 液に 1 枚, C 液に 3 枚のろ紙 (85 \times 90 mm) (ATTO, NewYork, USA) を浸した。メンブレン(85 \times 90 mm) (ATTO, NewYork, USA) を methanol に 20-30 秒間浸し、B 液に入れ 30 分以上振とうした。泳動終了後、Manual 記載の順にろ紙、メンブレン、ゲルを重ね、AE-6685 パワープロット・ミニ (ATTO, NewYork, USA) を用いて 60 分で転写した。転写終了後、AE-1477 EzBlock CAS (ATTO, NewYork, USA) (リン酸化の場合は AE-1475 EzBlock Chemi (ATTO, NewYork, USA)) にメンブレンを浸し、60 分間振とうした。ブロッキング終了後、メンブレンを洗浄し、各希釈率で希釈した一次抗体に、4 $^{\circ}$ C、一晩で振とうした。一次抗体の希釈は Signal Booster A (Beacle, Kyoto, Japan) で行った。一次抗体反応終了後、TBS-T で 10 分洗浄を 3 回行い、一次抗体と同様に二次抗体反応を常温で 60 分間行った。二次抗体の希釈は Signal Booster B (Beacle, Kyoto, Japan) で行った。二次抗体反応終了後、TBS-T で 10 分洗浄を 3 回行い、ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Illinois, USA) の試薬を調製しメンブレンに添加、5 分反応させた。メンブレンをスリーブにはさみ込み Light-Capture (ATTO, NewYork, USA) で検出した。得られたバンドの結果を Image J を用いて輝度を算出し、解析を行った。一次抗体として、eIF5 (#2480, CST, Danvers, Massachusetts, USA) および β -actin (ab6276, Abcam, Cambridge, UK)、二次抗体 (#934&931, GE

Healthcare, Illinois, USA)を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、既に樹立された細胞株を用いる *in vitro* 実験主体である。また、遺伝子実験において、必要とする場合は当該施設の遺伝子組換え実験の安全管理規則に従って行った。動物実験に関しても、国立がん研究センター研究所の委員会に申請を行い、動物愛護法などを遵守して行なった。ナノマテリアルの取扱いに関して、「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第 0331013 号) に準じて行った。

C. 研究結果

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

各培養担体上における SS を縦軸としたヒストグラムを Fig. 1 に示す。磁性体ナノ粒子非曝露群に比べて 100 μ g/mL 曝露群の SS (Side Scatter、側方散乱光) が増加していることが、各培養担体上で確認された。磁性体ナノ粒子曝露時の各担体上における SS 変化を、非曝露群を 1 として定量化した結果を Fig. 2 に示す。SS 増加は、二次元培養曝露群が $1.71 \pm 4.49 \times 10^{-2}$ 、肺切片担体上曝露群が $1.43 \pm 4.93 \times 10^{-2}$ 、肝臓切片上曝露群が 1.44 ± 0.122 であった。各組織切片の SS 増加量は、二次元培養と比較し有意な差を持って減少した。

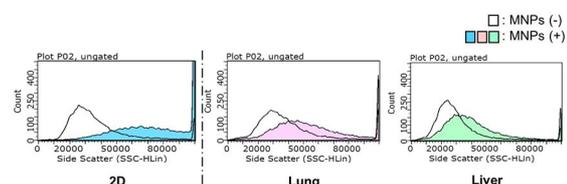


Fig.1 SS ヒストグラムの比較

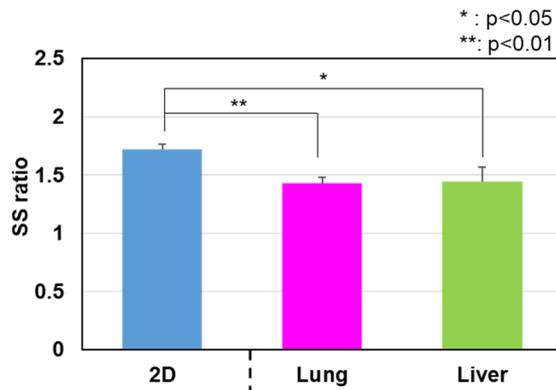


Fig.2 磁性体ナノ粒子 100 μ mL 曝露時の SS 変化量

各組織切片担体における Integrin- β 1 及び EGFR (Epidermal growth factor receptor) の mRNA 発現量を Fig. 3 および 4 に示す。磁性体ナノ粒子を 24 時間曝露した。各遺伝子で、従来の二次元培養での非曝露群の発現量を 1 として相対的に定量化した。Integrin- β 1 の発現量は、二次元培養上 100 μ mL 曝露時は 0.228 ± 0.109 、肺切片担体上では非曝露時 2.93 ± 0.721 、100 μ mL 曝露時は 2.23 ± 0.415 、肝臓切片担体上では非曝露時は 2.01 ± 0.572 、100 μ mL 曝露時は 1.43 ± 0.436 であった。EGFR の発現量は、二次元培養上 100 μ mL 曝露時は 1.15 ± 0.514 、肺切片担体上では非曝露時は 4.11 ± 0.676 、100 μ mL 曝露時は 3.91 ± 0.994 、肝臓切片担体上では非曝露時は 1.33 ± 0.122 、100 μ mL 曝露時は 1.39 ± 0.711 であった。Integrin- β 1 の発現は、二次元培養における非曝露群と比較して、二次元培養の磁性体ナノ粒子 100 μ mL 曝露時に有意に減少、肺切片担体上の非曝露時と肝臓切片担体上の非曝露時で有意に増加したが、曝露時ではやや減少を認めた。EGFR の発現は、二次元培養における非曝露群と比較して、肺切片担体上の非曝露時と肝臓切片担体上の非曝露時で有意に増加し、曝露時ではやや減少を認めた。

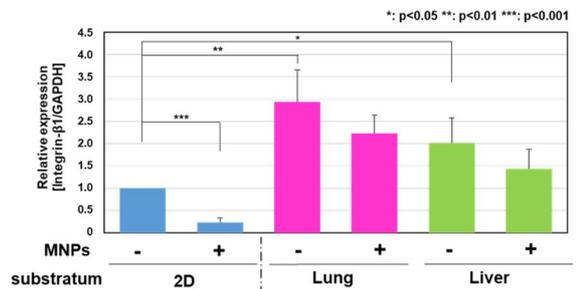


Fig.3 Integrin- β 1 の発現量

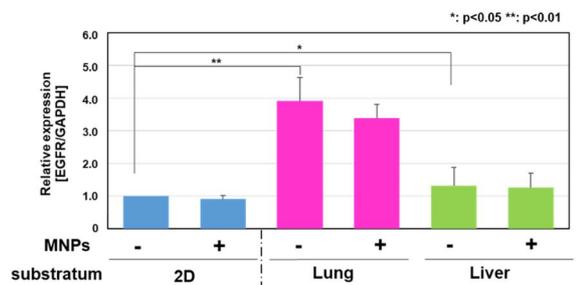


Fig.4 EGFR の発現量

ナノマテリアルの傷害機構の解析

候補 microRNA 発現解析: 100~400 μ mL の磁性体ナノ粒子を曝露後 24~72 時間における miR5787 の発現を Real-Time PCR で解析を行った (Fig.5)。濃度依存的に発現量は増加し、72 時間後まで発現量が増加した。また、N-acetylcystein (NAC) で活性酸素種 (ROS) 発生を抑制すると、miR5787 の発現量が抑制されるのを認めた。

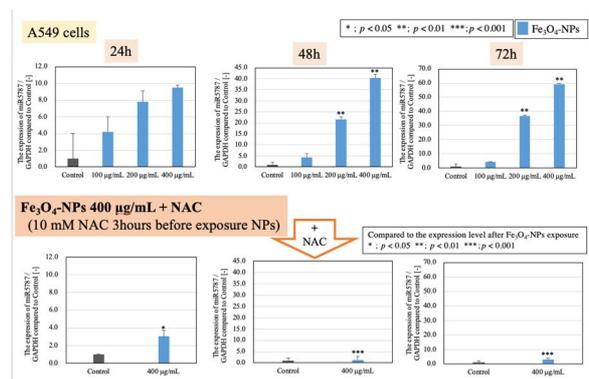


Fig.5 磁性体ナノ粒子曝露による miR5787 発現量変化

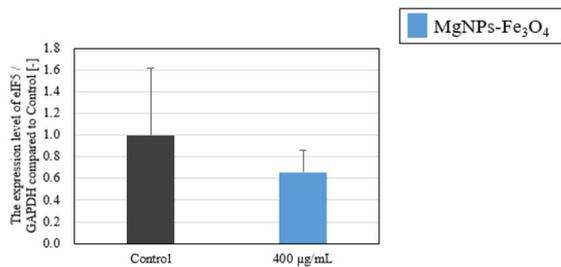


Fig.6 磁性体ナノ粒子暴露時の eIF5 mRNA 発現

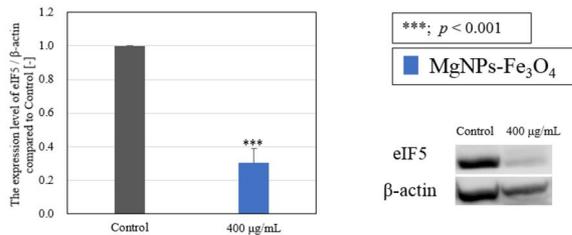


Fig.7 磁性体ナノ粒子暴露時の eIF5 蛋白発現

miR5787 の標的遺伝子と考えられる eIF5 の発現を mRNA および蛋白レベルで解析した。磁性体ナノ粒子暴露により、いずれも発現量が減少するのを認めた。

D. まとめ

A549 細胞の切片担体培養系の条件設定後に、磁性体ナノ粒子の暴露実験を行った。Flowcytometry による SS 値の測定より、細胞内の磁性体ナノ粒子の取込み量を定量化した。SS の上昇は磁性体ナノ粒子によるものと考えナノ粒子の取込み指標とした。切片担体培養系を用いた A549 の磁性体ナノ粒子の取込みは、従来法の培養細胞のナノ粒子取込みに比べ有意に低下することが示された。加えて、細胞-細胞外マトリックス間の接着に關与する Integrin-β1 や細胞表面に発現する EGFR の発現解析より、二次元培養では Integrin- 1 は磁性体ナノ粒子により発現が減少することを認めた。一方、切片担体培養系では Integrin-β1 の発現が有意に亢進した。またナノ粒子を暴露した状態でも、二次元培養と比較して Integrin-β1 の発現が維持されるのを確認した。EGFR の発現量は、肺切片担体上での発現が高い傾

向が認められた。Integrin-β1 や EGFR は細胞の物質取込み経路に係わることが報告されている[EMBO J, 33(18), 2098-2112, 2014]。細胞の物質取込み経路の一つであるエンドサイトーシスは複数のシステムにより進行するが、そのうちの一つにクラスリン介在性エンドサイトーシスがある。このエンドサイトーシスは切断タンパク質 Dynamin 2 が小胞の切断を行うが、切断には Girdin という制御因子と相互作用を起こす必要がある。しかし、Girdin は Integrin-β1 あるいは EGFR の存在下ではこの二因子と結合し、Dynamin 2 とは相互作用を起こすことができなくなり、結果としてエンドサイトーシスによる物質の取込みが抑制される。

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

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

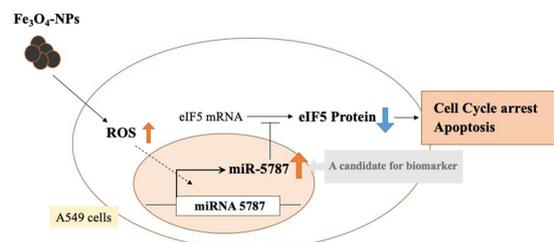


Fig.8 まとめ

E . 研究発表

1. 論文発表

- (1) E.Fukai, H.Sato, M.Watanabe, D.Nakae, Y.Tostuka. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci*, 109(4), 1024-1031, 2018.
- (2) K.Ishii, S.Takahashi, Y.Sugimura, M.Watanabe. Role of stromal paracrine signals in proliferative diseases of the aging human prostate. *J. Clin. Med.* 7, 68, 2018.
- (3) G.W.Lee, J.B.Park, S.Y.Park, J.Seo, S.H.Shin, J.W.Park, S.J.Kim, M.Watanabe, Y.S.Chun. The E3 ligase C-CBL inhibits cancer cell migration by neddylation of the proto-oncogene c-Src. *Oncogene*, 37, 5552-68, 2018
- (4) Y.Fujiwara, M.Nishida, M.Saito, A.I Robles, F.Takeshita, M.Watanabe, T.Ochiya, J.Yokota, T.Kohno, C.C.Harris, N.Tsuchiya. A nucleolar stress-specific p53-miR-101 molecular circuit functions as an intrinsic tumor-suppressor network. *EBioMedicine*, 33, 33-48, 2018.
- (5) Y.Kudo, Y.Sasaki, T.Onodera, J.Hashimoto, T.Nozaki, K.Tamura, M.Watanabe, M.Masutani. Measurement of poly(ADP-ribose) level with enhanced slot blot assay with crosslinking. *Challenges*, 9(2), 27, 2018.
- (6) K.Hayashi, S.Yamada, W.Sakamoto, E.Usugi, M.Watanabe, T.Yogo. Red Blood Cell-Shaped Microparticles with Red Blood Cell Membrane Demonstrate Prolonged Circulation Time in Blood. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 4(8), 2729-2732, 2018.
- (7) Y.Nishimura, K.Kasahara, T.Shiromizu, M.Watanabe, M.Inagaki. Primary cilia as

signaling hubs in health and disease. *Adv. Sci.*, 1801138, 2018.

2. 学会発表

- (1) K.Kojima, S.Takahashi, S.Saito, T.Nittami, E.Usugi, K.Ishii, Y.Hirokawa, M.Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagic cell death in prostate cancer cells treated with docetaxel via ROS generation and NF-KB signaling. AACR annual meeting 2018, April.14-18, 2018, Chicago.
- (2) S.Takahashi, S.Saito, T.Nittami, Y.Totsuka, Y.Nakagawa, M.Watanabe. MicroRNAs profiling of cancer cells after Fe₃O₄ nanoparticles exposure (II). 第 77 回日本癌学会学術総会 , 大阪国際会議場 , 2018 年 9 月.
- (3) S.Saito, S.Takahashi, T.Nittami, Y.Totsuka, Y.Nakagawa, M.Watanabe. Establishment of the substrate made of tissue/ organ sections for histopathology based systems for nanotoxicity. 第 77 回日本癌学会学術総会 , 大阪国際会議場 , 2018 年 9 月.
- (4) Y-S.Chun, J.B.Park, G.Lee, S.Y.Park, M.Watanabe. Activation of c-Src by neddylation blockade enhanced cancer cell migration through Akt signaling pathway. 第 77 回日本癌学会学術総会 , 大阪国際会議場 , 2018 年 9 月.
- (5) K.Ishii, S.Kajiwara, K.Iguchi, M.Kato, Y.Hirokawa, K.Arima, M.Watanabe, Y.Sugimura. Characterization of human prostate cancer LNCaP sublines differing in androgen-sensitivity. 第 77 回日本癌学会学術総会 , 大阪国際会議場 , 2018 年 9 月.
- (6) M.Kato, K.Ishii, S.Kajiwara, Y.Hirokawa, K.Arima, M.Watanabe, Y.Sugimura. Fibroblasts disturb the expression of cancer-related genes in non-transformed human

prostatic epithelial cell line BPH-1. 第 77 回日本癌学会学術総会，大阪国際会議場，2018 年 9 月.

- (7) K.Ishii, I.Matsuoka, T.Sasaki, M.Kato, K.Nishikawa, H.Kanda, Y.Hirokawa, K.Iguchi, K.Arima, M.Watanabe, Y.Sugimura. Loss of fibroblasts-dependent androgen receptor activation in prostate cancer cells develops castration-resistant prostate cancer. AACR annual meeting 2019, March.29-April.3, Atlanta.
- (8) M.Watanabe, S.Takahashi, E.Usugi, K.Ishii, Y.Hirokawa. Crosstalk between apoptosis and autophagy induced by docetaxel-magnetic nanoparticles with different surface in prostate cancer cells. AACR annual meeting 2019, March.29-April.3, Atlanta.

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
平成 30 年度分担研究報告書

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
生体を模倣した *in vitro* 試験系を用いた遺伝毒性評価

研究分担者 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：先行研究により、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。本研究では、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、RAW264.7 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 RAW264.7 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り、また BMSC-5 曝露群では酸化ストレス由来の変異が多く観察された。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。変異スペクトルから酸化ストレス由来の変異が観察されたため活性酸素種(ROS)の産生を評価した結果、BMSC-5 曝露で BMS-10 よりも強い ROS 産生の増加が確認された。さらに RAW264.7 における炎症性サイトカイン TNF- α 産生を定量した結果、BMSC-5 曝露で有意な増加が見られた。BMSC-5 曝露で細胞毒性や強い変異原性および ROS や炎症性サイトカインの増加が確認されたが、ポリアクリル酸修飾による MGT の特性の変化から貪食細胞に認識されにくくなり、細胞内に取り込まれないためポリアクリル酸修飾による影響が示唆された。さらに酸化ストレス由来の変異が確認されたことから Fenton 反応による影響も示唆された。そこで BMSC-5 液内の鉄イオン濃度を調べた結果、BMS-10 の 9 倍近い鉄イオンが検出された。これらの結果から鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと考えられた。今後は、鉄イオンの発生場所や鉄キレート剤を加えて毒性が軽減するのかを調べることで毒性原因を追求していく。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られる。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。

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

1) 細胞毒性試験

96 well 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 $\mu\text{g/ml}$ 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、ThinCert™ (pore size; 0.4 μm , high density: greiner bio-one) を各 well に入れ、インサート内に RAW264 を播種し、24 時間培養した。BMSC-5 及び BMS-10 を RAW264 のみ、または RAW 264 と GDL1 の両方に 24 時間曝露させた後にトリプシン処理により GDL1 を回収し、一定期間培養した後細胞から DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングによってトランスジーン EG10 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、EG10 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。

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 $\mu\text{g/ml}$ 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。

4) マグネタイトナノ粒子処理による活性酸素種 (ROS) 産生

6well plate に GDL1 及び RAW264.7 を 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 2 時間曝露し

た後、Lysis buffer を加え、セルスクレイパーで細胞を剥がし、1.5 ml チューブに移した。遠心分離を行い上清を新しいチューブに回収し、OxiSelect *in vitro* ROS/RNS assay kit を用い ROS 産生評価を行った。

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

6 well plate に RAW264.7 を 2.0×10^6 cells/well で播種し、24 時間前培養した。細胞に BMS-10 および BMSC-5 をそれぞれ 25 $\mu\text{g/ml}$ 及び 50 $\mu\text{g/ml}$ で 24 時間曝露した後、培養上清をチューブに移した。この上清をサンプル液とし、Quantikine Mouse TNF- α を用いて培養上清中の TNF- α を定量した。

6) Ferrozine assay を用いた培地中の鉄イオン濃度の定量

1.5 ml のエッペンチューブに DMEM を 1 ml 加え、50 $\mu\text{g/ml}$ になるように各 MNPs を加え、vortex を用いてよく混合した。4 °C、10000 rpm、10 min で遠心分離をし、上清をアッセイ検体とした。Ferrozine assay にて培地中の鉄イオン濃度 ($\mu\text{g/dl}$) を算出した。

(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 $\mu\text{g/ml}$ 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。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 $\mu\text{g/ml}$ で BMSC-5 は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 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)。

2) 共培養システムによる遺伝毒性試験法

共培養条件下の RAW 細胞または RAW 及び GDL1 の両細胞に各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を 24 時間曝露し、6~7 日間培養した後、GDL1 細胞から DNA を抽出し、gpt 遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。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。

3) ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み
各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を 24 時間曝露した各細胞固定サンプルをフローサイトメーターで解析を行った。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。

4) マグネタイトナノ粒子処理による活性酸素種(ROS)産生

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

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

各 MGT (BMS-10、BMSC-5)を単培養 RAW264.7 に 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 24 時間曝露後、培養上清を回収し TNF- α を定量した。結果を図 6 に示す。BMS-10 曝露群では 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で TNF-a の有意な増加が見られ、BMSC-5 曝露群では 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で有意な増加がみられた。また TNF- α 産生量は BMS-10 曝露群の方が BMSC-5 曝露群よりも多いということが確認された。

6) Ferrozine assay を用いた培地中の鉄イオン濃度
各 MNPs において、BMS-10 を加えた培地からは 15.4 \pm 4.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の鉄イオンが検出された。一方、BMSC-5 を加えた培地からは 138.4 \pm 9.89 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の鉄イオンが検出され、BMS-10 と比較すると有意な差が見られた

