

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2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 渡邊 昌俊

令和3（2021）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 幸壱朗
2. *in vitro* 評価系の高度化と有害性発現経路の確立・・・・・・・・・・16
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・・・・・・・・・・23
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・・・・・・・・・・28
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・・・・・・・・・・32
花方 信孝
6. *in silico* 評価系に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・35
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・・・・・・・・・・50
三宅 祐一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・56

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3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。また、共通のナノマテリアルとして、二酸化チタンナノ粒子を選択した。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および共培養系を用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価を用いた、二酸化チタン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、ROS 依存性の複数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、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得るために酸化亜鉛、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科学部食品安全健康学科 教授
戸塚 ゆかり 国立がん研究センター研究所・発がん・予防研究分野 ユニット長
花方 信孝 国立研究開発法人物質・材料研究開発機構
技術開発・共用部門 副部門長
三宅 祐一 静岡県立大学 食品栄養科学部 助教
大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官
林 幸彦 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科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科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。

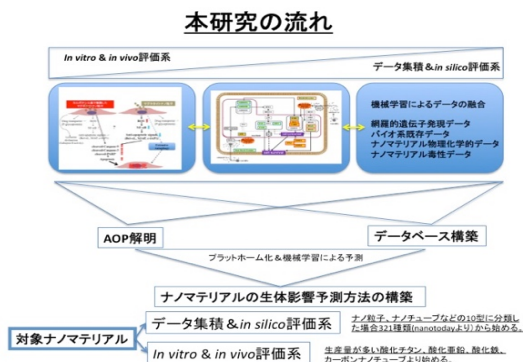


図 1. 本研究の流れ

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)。以下に令和二年度の各分担研究者の報告の概要を記載する。最終年度であるが、共通のナノマテリアル(酸化チタンナノ粒子)を使用した点から、まとめを行った。

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. 酸化チタンナノ粒子の共培養システム構成細胞に対する毒性(戸塚)

本試験で用いた酸化チタンは、JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A, AMT-100, TKP-102 である。このうち、JRCNM01001a, JRCNM1005a は EU の Joint Research Center (Ispra, Italy) より、MT-150A, AMT-100, TKP-102 は本研究班の大野先生より供給された。これらマテリアルは DMEM+ 10% FBS+1% penicillin/streptomycin 基本培地に懸濁して超音波処理を行い以下の試験に供した。酸化チタンナノ粒子は特に凝集しやすいことから、トリパンプルーの取り込みを指標に細胞毒性試験を行うこととした。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。6well plate に RAW264 及び GDL1 を 1×10^6 cell/well 及び 5×10^5 cell/well で播種し、24 時間培養した。その後、各細胞に 5 種の酸化チタンナノ粒子を RAW264 に 125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、GDL1 には 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を各 well に添加し、24 時間曝露後にトリパンプルーを用いて細胞生存率を測定した。

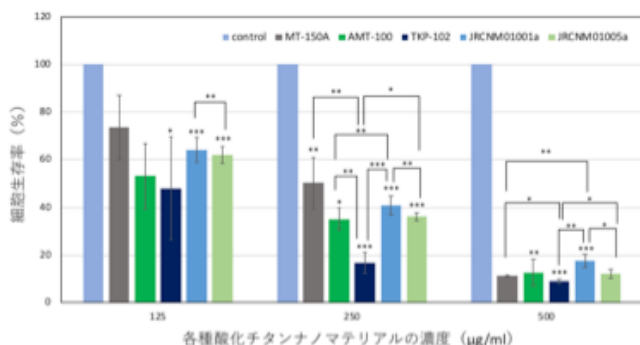


図2. 各種酸化チタンナノ粒子のRAW264に対する細胞毒性

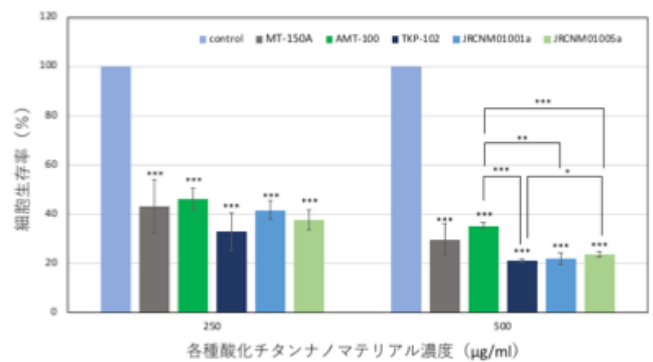


図3. 各種酸化チタンナノ粒子のGDL1に対する細胞毒性

その結果、RAW264 及び GDL1 に対して、いずれの酸化チタンナノ粒子も 用量依存的に細胞生存率を低下させることがわかった(図1及び2)。また、細胞毒性の程度はGDL1に比べRAW264で顕著であることがわかった。この結果から、遺伝毒性試験における各種酸化チタンナノ粒子の用量としては、125, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で行うことに決定した。

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、ThinCertTM (pore size; 0.4 μm 、high density: greiner bio-one) を各wellに入れ、インサート内にRAW264を播種し、24時間培養した。BMSC-5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組替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組替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する。

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 5 種の酸化チタンナノ粒子 (JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A, AMT-100, TKP-102) を 125, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の用量で 24 時間曝露した。曝露後、培地交換により酸化チタンナノ粒子を取り除き、更に 6~7 日間培養

した。それら GDL1 細胞から DNA を抽出した。まずは AMT-100 と TKP-102 暴露における *gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を実施した。また、*gpt* mutation assay を行なった。タイターが十分稼げている結果もあり、Preliminary なデータではあるが AMT-100 と TKP-102 のどちらの酸化チタンナノ粒子でも共培養した時より単培養した時の方が変異頻度の増加が見られた。しかし、AMT-100 の 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の単培養と共培養では共培養した時の方が変異頻度の増加が見られた。いずれも酸化チタンナノ粒子の用量非依存的であり、共培養よりも単培養で変異頻度が高い傾向が観察された。この結果は先行研究のナノマグネタイトや多層カーボンナノチューブの結果とは異なる結果となった。今回行なった実験で共培養よりも単培養での曝露の方が変異頻度が上昇したのはマクロファージ様細胞である RAW264.7 からの炎症性サイトカインまたは ROS の分泌が GDL1 への変異原性を上昇させるレベルではなかったか、あるいは酸化チタンナノ粒子自身が GDL1 に対して直接的な変異原性を十分に持つ可能性が考えられた。しかしながら、各サンプルのタイターからも、解析が不十分であることが考えられるため、最終的な評価には更なる検討が必要であると思われる。

B1-2. 共培養システムを用いて二酸化チタンナノ粒子などの遺伝毒性評価のための各種条件検討 (林、渡邊) : 本年は、ナノマテリアルの *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：二酸化チタンおよび酸化鉄ナノ粒子を用いることにした。

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

① 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 のメディアウムに溶かした。

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 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 +メディアウム+CCK8 : Blank

② メディアウム+Cells+CCK8 : Control

③ TiO_2 +メディアウム+Cells+CCK8 : Sample

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

凝集しやすい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、新たなプロトコールを作成し、確定した。前年度と同様に、以下の結果を得た。いずれも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。一方、さらに非曝露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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の添加量であった。

林は、本研究の対象ナノ粒子である酸化鉄ナノ粒子の新たな未知データとして使用する酸化鉄ナノ粒子の作製を行なった。鉄 (III) アセチルアセトネートを前駆体として用いた加水分解・縮合により、結晶子サイズ及び磁氣的性質が精密に制御された酸化鉄ナノ粒子 (マグネタイト或いはマグヘマイト) を得ることに成功した。得られた酸化鉄ナノ粒子の結晶子サイズは加水分解・縮合に用いるヒドラジン-水和物と水の添加量で制御することができた。結晶子サイズは 5~10 nm の範囲で、ナノメートルレベルで制御できた。

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) : 二酸化チタンナノ粒子 (JRCNM01001a・JRCNM01005a・MT-150A・MT-500B・AMT-100・AMT-600・TKP-102) の経皮毒性について、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すると共に、ヒト 3D 皮膚再構成系を用いた小核試験法を確立する前段階として NKEK 単層培養系で行っている。その結果、NHEK 単層培養系において、AMT-100・AMT-600・TKP-102 の 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の高濃度曝露 (24 時間) では細胞毒性が検出されたが、他の二酸化チタンナノ粒子では細胞毒性が検出されなかった。また、ヒト 3D 皮膚再構成系においては、いずれの二酸化チタンナノ粒子も細胞毒性を示さなかった。これらのことから、二酸化チタンナノ粒子のケラチノサイト毒性の有無と強度には当該粒子の物理科学的性状が関与し、また、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ことが示唆された。

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 の曝露から 24 時間後と 72 時間後の小核誘発について解析した。NHEK に MCC 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または DMSO を 3 または 6 時間曝露、24 または 72 時間まで培養し、2 核細胞 1000 個中の小核の有無と個数を解析した。その結果、24 時間培養条件では 2 核細胞数が著しく少なく

試験が実施できなかったが、72 時間培養条件では MMC で陽性結果、DMSO で陰性結果を得ることができた (表 1)。本年度は、二酸化チタンナノ粒子のケラチノサイト毒性の有無と強度には当該粒子の物理科学的性状が関与し、また、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ことが示唆された。また、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は分散制御が重要であると考えられた。NHEK を用いた小核試験を可能とするプロトコルが得られた。

表 1. NHEK 細胞を用いた小核試験

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	CBP1	2 核細胞		2 核細胞中の小核細胞比率 (%)
							小核あり	小核なし	
24	MMC	3	478	29	0	1.1	—	—	—
	DMSO	3	332	130	39	1.4	134	882	13.2
72	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*
	DMSO	6	320	166	15	1.4	226	776	22.6*

B2. 有害性発現経路の確立

B2-1. microRNA の挙動からの酸化鉄ナノ粒子 (Fe₃O₄-NPs) の細胞への影響解析 (渡邊・林・花方) : 酸化鉄ナノ粒子 (Fe₃O₄-NPs) の A549 細胞への影響を microRNA (miR) の発現とその標的について、前年度に引き続き解析を行った。今年度は、酸化鉄ナノ粒子 (Fe₃O₄-NPs) を各濃度で DU145 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 の発現解析を行った (図 4,5)。A549 細胞と同様に、miR-5787、miR-494-3p は、400 μg/mL より 200 μg/mL において、発現量が増加した。また、N-acetylcystein (NAC) で活性酸素種 (ROS) 発生を抑制すると、いずれもの発現量が抑制されるも、完全には抑制されなかった。過酸化水素で処理した場合、いずれも発現量が上昇し、なおかつ NAC 処理において、発現がほぼ抑制されるのを認めた。これら 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。

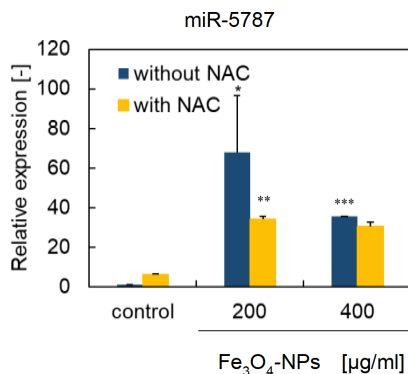


図 4. 磁性体ナノ粒子曝露による miR-5787 発現量変化

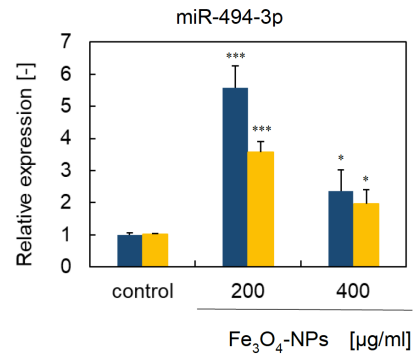


図 5. 磁性体ナノ粒子曝露による miR-494-3p 発現量変化

前年度より、eIF5 については既に報告しているが、今年度はさらに CXCR4 についての発現も解析を行なった。

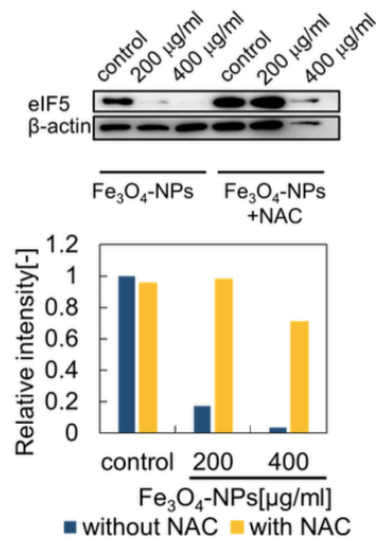


図 6. 酸化鉄ナノ粒子曝露後の eIF5 の発現

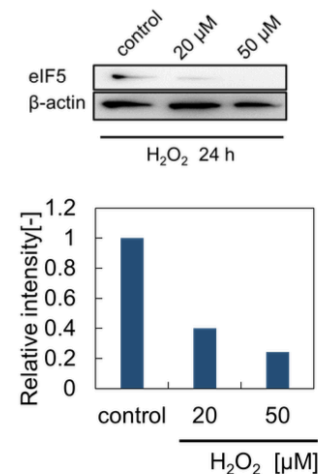


図 7. 過酸化水素曝露時の eIF5 タンパク質発現

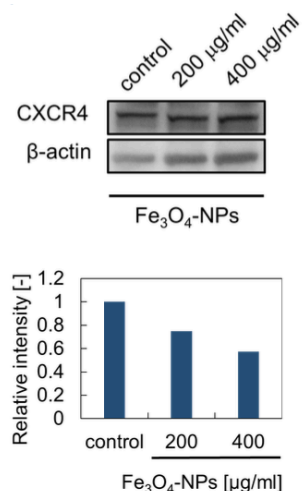


図 8. 磁性体ナノ粒子暴露時の CXCR4 タンパク質発現

磁性体ナノ粒子暴露により、特に 400 µg/mL において、eIF5 のタンパク発現量はほとんど消失するまで減少し、NAC 処理によりコントロールに近いレベルまで回復するのを認めた (図 6)。特に ROS の影響を受けた抑制を認めた。これは、過酸化水素暴露においても同様の結果を得た (図 7)。CXCR4 タンパク質の発現も eIF5 と同様に、磁性体ナノ粒子濃度依存的に減少傾向を認めた (図 8)。

microRNA の発現プロファイルから、ROS 依存性であり、複数の経路から細胞傷害に関与することが推測された (図 9)。

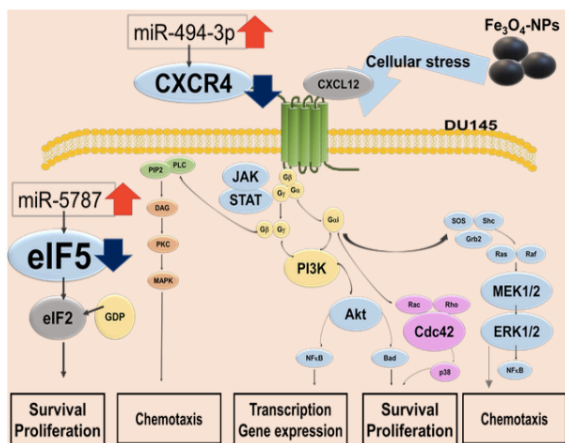


図9. まとめ

B2-2. 新規ナノマテリアル毒性評価指標の探索

新規ナノマテリアル毒性評価指標は、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 10)。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る。講座内での他の研究者の報告では、進行癌 (前立腺癌、膵癌) にお

いて、一次線毛は消失していると報告している (私信)。また、1 次線毛が、脂肪組織形成に関わることを報告した (Cell Rep, in press)。

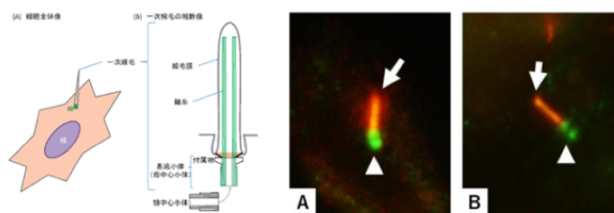


図10. 一次線毛について

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)：昨年度までに行った消費者製品に含まれる化学物質や粒子の曝露評価ツールに関する調査にて、特に汎用性が高く使い勝手も優れていると考えられた、オランダ国立公衆衛生環境研究所 (RIVM) が開発した ConsExpo-nano を本年度は対象とした。ConsExpo-nano を用いたナノマテリアル曝露評価に必要な情報を調査し、室内でのスプレー製品の使用を想定したケーススタディを行い、推算値の精度を文献値と比較することで評価した。また、ConsExpo-nano を用いて曝露量を推定する際にパラメータが結果に与える影響を定量的に評価するため、感度解析を行った。ConsExpo-nano のデフォルト値を基準とし、デフォルト値が設定されていないパラメータは二酸化チタンを含む消臭製品の使用を想定し、基準値を設定した。

ナノマテリアルを含むスプレータイプ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曝露量を推定するために必要なパラメータを収集、整理した。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) などであり、ナノマテリアルの性状を条件として入力することが可能であった。

ConsExpo-nano では、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数値を入力する必要があった。これらの情報に加え、曝露量に関する情報が記載された文献を用いて、二酸化チタンを含むスプレー型消臭製品についてケーススタディを行い、ConsExpo-nano の推算値の精度を評価した。ConsExpo-nano を用いて推算した曝露量と文献値の比は、吸入量については 0.104 倍、肺胞沈着量については 1.02 倍となった。このように、ナノ

マテリアルの曝露量に関する初期評価には、十分使用可能であると考えられる。

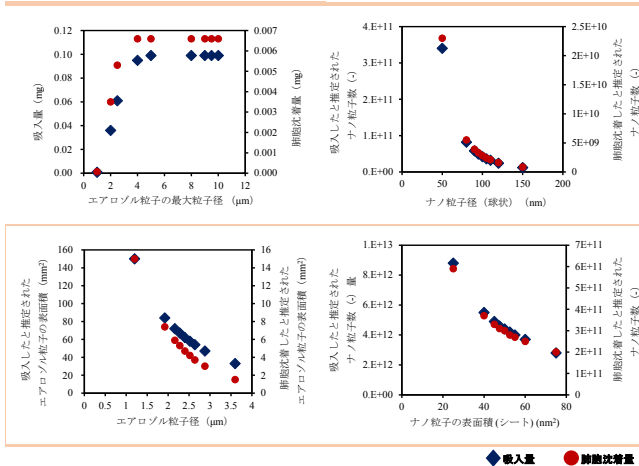


図 11. 非線形関係にあった入力パラメータと推定された曝露量の感度解析の結果

ConsExpo-nano への入力パラメータについて感度解析を行った結果を図 11 に示す。入力パラメータとエアロゾル粒子の曝露量の関係は大きく分けて、線形関係と非線形関係の 2 つに分けられた。製品に関するパラメータ、エアロゾルに関するパラメータ、製品使用状況に関するパラメータは、エアロゾル粒子の曝露量と線形関係にあった。一方、非線形関係にあった入力パラメータと推定された曝露量として、エアロゾル粒子の最大粒子径とエアロゾル粒子の曝露量、ナノ粒子径と曝露されると推定されたナノ粒子数、エアロゾル粒子径と曝露されると推定されたエアロゾル粒子の表面積、ナノ粒子の表面積と曝露されると推定されたナノ粒子数が挙げられた。パラメータが変動しうる範囲も考慮する必要があるが、非線形関係は線形関係と比較して、パラメータに敏感に反応するため、ConsExpo-nano を用いる際にはこれらのパラメータについてより詳細に調査し、入力する必要があることが示唆された。

以上の結果をもとに、ConsExpo-nano を用いて行政関係者および事業者などが手軽にナノマテリアルの曝露リスク評価を行えるようにテクニカルガイドランスを図 12 のように作成した。

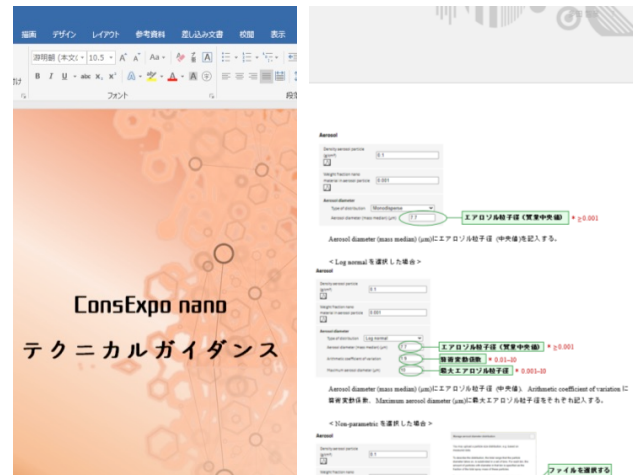


図 12. ConsExpo-nano テクニカルガイドランス

その有用性からConsExpo-nanoを取り上げ、行政関係者および事業者などが手軽にナノマテリアルの曝露リスク評価を行えるようにテクニカルガイドランスを作成し、今後の試用が望まれる。

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) :

今年度は、二つのナノマテリアルに着目し、①テイカ社から提供された 5 種の二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs : MT-150A、MT-500B、AMT-100、TKP-102、AMT-600、表 2) については、これらまでの有害性評価に重要となる物理化学的性状の項目について測定を含めた物性情報を収集すると共に、有害性データについての物性との関連性解析を実施した。②マグネタイトについては、これまでの研究で実施 (主に厚生労働科学研究成果データベース MHLW GRANTS SYSTEM への公表分) されている有害性情報と物性情報を収集し、有害性データについての物性との関連性解析を実施した。

