

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

令和元年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡邊 昌俊

令和2 (2020) 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・・・・・・13
林 幸彦朗
2. *in vitro* 評価系の高度化と有害性発現経路の確立・・・・・・17
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・・・・・・25
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・・・・・・30
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・・・・・・45
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・・・・・・61
三宅 祐一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・70

IV. 倫理審査等報告書・・・・・・-

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

研究代表者 渡邊 昌俊 三重大学大学院医学系研究科 教授

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

研究分担者：

中江 大 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 教授
戸塚 ゆ加里 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
花方 信孝 国立研究開発法人物質・材料研究開発機構
技術開発・共用部門 副部門長
三宅 祐一 静岡県立大学 食品栄養科学部 助教
大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官
林 幸志朗 九州大学大学院歯学研究院 准教授

研究協力者：

煙山 紀子 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 助教
美谷島 克宏 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 教授
広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長

A. 研究目的

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

Activity Relationship, QSAR)・リードアクロス（類推、Read-across）などの *in silico* 解析と、所謂「ウエット」な評価を組合せた統合的手法が求められる。また、動物愛護の3R (Replacement・Reduction・Refinement)原則より、動物実験代替法としての *in vitro* 評価法も重視される。申請者らは、現在までに、動物代替法として、ナノマテリアル曝露経路として皮膚・肺を想定し、ヒト生体環境を反映した新規 *in vitro* 評価系を開発し、これにDNAアダクトーム法を組み合わせ、ナノマテリアル誘導遺伝子変異頻度・様式を解析する統合的システムの構築を行い、また遺伝子などの生体応答を解析し、AOPを確立している。

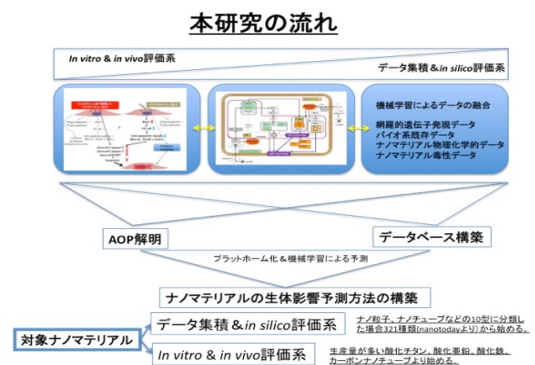


図1. 本研究の流れ

本研究は、上記の成果を踏まえて、①共培養、切片担体培養、ヒト皮膚三次元再構成系などのナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化と *in vivo* 実験による当該評価法の検証、②自験、文献などのデータによる有害性発現経路の確立、③ナノマテリアル毒性試験データベースの作成：試験データ項目の収集・探索・精査、④それらの成果に機械学習などによる *in silico* 生体影響予測を組合せたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法を構築する（図1）。以下に平成31/令和元年度の研究報告の概要を記載する。

B. 研究方法、結果および考察

B1. ナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化と *in vivo* 実験による当該評価法の検証

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

BMSC-5（カルボキシル基修飾マグネタイトナノ粒子）を4°C、10000 rpm、10 minで遠心分離をし、上清と沈殿に分けた。沈殿したBMSC-5は超純水で再懸濁して遺伝毒性試験に供した。GDL1細胞を播種して24時間培養した後、ThinCert™（pore size; 0.4 μm, high density: greiner bio-one）を各wellに入れ、インサート内にRAW264を播種し、24時間培養した。BMSC-5をRAW264のみ、またはRAW 264とGDL1の両方に24時間曝露させた後にトリプシン処理によりGDL1を回収し、一定期間培養した後に細胞からDNAを抽出し、*in vitro* パッケージングによってトランスジーンλEG10をファージ粒子として回収した。回収したファージをCre組換え酵素発現している大腸菌YG6020株に感染させると、λEG10上にある一組のloxP配列に挟まれた領域がCre組換え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後のYG6020菌液を6-thioguanin (6-TG) と chloramphenicol (Cm) を含むM9寒天培地に播いて37°Cで培養すると、プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TGを含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cmを含むM9寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。

GDL1 単独および共培養条件下のRAW264細胞またはRAW264及びGDL1の両細胞にBMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁を24時間暴露し、6~7日間培養した後、GDL1細胞からDNAを抽出し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。結果を図2に示す。BMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁画分曝露群のいずれも溶媒

対照群と比較して変異頻度が増加する傾向が観察された。

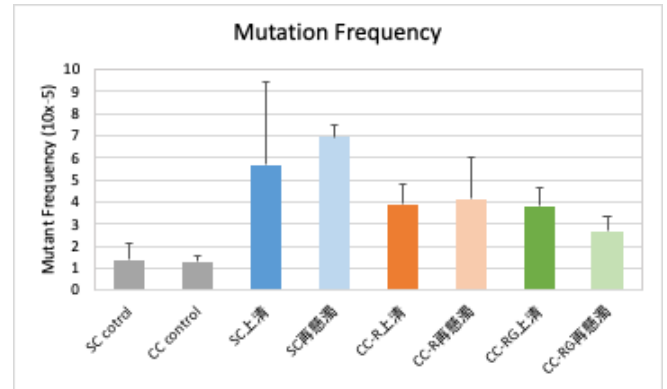


図2. BMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁画分の遺伝毒性評価(SC：単層培養、CC：共培養)

ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた肺の遺伝毒性評価系として共培養システムを構築し、その妥当性の評価を行ってきた。先行研究において、表面修飾を有するBMSC-5は表面修飾を有さないBMS-10（非修飾マグネタイトナノ粒子）に比べ細胞への取り込みが悪いにも関わらず、細胞毒性や変異原性が強いことを認めている。このことは、BMSC-5懸濁液内の鉄イオン濃度がBMS-10に比べ高く、鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと推測した。今年度は、この推測を検証するために、BMSC-5を遠心して鉄イオンを含む上清を取り除き、BMSC-5を再懸濁して、*gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べた。GDL1 単独および共培養条件下のRAW264細胞またはRAW264及びGDL1の両細胞にBMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁を暴露し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行ったところ、BMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁画分のGDL1 単独曝露群のいずれも溶媒対照群と比較して変異頻度が増加する傾向が観察された。

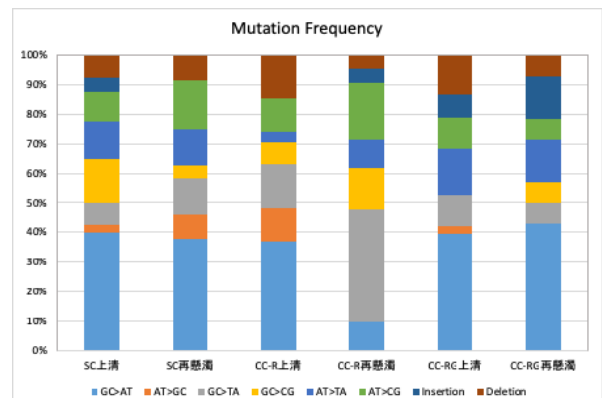


図3. BMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁画分における変異スペクトラム

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

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

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

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

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

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

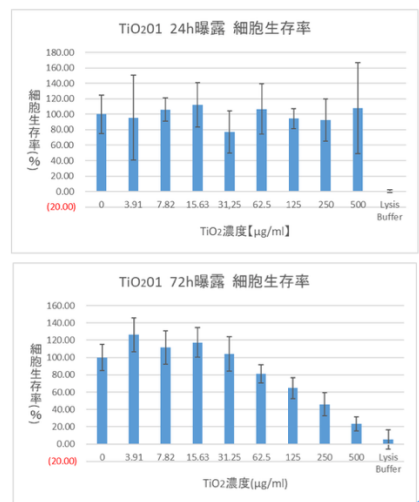


図4. JRCNM01001a01, NHEK 単層培養系, 細胞毒性(WST-8アッセイ;縦軸, %;横軸, µg/mL)

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

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

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

表 1. NHEK 細胞を用いた小核試験における培養時間の検討

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

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

B2. 有害性発現経路の確立

B2-1. microRNA の挙動からの酸化鉄ナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NPs}$) の細胞への影響解析 (渡邊・林・花方) : 酸化鉄ナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NPs}$) の A549 細胞への影響を microRNA (miR) の発現とその標的について、前年度に引き続き解析を行った。酸化鉄ナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NPs}$) を各濃度で A549 細胞に 24 時間の曝露後、リアルタイム PCR を用いて miR-5787、494-3p、1207-5p の発現解析を行った (図 3)。miR-1207-5p において、濃度依存的に発現量は増加し、miR-5787、miR-494-3p では、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ より 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、発現量が増加した。また、N-acetylcystein (NAC) で活性酸素種 (ROS) 発生を抑制すると、いずれもの発現量が抑制されるも、完全には抑制されなかった。過酸化水素で処理した場合、いずれも発現量が上昇し、なおかつ NAC 処理において、発現がほぼ抑制されるのを認めた。これら 3 種類の microRNA は ROS を減少させると発現量が減少するが、必ずしも完全には抑制されなかった。これはナノ粒子による ROS 依存的な発現制御のみならず、ナノ粒子自体の細胞への影響による可能性も考えられた。miR-1207-5p の発現は ROS 依存的と考えられた。

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

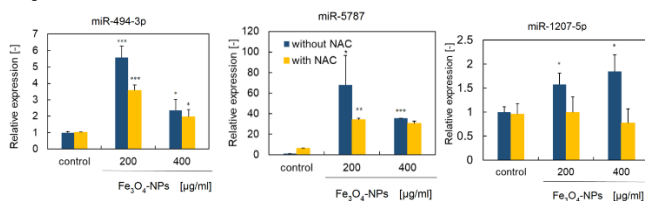


図 5. 酸化鉄ナノ粒子 24 時間曝露後の miR の発現

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

るのを認めた。ROS 依存的 eIF5 発現の変化が確認された。

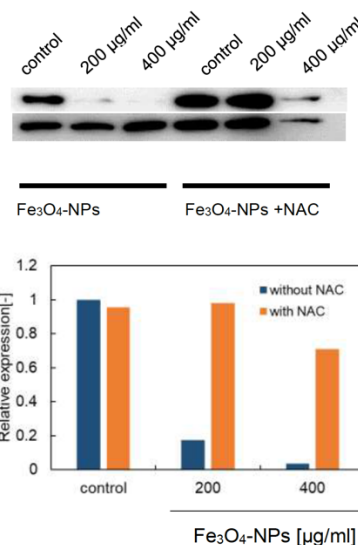


図 6. 酸化鉄ナノ粒子曝露後の eIF5 の発現

B2-2. 新規ナノマテリアル毒性評価指標の探索

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

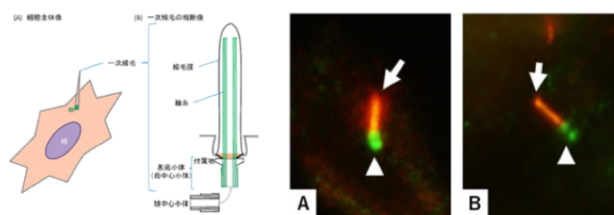


図 7. 一次線毛について

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

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

62.5 µg/mLで行った。

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

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

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

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

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

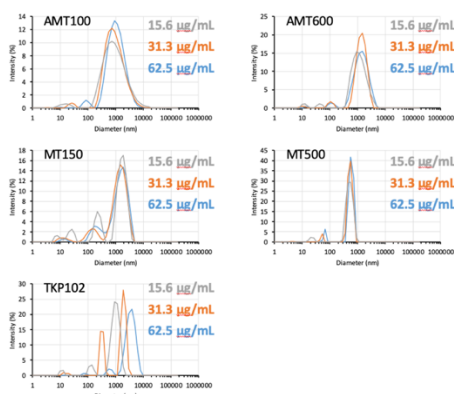


図8. 超純水中での二酸化チタンナノ粒子の粒度分布

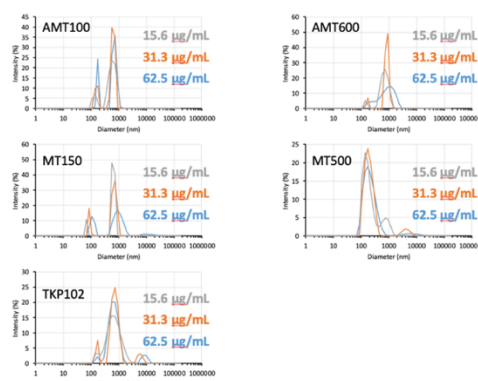


図9. FBS含有DMEM中の二酸化チタンナノ粒子の粒度分布

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

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

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

B3. ナノマテリアル毒性試験データベースの作成：試験データ項目の収集・探索・精査

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

（μm）、噴霧速度（g/sec）、製品に含まれる不

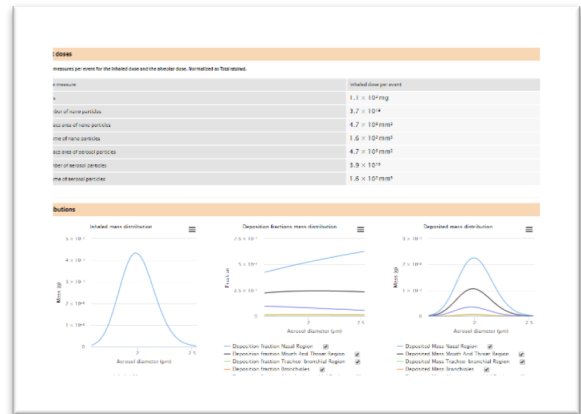


図10. ConsExpo-nanoを用いた評価結果例

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

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

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

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

[調査対象物質]表 3 に示す。

表 3 調査対象物質

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.

[調査対象情報源]

OECD 関連資料：Titanium dioxide (NM100-NM 105) - Manufactured nanomaterial にて公表された Summary dossier と関連する個別 dossier、ANNEX の情報について収集した。

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 データベースを用いた。

[調査対象情報源]

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 (表 4)。

有害性情報に関して、吸入暴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。また、in vitro 細胞毒性試験 (遺伝毒性試験を除く) に関しては、試験種類、細胞種、試験条件、曝露量 (時間)、EC50 等を収集項目とした。収集対象は、eNanoMapper データベースに公開されている以下の 4 種類の試験法 (LDH release assay, cell viability assay, MTT assay, その他) について実施した。

表 4 物理化学的性状データ例

Property	Unit	Method	NM01	NM02	NM03	NM04	NM05 (P25)
Particle size distribution	nm	DLS	2	25	4	21	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	2	25	25	20	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	3	14	22	20	24
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	4	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	5	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	6	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	7	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	8	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	9	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	10	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	11	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	12	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	13	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	14	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	15	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	16	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	17	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	18	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	19	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	20	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	21	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	22	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	23	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	24	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	25	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	26	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	27	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	28	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	29	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	30	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	31	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	32	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	33	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	34	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	35	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	36	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	37	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	38	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	39	118.0	6.4	22	20
Primary particle diameter (nm)	nm	DLS	40	118.0	6.4	22	20

[解析方法]

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。物理化学的性状の情報に基づくクラスタリング解析法と主成分分析法 (PCA : principal component analysis) を実施した。物理化学的性状と吸入毒試験結果との関連性について、主成分分析法 (PCA : principal component analysis) を実施した。

LC20 : 有害性情報として多変量解析に資する吸入毒試験情報で収集した毒性データの結果 (LOEL 値) に対し、原典へ戻り暴露濃度の再計算を実施した。

[6 種類の二酸化チタンナノ粒子間の物理化学的性状の特性解析]

デンドログラムを作成した (図 11)。Anatase 型と Rutile 型に分けられた。

加えて、PCA 解析より、第一、第二主成分に主として寄与する物理化学的性状項目が以下のように得られた (図)。PC1 (第一主成分) のプラス方向には、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た。PC1 (第一主成分) 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。PC2 (第二主成分) のプラス方向には、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。PC2 (第二主成分) のマイナス方向には、Crystal type の Anatase 型や、Al、Mg 等の組成量の項目が特徴づけられた。

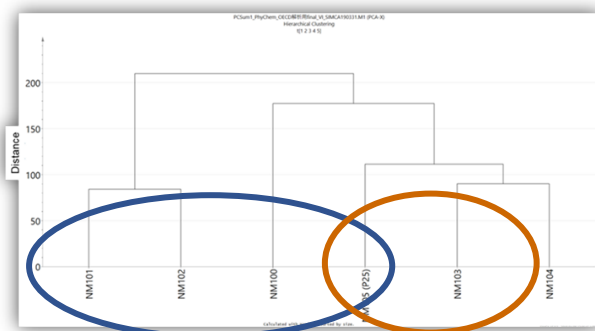


図 11. デンドログラム

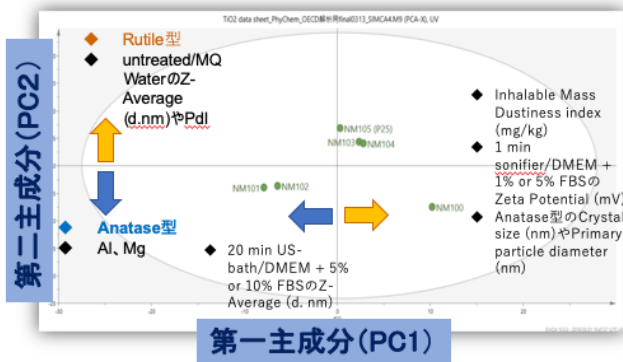


図 12. PCA 解析の結果

[3 種類の二酸化チタンナノ粒子の反復投与吸入毒性試験の多変量解析]

収集・整理したデータの中で OECD の TG412 に準拠して Fraunhofer Institute (Germany) で 3 物質の NPs (NM103、NM104、P25) を用いて吸入毒性試験が実施され、エンドポイントとして肺の毒性結果が明らかとなっていたことから、本データを解析対象とし、LC20 の算出と多変量解析を行った。

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

多変量解析の結果は表 5 に示す。

表 5 多変量解析の結果

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

[in vitro 細胞毒性試験について]

eNanoMapper データベースからの収集データ : (NM100 を除く 5 物質の TiO₂ NPs) の細胞毒性試験結果について、曝露 (時間)、アッセイ法、細胞種および EC50 (ug/mL) の項目について収集した。①同一アッセイ条件 (曝露時間、アッセイ法、細胞種) の組み合わせにおいて、統一されたデータ条件と、②TiO₂ NPs 間で横断的に細胞毒性評価の試験データが揃っていない (アッセイ法や細胞種の違いにより毒性の結果が異なる) ことから、今後、体系的な実験的データの収集が必要であった。

eNanoMapper データベース : NM103 のみ EC50 (ug/mL) >100 が記載されていた項目について収集した。しかしながら、曝露 (時間) と細胞アッセイ法および細胞腫において同一条件を満たすものはなかった。

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

有害性情報に関しては、今後、HESS (ラットを対象とした化学物質の反復投与毒性試験データ及び毒性にかかわる作用機序情報などを集積した毒性知識情報データベース) に搭載できるように、規格化されたシートをひな形として用い、今回情報収集した TiO₂ NPs のデータコンテンツに特化した項目を追加することで、新たな規格データシートを作成した (図 13)。

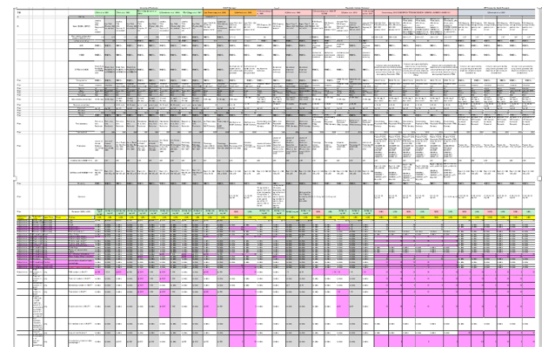


図 13. HESS DB 搭載に向けたデータシートの作成

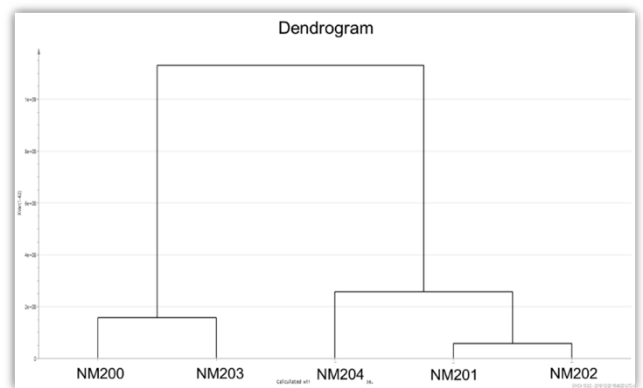


図 14. デンドログラム

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

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

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

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

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

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

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

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

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

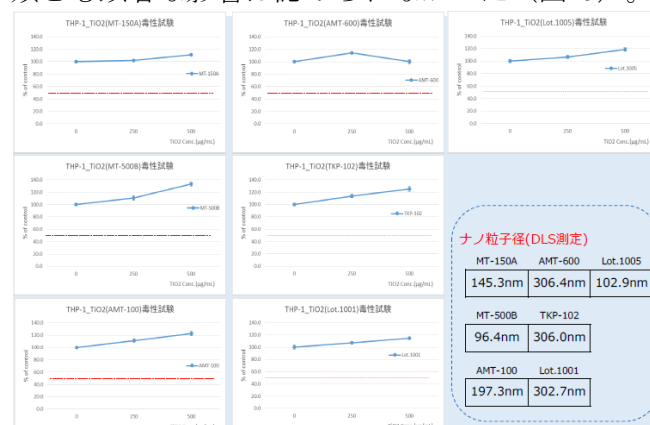


図15. THP-1 への影響

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

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

る予定である。

(倫理面の配慮)

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

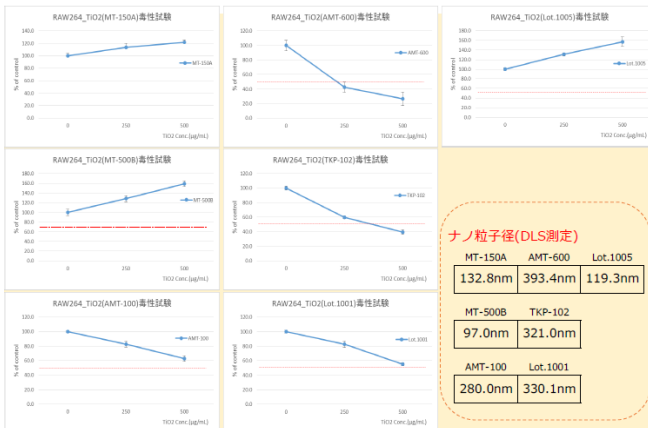


図16. RAW264への影響

C. 結論

本年度の研究のまとめを図15に示す。*in vitro*系と*in silico*系の統合を図るべく、共通のナノ粒子(二酸化チタンナノ粒子など)を用い、①ナノマテリアルの*in vitro*安全性評価法の高度化、③自験、文献などのデータによる生体影響に関するワールドワイドなデータの集積に基づくデータベースの構築の実現化を目指した。特に、③に関しては、6種の二酸化チタンナノ粒子(TiO₂ NPs)及び5種類の二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO₂NPs)を利用し、OECDのナノマテリアル安全性評価プログラムにおいて作成されたドシエの評価文書およびナノマテリアルのデータベースeNanoMapperに収載されている物性データと有害性情報の試験データについて収集し、可能な限りの物性について、様々な統計方法による特性解析および毒性評価を行い本解析手法の有用性について検討した。ナノマテリアルの安全性評価において、多変量解析法は物性と有害性の関連性について有用な解析手法であることが示唆された。この手法を用いて、酸化鉄、二酸化ケイ素ナノ粒子についても解析を進める。酸化鉄(マグネタイト)で構築された*in vitro*系評価系について、自験データを③に組み込むように、また本研究の*in vitro*評価系の有用性についての評価のために二酸化チタンナノ粒子などを用いた解析をさらに進める。