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。さらに共培養で両方の細胞に曝露することで MF の有意な増加が確認された。このことから、BMS-10 は RAW264.7 による間接的な影響が強くでており、BMSC-5 は GDL1 への直接的な影響および間接的な影響との相乗効果が強く出ており、これは遺伝毒性メカニズムが異なり、遺伝毒性に違いが出たと考えられる。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MGT により誘発される変異スペクトルの解析を試みたところ、各 MGT で大きく異なる変異スペクトルが確認された。GC>CG や AT>CG といった酸化ストレスが増大することによって増える変異や、AT>GC といった BMS-10 曝露群では確認されなかった変異が確認された。表面修飾の違いにより大きく異なる変異スペクトルを示したことから、表面修飾が遺伝毒性発現に強い影響を示していると考えられる。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。

変異スペクトラムから酸化ストレス由来の変異が確認されたため各 MGT 曝露細胞の活性酸素種産生を評価した。結果は、BMSC-5 曝露群の方が活性酸素種を多く産生する傾向が確認された。このことから BMSC-5 は活性酸素種をより多く産生していたため突然変異頻度が増加したと考えられる。また免疫細胞による間接的な影響が確認されたため RAW264.7 から産生された炎症性サイトカイン TNF- α の定量を行った。結果は、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曝露ではどちらの MGT も TNF- α の有意な増加が見られ、BMS-10 の方が BMSC-5 よりも多くの TNF- α を産生していた。このことから BMS-10 曝露群で間接

的な影響が強く出ていたのは炎症性サイトカインが原因であると考えられる。

一方、Ferrozine assayによって鉄イオン濃度を定量した結果、BMSC-5を含んだ培地からBMS-10を含んだ培地の9倍近い鉄イオン濃度を検出した。このことから培地中の多量の鉄イオンが細胞内に直接取り込まれたのではないかと考えられる。実際に細胞には培養培地中に存在するトランスフェリンを介した鉄イオン取り込み機構が存在することや、MNPの毒性は溶出した鉄イオンがFenton反応によってヒドロキシラジカルなどのROSを生成することで発現するとされており、deferoxamineのような鉄キレート剤を使用することでMNPの毒性を軽減させたという報告も知られている。またアスベストの細胞毒性において鉄 (Fe^{2+}) の含有量が多いほど毒性が強くなったという報告もある。このことからMNPの毒性には鉄イオンが大きく関わっており、BMS-10よりも強いBMSC-5の毒性は鉄イオンの含有量が大きく関係していると考えられる。

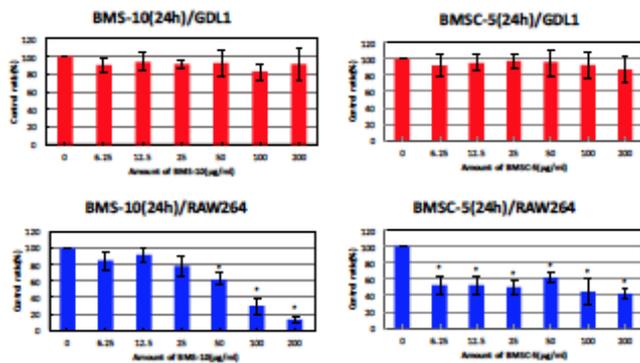


図1 表面修飾の異なるMGTの細胞毒性

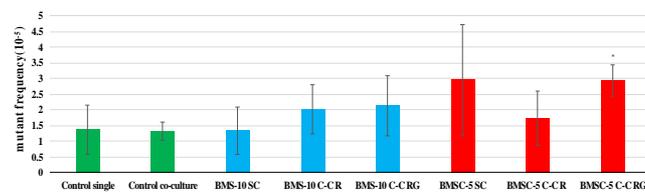


図3 GDL1細胞に観察された変異頻度

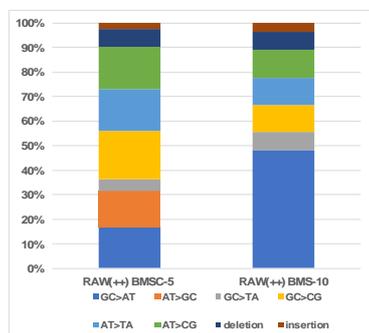


図3 変異スペクトラム

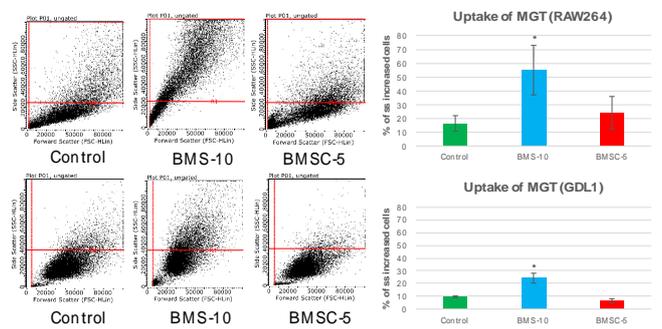


図4 各MGTの細胞への取り込み

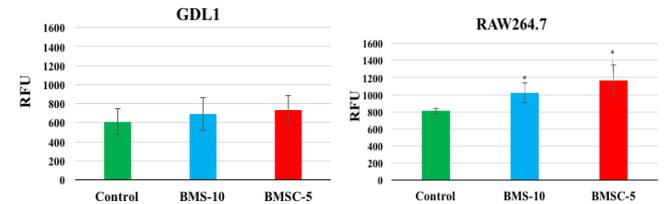


図5 各MGT処理による活性酸素種産生

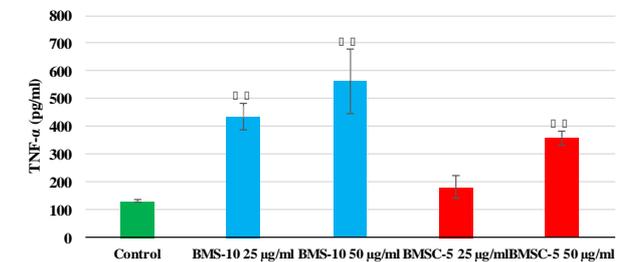


図6 RAW264.7における各MNPのTNF-α産生

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り、ROSや炎症性サイトカイン産生の増加がみられ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。遺伝毒性が強くでてしまっているため、ポリアクリル酸自身の細胞毒性や遺伝毒性への影響やFenton反応による酸化ストレスの増大による影響が考えられ、事実、培地中の鉄イオンを測定したところ、各MGTによる毒性の違いは鉄イオン濃度が異なっていることが原因であると推察された。今後はBMSC-5液内に存在している鉄イオンは製造過程に発生した夾雑物なのか、安定性の低下等によりBMSC-5自体から発生したのかを調べる

ことや、鉄キレート剤を加えることでBMSC-5の毒性が軽減するのかを調べることで毒性原因を追求すると共にMNPの安全性を検討していく。

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. 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, 1024-1031, 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. *Journal of Applied Toxicology*, 38, 537-543, 2018

2. 学会発表

- (1) 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)
- (2) 戸塚ゆ加里、秋場 望、佐藤春菜、前迫有也、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉. 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第33回発がん病理研究会 (御殿場、2018年8月)
- (3) 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二. 芳香族アミン類の代謝物分析とDNA付加体 第33回発がん病理研究会 (御殿場、2018年8月)
- (4) Y.Totsuka, T.Matsuda, M.Kato, A.Elzawahry, Y.Totoki, T.Shibata, H.Nakagama. Whole genome sequencing analysis elucidates the interaction between environmental factors and causes of human cancer. 第77回日本癌学会総会 (大阪、2018年9月)
- (5) 斎藤春五、高橋沙奈衣、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊. ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第77回日本癌学会総会 (大阪、2018年9月)
- (6) 高橋沙奈衣、斎藤春五、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊. Fe_3O_4 ナノ粒子の曝露された癌細胞における microRNAs のプ

ロファイリングについて (II) 第77回日本癌学会総会 (大阪、2018年9月)

- (7) 戸塚ゆ加里、佐藤春菜、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、遠藤 治. 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
- (8) 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
- (9) 前迫侑也、椎崎一宏、高村岳樹、戸塚ゆ加里. 職業性胆管がん発生に關与する1,2-ジクロロプロパンのDNA付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析) 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
- (10) 神尾翔真、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里. ナノマテリアルの表面修飾が及ぼす遺伝毒性への影響 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
- (11) 斎藤春吾、渡邊昌俊、戸塚ゆ加里. ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
- (12) 石野孔祐、前迫侑也、内藤善哉、戸塚ゆ加里. 質量分析データに基づくDNA付加体データベースの整備 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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。

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案

In vitro 評価系の高度化、毒性病理学的研究監修

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用いて、金属ナノ粒子の経皮一般/遺伝毒性に関する新規 *in vitro* 評価系を構築することである。本年度は、3D ヒト皮膚再構成系を用いた小核試験法を確立するための予備的検討を行った。本研究は、チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞 CHL/IU の単層培養系において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小核誘発性について解析した。本研究は、また、正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NKEK（クラボウ）の単層培養系および 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、それらへの小核試験の導入を試みた。その結果、CHL/IU 単層培養系において、非修飾マグネタイトは、一定の条件下で小核誘発性を持つ可能性が示唆された。カルボキシル基修飾は、この小核誘発性を減弱させることが判明した。NHEK 単層培養系または 3D ヒト皮膚再構成系への小核試験導入については、細胞の大きさや増殖性の観点から、さらなる検討が必要であることが判明した。

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学部食品安全健康学科助教

A. 研究目的

開発・使用されているナノマテリアルの社会的受容には、十分な安全性評価と、仮にリスクがある場合、ベネフィット・リスクバランスを考慮した低減化が必要である。加えて、欧米では、これらの安全性評価やリスク低減が通商政策で戦略的に実施され、我が国でも同様の戦略が必須であり、安全性評価の高度化・標準化も必須である。当該リスク評価に当たっては、動物愛護の 3R 原則の観点から、動物実験代替法の開発も重視される。本研究は、全体として、①共

培養・切片担体培養・3Dヒト皮膚再構成系などのナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化と *in vivo* 実験による当該評価法の検証、②自験・文献などのデータによる有害性発現経路の確立、③ナノマテリアル毒性試験データベースの作成、④それらの成果に機械学習などによる *in silico* 生体影響予測を組合せたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法を構築すること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一般/遺伝毒性に関する新規 *in vitro* 評価系を構築することである。本年度は、3D ヒト皮膚再構成系を用いた小核試験法を確立するための予備的検討を行った。

B. 研究方法

1) 細胞

1-1) 単層培養系

単層培養系としては、チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞 CHL/IU または正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NKEK (クラブウ) を適宜継代して用いた。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、代謝活性化の関与を解析するため、S9mix の存在・非存在条件で試験を行った。

1-2) 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。

2) 被験物質

2-1) 対照物質

陽性対照物質としては、マイトマイシン C またはベンツピレンを用いた。陰性対照物質としては、蒸留水 (dH₂O) を用いた。

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 -Fe₂O₃) およびマグネタイト (Fe₂O₄) 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。本研究では、Fe₃O₄ (BMS-10) および Fe₃O₄-COOH (BMSC-5) の 2 種類のマグネタイトを用いた。

3) 実験および解析

被験物質への曝露は、単層培養系において培地中へ、3D ヒト皮膚再構成系において表皮組織上面から (図 1)、それぞれ行った。小核試験は、基本的に常法に従って実施した。

(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) 単層培養系

1-1) 陽性対照物質

S9mix 非存在下の CHL/IU においては、マイトマイシン C を 3 または 24 時間曝露すると、2 核の「小核あり」が増加した (表 1)。

S9mix 存在下の CHL/IU においては、ベンツピレンを 3 時間曝露すると、2 核の「小核あり」が若干増加したが、2 核細胞が少なく、それ以外が多かった (表 2)。

S9mix 非存在下の NHEK においては、マイトマイシン C を 3 または 24 時間曝露しても、主に 1 核が多く、細胞分裂が行われてないようで、細胞の数も少なかった (表 3)。

1-2) マグネタイト

S9mix 非存在下の CHL/IU においては、BMS-10 の 10-200 μ g/mL で 24 時間曝露しても、2 核細胞中の小核出現頻度が陰性対照と同等であった (表 4)。

S9mix 非存在下の CHL/IU においては、BMSC-5 の 10-200 μ g/mL で 24 時間曝露しても、2 核細胞中の小核出現頻度が陰性対照と同等であった (表 5)。

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

なお、両マグネタイト共、S9mix 存在下の方が非存在下より、2 核細胞中の小核出現頻度が高かった(表 6)。

2) 3D ヒト皮膚再構成系

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

D. 考察

CHL/IU 単層培養系を用い、S9mix の非存在下または存在下で実施したオーソドックスな 24 時間曝露小核試験において、非修飾マグネタイト BMS-10 とカルボキシル基修飾マグネタイト BMSC-5 は、いずれも陰性であった。3 時間曝露試験において、BMS-10 は、S9mix の非存在下または存在下で陽性を示し、当該小核誘発性が S9mix の存在によって増強した。BMSC-5 は、S9mix 非存在下で陽性、存在下で陰性であった。以上の結果より、BMS-10 については、代謝活性化を必要としないが、それによって増強される遺伝毒性がある可能性がある、しかしながら、24 時間曝露で陰性であることを考え合わせると、この非修飾マグネタイトの「遺伝毒性」については、この段階で結論できず、Ames 試験など他の *in vitro* 試験や *in vivo* 試験の結果と併せて総合的に評価すべきである。一方、BMSC-5 については、S9mix 非存在下 3 時間培養で陽性であったが、当該陽性の程度が弱く、S9mix 存在下、また、その非存在・存在にかかわらず 24 時間培養で陰性であったことから、総合的に遺伝毒性を有しないと考える。もちろん、このカルボキシル基修飾マグネタイトの「遺伝毒性」については、前述の BMS-10

の場合と同様、他の *in vitro* 試験や *in vivo* 試験の結果と併せて総合的に評価すべきである。

マグネタイトのカルボキシル基修飾は、昨年度までに実施した厚生労働科学研究費補助金による先行研究により、マグネタイトの単層培養ケラチノサイト傷害性を減弱させることが明らかとなっている。したがって、CHL/IU 単層培養系においても、カルボキシル基修飾がマグネタイトの小核誘発性を減弱させたものと考ええる。一般に、ナノ材料は付着・凝集性が著しく高く、ナノ材料を材料原料として利用するには分散制御が極めて重要である。カルボキシル基修飾は、疎水性粒子を水中や極性溶媒に分散させる場合の表面修飾としてよく使われる手法で、ナノ材料の分散制御にも有用であるものと考えられている。たとえば、シリカ (SiO₂) については、カルボキシル基・水酸基・アミノ基などによる修飾を施すと表面電位の変化に基づいて毒性が減弱ないし消失することが知られている。マグネタイトの場合も、同様のメカニズムが働いているものと示唆される。

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

細胞増殖活性については、十分な増殖が得られなかった可能性がある。このことは、NHEK 単層培養系でも小核試験が困難であったことから推察できる。これらの培養

に用いている培養液は，keratinocyte growth factor (KGF) を含んでいないが，KGF 含有培養液の使用を推奨する論文もある．来年度は，KGF の使用も含め，培養液について検討する予定である．

E. 結論

CHL/IU 単層培養系において，非修飾マグネタイトは，一定の条件下で小核誘発性を持つ可能性が示唆された．カルボキシル基修飾は，この小核誘発性を減弱させることが判明した．

NHEK 単層培養系または 3D ヒト皮膚再構成系への小核試験導入については，細胞の大きさや増殖性の観点から，さらなる検討が必要であることが判明した．

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, 1024-1031, 2018.
- (2) Y.Sakamoto, M.Hojo, Y.Kosugi, K.Watanabe, A.Hirose, A.Inomata, T.Suzuki, D.Nakae. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.*, 43, 587-600, 2018.

2. 学会発表

- (1) 坂本義光，北條 幹，鈴木俊也，猪又明子，守安貴子，広瀬明彦，中江 大．多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を単回経気管噴霧投与した後終生飼育したラットの肺および中皮組織における増殖性病変の発生．第 45 回日本毒性

学会学術年会 (2018 年 7 月 19 日，大阪府大阪市)．

- (2) 北條 幹，小林憲弘，長谷川悠子，安藤 弘，久保喜一，海鉾藤文，田中和良，五十嵐海，村上詩歩，多田幸恵，生嶋清美，湯澤勝廣，坂本義光，前野愛，鈴木俊也，猪又明子，守安貴子，高橋祐次，広瀬明彦，中江 大．多層カーボンナノチューブのマウス気管内投与による発生毒性と肺の炎症との関連性．第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018 年 7 月 19 日，大阪府大阪市)．
- (3) M.Hojo, N.Kobayashi, Y.Hasegawa, Y.Sakamoto, S.Murakami, Y.Yamamoto, Y.Tada, A.Maeno, Y.Kubo, H.Ando, M.Shimizu, Y.Taquahashi, T.Suzuki, D.Nakae, A.Hirose. Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018) (2018 年 9 月 2 日，Belgium 王国 Brussels 市)．
- (4) 坂本義光，多田幸恵，北條 幹，前野愛，鈴木俊也，猪又明子，守安貴子，中江 大．ラットにおいて DHPN で誘発されたメソテリン陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性状．第 35 回日本毒性病理学会学術集会 (2019 年 2 月 1 日，東京都江戸川区)．
- (5) 前野 愛，坂本義光，北條 幹，湯澤勝廣，長谷川悠子，鈴木俊也，猪又明子，守安貴子，煙山紀子，美谷島克宏，中江 大．高齡 F344 ラットに自然発生した退形成ジンバル腺癌 (anaplastic Zymbal's gland carcinoma) を疑う 2 例．第 35 回日本毒性病理学会学術集会 (2019 年 1 月 31 日，東京都江戸川区)．

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

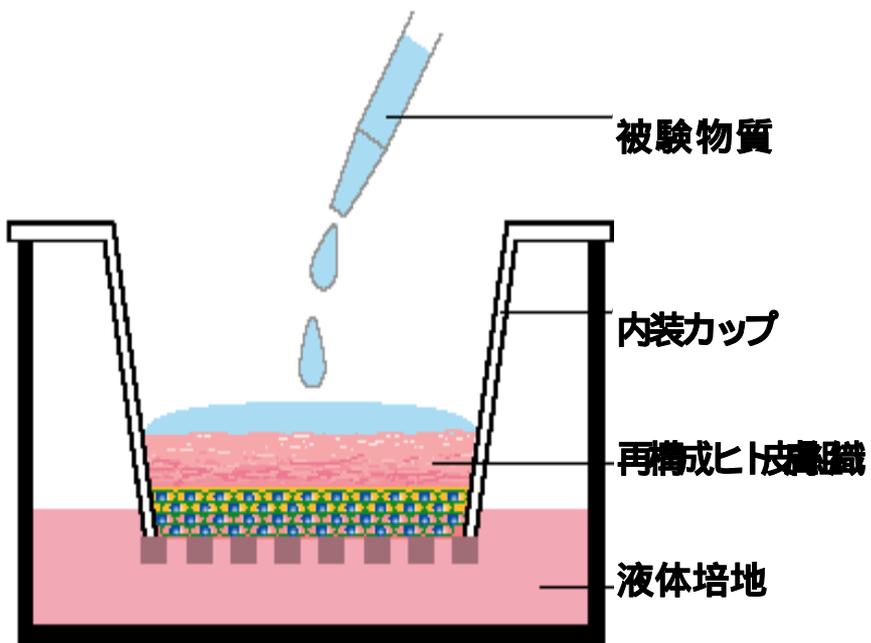


表 1 . S9mix 非存在下の CHL/ IU における陽性対象物質による小核試験

Group	1核		2核		3核以上		2核の細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBPI)	細胞増殖 抑制率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO3h	2	122	30	2446	42	773	1.2	2.2	-
MMC3h	6	182	312	1869	123	249	14.3	2.1	11.2
BP3h	35	1765	62	1938	16	75	3.1	1.6	84.2
DMSO24h	55	3555	98	1902	23	194	4.9	1.4	-
MMC24h	342	3825	271	1748	71	431	13.4	1.5	-8.2

表 2 . S9mix 存在下の CHL/ IU における陽性対象物質による小核試験

Group	1核		2核		3核以上		2核の細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBPI)	細胞増殖 抑制率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO3h	13	611	38	1980	20	248	1.9	1.9	-
BP3h	41	1524	52	373	12	38	12.2	1.26	70.4

表 3 . S9mix 非存在下の NHEK における陽性対象物質による小核試験

Group	1核		2核		3核以上		2核細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBPI)	細胞増殖 抑制率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO3h	1	294	2	81	3	3	2.4	1.25	-
MMC3h	1	833	2	304	0	19	0.7	1.3	-20
DMSO24h	5	585	4	124	2	16	3.1	1.22	-
MMC24h	0	62	0	24	0	6	0	1.39	-75.6