【有害性情報の調査対象情報源】

本研究班で実施された in vitro 毒性試験結果および厚生労働科学研究成果データベース MHLW GRANTS SYSTEM に公表された厚労科学研究費補助金化学物質リスク研究事業研究報告書、及びこれらの研究成果として公表された原著論文を調査対象情報源とした。

【物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目】

物理化学的性状データは、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等について収集整理した。調査対象情報源に記載された有害性情報は、in vivo 試験結果 (吸入ばく露試験、気管内投与試験、腹腔内投与・経口投与試験による急性毒性、免疫毒性、アジュバント効果) in vitro 試験結果 (細

胞毒性試験、遺伝毒性試験等の EC50 値等) について収集整理した。

表 2 調査対象物質

	種類	Crystal phase	Crystal size (nm)	Surface coating	Composition (TiO ₂ , %)
MT-150A	微粒子酸化チタン	Rutile	15	uncoating	99.8
MT-500B	微粒子酸化チタン	Rutile	35	uncoating	99.7
AMT-100	光触媒作用酸化チタン	Anatase	6	uncoating	98.7
TKP-102	光触媒作用酸化チタン	Anatase	15	uncoating	99.6
AMT-600	光触媒作用酸化チタン	Anatase	30	uncoating	99.7

【二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状の分析対象項目】

- 不純物の成分分析 (化学分析) : 高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) (Ce、Nb は蛍光 X 線分析) による定性分析 (対象元素 : K、Ca、Na、S、Ce、Nb : 下限 0.1%、Fe、Si、P、Al、Cr、Zr、Ti : 下限 0.01%)、ICP 発光分光分析法による定量分析 (対象元素 : P、Zr、Ca、Ti、Ce、Nb : 下限 0.01%)
- 細孔分布・比表面積測定 (粒子解析) : 窒素吸着 BET 多点法による細孔分布ならびに比表面積測定
- 親水性および疎水性評価 (表面化学分析) : 粒子浸透速度測定、粒子接触角測定

【研究結果】

二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状の結果を表 3 に示す。

表 3 二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状

Property	Method/Instrument	MT-150A	MT-500B	AMT-100	TKP-102	AMT-600
Crystal phase		Rutile	Rutile	Anatase	Anatase	Anatase
Crystal size (nm)		15	35	6	15	30
Composition※						
Impurity (µg/g Fe)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Impurity (µg/g Si)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Impurity (µg/g K)	ICP-AES	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
Impurity (µg/g P) ※1	ICP-AES	< 100	< 100	680	770	620
Impurity-coating (µg/g Al)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Impurity (µg/g Cr)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
Impurity (µg/g Zr) ※1	ICP-AES	286	300	270	300	470
Impurity (µg/g Ca) ※1	ICP-AES	870	910	160	280	280
Impurity (µg/g Na)	ICP-AES	2000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
Impurity (µg/g S)	ICP-AES	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
Impurity (µg/g Mg)		-	-	-	-	-
Impurity (% Ce) ※3	ICP-AES	< 0.1	< 0.1	0.9	< 0.1	< 0.1
Impurity (% Nb) ※3	ICP-AES	0.2	0.3	0.4	0.4	0.3
O (wt%)	ICP-AES	55.7	59.6	52.1	58.4	58.5
Ti (wt%) ※2	ICP-AES	92.9(90<)	99.5(90<)	86.9(93)	97.5(96)	97.5(98)
TiO ₂ (%) (括弧内はdata-sheetの値)	ICP-AES	92.9(90<)	99.5(90<)	86.9(93)	97.5(96)	97.5(98)
Coating		no	no	no	no	no
Hydrophilic / Hydrophobic		Hydrophilic	Hydrophobic	Hydrophilic	Hydrophilic	Hydrophobic
Specific surface area (m ² /g) (括弧内はdata-sheetの値)	BET	109	35	325(280)	109(110)	55(62)
micropore distribution (micropore distribution (細孔容積 cm ³ /g))	BET	0.44	-	0.36	0.32	0.24
micropore distribution (micropore distribution (細孔径 nm))	BET	46	-	2.7	13	26

不純物の成分分析 (化学分析) の結果、Ce(セリウム)は<0.01、Nb(ニオブ)は、<0.4 で検出された。

粒子解析に関して、比表面積は BET プロットの傾き及び切片を用い、BET 式より単分子層吸着量を求め、単分子層吸着量にガス分子一個の占める断面積 (分子占有断面積) をかけて算出した。一方、細孔分布は、BJH 解析による細孔分布曲線を用いて求めた。その結果、MT-150A は、他の検体と比較すると大きな穴を占有されていた。TKP-

102 は AMT-150A と同じ比表面積であるが、細孔径が小さく (1/3~1/4) なり、結果的にその容積も小さくなった。AMT-100 は比表面積が最大だが、MT-150A に比べて細孔径が非常に小さいため、その容積も小さくなり、小さな穴で占有されていることが推察された。AMT-600 に関しては比較的少数の大きな穴で占有されていることが推察された。MT-500B はガス吸着による細孔分布測定の上限 (100nm) 付近から上限以上においてガスの吸着が確認されたことから、細孔容積は求めることができなかった。

親水性および疎水性の傾向および相関では (詳細は分担報告書を参照)、高い逆相関 (R²=0.9084) を示し、MT-150A、AMT-100、TKP-102 (ほぼ有意差なし) AMT-600>MT500B となり、AMT-600、MT500B は疎水性の傾向を示した。予試験的に二酸化チタンナノ粒子の物性と細胞毒性試験結果 (A549 細胞に与える毒性評価試験結果) との関連性解析について、多変量解析 (OPLS 解析) を実施した (図 13)。解析結果から、毒性を示す TKP-102 は、不純物 (P、Zr、Ca) の多さの影響が示唆された。

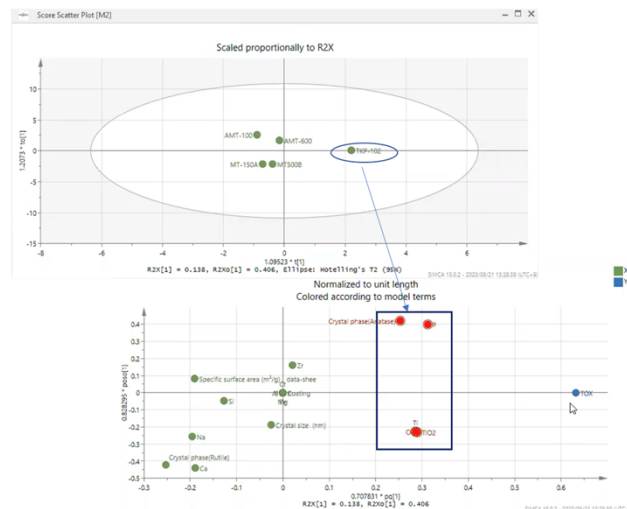


図 13. 物性と細胞毒性試験と物性との多変量解析 (OPLS 解析)

マグネタイトは、*in vivo* 急性毒性試験 (1 試験) 慢性毒性試験 (1 試験) では、試験種類、動物種、試験条件、BAL 細胞数の増加、炎症、生化学値等の変動が生じた LOAEL 等についての Endpoint について調査し収集・整理を行った。*in vivo* (7 試験) / *in vitro* (2 試験) 遺伝毒性試験では、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。*in vitro* 細胞毒性試験 (13 試験) 試験種類、細胞種、試験条件、結果 (EC₅₀ 等) を収集・整理し、その他 2 試験の *in vivo* 試験 (肺発がんイニシエーター活性の検討および中期発がん性試験) の合計 26 試験について収集した (詳細は分担報告書を参照)。

B4. 機械学習などによる*in silico*生体影響予測の準備（花方）：データベースを構築する上で元データとして使用する既存のデータベースを選定するために生命科学系データベースの調査、データベースの構築法および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など予測モデルの検討、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。

B4-1. 既存データベースの調査

Integbioデータベースカタログを中心に調査を行なったところ、本研究の目的に適するいくつかのデータベースが見出された（表1）。そのうち最大のもはよく知られているNCBI運営のGene Expression Omnibus (GEO)であり、DataSetsで4,348件、Seriesで105,964件、Samplesで2,783,483件の遺伝子発現データが登録されている（2018/12/14調査時点）。今後はこのGEOのデータを主に利用することとした。また、Integbioデータベースカタログには収録されていないが、化学物質の曝露と遺伝子や病気との関連をまとめたデータベースとしてノースカロライナ州立大学運営のComparative Toxicogenomics Database (CTD)が存在し、補足的に利用可能と思われる。なお、公開されている既存データベースの中でも、全データを一括ダウンロードして再利用可能なデータベースと、検索はできるものの一部データしかダウンロードできないデータベースが存在した。後者のタイプのデータベースからウェブスクレイピングにより全データをダウンロードすることは可能かもしれないが、当該データベースのライセンス条件的に問題がないかどうか慎重な検討が必要と思われる。

B4-2. 機械学習の実施環境

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

B4-3. データベース構築および機械学習の調整と検討

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を進めた。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。入力特徴量については

計算機的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た。

B4-4. 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MMT-8法により評価した。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かった。

B4-4. ZnO曝露細胞のマイクロアレイ解析

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。発現強度の分布は概ね均等であった。

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14）。まず、THP-1細胞とA549細胞でクラスタが大きく分かれている。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。

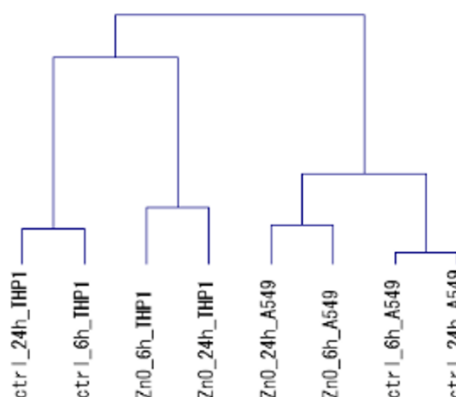


図 14. 階層的クラスタリング

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、二酸化チタンナノ粒子(TiO₂ NPs)を対象に、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。今更ながらであるが、ナノマテリアルの毒性はその工程で含まれる不純物の影響やどの細胞を使用して細胞毒性評価をするかに影響することが判明した。自分たちの特異的なin vitro系評価系による自験データを③に組み込む統合的な評価系の構築の可能性を得ることができた。

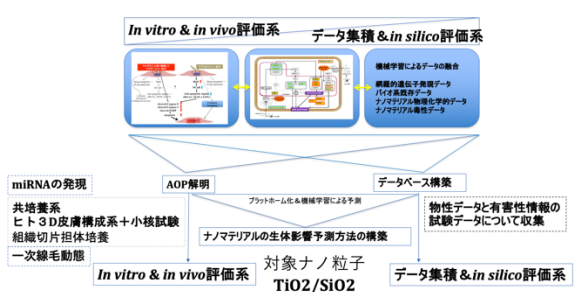


図15 本研究のまとめ

(倫理面の配慮)

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

通達「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応につい

て」(厚生労働省労働基準局, 基発第0207004号, 平成20年2月7日)に基づいて、実験環境管理を行う。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. [Hayashi K](#), Kato N, Kato M, Ishikawa K. Impacts of channel direction on bone tissue engineering in 3D-printed carbonate apatite scaffolds. Mater Des, 2021 DOI: 10.1016/j.matdes. 2021.109686.
2. Sakemi Y, [Hayashi K](#), Akira Tsuchiya A, Nakashima Y, Ishikawa K. Reconstruction of critical-size segmental defects in rat femurs using carbonate apatite honeycomb scaffolds. J Biomed Mater Res A, 2021. DOI: 10.1002/jbm.a.37157.
3. [Hayashi K](#), Ishikawa K. Honeycomb scaffolds fabricated using extrusion molding and sphere packing theory for bone regeneration. ACS Appl Bio Mater, 4(1), 721-730, 2021.
4. Kim H, Röth D, Isoe Y, [Hayashi K](#), Mochizuki C, Markus K, Nakamura M. Protein corona components of polyethylene glycol-conjugated organosilica nanoparticles modulates macrophage uptake. Colloids Surf B Biointerfaces, 199, 111527, 2021.
5. [Hayashi K](#), Ishikawa K. Effects of nanopores on the mechanical strength, osteoclastogenesis, and osteogenesis in honeycomb scaffolds. J Mater Chem B, 8(37), 8536-8545, 2020.
6. Nakamura M, [Hayashi K](#), Nakamura J, Mochizuki C, Murakami T, Miki H, Ozaki S, Abe M. Near-infrared fluorescent thiol-organosilica nanoparticles that are functionalized with IR-820 and their applications for long-term imaging of in situ labeled cells and depth-dependent tumor in vivo imaging. Chem Mater, 32(17), 7201-7214, 2020.
7. Putri TS, [Hayashi K](#), Ishikawa K. Fabrication of three-dimensional interconnected porous blocks composed of robust carbonate apatite frameworks. Ceram Int, 46(12), 20045-20049, 2020.
8. [Hayashi K](#), Tokuda A, Nakamura J, Sugawara-Narutaki A, Ohtsuki C. Tearable and fillable composite sponges capable of heat generation and drug release in response to alternating magnetic field. Mater,13(16), 3637, 2020.
9. 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, 46(11), 17881-17890 2020.
10. [Hayashi K](#), Munar ML, Ishikawa K. Effects of macropore size in carbonate apatite honeycomb scaffolds on bone regeneration. Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl, 111, 110848, 2020.
11. Yamakawa D, Katoh D, Kasahara K, Shiromizu T, Matsuyama M, Matsuda C, Maeo Y,

- Watanabe M, Inagaki M. Primary cilia dependent-lipid rafts/caveolin dynamics regulate adipogenesis. *Cell Rep*, 34(10), 108817, 2021.
12. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductor for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci*, 112(1), 7-15, 2021.
 13. Kajiwara S, Ishii K, Sasaki T, Kato M, Nishikawa K, Kanda H, Arima K, Watanabe M, Sugimura Y. Castration-induced stromal remodeling disrupts the reconstituted prostate epithelial structure. *Lab Invest*, 100(5), 670-681, 2020.
 14. Yamamoto N, Eguchi A, Hirokawa Y, Ogura S, Sugimoto K, Iwase M, Watanabe M, Takei Y. Expression pattern of PLXDC2 in human hepatocellular carcinoma. *Monoclonal Antib Immunodiagn Immunother*. 39(2), 57-60, 2020.
 15. Mahmud MRA, Ishii K, Bernal-Lozano C, Delgado-Sainz I, Toi M, Akamatsu S, Fukumoto M, Watanabe M, Takeda S, Cortes-Ledesma F, Sasanuma H. TDP2 suppresses genomic instability induced by androgens in the epithelial cells of prostate glands. *Genes to Cells*, 00, 1-16, 2020.
 16. Sonoda Y, Sasaki Y, Gunji A, Shirai H, Araki T, Imamichi S, Onodera T, Rydén AM, Watanabe M, Itami J, Honda T, Ashizawa K, Nakao K, Masutani M. Reduced tumorigenicity of mouse ES cells and the augmented anti-tumor therapeutic effects under Parg deficiency. *Cancers*, 12(4), 1056, 2020.
 17. Mizutani K, Shirakami E, Ichishi M, Matsushima Y, Umaoka A, Okada K, Yamaguchi Y, Watanabe M, Morita E, Yamanaka K. Long-lasting severe dermatitis affect visceral adipose tissue via skin-derived inflammatory cytokines. *Int J Med Sci*, 21, 3367, 2020.
 18. Kanayama K, Imai H, Usugi E, Matsuda C, Ichishi M, Hirokawa Y, Watanabe M. Cancer-related gene mutations and intratumoral genetic heterogeneity in human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneous gastric cancer. *Pathol Int*, 70(11), 865-870, 2020.
 19. Hirokawa YS, Kanayama K, Kagaya M, Shimojo N, Uchida K, Imai H, Ishii K, Watanabe M. SOX11-induced decrease in vimentin and an increase in prostate cancer cell migration attributed to cofilin activity. *Exp Mol Pathol*, 117, 104642, 2020
 20. Wakai E, Suzumura Y, Ikemura K, Mizuno T, Watanabe M, Takeuchi K, Nishimura Y. An integrated in silico and in vivo approach identifies protective effects of palonosetron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Pharmaceuticals*, 13,480, 2020.
 21. Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabenjakul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE,, Kurane I. U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. *Virology*, 555, 71-77, 2021.
 22. Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 96, 180-187, 2020.
 23. Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel *o*-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*, 33, 1907-1914, 2020.
 24. Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ*, 42, 16, 2020.
 25. 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*, 41, 368-376, 2020.
 26. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kannno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci*. 2021 Mar 4. doi: 10.1111/cas.14873.
 27. Chinnathambi S, Hanagata N, Yamazaki T, Shirahata N. Nano-Bio Interaction between Blood Plasma Proteins and Water-Soluble Silicon Quantum Dots with Enabled Cellular Uptake and Minimal Cytotoxicity. *Nanomaterials*, 10(11), 2250, 2020.
2. 学会発表
 1. 林幸壱朗、石川邦夫。「炭酸アパタイトハニカムスキャホールドの骨誘導能評価」、日本歯科理工学会 第75回学術講演会
 2. Hayashi K. Impacts of pore architecture on bone regeneration in honeycomb scaffolds, KOB & OBT Research Center Joint International Symposium, Feb. 6, 2021, Fukuoka. 受賞講演
 3. Oshio L, Nakagawa Y, Watanabe M, Iijima K. Functional analysis of microRNA in anti-prostate cancer activity of magnetic iron oxide nanoparticles. 第 43 回日本分子生物学会年会.

- オンライン 12.2-4, 2020.
4. Inagaki M, Kasahara K, Yamakawa D, Matsuda C, Watanabe M. The role of primary cilia in cell growth, differentiation and tumorigenesis. 第 79 回日本癌学会学術総会.リーガロイヤルホテル広島.10.1-3, 2020.
 5. Watanabe M. The application of nanomaterial in anti-tumor drugs. China-ASEAN International Cancer Precision Medicine Conference. Guangxi Medical University. 11.6-8, 2020.
 6. 戸塚ゆ加里 NGSによるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望 第 47 回日本毒性学会学術年会シンポジウム (2020 年 6 月 Web 開催)
 7. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 がん予防学術大会 (2020 年 9 月 Web 開催)
 8. 戸塚ゆ加里 Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach 第 79 回癌学会 (2020 年 10 月、広島)
 9. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによりがんの要因を解明する 第 2 回 三陸包括的緩和医療研究会 (2020 年 10 月 Web 開催)
 10. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第 49 回 環境変異原学会 (2020 年 9 月、静岡)
 11. 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 第 37 回 日本毒性病理学会 (2021 年 1 月、Web 開催)
 12. 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 第 12 回 JBF シンポジウム (2021 年 3 月、Web 開催)
 13. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Hasegawa Y, Yuzawa K, Kubo Y, Nagasawa A, Yano N, Ohnuki A, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Nakae D. Histopathological features during development of the peritoneal mesothelioma in F344 rats administered multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) and a potential relationship between its pathogenesis and serum levels of apolipoproteins. EUROTOX 2020 (2020 年 9 月 6-9 日, デンマーク王国コペンハーゲン市).
 14. 宍戸健太, 煙山紀子, 政所陽菜, 小川絢子, 小川秀治, 阿部有加里, 山口彩音, 宇野絹子, 美谷島克宏, 中江大. 3D ヒト皮膚再構成系による folpet の経皮毒性評価法の検討. 第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020 年 6 月 29 日~7 月 1 日, リモート開催).
 15. 前野愛, 北條幹, 坂本義光, 湯澤勝廣, 長谷川悠子, 久保喜一, 長澤明道, 安藤弘, 田中和良, 海鉾藤文, 生嶋清美, 山本行男, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 高橋祐次, 横田 理, 小林憲弘, 広瀬明彦, 中江大. ラットによる多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の長期気管内反復投与試験: 1 年経過時点における報告. 第 47 回日本毒性学会学術年会 2020 年 6 月 29 日~7 月 1 日, リモート開催).
 16. 坂本義光, 北條幹, 前野愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の長期反復気管内投与ラットにおける肺神経内分泌細胞(PNEC)の増生. 第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020 年 6 月 29 日~7 月 1 日, リモート開催).
 17. 宍戸健太, 煙山紀子, 小川秀治, 大西未悠, 桑原みなみ, 波多野遥子, 渡邊 厚, 佐野龍平, 美谷島克宏, 中江大. 金属ナノ粒子の経皮遺伝毒性に関する新規 *in vitro* 評価系の構築. 第 37 回日本毒性病理学会総会および学術集会 (2021 年 1 月 28 日~2 月 26 日, リモート開催).
 18. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Ohnuki A, Maeno A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kannno J, Hirose A, Nakae D. Declines serum levels of apolipoproteins during the development of peritoneal mesothelioma by multiwalled carbon nanotube in rats. Virtual 2021 Society of Toxicology (SOT) Annual Meeting and ToxExpo (2021 年 3 月 12-26 日, リモート開催).
 19. 大野彰子, 渡邊昌俊, 広瀬明彦: 多変量解析を用いたナノマテリアルの毒性評価手法の開発, 第 47 回日本毒性学会学術集会 (2020. 6.29-7.1, web 開催)
 20. FUKUHARA K, OHNO A. Generation of reactive oxygen species following photoirradiation of nitromusks, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
 21. OHNO A, WATANABE M, HIROSE A. Application to toxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
 22. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の解析, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
 23. IJIMA K, NISHIDA A, OHNO A, ASHIKAGA T. Comparison of Sensitization Potentials between Silver Nanoparticles and Silver Ions using Monocytic Cell Line THP-1, SOT 60th Annual Meeting and ToxExpo (March 15-18,

2021, virtual meeting)

24. 大野彰子, 沖山 佳生, 広瀬 明彦, 福原 潔:
ニトロ多環芳香族炭化水素の構造と変異原性に関するドッキングスタディ, 日本薬学会第 141 年会 (2021. 3.26-3.29, web 開催)
25. 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-メチルフィセチンのラジカル消去作用, 日本農芸化学会 2021 年度大会 (2021. 3.18-3.21, web 開催)
26. 鱒川雅花, 多田智彦, 徳村雅弘, 王齊, 三宅祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和. ConsExpo nano を用いたスプレー製品中ナノマテリアルの曝露量推定における曝露パラメータの影響評価, 2020 年室内環境学会学術大会, 郡山. (2020 年 12 月)

E.知的所有権の取得状況

1. 特許取得
 1. 発明の名称: 医用ハニカム構造体およびその製造方法、医用組織再建袋、成型型. 発明者: 石川 邦夫、林 幸壺朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴. 出願人: 石川邦夫、株式会社ジーシー. 国際出願番号: PCT/JP2021/008783 出願日: 2021.3.5.
 2. 発明の名称: 医用ハニカム構造体およびその製造方法、医用組織再建袋、成型型. 発明者: 石川 邦夫、林 幸壺朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴. 出願人: 石川邦夫. 出願番号: 特願 2021-034784. 出願日: 2021.3.4.
 3. 発明の名称: 炭酸アパタイト被覆材料およびその製造方法. 発明者: 石川 邦夫、林 幸壺朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴. 出願人: 石川邦夫. 出願番号: 特願2021-56520. 出願日: 2021.3.30.
2. 実用新案登録
なし
3. その他
 1. 2020年度 九州大学歯学優秀研究者賞, 九州大学, 2021年1月.
 2. 日本歯科理工学会 第75回学術講演会 株式会社ジーシー賞受賞, 2020年4月.