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

D. 研究発表

1. 論文発表

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

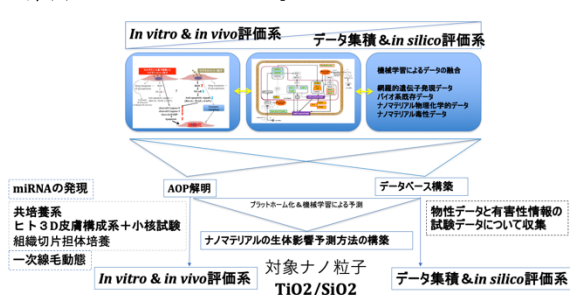


図15 本研究のまとめ

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

- 広川佳史, 杉村芳樹, 渡邊昌俊. 粘性基質上培養でのヒト前立腺癌細胞と線維芽細胞の3次元構造形成に関わる評価. 第78回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019年9月.
- (8) ○大塩里紗, 中川泰久, 渡邊昌俊, 飯島一智. 磁性体ナノ粒子の抗前立腺癌活性におけるmiRNA発現の解析. 第78回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019年9月.
- (9) 臼杵恵梨, 石井健一朗, 広川佳史, 金山和樹, 松田知世, 渡邊昌俊. 抗線維化薬ピルフェドニンは細胞周期のG0/G1期停止を誘導することによってヒト膀胱癌細胞の増殖を抑制する. 第78回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019年9月.
- (10) Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS (東京, 2019年11月)
- (11) Iwamura K, Shimada H, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Endo O, Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 6th ACEM-48th JEMS (東京, 2019年11月)
- (12) ○Ono H, Nagai M, Narushima D, Hamamoto R, Totsuka Y., Kato M. Detection of DNA adducts by nanopore sequencing using deep learning. 6th ACEM-48th JEMS (東京, 2019年11月)
- (13) Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 日本癌学会学術総会シンポジウム. (京都, 2019年9月)
- (14) Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using Comprehensive DNA Adduct Analysis (DNA Adductome Analysis) 2nd Hebei International Forum on Theory and Oractice of Cancer Prevention and Control (石家庄, 2019年7月)
- (15) Totsuka Y. How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting (リヨン, 2019年7月)
- (16) ○戸塚ゆ加里. ナノマテリアルの遺伝毒性評価の動向—JRC会議に参加して— MMS定例会 (京都, 2019年6月)
- (17) ○戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としてのDNAアダクトーム解析の展望 日本毒性学会シンポジウム (徳島, 2019年6月)
- (18) ○政所陽菜 他. ヒト3D皮膚再構成系によるfolpetの経皮毒性評価法の検討. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2020年2月13日, 東京都世田谷区).
- (19) ○小川秀治 他. ヒト3D皮膚再構成系を用いた金属ナノマテリアルの経皮膚毒性評価. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2020年2月14日, 東京都世田谷区).
- (20) ○大野彰子, 山田隆志, 広瀬明彦. 「データベースを活用した神経毒性の*in silico*予測手法の開発」第46回日本毒性学会学術年会 (徳島, 2019年6月)
- (21) 福原 潔, 今井耕平, 中西郁夫, 大久保 敬, 大野彰子, 水野美麗, 福住俊一. 「C-メチルフィセチンのラジカル消去活性」第72回日本酸化ストレス学会学術集会 (北海道, 2019年6月)
- (22) 福原 潔, 中西郁夫, 今井耕平, 松本謙一郎, 大野彰子. 「鉄錯体形成をトリガーとした新規抗酸化物質の開発」第43回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 (京都, 2019年9月)
- (23) ○大野彰子, 渡邊昌俊, 広瀬明彦. 「多変量解析手法を用いた二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状に基づく毒性評価への応用」 (京都, 2020年3月)
- (24) 福原 潔, 中西郁夫, 大久保敬, 今井耕平, 水野美麗, 松本謙一郎, 大野彰子. 「C-メチルフラボノイドのラジカル消去作用」日本農芸化学会2020年度大会 (東京, 2020年3月)
- (25) Fukuhara K., Imai K., Nakanishi I, Matsumoto K., Ohno A. Planar catechin conjugated with DTPA as a promising antioxidant triggered by Fe³⁺ coordination, 258th ACS National Meeting, (August, 2019, San Diego, USA)
- (26) ○大野彰子. 「薬学研究分野 (医薬品・食品・化学物質) への多変量解析法の活用例」 Umetrics 日本ユーザー会 2019 (東京国際フォーラム, 2019年12月)

E.知的所有権の取得状況

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（H30-化学-一般-004）令和元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
分担研究課題名：ナノマテリアルの特性評価

分担研究者：林 幸彦郎 九州大学大学院歯学研究院 准教授

研究要旨：研究班内で共通に使用する5種類の二酸化チタンナノ粒子の粒度分布を蒸留水および細胞培養培地中で測定した。二酸化チタンナノ粒子は種類および分散濃度によらず蒸留水および細胞培地中で凝集していた。各酸化チタンナノ粒子の一次粒径は数ナノメートルから数十ナノメートルであるが、溶液中ではサブミクロンから数十マイクロメートルの凝集体として存在していることが明らかになった。

A.研究目的

研究班内で共通に使用する二酸化チタンナノ粒子の蒸留水および細胞培地中での粒度分布を測定することを目的とした。

B.研究方法

以下の5種類のテイカ株式会社製酸化チタンナノ粒子を使用した：AMT100、AMT600、MT150、MT500、TKP102。これらの酸化チタンナノ粒子を15.63、31.25、62.5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で蒸留水またはウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM+FBS）に分散させた。調製した懸濁液中の粒度分布およびゼータ電位をベックマンコールター製 DelsaMax Pro を用いて、動的光散乱法により求めた。懸濁液の調整条件（二酸化チタン、溶媒、濃度）を表1に示す。

C.研究結果

各懸濁液の蒸留水中での粒度分布を図1に示す。AMT100、AMT600、MT150は100~200 nmと200 nm~3 μm の凝集体を形成していた。粒子濃度が高くなるにつれて、若干、粒径が増加していた。MT500は粒子濃度によらず、100~1000 nmの凝集体を形成した。TKP102は粒子濃度による粒度分布の違いはほとんどなく、100~200 nm、200 nm~3 μm 、3~20 μm の凝集体を形成していた。つまり、いずれの二酸化チタンナノ粒子も一次粒子としては存在しておらず、凝集してい

ることが明らかになった。

表1. 粒度分布およびゼータ電位測定に用いた懸濁液

TiO ₂ サンプル名	溶媒	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
AMT100	蒸留水	15.6
AMT100	蒸留水	31.3
AMT100	蒸留水	62.5
AMT600	蒸留水	15.6
AMT600	蒸留水	31.3
AMT600	蒸留水	62.5
MT150	蒸留水	15.6
MT150	蒸留水	31.3
MT150	蒸留水	62.5
MT500	蒸留水	15.6
MT500	蒸留水	31.3
MT500	蒸留水	62.5
TKP102	蒸留水	15.6
TKP102	蒸留水	31.3
TKP102	蒸留水	62.5
AMT100	DMEM+FBS	15.6
AMT100	DMEM+FBS	31.3
AMT100	DMEM+FBS	62.5
AMT600	DMEM+FBS	15.6
AMT600	DMEM+FBS	31.3
AMT600	DMEM+FBS	62.5
MT150	DMEM+FBS	15.6
MT150	DMEM+FBS	31.3
MT150	DMEM+FBS	62.5
MT500	DMEM+FBS	15.6
MT500	DMEM+FBS	31.3
MT500	DMEM+FBS	62.5
TKP102	DMEM+FBS	15.6
TKP102	DMEM+FBS	31.3
TKP102	DMEM+FBS	62.5

各懸濁液の DMEM+FBS 中での粒度分布を図 2 に示す。AMT100 は濃度によらず 200 nm 以下と 200 nm~20 μ m の 2 種類の凝集体として存在していた。AMT600 も濃度によらず 200 nm 以下と 200 nm~10 μ m の 2 種類の凝集体として存在していた。MT150 は、40 nm 以下、40~400 nm、400 nm~5 μ m の 3 種類の凝集体として存在していた。MT500 は、100 nm 以下と 100~1000 nm の 2 種類の凝集体を形成していた。TKP102 は粒子濃度により粒度分布が異なり、粒子濃度が高くなるにつれて、粒径が増大していた。以上の結果から、蒸留水中と同様に、DMEM+FBS 中でもこれらの二酸化チタンナノ粒子は凝集体として存在していることが明らかになった。

表 2 に各懸濁液のゼータ電位を示す。いずれの二酸化チタンも負電荷を帯びており、蒸留水中の方が絶対値が大きくなった。MT500 および TKP102 はその他の二酸化チタンに比べゼータ電位の絶対値が小さい傾向があった。

D. 考察

いずれの二酸化チタンナノ粒子も溶液中では凝集しており、実際の二酸化チタンを使用する際に、一次粒子として存在する二酸化チタンナノ粒子に暴露されることは少ないと考えられる。これは酸化チタンナノ粒子に限らず、他組成のナノ粒子にも言えることである。ナノ粒子の毒性を評価するにあたり、二次粒子の毒性を評価している可能性があることを考慮に入れる必要があると思われる。

E. 結論

今回測定に用いた 5 種類の二酸化チタンナノ粒子はいずれも蒸留水及びウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地では凝集体として存在していた。

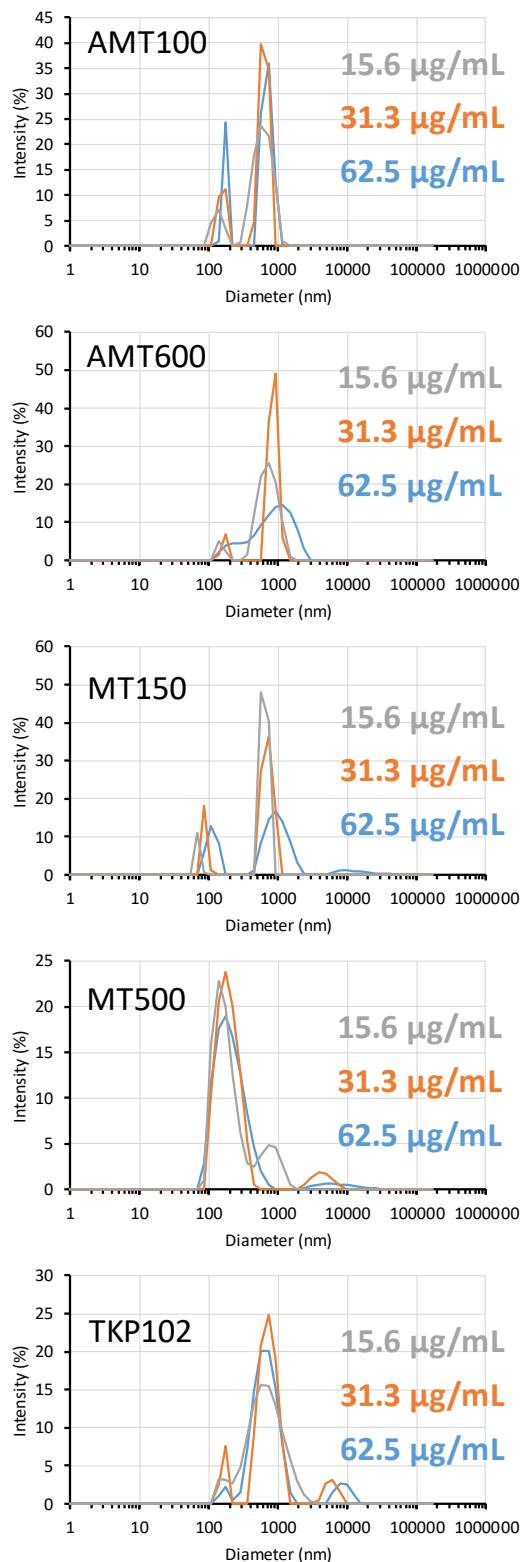


図 1. 各懸濁液の蒸留水中での粒度分布

表 2. 各懸濁液のゼータ電位

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

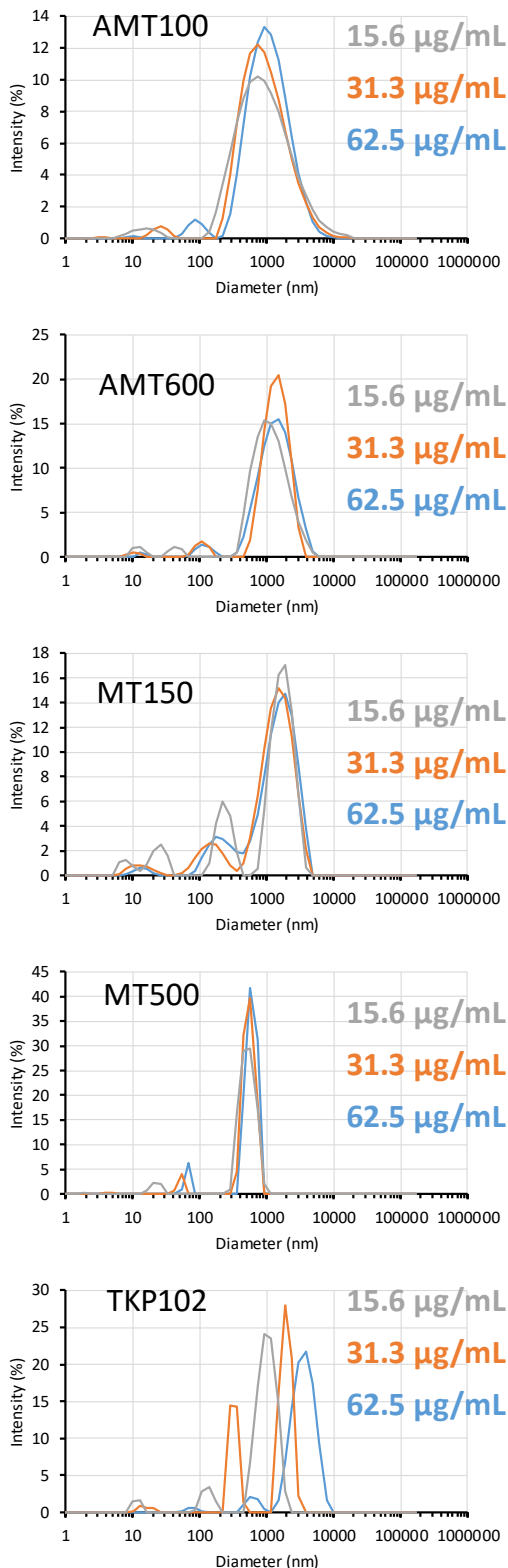


図 1. 各懸濁液の DMEM+FBS 中での粒度分布

F. 研究発表

1. 論文発表

1. [Hayashi K](#), Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Carbonate Apatite Micro-Honeycombed Blocks Generate Bone Marrow-Like Tissues as well as Bone. *Adv Biosys*, 3, 1900140, 2019.
2. [Hayashi K](#), Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Honeycomb blocks composed of carbonate apatite, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite for bone regeneration: effects of composition on biological responses, *Mater Today Bio*, 4, 100031, 2019.
3. [Hayashi K](#), Munar ML, Ishikawa K. Carbonate apatite granules with uniformly sized pores that arrange regularly and penetrate straight through granules in one direction for bone regeneration. *Ceram Int*, 45, 15429-15434. 2019.
4. Shi R, [Hayashi K](#), Bang LT, Ishikawa K. Effects of surface roughening and calcite coating of titanium on cell growth and differentiation. *J Biomater Appl*, 34, 917-927, 2019.
5. Ishikawa K, Arifita T, [Hayashi K](#), Tsuru K. Fabrication and Evaluation of Interconnected Porous Carbonate Apatite from Alpha Tricalcium Phosphate Spheres. *J Biomed Mater Res B*, 107, 269-277, 2019.
6. Sakemi Y, [Hayashi K](#), Tsuchiya A, Nakashima Y, Ishikawa K. Fabrication and Histological Evaluation of Porous Carbonate Apatite Block from Gypsum Block Containing Spherical Phenol Resin as a Porogen. *Materials*, 2019, 12, 3997, 2019.
7. [Hayashi K](#), Munar L.M, Ishikawa K. Effects of macropore size in carbonate apatite honeycomb scaffolds on bone regeneration. *Mat Sci Eng C*, 111, 110848, 2020.

8. Hayashi K, Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Granular Honeycombs Composed of Carbonate Apatite, Hydroxyapatite, and β -Tricalcium Phosphate as Bone Graft Substitutes: Effects of Composition on Bone Formation and Maturation. *ACS Appl Bio Mater*, 3, 1787-1795, 2020
9. Putri TS, Hayashi K, Ishikawa K. Bone regeneration using β -tricalcium phosphate (β -TCP) block with interconnected pores made by setting reaction of β -TCP granules, *J Biomed Mater Res A*, 108A, 625-632, 2020.
10. Swe TT, Shariff KA, Mohamad H, Ishikawa K, Hayashi K, Bakar MHA. Behavioural response of cells and bacteria on single and multiple doped Sr and Ag S53P4 Sol-Gel Bioglass. *Ceram Int* <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.04.094>
11. 林幸壱朗, “骨髄様組織を形成するハニカムスキャフォールド” *BIO INDUSTRY*, シーエムシー出版, 2月号, 24-33, 2020.

G.知的財産権の出願・登録状況

1. 石川 邦夫、林 幸壱朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴、医用ハニカム構造体、成形型、および製造方法、特願 2020-38167、2020年3月5日
2. 石川 邦夫、林 幸壱朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴、炭酸アパタイト被覆材料およびその製造方法、特願 2020-063503、2020年3月31日

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
分担研究課題名：***in vitro*** 評価系の高度化と有害性発現経路の確立

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：本分担研究では、①ナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化と *in vivo* 実験による当該評価法の検証、②自験、文献などのデータによる AOP の確立を目標とした。①に関して、ヒト 3D 皮膚再構成系による金属ナノマテリアルの一般毒性評価系の確立し、共培養系を用いたナノマテリアルの遺伝性毒性評価の構築のために共通して使用する二酸化チタンの評価を行った。水に不溶性である二酸化チタンナノ粒子の取り扱い方法の改善とその細胞毒性の評価を行った。②に関して、microRNA の挙動は活性酸素種(ROS)依存性、活性酸素種(ROS)非依存性（ナノ粒子依存性）が存在し、抽出した miRNA-5787 の標的遺伝子 eIF5 の発現を抑制させ、細胞毒性を誘発する可能性を見出した。

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ックスマーカーの検索である。(1)に関して、共培養系を用いたナノマテリアルの遺伝性毒性評価の構築のために共通して使用する二酸化チタンの評価を行った。(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、microRNA のさらなる解析を行った。

B. 研究方法

共通して使用する二酸化チタンの評価方法の確立、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。

二酸化チタンナノ粒子の毒性評価：

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 JCRB 細胞バンクより入手した。A549 は MEM および添加物を加えた培養液を用いて 37 °C、CO₂ 濃度 5 %加湿インキュベーターで培養した。

2) 使用した二酸化チタンナノ粒子(TiO_2 NPs)：

本研究班の中で共通して使用する 5 種類の二酸化チタンナノ粒子（MT150A、MT500B、AMT100、AMT600、TKP102、テイカ株式会社、大阪）が国立医薬品食品衛生研究所から供与された。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、凝集を取り除き使用した。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 (DelsaMax PRO, Beckman Coulter, Inc., Georgia) で測定を行った。詳細は林分担研究者の報告書を参照いただきたい。細胞毒性評価には、Cell Counting Kit-8 (CCK8, Dojindo, Kumamoto) を使用した。

3) 二酸化チタンナノ粒子の調整：

1000-15.63 $\mu\text{g/mL}$ の TiO_2 の希釈系列を作製した。

① 4000 $\mu\text{g/mL}$ の TiO_2 を作製のため 15 mL チューブに 20 mg の TiO_2 を量り 5 mL のメディウムに溶かした。

② 水中にてソニケーター設定 PWM 30 % で 15 mL チューブの中で 1 分間、プローブを上下に動かし分散させた。

③ TiO_2 が分散浮遊しているうちに短時間で希釈系列を作製した。

4) 二酸化チタンナノ粒子の毒性評価：

96 well に 5000 cells の A549 細胞を 100 μL で播種した。播種して 24 時間後に、すべての well の上清を 50 μL 抜いて、希釈系列 TiO_2 溶液を 50 μL 添加し計 100 μL になるようにして 6、12、24、48 時間インキュベートした。各インキュベート終了時間に到達したものより、CCK8 を 10 μL 各プレートに添加し、2 時間後にプレート遠心機で 5000 rpm、3 分遠心後、上清 80 μL を新しい 96 well プレートに移し替えて、450 nm の吸光度で測定した。

系列

① TiO_2 +メディウム+CCK8 : Blank

② メディウム+Cells+CCK8 : Control

③ TiO_2 +メディウム+Cells+CCK8 : Sample

$$\text{細胞生存率} = \frac{\text{③} - \text{①}}{\text{②}} \times 100$$

ナノマテリアルの傷害機構の解析

5) 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。

6) 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 $\mu\text{g/mL}$)、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 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°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 はインターカーレーター法で、miRNA は TaqMan プローブ法で、CFX Connect[™] Real-Time System (BIORAD, California, USA) を用いて 95°C 10 分加熱後、 95°C 15 秒、 60°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。

また、活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) の影響を検討するために、NAC (N-Acetyl-L-Cysteine) を培養液に溶かし、10 mM となるように調整した。調整培養液を播種

24 時間後の細胞に添加し、3 時間 37°C、CO₂ 濃度 5%加湿インキュベーター内でインキュベートした後に吸引し、1x PBS で洗浄した。その後に磁性体ナノ粒子や過酸化水素に暴露した。

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, NewYork, USA) を 30 μ L、Protease Inhibitor (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を 0.3 μ L 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°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 μ g にタンパク量を調製したサンプル 10 μ L に 2 \times sample buffer を 10 μ L 加え、95°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 記載のブロッキング用溶液を 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 パワーブロット・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°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 II (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い行った。ナノマテリアルの取扱いに関して、「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第 0331013 号) に準じて行った。

C. 研究結果

1) 二酸化チタンナノ粒子の毒性評価：不溶性である二酸化チタンナノ粒子の細胞増殖への影響を評価するために、新たなプロトコルを作成し、評価を行った。

図 1-4 に、5 種類の二酸化チタンナノ粒子の濃度別、時間経過による細胞増殖への影響について示す。また、Table1 に希釈濃度と時間経過による細胞増殖促進あるいは抑

制した条件を記す。

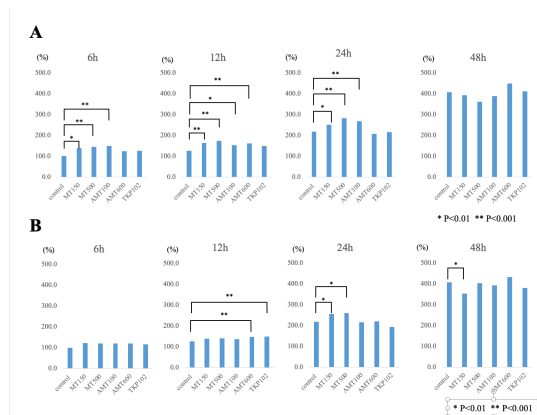


図 1 二酸化チタンナノ粒子曝露による細胞増殖への影響 (A)1000 µg/mL、(B)500 µg/mL

いずれも Control 群（非曝露群）に対して曝露群の多くにおいて、細胞増殖が促進するのを認めた。TiO₂ が比較的低濃度域（15.6-62.5 µg/mL）では AMT600 や TKP102 の細胞増殖が Control 群に対して高い結果となった。高濃度域（500-1000 µg/mL）においても MT500、AMT600 などでは増殖が促進を認めた。

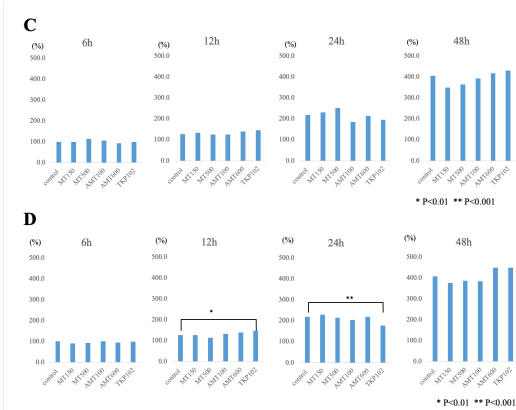


図 2 二酸化チタンナノ粒子曝露による細胞増殖への影響 (C)250 µg/mL、(D)125 µg/mL

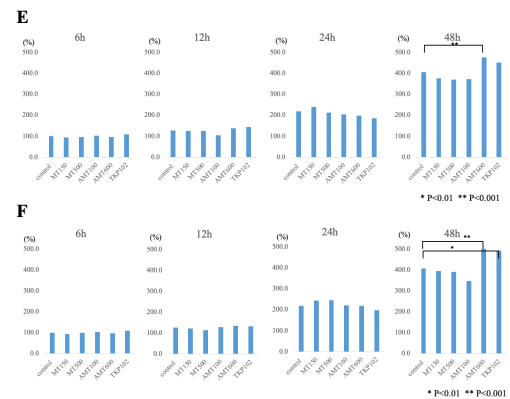


図 3 二酸化チタンナノ粒子曝露による細胞増殖への影響 (E)62.5 µg/mL、(F)31.25 µg/mL

一方、MT150 や AMT100 などでは、細胞増殖は低濃度域では Control 群と同等程度か以下である可能性を認めた。さらに Control 群に対して細胞増殖が減少したものは MT150 および TKP102 であり濃度は 125、500 µg/mL の添加量であった。

表 1.5 種類の二酸化チタンナノ粒子の細胞増殖への影響

A	6h	12h	24h	48h
1000 µg/ml	MT150*,MT500** AMT100**	MT150**,MT500** AMT100*,AMT600**	MT150*,MT500** AMT100**	
500 µg/ml		AMT600**,TKP102**	MT150*,MT500*	
125 µg/ml				AMT600**
62.5 µg/ml				AMT600**,TKP102*
31.25 µg/ml				AMT600**,TKP102**
15.6 µg/ml	AMT600*,TKP102*	AMT600*		AMT600**,TKP102**
B	6h	12h	24h	48h
500 µg/ml				MT150*
125 µg/ml			TKP102**	