表 4 . S9mix 非存在下の CHL/ IU における BMS-10 による小核試験 (24 時間)

Group	1核		2核		3核以上		2核細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBTI)	細胞増殖 抑制率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO 24h	388	3683	131	1890	52	372	6.48	1.44	-
MMC 24h	858	5032	438	1565	127	359	21.87	1.36	19.36
0µg/ml 24h	42	4113	58	1955	36	401	2.88	1.44	-
10µg/ml 24h	33	3696	20	1984	12	456	1.00	1.47	-8.47
100µg/ml 24h	31	2619	71	1929	46	596	3.55	1.62	-41.97
200µg/ml 24h	6	2705	21	1980	6	70	1.05	1.45	-2.88

表 5 . S9mix 非存在下の CHL/IU における BMSC-5 による小核試験 (24 時間)

Group	1核		2核		3核以上		2核細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBTI)	細胞増殖 抑止率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO 24h	105	5350	138	1862	44	257	6.90	1.34	-
MMC 24h	153	7789	236	1764	37	311	11.80	1.26	21.90
0µg/ml 24h	77	5630	46	1954	21	783	2.30	1.42	-
10µg/ml 24h	16	5989	16	2000	9	174	0.79	1.29	31.51
100µg/ml 24h	78	7185	52	1948	8	229	2.60	1.26	38.57
200µg/ml 24h	49	2970	46	1957	35	718	2.30	1.61	-43.33

表 6 . S9mix 非存在下または存在下の CHL/IU における BMS-10 または BMSC-5 による小核試験 (3 時間)

Group	1核		2核		3核以上		2核の細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBTI)	細胞増殖 抑止率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO S9(-)	18	1014	32	1970	19	75	1.60	1.70	-
DMSO S9(+)	20	665	25	1977	14	237	1.25	1.85	-
MMC S9(-)	537	3718	485	1515	63	169	24.25	1.38	45.75
BP S9(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0µg/ml S9(-)	18	1046	26	1975	20	216	1.30	1.75	-
0µg/ml S9(+)	72	568	127	1873	85	566	6.35	2.00	-
非修飾マグネタイト 200µg/ml S9(-)	36	974	69	1934	13	261	3.44	1.78	-3.59
非修飾マグネタイト 200µg/ml S9(+)	178	1197	148	1854	113	364	7.39	1.77	23.56
修飾マグネタイト 200µg/ml S9(-)	30	974	89	1913	36	608	4.45	1.90	-20.32
修飾マグネタイト 200µg/ml S9(+)	48	873	103	1897	49	466	5.15	1.88	12.11

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案

(1)ナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築、

(2)機械学習による生体影響予測の試み

研究分担者 花方信孝 物質・材料研究機構 技術開発・共用部門 副部門長

研究要旨:初年度はナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築方法の検討のため利用可能な既存の生命科学系データベースを調査した。その結果、NCBI の GEO データベースを始めいくつかの有用なデータベースを見出した。また、生体影響予測の基盤となる機械学習の実行環境として Tensor Flow を中心に整備するとともに、ナノマテリアルとして ZnO を曝露した細胞系の遺伝子発現マイクロアレイ解析を実施して機械学習に用いる実測データを取得した。さらには、マイクロアレイ解析における一色法と二色法の違いについても検討した。

A. 研究目的

現在一般社会で開発・使用されているナノマテリアルが社会的に受容されるためには、そのリスクについて十分な安全評価手法が必要である。しかしながら、その手法として代表的な動物実験は費用的にも時間的にも高コストであることに加えて、近年の動物愛護原則から敬遠され、代替手法が求められている。そこで *in vitro* 評価法の一環として、初年度はナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築方法および機械学習による生体影響予測モデルを検討することを研究目的とした。

具体的には、データベースを構築する上で元データとして使用する既存のデータベースを選定するために生命科学系データベースの調査と、機械学習を実施するためにコンピュータ環境に関する調査および実環境の整備、機械学習に用いる実測データを得るためにナノマテリアルを曝露した場合の遺伝子発現マイクロアレイ解析を実施することとした。さらに既存データベースにおけるマイクロアレイ解析の一色法と二色法の扱いについても調査することとした。

B. 研究方法

1) 既存データベースの調査

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

2) 機械学習の実施環境

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

表 1 ZnO 曝露実験におけるマイクロアレイの割り当て

Slide ID	Slide No.	Pos.	Block	Cy3	Cy5
AH72	257236319408	1_1	B1	THP-1_ZnO=0µg/mL_6hr	THP-1_ZnO=300µg/mL_6hr
AH72	257236319408	1_2	B2	THP-1_ZnO=300µg/mL_6hr	THP-1_ZnO=0µg/mL_6hr
AH72	257236319408	1_3	B3	THP-1_ZnO=0µg/mL_24hr	THP-1_ZnO=300µg/mL_24hr
AH72	257236319408	1_4	B4	THP-1_ZnO=300µg/mL_24hr	THP-1_ZnO=0µg/mL_24hr
AH72	257236319408	2_1	B5	A549_ZnO=0µg/mL_6hr	A549_ZnO=60µg/mL_6hr
AH72	257236319408	2_2	B6	A549_ZnO=60µg/mL_6hr	A549_ZnO=0µg/mL_6hr
AH72	257236319408	2_3	B7	A549_ZnO=0µg/mL_24hr	A549_ZnO=60µg/mL_24hr
AH72	257236319408	2_4	B8	A549_ZnO=60µg/mL_24hr	A549_ZnO=0µg/mL_24hr

表 2 本研究目的に適すると思われる既存データベース

データベース名	URL	説明
Gene Expression Omnibus (GEO)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/	NCBIが運営するマイクロアレイ解析等の遺伝子発現データのレポジトリ。
GEO Data Sets	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/	GEOのデータセット部分。実験条件等の情報が整備。
ArrayExpress	https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/	EBIが運営する遺伝子発現データアーカイブ。
CIBEX	https://cibex.nig.ac.jp/data/	DDBJが運営する遺伝子発現データレポジトリ。
CellMontage	http://cellmontage.cbrc.jp/	マイクロアレイデータ検索・解析システム。
Open TG-GATEs	https://toxico.nibiohn.go.jp/	医薬品等のin vivo/in vitro曝露データ集積データベース。
抗がん剤遺伝子発現データベース	http://scads.jfcr.or.jp/db/cs/	化合物の制がん作用と関連する遺伝子発現情報を提供するデータベース。
Comparative Toxicogenomics Database (CTD)	https://ctdbase.org/	環境曝露と人間の健康に関するデータベース。
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/	ヒトの遺伝子変異と遺伝病のデータベース。
Gene Signature DataBase (GeneSigDB)	https://genesigdb.org/genesigdb/	遺伝子発現解析結果からの変動遺伝子群のデータベース。
Integrative Disease Omics Database (iDOx DB)	https://gemdbj.ncc.go.jp/omics/	多層的な疾患オミックス解析の統合データベース。
Functional Annotation of the Mammalian Genome (FANTOM)	http://fantom.gsc.riken.jp/jp/	ゲノムDNAから転写されているRNAの機能をカタログ化したデータベース。
COXPRESdb	https://coxpresdb.jp/	ヒト・マウス・ラット、他4種の共発現遺伝子データベース。
Human Protein Atlas	https://www.proteinatlas.org/	ヒトの器官、組織、細胞におけるタンパク質の発現および局在に関するデータベース。
H-ANGEL	http://www.h-invitational.jp/hinv/h-angel	H-Invitationalプロジェクトの構築した転写産物データに対する遺伝子発現データ
BioGPS	http://biogps.org/	ヒトおよびマウスの遺伝子発現情報データベース。

3) ZnO 曝露細胞のマイクロアレイ解析

細胞: THP-1 細胞および A549 細胞

曝露ナノマテリアル: 酸化亜鉛 (ZnO)

曝露濃度: 300 µg/mL (THP-1 細胞) または 60 µg/mL (A549 細胞)

曝露時間: 6 時間または 24 時間

マイクロアレイ: Agilent SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60K Ver. 3.0 (G4851C; GEO platform:GPL21185) 1枚

ハイブリダイゼーション: 二色法

マイクロアレイの割り当て: 表 1

マイクロアレイスキャナー: Agilent SuresScan G2600D

画像数値化処理ソフトウェア: Agilent Feature Extraction v11.5

データ処理ソフトウェア: 自作プログラム

Gene Ontology 解析ソフトウェア: DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>)

(マイクロアレイの一色法と二色法)

マイクロアレイ解析には一色法と二色法が存在するが、この2種類では遺伝子発現を測定する根本原理が異なり遺伝子発現データの取り扱い方に影響するため、現在ではどちらが主流か把握するために、GEO データベースから特定のマイクロアレイについて登録されているデータの解析条件情報をダウンロードして、暦年ごとに一色法と二色法のサンプル数を集計した。

C. 研究結果

1) 既存データベースの調査

Integbio データベースカタログを中心に調査を行なったところ、本研究の目的に適するいくつかのデータベースが見出された(表 2)。そのうち最大のはよく知られている NCBI 運営の Gene Expression Omnibus (GEO) であり、DataSets で 4,348 件、Series で 105,964 件、

表 3 マイクロアレイ解析発現比分布 (生データ)

Sample	ZnO/ctrl 6h THP1 [B1]	ZnO/ctrl 6h THP1 [B2]	ZnO/ctrl 6h THP1 [rep.]	ZnO/ctrl 24h THP1 [B3]	ZnO/ctrl 24h THP1 [B4]	ZnO/ctrl 24h THP1 [rep.]	ZnO/ctrl 6h A549 [B5]	ZnO/ctrl 6h A549 [B6]	ZnO/ctrl 6h A549 [rep.]	ZnO/ctrl 24h A549 [B7]	ZnO/ctrl 24h A549 [B8]	ZnO/ctrl 24h A549 [rep.]
スポット数	60,901	60,901	60,901	60,901	60,901	60,901	60,901	60,901	60,901	60,901	60,901	60,901
10以上11未満				1								
9以上10未満				3	6					1		
8以上9未満				13	19	14				6	1	1
7以上8未満	6	1	2	61	78	56	9	5	5	17	3	16
6以上7未満	35	27	30	147	183	142	5	9	7	24	23	8
5以上6未満	51	69	54	313	370	293	48	26	26	63	36	43
4以上5未満	108	120	84	825	780	678	102	143	97	187	180	151
3以上4未満	373	458	279	1,735	1,633	1,406	498	468	372	572	681	464
2以上3未満	2,047	2,208	1,217	4,128	3,862	2,970	2,301	2,247	1,432	2,185	2,545	1,564
1以上2未満	27,377	28,139	23,355	19,358	19,031	15,427	28,293	28,168	24,081	27,467	29,906	24,818
-1超過1未満	1,906	2,305	1,084	4,509	4,489	3,466	2,181	2,016	1,174	2,422	2,345	1,391
-2超過-1以下	169	219	57	1,592	1,518	1,265	170	168	57	265	265	143
-3超過-2以下	17	12	4	626	635	556	9	13	6	37	25	18
-4超過-3以下				335	263	234			1	1	2	4
-5超過-4以下				148	112	103						
-6超過-5以下				66	51	46						
-7超過-6以下				42	18	20						
-8超過-7以下				8	3	2						
-9超過-8以下				2	1	1						
-10超過-9以下												
-11超過-10以下												
total	32,090	33,558	26,166	33,912	33,053	26,680	33,616	33,264	27,258	33,248	36,014	28,617
total(%)	52.69%	55.10%	42.96%	55.68%	54.27%	43.81%	55.20%	54.62%	44.76%	54.59%	59.14%	46.99%
Log2値 1	2,620	2,883	1,666	7,226	6,931	5,560	2,963	2,898	1,939	3,055	3,469	2,247
-1<Log2値<1	27,377	28,139	23,355	19,358	19,031	15,427	28,293	28,168	24,081	27,467	29,906	24,818
Log2値 -1	2,093	2,536	1,145	7,328	7,091	5,693	2,360	2,198	1,238	2,726	2,639	1,552
Log2値 1	8.16%	8.59%	6.37%	21.31%	20.97%	20.84%	8.81%	8.71%	7.11%	9.19%	9.63%	7.85%
-1<Log2値<1	85.31%	83.85%	89.26%	57.08%	57.58%	57.82%	84.17%	84.68%	88.34%	82.61%	83.04%	86.72%
Log2値 -1	6.52%	7.56%	4.38%	21.61%	21.45%	21.34%	7.02%	6.61%	4.54%	8.20%	7.33%	5.42%
中央値	-0.036	-0.049	-0.050	-0.013	-0.046	-0.036	-0.032	-0.045	-0.039	-0.052	-0.059	-0.055
算術平均	0.013	0.002	0.009	-0.002	0.012	0.007	0.017	0.011	0.018	0.007	0.010	0.012
標準偏差	0.785	0.806	0.715	1.642	1.630	1.649	0.783	0.776	0.708	0.873	0.834	0.782

Samples で 2,783,483 件の遺伝子発現データが登録されている (2018/12/14 調査時点)。今後はこの GEO のデータを主に利用することとした。また、Integbio データベースカタログには収録されていないが、化学物質の曝露と遺伝子や病気との関連をまとめたデータベースとしてノースカロライナ州立大学運営の Comparative Toxicogenomics Database (CTD) が存在し、補足的に利用可能と思われる。なお、公開されている既存データベースの中でも、全データを一括ダウンロードして再利用可能なデータベースと、検索はできるものの一部データしかダウンロードできないデータベースが存在した。後者のタイプのデータベースからウェブスクレイピングにより全データをダウンロードすることは可能かもしれないが、当該データベースのライセンス条件的に問題がないかどうか慎重な検討が必要と思われる。

2) 機械学習の実施環境

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

3) ZnO 曝露細胞のマイクロアレイ解析

発現比(生データ): 全 8 アレイおよびカラスワップ間で再現性が取れたデータの発現比の分布を表 3 に示す。THP1 細胞の 24 時間後は ZnO の影響を大きく受けていることが分かる。また、A549 細胞の 6 時間後は、他の条件よりも遺伝子発現の変動が小さいものの ZnO の影響を明らかに受けている。

階層的クラスタリングその 1: 全 8 アレイのデータのうち 8 アレイとも発現比が求まったプローブ 20,090 個の発現比データで階層的クラスタリングを行なった(図 1)。まず、それぞれのサン

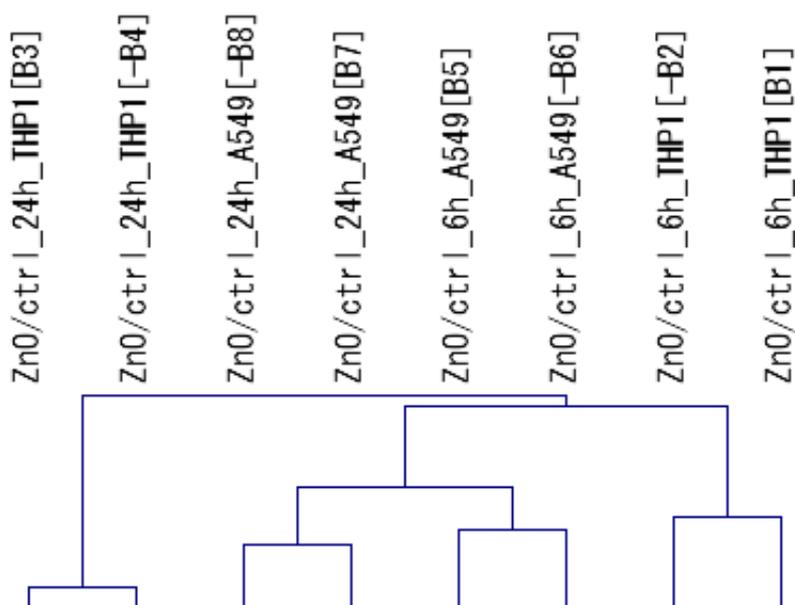


図1 階層的クラスタリング。アレイ数 8 個、プローブ数 20,090 個。

ル条件のカラーズワップ間でクラスタが形成され、マイクロアレイのサンプル条件ごとの再現性が取れていることが確認された。続いて A549 細胞の 6 時間後と 24 時間後がクラスタを形成した。THP1 細胞の 24 時間後は他とは大きく異なる発現パターンであると示されており、やはり ZnO の影響が大きいことの表れだと考えられる。

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

発現比(転写産物): 複数のプローブが 1 つの転写産物に対応する場合があるので、転写産物単位でまとめた発現比データのうち RefSeq (Reference Sequence)の分布を表 4 に示す。なお、1 つの遺伝子から複数の転写産物が転写されるケースがある(transcript variant)。この分布からも THP1 細胞の 24 時間後は ZnO の影響を強く受けていることが分かる。

Gene Ontology 解析: 転写産物単位の発現比について Gene Ontology 解析を行なった(表 5)。ZnO の影響を最も受けた THP1 細胞の 24 時間後は発現が上昇する群において GO:0006954 inflammatory response(炎症反応)の転写産物が顕著に多かった。inflammatory response は THP1 細胞の 6 時間後でも有意に多かったことから、ナノマテリアル ZnO は THP1 細胞に対して早期から影響を与えていることが分かる。一方で、A549 細胞では inflammatory response の転写物が有意に増えているとは認められなかった。また、THP1 細胞の 6 時間後では GO:0006364 rRNA processing に分類される転写産物の発現が減少しており、ZnO を曝露した初期段階で rRNA 系が障害を受けていると考えられる。ただし、THP1 細胞の 24 時間後では rRNA processing の転写物は有意に発現が減

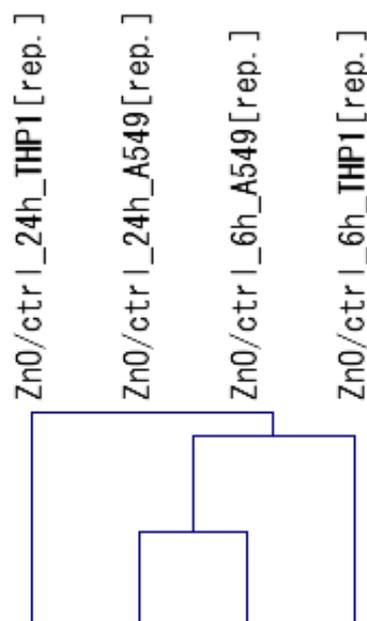


図2 階層的クラスタリング。カラーズワップ処理後、プローブ数 17,167 個

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

4) マイクロアレイの一色法と二色法

GEO データベースから Agilent ヒト遺伝子発現のマイクロアレイを一例として集計した。このマイクロアレイは数年ごとに改定バージョンが登場し、現在は V1 (4x44K フォーマット; GEO プラットフォーム番号 GPL4133, GPL6480), V2 (4x44K; GPL10332, GPL13497), V3 (8x60K; GPL20844, GPL21185)の 3 つのバージョンがある。GEO データベースはマイクロアレイ解析データのレポジトリとして最大級であり、現在ではマイクロアレイ解析の論文発表においてレポジトリへの登録が義務付けられていることが多いことから、世界におけるマイクロアレイ解析の実情を反映していると言える。各バージョンと 3 つの

バージョンの合計について一色法と二色法のサンプル数の暦年変化を図3に示す。

表4 マイクロアレイ解析発現比分布 (転写産物、RefSeqのみ)

Sample	ZnO/ctrl 6h THP1 [rep.]	ZnO/ctrl 24h THP1 [rep.]	ZnO/ctrl 6h A549 [rep.]	ZnO/ctrl 24h A549 [rep.]
転写産物数	21,033	21,033	21,033	21,033
Log2値の分布	10以上11未満			
	9以上10未満			
	8以上9未満			
	7以上8未満		11	
	6以上7未満		31	2
	5以上6未満	7	92	2
	4以上5未満	19	192	14
	3以上4未満	58	396	43
	2以上3未満	157	748	199
	1以上2未満	691	1,518	759
	-1超過-1未満	12,062	7,830	12,325
	-2超過-1以下	544	1,951	615
	-3超過-2以下	23	718	31
	-4超過-3以下	3	330	5
	-5超過-4以下		143	1
	-6超過-5以下		72	
	-7超過-6以下		34	
	-8超過-7以下		8	
	-9超過-8以下		1	
	-10超過-9以下		1	
	-11超過-10以下			
	total	13,564	14,076	13,996
total(%)	64.49%	66.92%	66.54%	69.29%
Log2値 1	932	2,988	1,019	1,091
-1<Log2値<1	12,062	7,830	12,325	12,754
Log2値 -1	570	3,258	652	728
Log2値 1	6.87%	21.23%	7.28%	7.49%
-1<Log2値<1	88.93%	55.63%	88.06%	87.52%
Log2値 -1	4.20%	23.15%	4.66%	5.00%
中央値	-0.055	-0.072	-0.046	-0.065
算術平均	0.014	-0.018	0.012	0.006
標準偏差	0.708	1.736	0.708	0.755