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 九州大学大学院歯学研究院 准教授

研究要旨：鉄（III）アセチルアセトネートを前駆体として用いた加水分解・縮合により、結晶子サイズ及び磁氣的性質が精密に制御された酸化鉄ナノ粒子（マグネタイト或いはマグヘマイト）を得ることに成功した。得られた酸化鉄ナノ粒子の結晶子サイズは加水分解・縮合に用いるヒドラジン一水和物と水の添加量で制御することができた。結晶子サイズは5～10 nmの範囲で、ナノメートルレベルで制御でき、これに伴い磁気特性も変化した。室温において、最小結晶子サイズの酸化鉄ナノ粒子の飽和磁化は約 50 emu/g であり、最大結晶子サイズの酸化鉄ナノ粒子の飽和磁化は 80 emu/g であった。つまり、結晶サイズが約 5 nm 増加すると、飽和磁化が約 1.6 倍増加することが明らかになった。また、最大結晶子サイズの酸化鉄ナノ粒子の飽和磁化は、バルクのマグネタイトの 85%以上の飽和磁化を示し、比表面積の大きいナノ粒子には高い飽和磁化を示した。一方、結晶子サイズによらず全ての酸化鉄ナノ粒子において、保磁力及び残留磁化がゼロであり、超常磁性的挙動を示した。以上より、本手法を用いることで、結晶子サイズと磁気特性を制御でき、その磁気特性は超常磁性であり、高い飽和磁化を示すことが明らかになった。

A. 研究目的

細胞・タンパクの分離、磁気共鳴画像法(MRI)、磁気ハイパーサーミア等のバイオメディカル分野において、酸化鉄ナノ粒子が用いられている。これらの用途では、超常磁性を示す酸化鉄ナノ粒子を用いることが多い。酸化鉄ナノ粒子の場合、超常磁性は一般に10 nm以下で発現される。一方、10 nm以下の酸化鉄ナノ粒子では目的とする性能が得られないことがある。例えば、酸化鉄ナノ粒子を磁気ハイパーサーミアに応用する場合、発熱能が不足しており、適正濃度において、治療効果を示す温度まで加熱することができないことがある。このため、10 nm以下の超常磁性を維持しつつ、磁気特性、特に飽和磁化を高めることが求められる。そこで本研究では、10 nm以下の範囲において、酸化鉄ナノ粒子の結晶子サイズを精密に制御する方法を確立し、超常磁性を示しつつ、飽和磁化を可能な限り高めることを試みた。

B. 研究方法

鉄（III）アセチルアセトネート（Fe(acac)₃、日本化学産業、東京）をエタノールに溶解した。この溶液に、hydrazine monohydrateを（キシダ化学、大阪）と蒸留水を添加した。異なるFe(acac)₃溶液

濃度、hydrazine monohydrate添加量、蒸留水添加量で合成した酸化鉄ナノ粒子のサンプル名をMNPs-1～MNPs-9とし、表1にこれらの合成条件を示す。Fe(acac)₃溶液にhydrazine monohydrateと蒸留水を添加した後、78°Cで24時間攪拌した。最後に、遠心分離（10,000 rpm、10分）により生成した酸化鉄ナノ粒子を回収し、エタノールと蒸留水で少

表1. 酸化鉄ナノ粒子作製条件

Sample	Fe(acac) ₃ concentration (mM)	Additive amount of hydrazine monohydrate (equiv.)	Additive amount of distilled water (equiv.)
MNPs-1	0.5	6	72
MNPs-2	0.7	6	72
MNPs-3	0.9	4	72
MNPs-4	0.9	6	36
MNPs-5	0.9	6	72
MNPs-6	0.9	6	108
MNPs-7	0.9	8	72
MNPs-8	0.9	8	144
MNPs-9	1.1	6	72

なくとも3回洗浄した。

（倫理面の配慮）

倫理面で配慮が必要な実験は行っていない。

C. 研究結果

図1に合成した酸化鉄ナノ粒子（サンプル名 MNPs-1～MNPs-9）のX線回折（XRD）図形を示す。全てのサンプルにおいて、X線回折パターン

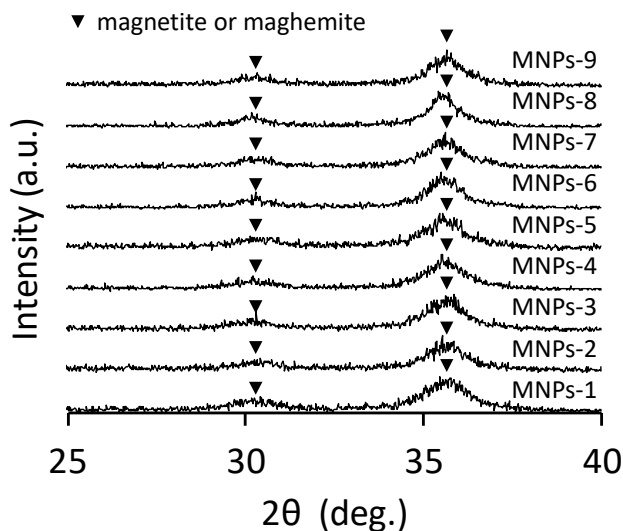


図1. 酸化鉄ナノ粒子のXRDパターン

はマグネタイト・マグヘタイトのパターンと一致した。これにより、本手法により、マグネタイト・マグヘタイトを合成できることが明らかになった。

Scherrer式から、MNPs-1～MNPs-9の結晶子サイズを求め、結晶子サイズに及ぼす $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 濃度の影響、ヒドラジン添加量の影響、水添加量の影響を評価した（図2）。 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 濃度、ヒドラジン添加量、水添加量の増加とともに、結晶子サイズも増大した。これらの条件を調整することにより、酸化鉄ナノ粒子の結晶子サイズは5～10 nmの範囲で、ナノメートルレベルで制御できることが明らかになった。

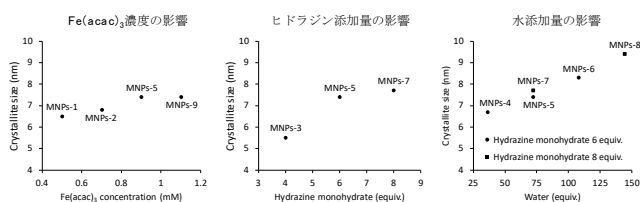


図2. 酸化鉄ナノ粒子の作製条件と結晶子サイズの関係

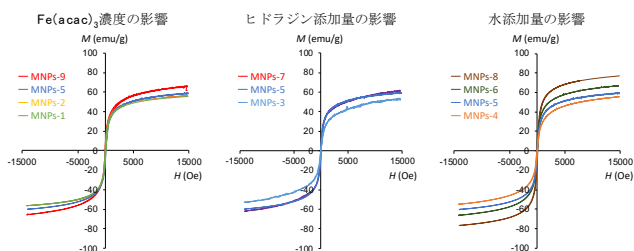


図3. 酸化鉄ナノ粒子の室温での磁化曲線

MNPs-1～MNPs-9の室温での磁気特性を振動試料型磁力計により測定し、酸化鉄ナノ粒子合成

時の $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 濃度、ヒドラジン添加量、水添加量（つまり酸化鉄ナノ粒子の結晶子サイズ）が磁気特性に与える影響を評価した（図3）。 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 濃度、ヒドラジン添加量、水添加量の増加（つまり結晶子サイズの増大）とともに、飽和磁化が向上した。また、いずれのサンプルも保磁力・三流磁化はゼロであり、超常磁性的挙動を示した。

D. 考察

鉄錯体を前駆体とする加水分解・縮合により酸化鉄ナノ粒子を合成する本方法は、 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 濃度、ヒドラジン添加量、水添加量の調整により、1ナノメートルオーダーで結晶子サイズを制御でき、従前の酸化鉄作製法に比べより精密な結晶子サイズ制御が可能である。これにより、10 nm以下の結晶子サイズと磁気特性の関係性を詳細に評価することができた。5～10 nmの範囲では、いずれのサンプルも超常磁性的挙動を示すが、その飽和磁化は結晶子サイズに大きく依存することが明らかになった。10 nmの酸化鉄ナノ粒子は5 nmの酸化鉄ナノ粒子の約1.6倍の飽和磁化を有し、僅か5 nmの差で劇的に飽和磁化が変化することが明らかになった。また、10 nmの酸化鉄ナノ粒子の飽和磁化は約80 emu/gであったことから、バルク酸化鉄の飽和磁化の約85%に迫り、比表面積の大きいナノ粒子でありながら、比較的高い飽和磁化を示すことが明らかになった。これは本手法で得られる酸化鉄ナノ粒子の粒子径に占める磁氣的粒径が大きいことを示している。バイオメディカル用途において用いられる酸化鉄ナノ粒子は超常磁性を示すものが多いが、用途によっては飽和磁化が不足しており、満足のいく結果が得られないことがある。本研究は、超常磁性を示す範囲で、最大限飽和磁化を高める手法を提案するものであり、バイオメディカル応用に資する酸化鉄ナノ粒子の合成に役立つと思われる。

E. 結論

$\text{Fe}(\text{acac})_3$ を前駆体として、加水分解・縮合により、酸化鉄ナノ粒子を作製することができた。前駆体濃度及び加水分解・縮合条件によって、酸化鉄ナノ粒子の結晶子サイズをナノメートルスケールで制御することができ、これにより磁気特性も制御することができた。本方法により、超常磁性を維持したまま、飽和磁化を向上させることができるが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. [Hayashi K, Kato N, Kato M, Ishikawa K. Impacts of channel direction on bone tissue engineering in](#)

- 3D-printed carbonate apatite scaffolds. *Mater Des*, 2021 DOI: 10.1016/j.matdes. 2021.109686.
2. Sakemi Y, Hayashi K, Akira Tsuchiya A, Nakashima Y, Ishikawa K. Reconstruction of critical-size segmental defects in rat femurs using carbonate apatite honeycomb scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 2021. DOI: 10.1002/jbm.a.37157.
 3. Hayashi K, Ishikawa K. Honeycomb scaffolds fabricated using extrusion molding and sphere packing theory for bone regeneration. *ACS Appl Bio Mater*, 4(1), 721-730, 2021.
 4. Kim H, Röth D, Isoe Y, Hayashi K, Mochizuki C, Markus K, Nakamura M. Protein corona components of polyethylene glycol-conjugated organosilica nanoparticles modulates macrophage uptake. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 199, 111527, 2021.
 5. Hayashi K, Ishikawa K. Effects of nanopores on the mechanical strength, osteoclastogenesis, and osteogenesis in honeycomb scaffolds. *J Mater Chem B*, 8(37), 8536-8545, 2020.
 6. Nakamura M, Hayashi K, Nakamura J, Mochizuki C, Murakami T, Miki H, Ozaki S, Abe M. Near-infrared fluorescent thiol-organosilica nanoparticles that are functionalized with IR-820 and their applications for long-term imaging of in situ labeled cells and depth-dependent tumor in vivo imaging. *Chem Mater* 32(17), 7201-7214, 2020.
 7. Putri TS, Hayashi K, Ishikawa K. Fabrication of three-dimensional interconnected porous blocks composed of robust carbonate apatite frameworks. *Ceram Int*, 46(12), 20045-20049, 2020.
 8. Hayashi K, Tokuda A, Nakamura J, Sugawara-Narutaki A, Ohtsuki C. Tearable and fillable composite sponges capable of heat generation and drug release in response to alternating magnetic field. *Mater*, 13(16), 3637, 2020.
 9. 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*, 46(11), 17881-17890 2020.
 10. Hayashi K, Munar ML, Ishikawa K. Effects of macropore size in carbonate apatite honeycomb scaffolds on bone regeneration. *Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl*, 111, 110848, 2020.
2. 学会発表
 1. 林幸壱朗、石川邦夫。「炭酸アパタイトハニカムスキャホールドの骨誘導能評価」、日本歯科理工学会 第75回学術講演会
 2. Hayashi K. Impacts of pore architecture on bone regeneration in honeycomb scaffolds, KOB & OBT Research Center Joint International Symposium, Feb. 6, 2021, Fukuoka. 受賞講演
- G.知的所有権の取得状況**
1. **特許取得**
 1. 発明の名称：医用ハニカム構造体およびその製造方法、医用組織再建袋、成形型。発明者：石川 邦夫、林 幸壱朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴。出願人：石川邦夫、株式会社ジーシー。国際出願番号：PCT/JP2021/008783 出願日：2021.3.5.
 2. 発明の名称：医用ハニカム構造体およびその製造方法、医用組織再建袋、成形型。発明者：石川 邦夫、林 幸壱朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴。出願人：石川邦夫。出願番号：特願2021-034784。出願日：2021.3.4.
 3. 発明の名称：炭酸アパタイト被覆材料およびその製造方法。発明者：石川 邦夫、林 幸壱朗、土谷 享、岸田 良、中島 康晴。出願人：石川邦夫。出願番号：特願2021-56520。出願日：2021.3.30.
 2. **実用新案登録**
なし
 3. **その他**
 1. 2020年度 九州大学歯学優秀研究者賞, 九州大学, 2021年1月.
 2. 日本歯科理工学会 第75回学術講演会 株式会社ジーシー賞受賞, 2020年4月.

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不溶性の二酸化チタンの調整・毒性評価プロトコールを作成した。②に関して、活性酸素種 (ROS) 依存性 microRNA とその標的タンパクの発現解析より、複数の経路から細胞傷害に關与することが推測された。

A. 研究目的

本研究の目的は、新しい *in vitro* 評価系として考えられる切片担体培養系を用いたナノリスクマテリアルの毒性評価系の構築及び磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs/MNPs)の細胞傷害機構の解明である。本研究の分担者は、細胞株を利用した *in vitro* 系での各種ナノ粒子の細胞毒性、遺伝毒性の解析、およびその細胞傷害機構の解明を報告してきた。本研究での分担は、(1)切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築、(2) 磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs/MNPs)の細胞傷害機構の解明およびエピジェネティ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用のプロトコール作成を行った。(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。ナノ粒子傷害機構に関して、先行実験として、前立腺癌細胞株 DU145 を用いた。

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、超音波破砕機 (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毒性評価プロトコール作成の確認および確定：

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

した。

①4000 µg/mL の TiO₂ を作製のため 15 mL チューブに 20 mg の TiO₂ を量り 5 mL のメディアウムに溶かした。

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。

③TiO₂ 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。

④96 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 TiO₂ 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 TiO₂+メディアウム+CCK8 : Blank

② メディアウム+Cells+CCK8 : Control

③ TiO₂+メディアウム+Cells+CCK8 : Sample

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

4) 二酸化チタンナノ粒子の取込み解析

10cm シャーレに A549 細胞を 5x10⁵ 細胞数を播種し、2 日後に TiO₂ 250 µg/mL 添加し、1 日後回収し、透過電子顕微鏡 (TEM) 用に回収し、処理後観察した。

ナノマテリアルの傷害機構の解析

5) 候補 microRNA 発現解析: miR-5787 および miR-494-3p

候補 microRNA に関して、miR-5787 および miR-494-3p を選択した。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 1.0×10⁵ cells/well、48 時間の場合は 8.0×10⁴ cells/well、72 時間の場合は 6.0×10⁴ 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 µg/mL)、100 µg/mL、200 µg/mL、

400 µg/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×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 BIRD™ 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 はインターカラー法で、miRNA は TaqMan プロブ法で、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、ΔΔCt 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。

6) eIF5 の発現解析：

候補 microRNA である miR-5787 の標的である eIF5 および miRNA-494-3p の標的であるを選択した。

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 パジェラン (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 パワープロット・ミニ (ATTO, NewYork, USA) を用いて 60 分で転写した。転写終了後、AE-1477 EzBlock CAS (ATTO, NewYork, USA) (リン酸化の場合は AE-1475 EzBlock Chemi (ATTO, NewYork, USA)) にメンブレンを浸し、60 分間振とうした。ブロッキング終了後、メンブレンを洗浄し、各希釈率で希釈した一次抗体に、4°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って行った。ナノマテリアルの取扱いに関して、「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第 0331013 号) に準じて行った。

C. 研究結果

1) 二酸化チタンナノ粒子の毒性評価プロトコール確定：凝集しやすい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、新たなプロトコールを作成し、確定した。

図 1 に、二酸化チタンナノ粒子の調整法について示す。また、図 2 に、プロトコールを示す。

TiO₂の調製
 1000-15.63ug/ml の TiO₂ の希釈系列作製
 ①4000ug/ml の TiO₂ を作製のため 15ml チューブに 20mg の TiO₂ を量り 5ml のメEDIUMに溶かす
 ②水中にてソニケーター設定 PWM30%で 15ml チューブの中で 1分プローブを上下に動かし分散
 ③TiO₂ が分散浮遊しているうちに短時間で希釈系列を作製する

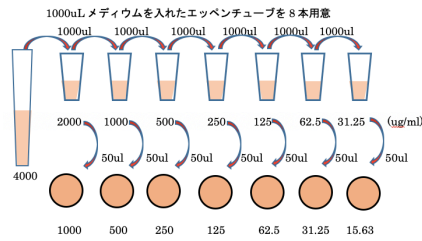


図 1. 二酸化チタンナノ粒子調整

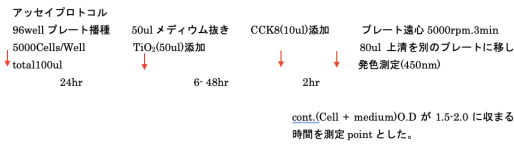


図 2. 二酸化チタンナノ粒子細胞毒性評価プロトコール

表 1 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再度記す。

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		TKP102*		
62.5 µg/ml				AMT600**
31.25 µg/ml				AMT600**, TKP102*
15.6 µg/ml	AMT600*, TLP102*	AMT600*		AMT600**, TKP102**
B				
	6h	12h	24h	48h
500 µg/ml				MT150*
125 µg/ml			TKP102**	

Statistics by dunnet's test

細胞増殖を抑制した MT150 と促進させた MT500、AMT600 の細胞内取込み像を示す (図 3)。定性的であるが、明らかに MT150 の細胞内取込みが多いと観察できる。しかしながら、AMT600 は多く取込みながら、増殖は抑制しなかった。

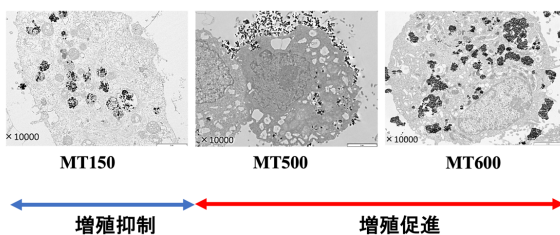


図 3. 二酸化チタンナノ粒子細胞内取込み像

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 の発現を Real-Time PCR で解析を行った (図 4,5 前年度データ)。

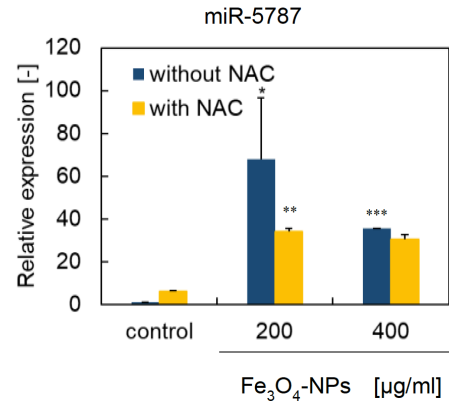


図 4. 磁性体ナノ粒子曝露による miR-5787 発現量変化

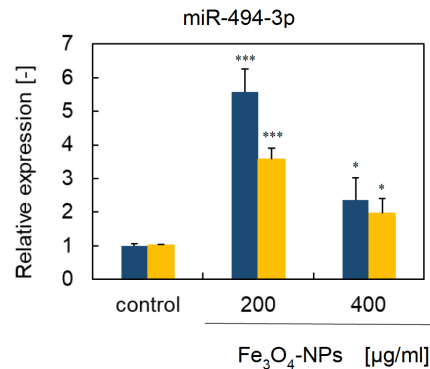


図 5. 磁性体ナノ粒子曝露による miR-494-3p 発現量変化

miR-5787、miR-494-3p では、400 µg/mL より 200 µg/mL において、発現量が増加した。また、N-acetylcystein (NAC)で活性酸素種(ROS)発生を抑制すると、いずれもの発現量が抑制されるも、完全には抑制されなかった。過酸化水素で処理した場合、いずれも発現量が上昇し、なおかつ NAC 処理において、発現がほぼ抑制されるのを認めた。この 2 つの標的因子を表 2 に示す。前年度より、eIF5 については既に報告しているが、今年度はさらに CXCR4 についての発現も解析を行なった。