Statistics by dunnet's test

2) ナノマテリアルの傷害機構の解析

ナノマテリアルの傷害機構を microRNA の挙動から解析を行った。

候補 microRNA 発現解析:200 及び 400 µg/mL の磁性体ナノ粒子を曝露後 24 時間における miR-5787、miR-494-3p、miR-1207-5p の発現を Real-Time PCR で解析を行った。

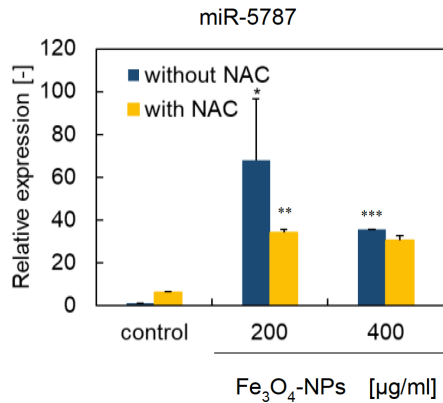


図 4. 磁性体ナノ粒子暴露による miR-5787 発現量変化

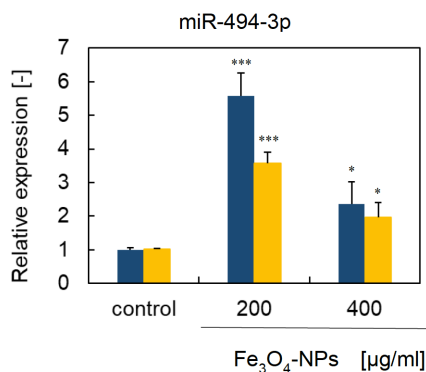


図 5. 磁性体ナノ粒子暴露による miR-494-3p 発現量変化

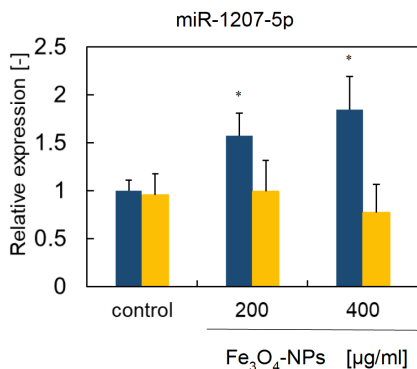


図 6. 磁性体ナノ粒子暴露による miR-1207-5p 発現量変化

miR-1207-5p において、濃度依存的に発現量は増加し、miR-5787、miR-494-3p では、400 μg/mL より 200 μg/mL において、発現量が増加した。また、N-acetylcystein (NAC) で活性酸素種(ROS)発生を抑制すると、いずれもの発現量が抑制されるも、完全には抑制されなかった。過酸化水素で処理した場合、いずれも発現量が上昇し、なおかつ

NAC 処理において、発現がほぼ抑制されるのを認めた。

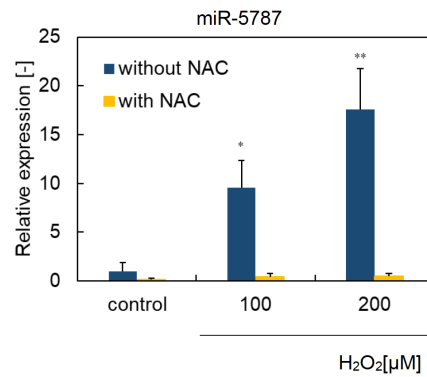


図 7. H₂O₂ 暴露による miR-5787 発現量変化

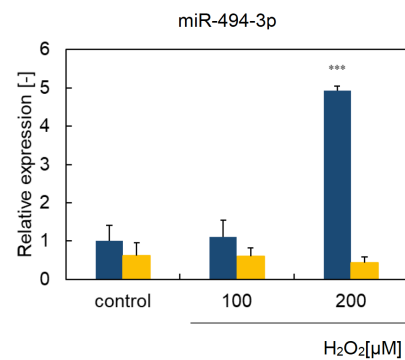


図 8. H₂O₂ 暴露による miR-494-3p 発現量変化

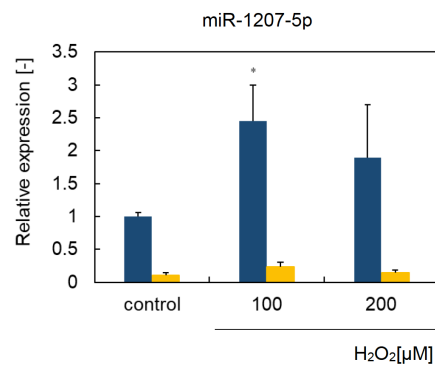


図 9. H₂O₂ 暴露による miR-1207-5p 発現量変化

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

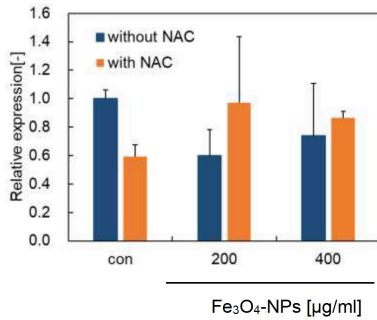


図 10. 磁性体ナノ粒子暴露時の eIF5 mRNA 発現
磁性体ナノ粒子曝露により、特に 200 µg/mL において、eIF5 の発現量は半分程度まで減少するも、NAC 処理によりコントロール程度まで回復するのを認めた。

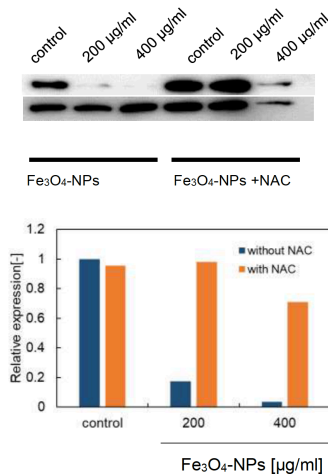


図 11. 磁性体ナノ粒子暴露時の eIF5 タンパク発現
タンパクレベルでも、同様に磁性体ナノ粒子により、特に ROS の影響を受けた抑制を認めた。

D. まとめ

今年度の分担研究として、A549 細胞の切片担体培養系に使用するための班共通の二酸化チタンナノ粒子の毒性評価方法の構築と毒性評価を行った。二酸化チタンナノ粒子は不溶性であり、*in vitro* 系においての評価では注意しなければならない。今回行った方法は、分散に注意し、測定時における残存二酸化チタンの影響を排除した方法である。結果は一部の粒子を除いて、細胞増殖を抑制させる方向には働かなかった。むしろ、高濃度の二酸化チタンナノ粒子曝露において、細胞増殖が促進される結果とな

った。これはすでに出されている各種報告における二酸化チタンナノ粒子の毒性情報と一致する。今後は、このナノ粒子を用いて、A549 細胞の切片担体培養系への使用を図る。

磁性体ナノ粒子の暴露により、3 種類の microRNA(miR5787、494-3p、1207-5p)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、これら 3 種類の microRNA は ROS を減少させると発現量が減少するが、必ずしも完全には抑制されなかった。これはナノ粒子による ROS 依存的な発現のみならず、ナノ粒子自体の細胞への影響による可能性も考えられた。miR-1207-5p の発現は ROS 依存的と考えられた。ROS 依存的に eIF5 の発現の変化は確認された。したがって、miRNA5787 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。

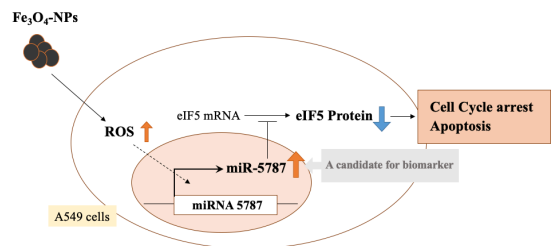


図 12. まとめ

E.提案

新規ナノマテリアル毒性評価指標の探索

今年度は、切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築に関して、新規ナノマテリアル毒性評価指標の可能性について、解析を始めた。その指標は、一次線毛動態である。一次線毛は細胞膜上に生じる不動性の突起物であり、この出現は中心体の消失とともに細胞周期を停止させる。比較的容易に観察できることより、A549 細胞での一次線毛を特異的な抗体で確認をした (図 6)。同細胞に障害を与えると、消失することより、細胞への障害と一次線毛の動態が関係する可能性を考え、ナノマテリアルの毒性との関係を探る予定である [Nishimura Y, Watanabe M, et al., *Acv Sci*, 6(1), 1801138, 2018]。

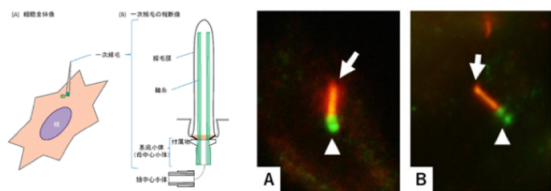


図7. 一次線毛について

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K.Ishii, T.Sasaki, K.Iguchi, M.Kato, H.Kanda, Y.Hirokawa, K.Arima, M.Watanabe, Y.Sugimura. Pirfenidone, an anti-fibrotic drug, suppresses the growth of human prostate cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest. *J Clin Med*, 8(1), 44, 2019.
- (2) E.Usugi, K.Ishii, Y.Hirokawa, K.Kanayama, C.Matsuda, K.Uchida, T.Shiraishi, M.Watanabe. Anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses proliferation of human pancreatic cancer cells by inducing G0/G1 cell cycle arrest. *Pharmacology*, 103(5-6), 250-256, 2019.
- (3) K.Kanayama, H.Imai, E.Usugi, T.Shiraishi, YS Hirokawa, M.Watanabe. Letter to the editor: reply to Antonio Ieni “Intratumoral HER2 heterogeneity in early gastric carcinoma: potential bias in therapeutic management”. *Virchow Arch*, 474(3), 403-404, 2019.

2. 学会発表

- (1) ○M.Watanabe, S.Takahashi, E.Usugi, K.Ishii, Y.Hirokawa. Crosstalk between apoptosis and autophagy induced by docetaxel-magnetic nanoparticles with different surface in prostate cancer cells. AACR annual meeting 2019, March.30-April.3, 2019, Atlanta.
- (2) K.Ishii, I.Matsuoka, T.Sasaki, M.Kato, K.Nishikawa, H.Kanda, Y.Hirokawa, K.Iguchi, K.Arima, M.Watanabe, Y.Sugimura. Loss of fibroblasts-dependent

androgen receptor activation in prostate cancer cells develops castration-resistant prostate cancer. AACR annual meeting 2019, March.30-April.3, 2019, Atlanta.

- (3) ○渡邊昌俊. 酸化鉄ナノ粒子はドキシソルビシンの前立腺癌細胞への細胞毒性に対してパラドキシカルな影響を示す. 第 108 回日本病理学会総会, 東京国際フォーラム, 2019 年 5 月.
- (4) ○渡邊昌俊, 中野洋.カーボンナノチューブ曝露における癌細胞株の microRNA 網羅的発現解析.第 66 回日本臨床検査医学会学術集会, 岡山コンベンションセンター, 2019 年 11 月.
- (5) ○渡邊昌俊. 腫瘍に対するビオミメテジックスなマテリアルのプラットフォーム構築. 第 9 回日本泌尿器病理研究会学術集会, 日本橋ライフサイエンスビル, 東京, 2020 年 2 月.
- (6) 渡邊昌俊, 上村博司. 前立腺癌の遊走・浸潤への Zyxin の関与について.第 78 回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019 年 9 月.
- (7) 中川泰久, 石井健一郎, 藤原雅也, 臼杵恵梨, 広川佳史, 杉村芳樹, 渡邊昌俊. 粘性基質上培養でのヒト前立腺癌細胞と線維芽細胞の 3 次元構造形成に関わる評価. 第 78 回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019 年 9 月.
- (8) ○大塩里紗, 中川泰久, 渡邊昌俊, 飯島一智. 磁性体ナノ粒子の抗前立腺癌活性における miRNA 発現の解析.第 78 回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019 年 9 月.
- (9) 臼杵恵梨, 石井健一郎, 広川佳史, 金山和樹, 松田知世, 渡邊昌俊. 抗線維化薬ピルフェドニンは細胞周期の G0/G1 期停止を誘導することによってヒト膀胱癌細胞の増殖を抑制する. 第 78 回日本癌学会学術総会, 国立京都国際会館, 2019 年 9 月.

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（H30-化学-一般-004）令和元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
分担研究課題名：生体を模倣した *in vitro* 試験系を用いた遺伝毒性評価

分担研究者：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。マグネタイトナノ粒子（MGT）を用いて本評価系の検証を行った。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。表面修飾を有する MGT(BMSC-5)は表面修飾を有さない MGT(BMS-10)に比べ細胞への取り込みが悪いにも関わらず、細胞毒性や変異原性が強かった。このことは、BMSC-5 懸濁液内の鉄イオン濃度がBMS-10に比べ高く、鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと推測した。今年度は、これを検証するために、BMSC-5 を遠心して鉄イオンを含む上清を取り除き、BMSC-5 を再懸濁して、*gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べた。その結果、予想に反して、GDL1 細胞の単培養条件下で鉄イオンを含む上清を取り除き、再懸濁した BMSC-5 が高い変異頻度誘発を示し、先行研究で観察された結果と同じ傾向を示した。今後、単培養条件下で BMSC-5 により誘発された変異スペクトルの解析および変異誘発メカニズムの検討を行う。また、今年度は本手法を用いて他のナノ粒子（各種二酸化チタンナノ粒子）の遺伝毒性評価を行う予定であり、現在、マテリアルの用量や培養条件などの検討を行っている。

A.研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験（変異原性試験）、コメットアッセイ（DNA 損傷試験）、小核試験（染色体異常試験）などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは微粒子などの化学物質の遺伝毒性評価は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考え。これまで我々は、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法（アダクトーム法）を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて確かめてきた。

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し、その妥当性を多層カーボンナノチューブやマグネタイトナノ粒子（MGT）を用いて検証してきた。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、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）を使用して検討している。先行研究において、表面修飾を有する BMSC-5 は表面修飾を有さない BMS-10 に比べ細胞への取り込みが悪いにも関わらず、細胞毒性や変異原性が強いことがわかった。このことは、BMSC-5 懸濁液内の鉄イオン濃度が BMS-10 に比べ高く、鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと推測した。今年度は、この推測を検証することを目的に、BMSC-5 を遠心して鉄イオンを含む上清を取り除き、BMSC-5 を再懸濁して、*gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べた。

また、本手法を他のナノマテリアル（二酸化チタン）の遺伝毒性評価に応用するための条件設定

についても検討する。

B. 研究方法

① 共培養システムによる遺伝毒性試験法

まず、被験物質の調整を行なった。BMSC-5 を 4°C、10000 rpm、10 min で遠心分離をし、上清と沈殿に分けた。沈殿した BMSC-5 は超純水で再懸濁して遺伝毒性試験に供した。

GDL1 細胞を播種して 24 時間培養した後、ThinCert™ (pore size; 0.4 μm, high density: greiner bio-one) を各 well に入れ、インサート内に RAW264 を播種し、24 時間培養した。BMSC-5 及び BMS-10 を RAW264 のみ、または RAW 264 と GDL1 の両方に 24 時間曝露させた後にトリプシン処理により GDL1 を回収し、一定期間培養した後に細胞から DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングによってトランスジーン λEG10 をファージ粒子として回収した。回収したファージを Cre 組換え酵素発現している大腸菌 YG6020 株に感染させると、λEG10 上にある一組の loxP 配列に挟まれた領域が Cre 組換え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後の YG6020 菌液を 6-thioguanin (6-TG) と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地に播いて 37°C で培養すると、プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TG を含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cm を含む M9 寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。さらに、MGT により誘発される変異スペクトルの解析は、変異コロニーを用いたダイレクト PCR 法により実施した。

② 共培養システムを用いて酸化チタンナノ粒子の遺伝毒性評価における各種条件検討

先行研究では、細胞毒性試験にニュートラルレッド(NR)を用いていたが、ナノ材料が凝集した際に NR がナノ物質の凝集塊に吸着してしまうなどの問題点があった。酸化チタンナノ粒子は特に凝集しやすいことから、WST-1 法を用いて細胞毒性試験を行うこととし、その条件検討から開始した。実験に供した細胞は、*gpt delta* マウスより樹立された GDL1、マクロファージ様細胞の RAW246 の 2 種類。96well プレートにそれぞれ 1×10^4 cells/well、 4×10^4 cells/well の濃度で播種し、一

晩培養した。その後、TiO₂ を 1mg/ml から 2 段階希釈の濃度で 24 時間曝露させた。培養液に WST-1 試薬を加え、37°C で 2 時間インキュベートし、分光光度計にて 450nm の吸光度を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では該当しない。

C. 研究結果

① 共培養システムによる遺伝毒性試験法

GDL1 単独および共培養条件下の RAW 細胞または RAW 及び GDL1 の両細胞に BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁を 24 時間曝露し、6~7 日間培養した後、GDL1 細胞から DNA を抽出し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。結果を図 1 に示す。BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁画分曝露群のいずれも溶媒対照群と比較して変異頻度が増加する傾向が観察された。さらに、遠心上清および下層の再懸濁画分曝露群で誘発された変異スペクトルについて解析を行ったところ、共培養条件下における再懸濁画分曝露群で特異的な変異スペクトルを示した (図 2)。

② 共培養システムを用いて酸化チタンナノ粒子の遺伝毒性評価における各種条件検討

酸化チタンナノ粒子による細胞毒性を調べるために、WST-1 Assay 試薬を用いた。この方法では、生細胞中のミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩(WST-1)のホルマザン色素への変換を検出する。実験に供した細胞は、*gpt delta* マウスより樹立された GDL1、マクロファージ様細胞の RAW246 の 2 種類。96well プレートにそれぞれ 1×10^4 cells/well、 4×10^4 cells/well の濃度で播種し、一晩培養した。その後、酸化チタンナノ粒子を 1mg/ml から 2 段階希釈の濃度で 24 時間曝露させた。培養液に WST-1 試薬を加え、37°C で 2 時間インキュベートし、分光光度計にて 450nm の吸光度を測定した。この細胞数で実験したところ、細胞数が多かったため 0mg/ml で分光光度計の検出限界を超えていた。そのため最適な細胞数を決めるために、2 段階希釈で細胞濃度を変えて同様の実験をした。その結果、GDL1 では 5×10^3 cells/well、RAW246 では 1×10^4 cells/well が最適であることが観察された。今後は、分散性の確認された濃度を含む酸化チタンナノ粒子溶液に曝露させて細胞毒性を調べ、それを基に共培養系での曝露実験、遺

伝毒性試験へと進めていく予定である。

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、その妥当性の評価を行ってきた。先行研究において、表面修飾を有する BMSC-5 は表面修飾を有さない BMS-10 に比べ細胞への取り込みが悪いにも関わらず、細胞毒性や変異原性が強いことがわかった。このことは、BMSC-5 懸濁液内の鉄イオン濃度が BMS-10 に比べ高く、鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと推測した。今年度は、この推測を検証することを目的に、BMSC-5 を遠心して鉄イオンを含む上清を取り除き、BMSC-5 を再懸濁して、*gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べた。GDL1 単独および共培養条件下の RAW 細胞または RAW 及び GDL1 の両細胞に BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁を曝露し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行ったところ、BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁画分の GDL1 単独曝露群のいずれも溶媒対照群と比較して変異頻度が増加する傾向が観察された。このことは、GDL1 単培養に対する遺伝毒性は鉄イオンと関係がないか、遠心分離では完全に鉄イオンが除去されていないか、あるいは BMSC-5 から常に飽和状態になるべく鉄イオンが放出されている等の可能性が考察された。

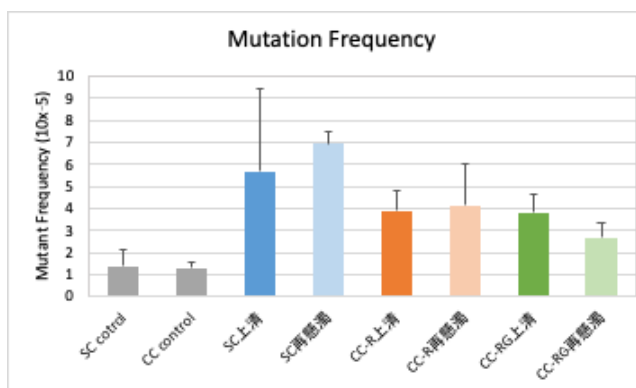


図1. BMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁画分の遺伝毒性評価

さらに、変異原性誘発のメカニズム探索のため、各条件下で誘発される変異スペクトラムの解析を行ったところ、共培養条件下における再懸濁画分曝露群で GC>TA 変異の上昇が確認された。

今後は、再懸濁画分の鉄イオン濃度の測定を行い、鉄イオンが変異に及ぼす影響について検討す

る。さらに、酸化チタンナノ粒子においても、細胞毒性の有無を確認し、それを基に共培養系での曝露実験、遺伝毒性試験へと進めていく予定である。

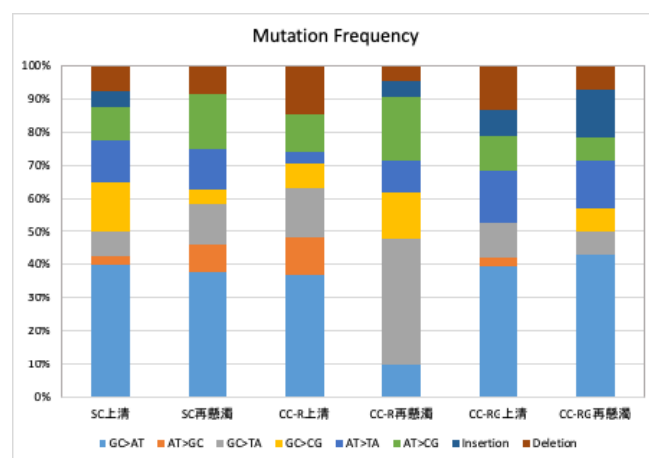


図2. BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁画分における変異スペクトラム

E. 結論

これ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ない、多層カーボンナノチューブや MGT を用いて、本システムの妥当性の検証を行ってきた。先行研究において、表面修飾を有する BMSC-5 は表面修飾を有さない BMS-10 に比べ細胞への取り込みが悪いにも関わらず、細胞毒性や変異原性が強いことがわかった。このことは、BMSC-5 懸濁液内の鉄イオン濃度が BMS-10 に比べ高く、鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと推測した。今年度は、この推測を検証することを目的に、BMSC-5 を遠心して鉄イオンを含む上清を取り除き、BMSC-5 を再懸濁して、*gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べた。GDL1 単独および共培養条件下の RAW 細胞または RAW 及び GDL1 の両細胞に BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁を曝露し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行ったところ、BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁画分の GDL1 単独曝露群のいずれも溶媒対照群と比較して変異頻度が増加する傾向が観察された。このことは、GDL1 単培養に対する遺伝毒性は鉄イオンと関係がないか、もしくは、遠心分離では完全に鉄イオンが除去されていないか、あるいは

BMSC-5 から常に飽和状態になるべく鉄イオンが放出されている等の可能性が考察された。また、変異スペクトラムの解析を行ったところ、共培養条件下における再懸濁画分曝露群で GC>TA 変異の上昇が確認された。

今後は、再懸濁画分の鉄イオン濃度の測定を行い、鉄イオンが変異に及ぼす影響の有無を確認するとともに、BMSC-5 の細胞毒性や変異原性の要因についてさらなる検討を重ねる。さらに、酸化チタンナノ粒子においても、細胞毒性の有無を確認し、それを基に共培養系での曝露実験、遺伝毒性試験へと進めていく予定である。

また、今後、本手法を用いて他のナノマテリアルの遺伝毒性を検討するための条件検討を行っている。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

- Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Totsuka Y, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K. Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles. *Carcinogenesis*. 2019 Jun 20.
- Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats. *Mutagenesis*. 34 (3), 279-287, 2019.
- Totsuka Y, Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Kato M, Nagai M, Elzawahry A, Totoki Y, Nakamura H, Hosoda F, Shibata T, Matsuda T, Matsushima Y, Song G, Meng F, Li D, Liu J, Qiao Y, Wei W, Inoue M, Kikuchi S, Nakagama H, Shan B. DNA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China. *Chem Res Toxicol*. 32 (8), 1515-1527, 2019.
- Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL. High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Res*. 847, 403022, 2019.
- Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl- β -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of β -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res*. 2019 in press.