表5 Gene Ontology 解析結果

(a) THP1, 6h, up-regulated

Term	Count	%	PValue	List Total	Pop Hits	Fold	Bonferroni	FDR
GO:0006954 inflammatory response	56	6.25	1.97E-14	766	379	3.24	6.61E-11	3.58E-11
GO:0006986 response to unfolded protein	18	2.01	1.15E-12	766	42	9.40	3.87E-09	2.10E-09
GO:0043066 negative regulation of apoptotic process	51	5.69	7.34E-09	766	455	2.46	2.47E-05	1.34E-05
GO:0045926 negative regulation of growth	10	1.12	4.94E-08	766	19	11.54	1.66E-04	9.01E-05
GO:0042981 regulation of apoptotic process	29	3.24	4.51E-07	766	213	2.98	1.52E-03	8.22E-04
GO:0043547 positive regulation of GTPase activity	54	6.03	4.90E-07	766	565	2.10	1.65E-03	8.93E-04
GO:0071294 cellular response to zinc ion	9	1.00	8.64E-07	766	19	10.38	2.90E-03	1.58E-03
GO:0042026 protein refolding	8	0.89	1.85E-06	766	15	11.69	6.21E-03	3.37E-03
GO:0032496 response to lipopolysaccharide	23	2.57	5.44E-06	766	164	3.07	1.81E-02	9.91E-03
GO:0043491 protein kinase B signaling	10	1.12	1.16E-05	766	33	6.64	3.83E-02	2.11E-02

(b) THP1, 6h, down-regulated

Term	Count	%	PValue	List Total	Pop Hits	Fold	Bonferroni	FDR
GO:0006364 rRNA processing	41	7.44	8.56E-22	475	214	6.77	1.69E-18	1.47E-18
GO:0000462 maturation of SSU-rRNA from tricistronic rRNA transcript (SSU-rRNA, 5.8S rRNA,	9	1.63	2.20E-06	475	32	9.94	4.34E-03	3.78E-03
GO:0042273 ribosomal large subunit biogenesis	7	1.27	5.50E-05	475	25	9.90	1.03E-01	9.43E-02

表 5 Gene Ontology 解析結果 (続き)

(c) THP1, 24h, up-regulated

Term	Count	%	PValue	List Total	Pop Hits	Fold	Bonferroni	FDR
GO:0006954 inflammatory response	120	4.24	3.21E-17	2462	379	2.16	1.90E-13	6.22E-14
GO:0060333 interferon-gamma-mediated signaling pathway	34	1.20	1.50E-10	2462	71	3.27	8.87E-07	2.90E-07
GO:0006955 immune response	108	3.82	3.28E-09	2462	421	1.75	1.94E-05	6.35E-06
GO:0060337 type I interferon signaling pathway	30	1.06	4.03E-09	2462	64	3.20	2.39E-05	7.80E-06
GO:0032496 response to lipopolysaccharide	53	1.87	2.24E-08	2462	164	2.20	1.33E-04	4.34E-05
GO:0045087 innate immune response	105	3.71	8.53E-08	2462	430	1.67	5.05E-04	1.65E-04
GO:0071222 cellular response to lipopolysaccharide	40	1.41	1.03E-07	2462	113	2.41	6.09E-04	1.99E-04
GO:0045766 positive regulation of angiogenesis	40	1.41	1.75E-07	2462	115	2.37	1.04E-03	3.39E-04
GO:0043547 positive regulation of GTPase activity	127	4.49	5.02E-07	2462	565	1.53	2.97E-03	9.72E-04
GO:0030168 platelet activation	39	1.38	5.30E-07	2462	115	2.31	3.14E-03	1.03E-03

(d) THP1, 24h, down-regulated

Term	Count	%	PValue	List Total	Pop Hits	Fold	Bonferroni	FDR
GO:0070125 mitochondrial translational elongation	43	1.41	5.89E-13	2673	85	3.18	3.45E-09	1.14E-09
GO:0070126 mitochondrial translational termination	42	1.38	4.92E-12	2673	86	3.07	2.88E-08	9.52E-09
GO:0055114 oxidation-reduction process	146	4.78	2.65E-08	2673	592	1.55	1.55E-04	5.12E-05
GO:0006364 rRNA processing	64	2.10	4.11E-07	2673	214	1.88	2.40E-03	7.95E-04
GO:0042384 cilium assembly	42	1.38	1.72E-06	2673	124	2.13	1.00E-02	3.33E-03
GO:0030705 cytoskeleton-dependent intracellular transport	11	0.36	1.30E-04	2673	18	3.84	5.33E-01	2.51E-01
GO:0043434 response to peptide hormone	18	0.59	2.31E-04	2673	44	2.57	7.42E-01	4.47E-01
GO:0060070 canonical Wnt signaling pathway	27	0.88	3.43E-04	2673	83	2.04	8.65E-01	6.61E-01

(e) A549, 6h, up-regulated

Term	Count	%	PValue	List Total	Pop Hits	Fold	Bonferroni	FDR
GO:0006986 response to unfolded protein	16	1.64	7.92E-10	844	42	7.58	2.60E-06	1.44E-06
GO:0000122 negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	74	7.59	7.16E-09	844	720	2.04	2.35E-05	1.30E-05
GO:0045944 positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	84	8.62	1.78E-06	844	981	1.70	5.82E-03	3.23E-03
GO:0045892 negative regulation of transcription, DNA-templated	50	5.13	5.55E-06	844	499	1.99	1.81E-02	1.01E-02
GO:0007264 small GTPase mediated signal	30	3.08	1.74E-05	844	246	2.43	5.55E-02	3.16E-02
GO:0035914 skeletal muscle cell differentiation	12	1.23	2.41E-05	844	49	4.87	7.61E-02	4.38E-02
GO:0043065 positive regulation of apoptotic process	33	3.38	4.89E-05	844	300	2.19	1.48E-01	8.89E-02
GO:0045444 fat cell differentiation	14	1.44	6.16E-05	844	73	3.82	1.83E-01	1.12E-01
GO:0006351 transcription, DNA-templated	134	13.74	1.37E-04	844	1955	1.36	3.62E-01	2.48E-01
GO:0045599 negative regulation of fat cell differentiation	10	1.03	1.94E-04	844	42	4.74	4.71E-01	3.52E-01

(f) A549, 6h, down-regulated

Term	Count	%	PValue	List Total	Pop Hits	Fold	Bonferroni	FDR
GO:0051301 cell division	41	6.51	7.65E-12	556	350	3.54	1.74E-08	1.33E-08
GO:0007067 mitotic nuclear division	34	5.40	9.14E-12	556	248	4.14	2.08E-08	1.60E-08
GO:0006334 nucleosome assembly	19	3.02	7.01E-08	556	119	4.82	1.59E-04	1.22E-04
GO:0000070 mitotic sister chromatid segregation	9	1.43	8.91E-07	556	25	10.87	2.02E-03	1.55E-03
GO:0007062 sister chromatid cohesion	16	2.54	1.42E-06	556	103	4.69	3.22E-03	2.47E-03
GO:0000183 chromatin silencing at rDNA	10	1.59	2.40E-06	556	37	8.16	5.43E-03	4.19E-03
GO:0006260 DNA replication	19	3.02	3.76E-06	556	155	3.70	8.51E-03	6.56E-03
GO:0006335 DNA replication-dependent nucleosome assembly	9	1.43	7.06E-06	556	32	8.49	1.59E-02	1.23E-02
GO:0007059 chromosome segregation	12	1.90	1.29E-05	556	68	5.33	2.89E-02	2.26E-02
GO:0032200 telomere organization	8	1.27	2.07E-05	556	27	8.95	4.59E-02	3.61E-02

(g) A549, 24h, up-regulated

Term	Count	%	PValue	List Total	Pop Hits	Fold	Bonferroni	FDR
GO:0043065 positive regulation of apoptotic process	38	3.59	1.05E-06	878	300	2.42	3.37E-03	1.91E-03
GO:0000122 negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	67	6.33	5.74E-06	878	720	1.78	1.82E-02	1.04E-02
GO:0030308 negative regulation of cell growth	20	1.89	1.60E-05	878	121	3.16	4.99E-02	2.90E-02
GO:0006986 response to unfolded protein	11	1.04	4.58E-05	878	42	5.01	1.37E-01	8.31E-02
GO:0006351 transcription, DNA-templated	139	13.14	1.16E-04	878	1955	1.36	3.09E-01	2.09E-01
GO:0035914 skeletal muscle cell differentiation	11	1.04	1.84E-04	878	49	4.29	4.45E-01	3.33E-01
GO:0006954 inflammatory response	38	3.59	1.92E-04	878	379	1.92	4.60E-01	3.49E-01
GO:0001666 response to hypoxia	22	2.08	2.55E-04	878	172	2.45	5.58E-01	4.61E-01
GO:0045926 negative regulation of growth	7	0.66	3.01E-04	878	19	7.05	6.19E-01	5.44E-01
GO:0071294 cellular response to zinc ion	7	0.66	3.01E-04	878	19	7.05	6.19E-01	5.44E-01

(h) A549, 24h, down-regulated

Term	Count	%	PValue	List Total	Pop Hits	Fold	Bonferroni	FDR
GO:0001525 angiogenesis	23	3.32	1.93E-05	606	223	2.86	5.57E-02	3.47E-02

このグラフから 2009 年までは二色法が主流であり、それからわずか 2 年後の 2011 年には二色法に替わって一色法が主流となっている。これはマイクロアレイ解析のサンプル数が増える中で効率の良い一色法の方が好まれるためだと思われる。また、後継バージョンである V2 や V3 では 80%程度は一色法で利用されており、二色法ではあまり使われていないことが分かる。一方で初期バージョンの V1 は二色法での利用割合がここ 8 年間ほどは 40%程度を維持している。また、一色法について見てみると、V1 から V2 や V3 への乗り換えが進んでいることが分かる。

D. 考察

既存の生命科学系データベースは多種多様であったが、本研究に最も適しているのはマイクロアレイ解析の生データが登録されている GEO データベースであると考えられる。補足的に CTD データベースが利用可能と思われる。これらのデータを利用して機械学習を行なう場合に一番の問題になると思われることは、サンプル条件などのラベル付けである。人間が手動でラベルを付けるのは困難なため、データのメタ情報からうまくラベルを生成する方法を検討する必要がある。また、Gene Ontology 解析の結果をラベルとして利用することも検討する価値があると思われる。

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

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

たい。

マイクロアレイ解析のデータの扱いにおいて一色法と二色法の違いは重要である。測定原理として一色法はマイクロアレイ上のプローブ量が一定であることを前提としており、製造上の誤差が小さい必要がある。一方で二色法は製造上の誤差があっても問題ない方法であり、2 種類のサンプルを異なる蛍光色素で標識し競合ハイブリダイゼーションを行なうことで発現比を測定する。このように原理が異なるため、一色法と二色法のデータは相互に直接比較することはできない。今後も一色法が主流であると見込まれるが、二色法のデータも有効活用するためには一色法のデータと比較できるようにデータ変換を行わなければならない。同一サンプルを一色法と二色法でマイクロアレイ解析したデータを基に適切なデータ変換法を検討していきたい。

以上を踏まえて、次年度は GEO データベースから利用可能なデータを抽出・整理した上で、機械学習を実施する。GEO データベースからの抽出にあたって解決すべき主な研究課題は、①サンプル情報をどのように解釈し分類するか、②一色法と二色法のデータ変換、③異なるマイクロアレイプラットフォーム間のデータ変換、が挙げられる。また、機械学習の実行にあたっては、①入力する特徴量の削減、②機械学習アルゴリズムの選択と最適化、が検討すべき課題となる。なお、マイクロアレイ解析の実測データも増やしていく予定である。

E. 結論

本年度は、ナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築方法の検討のため利用可能な既存の生命科学系データベースを調査し、今後構築するデータベースの元データに利用すべきものとして NCBI 運営の GEO データベースやノースカロライナ州立大学運営の CTD データベースを含む複数のデータベースを選択した。また、生体影響予測の基盤となる機械学習を実施するコンピュータ環境とし

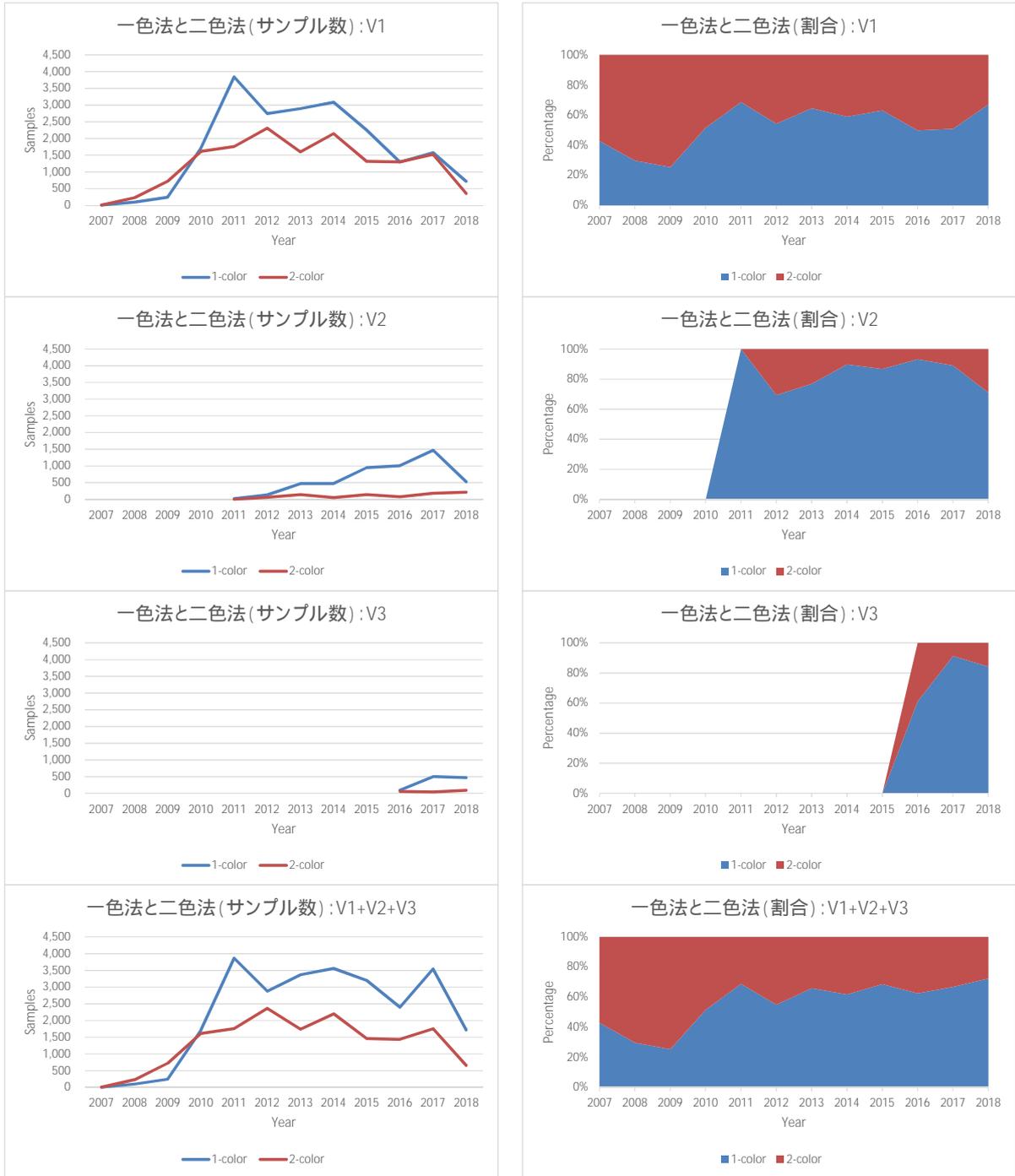


図3 Agilent ヒト遺伝子発現マイクロアレイの GEO データベースにおける一色法と二色法の遷移

て Google の Keras / Tensor Flow を中心にセットアップを行ない、その動作確認を行なった。ナノマテリアルとして ZnO を曝露した細胞の遺伝子発現マイクロアレイ解析を実施して、機械学習で利用する実測データを取得した。この実測データについて階層的クラスタリングや Gene Ontology 解析などの検討を加えた。さらには、マイクロアレイ解析における一色法と二色法の利用現状について調査し、測定原理の違いによるデータ変換について考察した。

F. 研究発表

本年度はなし

G. 知的所有権の出願・登録状況

本年度はなし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 30 年度分担研究報告書

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
in silico 評価系に関する研究

分担研究者：大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官
研究協力者：広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長

研究要旨：化学物質の中でも極めて特殊な性状を有するナノマテリアルは、生産現場のほか家庭用品などへの利用が拡大しており、ヒトへの健康影響の評価が重大な課題となっている。ナノマテリアルの有害性については、物理化学的特性や表面修飾により有害性が異なることが知られており、物理化学的性状と有害性情報を関連付けるような評価が必要となる。国内において、こうした評価を行うための情報整理が未だされていないのが現状である。一方、海外では、EU US がナノマテリアルの規制への枠組みを進めており、さらに経済協力開発機構（以下、「OECD」と記載）でナノマテリアルの規制に向け代表的なナノマテリアルについての特有の物理化学的性状と有害性情報等を収載した報告書（dossier：有害性評価書）が公開されている。本研究では、ナノマテリアルの生体への健康影響に対する安全性評価に向けた、*in vitro* / *in vivo* の自験データおよび文献などのデータによるナノマテリアルの安全性評価のデータの集積とデータベースの構築を目的として、ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データ項目および QSAR/Read-across 解析に向けた有用なナノマテリアルの安全評価に関する情報の項目について探索・精査する。

今年度は、二酸化チタンナノ粒子（TiO₂ NPs）について、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムにおいて作成され評価文書等に収載された物理化学的性状情報と有害性情報について収集・整理し、解析に資するデータの資料作成（データマイニング）を行った。さらに収集・整理した物理化学的性状データと有害性データとの関連性について解析を実施した。その結果、データ解析の基礎となる物性値ならびに有害性情報の広域かつ高精度なデータの収集と、データマイニングのためのリソースの選択が非常に重要であった。また、物理化学的性状データと有害性データについて関連性を見出すための解析手法として多変量解析法がナノマテリアルの安全性評価に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、ナノマテリアルを用いた材料は、一般消費者に向け幅広く利用されており、日焼け止め製品としての化粧品や、塗料・抗菌雑貨など家庭用品の他、電子材料などの産業分野においても、今後、新素材として更なる応

用が期待されている。産業用ナノマテリアルのナノ粒子は、粒径サイズが 1 - 100 nm とされ、それよりも大きな粒径のものは微粒子に分類されている。一方、ナノマテリアルは物理化学的特性が従来の粒子と異なることから、既存の毒性試験法が適応可能かどうか問

題となってきた。従って、ヒト健康影響への可能性が指摘されており、ナノマテリアルの安全性に対する懸念は年々高まってきている。欧州連合では、ナノ材料の安全性のデータの届出・登録の義務化への整備が進められており、国内においては、カーボンナノチューブ等で形状やサイズによって毒性が異なる可能性が示唆されている。二酸化チタン(TiO_2)は、代表的な金属酸化物粒子である。一般的には TiO_2 の微粒子は毒性が低いとされているが、二酸化チタンナノ粒子(TiO_2 NPs)は微粒子のものに比べ、サイズが小さいことや表面積が大きく、酸素反応活性化能が高く強い光触媒作用を有するため、ヒトへの暴露による健康影響の評価が重要な課題となっている。こうしたナノ物質の持つ特性から、その有害性が他の化学物質とは異なることが指摘されており、ナノ物質の健康影響を評価するためには物理化学的性状と有害性情報を関連付けた評価が必要となる。しかし、現状ではこうした評価を行うための情報が整理されていない。近年、OECDのナノマテリアル安全性評価プログラムの代表的なナノマテリアルについて、ナノマテリアル特有の物理化学的性状情報と有害性情報を掲載した dossier(ドシエ：安全性データ集)試験データの報告書が公開されている。

本研究では、ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データ項目および QSAR/Read-across 解析に向けた有用なナノマテリアルの安全評価に関する情報の項目について探索・精査する。今年度は、二酸化チタンナノ粒子(TiO_2 NPs)について、OECDのナノマテリアル安全性評価プログラムにおいて作成され評価文書等に掲載された物理化学的性状情報と有害性情報について収集・整理し、解析に資するデータの資料作成を行った。さらに収集・整理した物理化学的性状データと有害性データとの関連性について解析を実施した。

B. 研究方法

1. 対象物質

OECD ウェブサイト上の Titanium dioxide (NM100-NM105) - Manufactured nanomaterial¹にて公表された Summary dossier と dossier² に掲載されている二酸化チタンナノ粒子(TiO_2 NPs :NM-100、NM-101、NM-102、NM-103、NM-104、NM-105 (P25)) を本研究での収集・整理の対象物質とした (Table 1)。