表 2. 磁性体ナノ粒子曝露後に発現亢進した miRNAs

miRNA	DU145	LNCaP	Target	Functions
miR-5787	4.14	3.18	eIF5	Cell Proliferation ¹⁾
miR-6785-5p	3.45	1.03	CDK4/6	Cell proliferation ²⁾
miR-6769b-5p	3.39	2.09		
miR-188-5p	3.31	1.35	ZFP91	Cell proliferation ³⁾
miR-513c-5p	2.91	2.09		
miR-494-3p	2.87	2.3	CXCR4	Cell Proliferation ⁴⁾
miR-7641	2.46	2.13	CXCL1	Neovascularization ⁵⁾
miR-7150	2.43	3.14		
miR-4459	2.32	1.79	CDC20B	Cell Cycle ⁶⁾
miR-4721	2.29	1.43		
miR-1973	2.19	1.76		
miR-6812-5p	2.16	1.51		
miR-513a-5p	2.06	1.49	Bcl-2	Apoptosis ⁷⁾
miR-4485-3p	2.04	1.56		
miR-6124	2.03	1.03		
miR-7847-3p	1.76	2.07		
miR-6090	1.33	2.02		

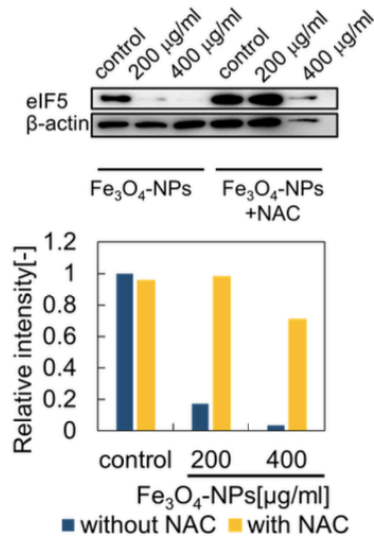


図 6. 磁性体ナノ粒子曝露時の eIF5 タンパク質発現

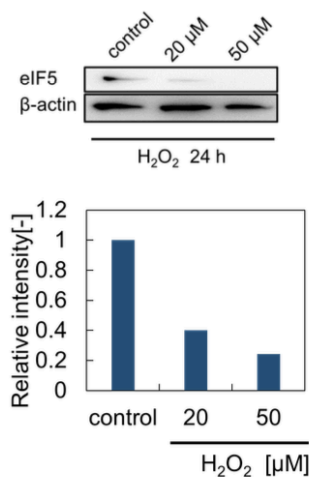


図 7. 過酸化水素曝露時の eIF5 タンパク質発現
磁性体ナノ粒子曝露により、特に 400 µg/mL において、eIF5 のタンパク発現量はほとんど消失するまで減少し、NAC 処理によりコントロールに近いレベルまで回復するのを認めた (図 6)。特に ROS の影響を受けた抑制を認めた。これは、過酸化水素曝露においても同様の結果を得た (図 7)。

CXCR4 タンパク質の発現も eIF5 と同様に、磁性体ナノ粒子濃度依存的に減少傾向を認めた (図 8)。

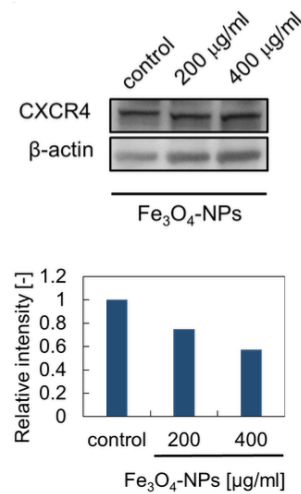


図 8. 磁性体ナノ粒子曝露時の CXCR4 タンパク質発現

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 系における評価では注意しなければならない。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プロトコールを作成した。グループの他への報告として、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ず、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。

磁性体ナノ粒子の曝露により、2 種類の microRNA(miR5787、494-3p)の発現上昇、その標的遺伝子である eIF5 および CXCR4 の発現減少が認められた。また、これらの microRNA は ROS 依存性であることが示された。これらの結果をまとめ (図 9) に記す。microRNA の発現プロファイルから、ROS 依存性であり、複数の経路から細胞傷害に関与することが推測された。

microRNA の研究は、横浜国立大学大学院

工学研究院医工学研究室（旧渡邊研究室、現飯島研究室）との共同研究である。

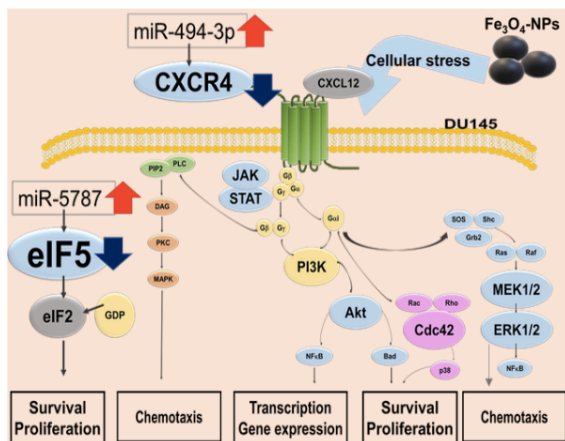


図9. まとめ

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10）。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]。講座内での他の研究者の報告では、進行癌（前立腺癌、膀胱癌）において、一次線毛は消失していると報告している（私信）。また、1次線毛が、脂肪組織形成に関わることを報告した（*Cell Rep*, in press）。

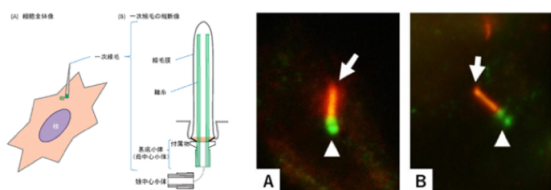


図9. 一次線毛について

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamakawa D, Katoh D, Kasahara K, Shiromizu T, Matsuyama M, Matsuda C, Maeo Y, Watanabe M, Inagaki M. Primary cilia dependent-lipid rafts/caveolin dynamics regulate adipogenesis. *Cell Rep*, 34(10), 108817, 2021.
2. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductor for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci*, 112(1), 7-15, 2021.
3. Kajiwara S, Ishii K, Sasaki T, Kato M, Nishikawa K, Kanda H, Arima K, Watanabe M, Sugimura Y. Castration-induced stromal remodeling disrupts the reconstituted prostate epithelial structure. *Lab Invest*, 100(5), 670-681, 2020.
4. Yamamoto N, Eguchi A, Hirokawa Y, Ogura S, Sugimoto K, Iwase M, Watanabe M, Takei Y. Expression pattern of PLXDC2 in human hepatocellular carcinoma. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. 39(2), 57-60, 2020
5. Mahmud MRA, Ishii K, Bernal-Lozano C, Delgado-Sainz I, Toi M, Akamatsu S, Fukumoto M, Watanabe M, Takeda S, Cortes-Ledesma F, Sasanuma H. TDP2 suppresses genomic instability induced by androgens in the epithelial cells of prostate glands. *Genes to Cells*, 00, 1-16, 2020.
6. Sonoda Y, Sasaki Y, Gunji A, Shirai H, Araki T, Imamichi S, Onodera T, Rydén AM, Watanabe M, Itami J, Honda T, Ashizawa K, Nakao K, Masutani M. Reduced tumorigenicity of mouse ES cells and the augmented anti-tumor therapeutic effects under Parg deficiency. *Cancers*, 12(4), 1056, 2020.
7. Mizutani K, Shirakami E, Ichishi M, Matsushima Y, Umaoka A, Okada K, Yamaguchi Y, Watanabe M, Morita

- E, Yamanaka K. Long-lasting severe dermatitis affect visceral adipose tissue via skin-derived inflammatory cytokines. *Int J Med Sci*, 21, 3367, 2020.
8. Kanayama K, Imai H, Usugi E, Matsuda C, Ichishi M, Hirokawa Y, Watanabe M. Cancer-related gene mutations and intratumoral genetic heterogeneity in human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneous gastric cancer. *Pathol Int*, 70(11), 865-870, 2020.
9. Hirokawa YS, Kanayama K, Kagaya M, Shimojo N, Uchida K, Imai H, Ishii K, Watanabe M. SOX11-induced decrease in vimentin and an increase in prostate cancer cell migration attributed to cofilin activity. *Exp Mol Pathol.* , 117, 104642, 2020
10. Wakai E, Suzumura Y, Ikemura K, Mizuno T, Watanabe M, Takeuchi K, Nishimura Y. An integrated in silico and in vivo approach identifies protective effects of palonosetron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Pharmaceuticals*, 13,480, 2020.

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

2. 学会発表

1. Oshio L, Nakagawa Y, Watanabe M, Iijima K. Functional analysis of microRNA in anti-prostate cancer activity of magnetic iron oxide nanoparticles. 第 43 回日本分子生物学会年会.オンライン 12.2-4, 2020.
2. Inagaki M, Kasahara K, Yamakawa D, Matsuda C, Watanabe M. The role of primary cilia in cell growth, differentiation and tumorigenesis. 第 79 回日本癌学会学術総会.リーガロイヤルホテル広島.10.1-3, 2020.
3. Watanabe M. The application of nanomaterial in anti-tumor druds. China-ASEAN International Cancer Precision Medicine Conference. Guangxi Medical University. 11.6-8, 2020.

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

研究分担者：戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所 発がんモデル開発部門 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) を用い、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。今年度は、この手法を用いて酸化チタンナノ粒子の形状や粒径などの物理化学的な性質が毒性に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、5種の酸化チタンナノ粒子 (JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A, AMT-100, TKP-102) を用いて検討した。まず、細胞毒性について調べた結果、RAW264及びGDL1に対して、いずれの酸化チタンナノ粒子も用量依存的に細胞生存率を低下させることがわかった。また、細胞毒性の程度はGDL1に比べRAW264で顕著であることがわかった。これはRAW264がマクロファージ様細胞であるため、酸化チタンを貪食した後、分解できずに細胞破裂が起こったと考えられた。さらに、RAW264.7とGDL1のどちらの細胞でもアナターゼとルチルでの結晶の違いでの差は見られなかった。次にAMT-100とTKP-102暴露における *gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を実施した。いずれも酸化チタンナノ粒子の用量非依存的であり、共培養よりも単培養で変異頻度が高い傾向が観察された。この結果は先行研究のナノマグネタイトや多層カーボンナノチューブの結果とは異なる結果となったが、各サンプルのタイターからも、解析が不十分であることが考えられるため、最終的な評価には更なる検討が必要であると思われる。 *In vitro* 変異原性試験においてAMT-100の方がTKP-102より変異頻度が上昇する傾向が観察された。AMT-100は一次粒子径が6 nmで比表面積が280 m²/gに対しTKP-102はAMTより大きく一次粒子径が15 nmで比表面積が110 m²/gである。一般的には一次粒子径が小さく、比表面積が大きいほど細胞や組織に取り込まれやすく、毒性が現れることから、AMT-100の方が変異が起きやすいという結果になったと考えられた。今後、酸化チタンナノ粒子の形状や粒径などの物理化学的な性質が遺伝毒性に及ぼす影響についてさらに詳細に明らかにするために、その他の酸化チタンナノ粒子 (JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A,) の *gpt* 遺伝子に対する変異原性についても解析することが必要だと思われる。

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などの物理化学的な性質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) を使用して検討したところ、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、細胞毒性や変異原性が強いことがわかった。今年度は、本手法を用いて各種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、マテリアルの細胞毒性の検討を行っている。

B. 研究方法

① 酸化チタンナノ粒子の細胞毒性

まず、被験物質の調整を行なった。本試験で用いた酸化チタンは、JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A, AMT-100, TKP-102 である。このうち、JRCNM01001a, JRCNM1005a は EU の Joint Research Center (Ispra, Italy) より、MT-150A, AMT-100, TKP-102 は本研究班の大野先生より供給いただいた。これらマテリアルは DMEM+10% FBS+1% penicillin/streptomycin 基本培地に懸濁して超音波

処理を行い以下の試験に供した。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、トリパンプルーの取り込みを指標に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 RAW264 の 2 種類。6well plate に RAW264 及び GDL1 を 1×10^6 cell/well 及び 5×10^5 cell/well で播種し、24 時間培養した。その後、各細胞に 5 種の酸化チタンナノ粒子を RAW264 に 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 、GDL1 には 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ を各 well に添加し、24 時間曝露後にトリパンプルーを用いて細胞生存率を測定した。

② 共培養システムによる遺伝毒性試験法

GDL1 細胞を播種した後、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。各種酸化チタンナノ粒子を 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 λ EG10 をファージ粒子として回収した。回収したファージを Cre 組換え酵素発現している大腸菌 YG6020 株に感染させると、 λ EG10 上にある一組の loxP 配列に挟まれた領域が Cre 組換え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後の YG6020 菌液を 6-thioguanin (6-TG) と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地に播いて 37°C で培養すると、プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TG を含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cm を含む M9 寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究では該当しない。

C. 研究結果

① 酸化チタンナノ粒子の細胞毒性

酸化チタンナノ粒子による細胞毒性を調べるために、トリパンプルー試薬を用いた。この方法は、生細胞はトリパンプルーを取り込まないが死細胞はその色素を取り込み青色に染色される、という原理に基づいている。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 RAW264 の 2 種類。6well plate に RAW264 及び GDL1 を 1×10^6 cell/well 及び 5×10^5 cell/well で播種し、24 時間培養した。その後、各細胞に 5 種の酸化チタンナノ粒子 (JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A, AMT-100, TKP-102) を RAW264 に 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 、GDL1 には 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ を各 well に添加し、24 時間曝露後にトリパンプルーを用いて細胞生存率を測定した。本実験は各サンプル毎に 3 回測定を行い、平均と標準偏差を求めた。

RAW264.7 ではどの酸化チタンナノ粒子でも濃度依存的に細胞生存率減少が見られた (図 1)。コントロールと比べ、TKP-102、JRCNM01001a では有意な差が見られたが MT-150A では 250 $\mu\text{g/mL}$ のみで有意な差が見られ、AMT-100 では 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で、JRCNM01005a では 125, 250 $\mu\text{g/mL}$ の場合に有意な差が見られた。

各種酸化チタンナノ粒子間では MT-150A と TKP-102 では 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ の場合、MT-150A と JRCNM01001a では 500 $\mu\text{g/mL}$ の場合に有意な差が見られた。AMT-100 と TKP-102 では 250 $\mu\text{g/mL}$ の場合、AMT-100 と JRCNM01001a では 250 $\mu\text{g/mL}$ の場合に有意な差が見られた。TKP-102 と JRCNM01001a、JRCNM01005a では 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ の場合に有意な差が見られた。

GDL1 では今回使用した全ての酸化チタンナノ粒子でコントロールと比べ、濃度依存的に細胞数が優位的に減少した (図 2)。各種酸化チタンナノ粒子間では AMT-100 と TKP-102、JRCNM01001a、JRCNM01005a では 500 $\mu\text{g/mL}$ の場合に有意な差が見られた。TKP-102 と JRCNM01005a では 500 $\mu\text{g/mL}$ の場合に有意な差が見られた。

RAW264.7 と GDL1 のどちらの細胞でもアナターゼ とルチルでの結晶の違いでの差は見られなかった。

以上の結果から、RAW264 及び GDL1 に対して、いずれの酸化チタンナノ粒子も用量依存的に細胞生存率を低下させることがわかった。また、細胞毒性の程度は GDL1 に比べ RAW264 で顕著であることがわかった。この結果から、遺伝毒性試験における各種酸化チタンナノ粒子の用量としては、125, 250 $\mu\text{g/mL}$ で行うことに決定した。

② 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 5 種の酸化チタンナノ粒子 (JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A, AMT-100, TKP-102) を 125, 250 $\mu\text{g/mL}$ の用量で 24 時間曝露した。曝露後、培地交換により酸化チタンナノ粒子を取り除き、更に 6~7 日間培養した。それら GDL1 細胞から DNA を抽出した。

まずは AMT-100 と TKP-102 曝露における *gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を実施した。変異頻度(MF)を算出した結果を表 1 に示す。

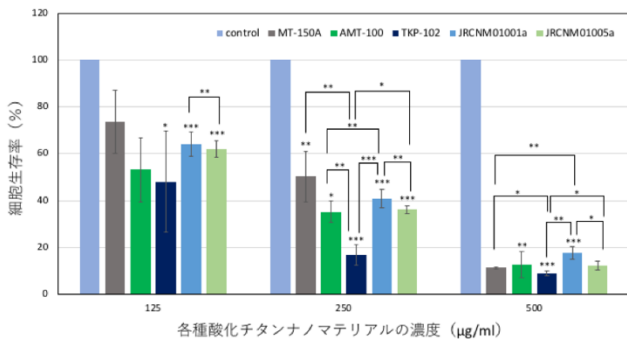


図1. 各種酸化チタンナノ粒子のRAW264に対する細胞毒性

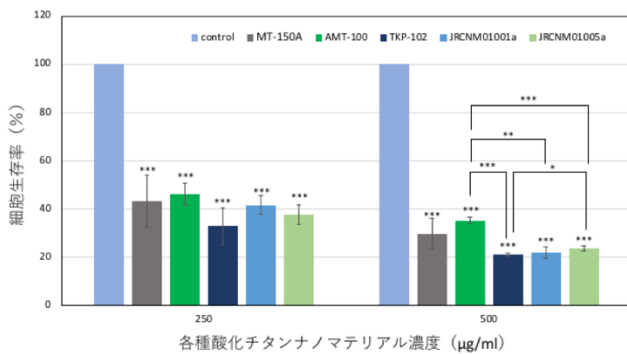


図2. 各種酸化チタンナノ粒子のGDL1に対する細胞毒性

表 1. 酸化チタンナノ粒子を曝露した変異頻度(MF)の結果

Treatment	sample	Number of colonies		MF($\times 10^{-5}$)	Average MF($\times 10^{-5}$)
		Mutant	Total		
control	1	5	280500	1.78	-
	2	3	205500	1.46	-
	3	5	370500	1.35	-
	-	-	-	-	1.53 \pm 0.23
AMT-100 125 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 単培養	1	6	31500	19.05	-
	2	0	15000	19.05	-
	3	0	22500	0.00	-
	-	-	-	-	12.70 \pm 11.00
AMT-100 250 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 単培養	1	5	243000	2.06	-
	2	12	526500	2.28	-
	3	18	435000	4.01	-
	-	-	-	-	2.13 \pm 1.14
AMT-100 125 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 共培養	1	2	40500	4.94	-
	2	3	100500	2.99	-
	3	3	21000	14.29	-
	-	-	-	-	7.40 \pm 6.04
AMT-100 250($\mu\text{g}/\text{ml}$) 共培養	1	8	123000	6.5	-
	2	7	459000	1.52	-
	3	3	199500	1.5	-
	-	-	-	-	3.19 \pm 2.88
TKP-102 125 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 単培養	1	0	16500	0.00	-
	2	5	40500	12.35	-
	3	2	24000	8.33	-
	-	-	-	-	6.89 \pm 6.30
TKP-102 250 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 単培養	1	13	658500	1.97	-
	2	11	282000	3.90	-
	3	13	217500	5.98	-
	-	-	-	-	3.95 \pm 2.00
TKP-102 125 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 共培養	1	3	271500	1.11	-
	2	2	64500	3.1	-
	3	8	252000	3.18	-
	-	-	-	-	2.46 \pm 1.17
TKP-102 250($\mu\text{g}/\text{ml}$) 共培養	1	5	228000	2.19	-
	2	6	555000	1.08	-
	3	22	579000	2.93	-
	-	-	-	-	2.01 \pm 0.93

gpt mutation assay を行なった結果をグラフにまとめた (図 3)。タイターが十分稼げている結果も

あり、Preliminary なデータではあるが AMT-100 と TKP-102 のどちらの酸化チタンナノ粒子でも共培養した時より単培養した時の方が変異頻度の増加が見られた。しかし、AMT-100 の 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の単培養と共培養では共培養した時の方が変異頻度の増加が見られた。

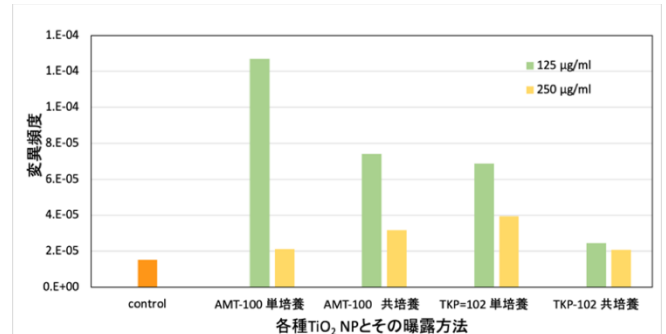


図 3. 酸化チタンナノ粒子の *gpt* 変異結果

D. 考察

まず、曝露濃度を検討するために、各種酸化チタンナノ粒子を RAW264.7 及び GDL1 に 24 時間曝露し、細胞生存率をトリパンブルーを用いて測定した。その結果 RAW264 と GDL1 のどちらの細胞でも濃度依存的に減少した。また、RAW264 は GDL1 より酸化チタンの影響が大きいことが分かった。これは RAW264 がマクロファージ様細胞であるため、酸化チタンを貪食した後、分解できずに細胞破裂が起こったと考えられた。また、以降の実験は 125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の曝露濃度で行なった。