2. 学会発表

- Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
- Iwamura K, Shimada H, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Endo O, Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
- Ono H, Nagai M, Narushima D, Hamamoto R, Totsuka Y, Kato M. Detection of DNA adducts by nanopore sequencing using deep learning. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
- Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 日本癌学会学術総会シンポジウム。(京都、2019年9月)
- Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using Comprehensive DNA Adduct Analysis (DNA Adductome Analysis) 2nd Hebei International Forum on Theory and Practice of Cancer Prevention and Control (石家荘、2019年7月)
- Totsuka Y. How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting (リヨン、2019年7月)
- 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルの遺伝毒性評価の動向 —JRC 会議に参加して— MMS 定例会 (京都、2019年6月)

8. 戸塚ゆ加里. 発がん性評価法としての DNA
アダクトーム解析の展望 日本毒性学会シ
ンポジウム (徳島、2019 年 6 月)

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
(H30—化学-一般-004)令和元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
分担研究課題名：*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 教授
研究協力者：煙山 紀子 東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 助教

研究要旨：本分担研究の目的は、ヒト 3D 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、ヒト 3D 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うと共に、二酸化チタンナノ粒子（JRCNM01001a・01005a）の表皮傷害性と表皮侵入性について、正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NKEK（クラボウ）を用いた単層培養系、または LabCyte EPI モデル（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）を用いたヒト 3D 皮膚再構成系において解析を行った。その結果、NHEK 単層培養系による試行では、24 時間培養だと 2 核細胞数が著しく少なくて試験が実施できず、72 時間培養することで実施可能になることが判明した。二酸化チタンナノ粒子における検討では、NHEK 単層培養系において 62.5 µg/mL 以上の 72 時間暴露において細胞障害性を示したのに対し、ヒト 3D 皮膚再構成系においては 20 mg/mL の 72 時間暴露においても細胞傷害性・病理組織学的な変化・表皮通過を示さなかった。このことから、表皮の重層構造は、二酸化チタンナノ粒子の細胞毒性を防御し得るものである可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年急ピッチで開発と実用化が進んでいるナノマテリアルの社会的受容には、十分なリスク評価と、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その低減化が必要である。加えて、欧米ではこれらのリスク評価や リスク低減が通商政策上から戦略的に実施されいていて、我が国でも同様の戦略が必須であり、そのためにはリスク評価の高度化・標準化も必須である。また、当該リスク評価に当たっては、動物福祉の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・ヒト3D皮膚再構成系 などを用いたナノマテリアルの*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、ヒト 3D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、ヒト 3D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うと共に、二酸化チタンナノ粒子（JRCNM01001a・01005a）の表皮傷害性と表皮侵入性について、正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NKEK（クラボウ）を用いた単層培養系、またはLabCyte EPIモデル（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）を用いたヒト3D皮膚再構成系において解析を行った。

B. 研究方法

1) 細胞

1-1) 単層培養系

単層培養系としては、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。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。

1-2) ヒト3D皮膚再構成系

ヒト3D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

NHEKの細胞増殖性を検討するため、keratinocyte growth factor (KGF) を用いた。小核試験の陽性対照物質としては、マイトマイシンCを用いた。陰性対照物質としては、dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いた。

2-2) 金属ナノ粒子

金属ナノ粒子としては、二酸化チタンを用いた。二酸化チタン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）から、本研究班構成者に配布されたものであるため、その物性等の詳細については渡邊博士の報告書を参照されたい。本年度の本研究では、配付されたものの内、JRCNM01001a01およびJRCNM01005aの2種類を用いた。

3) 実験および解析

被験物質への曝露は、ヒト3D皮膚再構成系において表皮組織上面から（図1）、単層培養系において培地中へ、それぞれ行った。詳細な実験条件は、結果の項に記す。細胞毒性は、細胞死による培養液中への乳酸脱水素酵素漏出（LDHアッセイ）、生細胞による3-(4,5-ジ-メチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム臭化物取り込み（MTTアッセイ）、生細胞によるテトラゾリウム塩ホルマゼン生成（WST-1またはWST-8アッセイ）を指標として、そ

れぞれ生化学的に解析した。

小核試験は、チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞CHL/IUを用いた常法の条件を改変し、マイトマイシンCの暴露から24時間後と72時間後の小核誘発について解析した。

ヒト3D皮膚再構成系においては、さらに、以下の解析を行った。

3-1) ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、表皮傷害性について病理組織学的に解析した。

3-2) 金属ナノ粒子の表皮透過性について解析するため、培地を回収してチタンの含有量をICP-MSにより測定した（東海技術センター）。

（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) 小核試験

1-1) NHEK 増殖に対する KGF の影響

培養液に KGF を 10・20・40 ng/mL とするよう添加し、3日間培養したが、KGF は NHEK の増殖に影響しなかった（図2）。

1-2) NHEK 単層培養系における小核試験

CHL/IU 細胞を用いた小核試験は常法として24時間培養で行うが、NHEK 細胞では24時間培養だと2核細胞数が著しく少なく、試験が実施できなかった。一方、マイトマイシンC（0.2 μg/mL）を3時間または6時間暴露し、計72時間培養を行って解析したところ、マイトマイシンC3時間および6時間暴露両方において、小核細胞比率を有意に増加させた（表1）。

2) 二酸化チタンナノ粒子

2-1) NKEK 単層培養系

JRCNM01001a01 は、最終濃度 500 μg/mL を最高濃度として 3.91 μg/mL まで倍々希釈を行い、24 または 72 時間曝露した。WST-8

アッセイを試みた結果、24時間培養ではいずれの用量でも細胞毒性を示さなかったが、72時間培養では62.5 µg/mL 群より濃度依存的に強い細胞毒性を示した(図3)。JRCNM01001a05も、最終濃度500 µg/mLを最高濃度として3.91 µg/mLまで倍々希釈を行い、24または72時間曝露した。WST-8アッセイを試みた結果、24時間培養では500 µg/mLの濃度曝露で細胞毒性を示した。72時間培養では濃度依存的に細胞毒性を示す傾向にあった。しかしながら、24時間・72時間培養ともに結果のバラツキが大きかった(図4)。

なお、JRCNM01001a01・001a05ともに、62.5 µg/mL以上の濃度になると、著しく凝集した。

2-2) ヒト3D皮膚再構成系

JRCNM01001a01は、最終濃度0・0.2・2・20 mg/mLで24時間または72時間曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図5)。しかし凝集が強かったため、凝集がみられない濃度を含む0・25・50・100 µg/mLで72時間曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図6)。

JRCNM01001a05、最終濃度0・0.2・2・20 mg/mL、または0・25・50・100 µg/mLで、それぞれ24時間または72時間曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図7、図8)。

病理組織学的解析において、

JRCNM01001a01・001a05は、接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった(表2、表3)。

ICP-MS解析は、JRCNM01001a01・001a05のいずれの用量でも、ヒト3D皮膚再構成系培地中にチタンを検出しなかった

(JRCNM001a05 20 mg/mLの1試料において検出限界をわずかにこえる値が得られたが、他の3試料が検出限界未満なので有意

でないと判断した)(表4)。

D. 考察

ヒト3D皮膚再構成系は、一般に培養カップの底にメンブレンフィルターがあり、その上に表皮細胞が培養されている。表皮細胞は、*in vivo*の場合と同様、上部に向かって増殖・分化し、培養時間経過と共に表層部に角質層を構築する。したがって、組織学的には、ヒト正常皮膚と類似する。本研究で用いたJ-TEC LabCyte EPI-MODELは、他の表皮組織のみタイプのヒト3D皮膚再構成系に類似し、経済協力開発機構(OECD)テストガイドライン(TG)431(*in vitro*皮膚腐食性試験)には記載されていないものの、OECD TG439(*in vitro*皮膚刺激性試験)には後から記載された。なお、OECD TG431/439は、定量的評価ができないという欠点がある。

二酸化チタンナノ粒子JRCNM01001a01は、単層培養ヒトケラチノサイトで62.5 µg/mL以上の72時間曝露で細胞毒性を示したが、ヒト3D皮膚再構成系において、20 mg/mL・72時間という高濃度・長時間の曝露においても細胞毒性を示さなかった。また、62.5 µg/mL以上の濃度になると、著しく凝集したため、ナノ粒子としての特性を失っている可能性を考慮し、凝集がみられない濃度を含む0・25・50・100 µg/mLでも試験を試みたが、やはり細胞毒性は認められなかった。JRCNM01005aにおいても、結果は同様の傾向であったが、粒子がきわめて細かいため、結果のバラつきが大きかった。以上より、表皮の重層構造は二酸化チタンナノ粒子の細胞毒性に対して防御効果を発揮することが示唆された。二酸化チタンナノ粒子が単層培養したヒトケラチノサイトを傷害した事実は、それをサポートするものである。さらに、ヒト3D皮膚再構成系の培地においてチタンを検出しなかったことから、本研究で用いた二酸化チタンナノ粒子JRCNM01001a01・001a05は表皮の重層構造を通過しないと考えられ、そのことが表皮

の重層構造が二酸化チタンナノ粒子の細胞傷害作用に対する防御効果に関与する可能性が示唆された。

なお、本研究で用いた二酸化チタンナノ粒子JRCNM01001a01・001a05は、いずれも凝集がしやすく、正確な評価の為に、分散制御方法の見直しも必要だと考えられた。

本年度の小核試験の試行において、NHEKを用いた小核試験では細胞増殖活性が低く、CHL/IU細胞を用いた常法と同条件では2核細胞および小核の検出が極めて困難であった。この課題を解決するため、KGF処置による細胞増殖促進と、培養時間延長の2つの実験条件の効果を検討した。その結果、KGF添加によってもNHEKの細胞増殖率にはほぼ変化が見られず、この方法は有用でないことが判明した。一方、培養時間を常法の24時間から72時間まで延長させる条件下では、マイトマイシンC暴露による小核の誘発を確認した。以上の結果から、NHEKを用いた小核試験は、72時間培養を行うことで実施可能であることが判明した。ヒト3D皮膚再構成系における小核試験については、来年度に検討する予定である。

E. 結論

NHEKを用いた小核試験は、培養時間を72時間まで延長することで実施が可能と判明した。今後はヒト3D皮膚再構成系を用いた小核試験への応用について検討していく予定である。

本研究で用いた二酸化チタンナノ粒子は、NHEK単層培養系において細胞傷害を示したが、ヒト3D皮膚再構成系において当該傷害

が防御された。この細胞傷害防御には、表皮の重層構造と、それによる二酸化チタンナノ粒子の通過阻止が関与している可能性が示唆された。一方、二酸化チタンナノ粒子は凝集しやすく、これらの正確な評価の為に分散制御方法の再検討が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 政所陽菜 他. ヒト3D皮膚再構成系によるfolpetの経皮毒性評価法の検討. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2020年2月13日，東京都世田谷区）.
2. 小川秀治 他. ヒト3D皮膚再構成系を用いた金属ナノマテリアルの経皮膚毒性評価. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2020年2月14日，東京都世田谷区）.

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

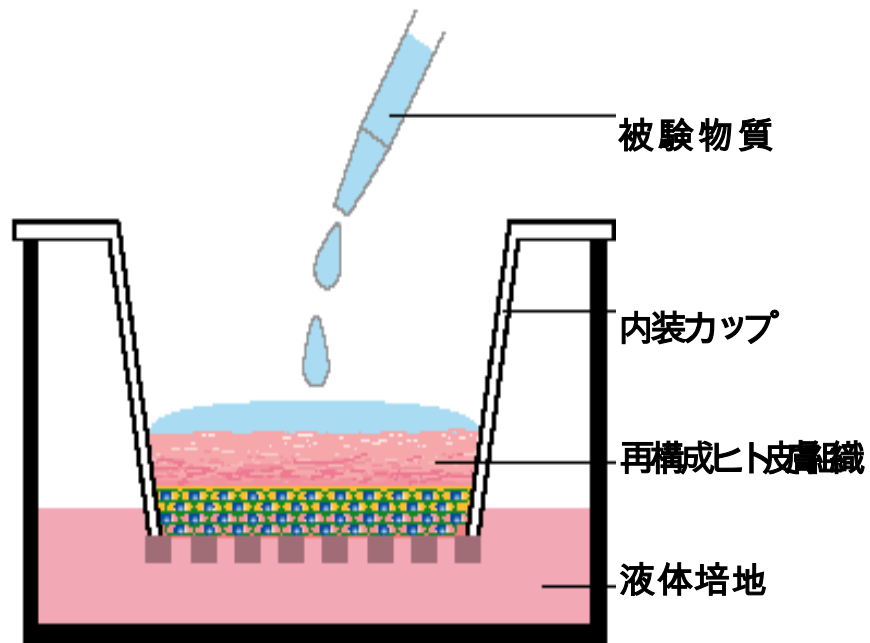


図1. LabCyte EPI 24 モデル

WST-1 assay

(800 cells/well)

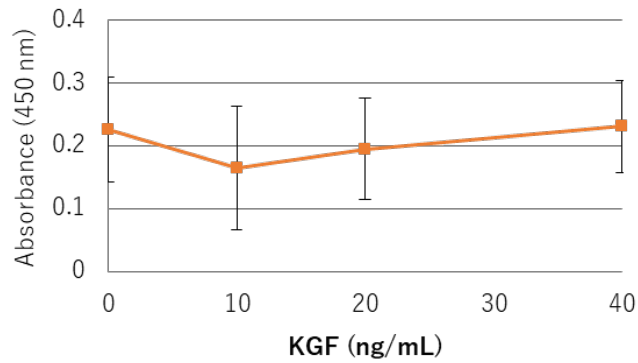


図 2. NHEK の増殖に及ぼす KGF の影響

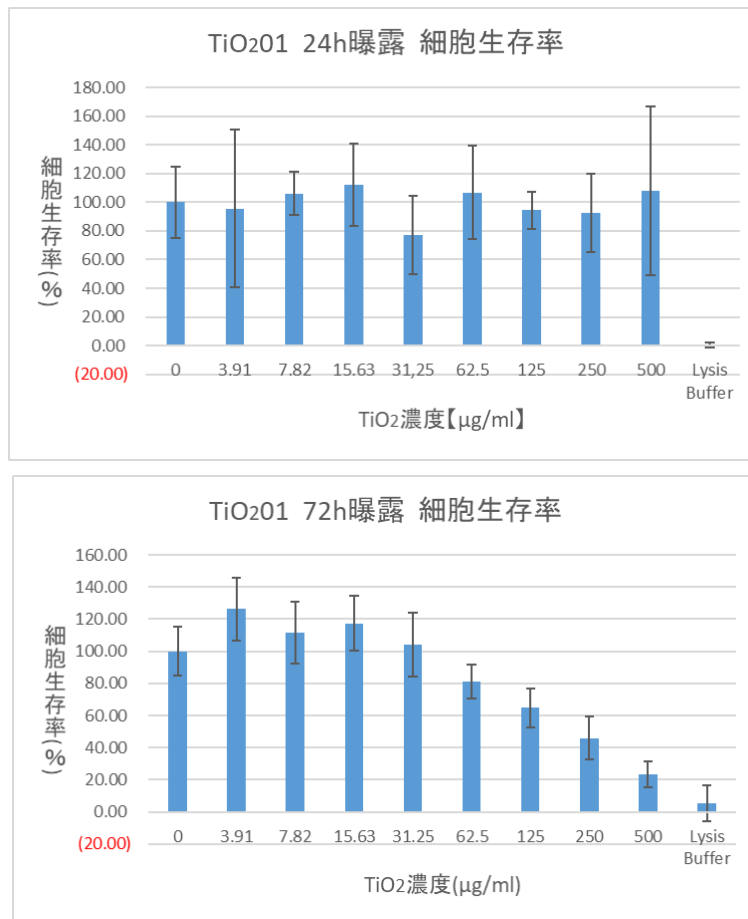


図 3. JRCNM01001a01, NHEK 単層培養系, 細胞毒性 (WST-8 アッセイ; 縦軸, %; 横軸, μg/mL)

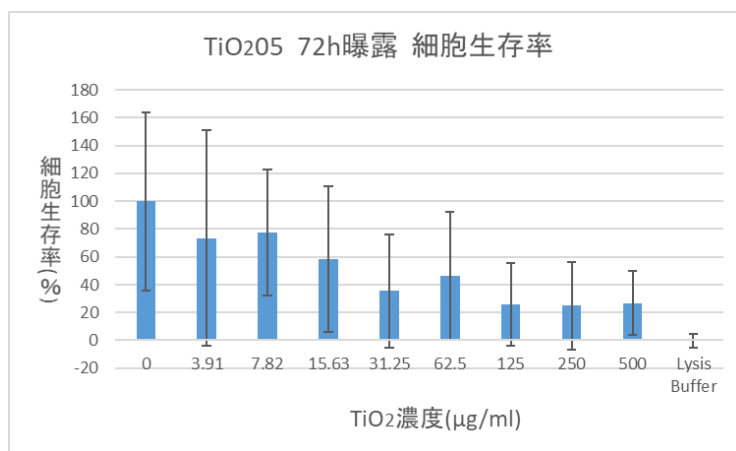
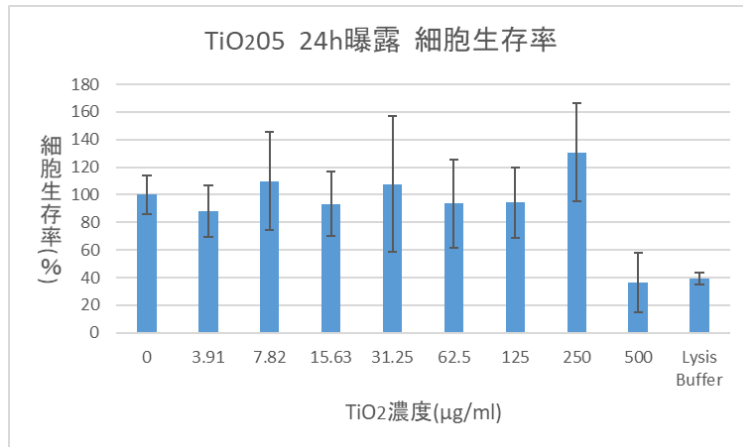


図 4. JRCNM01001a05, NHEK 単層培養系, 細胞毒性 (WST-8 アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

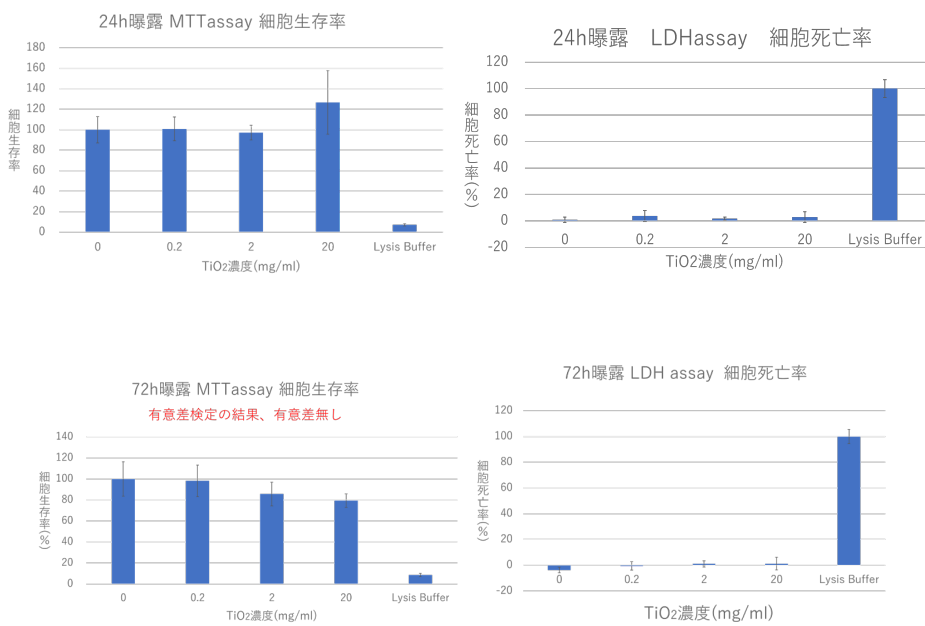


図 5. JRCNM01001a01, ヒト 3D 皮膚再構成系, 細胞毒性 (MTT アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

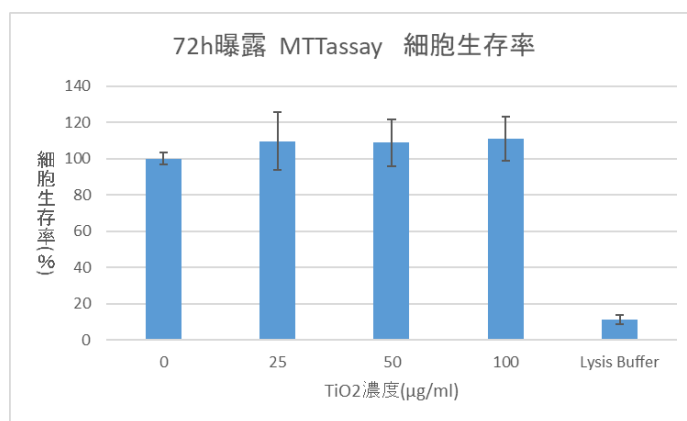


図 6. JRCNM01001a01, ヒト 3D 皮膚再構成系, 細胞毒性 (MTT アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

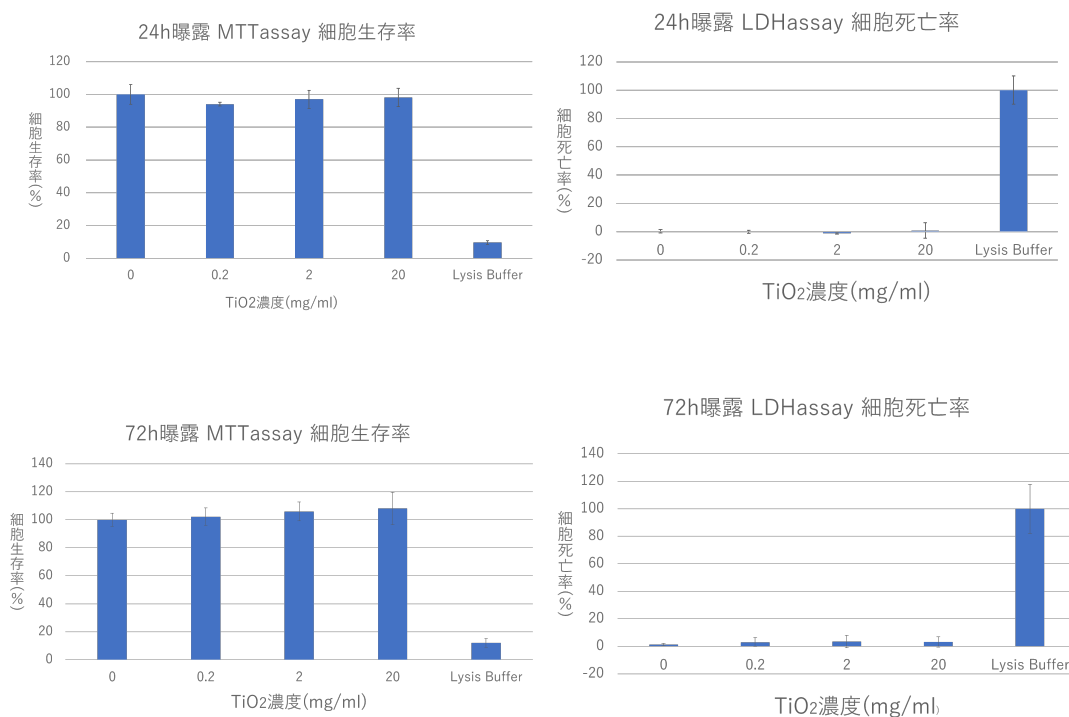


図 7. JRCNM01001a05, ヒト 3D 皮膚再構成系, 細胞毒性 (MTT アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

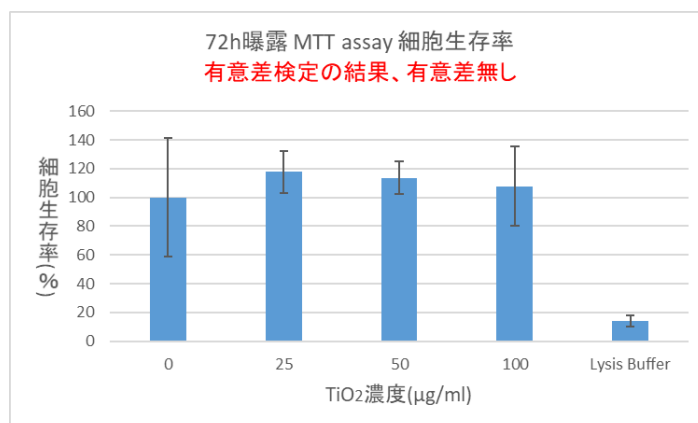


図 8. JRCNM01001a05, ヒト 3D 皮膚再構成系, 細胞毒性 (MTT アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

表 1. NHEK を用いた小核試験における培養時間の検討*: p < 0.01 (カイ2乗検定): 2核細胞が少数のため実施せず

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

表 2. ヒト 3D 皮膚再構成系 組織観察 所見
TiO₂JRCNM01001, 0・0.2・2・20 mg/mL 72 時間暴露

項目	ミリQ-1	ミリQ-2	ミリQ-3	ミリQ-4	0.2-1	0.2-2	0.2-3	0.2-4	2.0-1	2.0-2	2.0-3	2.0-4	20.0-1	20.0-2	20.0-3	20.0-4
基底層の層数	8	9	9	9	9	9	8	9	9	10	8	10	8	8	9	8
角質近くの核の個数(1視野当たり)	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1
顆粒の出現	4	4	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5
顆粒の塊の有無	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
細胞整列の乱れ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
変性																
①空胞化の有無	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
②核の隣以外での空胞化の有無	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
③角質での核の有無	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