2. 調査対象情報源

以下の情報源を調査・収集対象情報源とした。

(1) OECD 関連資料

Summary dossier と関連する個別 dossier、ANNEX の情報を収集した (Table 2)。

(2) その他の関連資料

- 物理化学的性状の情報の情報源として
 - Case study on grouping and read-across for nanomaterials –Genotoxicity of nano- TiO_2 (以下、Case study report)
- *in vitro* 細胞毒性試験の情報源として
 - eNanoMapper データベース³

(3) 文献情報⁴⁻⁴⁷

(1)、(2) に掲載された情報のうち原著文献の収集を行い、文献に記載された情報について収集・整理を実施した。

3. 情報整理の対象として

以下の物理化学的性状、有害性情報を情報整理の対象とした。

(1) 物理化学的性状

凝集、結晶子サイズ、比表面積、ゼータ電位、表面化学、酸化還元電位、その他のプロパティとして 168 項目を収集・整理を行った (Table 3)。

(2) 有害性情報

➤ 吸入曝露または気管内投与試験

反復投与試験が 14 試験、2 つの発がん性試験を含む反復投与以外の 9 試験の毒性試験データを収集した。これらの試験種類、動物種、試験条件、BAL 細胞数の増加、炎症、生化学値等の約 170 項目の Endpoint について調査し、LOEL 値等について収集・整理を行った。

➤ *in vitro* 細胞毒性試験（遺伝毒性試験を除く）

試験種類、細胞種、試験条件、曝露量（時間）、EC₅₀ 等を収集・整理した。

なお、eNanoMapper データベースについては、以下の 4 種類の試験についてデータの収集対象とした。

- LDH release assay
- Cell viability assay (MST-1, MST-8)
- MTT assay
- その他の細胞毒性試験

3. 情報整理及びデータシートの作成

収集した情報について MS-Excel のデータシートにて作成した。有害性情報に関しては、今後、HESS DB(「有害性評価支援システム統合プラットフォーム (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform、通称：HESS) :ラットを対象とした化学物質の反復投与毒性試験データ及び毒性にかかわる作用機序情報などを集積した毒性知識情報データベース」)に搭載できるように形式を整理し作成した。

4. 多変量解析法

収集したデータについて多変量解析ソフトウェア SIMCA15 (Umetrix 社製) で以下の解析を実施した。これらの解析を行うことにより変動に寄与している物理化学的性状について同定した。

➤ 物理化学的性状に基づくクラスタリ

ング解析法の実施

- 収集したデータに基づく物理化学的性状情報と吸入毒試験情報との関連性についての主成分分析法 (PCA : principal component analysis) の実施

C. 研究結果

(1) 物理化学的性状

データマイニング

物理化学的性状データシートについては解析を実施するため、以下についてデータマイニングを実施した (Table 3)。Table3 は主に OECD からの情報に基づいて作成しており、それ以外のデータは Case study report の情報から得た。その結果、168 項目のデータを収集した。

- Crystalline type : Anatase 型と Rutile 型を 1 および 0 と表記し、別々の項目に分けて記載した。
- Composition : impurity の各項目について、単位の表記が ppm、%、wt%であったため %w/w に換算し統一した (O と Ti は wt% と表記)。
- Dustiness : 桁数が 3 桁以上であったため Log10 に換算した。

階層的クラスタリング解析

Table3 に示されているデータマイニング後の物理化学的性状のエクセルシートについて階層的クラスタリング解析を示す (Figure 1)。その結果、全 6 物質の TiO₂ NPs の 168 項目についてクラスター化させた類似性を示した (Figure 1)。さらに PCA 解析の実施をしたスコアプロットの結果より、5 物質の TiO₂ NPs 間の変動について第一主成分 (PC1) および第二主成分 (PC2) によって特徴づけられた。PC1 のプラスの方向は NM100 に、マイナスの方向には NM101 および NM102 が分布し、PC2 はプラスの方向に

のみ NM105、NM103 および NM104 が分布し、それぞれを特徴づけることができた (Figure 2)。PC1 および PC2 の各主成分に対する物理化学的性状の項目について解析を行った結果、PC1 のプラス方向においては、Dustiness での Inhalable Mass Dustiness index (mg/kg)、Agglomeration/aggregation での 1 min sonifier/DMEM + 1% or 5% FBS の Zeta Potential (mV)、Anatase 型の Crystal size (nm) や Primary particle diameter (nm)、等の項目が特徴づけられ、PC1 のマイナス方向には、Agglomeration/aggregation での 20 min US-bath/DMEM + 5% or 10% FBS の Z-Average (d. nm)、等の項目が特徴づけられた。一方、PC2 のプラス方向においては、Crystal type の Rutile 型や、Agglomeration/aggregation での untreated/MQ Water の Z-Average (d.nm) や PdI、等の項目が特徴づけられた。

NM103、NM104、NM105：反復投与吸入毒性試験の結果および解析

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

(1) 吸入毒性試験結果

Wistar 雌雄ラットに各種 TiO₂ ナノ粒子 (NM103: 粒径: 20nm、Mass median aerodynamic diameter (MMAD) (μm): 0.62-1.17、surface area (m²/g): 60、NM104: 粒径: 20nm、MMAD (μm): 1.00-1.57、surface area (m²/g): 60、NM105: 粒径: 22nm、MMAD (μm): 0.59-0.87、surface area (m²/g): 61) を含むエアロゾルを 0、3、12 及び 48 mg/m³ の濃度で、28 日間 (6 時間/日、5 日/週) 吸入曝露した。これらの試験では、肺間質の細胞浸潤・繊維化が認められ、気管支肺胞洗浄液 (BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid) 中の総細胞数、

多形核白血球 (PMN: polymorphonuclear leukocytes) 数、マクロファージ数、総蛋白、酵素活性 (LDH, ALP, γ-GTP (GGT) 等)、マクロファージの粒子の蓄積性 (Accumulation of particle-laden macrophages) の増加が認められたので、これらの Endpoint を中心に解析した。

(2) 多変量解析

Endpoint として毒性影響が明らかな総細胞数 (LOEL 値: NM103(12 mg/m³)、NM104(12 mg/m³)、NM105(48 mg/m³))、多形核白血球数 (LOEL 値: NM103(48 mg/m³)、NM104(12 mg/m³)、NM105(48 mg/m³) について、原典⁴⁸ に戻り細胞数から推定される対照群から高用量群で増加する細胞数の約 20% 付近 (0 mg/m³ を control とした Total cell numbers : 3 倍、PMN : 100 倍付近の値) の曝露濃度をベンチマークドーズ (BMD: benchmark dose) として曝露濃度を再算出した。その結果、毒性の強さは NM104 > NM103 > NM105 であった。物性値と関連づけるため各 NPs の BMD を用いて PCA 解析を実施した結果、最も強い毒性を示した NM104 は、Specific surface area (m²/g) の SAXS surface (m²/g): 空孔、および BET surface (m²/g): 比表面積等が寄与している事が示唆された。次に毒性が強かった NM103 は、Dustiness (粒子の巻き上がり性) での Number Dustiness index (1/mg): 全体量に対する巻き上がり粒子数、Porosity: 多孔性等が主に寄与している事が示唆された。最も毒性の低かった NM105 は、Mass median aerodynamic diameter (MMAD) (μm): 半径順に並べて質量の和が全体の半分になるところの直径: 値が大きいと沈着しにくい性質を示す) Composition での impurity で Ti が主に寄与している事が示唆された。

P25: 単一濃度の反復投与吸入毒性試験

異なる粒子径を有する二酸化チタン P25

による影響を比較した単一濃度の反復投与吸入毒性試験は、二箇所の機関(University of Rochester と BASF)で実施された 6 試験 (University of Rochester : 5 試験、BASF : 1 試験)より得た。F344 雌雄ラットに P25 の TiO₂ ナノ粒子(粒径 : 20-30nm、MMAD (μm) : 0.71-1.70、surface area (m²/g) : University of Rochester: 50、BASF: 48.6)および対照物質として NM105(P25)の TiO₂ 微粒子(粒径 : 200-250 nm、MMAD (μm) : 0.74-1.9、surface area (m²/g) : University of Rochester: 6.5、BASF: 6)を含むエアロゾルを単一濃度 [University of Rochester: 23.5(mg/m³)、BASF: 100(mg/m³)] で、6 時間/日、10 日間(University of Rochester: 1 試験)または、12 週間 (University of Rochester: 4 試験) 5 日間 (BASF: 1 試験) 吸入曝露した。これらの亜急性試験の結果、TiO₂ 微粒子ではいずれの試験期間においても毒性を示す所見は認められなかった。一方、TiO₂ NPs を曝露した群では、試験毎による多少の違いはあるが肺間質の細胞浸潤・繊維化が認められ、BALF 中の総細胞数、多形核白血球数、マクロファージ数、総蛋白、酵素活性 (LDH, ALP, γ-GTP (GGT), N-acetyl-β-glucosaminidase (NAG), and/or β-glucuronidase)の増加が認められた。これらの試験結果から、TiO₂ NPs にのみ毒性が認められた。但し、対象とした TiO₂ 微粒子についての物理化学的性状のデータが揃っていないため、解析には至らなかった。

in vitro 細胞毒性試験

OECD の In vitro 細胞毒性結果の収集データ(NM102 を除く 5 物質の TiO₂ NPs)では、いずれの試験データからも EC₅₀ は算出されず、細胞毒性は認められなかった。一方、eNanoMapper データベースからの収集データ ((NM100 を除く 5 物質の TiO₂ NPs)の細胞毒性試験結果について、曝露 (時間)、アッセイ法、細胞種および EC₅₀ (ug/mL) の項

目について収集し Table 4 に示した。尚、細胞毒性の同一条件のアッセイ (曝露時間、アッセイ法、細胞種) は、4 つの組み合わせ (NO.1*、NO.3*、NO.5*、NO.6*) だった。

さらに、eNanoMapper データベースにおいて NM103 のみ EC₅₀ (ug/mL) > 100 が記載されていた (Table 5)。Table 5 に示されるように、曝露 (時間) と細胞アッセイ法および細胞腫において同一条件を満たすものはなかった。

D. 考察

本研究では、TiO₂ ナノ粒子に着目し、OECD 関連資料 (Table 2) およびその他の関連資料 (Case study report、eNanoMapper データベース)を調査・収集対象の情報源として、物理化学的性状情報および有害性情報(反復投与毒性 : 吸入曝露および気管内投与試験、遺伝毒性情報を除く *in vitro* 細胞毒性)を収集した。

TiO₂ NPs (NM100-NM105)の物理化学的性状の全データから階層的クラスタリング解析を実施した結果、クラスタ化による類似性を示すことが出来た (Figure 1)。さらに PCA 解析の実施をしたスコアプロットの結果より、5 物質の TiO₂ NPs 間の変動について第一主成分 (PC1) および第二主成分 (PC2) によって特徴づけることが出来た (Figure 2)。PC1 では、Crystal type の Anatase 型の Crystal size (nm) や Primary particle diameter (nm) の物理化学的性状の項目が特徴づけられ、PC2 は Crystal type の Rutile 型や不純物として多く含まれている元素等が特徴付けられた。

反復投与吸入毒性試験の結果から、肺の所見として毒性影響が明らかに認められた Endpoint について BMD による曝露濃度を再算出し、3 物質間の毒性の強さは NM104>NM103>NM105 となった。肺の所見の結果より、肺間質への細胞浸潤・繊維化および粒子を含むマクロファージの蓄積が認

められ、肺の炎症反応を引き起こしたことから、粒径の小さな粒子は、間質へ移行しやすく、マクロファージが粒子を貪食していたことが示唆された。さらに、物理化学的性状と毒性と関連性について PCA 解析を実施し、解析した結果、NM104 の毒性の強さを特徴づける物理化学的性状は、空孔が大きく、かつ比表面積が大きいことで生体への吸着能が高くなり、さらに、MMAD の値が小さいことで生体へ沈着率が高まることが示唆された。一方、NM103 は粒子の巻き上がりの値は高いものの、NM104 に比べて比表面積の値が小さいことから生体への吸着能が NM104 に比べて弱くなり、この物理化学的性状が毒性の強さへ影響したと推察された。

P25 の TiO₂ ナノ粒子および TiO₂ 微粒子の単用量の吸入曝露試験の結果から、TiO₂ 微粒子は、いずれの試験結果においても毒性所見は認められなかった。しかし、TiO₂ ナノ粒子を曝露した群は肺間質への細胞浸潤・繊維化が認められ、肺の炎症反応を引き起こしたことから、粒径の小さな粒子は、間質へ移行しやすく、マクロファージが粒子を貪食していたことが示唆された。今回、P25 単用量の反復投与毒性試験(吸入試験)の収集データから、TiO₂ のナノ粒子の対象物質となる TiO₂ 微粒子の物理化学的性状の情報が少なかったため、物理化学的性状と毒性を関連付ける解析に至らなかった。解析を実施するためには両者の同様な物理化学的性状の項目の測定値が必要となるため、今後の収集課題の一つと考えられた。

in vitro 細胞毒性の情報収集の結果で OECD の dossier からの NM102 を除く 5 物質の TiO₂ NPs の収集データでは、顕著な毒性を示す結果は認められなかったが、eNanoMapper データベースからの NM100 を除く 5 物質の TiO₂ NPs の収集データでは Table 4 に示されるように 9 つの細胞毒性試験において毒性を有する結果(EC₅₀)を得た。

細胞種は異なるが 24 h のアッセイ結果から、各々の NPs との毒性の強さの傾向として NM104 (EC₅₀: 151.2 ug/mL) が最も強かった。しかし、NM102 の 24 h の同一アッセイ法 (WST-1) の結果より、用いた細胞種の違いが毒性の強さ (EC₅₀) に大きく影響することが示唆された。また、NM103 および NM104 の 2 物質の TiO₂ NPs の長期試験 (10 日) で細胞毒性を示した結果より、これら 2 物質は、細胞に入り留まりやすい物理化学的性状を有する可能性が示唆された。Table 4 および Table 5 で示されるように、同一アッセイ条件 (曝露時間、アッセイ法、細胞種) の組み合わせにおいて、統一されたデータ条件がなく、さらに、NM100-NM105(P25) の TiO₂ NPs で横断的に細胞毒性評価の試験データが揃っていないことから、物質間の細胞毒性を比較解析に資する十分なデータがなく、また、アッセイ法や細胞種の違いにより毒性の結果が異なることから、今後、体系的な実験的データの収集が必要であると考えられた。

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

E. 結論

本研究のナノマテリアルの安全性評価において、多変量解析法は物理化学的性状と有害性の関連性について有用な解析手法であ

ることが示唆された。また多変量解析を実施するためにはデータ解析の基礎となる物性値ならびに有害性情報の広域かつ高精度なデータの収集と、データマイニングのためのリソースの選択が非常に重要であった。今後、ナノ粒子の健康影響のさらなる解明に繋がっていくために、さらに収集データ数を増やし、より複雑なデータに対し解析を実施することが必要である。

F. 引用文献

1. <http://www.oecd.org/env/ehs/nanosafety/titanium-dioxide-nm100-nm105-manufactured-nanomaterial.htm>
2. TITANIUM DIOXIDE: SUMMARY OF THE DOSSIER Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 73
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2016\)25&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2016)25&doclanguage=en)
3. <https://search.data.enanmapper.net/enm/index.html?search>
4. Ferin, J., Oberdörster, G., Soderholm, S. C., and Gelein, R., Pulmonary Tissue Access of Ultrafine Particles., *Journal of Aerosol Medicine*, 4(1), 57-68. 1991.
5. van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R., Fabian, E., Burkhardt, S., Strauss, V., and Ma-Hock, L., Comparing fate and effects of three particles of different surface properties: Nano-TiO₂, pigmentary TiO₂ and quartz., *Toxicology Letters*, 186(3), 152-159. 2009.
6. Ma-Hock, L., Burkhardt, S., Strauss, V., Gamer, A. O., Wiench, K., van Ravenzwaay, B., and Landsiedel, R., Development of a short-term inhalation test in the rat using nano-titanium dioxide as a model substance., *Inhalation Toxicology*, 21(2), 102-118. 2009.
7. Creutzenberg, O., Pohlmann, G., Hansen, T., Rittinghausen, S., Taugner, F., Ziemann, C. Nano- and microscaled titanium dioxide: Comparative study on the inflammatory and genotoxic effects after a 3-week inhalation in rats., *Toxicology Letters*, 189: S182. 2009.
8. Eydner M, Schaudien D, Creutzenberg O, Ernst H, Hansen T, Baumgärtner W, Rittinghausen, S., Impacts after inhalation of nano- and fine-sized titanium dioxide particles: morphological changes, translocation within the rat lung, and evaluation of particle deposition using the relative deposition index., *Inhalation Toxicology*, 24 (9):557-69. 2012.
9. Creutzenberg O, Bellmann B, Korolewicz R, Koch W, Mangelsdorf I, Tillmann T, Schaudien, D., Change in agglomeration status and toxicokinetic fate of various nanoparticles *in vivo* following lung exposure in rats., *Inhalation Toxicology*, 24: 821-830. 2012.
10. Ferin, J., Oberdörster, G., and Penney, D. P., Pulmonary Retention of Ultrafine and Fine Particles in Rats., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 6(5), 535-542. 1992.
11. Oberdörster, G., Ferin, J., and Lehnert, B. E., Correlation Between Particle-Size, In-Vivo Particle Persistence, and Lung Injury., *Environmental Health Perspectives*, 102, 173-179. 1994.
12. "Oberdörster, G., Ferin, J., Soderholm, S., Gelein, R., Cox, C., Baggs, R., and Morrow, P. E., "Increased Pulmonary Toxicity of Inhaled Ultrafine Particles: Due to Lung Overload Alone? *Ann Occup Hyg* 38(inhaled_particles_VII), 295-302. 1994.
13. Baggs, R. B., Ferin, J., and Oberdörster, G. Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats., *Veterinary Pathology*, 34(6), 592-597. 1997
14. Bermudez, E., Mangum, J. B., Wong, B. A.,

- Asgharian, B., Hext, P. M., Warheit, D. B., and Everitt, J. I., Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles., *Toxicol. Sci.*, 77(2), 347-357. 2004.
15. Muhle, H., Creutzenberg, O., Bellmann, B., Heinrich, U., and Mermelstein, R., Dust Overloading of Lungs - Investigations of Various Materials, Species-Differences, and Irreversibility of Effects., *Journal of Aerosol Medicine*, 3, S111- S128.1990.
16. Creutzenberg O, Biological interactions and toxicity of nanomaterials in the respiratory tract and various approaches of aerosol generation for toxicity testing., *Archives of Toxicology*, 86: 1117-1122. 2012.
17. Heinrich, U., Fuhst, R., Rittinghausen, S., Creutzenberg, O., Bellmann, B., Koch, W., and Levsen, K., Chronic Inhalation Exposure of Wistar Rats and 2 Different Strains of Mice to Diesel-Engine Exhaust, Carbon-Black, and Titanium-Dioxide., *Inhalation Toxicology*, 7(4), 533-556. 1995.
18. Pott, F., and Roller, M., Carcinogenicity study with nineteen granular dusts in rats., *European Journal of Oncology*, 10(4), 249-281. 2005.
19. Scuri, M., Chen, B. T., Castranova, V., Reynolds, J. S., Johnson, V. J., Samsell, L., Walton, C., and Piedimonte, G., Effects of Titanium Dioxide Nanoparticle Exposure on Neuroimmune Responses in Rat Airways., *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 73(20), 1353-1369. 2010.
20. Park, E. J., Yoon, J., Choi, K., Yi, J., and Park, K., Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation., *Toxicology*, 260(1-3), 37-46. 2009.
21. Gustafsson, A., Lindstedt, E., Elfsmark, L. S., and Bucht, A., Lung exposure of titanium dioxide nanoparticles induces innate immune activation and long-lasting lymphocyte response in the Dark Agouti rat., *Journal of Immunotoxicology*, 8(2), 111-121. 2011.
22. Nurkiewicz, T. R., Porter, D. W., Hubbs, A. F., Cumpston, J. L., Chen, B. T., Frazer, D. G., and Castranova, V., Nanoparticle inhalation augments particle-dependent systemic microvascular dysfunction., *Particle and Fibre Toxicology*, 5, 1-12. 2008.
23. Nurkiewicz, T. R., Porter, D. W., Hubbs, A. F., Stone, S., Chen, B. T., Frazer, D. G., Boegehold, M. A., and Castranova, V., Pulmonary nanoparticle exposure disrupts systemic microvascular nitric oxide signaling., *Toxicol. Sci.*, 110(1), 191-203. 2009.
24. LeBlanc, A. J., Cumpston, J. L., Chen, B. T., Frazer, D., Castranova, V., and Nurkiewicz, T. R., Nanoparticle Inhalation Impairs Endothelium-Dependent Vasodilation in Subepicardial Arterioles., *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*, 72(24), 1576-1584. 2009.
25. LeBlanc, A. J., Moseley A. M., Chen B. T., Frazer D., Castranova V., and Nurkiewicz T. R., Nanoparticle Inhalation Impairs Coronary Microvascular Reactivity via a Local Reactive Oxygen Species-Dependent Mechanism., *Cardiovasc Toxicol.*, 10:27–36. 2010.
26. Farcas L, Torres Andón F, Di Cristo L, Rotoli BM, Bussolati O, Bergamaschi E, et al., Comprehensive In Vitro Toxicity Testing of a Panel of Representative Oxide Nanomaterials, *PLoS ONE*, 10(5):