次に、*gpt* 遺伝子に対する変異原性の結果、いずれも酸化チタンナノ粒子の用量非依存的であり、共培養よりも単培養で変異頻度が高い傾向が観察された。この結果は先行研究のナノマグネタイトや多層カーボンナノチューブの結果とは異なる結果となった。多層カーボンナノチューブの場合では、マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞が MWCNT を貪食した後、IL-1 β や TNF- α が炎症性遺伝子の誘導を行い、さらに一酸化窒素が誘導され、ROS が誘導されることで酸化ストレスにより GDL1 に 8-oxo-dG が形成され変異が誘発されたと考えられている。今回行なった実験で共培養よりも単培養での曝露の方が変異頻度が上昇したのはマクロファージ様細胞である RAW264.7 からの炎症性サイトカインまたは ROS の分泌が GDL1 への変異原性を上昇させるレベルではなかったか、あるいは酸化チタンナノ粒子自身が GDL1 に対して直接的な変異原性を十分に持つ可能性が考えられた。しかしながら、各サンプルのタイターからも、解析が不十分であることが考えられるため、最終的な評価には更なる検討が必要であると思わ

れる。*In vitro* 変異原性試験において AMT-100 の方が TKP-102 より変異頻度が上昇した。AMT-100 は一次粒子径が 6 nm で比表面積が 280 m²/g に対し TKP-102 は AMT より大きく一次粒子径が 15 nm で比表面積が 110 m²/g である。一般的には一次粒子径が小さく、比表面積が大きいほど細胞や組織に取り込まれやすく、毒性が現れることから、AMT-100 の方が変異が起きやすいという結果になったと考えられた。

今後、その他の酸化チタンナノ粒子 (JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A) の *gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べることで、酸化チタンナノ粒子の形状や粒径などの物理化学的な性質が遺伝毒性に及ぼす影響についてさらに詳細に明らかになると思われる。

D. 考察

まず、曝露濃度を検討するために、各種酸化チタンナノ粒子を RAW264.7 及び GDL1 に 24 時間曝露し、細胞生存率をトリパンブルーを用いて測定した。その結果 RAW264 と GDL1 のどちらの細胞でも濃度依存的に減少した。また、RAW264 は GDL1 より酸化チタンの影響が大きいことが分かった。これは RAW264 がマクロファージ様細胞であるため、酸化チタンを貪食した後、分解できずに細胞破裂が起こったと考えられた。また、以降の実験は 125、250 µg/mL の曝露濃度で行なった。

次に、*gpt* 遺伝子に対する変異原性の結果、いずれも酸化チタンナノ粒子の用量非依存的であり、共培養よりも単培養で変異頻度が高い傾向が観察された。この結果は先行研究のナノマグネタイトや多層カーボンナノチューブの結果とは異なる結果となった。多層カーボンナノチューブの場合では、マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞が MWCNT を貪食した後、IL-1β や TNF-α が炎症性遺伝子の誘導を行い、さらに一酸化窒素が誘導され、ROS が誘導されることで酸化ストレスにより GDL1 に 8-oxo-dG が形成され変異が誘発されたと考えられている。今回行なった実験で共培養よりも単培養での曝露の方が変異頻度が上昇したのはマクロファージ様細胞である RAW264.7 からの炎症性サイトカインまたは ROS の分泌が GDL1 への変異原性を上昇させるレベルではなかったか、あるいは酸化チタンナノ粒子自身が GDL1 に対して直接的な変異原性を十分に持つ可能性が考えられた。しかしながら、各サンプルのタイターからも、解析が不十分であることが考えられるため、最終的な評価には更なる検討が必要であると思われる。*In vitro* 変異原性試験において AMT-100 の方が TKP-102 より変異頻度が上昇した。AMT-100 は一次粒子径が 6 nm で比表面積が 280 m²/g に対

し TKP-102 は AMT より大きく一次粒子径が 15 nm で比表面積が 110 m²/g である。一般的には一次粒子径が小さく、比表面積が大きいほど細胞や組織に取り込まれやすく、毒性が現れることから、AMT-100 の方が変異が起きやすいという結果になったと考えられた。

今後、その他の酸化チタンナノ粒子 (JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A,) の *gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べることで、酸化チタンナノ粒子の形状や粒径などの物理化学的な性質が遺伝毒性に及ぼす影響についてさらに詳細に明らかになると思われる。

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)を用い、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。今年度は、5種の酸化チタンナノ粒子 (JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A, AMT-100, TKP-102) を用いてナノマテリアルの物理化学的な性質が毒性に及ぼす影響について検討した。

まず、細胞毒性について調べた結果、RAW264 及び GDL1 に対して、いずれの酸化チタンナノ粒子も用量依存的に細胞生存率を低下させることがわかった。また、細胞毒性の程度は GDL1 に比べ RAW264 で顕著であることがわかった。これは RAW264 がマクロファージ様細胞であるため、酸化チタンを貪食した後、分解できずに細胞破裂が起こったと考えられた。さらに、RAW264.7 と GDL1 のどちらの細胞でもアナターゼ とルチルでの結晶の違いでの差は見られなかった。

次に *gpt* 遺伝子における変異原性を調べた。まずは AMT-100 と TKP-102 曝露における *gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を実施した。いずれも酸化チタンナノ粒子の用量非依存的であり、共培養よりも単培養で変異頻度が高い傾向が観察された。この結果は先行研究のナノマグネタイトや多層カーボンナノチューブの結果とは異なる結果となったが、各サンプルのタイター数からも、解析が不十分であることが考えられるため、最終的な評価には更なる検討が必要であると思われる。*In vitro* 変異原性試験において AMT-100 の方が TKP-102 より変異頻度が上昇する傾向が観察された。AMT-100 は一次粒子径が 6 nm で比表面積が 280 m²/g に対し TKP-102 は AMT より大きく一次粒子径が 15 nm で比表面積が 110 m²/g である。一般的には一次粒子径が小さく、比表面積が大きいほど細胞や組織に取り込まれやすく、毒性が現れ

ることから、AMT-100の方が変異が起きやすいという結果になったと考えられた。

今後、酸化チタンナノ粒子の形状や粒径などの物理化学的な性質が遺伝毒性に及ぼす影響についてさらに詳細に明らかにするために、その他の酸化チタンナノ粒子（JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A）の*gpt* 遺伝子に対する変異原性についても解析することが必要だと思われる。

また、本手法を用いて更に他のナノマテリアルについても検討し、毒性評価に資する情報として活用することを目指す。また、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についても検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, Totsuka Y, Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabekkul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE., Kurane I. U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, *Virology*, 555, 71-77, 2021.
2. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Sci.*, 112, 7-15, 2021.
3. Totsuka Y, Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 96, 180-187, 2020.
4. Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol.* 33, 1907-1914, 2020.
5. Kawanishi M, Yoneda R, Totsuka Y, Yagi T. Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts. *Genes Environ.* 42, 16, 2020.
6. 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.* 41, 368-376, 2020.

2. 学会発表

1. 戸塚ゆ加里 NGSによるノンバイアスな変異解析の現状と将来展望 第47回日本毒性学会学術年会シンポジウム(2020年6月 Web開催)
2. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 がん予防学術大会(2020年9月 Web開催)
3. 戸塚ゆ加里 Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach 第79回癌学会(2020年10月、広島)
4. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによりがんの要因を解明する 第2回 三陸包括的緩和医療研究会(2020年10月 Web開催)
5. 戸塚ゆ加里 集学的アプローチによるがんの要因解明と予防研究への展望 第49回環境変異原学会(2020年9月、静岡)
6. 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 第37回 日本毒性病理学会(2021年1月、Web開催)
7. 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 第12回 JBF シンポジウム(2021年3月、Web開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
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、7 種類の二酸化チタンナノ粒子（JRCNM01001a・JRCNM01005a・MT-150A・MT-500B・AMT-100・AMT-600・TKP-102）の経皮毒性について、正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NHEK（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すると共に、ヒト 3D 皮膚再構成系を用いた小核試験法を確立する前段階として NKEK 単層培養系で行った。その結果、7 種類の二酸化チタンナノ粒子は、いずれも 72 時間以内に細胞毒性を示した。この細胞毒性については、一次粒子径・比表面積・凝集程度などと、細胞傷害の強さの間には明確な相関性がみられなかったが、結晶型についてはルチル型がアナターゼ型より細胞傷害性が強い傾向がみられた。一方、ヒト 3D 皮膚再構成系では、いずれの二酸化チタンナノ粒子も細胞毒性を発揮しなかった。このことは、ヒト 3D 皮膚再構成系において、表皮の重層構造に基づく、いわゆるバリア機能が働き、二酸化チタンナノ粒子の細胞毒性を防御したものと示唆された。さらに、角質形成が未熟な条件でも同様の結果が得られたことから、表皮のバリア機能は、必ずしも角質形成の完了による表皮の重層化構造の完成を必要とせず、一定程度の分化が終了していれば有効となるものと推察された。なお、二酸化チタンナノ粒子は凝集しやすく、その細胞毒性を正確に評価する為には分散制御が重要であると考えられた。さらに、細胞増殖活性が低く、CHL/IU 細胞を用いた常法と同条件で小核試験が実施できない NHEK を用いる小核試験に関しては、被験物質曝露後長時間培養することにより可能とした。

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、二酸化チタンナノ粒子（JRCNM01001a・JRCNM01005a・MT-150A・MT-500B・AM-T100・AMT-600・TKP-102）の経皮毒性について、正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NHEK（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すると共に、ヒト3D皮膚再構成系を用いた小核試験法を確立する前段階として NKEK単層培養系で行った。

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 NHEK（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) 一般毒性

金属ナノ粒子として、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、JRCNM01001a・JRCNM01005a・MT-150A・MT-500B・AMT-100・AMT-600・TKP-102の7種類を用いた（表1）。

2-2) 遺伝毒性

小核試験の陽性対照物質としてマイトマイシンC（MMC）、陰性対照物質としてdimethyl sulfoxide（DMSO）を用いた。

3) 実験および解析

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

細胞毒性は、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）と、生細胞によるテトラゾリウム塩ホルマザン生成（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の曝露から24時間後と72時間後の小核誘発について解析した。

（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) 二酸化チタンナノ粒子の表皮系細胞毒性

1-1) NKEK 単層培養系

二酸化チタンナノ粒子は、最終濃度 1000 µg/mL を最高濃度として 7.82 µg/mL まで倍々希釈を行った 8 種の用量で 24 時間曝露して WST-8 アッセイを実施した結果、AMT-100 と AMT-600 の 500、1000 µg/mL と MT-150A と MT-500B の 1000 µg/mL で細胞傷害を認めた（表2）。JRCNM01001a と JRCNM01005a では、1000 µg/mL で細胞生存率が

若干低下したが、明らかでなかった（表2）。

TKP-102 では、1000 µg/mL まで、明らかな細胞傷害を認めなかった（表2）。

72 時間曝露では、7 種ともに 125~250 µg/mL で細胞傷害を認め、表2に示すような 50%致死用量を得た。

二酸化チタンナノ粒子は比較的容易に凝集したが、比較的低用量では図2に示すように、細胞外のみならず細胞内にも二酸化チタンナノ粒子が存在することを示唆する所見が観察された。二酸化チタンの凝集程度は、種類によって異なっていた（図3）。

1-2) ヒト 3D 皮膚再構成系

角質形成が成熟した 13 日間培養ヒト 3D 皮膚再構成系と、角質形成が未熟である 6 日間培養ヒト 3D 皮膚再構成系の両方において、二酸化チタンナノ粒子は、最終濃度 0、0.2、2、20 mg/mL で 24 時間曝露した。MTT アッセイを試みた結果、いずれの二酸化チタンナノ粒子も細胞毒性を示さなかった。

2) NHEK を用いた小核試験

NHEK に MCC 10 µg/mL または DMSO を 3 または 6 時間曝露、24 または 72 時間まで培養し、2 核細胞 1000 個中の小核の有無と個数を解析した。その結果、24 時間培養条件では 2 核細胞数が著しく少なく試験が実施できなかったが、72 時間培養条件では MMC で陽性結果、DMSO で陰性結果を得ることができた（表3）。

D. 考察

NHEK 単層培養系において、AMT-100・AMT-600・TKP-102 は、500 µg/mL 以上の高濃度曝露（24時間）で細胞毒性を示した。この細胞毒性の強度は二酸化チタンナノ粒子の種類によって異なり、また、他の被験二酸化チタンナノ粒子については細胞毒性が検出されなかった。したがって、二酸化チタンナノ粒子のケラチノサイト毒性の有無と強度には、当該粒子の物理科学的性状が関与するものと示唆された。その詳細については、現在、解析中である。

一方、ヒト3D皮膚再構成系では、いずれの二酸化チタンナノ粒子も細胞毒性を発揮しなかった。したがって、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ことが示唆された。その詳細と背景メカニズムについては、二酸化チタンナノ粒子の表皮透過性も含め、現在、病理組織学的・分子生物学的に解析中である。

昨年度の本研究は、NHEK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小核試

験が実施できないことを明らかにした。本年度は、細胞を被験物質曝露後長時間培養することにより、NHEKによる小核試験が可能となることが判明した。現在、このプロトコルに基づいて、二酸化チタンナノ粒子やマグネタイトを用いた小核試験を実施している。さらに、ヒト3D皮膚再構成系への応用についても、検討している。

E. 結論

二酸化チタンナノ粒子のケラチノサイト毒性の有無と強度には当該粒子の物理科学的性状が関与し、また、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ことが示唆された。また、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は分散制御が重要であると考えられた。NHEKを用いた小核試験を可能とするプロトコルが得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kannno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci.* 2021 Mar 4. doi: 10.1111/cas.14873.

2. 学会発表

1. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Hasegawa Y, Yuzawa K, Kubo Y, Nagasawa A, Yano N, Ohnuki A, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Nakae D. Histopathological features during development of the peritoneal mesothelioma in F344 rats administered multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) and a potential relationship between its pathogenesis and serum levels of apolipoproteins. *EUROTOX 2020* (2020年9月6-9日, デンマーク王国コペンハーゲン市).
2. 宋戸健太, 煙山紀子, 政所陽菜, 小川絢子, 小川秀治, 阿部有加里, 山口彩音, 宇野絹子, 美谷島克宏, 中江 大. 3D ヒト皮膚再構成系による folpet の経皮毒性評価法の検討. 第47回日本毒性学会学術年会 (2020年6月29日~7月1日, リモート開催).
3. 前野 愛, 北條 幹, 坂本義光, 湯澤勝廣, 長谷川悠子, 久保喜一, 長澤明道, 安藤弘, 田中和良, 海鉦藤文, 生嶋清美, 山本行男, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 高橋祐次, 横田 理, 小林憲弘, 広瀬明彦, 中江 大. ラットによる多層カーボンナノチューブ (MWCNT)の長期気管内反復投与試験: 1年経過時点における報告. 第47回日本毒性学会

学術年会 (2020年6月29日~7月1日, リモート開催).

4. 坂本義光, 北條 幹, 前野 愛, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江 大. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の長期反復気管内投与ラットにおける肺神経内分泌細胞(PNEC)の増生. 第47回日本毒性学会学術年会 (2020年6月29日~7月1日, リモート開催).
5. 宋戸健太, 煙山紀子, 小川秀治, 大西未悠, 桑原みなみ, 波多野遥子, 渡邊 厚, 佐野龍平, 美谷島克宏, 中江 大. 金属ナノ粒子の経皮遺伝毒性に関する新規 *in vitro* 評価系の構築. 第37回日本毒性病理学会総会および学術集会 (2021年1月28日~2月26日, リモート開催).
6. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Ohnuki A, Maeno A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kannno J, Hirose A, Nakae D. Declines serum levels of apolipoproteins during the development of peritoneal mesothelioma by multiwalled carbon nanotube in rats. *Virtual 2021 Society of Toxicology (SOT) Annual Meeting and ToxExpo* (2021年3月12-26日, リモート開催).

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

1. 実用新案登録

なし

2. その他

なし

表 1. 被験二酸化チタンナノ粒子の概要

二酸化チタンナノ粒子	一次粒子径(nm)	pH	比表面積(m ² /g)	結晶型
MT-150A	15			ルチル
MT-500B	35			ルチル
AMT-100	6	中性	280	アナターゼ
AMT-600	30	弱酸性	53	アナターゼ
TKP-102	15	弱酸性	110	アナターゼ
JRCNM01001a	5.6		170/316	アナターゼ
JRCNM01005a	15-24		46	ルチル

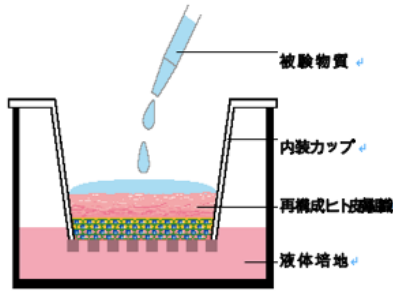


図1. LabCyte EPI 24 モデル

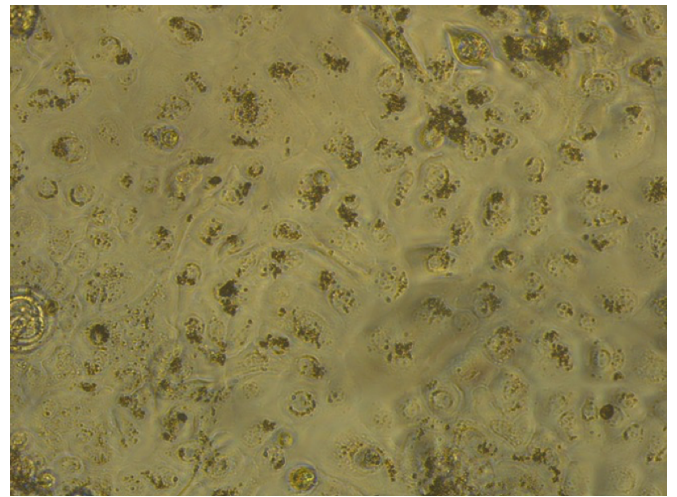


図2. NHEK 光学顕微鏡像 (MT-150A 15.63 µg/mL, 24 時間, 200 倍)

表2. NHEK 単層培養系における二酸化チタンナノ粒子の細胞毒性

TiO ₂ の種類	1000µg/ml における細胞生存率(24 時間)	50%生存率を示した曝露濃度(72 時間)	凝集のしやすさ
MT150A	84%	62.5 µg/mL	+
MT500B	61%	125 µg/mL	++
AMT100	63%	250 µg/mL	±
AMT600	62%	250 µg/mL	±
TKP102	116%	125 µg/mL	+
JRCNM01001a	72%	250 µg/mL	++
JRCNM01005a	85%	125 µg/mL	++

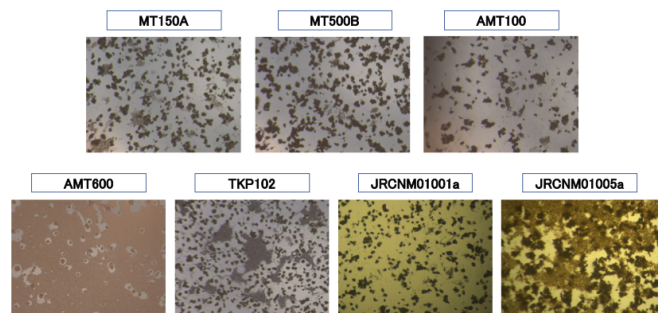


図3. NHEK 光学顕微鏡像 (125 µg/mL, 24 時間, 200 倍)

表3. NHEK を用いた小核試験

培養時間 (h)	被験物質	曝露時間 (h)	1 核細胞	2 核細胞	3 核以上細胞	CBPI	2 核細胞		2 核細胞中の小核細胞比率(%)
							小核あり	小核なし	
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*

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 部門長

研究要旨：過去2年間で構築した基礎的なデータベースに対して、機械学習のアルゴリズムやパラメータの検討を行ない、生体影響予測を試みた。特に機械学習のラベリング方法および入力特徴量の調整を検討や、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進めた。また、実測遺伝子発現データを得るために、標準ナノマテリアルとして酸化チタンを用いた曝露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、ナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築方法および機械学習による生体影響予測モデルを検討することを研究目的とした。

具体的には、データベースを構築する上で元データとして使用する既存のデータベースを選定するために生命科学系データベースの調査、データベースの構築法および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など予測モデルの検討、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

（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50μL/well, 100μL/wellで播種した。THP-1細胞には酸化チタンを50μL/well添加し、37°Cで24時間後にCCK-8を10μL/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100μL/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。

（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： 300μg/mL (THP-1細胞) または 60μg/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: not shown
- ・ 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
(倫理面への配慮)
本研究では該当しない。

C. 研究結果

(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1、図2)。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かった。

(ZnO曝露細胞のマイクロアレイ解析)

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。発現強度の分布は概ね均等であった。

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れている。そしてそれ

ぞれの細胞においてZnOに曝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。

D. 考察

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。そのため顕著な遺伝子に限って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できる。

E. 結論

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、既存データベースを調査して、それらからデータを抽出し適切なラベリングやデータ処理を行なって基礎的なデータベースを構築した。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

論文発表

1. Chinnathambi S, Hanagata N, Yamazaki T, Shirahata N. Nano-Bio Interaction between Blood Plasma Proteins and Water-Soluble Silicon Quantum Dots with Enabled Cellular Uptake and Minimal Cytotoxicity. *Nanomaterials*. 10(11), 2250, 2020.