表 3. 3D 再構成皮膚系 組織観察 所見
TiO₂JRCNM01005, 0・0.2・2・20 mg/mL 72 時間暴露

項目	0.2-1	0.2-2	0.2-3	0.2-4	2.0-1	2.0-2	2.0-3	2.0-4	20.0-1	20.0-2	20.0-3	20.0-4	Lysis Buffer-1	Lysis Buffer-2	Lysis Buffer-3	Lysis Buffer-4
基底層の層数	8	8	9	7	8	7	6	7	8	8	7	10	7	8	7	8
角質近くの核の個数(1視野当たり)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	0	0	0	0
顆粒の出現	5	5	5	5	6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
顆粒の塊の有無	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
細胞整列の乱れ	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
変性																
①空胞化の有無	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
②核の隣以外での空胞化の有無	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
③角質での核の有無	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

尚、表 2 と表 3 における陰性対照群(ミリ Q) および陽性対照群(Lysis Buffer)は、共通とする。

表 4. ヒト 3D 皮膚再構成系 培地中チタン濃度

試料名	Ti 結果(μ g/g)
Control 1	<0.5
Control 2	<0.5
Control 3	<0.5
Control 4	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 0.2mg/mL 1	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 0.2mg/mL 2	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 0.2mg/mL 3	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 0.2mg/mL 4	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 2mg/mL 1	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 2mg/mL 2	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 2mg/mL 3	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 2mg/mL 4	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 20mg/mL 1	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 20mg/mL 2	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 20mg/mL 3	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01001a 20mg/mL 4	<0.5
Control 5	<0.5
Control 6	<0.5
Control 7	<0.5
Control 8	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01005a 0.2mg/mL 1	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01005a 0.2mg/mL 2	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01005a 0.2mg/mL 3	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01005a 0.2mg/mL 4	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01005a 2mg/mL 1	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01005a 2mg/mL 2	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01005a 2mg/mL 3	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01005a 2mg/mL 4	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01005a 20mg/mL 1	1.0
TiO ₂ JRCNM 01005a 20mg/mL 2	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01005a 20mg/mL 3	<0.5
TiO ₂ JRCNM 01005a 20mg/mL 4	<0.5

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
(H30-化学-一般-004)令和元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
分担研究課題名：(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：二年度目は細胞内網羅的遺伝子発現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生命科学系データベースを調査して決定した。生体影響予測の基盤となる機械学習における学習用遺伝子発現サンプル情報のラベリング方法および入力特徴量の調整と検討を行なった。また、マイクロアレイ解析の一色法と二色法のデータを双方利用するため相互のデータ変換法の開発を進めた。他の分担研究と比較するため標準ナノマテリアルとして二酸化チタン曝露時の毒性試験の実施および遺伝子発現マイクロアレイ解析の準備を行なった。

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。

本年度は、細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築法および機械学習の予測モデルを実際に開発することを目的とした。具体的には、遺伝子発現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生命科学系データベースを決定し、機械学習における学習用サンプル情報のラベリング方法および入力特徴量の調整と検討、マイクロアレイ解析の一色法と二色法のデータ変換法の開発、標準ナノマテリアルとして酸化チタン曝露時の毒性試験の実施および遺伝子発現マイクロアレイ解析を目指した。

B.研究方法

B-1. ZnO 曝露細胞の一色法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 μ g/mL (THP-1 細胞) または

60 μ g/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：一色法
- 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 Surescan G2600D
- 画像数値化処理ソフトウェア：Agilent Feature Extraction v11.5

B-2. マイクロアレイの一色法と二色法の比較

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

表 1 ZnO 曝露実験におけるマイクロアレイ(一色法)

Slide ID	Slide No.	Pos.	B bck	Cy3
AH73	257236319389	1_1	B1	THP-1_Zn0=0 μ g/mL_6hr
AH73	257236319389	1_2	B2	THP-1_Zn0=300 μ g/mL_6hr
AH73	257236319389	1_3	B3	THP-1_Zn0=0 μ g/mL_24hr
AH73	257236319389	1_4	B4	THP-1_Zn0=300 μ g/mL_24hr
AH73	257236319389	2_1	B5	A549_Zn0=0 μ g/mL_6hr
AH73	257236319389	2_2	B6	A549_Zn0=60 μ g/mL_6hr
AH73	257236319389	2_3	B7	A549_Zn0=0 μ g/mL_24hr
AH73	257236319389	2_4	B8	A549_Zn0=60 μ g/mL_24hr

め、同一サンプルに対して実施した一色法と二色法のデータを比較し、そのデータ変換の妥当性を検証することとした。一色法のデータはプローブとハイブリダイズしたサンプル量に比例し、二色法のデータは 2 種

類のサンプルのプロープへの競合ハイブリダイゼーションの結果である。そのため、一色法で測定した2つのサンプルのシグナル強度を S_A , S_B とすると、二色法のデータへの変換式は S_A/S_B と書ける。一色法のデータから二色法にデータ変換したものと二色法で測定したデータを相関係数などで比較した。

B-3. 二酸化チタンの毒性評価

標準ナノマテリアルとして酸化チタンのナノ粒子を使用することとし、まずは毒性評価を行なうため WST-8 アッセイを実施した。評価を行なった酸化チタンは国立医薬品食品衛生研究所より分与された以下の7サンプル。

- MT-150A (Lot#651105)
- MT-500B (Lot#1880902)
- AMT-100 (Lot#181102)
- TKP-102 (Lot#4190101)
- AMT-600 (Lot#6553)
- TiO₂ (Lot#1001)
- TiO₂ (Lot#1005)

WST-8 アッセイには株式会社同仁化学研究所の Cell Counting Kit-8 (CCK-8) を使用した。細胞は THP-1 細胞と RAW264 細胞を用いて、それぞれ 500,000cells/mL, 70,000cells/mL に調製した。96 ウェルプレートにそれぞれ 50 μ L/well, 100 μ L/well で播種した。THP-1 細胞には酸化チタンを 50 μ L/well 添加し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間後に CCK-8 を 10 μ L/well 添加し 4 時間後に波長 450nm で吸光度を測定した。RAW264 細胞は播種から 24 時間後に培地を除去してから酸化チタンを 100 μ L/well 添加し、さらに 24 時間後に CCK-8 を同様に添加して測定した。

なお、酸化チタンのナノ粒子の大きさは動的光散乱光度計 (DLS) により測定した。

C. 研究結果

C-1. ZnO 曝露細胞のマイクロアレイ解析

発現強度 (生データ) : 全 8 アレイの発現強度データの分布を表 2 と図 1 に示す。なお、図はボックスプロットで、縦線の下端が最小値、箱の下端が第 1 四分位値、箱の中線が中央値、箱の上端が第 3 四分位値、縦線の上端が最大値を表す。今回は一色法のデータであるため、アレイ間の発現強度は直接比較することができない。そのためノーマライズ処理を行なう。

発現強度 (ノーマライズ) : ノーマライズ方法は第 3 四分位値を基準とする 75 パーセンタイル法を使用

した。ノーマライズした結果を表 3 と図 2 に示す。発現強度の分布は概ね均等である。

発現強度 (プローブ) : 今回使用したマイクロアレイスライドはスポット数としては 1 アレイあたり 60,901 個あるが、1 つのプローブが複数のスポットにある場合があるので、プローブ単位で発現強度をまとめた。なお、プローブの総数は 58,201 個である。

階層的クラスタリング : 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 22,003 個の発現強度データで階層的クラスタリングを行なった (図 3)。まず、THP-1 細胞と A549 細胞でクラスタが大きく分かっている。そしてそれぞれの細胞において ZnO に暴露したかしていないかでクラスタが分かれた。6 時間後と 24 時間後の違いは比較的小さいことが分かった。また、A549 細胞よりも THP-1 細胞の方が ZnO の影響が大きいことが明らかになった。

C-2. マイクロアレイの一色法と二色法の比較

今回の一色法で測定したマイクロアレイ解析のデータと前年度に二色法で測定したデータを比較すること

表 2 マイクロアレイ解析発現強度分

サンプル	AH7381	AH7382	AH7383	AH7384	AH7385	AH7386	AH7387	AH7388
スポット数	60901	60901	60901	60901	60901	60901	60901	60901
検出数	33242	43488	39214	42951	38535	35137	35718	38237
検出割合 (%)	54.6%	71.4%	64.4%	70.5%	63.3%	57.7%	58.7%	62.8%
最小値	4	3	3	3	4	4	4	4
第1四分位値	19	13	14	13	16	16	16	15
中央値	101	78	94	65	95	94	102	83
第3四分位値	683	650	617	508	813	753	696	698
最大値	261313	307037	267933	277060	291821	275938	291556	302015
算術平均	1749	2210	2513	1660	2595	2315	2377	2180
標準偏差	8175	11219	11144	8468	11569	10924	10282	10238

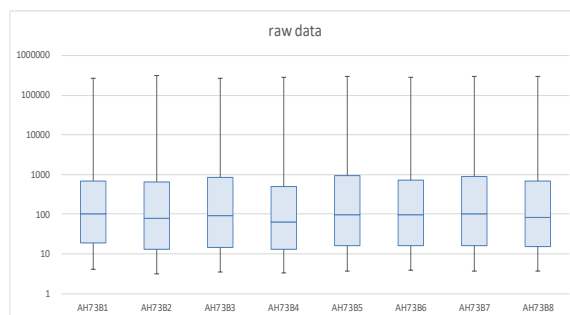


図 1 マイクロアレイ解析発現強度分布 (生データ)。

とした。使用したデータは、プローブ単位でまとめたデータのうち、RefSeq に該当する 25,685 プローブの

データ。二色法で測定した ZnO/ctrl の発現比（2 を底とする対数）4 種類（THP-1 細胞と A549 細胞それぞれについて 6 時間後と 24 時間後）に対応する一色法の発現強度 S_A と S_B から $\ln(S_A/S_B)$ で発現比を求めた。そして、横軸に一色法から求めた発現比を縦軸に二色法による発現比をプロットしたのが図 4 である。

THP-1 細胞の 6 時間後、A549 細胞の 6 時間後と 24 時間後は一色法と二色法のデータが一致する傾向を示している。ピアソンの相関係数を求めるとそれぞれ 0.763, 0.898, 0.884 と高い値であった。しかしながら、THP-1 細胞の 24 時間後では一色法のデータと二色法のデータの相関性が低く、相関係数も 0.255 と低かった。この原因は不明であるが、THP-1 細胞の 24 時間後の ZnO 暴露またはコントロールのサンプルに問題があった可能性がある。

参考のため一色法と二色法のデータで異なるサンプルの発現比の相関係数も求めた（表 4）。THP-1 細胞と A549 細胞の間での相関係数は 0.45 を下回っており発現パターンの差が大きいことが分かる。A549 細胞の 6 時間ごと 24 時間後の間では 0.714 と比較的高く発現パターンが近いことが分かる。一方で THP-1 細胞の 6 時間ごと 24 時間後の間では 0.235 と細胞間の相関係数よりも低く原因は不明である。

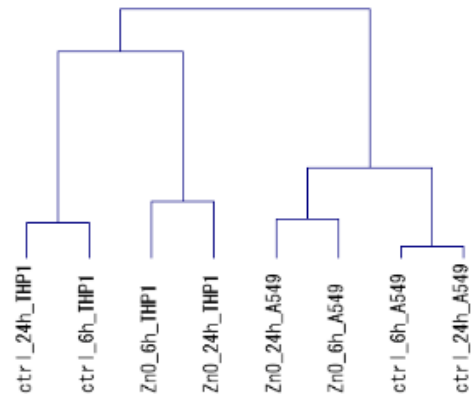


図 3 階層的クラスタリン

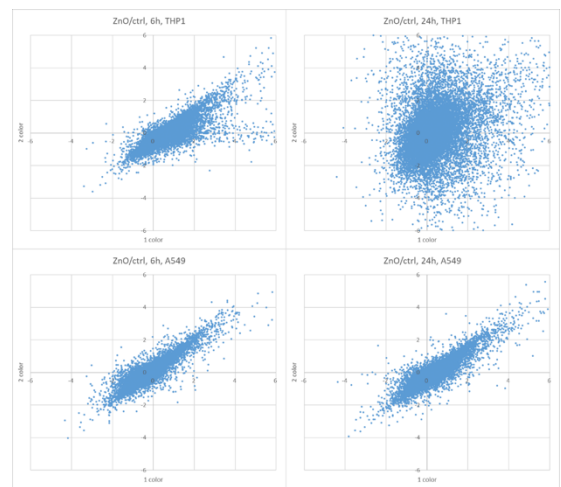


図 4 マイクロアレイ解析の一色法と二色法の比較

表 3 マイクロアレイ解析発現強度分

サンプル	AH7381	AH7382	AH7383	AH7384	AH7385	AH7386	AH7387	AH7388
スポット数	60901	60901	60901	60901	60901	60901	60901	60901
検出数	33242	43488	39214	42951	38535	35137	35778	38237
検出割合 (%)	54.6%	71.4%	64.4%	70.5%	63.3%	57.7%	58.7%	62.8%
最小値	6	5	4	6	4	5	4	5
第1四分位数	28	20	17	26	17	22	18	22
中央値	148	119	111	128	104	129	114	118
第3四分位数	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
最大値	382452	472686	316311	545421	319670	376275	325505	432948
算術平均	2560	3402	2966	3268	2843	3157	2654	3124
標準偏差	11964	17272	13153	16670	12673	14895	11479	14673

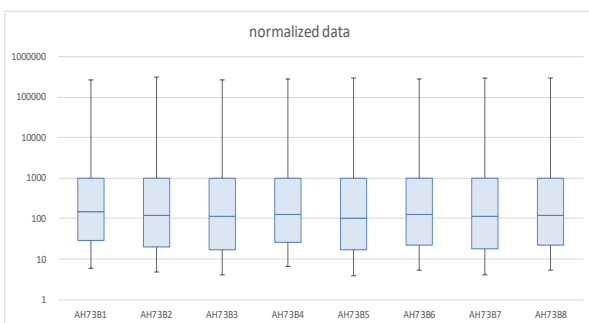


図 2 マイクロアレイ解析発現強度分

表 4 マイクロアレイ解析の一色法と二色法のデータのピアソンの相関係数。

		2color			
		ZnO/ctrl 6h THP1	ZnO/ctrl 24h THP1	ZnO/ctrl 6h A549	ZnO/ctrl 24h A549
1 color	ZnO/ctrl 6h THP1	0.763	0.235	0.344	0.328
	ZnO/ctrl 24h THP1		0.255	0.441	0.419
	ZnO/ctrl 6h A549			0.898	0.714
	ZnO/ctrl 24h A549				0.884

C-3.酸化チタンの毒性評価

標準ナノマテリアルとして酸化チタンのナノ粒子の使用することとした。これにより各分担研究間の比較も可能となる。まずは MMT-8 アッセイによる毒性評価を行なった（図 5、図 6）。浮遊細胞の THP-1 細胞に対しては 7 種類とも顕著な影響は認められなかった。一方で付着細胞の RAW264 細胞においては、MT-

150A, MT-500B, TiO₂-1005 の3種類では影響がみられなかったものの、AMT-100, AMT-600, TKP-102, TiO₂-1001 の4種類では毒性が認められた。THP-1 細胞と RAW 細胞で実験の日時に差があり、ナノ粒子径はその都度 DLS により測定したが多少のばらつきがある。しかしながら、RAW 細胞に毒性を示した酸化チタンとナノ粒子径との間に相関は認められない。

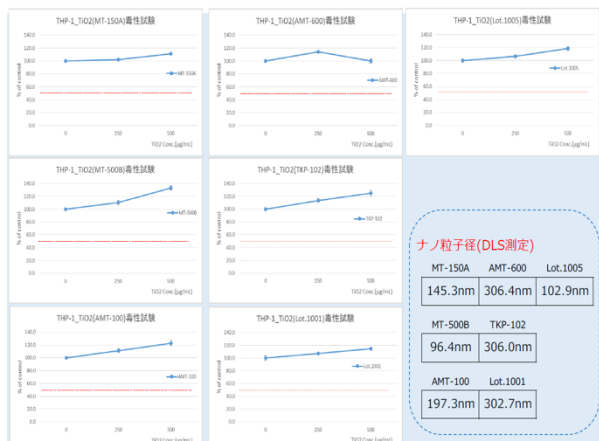


図5 THP-1細胞に対する酸化チタンの毒性評価。

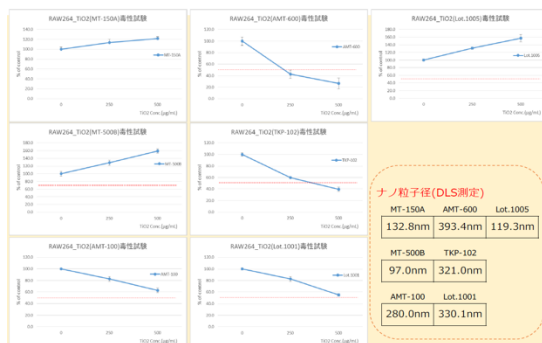


図6 RAW264細胞に対する酸化チタンの毒性評価。

D.考察

網羅的遺伝子発現データとしてマイクロアレイ解析のデータを利用する際には原理的に一色法と二色法の2種類のデータがあり、それらを双方ともに扱うにはデータの変換が必要となる。原理的には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。前年度に実施した二色法のデータに対して本年度は同じサンプルについて一色法によるマイクロアレイ解析を行い、二色法と比較した。一色法のデータか

ら二色法のデータに変換した結果、4つのケースのうち3つでは良好な対応関係が見られた。しかしながら、残り1つのケースでは適切な対応関係が得られなかった。原因は実験サンプルの問題と思われるが、データ変換について良好な対応が見られる場合でもピアソンの相関係数は高々0.76~0.90となっており、一色法から二色法にデータ変換した場合にはこれくらいの誤差を含むことに留意する必要がある。一方で二色法から一色法への変換についても考えると、二色法における2つのサンプルのうち1方の発現強度について既知であれば、変換は可能と思われる。

生命科学系データベースとしてマイクロアレイ解析の生データが登録されているGEOデータベースを選択したが、サンプル条件などのラベル付けが課題である。今のところ手動でラベルを付けているが、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、前年度に行なったGene Ontology エンリッチメント解析のような結果をラベルとして利用することも検討しているが、有意な結果がないケースがあるので、利用は限定的となる。

機械学習を実行する上で、ヒトの遺伝子の数はRefSeqデータベースに限っても26,000個ほどもあるため、入力特徴量としては扱いにくい。そのため顕著の遺伝子に限定して1/10程度の量に減らしてモデルを作成し機械学習を実行させている。この部分の効率的なデータの選択が本研究において重要である。

実測データとしてZnOを曝露した細胞の系を扱っていたが、他の分担研究と協調するためにも共通となる標準ナノマテリアルを使うことが適切として酸化チタンのナノ粒子を用いることとした。今回は7種類に酸化チタンについて毒性評価を行なったが、THP-1細胞とRAW264細胞で異なる結果を示すナノ粒子もあった。これらについてマイクロアレイ解析も実測し、機械学習のモデルを検証するデータとして利用したい。

以上を踏まえて、次年度は機械学習における学習用サンプル情報のラベリング方法および入力特徴量の調整・検討の結果とマイクロアレイ解析の一色法と二色法のデータ変換法の開発を元に、中途であった最小規模のデータベースの構築を完成させ、拡大・拡張する。機械学習の実行にあたってはアルゴリズムの最適化が解決すべき課題となる。標準ナノマテリアルとして酸化チタン曝露時の実測した遺伝子発現マイクロアレイ解析結果を用いて生体影響予測の精度を検討す

る。最終的には完成したデータベースと生体影響予測機能を提示する。

E.結論

本年度は、細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築法および機械学習の予測モデルを開発することを目的として、網羅的遺伝子発現データの基礎となるマイクロアレイ解析の一色法と二色法について検討し、一定の精度で一色法から二色法へのデータ変換を行なうことができた。機械学習における学習用サンプル情報のラベリング方法および入力特徴量の削減方法について検討した。分担研究間で共通して使用する標準ナノマテリアルとして酸化チタンのナノ粒子を採用し曝露時の毒性試験を実施した。

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）
（H30-化学-一般-004）令和元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
分担研究課題名：*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：ナノマテリアルは、同じ物質でも粒径サイズが 1–100 nm と定義されており結晶構造など物性の違いにより、多彩な機能を生ずる特性を有している。近年、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の拡大と共に、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法が必要とされる。国内では、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）では、ナノマテリアルの規制に向けた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）を公開している。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て *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、5 種の二酸化ケイ素ナノ粒子（SiO₂ NPs: NM200、NM201、NM202、NM203、NM204）について、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムで作成し評価文書およびナノマテリアルの公開データベース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・整理を行い、解析に資するデータの資料作成を実施した。さらに収集・整理した物理化学的性状と有害性情報との関連性について多変量解析法を実施し、本解析手法の有用性について検討した。

A. 研究目的

2011 年に欧州において、ナノマテリアルの定義が確定し、各国でナノマテリアルに対する登録制度に向けて整備を進めている。しかし、一般の化学物質の登録システムを中心としていることから、食品接触剤、医療器具、化粧品、農薬、食品および飼料は適応除外となっている。さらに、ナノマテリアルの安全性や暴露に関するような情報の十分なデータについては、未だ乏しい状況である。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について問題となっている。また、近年、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。冒頭で述べたように、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、一方、国内では、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を指摘している。

二酸化ケイ素（SiO₂）のナノ粒子は、医薬品・食品等では吸湿防止、流動性向上、歯磨き粉の研

磨剤などや、ゴムの強度向上、インク・塗料では発色や着色性の向上のため等、工業的にも幅広く利用されている。また、二酸化ケイ素ナノ粒子の結晶多形は、圧力や温度などの条件により様々に形成し、結晶質や、非晶質(アモルファス)に大別される。

国際がん研究機関 (IARC)は、結晶質シリカ (石英やクリストバル石 CAS:14808-60-7) をヒトへの発がん物質 (グループ 1) と分類している。炭素 (C) とケイ素 (Si) の 1:1 の化合物である髭状炭化ケイ素(CAS: 409-21-2)は、ヒトに対しておそらく発がん性がある物質 (グループ 2 A)、また、繊維状炭化ケイ素(CAS: 308076-74-6) はヒトに対して発がん性の可能性がある物質 (グループ 2 B)、非晶質二酸化ケイ素のヒトへの発ガン性は分類できない (グループ 3) としている。しかし、二酸化ケイ素のナノ粒子の安全性評価は進んでおらず、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。

ナノマテリアルの特性から、その有害性は他の化学物質とは異なることが指摘されており、ナノマテリアル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法が必要となる。しかし、現状ではこうした評価を行うための情報が殆ど整理されていない。近年、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムでは、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収載した dossier(ドシエ: 安全性データ集)試験データの報告書を公開している。

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、二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NPs) について、OECD の dossier およびナノマテリアルの公開データベース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。

B. 研究方法

1. 対象物質

OECD ウェブサイト上の Silicon dioxide - Manufactured nanomaterial¹にて公表されている Summary dossier²に収載された二酸化ケイ素ナノ粒子 (NM-200、NM-201、NM-202、NM-203、NM-204) を対象とした (Table 1)。

2. 調査対象情報源

以下の情報源を調査対象情報源とした。

(1) OECD 関連資料

Summary dossier 及び関連する個別 dossier、ANNEX の情報を収集した。各調査対象物質に関連する個別 dossier 及び ANNEX の情報を収集した (Table 2)。

(2) eNanoMapper³

EU FP7 eNanoMapper project で開発されたナノマテリアルの毒性データベース <https://data.enanomapper.net/> (以下、「eNanoMapper」と記載)。eNanoMapper に収載された情報のうち、*in vitro* 細胞毒性試験に関するエンドポイントを対象とした (Table 2)。

(3) 文献情報⁴⁻³⁶

(1)、(2) に収載された情報について原著文献の収集を行い、文献に記載された情報を収集整理の対象とした。

3. 情報整理の項目

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

組成、凝集、結晶子サイズ、比表面積、ゼータ電位、表面化学、その他のプロパティとして約 62 項目についてデータを収集・整理を行った (Table 3)。

(2) 有害性情報

以下のエンドポイントを情報整理の対象とした。

- 反復投与毒性試験 (吸入暴露経路: 17 試験、気管内投与経路: 5 試験)

試験種類、動物種、試験条件の他、Endpoint として BAL 細胞数の増加、炎症、生化学値等の変動

が生じた LOAEL 等について、約 519 項目の調査し収集・整理を行った (Table 7)。

➤ *in vivo/ in vitro* 遺伝毒性試験

試験種類、試験動物、細胞種、試験条件、結果 (陽性/陰性等) を収集・整理した (Table 4、Table 5)。

➤ *in vitro* 細胞毒性試験

試験種類、細胞種、試験条件、結果 (EC₅₀ 等) を収集・整理した (Table 6)。

尚、eNanoMapper については、以下の 4 項目を収集対象とした。

- LDH release assay
- Cell viability assay
- Cytotoxicity assay
- Genotoxicity assay