- e0127174. 2015
27. Gerloff, K., Albrecht, C., Boots, A.W., Förster, I., and Schins, R.P.F., Cytotoxicity and oxidative DNA damage by nanoparticles in human intestinal Caco-2 cells., *Nanotoxicology*, 3 (4), 355-364. 2009.
 28. Puzyn, T., Rasulev, B., Gajewicz, A., Hu, X., Dasari, T.P., Michalkova, A., Hwang, H.-M., Toropov, A., Leszczynska, D. & Leszczynski, J., Using nano-QSAR to predict the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles., *Nature Nanotechnology*, 6 (3), 175–178. 2011.
 29. Liu, R., Rallo,R., George, S., Ji, Z., Nair, S., Nel, A.E., and Cohen, Y., Classification NanoSAR Development for Cytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles., *Small*, 7 (8) 1118-1126. 2011.
 30. Renwick, L. C., Donaldson, K., and Clouter, A., Impairment of Alveolar Macrophage Phagocytosis by Ultrafine Particles.,*Toxicology and Applied Pharmacology*, 172(2), 119-127. 2001.
 31. Xia, T., Kovoichich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J. I., Wiesner, M. R., and Nel, A. E., Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm., *Nano Letters*, 6(8), 1794-1807. 2006.
 32. Kang, J. L., Moon, C., Lee, H. S., Lee, H. W., Park, E. M., Kim, H. S., and Castranova, V., Comparison of the biological activity between ultrafine and fine titanium dioxide particles in RAW 264.7 cells associated with oxidative stress., *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 71(8), 478-485. 2008.
 33. Han, W., Wang, Y. D., and Zheng, Y. F., In vitro biocompatibility study of nano TiO₂ materials., *Advanced Materials Research*, 47-50, 1438-1441. 2008.
 34. Komatsu, T., Tabata, M., Kubo-Irie, M., Shimizu, T., Suzuki, K. I., Nihei, Y., and Takeda, K., The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro., *Toxicology in Vitro*, 22, 1825-1831. 2008.
 35. VanWinkle, B. A., Mesy Bentley, K. L., Malecki, J. M., Gunter, K. K., Evans, I. M., Elder, A., Finkelstein, J. N., Oberdörster, G. and Gunter, T. E., Nanoparticle (NP) uptake by type I alveolar epithelial cells and their oxidant stress response., *Nanotoxicology*, 3(4), 307-318. 2009.
 36. Zhao, J. S., Bowman, L., Zhang, X. D., Vallyathan, V., Young, S. H., Castranova, V., and Ding, M., Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles Induce JB6 Cell Apoptosis Through Activation of the Caspase-8/Bid and Mitochondrial Pathways., *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A-Current Issues*, 72(19), 1141-1149. 2009.
 37. Barillet, S., Simon-Deckers, A., Herlin-Boime, N., Mayne-L'hermite, M., Reynaud, C., Cassio, D., Gouget, B., and Carriere, M., Toxicological consequences of TiO₂, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study., *J. Nanopart. Res.*, 12(1), 61-73. 2010.
 38. Simon, M., Barberet, P., Delville, M. H., Moretto, P., and Sez nec, H., Titanium dioxide nanoparticles induced intracellular calcium homeostasis modification in primary human keratinocytes. Towards an in vitro explanation of titanium dioxide nanoparticles toxicity., *Nanotoxicology*, 5 (2), 125-139. 2011.
 39. Long, T. C., Saleh, N., Tilton, R. D., Lowry,

- G. V., and Veronesi, B., Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): Implications for nanoparticle neurotoxicity., *Environmental Science and Technology*, 40(14), 4346-4352. 2006.
40. Long, T. C., Tajuba, J., Sama, P., Saleh, N., Swartz, C., Parker, J., Hester, S., Lowry, G. V., and Veronesi, B., Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro., *Environmental Health Perspectives*, 115(11), 1631-1637. 2007.
41. Liu, S., Xu, L., Zhang, T., Ren, G., and Yang, Z., Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells., *Toxicology*, 267(1-3), 172-177. 2010.
42. Shin, J. A., Lee, E. J., Seo, S. M., Kim, H. S., Kang, J. L., and Park, E. M. Nanosized titanium dioxide enhanced inflammatory responses in the septic brain of mouse., *Neuroscience*, 165(2), 445-454. 2010.
43. Liu, R., Yin, L. H., Pu, Y. P., Li, Y. H., Zhang, X. Q., Liang, G. Y., Li, X. B., Zhang, J. A., Li, Y. F., and Zhang, X. Y., The immune toxicity of titanium dioxide on primary pulmonary alveolar macrophages relies on their surface area and crystal structure., *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 10(12), 8491-8499. 2010.
44. Winter, M., Beer, H. D., Hornung, V., Krämer, U., Schins, R. P. F., and Förster, I., Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO₂ nanoparticles in murine dendritic cells., *Nanotoxicology*, 5(3), 326-340. 2011.
45. Hamzeh & Sunahara, In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells, *Toxicology in Vitro*, 27, 864-873. 2013.
46. Roblegg E, Fröhlich E, Meindl C, Teubl B, Zaversky M, Zimmer A., Evaluation of a physiological in vitro system to study the transport of nanoparticles through the buccal mucosa., *Nanotoxicology*, 6(4):399-413. 2012.
47. Creutzenberg, O., Bellmann, B., Heinrich, U., Fuhst, R., Koch, W., and Muhle, H., Clearance and Retention of Inhaled Diesel Exhaust Particles Carbon-Black and Titanium-Dioxide in Rats at Lung Overload Conditions., *Journal of Aerosol Science*, 21 (Suppl. 1), S455-S458. 1990.
48. DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE - GENERAL ANNEXES - ANNEX 21 Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 54

G. 研究発表

(論文発表)

- (1) K. Imai, I. Nakanishi, K. Ohkubo, A. Ohno, M. Mizuno, S. Fukuzumi, K. Matsumoto, K. Fukuhara. Synthesis and radical-scavenging activity of C-methylated fisetin analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **27** (8), 1720-1727, 2019.

(学会発表)

- (1) 福原 潔、今井耕平、中西郁夫、松本謙一郎、大野彰子. 金属イオン配位により活性化する抗酸化物質の開発、日本農芸化学会 2019 年度大会、東京 (2019. 3)
- (2) 福原 潔、今井耕平、中西郁夫、松本謙一郎、大野彰子. 金属錯体形成をトリガーとした新規抗酸化物質の開発：、第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム、京都 (2018. 11)
- (3) K. Fukuhara, T. Arai, A. Ohno, K. Mori, M. Shibamura, N. Miyata, H. Nakagawa.

Potential lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease: a peptide that blocks amyloid β induced neurotoxicity, ACS Fall 2018 National Meeting, Boston, 2018 August 19

- (4) T. Yamada, M. Kurimoto, M. Miura, T. Kawamura, K. Jojima, N. Taira, H. Ohata, S. Tsujii, A. Ohno, A. Hirose. Establishing mechanistic key event information of repeated dose toxicity to support category-based read-across assessment. 58th Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2019, Baltimore, USA)

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）

Table 1. Target substances: Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs, NM100-NM105).

NM	Product name	Crystal type	Surface coating	Composition (TiO ₂ , %)
NM-100	Tiona AT-1	Anatase	uncoating	98.7
NM-101	Hombikat UV 100	Anatase	uncoating	91.7
NM-102	PC105	Anatase	uncoating	95.4
NM-103	UV TITAN M262	Rutile	Al ₂ O ₃ and SiO ₂	89.0
NM-104	UV TITAN M212	Rutile	Al ₂ O ₃ and SiO ₂ , glycerol	89.0
NM-105 (P25)*	Aeroxide P25	85% Anatase 15% Rutile	uncoating	99.0

* Principle material: Aeroxide®P 25 (P25) was chosen as principle material, meaning all endpoints will be addressed for this material, because of its widespread use on the market and within the scientific community to perform comprehensive investigations.

Table 2. Target materials (TiO₂ NPs, NM100-NM105) collected from the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD).

Type	Title	Remarks
Summary dossier	TITANIUM DIOXIDE: SUMMARY OF THE DOSSIER Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 73	
Individual dossier	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 1/1 - NM 105	NM-105の物理化学的性状
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 1/3 - NM 105	NM-105の有害性
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 2- NM 100	NM-100の物理化学的性、有害性
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 3- NM 101	NM-101の物理化学的性、有害性
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 4- NM 102	NM-102の物理化学的性、有害性
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 5- NM 103	NM-103の物理化学的性、有害性
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE -Part 6- NM 104	NM-104の物理化学的性、有害性
ANNEX	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE - GENERAL ANNEXES -ANNEX 19	NM100-NM105の物理化学的性状をまとめたJRCレポート
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE - GENERAL ANNEXES -ANNEX 3	Nanogenotoxで用いられたNM100-NM105の物化性状情報
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE - GENERAL ANNEXES -ANNEX 10	NanogenotoxによるNM100-NM105の気管内投与試験のDossier
	DOSSIER ON TITANIUM DIOXIDE - GENERAL ANNEXES -ANNEX 21	Fraunhofer ITEMのCreutzenbergらによるNM 103, 104, 105を用いたラットの28日間反復吸入ばく露試験

Figure 1. Hierarchical clustering based on physicochemical values of the TiO₂ NPs.

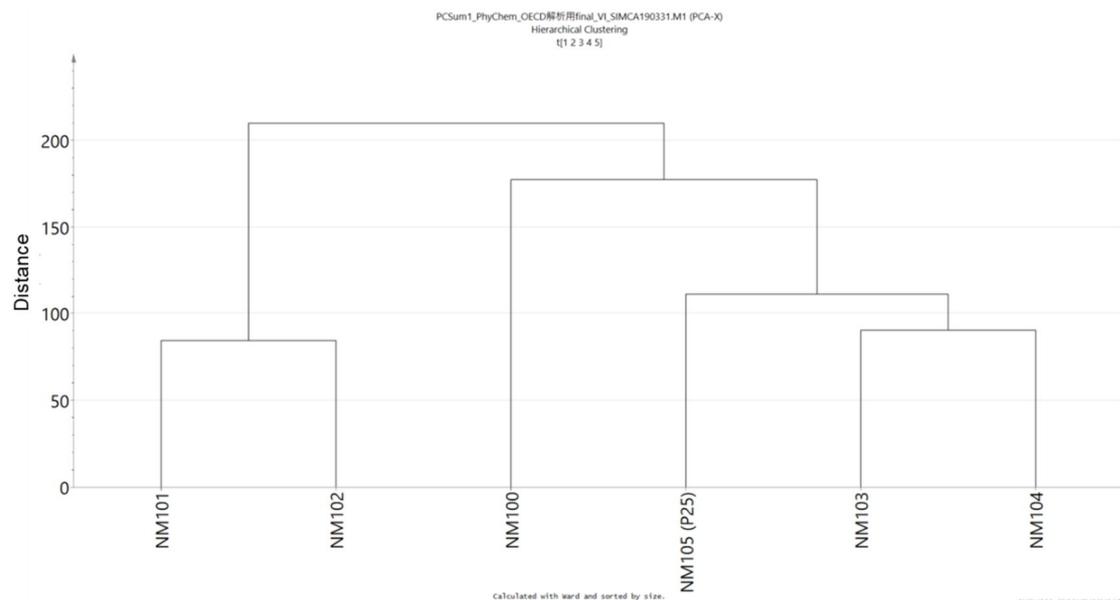


Figure 2. PCA analysis based on physicochemical values of the TiO₂ NPs.

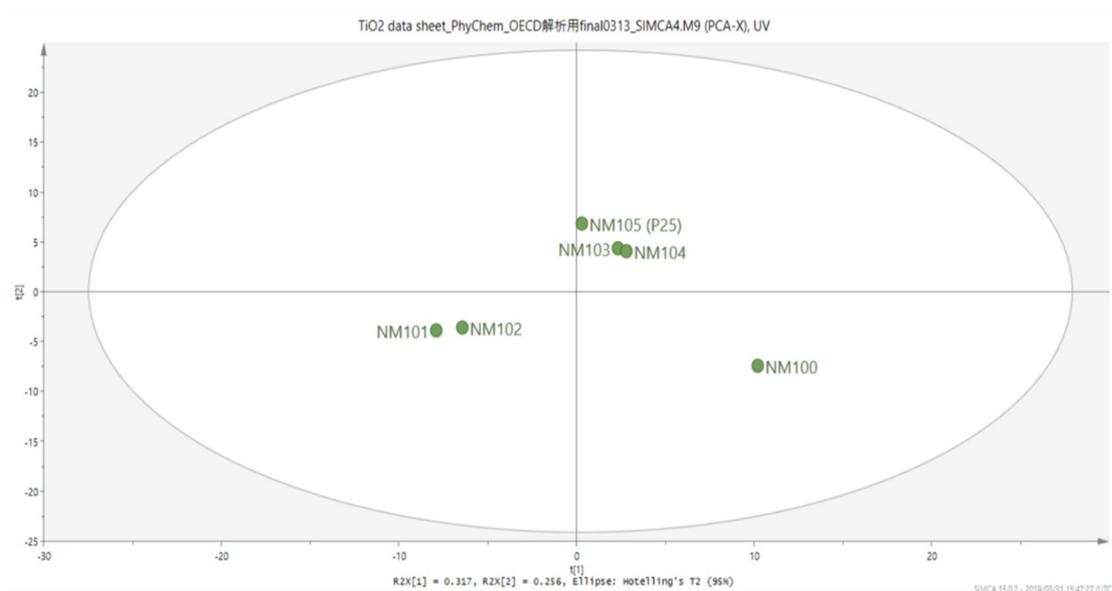


Table 3. Physicochemical properties of the TiO₂ NPs.

Property	Method/ Instrument	NM100	NM101	NM102	NM103	NM104	NM105 (P25)
1 Particle size, size distribution	Primary particle diameter (nm) Anatase	TEM	1	50	6	21	21
2	Primary particle diameter (nm) Rutile	TEM	2			26	26
3	Primary particle diameter (nm) Anatase	TEM	3		22		24
4	Primary particle diameter (nm) Rutile	TEM	4			26	26
5	Primary particle diameter (nm) Anatase	TEM	5	116.9	4.5	22	20.5
6	Primary particle diameter (nm) Rutile	TEM	6			23.7	23
7	Primary particle diameter (nm) Rutile	TEM	7				15
8	Feret mean (Manual Mesurement) (nm)	TEM	8				22.6
9	Feret mean (Automatical Mesurement) (nm)	TEM	9				21.6
10 Composition	Impurity (% w/w Fe)	EDS	10	0.49	0	0.07	0
11	Impurity (% w/w Si)	EDS	11	0.28	0.29	0.08	0.18
12	Impurity (% w/w K)	EDS	12	0.25	0	0.001	0.001
13	Impurity (% w/w P)	EDS	13	0.21	0.27	0.001	0
14	Impurity-coating (% w/w Al)	EDS	14	0.09	0.09	0.05	3.43
15	Impurity (% w/w Cr)	EDS	15	0.03	0	0.005	0
16	Impurity (% w/w Zr)	ICP_OES	16	0.005	0.01	0.005	0.001
17	Impurity (% w/w Ca)	ICP_OES	17	0.001	0.001	0.005	0.01
18	Impurity (% w/w Na)	ICP_OES	18	0.001	0.1	0.001	0.01
19	Impurity (% w/w S)	ICP_OES or EDS	19	0	0.22	0.01	0.32
20	Impurity (% w/w Mg)	ICP_OES	20	0	0	0.001	0.001
21	O (wt%)	EDS	21	40.08	40.35	40.07	40.82
22	Ti (wt%)	EDS	22	58.57	58.79	59.73	54.74
23 Agglomeration/aggregation	Size (d.nm)	untreated/MQ Water	23	391.2	1609	1115	973.2
24	Z-Average (d.nm)	untreated/MQ Water	24	343	1746	1062	671.6
25	Pdl	untreated/MQ Water	25	0.176	0.264	0.187	0.287
26	Zeta Potential (mV)	untreated/MQ Water	26	-34	-10.1	2.73	40.4
27	monomodal	untreated/MQ Water	27				
28	Zeta Deviation	untreated/MQ Water	28	8.26	3.49	8.86	5.27
29	Size (d.nm)	untreated/PBS	29	1440	1188	1528	1977
30	Z-Average (d.nm)	untreated/PBS	30	2289	1229	1579	1397
31	Pdl	untreated/PBS	31	0.355	0.239	0.769	0.255
32	Zeta Potential (mV)	untreated/PBS	32	-36.5	-23.3	-7.21	-35.5
33	monomodal	untreated/PBS	33				
34	Zeta Deviation	untreated/PBS	34	6.81	12.7	31.5	30.7
35	Size (d.nm)	untreated/DMEM + Lglutamine	35	995.5	1438	2745	2255
36	Z-Average (d.nm)	untreated/DMEM + Lglutamine	36	2129	1954	2427	1665
37	Pdl	untreated/DMEM + Lglutamine	37	0.662	0.359	0.181	0.256
38	Zeta Potential (mV)	untreated/DMEM + Lglutamine	38	-0.839	-8.84	-4.92	-19.9
39	monomodal	untreated/DMEM + Lglutamine	39	-7.62		-5.77	-9.46
40	Zeta Deviation	untreated/DMEM + Lglutamine	40	49.8	13.3	25.2	20.9
41	Size (d.nm)	untreated/DMEM + 1% FBS	41	736	1201	1415	1040
42	Z-Average (d.nm)	untreated/DMEM + 1% FBS	42	606.8	1166	1295	828.8
43	Pdl	untreated/DMEM + 1% FBS	43	0.168	0.201	0.081	0.269
44	Zeta Potential (mV)	untreated/DMEM + 1% FBS	44	-8.7	-9.59	-11.9	-8.8
45	monomodal	untreated/DMEM + 1% FBS	45				
46	Zeta Deviation	untreated/DMEM + 1% FBS	46	16.6	11	37.2	9.41
47	Size (d.nm)	untreated/DMEM + 5% FBS	47	845.4	1278	1414	991.1
48	Z-Average (d.nm)	untreated/DMEM + 5% FBS	48	621.9	1039	1234	653.2
49	Pdl	untreated/DMEM + 5% FBS	49	0.231	0.232	0.139	0.293
50	Zeta Potential (mV)	untreated/DMEM + 5% FBS	50	-9.95	-8.17	-11	-10.8
51	monomodal	untreated/DMEM + 5% FBS	51				
52	Zeta Deviation	untreated/DMEM + 5% FBS	52	15.3	24.8	13	12
53	Size (d.nm)	untreated/DMEM + 10% FBS	53	639.1	1406	1521	1156
54	Z-Average (d.nm)	untreated/DMEM + 10% FBS	54	582.4	1127	1227	683.3
55	Pdl	untreated/DMEM + 10% FBS	55	0.262	0.194	0.182	0.369
56	Zeta Potential (mV)	untreated/DMEM + 10% FBS	56	-7.89	-10.5	-8.69	-8.47
57	monomodal	untreated/DMEM + 10% FBS	57				
58	Zeta Deviation	untreated/DMEM + 10% FBS	58	20.9	12.8	17.7	13.6
59	Size (d.nm)	1 min sonifier/MQ Water	59	259.3	719.5	703	2649
60	Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/MQ Water	60	201.3	500.9	505.7	1977
61	Pdl	1 min sonifier/MQ Water	61	0.205	0.274	0.248	0.393
62	Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/MQ Water	62	-24.5	-27.2	-27.1	39.1
63	monomodal	1 min sonifier/MQ Water	63				
64	Zeta Deviation	1 min sonifier/MQ Water	64	10.5	5.5	7.29	6.08
65	Size (d.nm)	1 min sonifier/PBS	65	2116	2254	2525	1629
66	Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/PBS	66	1624	1827	2079	2275
67	Pdl	1 min sonifier/PBS	67	0.219	0.283	0.188	0.442
68	Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/PBS	68	-26.7	-19.7	-25.1	-20.8
69	monomodal	1 min sonifier/PBS	69	-27.6			
70	Zeta Deviation	1 min sonifier/PBS	70	161	16	12.8	16.5
71	Size (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	71	2973	2854	3488	4043
72	Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	72	2514	2350	2701	3551
73	Pdl	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	73	0.332	0.217	0.268	0.279
74	Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	74	20.5	22.3	-3.14	-8.44
75	monomodal	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	75	1.58	-5.52		
76	Zeta Deviation	1 min sonifier/DMEM + Lglutamine	76	35.5	43.7	9.89	25.5