G. 知的所有権の取得状況

本年度はなし。

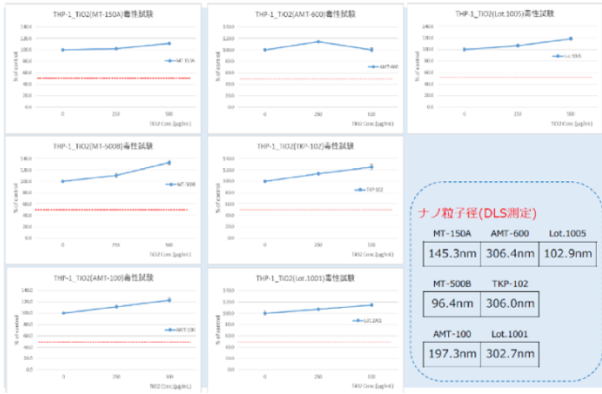


図1. THP-1細胞に対する酸化チタンの毒性評価

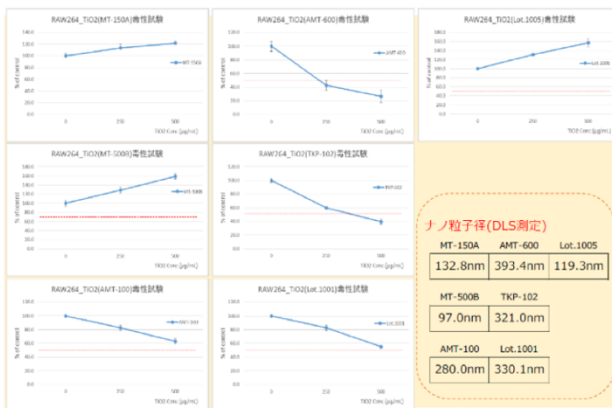


図 2. RAW264 細胞に対する酸化チタンの毒性評価

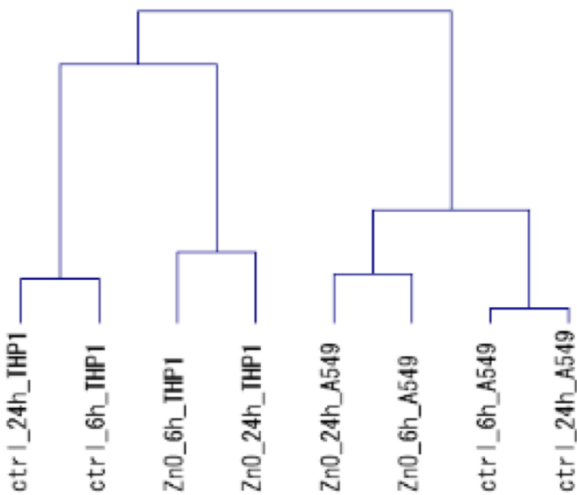


図3.階層的クラスタリング

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2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、二つのナノマテリアルに着目し、①テイカ社から提供された5種の二酸化チタンナノ粒子（TiO₂ NPs：MT-150A、MT-500B、AMT-100、TKP-102、AMT-600）については、これらまでの有害性評価に重要となる物理化学的性状の項目について測定を含めた物性情報を収集すると共に、有害性データについての物性との関連性解析を実施した。②マグネタイトについては、これまでの研究で実施（主に厚生労働科学研究成果データベース MHLW GRANTS SYSTEM への公表分）されている有害性情報と物性情報を収集した。

A. 研究目的

化学物質の中でも極めて特殊な性状を有するナノマテリアルは、生産現場のほか家庭用品などへの利用が拡大しており、ヒトへの健康影響の評価が重大な課題となっている。ナノマテリアルの有害性については、物理化学的特性や表面修飾により有害性が異なることが知られており、物理化学的性状と有害性情報を関連付けるような評価が必要となる。国内において、こうした評価を行うための情報整理が未だされていないのが現状である。一方、海外では、EU US がナノマテリアルの規制への枠組みを進めており、さらに経済協力開発機構（以下、「OECD」と記載）でナノマテリアルの規制に向け代表的なナノマテリアルについての特有の物理化学的性状と有害性情報等を収載した報告書（dossier：有害性評

価書）が公開されている。分担研究者の大野は、ナノマテリアルの生体への健康影響に対する安全性評価に向けた、*in vitro* / *in vivo* の自験データおよび文献などのデータによるナノマテリアルの安全性評価のデータの集積とデータベースの構築を目的として、ナノマテリアルの安全性評価に関わる試験データ項目および QSAR/Read-across 解析に向けた有用なナノマテリアルの安全評価に関する情報の項目について探索・精査する。

これまで 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等に収載され公開されている二酸化ケイ素ナノ粒子（SiO₂ NPs:NM200 シリーズ）や二酸化チタンナノ粒子（TiO₂ NPs:NM100 シリーズ）について、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

料作成を行ってきた。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関する多変量解析法を実施することにより、多変量解析手法の有用性と有害性評価に鍵となる物理化学的性状の組み合わせを見出した。

今年度は、二つのナノマテリアルに着目し、①ティカ社から提供された5種の二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs : MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT-600) については、これらまでの有害性評価に重要となる物理化学的性状の項目について測定を含めた物性情報を収集すると共に、有害性データについての物性との関連性解析を実施した。②マグネタイトについては、これまでの研究で実施(主に厚生労働科学研究成果データベースMHLW GRANTS SYSTEM への公表分) されている有害性情報と物性情報を収集した。

B. 研究方法

本研究で実施した対象化合物は、5種の二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs: MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT600) およびマグネタイトとした(表1)。

【有害性情報の調査対象情報源】

TiO₂ NPs は、本研究班内で実施された A549 細胞を用いた *in vitro* 毒性試験結果を用い、マグネタイトナノ粒子は、厚生労働科学研究成果データベース MHLW GRANTS SYSTEM に公表された厚労科学研究費補助金化学物質リスク研究事業研究報告書、及びこれらの研究成果として公表された原著論文を調査対象情報源とした(表6-9)。

【物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目】

物理化学的性状データは、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等について収集整理した(表2)。調査対象情報源に記載された有害性情報は、*in vivo* 試験結果(吸入ばく露試験、気管内投与試験、腹腔内投与・経口投与試験による急性毒性、免疫毒性、アジュバント効果) *in vitro* 試験結果(細胞毒性試験、遺伝毒性試験等の EC50 値等) について収集整理した(表6-9)。

【二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状の分析対象項目(表2)】

➤ 不純物の成分分析(化学分析):高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)(Ce, Nb は蛍光 X 線分析)による定性分析(対象元素:

K, Ca, Na, S, Ce, Nb:下限0.1%、Fe, Si, P, Al, Cr, Zr, Ti:下限0.01%)、ICP発光分光分析法による定量分析(対象元素:P, Zr, Ca, Ti, Ce, Nb:下限0.01%)

- 細孔分布・比表面積測定(粒子解析)(表3):窒素吸着 BET 多点法による細孔分布ならびに比表面積測定
- 親水性および疎水性評価(表面化学分析)(表4, 表5, 図1, 図2):粒体浸透速度測定、粒体接触角測定

【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(表9)】

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(本研究内ではマウスも記載)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。

【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検体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)からの階層的クラスタリング解析法(HCA: Hierarchical Clustering Analysis)の実施により、サンプル間の距離が近いものからクラスターを形成し、類似度の高いクラス分類した(図3, 図4)
- 収集したデータに基づく物理化学的性状情報と *in vitro* 試験での A549 細胞を用いた毒試験結果との関連性について直交部分的最小二乗回帰分析(OPLS: Orthogonal Partial Least Squares Regression)の実施した(図5A, 5B)
- OPLS法: $Y = f(x) = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots$ の回帰式から、Y変数に連動するX変数を探索する(X変数を使ってY変数のモデルを構築する)。今回の解析では物性値をXの説明変数とし、毒性値(細胞生存率の毒性試験結果)をYの目的変数として設定しX変数からY変数のモデルを構築し予測する。

C. 研究結果

1. データマイニング

物理化学的性状データ項目は主に先行研究で得られた OECD からの試験情報に基づいて作成しており、約 23 項目のデータを収集した。収集・整理された物理化学的性状データシートおよび *in vitro* 有害性情報は、多変量解析のため、以下についてデータマイニングを実施した。

- Composition : impurity の各項目についての検出限界以下 (<) は、「0」と定義した。
- 未測定データ・測定不能データは「空欄」と定義した。
- O (wt%) : TiO₂(%)の値から換算し算出した。
- A549 細胞の毒性試験結果：毒性無し (- : MT-500B、AMT-100、AMT-600) , 毒性は弱いがあり (+ : MT-150A), 毒性有り (++++ : TKP-102) は、「0, 2, 64」と数値化により定義した。

2. 化学分析

二酸化チタンナノ粒子の物理化学的性状の分析結果を以下に示す (表 2)。

- 成分分析 (化学分析) は、①K、Ca、Na、S、Ce、Nb : 下限 0.1%、Fe、Si、P、Al、Cr、Zr、Ti : 下限 0.01%に関して、定性・定性分析は高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES) 島津製作所 ICP8100 によって実施した。②Ce・Nb に関して、定性分析は日本電子 (株) 製エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 JSX-3100R II を用いて蛍光 X 線分析 (EDX) によって実施した。定量分析は ICP 発光分光分析装置 島津製作所 ICPS8100、原子吸光装置 Varian AA240、炭素・硫黄分析装置 CS-844 を用いて ICP 発光分光分析法、原子吸光分析法、燃焼-赤外線吸収法によって実施した。その結果、Ce(セリウム) は <0.01、Nb(ニオブ)は、<0.4 で検出された。細孔分布・比表面積測定 (粒子解析) に関しては、マイクロメリティクス製 細孔分布測定装置 ASAP-2020 を用いて真空中、300°C×3Hr 前処理を行い、窒素吸着 BET 多点法によって実施した (表 3)。
- 粒子解析は、比表面積は BET プロットの傾き及び切片を用い、BET 式より単分子層吸着量を求め、単分子層吸着量にガス分子一個の占める断面積 (分子占有断面積) をかけて算出した。一方、細孔分布は、BJH 解析による細孔分布曲

線を用いて求めた (表 3)。その結果、MT-150A は、他の検体と比較すると大きな穴を占有されていた。TKP-102 は AMT-150A と同じ比表面積であるが、細孔径が小さく (1/3~1/4) なり、結果的にその容積も小さくなった。AMT-100 は比表面積が最大だが、MT-150A に比べて細孔径が非常に小さいため、その容積も小さくなり、小さな穴で占有されていることが推察された。AMT-600 に関しては比較的少数の大きな穴で占有されていることが推察された。MT-500B はガス吸着による細孔分布測定の上限 (100nm) 付近から上限以上においてガスの吸着が確認されたことから、細孔容積は求めることができなかった (表 3)。

- 表面化学分析は、親水性および疎水性評価には二つの測定方法 (粒体浸透速度測定および粒体接触角測定) によって実施した (表 4、表 5、図 1、図 2)。粒体浸透速度測定は、協和界面科学製 高機能表面張力測定装置 DY-500 (温度 : 26±1°C湿度 : 40±5°C液体 : 蒸留水、粉体カラム半径 : 5mm) によって実施し、試料をカラムに充填し、カラムを液体表面に鉛直に接液させた。その後、毛管現象により液体が粉体粒子の空壁 (毛管) を上昇 (浸透) したことによるカラムの重量変化を測定することにより浸透速度を求めた (表 4)。粒体接触角測定は、協和界面科学製 高機能表面張力測定装置 DY-500 (温度 : 26±1°C湿度 : 40±5°C、毛管半径測定用液体 : イソプロパノール (IPA) 粉体カラム半径 : 5mm) を用いて、浸透速度法によって分析した (表 5)。

得られた表 4、表 5 の結果より、親水性および疎水性の傾向 (図 1) および相関 (図 2) を示す。図 2 から散布図を表示させたところ、高い逆相関 ($R^2=0.9084$) を示し、MT-150A、AMT-100、TKP-102 (ほぼ有意差なし) > AMT-600 > MT500B となり、AMT-600、MT500B は疎水性の傾向を示した。

3. 物理化学的性状の類似性評価 (階層的クラスタリング解析 : HCA)

収集・整理した 5 種の TiO₂ 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 法および、階層的クラスタリング法 (HCA) による類似度調査のための解析を実施した (図 3、図 4)。その結果、全 5 検体の TiO₂ NPs の 23 項目についてクラスター化し類似性が示された (図 4)。

4. *in vitro* 細胞毒性試験（令和元年度 MHLW GRANTS SYSTEM からの *in vitro* 細胞毒性試験報告結果：同一研究班内での試験報告結果）

in vitro 細胞毒性試験（A549 細胞を用いた細胞生存率％）は、本研究班内で実施された5種の TiO₂ NPs の試験報告について収集・整理した。その結果、毒性は、TKP-102 << MT-150A の2検体間で示し、AMT-100、AMT-600、MT-500B の3検体間で示されなかった。

5. 物理化学的性状データと *in vitro* 毒性試験結果の多変量解析による関連性解析

物理化学的性状データと *in vitro* 毒性試験結果との関連性解析については、直交部分的最小二乗回帰分析（OPLS: Orthogonal Partial Least Squares Regression）により実施された（図 5A, 5B）。本解析では物性項目（値）を説明変数（X）とし、毒性値（細胞生存率の毒性試験結果）を目的変数（Y）として設定し、X 変数から Y 変数のモデルを構築し予測した。

その結果、図 5A の Scores plot より、第一主成分の正の方向が毒性（+）の結果の強さに対応していた。さらに Loadings plot の棒グラフより、正の相関が大きくなる（インパクトが大きくなる）に伴い、毒性（+）に関連する変数（物性）が示された（図 5B）。従って、本解析結果では、図 5A の Scores plot より第一主成分（横軸）で毒性との相関の傾向が分かり、関連する物性項目が横軸から探索可能であることが示唆された。特に、図 5B から、毒性（+）に寄与する変数（インパクトが大きく、エラーバーが比較的落ち着いている）は、不純物（P）、Crystal Phase（Anatase）が挙げられた。一方、毒性（-）に寄与する変数（インパクトが大きく、エラーバーが比較的落ち着いている）は、Si、Crystal Phase（Rutile）、Ca、Crystal size（nm）が挙げられた。

6. マグネタイトナノ粒子の有害性情報（MHLW GRANTS SYSTEM からの *in vitro/in vivo* 毒性試験報告結果）

MHLW GRANTS SYSTEM を情報源とした *in vitro/in vivo* のマグネタイトの有害性情報については、合計 74 試験を収集した（表 6-9）。肺をエンドポイントとした気管内投与試験による *in vivo* 急性毒性試験（1 試験）慢性毒性試験（1 試験）、その他 2 試験の *in vivo* 試験（肺発がんイニシエーター活性の検討および中期発がん性試験）では、試験種類、動物種、試験条件、BAL 細胞数の増加、炎症、生化学値等の変動が生じた LOEL 等についての

Endpoint について調査し収集・整理を行った（表 9）。一方、*in vitro* 毒性試験報告結果について、①遺伝毒性試験（5 検体を用いた 6 試験）では、試験種類、試験動物、細胞種、試験条件、結果（陽性/陰性等）、②細胞毒性試験（10 検体を用いた 24 試験）では、試験種類、細胞種、試験条件、結果（細胞毒性有り・無し）、③酸化ストレス測定試験（11 検体を用いた 40 試験）では、試験種類、細胞種、試験条件、結果（ROS 産生、DNA 付加体形成の増加有り・変化なし、DNA 付加体形成の増加傾向）の項目について収集・整理した（表 6-8）。

➤ *in vitro* 毒性試験（MHLW GRANTS SYSTEM からの *in vitro* 毒性試験報告結果）（表 6-8）

MHLW GRANTS SYSTEM から収集されたマグネタイトナノ粒子の *in vivo* 毒性試験報告結果は、遺伝毒性試験（5 検体を用いた 6 試験）、細胞毒性試験（10 検体を用いた 24 試験）、酸化ストレス測定試験（11 検体を用いた 40 試験）について収集・整理した（表 6-8）。

遺伝毒性試験結果（表 6）

in vitro 遺伝毒性試験は、試験種類、試験動物、細胞種、試験条件、結果（陽性/陰性等）、について収集・整理した結果、6 試験全てにおいて陽性となった。

細胞毒性試験結果（表 7）

in vitro 細胞毒性試験は、試験種類、細胞種、試験条件、結果（細胞毒性有り・無し）、について収集・整理した結果、24 試験のうち 15 試験で毒性を有した。特に、①アモルファス SiO₂ にカプセル化された Mn_{1-x}Zn_xFe₂O₄（x=0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8）の検体で、Human prostate cancer cells（DU145）、breast cancer cells（KPL4, MCF7, MDA-MB231）を用いた試験結果は、30min で4種類のがん細胞すべてで約 80% の細胞生存率の低下を認めた。また、②非修飾磁性体ナノ粒子（Fe₃O₄NPs）（戸田工業株式会社より購入）、表面をカルボキシル基で修飾した磁性体ナノ粒子（Fe₃O₄NPs-COOH）（Institute for Integrated Cell-Material Sciences（iCeMS）、京都大学より購入）の検体で、前立腺癌細胞株（DU145）、前立腺癌細胞株（LNCaP）をもちいた 4 試験の結果においても、全ての検体間で細胞毒性が認められた。

酸化ストレス測定試験結果 (表 8)

in vitro 酸化ストレス測定試験は、試験種類、細胞種、試験条件、結果 (ROS 産生、DNA 付加体形成の増加有り・変化なし、DNA 付加体形成の増加傾向)について収集・整理した。結果は、40 試験のうち 18 試験間で ROS 産生・DNA 付加体形成の増加有り・変化なし、DNA 付加体形成の増加傾向を認めた。特に、上記の細胞毒性試験結果で同一検体として試験されていた非修飾磁性体ナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$) (戸田工業株式会社より購入)、と表面をカルボキシル基で修飾した磁性体ナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ -COOH) (Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), 京都大学より購入)は、16 試験のうち 2 試験： $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (ROS 生成、26h、前立腺癌細胞株 DU145、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ (ROS 生成、27h、前立腺癌細胞株 DU145、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で ROS 産生が認められたが、残り 14 試験間での変化は認められなかった。

➤ *in vivo* 毒性試験 (MHLW GRANTS SYSTEM からの *in vivo* 毒性試験報告結果) (表 9)

MHLW GRANTS SYSTEM から収集したマグネタイトナノ粒子の *in vivo* 毒性試験報告結果については、肺をエンドポイントとした 4 試験の気管内投与試験データについて、HESS 搭載用に収集・整理した。

反復投与毒性試験結果

反復投与毒性試験 (気管内投与試験) の有害性情報は 4 試験の毒性試験データについて収集した。これらの収集項目では、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 等について調査し、収集・整理を行った。4 試験の結果は以下であった。

- ✓ マグネタイトスラリー (pH10.1, Lot: 90316) (戸田工業) (EDS で鉄及び酸素を検出、それ以外の不純物 (元素) は検出無) を検体に用いて、F344/DuCrIcRli ラット (male/female, 5 mg/kg、15 mg/kg、45 mg/kg, 単回) に気管内スプレー投与し、2 週間後に血液学的・血液生化学的・病理学的検査を実施した。その結果、5 mg/kg で雄の精巣重量増加、5 mg/kg 以上で雌雄の肺の腫大・浮腫・黒色物質沈着、マグネタイト貪食マクロファージ浸潤・II 型肺胞上皮増生、胸腺リンパ節の褐色粒子沈着、雌の肺の炎症細胞浸

潤、15 mg/kg 以上で雌雄の肺重量増加、肺胞腔内マグネタイトの沈着・肉芽形成、45 mg/kg で雌雄の気管支上皮軽度腫大・気管支粘膜杯細胞増加、異物巨細胞浸潤、雄の肺血管周囲浮腫を認めた。

- ✓ 磁性ナノ粒子マグネタイト (Lot. 90828, pH10.5; Lot. 100316, pH10.0) (EDS で鉄及び酸素を検出、それ以外の不純物 (元素) は検出無) を検体に用いて、F344/DuCrIcRli ラット (male/female, 0.2 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 1 回/4 週間、計 13 回) に気管内スプレー投与し、52 週間後に血液学的・血液生化学的・病理学的・免疫組織学的検査を実施した。その結果、0.2 mg/kg 以上で雌雄の肺のマグネタイト貪食肺胞マクロファージの肺胞腔浸潤、1.0 mg/kg 以上で雌雄の肺の黒色物質沈着、胸腺リンパ腫の軽度腫大・灰黒色化、肺の肉芽形成・II 型肺胞上皮腫大・肺胞/細気管支上皮過形成、雄の血管周囲/気管周囲/間質炎症細胞浸潤、5.0 mg/kg で雌雄の肺絶対/相対重量増加、肺の軽度の腫大、雌の血管周囲/気管周囲/間質炎症細胞浸潤を認めた。
- ✓ 磁性ナノ粒子マグネタイト (BMS-11; Lot.111117, 戸田工業) (pH 10.5、一次粒径 5-15 nm) を検体に用いて、肺発がんイニシエーター活性の検討するため、F344 ラット (male, 5.0 mg/kg、1 日おき 15 日間、計 8 回) に気管内投与し、また、II 群 (マグネタイト投与群、0.0、5.0 mg/kg 体重、週 1 回、計 4 回) では、マグネタイトの肺発がんイニシエーター活性を検討するためマグネタイトを気管内投与後、肺発がんプロモーション作用を有する γ -オリザノールあるいはグリセロールを投与し、肺における腫瘍性病変の発生について病理学検査を実施した。その結果、マグネタイト投与群 (II・IV 群) では肺重量増加、マグネタイト投与群 (VI 群) では肺重量増加傾向、マグネタイト投与群 (II・IV・VI 群) の肺では、暗褐色を呈するマグネタイトの広汎な沈着、マグネタイト単独投与群 (II 群) の肺では、マグネタイトを貪食した肺胞マクロファージの肺胞腔及び肺胞壁への浸潤、炎症性細胞浸潤、II 型肺胞上皮の腫大等、マグネタイト投与群 (II・IV・VI 群) のリンパ節においては、HE 染色で黄褐色、鉄染色 (ベルリン青染色) で青色を呈する顆粒を貪食したマクロファージの浸潤 (胸腺リンパ節に