4. 情報整理及びデータベース (DB) 搭載用の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 (Table 7)。

5. 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物質間の類似性や毒性の変動に寄与している物理化学的性状について同定した。

➤ 物理化学的情報に基づく主成分分析法

(PCA : Principal Component Analysis) からによる階層的クラスタリング解析の実施 (Figure 1A、Figure 1B)

➤ 収集したデータに基づく物理化学的性状情報と毒試験情報との関連性についての直交部分的最小二乗回帰分析 (OPLS : Orthogonal Partial Least Squares Regression) の実施 (Figure 2)

➤ OPLS 法 : X 変数を使って Y 変数のモデルを構築し、X から Y を予測する PLS 法の改良型であり、今回の解析では X を説明変数として物性値とし、Y を目的変数として毒性値を設定した。

C. 研究結果

SiO₂ NPs の解析用データシートの作成および解析方法

1. 物理化学的性状

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。これらのデータは主に OECD からの情報に基づいて作成しており、約 62 項目のデータを収集した。

➤ データマイニング

- Particle size, size distribution : Elementary particle size of agglomerated Silica (nm)の NM200 は平均値を算出した。
- Composition : impurity の各項目について、下限値を採用した。
- Agglomeration/aggregation : Isoelectric Point (Mean) (pH)について、2 : <2、3 : 2-4 と定義した。
- Shape : Sphericity について、1: low / 2: low to medium / 3: medium と定義した。
- Solubility : NM203 は平均値を採用。NM204 は 1mol=60.08430g から換算した。

2. 階層的クラスタリング解析

収集・整理した SiO₂ NPs の物理化学的性状についてデータマイニングをした後、PCA 解析後 (Figure 1A)、階層的クラスタリング解析を実施した。その結果、全 5 物質の SiO₂ NPs の 62 項目についてクラスター化し類似性が示された (Figure 1B)。

3. 反復投与吸入毒性試験結果および多変量解析

有害性情報の項目において反復投与毒性試験 (吸入暴露および気管内投与試験) では、吸入暴露試験が 17 試験、気管内投与試験が 5 試験の毒性試験データについて収集した。これらの試験種

類、動物種、試験条件の他、EndpointとしてBAL細胞数の増加、炎症、生化学値等の変動が生じたLOEL等について、合計約519項目について調査し、収集・整理を行った。

➤ 吸入毒性試験

- 収集・整理した反復投与吸入毒性試験の中で、OECDのテストガイドラインTG412に準拠しTNO Division of Nutrition and Food Research, Zeist (NL)で実施された亜急性吸入毒性試験結果では、Wister雌雄ラット(NM202, NM203は雄ラットのみ)に各種SiO₂ナノ粒子[NM200: 粒径: Mass median aerodynamic diameter (MMAD) (μm): 2.83-3.27、NM201: MMAD (μm): 2.83-3.27、NM202: MMAD (μm): 1.2-1.3 or 2.2-3.5、NM203: MMAD (μm): 1.2-1.3 or 2.2-3.5、NM204: MMAD (μm): 2.83-3.27]を含むエアロゾルを1.16 (±0.36), 5.39 (±0.58)および25.2 (±1.5) mg/m³の濃度で、5日間(6時間/日)吸入暴露した。試験結果では、肺の絶対及び相対重量の増加肺間質の細胞浸潤・繊維化が認められた。
- 気管支肺胞洗浄液(BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid)中の多形核白血球(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)の増加が認められたことから、これらの肺炎症所見のEndpointを中心に解析対象とした。気管内投与毒性試験結果では、SD雌雄ラットに各種SiO₂ナノ粒子(NM200、NM201、NM202、NM203)を含むサンプル溶液を3、6及び12 mg/kg体重の濃度で、サンプリング前の48、24、3時間前にそれぞれ3回、気管内注入が実施されていた。試験結果では、全てのSiO₂ナノ粒子において、考慮された用量にかかわらず、最小用量(3 mg/kg重量)でBAL中のPMN数、総細胞数、酵素活性(LDH, ALP, γ-GTP (GGT)等)、好中球数の有意な増加がみられたことにより肺への炎症所見が確認された。従って、気管内投与毒性試験

を実施した全てのSiO₂ NPsにおいて最小用量で炎症所見がみられたことから解析には至らなかった。

- 多変量解析(直交部分的最小二乗回帰分析: Orthogonal Partial Least Squares Regression, OPLS法)
OECDのテストガイドラインTG412に準拠し実施された亜急性吸入毒性試験結果において、病理組織学的所見の結果からBALF中の総蛋白のLOEL値(NM200: 26.2 mg/m³、NM201: 26.2 mg/m³、NM202: 5.41 mg/m³、NM203: 5.41 mg/m³、NM204: 26.2 mg/m³)からの5物質間の毒性の強さはNM202・NM203 > NM200・NM201・NM204であった。物性値(項目)と有害性情報との関連性について調べるため、収集した物性値と各SiO₂ NPsのLOEL値を用いて、OPLS法による多変量解析を実施した(Figure 2)。Figure 2で、横軸はY変数(毒性値)の変動、縦軸はX変数(物性: Y変数グループ内の変動)を示した。従って、本解析法により毒性と関連する物性値が横軸から探査可能であることが示唆された。さらに解析を進めた結果、毒性に寄与する変数(物性)の共通項目として、毒性の強い化合物は、Impurity(Si)、Coating: 無し、Morphology of aggregates/agglomerates (nm): 凝集体の形態: Angular・low sphericity、Specific surface area (m²/g)のSAXS surface (m²/g): 空孔や、BET surface (m²/g): 比表面積、Impurity(S/Na/Mg/Zr/K)等の相関の高い物性項目の組み合わせが挙げられた。

4. HESS DB搭載のための情報整理およびデータシート作成

HESS搭載用に規格化されたシートをひな形として用いて今回情報収集したSiO₂ NPsのデータコンテンツに特化した項目を追加した。その結果、実施期間、被験物質、試験動物、試験条件情報等について約26項目と、毒性試験結果情報(NOEL、LOEL)血液学的検査、生理学的検査、尿の一般検査、病理組織学的所見等の約493項目について、新たな規格データシートを作成し

た (Table 7)。

5. *in vivo* / *in vitro* 遺伝毒性試験 (OECD による試験対象物質は 4 物質 : NM200-NM203)

in vivo / *in vitro* 遺伝毒性試験および *in vitro* 細胞毒性試験では、試験種類、試験動物、細胞種、試験条件、曝露量 (時間)、陽性/陰性、EC₅₀ 等の計 7 項目について収集・整理を行った。

in vivo の遺伝毒性試験結果は、いずれの試験データからも陽性は認められなかった (Table 4)。

しかし、*in vitro* 遺伝毒性試験の Comet 試験結果 (試験対象物質は 4 物質 : NM200-NM203) は、A549 細胞 (3h) で NM203 を除く 3 物質間、24 h で NM200 を除く NM201、NM202、NM203 の 3 物質間にて陽性を示した (Table 5)。一方、Caco-2 細胞では、3h で NM201 を除く 3 物質間、24 h で 4 物質間全てに陽性を示した (Table 5)。

OECD TG 487 試験法に準拠した Micronucleus 試験 (試験対象物質は 4 物質 : NM200-NM203) 結果は、A549 細胞 (48 h) で NM201、NM202 の 2 物質間で陽性を示した。一方、同試験の Caco-2 細胞の結果は、52 時間で 4 物質間全てに陽性を示した (Table 5)。*in vitro* 遺伝毒性試験の結果より、試験時間が長くなるにつれて、A549 細胞では、NM201、NM202、NM203 が陽性を示し、Caco-2 細胞では、全て陽性を示す傾向であった。

6. *in vitro* 細胞毒性試験 (EC₅₀)

in vitro 細胞毒性試験結果 (Endpoint : EC₅₀) で SiO₂ NPs の試験報告について 26 試験について収集・整理した (Table 6)。物性が揃っている OECD の SiO₂ NPs は、主に NM200 および NM203 の 2 物質間のみであった。その結果、2 物質間の毒性の強さの傾向は NM200 < NM203 となった (24 h の LDH assay 結果を除く)。

D. 考察

近年、ナノマテリアルを用いた材料は、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等、一般消費者に向け幅広く利用されており、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。

本研究では、二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NPs) に着目し、情報源として OECD の関連資料 (評価文書:dossier) およびその他の関連資料として eNanoMapper を調査・収集とした。また、主に物理化学的性状データと有害性情報 (ラットを用いた吸入暴露および気管内経路の毒性試験、および *in vivo* / *in vitro* 遺伝毒性試験、*in vitro* 細胞毒性試験) について収集し、データシートの策定に向けた各々の項目について整理した。

2003 年に TNO Division of Nutrition and Food Research, Zeist (NL) で実施されたラット亜急性吸入毒性試験結果から、Endpoint として肺への毒性影響が明らかな BALF 中の総細胞数や多型核白血球数について、より詳細な毒性影響の値について調べる (算出する) ため、原典に戻り細胞数から推定される高用量群で増加する細胞数の割合

(差) が認められる付近の暴露濃度について再算出を試みようとした。しかし、原典情報の入手に至らなかったことから、毒性値は LOEL 値を利用して、その後の物性と有害性との関連性について多変量解析を実施した。多変量解析結果から、毒性の強い NM202、NM203 の物性値 (項目) の特徴として、不純物は少なくシリカ (Si) の純度が高いが、コーティングが無く、また、比表面積が大きい項目が挙げられた。また、空孔や、比表面積の値が大きいものは細胞 (生体) への吸着のし易さ (吸着能) が高くなり、排出されにくい性質を有する事が示唆された。

2013 年に NANOGENOTOX で実施されたラット気管内投与試験 (48h) は、遺伝毒性試験を主目的として行なわれた試験と記載されていた。毒性の Endpoint として肺への毒性影響が明らかな BALF 中の BAL の細胞数、酵素活性への影響を観察していた。その結果、4 種の全ての SiO₂ NPs (NM200-NM203) において最小用量の 3 mg/kg で BAL 中の好中球数の有意な増加がみられていた。気管内投与試験法は、投与器具として金属製経ロゾンデ針 (以下、経ロゾンデ) のほか、投与液をエアロゾル状に噴出するタイプのゾンデ (以下、スプレーゾンデ) を用いて、直接、試験動物への経気道投与を可能とする。また、全身暴露試験法と比較した際、目的とする投与量を正確に投与でき、且つ、用量反応関係が分かる。従って、

気管内投与試験法は実験動物の気管内に被験物質を液体中に分散させて直接投与することから、主に被験物質の肺有害性を評価する試験法である。気管内投与試験でのばく露形態は直接投与により局所的な強い反応が出やすいことなど、実環境とは異なることから、上部気道への毒性影響を評価できないため、吸入毒性試験の完全な代替試験にはなりにくいと考えられている。しかし、被験物質の相対的な毒性比較評価に有用であることは広く認知されている。今回、投与後、一般的な毒性エンドポイントと、気管支肺胞洗浄（BAL）液検査が実施されデータを収集したが、実施された全てのSiO₂ NPsにおいて一番低い濃度（最小用量）にて肺への炎症所見が得られていたことから、解析には至らなかった。この結果は吸入暴露試験の肺毒性影響よりもさらに低い濃度であった。気管内投与試験法はOECDでのガイドライン化には未だ至っておらず、通常、対照群をもうける必要があると考えられるものの本試験では対照群の記載はされていなかった。

E. 結論

今年度の収集データの対象ナノマテリアルは、5種の二酸化ケイ素ナノ粒子（SiO₂ NPs）とした。SiO₂ NPsの情報収集源は、各種試験データ項目が多く揃っているOECDのナノマテリアル安全性評価プログラムにおいて作成された評価文書およびナノマテリアルの毒性データベース（eNanoMapper）とした。これらに収載された物性と有害性情報についてデータシートの作成を行った。物性情報は約62項目について収集した。有害性情報は、ナノマテリアルの投与試験で、特に肺への毒性所見をエンドポイントとした吸入毒性試験および気管内投与試験法の反復投与毒性試験と、*in vivo/in vitro* 遺伝毒性試験、*in vitro* 細胞毒性試験を収集対象とした。しかし、物性と有害性との関連性についての多変量解析の実施は、一機関の吸入毒性試験のみであった。解析の実施にあたり、データマイニングのリソースの選択や高精度なデータの収集が必要であった。さらに、有害性評価の横並びに試験されたデータ数の不足から、今後、更なるデータ収集や、自験データを組み込むことが必要とされた。

F. 引用文献

1. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/silicon-dioxide-manufactured-nanomaterial.htm>
2. SILICON DIOXIDE: SUMMARY OF THE DOSSIER Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 71
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2016\)23&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2016)23&doclanguage=en)
3. <https://search.data.enanomapper.net/enm/index.html?search>
4. Arts, J.H., Muijser, H., Duistermaat, E., Junker, K., and Kuper, C.F., Five-day inhalation toxicity study of three types of synthetic amorphous silicas in Wistar rats and post-exposure evaluations for up to 3 months., *Food Chem Toxicol* 2007 Oct; 45(10):1856-67.
5. Reuzel, P.G., Bruijntjes, J.P., Feron, V.J., and Woutersen, R.A., Subchronic inhalation toxicity of amorphous silicas and quartz dust in rats., *Food Chem Toxicol* 1991 29: 341-354.
6. Chen, Y., Chen, J., Dong, J. and Jin, Y., Comparing study of the effect of nanosized silicon dioxide and microsized silicon dioxide on fibrogenesis in rats., *Toxicol Ind Health* 2004 20: 21-27.
7. Ernst, H., Rittinghausen, S., Bartsch, W., Creutzenberg, O., Dasenbrock, C., Gorlitz, B.D., Hecht, M., Kairies, U., Muhle, H., Müller, M., Heinrich, U. and Pott, F., Pulmonary inflammation in rats after intratracheal instillation of quartz, amorphous SiO₂, carbon black, and coal dust and the influence of poly-2-vinylpyridine-N-oxide (PVNO)., *Exp Toxicol Pathol* 2002 54: 109-126
8. Downs, T. R., Crosby, M. E., Hu, T., Kumar, S., Sullivan, A., Sarlo, K., Reeder, B., Lynch, M., Wagner, M., Mills, T. and Pfuhler, S., Silica nanoparticles administered at the maximum tolerated dose induce genotoxic effects through an inflammatory reaction while gold nanoparticles do not., *Mutat Res* 2012 745: 38-50
9. Barnes, C.A., Elsaesser, A., Arkusz, J., Smok, A.,

- Palus, J., Lesniak, A. et al., Reproducible comet assay of amorphous silica nanoparticles detects no genotoxicity., *Nano Lett* 2008 8: 3069-3074.
10. Gonzalez, L., Thomassen, L.C., Plas, G., Rabolli, V., Napierska, D. and Decordier, I. et al., Exploring the aneugenic and clastogenic potential in the nanosize range: A549 human lung carcinoma cells and amorphous monodisperse silica nanoparticles as models., *Nanotoxicology* 2010 Dec;4:382-95.
 11. Napierska, D., Thomassen, L.C., Rabolli, V., Lison, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders, M., Martens, J.A. and Hoet, P.H., Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells., *Small* 5. 2009 Apr;5(7):846-53.
 12. Park, E.J., and Park, K., Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro., *Toxicol Lett* 2009 184(1): 18-25.
 13. Brown, S.C., Kamal, M., Nasreen, N., Baumuratov, A., Sharma, P., Antony, V.b. and Moudgil, B.M., Influence of shape, adhesion and simulated lung mechanics on amorphous silica nanoparticle toxicity., *Advanced Powder Technol* 2007 18: 69-79.
 14. Chang, J.S., Chang, K.L., Hwang, D.F., and Kong, Z.L., In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line., *Environ Sci Technol* 2007 41. 2064-2068
 15. Choi, S.J., Oh, J.M. and Choy, J.H., Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells., *J Inorg Biochem* 2009 103: 463-471.
 16. Eom, H.J., and Choi, J. Oxidative stress of silica nanoparticles in human bronchial epithelial cell, Beas-2B., *Toxicol In Vitro* 2009 23: 1326-1332.
 17. Jin, Y., Kannan, S., Wu, M., and Zhao, J.X. Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells. *Chem Res Toxicol* 2007 20. 1126-1133.
 18. Lin, W., Huang, Y.W., Zhou, X.D., and Ma, Y., In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells., *Toxicol Appl Pharmacol* 2006 217. 252-259
 19. Lu, F., Wu, S.H., Hung, Y., and Mou, C.Y., Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles., *Small* 2009 5: 1408-1413.
 20. Slowing, II, Wu, C.W., Vivero-Escoto, J.L. and Lin, V.S., Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells. *Small* 2009 5 (1). 57-62.
 21. Wahl, B., Daum, N., Ohrem, H.L., and Lehr, C.M., Novel luminescence assay offers new possibilities for the risk assessment of silica nanoparticles., *Nanotoxicology* 2008 2: 243-251.
 22. Ye, Y., Liu, J., Xu, J., Sun, L., Chen, M., and Lan, M. Nano-SiO₂ induces apoptosis via activation of p53 and Bax mediated by oxidative stress in human hepatic cell line., *Toxicol In Vitro* 2010 24: 751-758.
 23. Park Y.H., Kim, J.N., Jeong, S.H., Choi, J.E., Lee, S.H., Choi, B.H., Lee, J.P., Sohn, K.H., Park, K.L., Kim, M.K., and Son, S.W., Assessment of dermal toxicity of nanosilica using cultured keratinocytes, a human skin equivalent model and an in vivo model., *Toxicology*. 2010 267: 178-181.
 24. Rabolli V, Thomassen LC, Princen C, Napierska D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, et al., Influence of size, surface area and microporosity on the in vitro cytotoxic activity of amorphous silica nanoparticles in different cell types., *Nanotoxicology* 2010 Sep;4(3):307-18.
 25. Thomassen, L.C., Aerts, A., Rabolli, V., Lison, D., Gonzalez, L., Kirsch-Volders M, et al., Synthesis and characterization of stable monodisperse silica nanoparticle sols for in vitro cytotoxicity testing., *Langmuir* 2010 Jan 5;26(1):328-35.
 26. Nymark, P. et al., Extensive temporal transcriptome and microRNA analyses identify molecular mechanisms underlying mitochondrial dysfunction induced by multi-walled carbon nanotubes in human lung cells. *Journal*

- Nanotoxicology* 2015 9 (5); 624-635.
27. Warheit, D.B., McHugh, T.A., and Hartsky, M.A. "Differential pulmonary responses in rats inhaling crystalline, colloidal or amorphous silica dusts." *Scand J Work Environ Health* 1995 21 Suppl 2: 19-21.
 28. Lison, D., Thomassen, L.C., Rabolli, V., Gonzalez, L., Napierska, D., Seo, J.W. et al., Nominal and effective dosimetry of silica nanoparticles in cytotoxicity assays., *Toxicol Sci* 2008 104 (1). 155-162.
 29. Sayes, C.M., Reed, K.L., and Warheit, D.B., "Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles." *Toxicol Sci* 2007 97 (1). 163-180.
 30. Yang, X., Liu, J., He, H., Zhou, L., Gong, C., Wang, X. et al., SiO₂ nanoparticles induce cytotoxicity and protein expression alteration in HaCaT cells., *Part Fibre Toxicol* 2010 7: 1.
 31. Johnston CJ, Driscoll KE, Finkelstein JN, Baggs R, O'Reilly MA, Carter J, Gelein R, and Oberdorster G., Pulmonary Chemokine and Mutagenic Responses in Rats after Subchronic Inhalation of Amorphous and Crystalline Silica, *Toxicol Sci* 2000 56, 405-413.
 32. 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: First Steps towards an Intelligent Testing Strategy, *PLoS ONE* 10(5): e0127174. 2015
 33. 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* 2011 6; 175-178.
 34. 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*, 2011 7 (8); 1118-1126.
 35. Docter D, Bant, C, Westmeier D, Galla H J, Wang Q, Kirkpatrick J C, Nielsen P, Maskos M, and Stauber R H, The protein corona protects against size- and dose-dependent toxicity of amorphous silica nanoparticles, *Beilstein J. Nanotechnol.* 2014, 5, 1380-1392.
 36. 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. *Journal Nanotoxicology* 2009 3 (4); 355-364.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Imai K, Nakanishi I, Ohkubo K, Ohno A, Mizuno M, Fukuzumi S, Matsumoto K, Fukuhara K. Synthesis and Radical-Scavenging Activity of C-Methylated Fisetin Analogues. *Bioorg. Med. Chem.*, 27 (8), 1720-1727, 2019.

2. 学会発表

1. 大野彰子、山田隆志、広瀬明彦。「データベースを活用した神経毒性の *in silico* 予測手法の開発」第46回日本毒性学会学術年会（徳島、2019年6月）
2. 福原 潔、今井耕平、中西郁夫、大久保 敬、大野彰子、水野美麗、福住俊一。「C-メチルフィセチンのラジカル消去活性」第72回日本酸化ストレス学会学術集会（北海道、2019年6月）
3. 福原 潔、中西郁夫、今井耕平、松本謙一郎、大野彰子。「鉄錯体形成をトリガーとした新規抗酸化物質の開発」第43回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会（京都、2019年9月）
4. 大野彰子、渡邊昌俊、広瀬明彦。「多変量解析手法を用いた二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状に基づく毒性評価への応用」（京都、2020年3月）
5. 福原 潔、中西郁夫、大久保敬、今井耕平、水野美麗、松本謙一郎、大野彰子。「C-メチルフラボノイドのラジカル消去作用」日本農芸化学会 2020年度大会（東京、2020年3月）

6. Fukuhara K., Imai K., Nakanishi I, Matsumoto K., Ohno A. Planar catechin conjugated with DTPA as a promising antioxidant triggered by Fe³⁺ coordination, 258th ACS National Meeting, (August, 2019, San Diego, USA)

3.講演発表

1. 大野彰子.「薬学研究分野（医薬品・食品・化学物質）への多変量解析法の活用例」
Umetrics 日本ユーザー会 2019（東京国際フォーラム、2019年12月）

H. 知的所有権の出願・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. Surveyed substances: Silicon dioxide nanoparticles (SiO₂ NPs, NM200-NM204).

NM	Label name	Crystal type	Surface coating	Composition (SiO ₂ , ≥ %)
NM-200	Synthetic Amorphous Silica PR-A-02	Precipitated	Yes(or H ₂ O)	96
NM-201	Synthetic Amorphous Silica PR-B-01	Precipitated	Yes(or H ₂ O)	97
NM-202	Synthetic Amorphous Silica PY-AB-03	Pyrogenic	uncoating	99
NM-203	Synthetic Amorphous Silica PY-A-04	Pyrogenic	uncoating	99
NM-204	Synthetic Amorphous Silica PR-A-05	Precipitated	Yes(or H ₂ O)	98

Table 2. Target materials (SiO₂ NPs, NM200-NM204) collected from the organization for economic co-operation and development (OECD).

項目	タイトル	備考
物理化学的性状	PhysChem_Summary	Summary dossier、個別dossier、ANNEXの情報を委託者提供の参考シート (Physicochemical properties of the TiO ₂ NPs) の項目に沿って整理
	PhysChem_OECD_Summary dossier	Summary dossier、個別dossier、ANNEXの情報
	PhysChem_Case study Report	Summary dossier、個別dossier、ANNEXの情報をTiO ₂ のCase study report の項目に沿って整理した
	PhysChem_OECD Part 1 (NM200)	個別dossier (Part 1 – NM 200) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 2 (NM201)	個別dossier (Part 2 – NM 201) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 3 (NM202)	個別dossier (Part 3 – NM 202) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 4 (NM203)	個別dossier (Part 4 – NM 203) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 5 (NM204)	個別dossier (Part 5 – NM 204) に記載された物理化学的性状データ
	PhysChem_OECD Part 6 (AIST etc)	個別dossier (Part 6 – JP AIST data on SiO ₂ UFP-80 and NanoTek) に記載された物理化学的性状データ(データなし)
	有害性	反復投与毒性(吸入、気管内投与)_OECD
反復投与毒性(吸入、気管内投与)_OECD_詳細		“反復投与毒性(吸入、気管内投与)_OECD” データシートに整理した情報の詳細情報 (HESS DB形式)
細胞毒性 (in vitro)_EC50		EC ₅₀ が得られた <i>in vitro</i> 細胞毒性試験結果のばく露時間、試験法、細胞種、EC ₅₀ を要約
細胞毒性 (in vitro)_EC50 (>100)		EC ₅₀ > 100 µg/mLと報告された <i>in vitro</i> 細胞毒性試験結果のばく露時間、試験法、細胞種、EC ₅₀ を要約
Mutagenicity (in vitro)_Summary		<i>In vitro</i> 遺伝毒性試験結果を要約
Mutagenicity (in vivo)_Summary		<i>In vivo</i> 遺伝毒性試験結果を要約
細胞毒性 (in vitro)_OECD		Summary dossierに記載された <i>in vitro</i> 細胞毒性 (遺伝毒性情報を除く)
細胞毒性 (in vitro)_ eNanoMapper		eNanoMapperのLDH release assay、Cell viability assay、Cytotoxicity assay、Genotoxicity assayの情報
Mutagenicity (in vitro)_OECD		Summary dossierに記載された <i>in vitro</i> 遺伝毒性情報
Mutagenicity (in vivo)_OECD		Summary dossierに記載された <i>in vivo</i> 遺伝毒性情報

Table 3. SiO₂ NPs: Physicochemical properties.