77	Size (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	77	405.3	678.5	837.5	275.6	333.6	306.8	
78	Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	78	310.4	521.2	590	263.5	278.5	265.3	
79	Pdl	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	79	0.207	0.232	0.243	0.243	0.194	0.177	
80	Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	80	-9.14	-11.8	-13.6	-9.98	-8.88	-9.37	
81	monomodal	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	81	-10						
82	Zeta Deviation	1 min sonifier/DMEM + 1% FBS	82	41.6	18.8	20.4	19.1	-19.7	19.1	
83	Size (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	83	408.8	755.5	901.8	432.4	278.2	336.9	
84	Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	84	315.2	569.2	617.3	345.8	228.5	286.3	
85	Pdl	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	85	0.194	0.232	0.27	0.25	0.161	0.207	
86	Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	86	107	-15	-13.4	-12	15.1	9.43	
87	monomodal	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	87	1.75		-11.5		-11.8	-11.5	
88	Zeta Deviation	1 min sonifier/DMEM + 5% FBS	88	275	19.9	25.3	19.8	37.6	35.5	
89	Size (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	89	345.8	823.6	1077	370.9	334.4	349.8	
90	Z-Average (d.nm)	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	90	283.9	623.4	732.2	286.9	267.8	281.2	
91	Pdl	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	91	0.176	0.24	0.27	0.196	0.178	0.196	
92	Zeta Potential (mV)	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	92	78.4	-13	-10.5	-12.4	-9.38	-9.92	
93	monomodal	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	93	-4.19			-11.9	-9.5		
94	Zeta Deviation	1 min sonifier/DMEM + 10% FBS	94	193	16.9	13.5	25.6	48.7	15.3	
95	Size (d.nm)	20 min US-bath/MQ Water	95	378.8	1111	1103	765.3	344.5	902	
96	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/MQ Water	96	307.6	1130	794.1	596.9	290.8	474.4	
97	Pdl	20 min US-bath/MQ Water	97	0.199	0.351	0.254	0.393	0.306	0.443	
98	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/MQ Water	98	-40.6	-27.5	30.3	39.1	24.6	-32.6	
99	monomodal	20 min US-bath/MQ Water	99							
100	Zeta Deviation	20 min US-bath/MQ Water	100	6.58	3.67	9.37	6.08	4.39	3.37	
101	Size (d.nm)	20 min US-bath/PBS	101	1042	1265	1789	1449	2779	4437	
102	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/PBS	102	1217	1276	1809	1350	2284	4514	
103	Pdl	20 min US-bath/PBS	103	0.317	0.238	0.231	0.25	0.227	0.274	
104	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/PBS	104	-20.2	-21.7	-18.5	-20.9	-20.3	-33.2	
105	monomodal	20 min US-bath/PBS	105							
106	Zeta Deviation	20 min US-bath/PBS	106	16.7	12.9	15.6	11.2	9.63	14.4	
107	Size (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	107	1059	1974	2001	2916	3207	1956	
108	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	108	1754	1992	1997	2268	2636	2938	
109	Pdl	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	109	0.515	0.247	0.227	0.264	0.209	0.341	
110	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	110	-1.55	3.6	-3.46	-8.76	-9.98	-8.55	
111	monomodal	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	111	-1.84	-7.32					
112	Zeta Deviation	20 min US-bath/DMEM + Lglutamine	112	25.4	27.5	14.9	15.4	18.1	11.5	
113	Size (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	113	631.9	1368	1063	684.1	975.4	969.6	
114	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	114	540.2	668.7	975.4	526.8	520.4	743.9	
115	Pdl	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	115	0.195	0.282	0.054	0.317	0.282	0.48	
116	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	116	-11.4	-12	-12.4	-10.0	-10.2	-7.76	
117	monomodal	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	117							
118	Zeta Deviation	20 min US-bath/DMEM + 1% FBS	118	16.2	44	17.6	15.4	12.8	12.2	
119	Size (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	119	522.7	1073	1487	1079	925	848.3	
120	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	120	450.4	1065	1197	656.9	696.2	921.8	
121	Pdl	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	121	0.223	0.302	0.179	0.367	0.221	0.456	
122	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	122	-10.4	-11.3	-9.47	-13.7	-9.38	-11.9	
123	monomodal	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	123							
124	Zeta Deviation	20 min US-bath/DMEM + 5% FBS	124	16.9	13.6	12	20.3	11.8	12.2	
125	Size (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	125	565.7	1255	1228	1155	605.2	1110	
126	Z-Average (d.nm)	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	126	473.1	957.9	874.8	570.3	480.8	619.8	
127	Pdl	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	127	0.204	0.234	0.235	0.417	0.239	0.391	
128	Zeta Potential (mV)	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	128	-11.3	-11.5	-10.4	-11.8	-10.5	-5.43	
129	monomodal	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	129	-10.2					-9.61	
130	Zeta Deviation	20 min US-bath/DMEM + 10% FBS	130	14.3	14	19.5	14.1	13.4	26.5	
131	Pdl	DLS	131			0.427	0.242	0.221	0.171	
132	Isoelectric Point (pH)	ultrasonic spectroscopy	132				6		6.9	
133	Crystalline type (Anatase)	XRD	133	1	1	1	0	0	0.85	
134	Crystalline type (Rutile)	XRD	134	0	0	0	1	1	0.15	
135	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/Peak fit	135	56.66	5	18			18	
136	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/Peak fit	136					19		
137	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/TOPAS	137	61.87	5	16			18	
138	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/TOPAS	138				19	20		
139	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/Fullprof	139	168.18	7	18			19	
140	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/Fullprof	140				20	18		
141	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/Scherrer eq.	141	100	7	23			27	
142	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/Scherrer eq.	142				26	27		
143	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/TOPAS, IB	143	100	7	26			27	
144	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/TOPAS, IB	144				25	25		
145	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/TOPAS, FWHM	145	100	10	28			31	
146	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/TOPAS, FWHM	146				28	29		
147	Crystal size (nm)(Anatase)	XRD/Scherrer eq.	147	100		30			23	
148	Crystal size (nm) (Rutile)	XRD/Scherrer eq.	148				18	23		
149	Aspect ratio	TEM	149						1.36	
150	Specific surface area (m ² /g)	SAXS surface (m ² /g)	150		169.5	65.6	51.1	52.4	47.0	
151	BET surface (m ² /g)	BET	151	9.23	316.07	77.992	50.835	56.261	46.175	
152	Total pore volume (ml/g)	BET	152	0.0324	0.319	0.2996	0.2616	0.1935	0.1937	
153	Micro surface area (m ² /g)	BET	153	0	13.625	1.108	0	0	0	
154	micropore volume (ml/g)	BET	154	0	0.00179	0.00034	0	0	0	
155	Dustiness	Number Dustiness Index (1/mg)	Small Rotating Drum	155	6.04	5.47	7.26	5.62	5.50	
156	Inhalable Mass Dustiness Index (mg/kg)	Small Rotating Drum	156		2.86	2.43	3.96	3.59	3.01	
157	Respirable Mass Dustiness Index (mg/kg)	Small Rotating Drum	157		1.38	1.18	2.51	1.58	1.45	
158	Number Dustiness Index (1/g)	measured by CPC (180s) Vortex Shaker (VS) m	158		5.20	4.98	5.73	4.63	4.54	
159	Number Dustiness Index (1/g)	measured by CPC (360s) Vortex Shaker (VS) m	159		6.49	5.85	6.28	5.32	5.36	
160	Number Dustiness Index (1/g)	measured by ELPI Vortex Shaker (VS) m	160		5.51	4.98	6.30	5.40	6.00	
161	Respirable Mass Dustiness Index (mg/kg)	Vortex Shaker (VS) m	161		3.75	3.96	4.28	3.81	4.04	
162	covered by hydrophobic layer of dimethicone (C2H6OSi)n		162				1			
163	high hydrophilic surface		163					1		
164	Porosity	total pore volume (ml/g)	BET	164	0.0324	0.319	0.2996	0.2616	0.1935	0.1937
165	micropore volume (ml/g)	BET	165	0	0.00179	0.00034	0	0	0	
166	Photocatalytic activity	UV-Vis	166				0	0	1	
167	Radical formation potential	OH ⁻ generation	167				0	0	0	
168	Surface reactivity		168				0	1	0	

Table 4. Cytotoxicity assay data of the TiO₂ NPs (NM101-NM105) extracted from eNanoMapper database.

Time	Cell assay	Measurement condition	NO	NM100	NM101	NM102	NM103	NM104	NM105 (P25)
24 (hr)	WST-1 assay	EC ₅₀ (µg/mL)	1*			1484.4			187.8
		Test cell type				A549			A549
		EC ₅₀ (µg/mL)	2		1041.9	350.8			
	LDH assay	Test cell type			NCI-H292	16HBE			
		EC ₅₀ (µg/mL)	3*				8250.3	151.2	
		Test cell type					A549	A549	
48 (hr)	WST-1 assay	EC ₅₀ (µg/mL)	4						306.4
		Test cell type							A549
144 (hr)	MTT assay	EC ₅₀ (µg/mL)	5*				4.0	107.2	
		Test cell type					NIH/3T3	NIH/3T3	
240 (hr)	MTT assay	EC ₅₀ (µg/mL)	6*				1.3	23.0	
		Test cell type					mES	mES	
240 (hr)	WST-1 assay	EC ₅₀ (µg/mL)	7				37.4		
		Test cell type					NIH/3T3		
		EC ₅₀ (µg/mL)	8				11.4		
		Test cell type					mES		
		EC ₅₀ (µg/mL)	9				23.5		
		Test cell type					mES		

1*, 3*, 5*, 6*:Combination of assays with the same time and cell lines, A549, NIH/3T3, mES
A549 : human adenocarcinoma-derived alveolar basal epithelial
NIH/3T3 : mouse fibroblast cell
mES : D3 mouse embryonic stem sell

Table 5. Cytotoxicity assay data extracted from eNanoMapper database for NM103 with EC₅₀ (> 100).

Time	Cell assay	Test cell type	NM103	Number of assay tests for different doses
			EC ₅₀ (µg/mL)	
6, 24 (hr)	LDH release assay	HMDM	> 100	2
24 (hr)	WST-1 assay	TM3	> 100	2
		TM4	> 100	2
	WST-8 assay	16HBE	> 100	2
		NIH3T3	> 100	2
		NRK-52E	> 100	2
		RAW 264.7	> 100	2
		RLE-6TN	> 100	2
	LDH release assay	NRK-52E	> 100	2
		RAW 264.7	> 100	2
		NIH3T3	> 100	2
		RLE-6TN	> 100	2
24, 48, 72 (hr)	Rasazurin assay, NRU assay	RAW 264.7	> 100	2
		MH-S	> 100	2
		Calu-3	> 100	2
240 (hr)	WST-1 assay	NIH3T3	> 100	1

HMDM (human monocyte-derived macrophages)

TM3 (mouse Lydig cell)

TM4 (mouse Sertoli cell)

16HBE (human bronchial epithelial cell)

NIH3T3 (mouse fibroblast cell)

NRK-52E (normal rat kidney cell)

RAW 264.7 (mouse peritoneal macrophage)

NRK-52E (normal rat kidney cell)

RLE-6TN (Rat lung epithelial cell)

MH-S (mouse alveolar macrophage)

Calu-3 (human lung adenocarcinoma)

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
ナノマテリアルの使用状況、安全性などの既存情報の収集と整理

研究分担者 三宅 祐一 静岡県立大学食品栄養科学部 助教

研究要旨：本サブテーマ（a）では *in silico* 生体影響予測を組み合わせたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の構築に資する情報を収集するため、ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データ項目の探索・精査を行った。具体的には、国内省庁のリスク評価書および報告書や文献情報を収集・整理し、ナノマテリアルに関する物性（サイズ、形態、表面修飾など）、物理化学的特性、用途情報などのデータベースの構築を行った。ナノマテリアルはすでに実用化され、身の回りの製品に含まれていることが明らかとなった。しかし、詳細な情報は公開されていないため、リスク評価に必要な情報の公開が望まれる。

A．研究目的

本年度は、*in silico* 生体影響予測を組み合わせたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の構築に資する情報を収集するため、ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データ項目の探索・精査を行った。具体的には、国内省庁のリスク評価書および報告書や文献情報を収集・整理し、ナノマテリアルに関する物性（サイズ、形態、表面修飾など）、物理化学的特性、用途情報などのデータベースの構築を行った。

B．研究方法

B-1 ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報の調査方法

経済産業省が行っているナノマテリアル情報収集・発信プログラムは、ナノマテリアルの安全性に対する国民の懸念を払拭するために、安全性に関する科学的知見や自主管理による安全対策の実施状況等について積極的に情報収集および発信を行うことを目的として作成されたものである。本研究では、このプログラムにより平成 20 年度から平成 29 年度までに集められた情報を収集した。ナノマテリアルとしては、特にカーボンナノチューブ、カーボンブラック、アセチレンブラック、二酸化チタン、フラーレン、酸化亜鉛、シリカ、酸化鉄に関する情報を収集した。収

集した項目としては、事業者名、特性、有害性情報、結晶構造、凝集・分散状態、粒度分布、平均一次粒径、製品粒径、製品形状、密度、比表面積、表面電荷、化学組成、その他物理化学的特性、製造、輸入量、主な用途、製造・加工施設およびプロセス、労働者の曝露情報（曝露対象者、曝露活動・時間など）、工程からの環境排出量、計測技術と計測結果、リスク評価結果、曝露・排出抑制対策、労働者への教育、今後の対策などのロードマップ、ナノマテリアルの性質などに関する事業者のコメント、その他である。

産業技術総合研究所 化学物質リスク管理研究センターが編集したナノテクノロジー消費者製品一覧は、日本で購入できるナノテクノロジーの利用が明記されている消費者製品をまとめたリストであり、日本に住む人がナノマテリアルへ曝露する可能性や消費者のナノテクノロジー認知の形成について検討する際の基礎情報となり得るものである。ここでは、このリストを参考にし、ナノマテリアルを含む化粧品などの情報を収集した。製品名やナノマテリアルの種類、製造元などについての情報を収集した。

B-2 ナノ粒子の毒性情報の調査方法

2011 年 7 月 22 日に報告された産業技術総合研究所の NEDO プロジェクト（P06041）「ナノ粒子特性評価手法の研究

開発」にてまとめられた「ナノ材料リスク評価書-二酸化チタン-」より、二酸化チタンに関する毒性情報を収集した。また、厚生労働省の有害性評価書および上述の経済産業省のナノマテリアル情報収集・発信プログラムより二酸化チタンの毒性情報を収集した。

C. 研究結果

C-1 ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報の調査結果

カーボンナノチューブは 4 社、カーボンブラック 5 社は、アセチレンブラックは 1 社、二酸化チタンは 7 社、フラーレンは 1 社、酸化亜鉛は 3 社、シリカは 3 社、酸化鉄は 1 社、非磁性 α 2 Fe³⁺酸化鉄ナノ粒子は 1 社からのナノマテリアルに関する情報を表 1 から表 10 に示す。カーボンナノチューブの用途および添加理由については機械的物性向上、電気的物性向上、触媒担持、導電性付与、熱伝導性付与、高強度、高柔軟性、高電流密度があり、カーボンブラックはゴム補強効果、黒色着色性、導電性付与効果があり、アセチレンブラックはゴム補強性、導電付与効果、二酸化チタンは紫外線遮蔽能、吸着能、光触媒活性、触媒活性、高屈折率、電荷調整効果がある。フラーレンはラジカル捕捉性、電子受容性、昇華性がある。酸化亜鉛は透明性と紫外線遮蔽能力を向上させ、シリカは増粘・チキソ性付与、補強性付与、流動性付与、耐熱性向上付与の効果があり、酸化鉄は吸油量が低く、分散性が良く、フルイ残分が極めて少なく、着色力・隠ぺい力が大きいなどである。

C-2 ナノ粒子の毒性情報の調査結果

産業技術総合研究所、厚生労働省、経済産業省から収集した情報を、ナノマテリアルの曝露経路ごと(経口摂取、吸入曝露、経皮摂取)にまとめて列挙する。

C-2-1 経口摂取に関する毒性情報

C-2-1-1 産業技術総合研究所の報告書か

らの情報

使用動物、被験物質、投与期間、投与濃度が試験ごとに異なるために、試験結果を単純に比較することは困難であるが、経口投与された二酸化チタンはナノおよび顔料グレードに関わらず、吸収され、全身に分布すると考えられる。¹²

C-2-1-2 厚生労働省の報告書からの情報

二酸化チタンナノ粒子の LD50 は 5000 mg/kg 以上であった。80 nm および 155 nm 二酸化チタン投与群において、海馬領域の細胞減少、肝臓に中心静脈周囲の水腫性変性および肝細胞の散在性壊死が観察された。²³

C-2-1-3 経済産業省の報告書からの情報

マウスに腹腔内投与し、骨髄細胞を観察した。染色体異常試験や姉妹分体交換試験では陰性であった。ラットの経口投与による LD50 は 10,000 mg/kg 以上との記述がある。(NTP)染色体(IUCLID、環境リスク評価)LD, https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/files/nanomaterial/2016.TiO1.pdf

C-2-2 吸入曝露に関する毒性情報

C-2-2-1 産業技術総合研究所の報告書からの情報

ナノサイズ二酸化チタンは顔料グレード二酸化チタンよりもフリーラジカル活性が強く、ナノサイズの二酸化チタンが、発がん物質活性化、DNA 損傷、腫瘍プロモーション等の発がん過程に参与する酸化ストレスを惹起することが示唆されている。⁴⁵

C-2-2-2 厚生労働省の報告書からの情報

生殖能に関しては、生後 19 週に二酸化チタン曝露群の雄 F1 児を無処置の雌 CBA/J マウスと交配したところ、初回交配開始から F2 児出産までの期間が、有意

ではないが、延長する傾向がみられた。⁶

C-2-2-3 経済産業省の報告書からの情報

試験ラットに粒径が15–40 nmの二酸化チタンを24ヶ月間全身吸入曝露させ、6ヶ月間清浄な空気下で飼育した後解剖した試験で、気管支肺胞の過形成、間質性線維化、肺に粒子を貪食したマクロファージ等がみられた。⁷

C-2-3 経皮摂取に関する毒性情報

C-2-3-1 産業技術総合研究所の報告書からの情報

ラット、ウサギおよびブタにナノサイズの二酸化チタンを塗布したとき、チタンは角質層および毛包から検出されたが、真皮までは到達せず、ナノサイズの二酸化チタンは皮膚を通過しないことが示されている。⁸⁻¹²

C-2-3-2 厚生労働省の報告書からの情報

二酸化チタン塗布による細胞間隙拡大、デスモソーム損傷及び基底細胞核周囲の空胞増大などの病理学的変化がみられたが、皮膚刺激性は認められなかった。また粒子径が90 nmよりも小さな二酸化チタンはマウスの皮膚を通過して、全身に移行すること示している。¹¹

C-2-3-3 経済産業省の報告書からの情報

ウサギを用いた眼刺激性試験で、わずかに刺激性がみられた。またウサギでの皮膚刺激性試験やヒトでの例で、刺激性が認められなかった場合とわずかに刺激性が認められた場合がある。(IUCLID)(SIDS)

https://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/files/nanomaterial/2016.TiO1.pdf

D. 考察

ナノマテリアルのリスク評価を行っている機関および省庁としては、産業技術総合研究所、経済産業省、厚生労働省が主

であった。

市販されている製品中に含まれるナノマテリアルとしては二酸化チタンが多かった。それに伴い、ナノマテリアルに関する毒性情報も二酸化チタンのものが多かった。しかし、製品中のナノマテリアルに関しては、具体的な性状などの情報が公開されていないことが多いため、製品中に含まれるナノマテリアルのリスク評価のためにはより詳細な情報を独自に収集する必要があることが示唆された。

E. 結論

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

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

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 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

引用文献

1. Jani, P. U.; McCarthy, D. E.; Florence, A. T., Titanium dioxide (rutile) particle uptake from the rat GI tract and translocation to systemic organs after oral

- administration. *International journal of pharmaceutics* **1994**, *105*, (2), 157-168.
2. Wang, J.; Chen, C.; Yu, H.; Sun, J.; Li, B.; Li, Y.; Gao, Y.; He, W.; Huang, Y.; Chai, Z., Distribution of TiO₂ particles in the olfactory bulb of mice after nasal inhalation using microbeam SRXRF mapping techniques. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry* **2007**, *272*, (3), 527-531.
 3. Warheit, D. B.; Webb, T. R.; Reed, K. L.; Frerichs, S.; Sayes, C. M., Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* **2007**, *230*, (1), 90-104.
 4. Donaldson, K.; Beswick, P. H.; Gilmour, P. S., Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicology letters* **1996**, *88*, (1-3), 293-298.
 5. Gurr, J.-R.; Wang, A. S.; Chen, C.-H.; Jan, K.-Y., Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* **2005**, *213*, (1-2), 66-73.
 6. Hougaard, K. S.; Jackson, P.; Jensen, K. A.; Sloth, J. J.; Löschner, K.; Larsen, E. H.; Birkedal, R. K.; Vibenholt, A.; Boisen, A.-M. Z.; Wallin, H., Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Particle and fibre toxicology* **2010**, *7*, (1), 16.
 7. Heinrich, U.; Fuhst, R.; Rittinghausen, S.; Creutzenberg, O.; Bellmann, B.; Koch, W.; Levsen, K., Chronic inhalation exposure of Wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhalation Toxicology* **1995**, *7*, (4), 533-556.
 8. Nohynek, G.; Dufour, E.; Roberts, M., Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? *Skin pharmacology and physiology* **2008**, *21*, (3), 136-149.
 9. Adachi, K.; Yamada, N.; Yamamoto, K.; Yoshida, Y.; Yamamoto, O., In vivo effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, (3), 296-306.
 10. Lansdown, A.; Taylor, A., Zinc and titanium oxides: promising UV-absorbers but what influence do they have on the intact skin? *International journal of cosmetic science* **1997**, *19*, (4), 167-172.
 11. Wu, J.; Liu, W.; Xue, C.; Zhou, S.; Lan, F.; Bi, L.; Xu, H.; Yang, X.; Zeng, F.-D., Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology letters* **2009**, *191*, (1), 1-8.
 12. Sadrieh, N.; Wokovich, A. M.; Gopee, N. V.; Zheng, J.; Haines, D.; Parmiter, D.; Siitonen, P. H.; Cozart, C. R.; Patri, A. K.; McNeil, S. E., Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles. *Toxicological Sciences* **2010**, *115*, (1), 156-166.