において顕著)を認めた。さらに、マグネタイトを気管内投与した後、肺発がんのプロモーターとされる γ -オリザノールあるいはグリセロールを投与した群においては、マグネタイト単独投与による肺の病変が修飾されず、肺の過形成性病変も観察されず、本条件下では、マグネタイトが肺発がんイニシエーターとしての活性を有しなかった。

- ✓ 磁性ナノ粒子マグネタイト (BMS-11; Lot.140528, 戸田工業) (pH9.7、一次粒径 5-15 nm) を検体に用いて、中期発がん性試験として、A/JJmsSlc NNK 2 mg/マウスを腹腔内投与後、マグネタイト 0、5.0 mg/kg 体重で 16 週間 (4 週間毎に 1 回)、気管内投与した。II 群 (マグネタイト投与群) の結果は、NNK を投与したマウスの肺に、多発性に結節あるいは白斑が認められ、組織学的検索で肺胞上皮の過形成あるいは気管/肺胞上皮腺腫が高い確率で認められた。肺胞上皮の過形成及び腺腫の発現率と個体当たりの腫瘍数にマグネタイト併用投与の影響は認められず、本試験条件下では、マグネタイトが肺に対する発がん性を有しないことが明らかとなった。一方、マグネタイト 5 mg/kg 体重投与群でみられた所見では、肺全例にマグネタイトの沈着と思われる黒色斑や、マグネタイトと思われる黄褐色の顆粒を貪食したマクロファージの浸潤、炎症性細胞の浸潤、肺、卵巣の絶対・相対重量増加を認めた。

D. 考察

成分分析の定性分析から、Ce については、定量分析結果から偏析の可能性として考えられた。また、Nb は、製造元より酸化チタン製造に用いる原料に 0.1-0.2% 程度含まれている報告から、本試験結果と一致し、二酸化チタンナノ粒子そのものへの含有ではなかった。5 種の TiO₂ NPs について、物理化学的性状データの特異解析 (HCA 法) によるクラスタリングの実施結果のみでは、毒性試験結果 (A549 細胞に与える毒性評価試験結果) と関連性は見いだせず、物性項目データ数の情報が少ないことが理由の一つと考えられた。また、更に検討をすすめた物理化学的性状データと細胞毒性試験結果 (A549 細胞に与える毒性評価試験結果) との OPLS 解析による関連性解析の結果から、最も毒性を示した TKP-102 は、不純物 (P) の多さと Crystal phase (Anatase) の影響

が示唆された。従って、これらの物理化学的性状の組み合わせが *in vitro* 試験での毒性に影響することが考えられた。一方、マグネタイトナノ粒子の有害性情報については、MHLW GRANTS SYSTEM から *in vitro/in vivo* 毒性試験報告結果より 74 試験を収集・整理した。マグネタイトナノ粒子に関しては、物理化学的性状の情報数が殆どなく、現在は収集したデータ内で入手困難な検体が多かった理由により、物理化学的性状に必要な測定ができず、有害性情報との解析に資するデータが揃わなかった。今回、収集・整理したマグネタイトナノ粒子の毒性の傾向としては、*in vitro* 毒性試験で遺伝毒性は試験されたすべての検体間で陽性を示し、また、細胞毒性、酸化ストレス試験では試験された約半分の検体が、それぞれで細胞毒性を有し、酸化ストレスを引き起こしていた。従って、どのような物理化学的性状を有するかについては不明であることから各検体の測定データの収集の必要性が求められた。

E. 結論

本研究で 5 種の TiO₂ NPs に関する物理化学的性状データの情報収集と、*in vitro* 毒性試験結果の収集データについて、解析用データに整理・データマイニングし、物理化学的性状の特異解析および、A549 細胞に与える毒性評価試験結果との関連性解析を実施した。OPLS 法による多変量解析で毒性に関連する物理化学的性状項目の組み合わせを見出したが、物理化学的性状の情報については項目数の不足が見られた。マグネタイトナノ粒子に関しては、*in vitro/in vivo* 毒性試験報告結果からの有害性情報に関しては、*in vitro* 試験で同一検体間の統一された試験法や条件で毒性試験を検討し、実施する必要がある。また、*in vivo* 試験では、肺に炎症所見のある気管内投与試験結果データは、わずか 4 試験のみであった。さらに、マグネタイトナノ粒子の物理化学的性状については、情報が殆どなかったことから、毒性試験結果との関連性解析を進めていくためにも物理化学的性状の収集が今後の課題となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 大野彰子, 渡邊昌俊, 広瀬明彦: 多変量解析

を用いたナノマテリアルの毒性評価手法の開発, 第 47 回日本毒性学会学術集会 (2020. 6.29-7.1, web 開催)

2. FUKUHARA K, OHNO A. Generation of reactive oxygen species following photoirradiation of nitromusks, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
3. OHNO A., WATANABE M, HIROSE A. Application to toxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
4. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の解析, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
5. IIJIMA K, NISHIDA A, OHNO A., ASHIKAGA T. Comparison of Sensitization Potentials between Silver Nanoparticles and Silver Ions using Monocytic Cell Line THP-1, SOT 60th Annual Meeting and ToxExpo (March 15-18, 2021, virtual meeting)
6. 大野 彰子, 沖山 佳生, 広瀬 明彦, 福原 潔: ニトロ多環芳香族炭化水素の構造と変異原性に関するドッキングスタディ, 日本薬学会第 141 年会 (2021. 3.26-3.29, web 開催)
7. 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-メチルフェニールのラジカル消去作用, 日本農芸化学会 2021 年度大会 (2021. 3.18-3.21, web 開催)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

Table 1 5種のTiO₂ NPsの調査対象物質

	種類	Crystal phase	Crystal size (nm)	Surface coating	Composition (TiO ₂ , %)
MT-150A	微粒子酸化チタン	Rutile	15	uncoating	99.8
MT-500B	微粒子酸化チタン	Rutile	35	uncoating	99.7
AMT-100	光触媒作用酸化チタン	Anatase	6	uncoating	98.7
TKP-102	光触媒作用酸化チタン	Anatase	15	uncoating	99.6
AMT-600	光触媒作用酸化チタン	Anatase	30	uncoating	99.7

Table 2 5種のTiO₂ NPsの物理化学的性状

Property		Method/Instrument	MT-150A	MT-500B	AMT-100	TKP-102	AMT-600
Crystal phase			Rutile	Rutile	Anatase	Anatase	Anatase
Crystal size (nm)			15	35	6	15	30
Composition※	Impurity (µg/g Fe)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
	Impurity (µg/g Si)	ICP-AES	< 100	100	< 100	< 100	100
	Impurity (µg/g K)	ICP-AES	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
	Impurity (µg/g P) ※1	ICP-AES	< 100	< 100	680	770	620
	Impurity-coating (µg/g Al)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
	Impurity (µg/g Cr)	ICP-AES	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
	Impurity (µg/g Zr) ※1	ICP-AES	280	300	270	300	470
	Impurity (µg/g Ca) ※1	ICP-AES	870	910	160	290	280
	Impurity (µg/g Na)	ICP-AES	2000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
	Impurity (µg/g S)	ICP-AES	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000	< 1000
	Impurity (µg/g Mg)		-	-	-	-	-
	Impurity (% Ce) ※3	ICP-AES	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
	Impurity (% Nb) ※3	ICP-AES	0.11	0.16	0.16	0.17	0.15
	O (wt%)		0.0	39.8	34.8	39.0	39.1
	Ti (wt%) ※2	ICP-AES	55.7	59.6	52.1	58.4	58.5
	TiO ₂ (%) (括弧内はdata-sheetの値)	ICP-AES	92.9(90<)	99.5(90<)	86.9(93)	97.5(96)	97.5(98)
Coating			no	no	no	no	no
Hydrophilic / Hydrophobic			Hydrophilic	Hydrophobic	Hydrophilic	Hydrophilic	Hydrophobic
Specific surface area (m ² /g)	surface area (m ² /g) (括弧内はdata-sheetの値)	BET	109	35	325(280)	109(110)	55(52)
micropore distribution	micropore distribution (細孔容積 cm ³ /g)	BET	0.44	-	0.36	0.32	0.24
	micropore distribution (細孔径 nm)	BET	46	-	2.7	13	26

※1 不純物は6化合物の各種元素について定性分析後、P, Ca, Zr, Tiについては定量分析を実施した。

※2 TiO₂はTiの定量結果より換算した。

※3 推定存在比 (%)

Table 3 窒素吸着多点法測定結果

	比表面積(m ² /g)	マイクロ領域 BJH 解析 (1~100nm)	
		細孔容積 (cm ³ /g)	細孔径※1 (nm)
MT-150A	109	0.44	46
MT-500B	35	-	-
AMT-100	325	0.36	2.7
TKP-102	109	0.32	13
AMT-600	55	0.24	26

Table 4 浸透速度測定結果

	粉体浸透速度(mm ² /s)				
	1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
MT-150A	0.9	0.8	0.8	0.8	0
MT-500B	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
AMT-100	0.9	0.7	1	0.8	0.2
TKP-102	0.7	0.7	0.9	0.7	0.1
AMT-600	0.5	0.5	0.5	0.5	0

Table 5 粉体接触角測定結果

	粉体接触角 (°)				
	1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
MT-150A	53.8	56.4	57.2	55.8	1.8
MT-500B	87.8	83	82.8	84.5	2.8
AMT-100	53.9	61.9	46.5	54.1	7.7
TKP-102	59.6	63.3	54.2	59.1	4.6
AMT-600	75.7	77.4	77.4	76.9	1

Figure 1 浸透速度と接触角（親水性および疎水性の傾向）

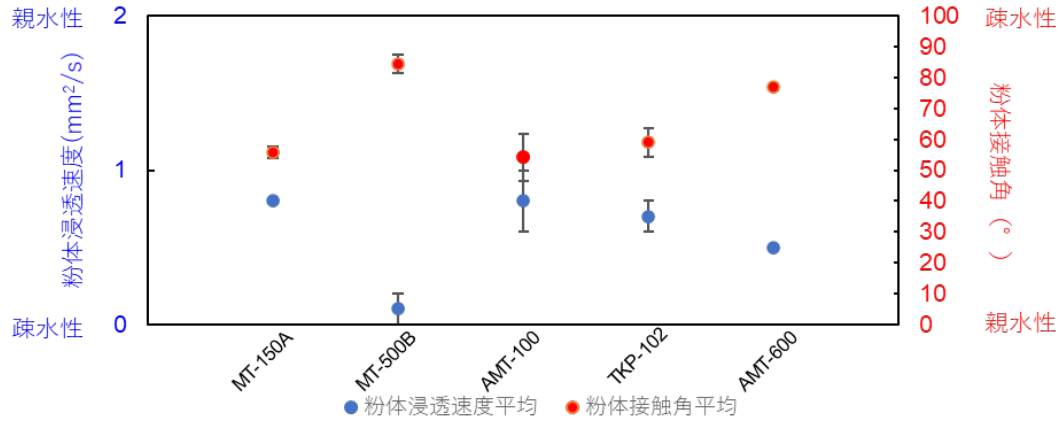


Figure 2 浸透速度と接触角（親水性および疎水性の傾向）との相関図

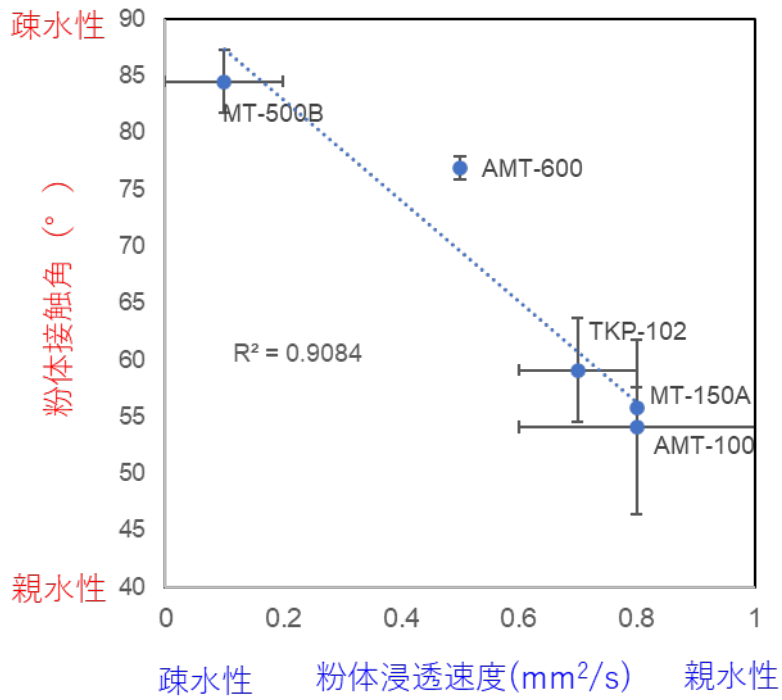


Figure 3 5種のTiO₂ NPsの主成分分析 (PCA)

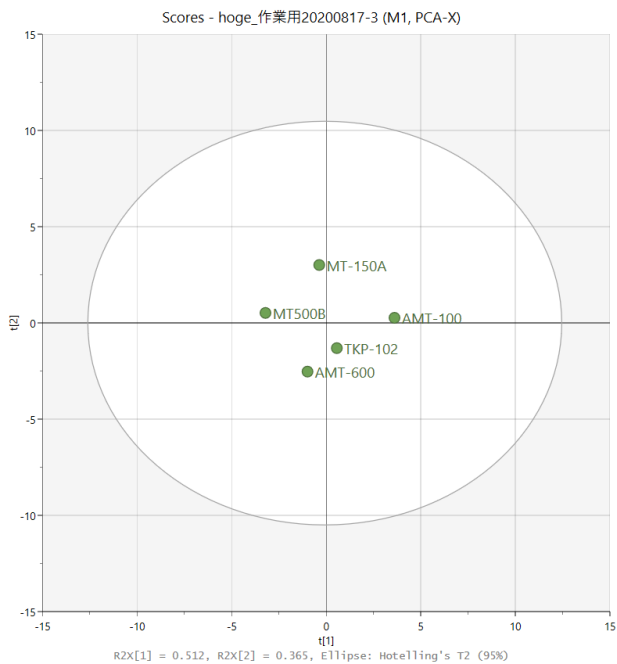


Figure 4 5種のTiO₂ NPsのクラスタリング (HCA)

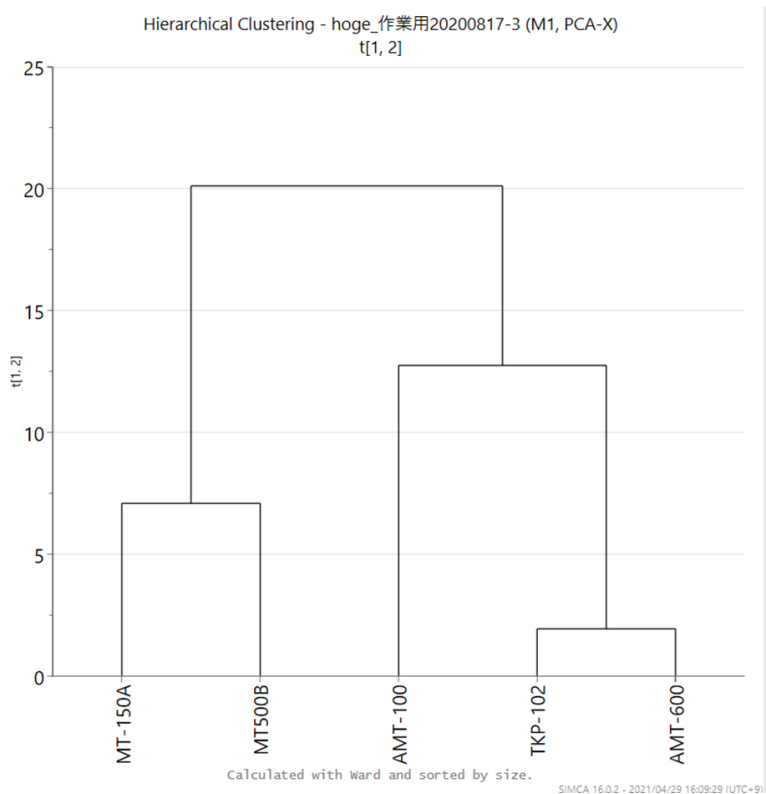
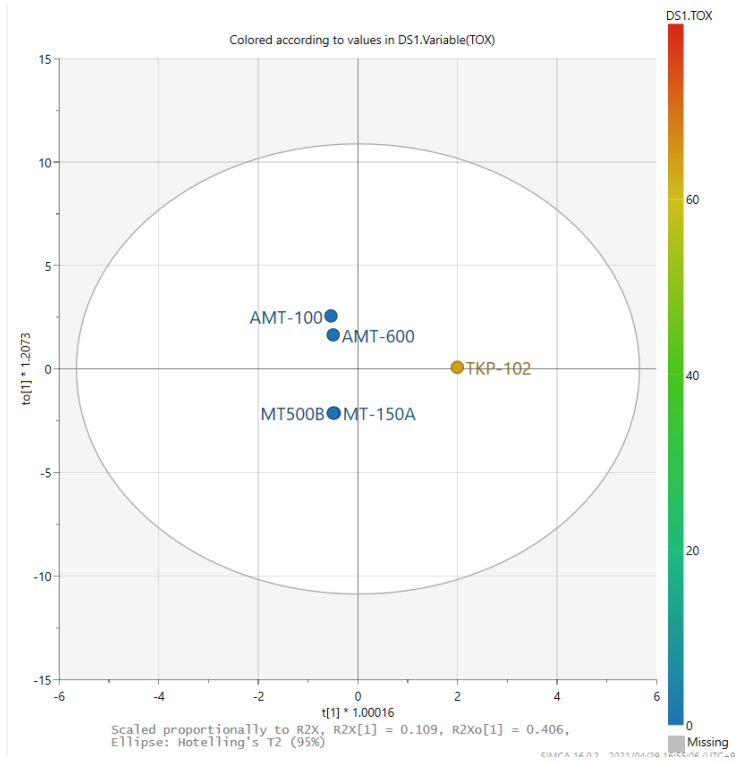


Figure 5 5種のTiO₂ NPsの物理化学的性状とA549細胞毒性試験結果と物性との多変量解析 (OPLS 解析)

5A) Scores plot



5B) Loadings plot

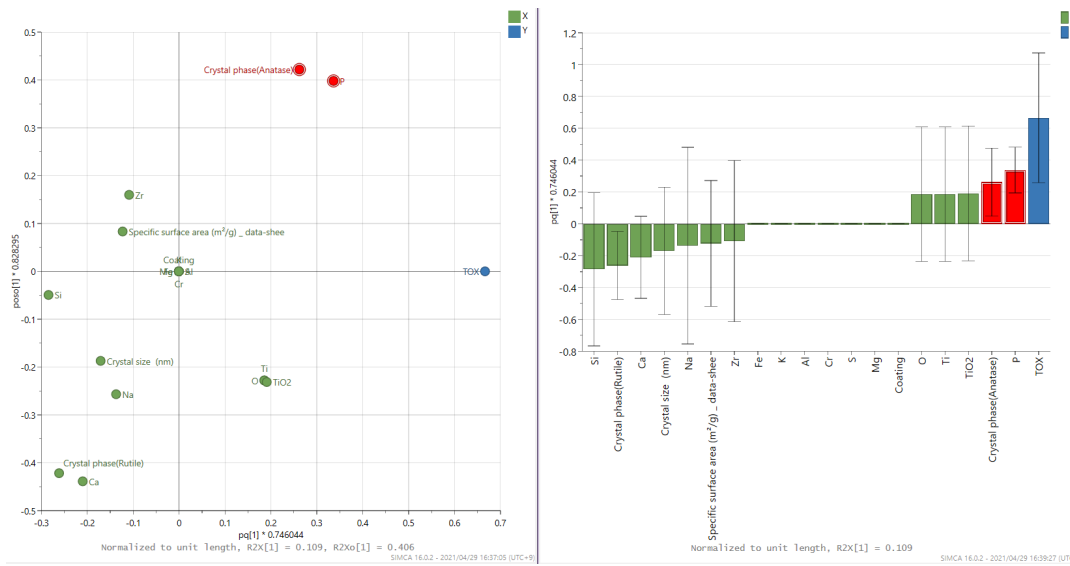


Table 6 マグネタイトの有害性情報 (遺伝毒性)

検体	試験法	Test cell type	Time	濃度	結果
マグネタイト	コメットアッセイ	マウス肺細胞	単回気管内投与3、24、72時間後	0.05、0.2 mg/mouse	+
マグネタイト	gpt遺伝子突然変異	マウス肺細胞	反復気管内投2ヵ月後	0.2 mg/mouse	+
Fe2O3 Fe3O4	末梢血小核試験	マウス末梢血網状赤血球	腹腔内投与0、24、48、72時間後	1、3 mg	+
マグネタイト	小核試験	ヒト肺がん由来細胞株 (A549)	不明	200 μ g/mL (その他の濃度は不明)	+
	姉妹染色分体交換試験	チャイニーズハムスター (CHO) 細胞株	不明	2 μ g/mL (その他の濃度は不明)	+
マグネタイトナノ粒子 (MGT) 表面修飾を有さないMGT (BMS-10) 表面修飾 (ポリアクリル酸修飾) を有するMGT (BMSC-5)	gpt遺伝子突然変異	GDL1、RAW264.7	24時間ばく露、6~7日間培養後	不明	+