Property			Method/ Instrument		NM200	NM201	NM202	NM203	NM204
Particle size, size distribution	Primary particle size (nm)	Equivalent diameter for sphere	SAXS	1	22	22	15	16	21
	Primary particle size (nm)		TEM	2	14±7	17±8	15±7	13±6	15±10
	Primary particle size (nm)		TEM	3	23±8	19±4	18±3	16±3	-
	Primary particle size (nm)		TEM	4	18	18	20	45	-
	Mean diameter (nm)		TEM	5	31±3	43±4	53±9	48±4	-
	Feret Min (nm)		TEM	6	21.9	33	58	53	-
	Feret Max (nm)		TEM	7	34.5	51	37.2	33.5	-
	Elementary particle size of agglomerated Silica (nm)		TEM	8	ly around 10-15)	-	-	-	-
Composition	Total non-SiO ₂ content including coating and impurities (% w/w)		EDS	9	1.5	2.21	1.64	0.63	0.47
	Impurity (% w/w Al)		EDS	10	0.46	0.74	0.45	0.43	0.48
	Impurity (% w/w S)		EDS	11	0.87	0.46	0	0.04	0.21
	Impurity (% w/w Na)		EDS	12	0.88	0.44	0	0	0.18
	Impurity (% w/w Ca)		EDS	13	-	0	0.18	-	0
	Impurity (% w/w K)		ICP-OES	14	0.005-0.01	0.001-0.005	-	-	-
	Impurity (% w/w Fe)		ICP-OES	15	0.005-0.01	0.001-0.005	-	-	0.001-0.005
	Impurity (% w/w Zr)		ICP-OES	16	0.001-0.005	0.005-0.01	-	-	0.005-0.01
	Impurity (% w/w Mg)		ICP-OES	17	0.001-0.005	0.001-0.005	-	-	-
	O (wt%)		EDS	18	53.02	53.06	53.14	53.21	53.17
Si (wt%)		EDS	19	44.77	45.27	46.23	46.32	45.96	
Coating		TGA	20	Yes (or H ₂ O)	Yes (or H ₂ O)	No	No	Yes (or H ₂ O)	
Weight of coating (wt%)		TGA	21	3	3	-	-	3	
Agglomeration/aggregation	Z-average (nm)	Ultra-pure water dispersion (iDLS)	DLS	22	207.1±12.3	208.1±34.5	175.9±4.5	172.9±9.2	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (iDLS)	DLS	23	0.390±0.041	0.352±0.028	0.355±0.001	0.427±0.025	-
	Z-average (nm)	Ultra-pure water dispersion (iDLS)	DLS	24	-	197.0±15.7	-	147.5±4.5	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (iDLS)	DLS	25	-	0.337±0.020	-	0.244±0.017	-
	Z-average (nm)	Ultra-pure water dispersion (iDLS)	DLS	26	181.5±4.3	-	-	-	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (iDLS)	DLS	27	0.238±0.006	-	-	-	-
	Z-average (nm)	Ultra-pure water dispersion (iDLS)	DLS	28	-	-	-	146.8±0.6	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (iDLS)	DLS	29	-	-	-	0.229±0.015	-
	Z-average (nm)	Ultra-pure water dispersion (iDLS)	DLS	30	240.5±2.3	-	-	245.7±37.2	-
	PdI	Ultra-pure water dispersion (iDLS)	DLS	31	0.248±0.006	-	-	0.299±0.024	-
	2Rg1 (nm)	Gyration radius of primary part	SAXS	32	18	20	16	-	-
	2Rg2 (nm)	Gyration radius of primary part	SAXS	33	440	180	100	-	-
	Df	Gyration radius of primary part	SAXS	34	2.45	2.45	2.5	-	-
Npart/agg	Gyration radius of primary part	SAXS	35	3600	457	200	-	-	
Morphology of aggregates/agglomerates (nm)		TEM	36	medium sphericity	medium sphericity	ar. low sphericity	ar. low sphericity	-	
Zeta Potential around pH 7 (mV)		Lazer-Dppler-E	37	-45	-40	-40	-35	-	
Isoelectric Point (Mean) (pH)		Lazer-Dppler-E	38	< 2	< 2	2-4	2-4	-	
Crystalline phase	Crystalline type		XRD	39	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous	amorphous
	Crystalline impurities		XRD	40	Boehmite (Al ₂ O ₃)	Boehmite (Al ₂ O ₃)	Boehmite (Al ₂ O ₃)	Boehmite (Al ₂ O ₃)	Boehmite (Al ₂ O ₃)
	Crystalline size (mean)		-	41	-	-	-	-	-
Aspect ratio			42	1460	1461	1518	1533	-	
Specific surface area	SAXS surface area (m ² /g)		SAXS	43	123±4.9	123±8.3	184±17.8	167±13.4	131±22.9
	BET surface area (m ² /g)		BET	44	189.16	140.46	204.11	203.92	136.6
	Total pore volume (mL/g)		BET	45	0.7905	0.5815	0.5136	0.499	0.5057
	Micropore surface area (m ² /g)		BET	46	30.044	-	-	-	0
	Micropore volume (mL/g)		BET	47	0.01181	0.00916	0.00084	0	0.00666
Shape	Sphericity		TEM	48	low to medium	medium	low	low	-
	Surface coating	Weight of coating (wt%)	-	49	3	3	-	-	3
Density	Density (g/mL)		Weighing	50	0.12	0.28	0.13	0.03	0.16
Dustiness	Inhalable Mass Dustiness index (mg/kg)		Small rotating C	51	6459±273	6034±199	4988±1866	5800±1488	24969±601
	Respirable Mass Dustiness index (mg/kg)		Small rotating C	52	293±193	218±24	91±11	354±6	1058±1
	Respirable Mass Dustiness index (mg/kg)		Vortex Shaker (53	34000	6500	17000	51000	14000
Surface chemistry	O (%)		EDS	54	71.43	67.9	-	-	-
	Si (%)		EDS	55	20.3	20.83	-	-	-
	C (%)		EDS	56	5.96	8.28	-	-	-
	Na (%)		EDS	57	1.83	2.89	-	-	-
Pour density	Water content (wt% dry)		Weighing	58	8	8	1	1	6
	Bulk density (g/cm ³)		Weighing	59	0.12	0.28	0.13	0.03	0.16
Porosity	Total pore volume (mL/g)		BET	60	0.7905	0.5815	0.5136	0.499	0.5057
	Micropore volume (mL/g)		BET	61	0.01181	0.00916	0.00084	0	0.00666
Solubility	Saturation concentration (mmol/L)		Flask method	62	2.4±0.03	2.4±0.03	2-2.5	201 mg/l	-
	24h 0.05% BSA (µg/L Ti)		-	63	-	-	-	-	-
	24h Gambles solution (µg/L Ti)		-	64	-	-	-	-	-
	24h Caco2 (µg/L Ti)		-	65	-	-	-	-	-
Biodurability	Biodurability (µg/g Ti)		-	66	-	-	-	-	-
	Biodurability (µg/g Al)		-	67	-	-	-	-	-
	Biodurability (µg/g Si)		-	68	-	-	-	-	-
Redox	Redox caco2 medium		-	69	-	-	-	-	-
	Redox Gambles solution		-	70	-	-	-	-	-
	Redox BSA		-	71	-	-	-	-	-

Table 4. Mutagenicity (*in vivo*)

Time	Cell assay	Administration route	Test Organism/System	Result					Colloidal silica Levasil from HC Stark Lev 50, Lev 200
				NM 200	NM 201	NM 202	NM 203	Aerosil 200	
3 administrations at 0, 24 and 45 h. Sacrifice 3 h after the last administration	Comet assay (BAL cells, lung, blood, liver, spleen, kidney, bone marrow)	Intratracheal	Rat (Sprague-Dawley, male)	-	-	-	-		
	Micronucleus assay in bone marrow (OECD TG 474)	Intratracheal	Rat (Sprague-Dawley, male)	-	-	-	-		
	Comet assay	Oral (gavage)	Rat (Sprague-Dawley, male)	-	-	-	equivocal		
	Micronucleus assay in bone marrow (OECD TG 474)	Oral (gavage)	Rat (Sprague-Dawley, male)	-	-	-	equivocal		
	Micronucleus assay in colon	Oral (gavage)	Rat (Sprague-Dawley, male)	-	-	-	equivocal		
	Comet assay (BAL cells, lung, blood, liver, spleen, kidney, bone marrow)	Intravenous	Rat (Sprague-Dawley, male)				-		
3 injections on 3 consecutive days. Sacrifice 4 h after the last injection	Micronucleus assay in bone marrow (OECD TG 474)	Intravenous	Rat (Sprague-Dawley, male)				-		
	Comet assay (lung, liver, blood)	Intravenous	Rat (male)						+ (only at high dose)
	Micronucleus assay in peripheral blood reticulocytes	Intravenous	Rat (male)						+ (only at high dose)
6 h/d, 5 d/wk for 90 days	Inflammation	Intravenous	Rat (male)						+ (only at high dose)
	ex-vivo/in vitro gene mutation assay (HPRT assay) in alveolar epithelial cells	Inhalation (whole body)	Rat (Fischer 344, male)					-	

Table 5. Mutagenicity (*in vitro*)

Time	Cell assay	Test cell type	Result												
			NM200	NM201	NM202	NM203	NM204	equivalent to NM 202	equivalent to NM 203	Commercial colloidal and laboratory synthesized silica	Purposely synthesized SAS (2): Stöber SAS (16, 60 and 104 nm)	Amorphous SiO ₂ , fumed (Sigma) (14 nm)			
no data	Bacterial Reverse Mutation Assay (OECD TG 471)	Styphimurium TA 1535, TA 1537, TA 98 and TA 100								-	-				
3 (hr)	Comet assay	BEAS-2B	+		+	+									
4 (hr)	In vitro mammalian cell gene mutation tests (OECD TG 476)	L5178Y TK +/- mouse lymphoma cells	-												
	In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (OECD TG 473)	Chinese hamster lung fibroblasts (V79)	-												
	Fpg-modified comet assay	Caco-2													-
5 (hr)	In vitro mammalian cell gene mutation tests (OECD TG 476)	Chinese hamster Ovary (CHO)								-	-				
2 h (+S9) 18 h (-S9)	In vitro mammalian cell gene mutation Test (OECD TG 476)	Chinese hamster Ovary (CHO)								-					
	In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (OECD TG 473)	Chinese hamster lung fibroblasts (V79)									-				
18-20 (hr)	DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells (OECD TG 482)	Primary rat hepatocytes								-	-				
	Comet assay	16-HBE	+/-	-/-	-/-	-/-									
		A549	Equivocal/-	+ /Equivocal	+ /Equivocal	-/+									
		Caco-2	+ /+	- /Equivocal	Equivocal/ Equivocal	+ /+									
3 (hr)	Comet assay	BEAS-2B	+	Equivocal	+	+									
4, 24 (hr)	Comet assay	Primary rat (Wistar) alveolar macrophage	-												
3, 6, 24 (hr)	Comet assay	Mouse embryonic fibroblast cells										-			
24 (hr)	In vitro mammalian cell gene mutation tests (OECD TG 476)	L5178Y TK +/- mouse lymphoma cells	-	-	-	-									
	Comet assay	BEAS-2B					Equivocal/-								
		Caco-2					-/+								
30 (hr)	Micronucleus assay (OECD TG 487)	Human primary peripheral blood	-	-	-	-									
40 (hr)	Micronucleus assay (OECD TG 487)	A549											+		
41 (hr)	Micronucleus assay (OECD TG 487)	16HBE	-	-	-	-									
48 (hr)	Micronucleus assay (OECD TG 487)	BEAS-2B	-	-	-	-	+ /Equivocal								
		A549	-	+	+	-									
		Caco-2					-/+								
52 (hr)	Micronucleus assay (OECD TG 487)	Caco-2	+	+	+	+									

BEAS-2B : Human bronchial epithelium
 16HBE : Human bronchial epithelial cell
 A549 : Human bronchoalveolar carcinoma
 Caco-2 : Human intestinal epithelial cells

Table 6. Cytotoxicity (*in vitro*), endpoint: EC₅₀

Time	Cell assay	Measurement condition	No.	NM 200	NM 201	NM 202	NM 203	NM 204	JP-PAIST data on SiO ₂ LFPF-90 and NanoTeK	Ludox L-14 (14 nm)	Ludox L-15 (15 nm)	Stober silica S-16 (16 nm)	Stober silica S-19 (19 nm)	Stober silica nanoparticles (29 nm)	Stober silica S-60 (60 nm)	Stober silica S-104 (104 nm)	Stober silica S-335 (335 nm)	unspecifed 15 nm silica nanoparticles from Merck	SAS colloids (21 nm)	SAS colloids (48 nm or 85 nm)	SAS from Wang Jung New Material Co (15 nm)	SAS from Wang Jung New Material Co (30 nm)	SAS from Wang Jung New Material Co (micro-sized, 385 nm)	FI-25 SiO ₂	FI-50 SiO ₂	SiO ₂ 15 nm	SiO ₂ 60 nm	SiO ₂ 20 nm	Amorphous SiO ₂ ASP30 (Nysacol Nano Technologies)					
4 (hr)	Luminescence assay	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type																																
		MTT assay	ED50 (μg/mL)																													80		
8 (hr)	Razazurin assay, NRU assay	ED50 (μg/mL)					84-88																											
		Test cell type					RAW 264.7																											
		LDH assay	ED50 (μg/mL)				75-100																											
8 (hr)	MTT assay	ED50 (μg/mL)																														80		
		Test cell type																																
		Razazurin assay, NRU assay	ED50 (μg/mL)	25-60			< 10																											
24 (hr)	Razazurin assay, NRU assay	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type		MH-S																														
		ED50 (μg/mL)					84-88																											
24 (hr)	crystal violet staining	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type																																
		ED50 (μg/mL)																																
24 (hr)	WST-1 assay	ED50 (μg/mL)	1500			421																												
		Test cell type		A549			A549																											
		ED50 (μg/mL)	112			1155																												
24 (hr)	WST-6 assay	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type		THP-1			THP-1																											
		ED50 (μg/mL)																																
24 (hr)	LDH assay	ED50 (μg/mL)	184			2802																												
		Test cell type		A549			A549																											
		ED50 (μg/mL)					75-100																											
24 (hr)	MTT assay	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type																																
		ED50 (μg/mL)																																
48 (hr)	Razazurin assay, NRU assay	ED50 (μg/mL)	25-60			< 10																												
		Test cell type		MH-S			MH-S																											
		ED50 (μg/mL)																																
72 (hr)	Razazurin assay, NRU assay	ED50 (μg/mL)	25-60			< 10																												
		Test cell type		MH-S			MH-S																											
		ED50 (μg/mL)																																
240 (hr)	WST-1 assay	ED50 (μg/mL)																																
		Test cell type																																
		ED50 (μg/mL)																																

- Caco-2 : Human intestinal epithelial cells
- Colon HT29 : Human colorectal adenocarcinoma
- RAW 264.7 : Mouse peritoneal macrophage
- J774 : Mouse monocyte
- HMDM : Human monocyte-derived macrophages
- THP-1 : Human monocytic leukaemia
- EAHY926 : Human endothelial cells
- L-02 : Human hepatic cell line
- HaCaT : Human keratinocyte cell line
- MH-S : Mouse alveolar macrophage
- A549 : Human bronchoalveolar carcinoma
- NRK-52E : Normal rat kidney cell
- NIH3T3 : Mouse fibroblast cell
- mES : D3 mouse embryonic stem cell

Figure 1A. PCA based on physicochemical properties of SiO₂ NPs.

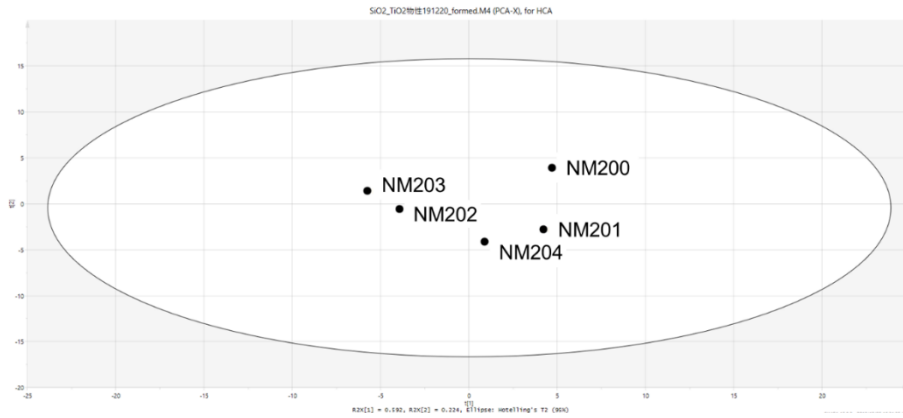


Figure 1B. Dendrogram for PCA based on physicochemical properties of SiO₂ NPs.

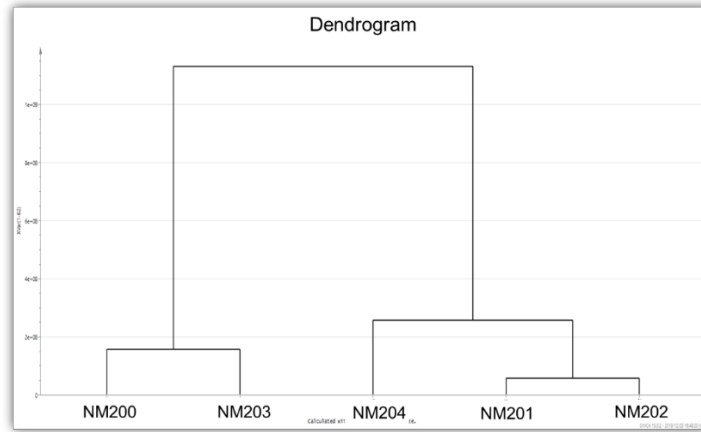
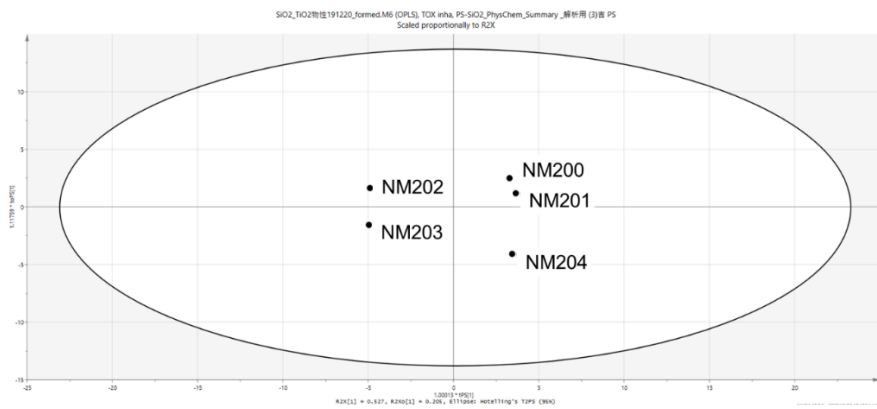


Figure 2. Multivariate analysis results for repeated dose toxicity (inhalation).



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（H30-化学-一般-004）令和元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
分担研究課題名：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

分担研究者：三宅 祐一 静岡県立大学食品栄養科学部 助教

研究要旨：本サブテーマではナノマテリアルを含む消費者製品として、スプレー型の製品を使用した際の、使用者へのナノマテリアルの経口曝露量の評価法について、曝露評価ツールの比較・検討を行った。一般的に広く認知されている産業技術総合研究所（AIST）が開発した室内製品曝露評価ツール AIST-ICET（Indoor Consumer Exposure Assessment Tool）とオランダ国立公衆衛生環境研究所（RIVM）が開発した ConsExpo-nano を対象とした。両者を比較すると、曝露量の推算に必要なインプット値や、結果として得られるアウトプット値（推算値）に大きな違いがみられた。これは、それぞれの曝露評価ツールの推算メカニズムが異なることが理由であると考えられる。ナノマテリアルを含む製品の想定される曝露経路に合わせて、それぞれの曝露評価ツールの特性を考慮しながら適宜最適なものを選択する必要性が示唆された。

A.研究目的

本年度は、ナノマテリアルを含む消費者製品を使用した際の、使用者へのナノマテリアルのリスクを評価するため、曝露評価法の検討を行った。ナノマテリアルを含む消費者製品として、曝露量が多くなることが懸念されているスプレー型の製品を対象とし、曝露経路としては経口曝露を考慮した。

B.研究方法

B-1. ナノマテリアルの安全性評価に関わる曝露評価ツールの探索・精査

ナノマテリアルを含むスプレー等の消費者製品を使用した際の、使用者へのナノマテリアルのリスクを評価するためには、曝露量を調査することが必要である。ただし、ナノマテリアルの曝露量を実測することは困難であるため、一般的に曝露評価ツールを使用して曝露量の推算が行われている。消費者製品からの化学物質や粒子の曝露評価ツールとしては、産業技術総合研究所（AIST）が開発した室内製品曝露評価ツール AIST-ICET（Indoor Consumer Exposure Assessment Tool）とオランダ国立公衆衛生環境研究所（RIVM）が開発した ConsExpo-nano がよく知られており、この2種のツールについて、ナノマテリアル曝露評価に必要な情報やアウトプット値

などを調査し、まとめた。

AIST-ICET は、消費者製品を含む室内製品に含まれる化学物質のヒトへの経気道・経口曝露量に加え、経皮曝露量を推定するために開発されたツールである。混合物（例えば、洗剤や殺虫剤など）だけでなく、成形品（例えば、家電や家具など）からの化学物質の曝露量を推定することが可能であり、製品開発時の安全性評価や製品事故時のリスク評価への活用が想定されている。

AIST-ICET では、室内でスプレー製品を使用した際の室内空气中化学物質濃度を推定するために、4つのスプレーモデルが搭載されている。これらのスプレーモデルは、次の3種のサブモデルが利用できる。1.「対象化学物質が揮発性であり、噴霧された物質は噴霧者周辺空間（クラウド）でとどまり、クラウド以外の濃度と比較して濃度が高くなる状況を想定したモデル」、2.「対象化学物質が非揮発性であり、噴霧された物質は部屋全体に速やかに拡散した後に重力沈降が加味したモデル」、3.「対象化学物質が非揮発性であり、かつ、噴霧された物質は噴霧者周辺空間でとどまり、クラウド以外の濃度と比較して濃度が高くなる状況を表したモデル」、4「対象化学物質が非揮発性であり、噴霧された物質は部屋全体に速やかに拡散することを想定したモデル」

が含まれる。これらのモデルにより、壁や床などへの吸脱着を考慮した、住宅の室内空気中の化学物質濃度の時間変化を推算することができる。また、長期間における曝露量を簡易的に推算するために、定常状態を仮定した推定も行える。スプレー製品については、独自に行われた噴霧実験の結果に基づいて、噴霧者（製品使用者）の周辺空間（クラウド）や粒子沈降を考慮した推定式を搭載している。

ConsExpo-nano は、塗料や洗浄剤、パーソナルケア製品などの消費者製品に含まれる化学物質のヒトへの曝露量を評価するツールである。前身となる ConsExpo という曝露評価ツールを、ナノマテリアルに特化させたツールである。本ツールを用いてスプレー型の消費者製品に含まれるナノマテリアルの、消費者への曝露量を推定することが可能であり、また、空気中ナノマテリアル濃度に基づいた曝露評価を行うことも可能である。さらに、粒子径毎のナノマテリアルの肺胞到達比率をシミュレートすることもできる。

C. 結果

C-1. ナノマテリアルの安全性評価に関わる曝露評価ツールの探索・精査

ナノマテリアルを含むスプレー型の消費者製品を使用した際の、使用者へのナノマテリアルの経口曝露量の推定に必要なパラメータを、AIST-ICET、ConsExpo-nano ごとに列挙し、まとめた。

AIST-ICET の使用方法は、まず、サイト (<https://icet.aist-riss.jp/>) にアクセスし、AIST-ICET をダウンロードしてインストールする。計算ケース名を入力し、曝露経路として吸入曝露、製品は家庭用塗料（スプレー）を選択する（図 1）。放散モデルは、クラウド-非揮発性を選択し、計算に必要なインプット値を入力して実行する。表 1 に ナノマテリアルを含むスプレー型の消費者製品を使用した際の、使用者へのナノマテリアルの経口曝露量の推定に必要なインプット値を示す。AIST-ICET では、噴霧時間 (sec)、噴霧量 (g/sec)、化学物質比率 (wt%)、気中画分 (%)、10 μm 以下粒子比率 (%)、初期クラウド体積 (m^3) が推定に必要なパラメータであった。このうち 1 秒あたりの噴霧量（製品の分類や方式によって、それぞれデフォルト値が用意されている）、対象成分比率、気中比率、粒径が 10 μm 以下の粒子比率、初期クラウド体積