表 1. ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報（物性）①

		密度 (g/cm ³)	化学組成	結晶構造	特性	比表面積 (m ² /g)	表面電荷	その他物理化学的組成
カーボンナノチューブ	A社	0.05	炭素 98%以上	切頭円錐乱層黒鉛積層構造	<ul style="list-style-type: none"> ・機械的物性向上 ・電気的物性向上 ・触媒担持 	50	データなし	特になし
	B社	0.08	炭素 99.95%以上	黒鉛構造	<ul style="list-style-type: none"> ・導電性付与 ・熱伝導性付与 	13 (代表値)		
	C社	測定データなし	炭素 99%以上	グラファイト螺旋円筒結晶	<ul style="list-style-type: none"> ・高強度、高柔軟性 ・高熱伝導性 ・高電流密度 ・比表面積が大きい 	800 以上		
	D社	測定データなし	測定データなし	多層構造並立構造等複次構造	<ul style="list-style-type: none"> ・管状構造 ・半導体性能 ・高弾性 ・高熱導電性 	測定データ無し		

表 2. ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報（物性）②

		密度 (g/cm ³)	化学組成	結晶構造	特性	比表面積 (m ² /g)	表面電荷	その他物理化学的組成
カーボンブラック	E社	かさ密度; 0.1 (粉状品)、0.3-0.6 (粒状品)	炭素(C) 97~100%, 水素(H) 0.1~0.5%, 酸素(O) 0~1%, 硫黄(S) 0~1%, 灰分 0~1%	乱層黒鉛構造	<ul style="list-style-type: none"> ・ゴム補強効 ・黒色着色性 ・導電性付与効果 	5~500	データなし	黒色、臭気なし、3000℃未満では沸騰・溶融しない、水や油、溶剤には不溶である、比表面積が大きい、すなわち粒子径が小さい銘柄は吸湿性が高い、表面にヒドロキノン、ラクトン、キノン等の酸素含有官能基が存在しており、重合反応等への影響や触媒作用がある、水との反応性はない。強酸化物質と接触した場合には、反応して発熱する他の物質に対する酸化性はない、酸化しない一般のCBは、pH4~11
	F社	かさ密度; 0.3~0.6 (粒状品)						
	G社	かさ密度; 0.3~0.6 (粒状品)						
	H社	かさ密度; 0.1 (粉状品)、0.3~0.6 (粒状品)						
	I社	かさ密度; 0.1 (粉状品)、0.3~0.6 (粒状品)						
アセチレンブラック	J社	かさ密度; 0.02~0.18 (粉状・プレス品)、~0.25 (粒状品)			<ul style="list-style-type: none"> ・ゴム補強性 ・導電付与効果 	35~150	-10~-50	基本的にはカーボンブラックと同じであるが、アセチレンブラックは表面官能基が少ないので吸湿性が小さい。

表 3. ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報（物性）③

	密度 (g/cm ³)	化学組成	結晶構造	特性	比表面積 (m ² /g)	表面電荷	その他物理化学的組成
二酸化チタン	K社 0.05-0.8 (粉状品)	99%以上	・ルチル型 ・アナターゼ型	・電子的特性 ・光触媒効果 ・紫外線遮蔽効果特性	30	-40	凝集しやすいことから、空気中では沈降しやすい。 重金属などの不純物が少ない。
	L社 3.5-4.5 (粉状品)	二酸化チタン（多くは、他の物質を表面コート）		・紫外線遮蔽能 ・吸着能 ・光触媒活性 ・触媒活性	15~300	データなし	特になし
	M社 0.05~0.40 (粉状品)	二酸化チタン（多くは含水シリカ、水酸化アルミニウム、ポリシロキサン、ステアリン酸等によって表面処理されている）		・可視光透明性 ・光触媒作用 ・紫外線遮蔽機能	ルチル型: 20~140、アナターゼ型: 80~300		
	N社 0.9~1.3 (粉状品)	二酸化チタン		・高屈折率 ・紫外線遮蔽効果	200 前後	-50	
	O社 0.15 (粉状品: タッピング密度)	二酸化チタン オルガノシラン オルガノポリシロキサン	アナターゼ型	・電荷調整効果 ・紫外線カット	68 (代表値)	データなし	
P社 ルチル: 4.2 アナターゼ: 3.9 (粉状品)	99%以上	・ルチル型 ・アナターゼ型	・紫外線遮蔽効果 ・制御効果等	40-100			
Q社 3.9 ~ 4.3 (粉状品)	TiO ₂ 二酸化チタン		・透明性 ・紫外線遮蔽能力	約 10 - 300 (比表面積値は表面処理剤の影響も受ける)			

表 4. ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報 (物性) ④

		密度 (g/cm ³)	化学組成	結晶構造	特性	比表面積 (m ² /g)	表面電荷	その他物理化学的組成
シリカ	R社	1.12~1.35 (真密度: 2.2, 粉状品)	SiO ₂	非晶質	・コロイド溶液 (液体)	130~280 (最小: 27~40m ² /g、 最大: 450~680 m ² /g)	負	・pH:9.5~10.5 ・粘度:1~3mPa·s
	S社	0.03~0.1 (真比重: 2.2, 粉状品)	99.9%以上 SiO ₂	アモルファス構造 (非晶質)	・化学的に不活性で安定 (フッ酸、強アルカリには溶解) ・増粘・チキソ性付与、ゴム等に補強性付与、粉体に流動性付与、耐熱性向上付与等の効果あり ・高純度、低吸着水分、高比表面積、内部表面積がない、かさ高い ・電気比抵抗が高い ・アモルファス構造 (非晶質)	50~400	データなし	屈折率: 約 1.46 電気比抵抗: 約 10×10 ¹² Ωcm 水中で負帯電 (表面のシラノール基 Si-OH の水素が解離して Si-O ⁻ となる)
	T社	0.025 ~ 0.2 (粉状品)	99%以上 SiO ₂	非晶質	シリカは微粒子であり、且つ凝集体であるため、塗料、ゴム、シーラント等に分散させた際に、内部で構造性を保ち、補強性、増粘性、チキソ性を付与する。また、粒子が塗装表面に現れる事で表面を粗面化し、塗料の艶消しにも利用される。凝集体は、その構造上多孔質であるため、吸油量が大きい。	50 ~ 500		特になし

表 5. ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報 (物性) ⑤

		密度 (g/cm ³)	化学組成	結晶構造	特性	比表面積 (m ² /g)	表面電荷	その他物理化学的組成
酸化亜鉛	U社	5.5 ~ 5.7 (粉状品)	ZnO	六方晶ウルツ型	・透明性 ・紫外線遮蔽能力の向上	20 - 70 (比表面積値は表面処理剤の影響も受ける)	データなし (表面処理の影響が大)	特になし
	V社	0.15~0.35 (粉状品)		六方晶系	・紫外線遮蔽効果 ・透明性 ・抗菌性 ・消臭性	25~45		
	W社	0.05~0.50 (粉状品)		ウルツ鉱型(六方晶)	・可視光透明性が高い ・触媒作用 ・紫外線遮蔽機能	15~90	データなし	

表 6. ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報 (物性) ⑥

		密度 (g/cm ³)	化学組成	結晶構造	特性	比表面積 (m ² /g)	表面電荷	その他物理 化学的組成
フラー レン	X 社	0.65 (粉 状品)	炭素 99.9%以上 *C60、C70 が 97%以 上	フラーレン分子: 面心立 法、六方晶等(1次凝集体) フラーレン粉体(1次凝 集体)	<ul style="list-style-type: none"> ラジカル捕捉性 電子受容性 昇華性 誘導体化可能 	0.24~0.92 (代表値と して、C60 粉体)		特になし
酸化鉄	Y 社	4 (粉状 品)	α -FeOOH 87.5%以上		<ul style="list-style-type: none"> 高純度で品質が均一である。 濃色・淡色ともに彩度・明度が高い。 吸油量が低い。 分散性が良い。 フルイ残分が極めて少ない。 着色力・隠べい力が大きい。 耐候性が良い。 耐酸・耐アルカリ性が良い。 耐溶剤性が良い。 毒性がない。 		データな し	きれいな明 るい黄色、低 吸油量、塗装 におけるベ ース顔料
非磁性 α 2 Fe 3 酸化鉄 ナノ粒 子	Z 社	データ なし	$ZnO \cdot Fe_2O_3$		<ul style="list-style-type: none"> 防錆添加剤 触媒ガスセンサー顔料 ガス精製、水素および一酸化炭素を除去する 半導体材料。 顔料、インキ、塗装、ゴムなどに適用されます。 ガラス、宝石および金属の <u>ect</u> に適用される研 磨剤 			特になし

表 7. ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報 (性質) ①

製品名	事業者 名	凝集状態/分散状態	粒度分布	平均一次粒径	製品粒径	製品形状
カーボンナノチ ューブ(カップ積 層型)	A社	ミクロンサイズの凝集体	なし	およそ 5 μ m (長さ)、80-100 nm (直径)	凝集体でおよそ 20 μ m	一次粒子: 繊維状、二次粒子: 凝集体(繭玉状)
	B社		およそ 8 μ m (中央 値)、およそ 2.5 μ m (最小値)、20 μ m (最 大値)	6 μ m (長さ)、150 nm (直 径)	凝集体で数 μ m	一次粒子: 繊維状、凝集体: 糸鞠状
	C社		データなし	4 μ m (長さ)	凝集体で数 μ m から数 m m 程度	一次粒子: 繊維状
	D社	綿状	1~10 μ m	粒子構造ではない	およそ 1-0 μ m (長さ)、 およそ 3~30 nm (外径)。 粒状でない。	管状
カーボンブラッ ク	E社	アグリゲート (一次凝集 体)を最小とする炭素構造 体	データなし	30-400 nm (アグリゲート径)	粉状品: 2次凝集体径で数 μ m-数 100 μ m、粒品: 0.5-2 mm	粉状、粒状固体
	F社					
	H社					
	I社					

表 8. ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報 (性質) ②

製品名	事業者名	凝集状態/分散状態	粒度分布	平均一次粒径	製品粒径	製品形状
アセチレンブラック	J社	アグリゲート(一次凝集体)を最小とする炭素構造体	データなし	400-1000 nm	粒状品: 0.5mm	粉状、プレス状、粒状固体
	K社	ほとんどが二次粒子状態	およそ 0.2 μm (中央値)、およそ 0.05 μm (最小値)、0.8 μm (最大値)	60 nm	170 nm	一次粒子: ほぼ球形に近い粒子 凝集形状: 不定形
二酸化チタン	L社	ミクロンオーダーの凝集状態	およそ 0.4 μm (中央値)、およそ 0.1 μm (最小値)、0.7 μm (最大値)	5-100 nm	データなし	略球状、紡錘状、樹枝状
	M社	ミクロンオーダーの凝集状態	ルチル形: およそ 0.43 μm (中央値)、およそ 0.05 μm (最小値)、1.1 μm (最大値)、アナタース形: およそ 1.01 μm (中央値)、およそ 0.07 μm (最小値)、1.2 μm (最大値)	10-50 nm (ルチル形)、7-15 nm (アナタース形)	凝集体でミクロンオーダー	ルチル形: 紡錘状、アナタース形: 粒状
	N社	コロイド粒子	データなし	10 nm前後	10 nm前後	アナタース型: 球状、ルチル型: 針状
	O社	アグロメレート状態。	およそ 100 nm (中央値)、およそ 40 μm (最小値)、300 nm (最大値)	65 nm	データなし	略球状
	P社	ミクロンオーダーの凝集状態	データなし	10-50 nm	200 nm	白色粉体
	Q社	電子顕微鏡写真参照	およそ 1 μm (中央値)、およそ 0.7 μm (最小値)、25 μm (最大値)	6-80 nm	6-80 nm	紡錘形~球

表 9. ナノマテリアルを含む市販製品に関する情報 (性質) ③

製品名	事業者名	凝集状態/分散状態	粒度分布	平均一次粒径	製品粒径	製品形状
シリカ	R社	液中: 単分散、乾燥中: 凝集。	データなし	10-20 nm	10-20 nm	球状
	S社	一次粒子(ほぼ球状)が融着した数珠状の凝集粒子	AEROSIL 300: およそ 7 nm (中央値)、およそ 1.25 μm (最小値)、15 nm (最大値)	およそ 5-40 nm	データなし	球状
	T社	数100 nm以上の凝集体	データなし	5-50 nm	数 μm -数100 μm	微粉末、微粒子、球状
酸化亜鉛	U社	データなし	約 2.5 μm	15 ~ 80nm	数 μm ~ 数100 μm 程度	球状
	V社	ミクロンオーダーの凝集状態	0.3-1.2 μm で分布	20-50 nm	1100-2600 μm	凝集粉体
	W社	ミクロンオーダーの凝集状態	およそ 0.16 μm (中央値)、およそ 0.05 μm (最小値)、1 μm (最大値)	10-70 nm	凝集体でミクロンオーダー	データなし
フラーレン	X社	データなし	0.5~50 μm で分布	1 nm	10-40 μm	非針状の球形、立方体、鱗片状などの形状の粉体の集合体

III. 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
<u>K.Hayashi</u> , A.Tokuda, W.Sakamoto.	Hydroxyl Radical- Suppressing Mechanism and Efficiency of Melanin- Mimetic Nanoparticles.	Int. J. Mol. Sci.	19(8)	E2309	2018
<u>K.Hayashi</u> , S.Yamada, W.Sakamoto, E.Usugi, <u>M.Watanabe</u> , T.Yogo.	Red Blood Cell-Shaped Microparticles with a Red Blood Cell Membrane Demonstrate Prolonged Circulation Time in Blood.	ACS Biomater. Sci. Eng.	4	2729-2732	2018
<u>K.Hayashi</u> , H.Hayashi, S.Yamada, W.Sakamoto, T.Yogo.	Cellulose-based molecularly imprinted red-blood-cell-like microparticles for the selective capture of cortisol.	Carbohydr. Polym.	193	173-178	2018
E.Fukai, H.Sato, <u>M.Watanabe</u> , <u>D.Nakae</u> , <u>Y.Tostuka</u> .	Establishment of an in vivo simulating co- culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes.	Cancer Sci.	109(4)	1024-1031	2018
K.Ishii, S.Takahashi, Y.Sugimura, <u>M.Watanabe</u> .	Role of stromal paracrine signals in proliferative diseases of the aging human prostate.	J. Clin. Med.	7(4)	68	2018

G.W. Lee, J.B. Park, S.Y.Park, J.Seo, S.H.Shin, J.W.Park, S.J.Kim, <u>M.Watanabe</u> , Y.S.Chun.	The E3 ligase C-CBL inhibits cancer cell migration by neddylation of the proto-oncogene c-Src.	Oncogene	37(41)	5552-5568	2018
Y.Fujiwara, M.Nishida, M.Saito, A. IRobles, F.Takeshita, <u>M.Watanabe</u> , T.Ochiya, J.Yokota, T.Kohnno, C.C.Harris, N.Tsuchiya.	A nucleolar stress-specific p53-miR-101 molecular circuit functions as an intrinsic tumor-suppressor network.	EBioMedicine	33	33-48	2018
Y.Kudo, Y.Sasaki, T.Onodera, J.Hashimoto, T.Nozaki, K.Tamura, <u>M.Watanabe</u> , M.Masutani.	Measurement of poly(ADP-ribose) level with enhanced slot blot assay with crosslinking.	Challenges	9(2)	27	2018
Y.Nishimura, K.Kasahara, T.Shiromizu, <u>M.Watanabe</u> , M.Inagaki.	Primary cilia as signaling hubs in health and disease.	Adv. Sci.	16(1)	1801138	2018
T.Toyoda,	γ -H2AX formation in	J. Appl. Toxicol.	38(4)	537-543	2018

Y.Totsuka, K.Matsushita, T.Morikawa, N.Miyoshi, K.Wakabayashi, K.Ogawa.	the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline.				
Y.Sakamoto, M.Hojo, Y.Kosugi, K.Watanabe, A.Hirose, A.Inomata, T.Suzuki, D.Nakae.	Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats.	J. Toxicol. Sci.	43(10)	587-600	2018
K.Imai, I.Nakanishi, K.Ohkubo, A.Ohno, M.Mizuno, S.Fukuzumi, K.Matsumoto, K.Fukuhara.	Synthesis and radical-scavenging activity of C-methylated fisetin analogues.	Bioorg. Med. Chem.	27(8)	1720-1727	2019

2019 年 3月 27日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人三重大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 駒田 美和

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医学系研究科・教授
(氏名・フリガナ) 渡邊 昌俊・ワタナベ マサトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項) 承認番号: T17-057 課題名: 発がん要因の検索とリスク評価に関する研究 で国立がん研究センター研究所で承認。

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

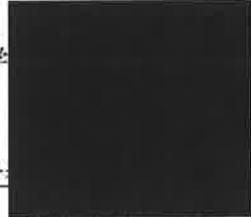
2019年 4月16日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 久保 千



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院歯学研究院・准教授
(氏名・フリガナ) 林 幸彦朗 (ハヤシ コウイチロウ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

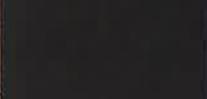
6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2019年 4月 1日

厚生労働大臣 殿
国立医薬品食品衛生研究所長

機関名 国立研究開発  研究センター
所属研究機関長 職 名 理事長
氏 名 中釜 斉 

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
3. 研究者名 (所属部局・職名) 研究所 発がん・予防研究分野・ユニット長
(氏名・フリガナ) 戸塚 ゆ加里・トツカ ユカリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立がん研究センター	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年 3月 15日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 学校法人 東京

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 大澤 貴寿

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
3. 研究者名 (所属部局・職名) 応用生物科学部 食品安全健康学科 ・ 教授
(氏名・フリガナ) 中江 大・ナカエ ダイ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和元年5月9日

厚生労働大臣
—(国立医薬品食品衛生研究所長)— 殿
—(国立保健医療科学院長)—

機関名 国立研究開発法人物質・材料研究機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 橋本 和仁

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案

3. 研究者名 (所属部局・職名) 物質・材料研究機構 技術開発・共用部門 副部門長

(氏名・フリガナ) 花方 信孝 ・ ハナガタ ノブタカ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性予測評価部 主任研究官
(氏名・フリガナ) 大野 彰子 (オオノ アキコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和元年 5 月 13 日

国立医薬品食品衛生研究所 殿

機関名 静岡県立大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 鬼頭 宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの総合的健康影響評価方法の提案
3. 研究者名 (所属部局・職名) 静岡県立大学 食品栄養科学部 助教
(氏名・フリガナ) 三宅 祐一 (ミヤケ ユウイチ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。