は、AIST-ICET 内にデフォルト値が用意されており、それぞれ 0.028–2.0 g/sec、0.4–9%、100%、0.1–38%、0.0625 m^3 であった。ただし、化学物質の曝露評価が主な目的であるために、ナノマテリアルの性状に関するパラメータは設定できず、ナノマテリアルの曝露評価を適切に行えるのかについて、検証が必要であると考えられる。

AIST-ICET を用いた、ナノマテリアルを含むスプレー型の消費者製品を使用した際の、使用者へのナノマテリアルの経口曝露量の推定結果を図 2 に示す。また、アウトプットされる結果を表 2 にまとめる。AIST-ICET の場合、室内空気中濃度 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)、吸入曝露量 ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)、時間変化に伴う濃度変化 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) がアウトプットされた。

ConsExpo-nano の使用方法は、まず、サイト (<https://www.consexponano.nl>) にアクセスする。AIST-ICET と異なり、Web 上で計算を完結することができるため、ツールをインストールする必要がない。ConsExpo-nano ではシナリオタイプとして、スプレーシナリオとカスタムシナリオが存在する。ナノマテリアルを含むスプレー型の消費者製品を使用した際の、使用者へのナノマテリアルの経口曝露量の推定には、スプレーシナリオを選択する。図 3 に推算に必要なインプット値を入力する画面を示す。表 3 に推算に必要なインプット値をまとめた。任意に設定できるパラメータとしては曝露時間 (min)、エアロゾル粒子密度 (g/cm^3)、製品に含まれる対象物質の重量割合 (-)、エアロゾルの直径 (μm)、変動係数 (-)、最大粒径 (μm)、噴霧速度 (g/sec)、製品に含まれる不揮発性物質の重量割合 (-)、気中比率 (%)、噴霧時間 (sec)、部屋の体積 (m^3)、部屋の高さ (m)、換気回数 (h^{-1})、ナノマテリアル密度 (g/cm^3)、ナノ粒子直径 (nm)、ナノ粒子高さ (nm)、ナノ粒子厚み (nm)、ナノ粒子表面積 (nm^2)、溶解率 (%)、曝露頻度 (days)、シミュレーション時間 (day)、呼吸速度 (m^3/h)、噴霧 1 秒後のクラウドの体積 (m^3)、平均粒径 (μm) があり、ナノマテリアルの性状に関する情報を入力することが可能であった。以上のほとんどのパラメータにおいてはデフォルト値が設定されていたが、ナノマテリアル密度 (g/cm^3)、ナノ粒子直径 (nm)、ナノ粒子高さ (nm)、ナノ粒子厚み (nm)、ナノ粒子表面積 (nm^2) のような、ナノマテリアルの性状についての情報は入力する必要があった。これらの情

報を収集・整理しておくことができれば、効率的かつ迅速にナノマテリアルの曝露評価をすることが可能となると考えられる。

Consexpo-nano を用いた、ナノマテリアルを含むスプレー型の消費者製品を使用した際の、使用者へのナノマテリアルの経口曝露量の推定結果の例を図4に示す。ConsExpo-nano の場合、吸入曝露量

(mg)、エアロゾル粒子径の沈降率 (%)、ナノ粒子の体積 (m³)、エアロゾル粒子の体積 (m³) がアウトプットされた。アウトプット値を表4にまとめる。ConsExpo-nano では、ナノマテリアルの粒径ごとの曝露量 (図5) や、粒径ごとの沈着部位別の沈着比率 (図6) や沈着量 (図7) を推算することも可能である。また、以上の結果は、Microsoft Excel へのエクスポートも可能である。

D. 考察

ナノマテリアルを含むスプレー型の消費者製品を使用した際の、使用者へのナノマテリアルの経口曝露量の推定において、AIST-ICET および Consexpo-nano の両者を比較すると、ナノマテリアルの曝露量の推算に必要なインプット値や、結果として得られるアウトプット値 (推算値) の項目に大きな違いがみられた。これは、それぞれの曝露評価ツールの推算メカニズムが異なることが理由であると考えられる。特に、Consexpo-nano は、ナノマテリアルの曝露評価に特化しているため、ナノマテリアルの性状を考慮した曝露評価が可能である。しかし、推算に必要な項目が多いことから、その適切なインプット値の収集が難しい。

E. 結論

ナノマテリアルを含む製品の想定される曝露経路に合わせて、それぞれの曝露評価ツールの特性を考慮しながら適宜最適なツールを選択する必要性が示唆された。

今後、ナノマテリアルの曝露量の推定に必要なパラメータの感度解析を行うことで、各パラメータのアウトプットに対する影響を定量的に評価し、曝露評価に特に重要なパラメータを特定する。これらの結果から、推定に必要なパラメータをより効率的に収集し、実用的なデータベースの構築を行う。また、行政関係者および事業者などが効率的にナノマテリアルの曝露・リスク評価を行えるようにするた

めに、ナノマテリアルを含むスプレーを使用した際の曝露量推定などをケーススタディとして、上記ツールのテクニカルガイダンスを作成する予定である。

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



図 1. AIST-ICET の計算ケース設定画面

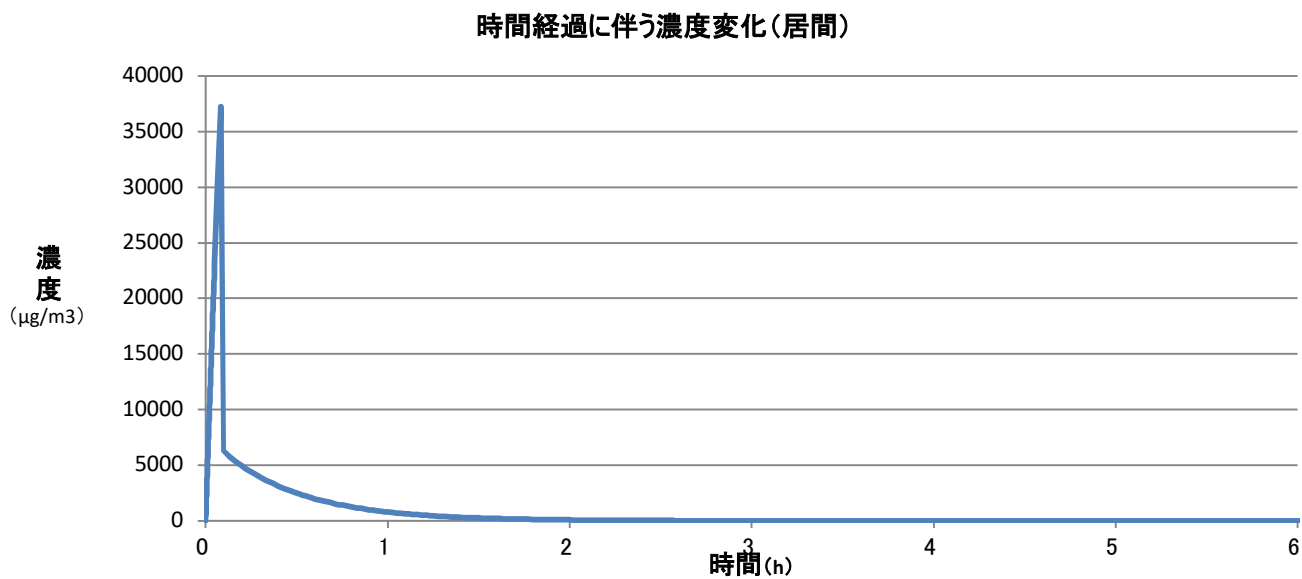


図 2. スプレー型の消費者製品を使用した際のナノマテリアル経口曝露量の推定結果の例 (AIST-ICET)

Scenario

Name or description (optional)

Scenario type

Spray scenario

Custom scenario

Exposure duration (min)

Aerosol

Density aerosol particle (g/cm³)

Weight fraction nano material in aerosol particle

Aerosol diameter

Type of distribution

Aerosol diameter (mass median) (μm)

Arithmetic coefficient of variation

Maximum aerosol diameter (μm)

Nanomaterial

Name or description (optional)

Density nanomaterial (g/cm³)

Type of distribution

Shape nano particle

Nano particle diameter (nm)

Nanomaterial soluble

Load default scenario from factsheet > show

Spray

Mass generation rate (g/s)

Weight fraction nanomaterial in product

Airborne fraction

Usage

Spray duration (s)

Spraying towards exposed person

Room

Room volume (m³)

Room height (m)

Ventilation rate (per hour)

Simulation

Exposure Pattern

Simulation duration (days)

Deposition model

Inhalation rate (m³/h)

図 3. インプット値の入力画面 (ConsExpo-nano)

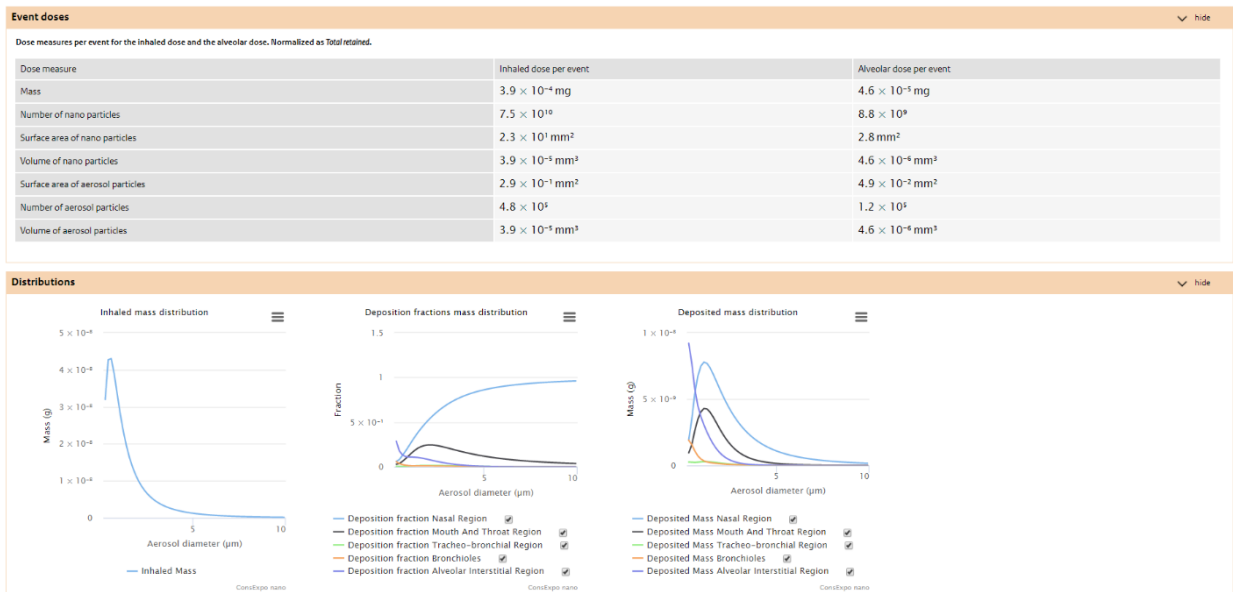


図 4. スプレー型の消費者製品を使用した際のナノマテリアル経口曝露量の推定結果の例 (ConsExpo-nano)

Distributions

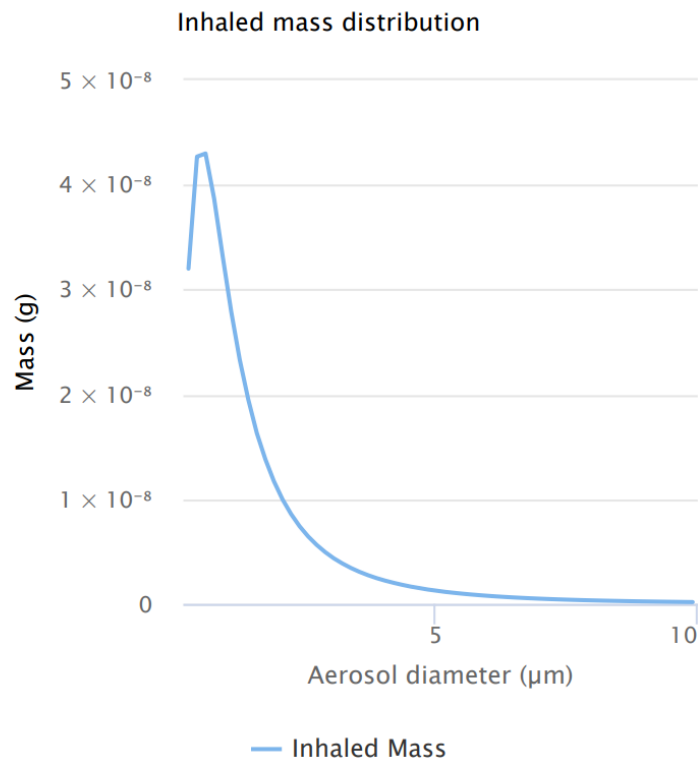


図 5. ナノマテリアルの粒径ごとの曝露量 (ConsExpo-nano)

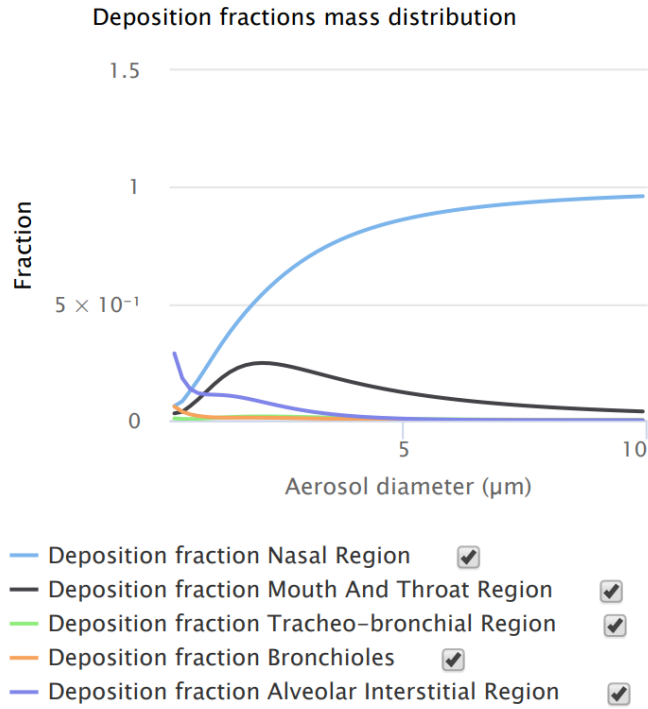


図 6. ナノマテリアルの粒径ごとの沈着部位別の沈着比率 (ConsExpo-nano)

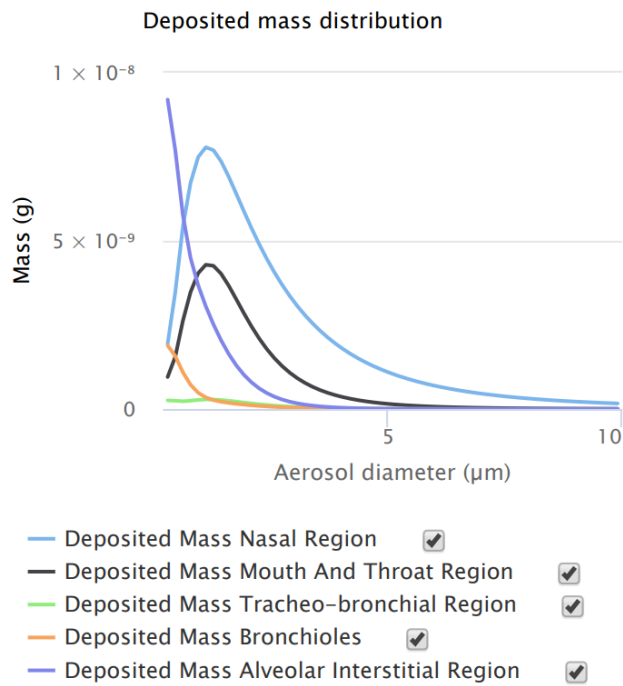


図 7. ナノマテリアルの粒径ごとの沈着部位別の沈着量 (ConsExpo-nano)

表 1. スプレー型の消費者製品を使用した際のナノマテリアル経口曝露量の推定に必要な
 インプット値 (AIST-ICET)

	変数名	単位	備考
スプレー	噴霧時間	sec	スプレー製品の使用 1 回当たり噴霧時間
	噴霧量	g/sec	スプレー製品の 1 秒当たり噴霧量
	化学物質比率	wt%	スプレー中の化学物質重量比率
	気中画分	%	スプレー製品における非揮発性物質の 浮遊量割合
	10 μm 以下粒子 比率	%	スプレー製品における非揮発性物質の 全粒径のうち粒径 10 μm 以下の比率
	初期クラウド体 積	m ³	スプレーモデルにおける 初期クラウド体積

表 2. AIST-ICET のアウトプット値

		単位
室内空气中濃度	最高濃度	μg/m ³
	平均濃度	μg/m ³
吸入	24 時間平均	μg/kg/day
	全計算期間平均	μg/kg/day

表 3. スプレー型の消費者製品を使用した際のナノマテリアル経口曝露量の推定に必要なインプット値 (ConsExpo-nano)

		Variable	Putty spray	Splay glue	Unit
Scenario type	Spray scenario	Exposure duration	30	240	min
		Density aerosol particle	-	-	g/cm ³
		Weight fraction nano material in aerosol particle	-	-	
Diameter distribution	Monodisperse	Aerosol diameter (mass median)	15.1	15.1	μm
	Log normal	Aerosol diameter (mass median)	15.1	15.1	μm
		Arithmetic coefficient of variation	1.2	1.2	
		Maximum aerosol diameter	10	10	μm
Exposure Pattern	Single event	Simulation duration	S	S	day
	Deposition model	ICRP: Male (light exercise)	S	S	
		ICRP: Female (light exercise)	S	S	
		Inhalation rate	1.4	1.4	m ³ /h
	Exposure frequency unit	Per day	S	S	
		Per week	S	S	
		Per month	S	S	
		Per year	1	12	
	Deposition model	Simulation duration	365	365	day
		ICRP: Male (light exercise)	S	S	
ICRP: Female (light exercise)		S	S		
Inhalation rate		1.4	1.4	m ³ /h	

* 「-」 は入力が必要な値

* 「S」 は画面上に候補が示される

表 4. ConsExpo-nano のアウトプット値

Dose measure		
Event doses	Inhaled dose per event, Alveolar dose per event	
	Mass	
	Number of nano particles	
	Surface of area nano particles	
	Volume of nano particles	
	Surface area of aerosol particles	
	Number of aerosol particles	
	Volume of aerosol particles	
	Distributions	Inhaled mass distribution
		Deposition fraction mass distribution
Deposited mass distribution		
Dose-time plots	Inhaled and alveolar dose one event	
	Alveolar load	

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>Hayashi K</u> , Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K.	Carbonate Apatite Micro-Honeycombed Blocks Generate Bone Marrow-Like Tissues as well as Bone.	Adv Biosys	3	1900140	2019
<u>Hayashi K</u> , Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K.	Honeycomb blocks composed of carbonate apatite, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite for bone regeneration: effects of composition on biological responses.	Mater Today Bio	4	100031	2019
<u>Hayashi K</u> , Munar ML, Ishikawa K.	Carbonate apatite granules with uniformly sized pores that arrange regularly and penetrate straight through granules in one direction for bone regeneration.	Ceram Int	45	15429- 15434	2019
Shi R, <u>Hayashi</u> <u>K</u> , Bang LT, Ishikawa K.	Effects of surface roughening and calcite coating of titanium on cell growth and differentiation.	J Biomater Appl	34	917-927	2019

Ishikawa K, Arifita T, <u>Hayashi K</u> , Tsuru K.	Fabrication and Evaluation of Interconnected Porous Carbonate Apatite from Alpha Tricalcium Phosphate Spheres.	J Biomed Mater Res B	107	269-277	2019
Sakemi Y, <u>Hayashi K</u> , Tsuchiya A, Nakashima Y, Ishikawa K.	Fabrication and Histological Evaluation of Porous Carbonate Apatite Block from Gypsum Block Containing Spherical Phenol Resin as a Porogen.	Materials	12	3997	2019
<u>Hayashi K</u> , Munar L.M, Ishikawa K.	Effects of macropore size in carbonate apatite honeycomb scaffolds on bone regeneration.	Mat Sci Eng C	111	3110848	2020
<u>Hayashi K</u> , Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K.	Granular Honeycombs Composed of Carbonate Apatite, Hydroxyapatite, and β - Tricalcium Phosphate as Bone Graft Substitutes: Effects of Composition on Bone Formation and Maturation.	ACS Appl Bio Mater	3	1787-1795	2020
Putri TS, <u>Hayashi K</u> , Ishikawa K.	Bone regeneration using β -tricalcium phosphate (β -TCP)	J Biomed Mater Res A	108A	625-632	2020

	block with interconnected pores made by setting reaction of β -TCP granules.				
Swe TT, Shariff KA, Mohamad H, Ishikawa K, <u>Hayashi K</u> , Bakar MHA.	Behavioural response of cells and bacteria on single and multiple doped Sr and Ag S53P4 Sol-Gel Bioglass.	Ceram Int		https://doi.org/10.1016/j.ceramint .	2020
<u>林幸彦朗</u>	骨髓様組織を形成するハニカムスキャフォールド	BIO INDUSTRY	2月号	24-33	2020
K.Ishii, T.Sasaki, K.Iguchi, M.Kato, H.Kanda, Y.Hirokawa, K.Arima, <u>M.Watanabe</u> , Y.Sugimura.	Pirfenidone, an anti-fibrotic drug, suppresses the growth of human prostate cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest.	J Clin Med	8(1)	44	2019
E.Usugi, K.Ishii, Y.Hirokawa, K.Kanayama, C.Matsuda, K.Uchida, T.Shiraishi, <u>M.Watanabe</u> .	Anti-fibrotic agent pirfenidone suppresses proliferation of human pancreatic cancer cells by inducing G0/G1 cell cycle arrest.	Pharmacology	103(5-6)	250-256	2019
K.Kanayama, H.Imai,	Letter to the editor: reply to Antonio Ieni	Virchow Arch	474(3)	403-404	2019

E.Usugi, T.Shiraishi, YS Hirokawa, <u>M.Watanabe.</u>	“Intratumoral HER2 heterogeneity in early gastric carcinoma: potential bias in therapeutic management”.				
Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R, Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, <u>Totsuka Y.</u> Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K.	Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison of multilesion mutational profiles.	Carcinogenesis		pii: bgz120. doi: 10.1093/ carcin/b gz120. [Epub ahead of print]	2019
Gi M, Fujioka M, <u>Totsuka Y.</u> Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H.	Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats.	Mutagenesis.	34(3)	279-287	2019
<u>Totsuka Y.</u> Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Kato	DNA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine	Chem Res Toxicol.	32 (8)	1515-1527	2019

M, Nagai M, Elzawahry A, Totoki Y, Nakamura H, Hosoda F, Shibata T, Matsuda T, Matsushima Y, Song G, Meng F, Li D, Liu J, Qiao Y, Wei W, Inoue M, Kikuchi S, Nakagama H, Shan B.	Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China.				
○Dertinger SD, <u>Totsuka Y</u> , Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL.	High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT).	Mutation Res	847	403022	2019
<u>Totsuka Y</u> , Wakabayashi K.	Biological significance of aminophenyl- β - carboline derivatives formed from co- mutagenic action of β - carbolines and	Mutation Res.		In press	2019

	aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review.				
Imai K, Nakanishi I, Ohkubo K, <u>Ohno A</u> , Mizuno M, Fukuzumi S, Matsumoto K, Fukuhara K.	Synthesis and Radical-Scavenging Activity of C-Methylated Fisetin Analogues.	Bioorg. Med. Chem	27(8)	1720-1727	2019

令和2年 2月 20日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人九州大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 久保 千穂

次の職員の令和元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) 大学院歯学研究院・准教授
(氏名・フリガナ) 林 幸彦郎 (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 2 年 5 月 19 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法
所属研究機関長 職名 学長
氏名 駒田 美弘

次の職員の令和元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) 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)

(※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。

2020年4月1日

国立医薬品食品衛生研究所 殿

機関名 国立研究開発法人国

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 中釜 育

次の職員の令和元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"/>
-------------	---

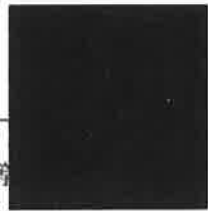
6. 利益相反の管理

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。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 東京農業大学
 所属研究機関長 職名 学長
 氏名 高野 克己



次の職員の令和元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
 ては以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 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
- 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2年4月10日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

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

次の職員の令和元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) 技術開発・共用部門 理事 (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。

令和2年 4月 7日

国立医薬品食品衛生研究所長 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

次の職員の令和元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) 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 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2年3月27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

次の職員の令和元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。