+: 陽性

Table 7 マグネタイトの有害性情報 (細胞毒性)

検体	Cell assay	Test cell type	Time	濃度	結果	備考
マグネタイト	Alamar Blue Assay (生存細胞数測定)	前立腺癌細胞株DU145 前立腺正常上皮細胞株RWPE1	24、48、72h	記載なし	↓	濃度依存的に生存細胞数が減少
マグネタイト	細胞生存率	ヒト肺がん由来細胞株 (A549)	24、48、72h	10 μ g/mL	↓	A549: 10 μ g/mLより生存細胞率が低下 DU-145: 1 μ g/mLより生存細胞率が低下
	細胞生存率	ヒト前立腺細胞株 (DU145)	24、48、72h	1 μ g/mL	↓	
	細胞生存率	ヒト前立腺細胞株 (LNCaP、RWPE-1)	24、48、72h	1、10 μ g/mL?	→	
γ -Fe2O3 (d= 70 nm) (CIK NanoTek社より購入)をPEI maxで表面コーティングしたPEIImax-nanoparticle	Alamar Blue Assay (生存細胞数測定)	CL6 cells	0.8 μ g for 4h on the magnetic sheet	0.8 μ g for 4h on the magnetic sheet	→	
非修飾磁性体ナノ粒子 (Fe3O4NPs) (戸田工業株式会社より購入) 表面をカルボキシル基で修飾した磁性体ナノ粒子 (Fe3O4NPs-COOH) (Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), 京都大学より購入)	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (DU145)	72h	200 μ g/mL	↓	Fe3O4NPs
	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (DU145)	72h	200 μ g/mL	↓	Fe3O4NPs-COOH
	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (LNCaP)	72h	100, 200 μ g/mL	↓	Fe3O4NPs
	細胞生存率	前立腺癌細胞株 (LNCaP)	72h	100, 200 μ g/mL	↓	Fe3O4NPs-COOH
マグネタイト (酸化鉄ナノ粒子) (濃邊先生より本研究班全体に分配)	MTTアッセイ LDHアッセイ	3D皮膚再構成系	24h	0, 2, 6.7, 20 mg/mL	→	表面修飾マグネタイト
	Alamar Blue Assay	NKEK単層培養系	24、72h	0, 1, 10, 100, 200 μ g/mL	↓	表面修飾マグネタイト 72時間培養では200 μ g/mLで強い細胞毒性
	Alamar Blue Assay	HepG2単層培養系	24、72h	0, 1, 10, 100, 200 μ g/mL	→	表面修飾マグネタイト
	MTT assay LDH assay	3D皮膚再構成系	24h	0, 2, 6.7, 20 mg/mL	→	表面非修飾マグネタイト
	Alamar Blue Assay	NKEK単層培養系	24、72h	0, 1, 10, 100, 200 μ g/mL	↓	表面非修飾マグネタイト 24時間培養では200 μ g/mLで、72時間培養では100及び200 μ g/mLで強い細胞毒性
	Alamar Blue Assay	HepG2単層培養系	24、72h	0, 1, 10, 100, 200 μ g/mL	→	表面非修飾マグネタイト
マグネタイトナノ粒子 (MGT) 表面修飾を有さないMGT (BMS-10) 表面修飾 (ポリアクリル酸修飾) を有するMGT (BMSC-5)	NR assay	GDL1	24h	6.25-200 μ g/mL	→	表面修飾を有さないMGT (BMS-10)
	NR assay	GDL1	24h	6.25-200 μ g/mL	→	表面修飾 (ポリアクリル酸修飾) を有するMGT (BMSC-5)
	NR assay	RAW264.7	24h	200 μ g/mL	↓	表面修飾を有さないMGT (BMS-10)
	NR assay	RAW264.7	24h	6.25 μ g/mL	↓	表面修飾 (ポリアクリル酸修飾) を有するMGT (BMSC-5)
Fe3O4磁性体ナノ粒子	不明	前立腺癌細胞株 (DU145、LNCaP) 前立腺由来間質細胞株 (PrSC)	記載なし	1, 10, 100 μ g/mL	↓	LNCaPは濃度依存的に細胞生存率が低下
Fe3O4 NPs (Toda Kogyo Corporation (Otake, Hiroshima, Japan))	Alamar Blue Assay	前立腺癌細胞株 (DU145)	72h	100 μ g/mL	↓	
	Alamar Blue Assay	前立腺癌細胞株 (PC-3)	24、72h	10、100 μ g/mL	↓	
Core-Shell (塩化鉄 (III) 六水和物、PVA溶液、ピロール-3-カルボン酸から合成)	WST-1 Assay	human ovary cancer cell line (HAC-2) folate-receptor negative cells (MCF-7)	24h	不明	→	
アモルファスSiO ₂ にナノ粒子化されたMn ¹⁺ -xZn ^x Fe ₂ O ₄ (x=0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8)	細胞生存率	Human prostate cancer cells (DU145) breast cancer cells (KPL4, MCF7, MDA-MB231)	30 min	1 mg/ml	↓	4種類のがん細胞すべてで約80%の細胞生存率の低下 After application of an AC magnetic field of 31 kHz and 90 Oe for 30 min, the cells were stained with trypan blue, and the remaining cells were counted.

↓: 細胞毒性有り、→: 細胞毒性無し

Table 8 マグネタイトの有害性情報（酸化ストレス）

検体	試験方法	Time	Test cell type	濃度	結果
マグネタイト	8-oxo-dG、H ϵ dG、H ϵ dA、H ϵ 測定	マウス肺細胞	単回気管内投与3~168時間後	0.2 mg/mouse	↑
マグネタイト	8-OH-dG測定	3、24、72、168時間後	単回気管内投与マウスの摘出肺	0.2 mg/body	↑
フェライト（酸化鉄）Fe ₃ O ₄	8-OH-dG測定	気管内投与3時間後	気管内投与マウスの肺組織DNA	0.2 mg/body	↑
フェライト（酸化鉄）Fe ₃ O ₄	8-OH-dG測定	不明	培養細胞（DU-145, LNCaP）DNA	0.1、1、10（単位不明）	↑
マグネタイト	ROS生成	ばく露2日後	ヒト前立腺がん細胞株: DU-145, PC-3	1、10 μ g/mL?	↑
	ROS生成	ばく露2日後	ヒト前立腺がん細胞株: LNCaP ヒト肺がん細胞株: A549	1、10 μ g/mL?	→
	8-OH-dGの生成	ばく露2日後	ヒト前立腺がん細胞株: DU-145, PC-3	1 μ g/mL	↑
	8-OH-dGの生成	ばく露2日後	ヒト前立腺がん細胞株: LNCaP ヒト肺がん細胞株: A549	1、10 μ g/mL?	→
	修復酵素遺伝子	ばく露2日後	ヒト前立腺がん細胞株: DU-145 ヒト肺がん細胞株: A549	1、10 μ g/mL?	↓
マグネタイト	hOGG1遺伝子発現	24、48、72h	DU-145	不明	↓
	hOGG1遺伝子発現	24、48、73h	RWPE1	不明	↑
マグネタイト	8-OH-dG測定	24、48、74h	ヒト肺がん由来細胞株（A549）	10 μ g/mL	↑
	8-OH-dG測定	24、48、75h	ヒト前立腺細胞株（DU145）	1 μ g/mL	↑
	ROS生成	24、48、76h	ヒト肺がん由来細胞株（A549）	10 μ g/mL	↑
	ROS生成	24、48、77h	ヒト前立腺細胞株（DU145）	1 μ g/mL	↑
Fe ₂ O ₃ Fe ₃ O ₄	8-OH-dG測定	不明	ICRマウス尿	1、3 mg?	(↑)
	8-OH-dG測定	不明	ICRマウス肝臓	1、3 mg?	→
非修飾磁性体ナノ粒子（Fe ₃ O ₄ NPs）（戸田工業株式会社より購入） 表面をカルボキシル基で修飾した磁性体ナノ粒子（Fe ₃ O ₄ NPs-COOH）（Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), 京都大学より購入）	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株DU145	1 μ g/mL	→
	ROS生成	25h	前立腺癌細胞株DU145	10 μ g/mL	→
	ROS生成	26h	前立腺癌細胞株DU145	100 μ g/mL	↑
	ROS生成	27h	前立腺癌細胞株DU145	200 μ g/mL	↑
	ROS生成	28h	前立腺癌細胞株LNCaP	1 μ g/mL	→
	ROS生成	29h	前立腺癌細胞株LNCaP	10 μ g/mL	→
	ROS生成	30h	前立腺癌細胞株LNCaP	100 μ g/mL	→
	ROS生成	31h	前立腺癌細胞株LNCaP	200 μ g/mL	→
	ROS生成	32h	前立腺癌細胞株DU145	1 μ g/mL	→
	ROS生成	33h	前立腺癌細胞株DU145	10 μ g/mL	→
	ROS生成	34h	前立腺癌細胞株DU145	100 μ g/mL	→
	ROS生成	35h	前立腺癌細胞株DU145	200 μ g/mL	→
	ROS生成	36h	前立腺癌細胞株LNCaP	1 μ g/mL	→
	ROS生成	37h	前立腺癌細胞株LNCaP	10 μ g/mL	→
	ROS生成	38h	前立腺癌細胞株LNCaP	100 μ g/mL	→
ROS生成	39h	前立腺癌細胞株LNCaP	200 μ g/mL	→	
磁性体ナノ粒子（MgNPs-Fe ₃ O ₄ ）	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株DU145	1 μ g/mL	→
	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株DU145	10 μ g/mL	↑
	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株DU145	100 μ g/mL	↑
	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株PC-3	1 μ g/mL	→
	ROS生成	24h	前立腺癌細胞株PC-3	10 μ g/mL	↑
ROS生成	24h	前立腺癌細胞株PC-3	100 μ g/mL	↑	
Fe ₃ O ₄ NPs (Toda Kogyo Corporation)	ROS生成	24h	PC-3 or DU145 cells	1、10、100 μ g/mL	↑

↑ : ROS 産生、DNA 付加体形成の増加

(↑) : DNA 付加体形成の増加傾向

→ : 変化なし

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案
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：本サブテーマではオランダ国立公衆衛生環境研究所（RIVM）が開発した ConsExpo-nano を用いたナノマテリアル曝露評価に必要な情報を調査し、室内でのスプレー型の消費者製品の使用を想定したケーススタディを行った。また、ConsExpo-nano を用いて曝露量を推定する際にパラメータが結果に与える影響を定量的に評価するため、感度解析を行った。ConsExpo-nano は、ナノマテリアルの曝露量に関する初期評価には、使用可能であると考えられるが、今後、対象とするケースを増やした研究が望まれる。また、ConsExpo-nano を用いる際には、パラメータが変動しうる範囲も考慮する必要があるが、曝露量と非線形関係にあった入力パラメータについてより詳細に調査・入力することが、より正確な推算値を得るために効率的であることが示唆された。

A. 研究目的

昨年度までに行った消費者製品に含まれる化学物質や粒子の曝露評価ツールに関する調査にて、特に汎用性が高く使い勝手も優れていると考えられた、オランダ国立公衆衛生環境研究所（RIVM）が開発した ConsExpo-nano の、ナノマテリアル曝露評価に必要な情報を調査し、室内でのスプレー型の消費者製品の使用を想定したケーススタディを行った。また、ConsExpo-nano を用いて曝露量を推定する際にパラメータが結果に与える影響を定量的に評価するため、感度解析を行った。テクニカルガイダンスの作成も行った。

B. 研究方法

ナノマテリアルの安全性評価に関わる曝露評価ツールを用いたケーススタディ

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 をベースに開発され、ナノマテリアルの性状を考慮して、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。本ツールを用いて室内での二酸化チタンを含むスプレー型の消費者製品の使用を想定し、ケーススタディを行い、推算値の精度を文献値¹と比較することで評価した。ConsExpo-nano を用いてナノマテリアルの曝露量を推定するために必要な入力パラメータを表1に示し、入力画面を図1に示す。また、出力パラメータを表2に示す。ConsExpo-nano

では、ナノマテリアルの粒径ごとの曝露量（図2）や、粒径ごとの沈着部位別の沈着比率（図3）、沈着量（図4）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。表3には、本ケーススタディにて使用した入力パラメータを示す。

感度解析は、ConsExpo-nano のデフォルト値を基準とし、デフォルト値が設定されていないパラメータは二酸化チタンを含む消臭製品の使用を想定し、基準値を設定し、±50%変動幅させた際の曝露量に及ぼす影響を評価した。ConsExpo-nano で最大値、最小値が設定されているパラメータもあり、変動幅を±50%にできないパラメータは、変動できる範囲で感度解析を行った。表4に感度解析で用いた基準値と変動幅を示す。

C. 結果

ナノマテリアルの安全性評価に関わる曝露評価ツールを用いたケーススタディ

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曝露量を推定するために必要なパラメータを収集、整理した。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/cm^3)、製品に含まれる対象物質の重量割合 (-)、エアロゾルの粒子径 (μm)、変動係数 (-)、最大粒子径 (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)、換気速度 (h^{-1})、ナノマテリアル密度 (g/cm^3)、ナノ粒

子径 (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 秒後のクラウドの体積 (m³) であり、ナノマテリアルの性状を条件として入力することが可能であった。ConsExpo-nano では、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数値を入力する必要があった。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 5 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。

これらの情報に加え、曝露量に関する情報が記載された文献¹を用いて、二酸化チタンを含むスプレー型の消臭製品についてケーススタディを行い、ConsExpo-nano の推算値の精度を評価した。ConsExpo nano を用いて推定した消臭スプレーに含まれる二酸化チタンの使用に伴う吸入量および肺泡沈着量は、それぞれ 5.9×10^{-3} および 4.1×10^{-4} mg kg⁻¹ であった。同様のケースにおける既往研究¹の推定値は、それぞれ 5.7×10^{-2} および 4.0×10^{-4} mg kg⁻¹ であり、ConsExpo-nano を用いて推算した曝露量と文献値¹の比は、吸入量については 0.104 倍、肺泡沈着量については 1.02 倍となった。

ConsExpo-nano への入力パラメータについて感度解析を行った結果、入力パラメータとエアロゾル粒子の曝露量の関係は大きく分けて、線形関係 (図 6) と非線形関係 (図 7) の 2 つに分けられた。製品に関するパラメータ、エアロゾルに関するパラメータ、製品使用状況に関するパラメータは、エアロゾル粒子の曝露量と線形関係にあった。一方、非線形関係にあった入力パラメータと推定された曝露量として、エアロゾル粒子の最大粒子径とエアロゾル粒子の曝露量、ナノ粒子径と曝露されると推定されたナノ粒子数、エアロゾル粒子径と曝露されると推定されたエアロゾル粒子の表面積、ナノ粒子の表面積と曝露されると推定されたナノ粒子数が挙げられた。ConsExpo nano においては、エアロゾルの最大粒子径は、粒子径の中央値や変動係数とともに、粒子径分布を求めるために使用され、統計的な意味と異なって使用される。具体的には、最大粒子径以上の分布は切り取られ、中央値以下の最大値も許容される。

以上の結果をもとに、ConsExpo-nano を用いて行政関係者および事業者などが手軽にナノマテリア

ルの曝露リスク評価を行えるようにテクニカルガイダンスを図 8 のように作成した。

D. 考察

本研究で参考にした文献¹には、ConsExpo-nano での推算に必要なすべてのパラメータが記載されていたわけではなく、いくつかのパラメータは文献¹の状況を反映しきれていない可能性があるデフォルト値などの数値を用いたため、これによる誤差も含まれていると考えられる。そのため、ConsExpo-nano 自体の評価には、パラメータを揃えた実験が必要だと考えられる。

E. 結論

ConsExpo-nano は、ナノマテリアルの曝露量に関する初期評価には、十分使用可能であると考えられるが、今後、対象とするケースを増やした研究が望まれる。また、ConsExpo-nano を用いる際には、パラメータが変動しうる範囲も考慮する必要があるが、曝露量と非線形関係にあった入力パラメータについてより詳細に調査し、入力することが示唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

鰐川 雅花, 多田 智彦, 徳村 雅弘, 王 齊, 三宅 祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和. ConsExpo nano を用いたスプレー製品中ナノマテリアルの曝露量推定における曝露パラメータの影響評価, 2020 年室内環境学会学術大会, 郡山. (2020 年 12 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

引用文献

Park, J.; Ham, S.; Jang, M.; Lee, J.; Kim, S.; Kim, S.; Lee, K.; Park, D.; Kwon, J.; Kim, H.; Kim, P.; Choi, K.; Yoon, C.; Spatial-temporal dispersion of aerosolized nanoparticles during the use of consumer sp

ray products and estimates of inhalation exposure. *Environmental science & technology* **2017**, *51*, (13), 762-7638.

表 1. ConsExpo-nano を用いたナノマテリアルの曝露量の推定に必要な入力パラメータ

Scenario type	Variable	Putty spray/Spray glue		Unit
		30	240	
Scenario type	Cleaning and washing	All-purpose cleaning spray		-
	Spray scenario	Exposure duration	60	±50%
		Density aerosol particle	4.5	-80%~default
Diameter distribution	Monodisperse	Weight fraction nano material in aerosol particle	1	-90%~default
		Aerosol diameter (mass median)	15.1	15.1
	Log normal	Aerosol diameter (mass median)	15.1	15.1
		Arithmetic coefficient of variation	1.2	1.2
		Maximum aerosol diameter	10	10
Exposure Pattern	Single event	Simulation duration	S	S
		ICRP: Male (light exercise)	S	S
	Deposition model	ICRP: Female (light exercise)	S	S
		Inhalation rate	1.4	1.4
	Exposure frequency unit	Per day	S	S
		Per week	S	S
		Per month	S	S
		Per year	1	12
		Simulation duration	365	365
		ICRP: Male (light exercise)	S	S
	Deposition model	ICRP: Female (light exercise)	S	S
		Inhalation rate	1.4	1.4

* 「-」は入力が必要な値
* 「S」は画面上に候補が表示される

表 2. ConsExpo-nano の出力パラメータ

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

表 3. ConsExpo-nano でのケーススタディに用いた入力パラメータ

Variable	Unit		
Cleaning and washing	All-purpose cleaning spray	-	
Scenario type	Spray scenario	-	
Aerosol	Exposure duration	138.3 min	
	Density aerosol particle	4.5 g/cm ³	
	Log normal	Weight fraction nano material in aerosol particle	1
		Aerosol diameter (mass median)	7.7 μm
		Arithmetic coefficient of variation	1.9
Maximum aerosol diameter	10 μm		
Spray	Mass generation rate	0.3625 g/s	
	Weight fraction nanomaterial in product	0.03	
Usage	Airborne fraction	1	
	Spray duration	8 s	
Room	Room volume	40 m ³	
	Room height	3 m	
	Ventilation rate	0.5 Per hour	
Nanomaterial	Density nanomaterial	4.5 g/cm ³	
	Monodisperse	-	
	sphere	Nano particle diameter	100 nm
Simulation	Single event	Simulation duration	365 day
	Deposition model	ICRP: Male (light exercise)	-
Inhalation rate	0.594 m ³ /h		

表 4. ConsExpo-nano での感度解析に用いた入力パラメータの基準値および範囲

Variable	Default	Range	Unit	
Cleaning and washing	All-purpose cleaning spray	-	-	
Scenario type	Spray scenario	-	-	
Aerosol	Exposure duration	60	±50%	
	Density aerosol particle	4.5	-80%~default	
	Log normal	Weight fraction nano material in aerosol particle	1	-90%~default
		Aerosol diameter (mass median)	2.4	±50%
		Arithmetic coefficient of variation	0.37	±50%
Maximum aerosol diameter	10	-90%~default		
Spray	Mass generation rate	1.6	±50%	
	Weight fraction nanomaterial in product	0.03	±50%	
Usage	Airborne fraction	0.006	±50%	
	Spray duration	13.8	±50%	
Room	Room volume	15	±50%	
	Room height	2.5	±50%	
	Ventilation rate	2.5	±50%	
Nanomaterial	Density nanomaterial	4.5	±50%	
	Monodisperse	-	-	
Simulation	sphere	Nano particle diameter	100 nm	
	Single event	Simulation duration	365 day	
	Deposition model	ICRP: Male (light exercise)	-	
Inhalation rate	1.4	±50%		

図 1. パラメータの入力画面

Distributions

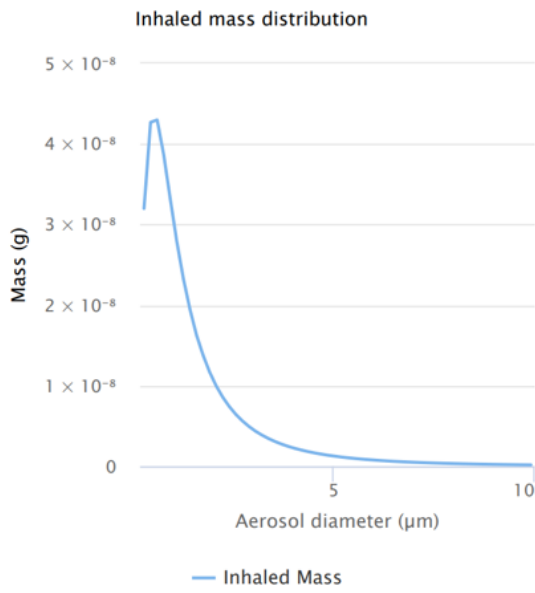


図2. ナノマテリアルの粒径ごとの曝露量

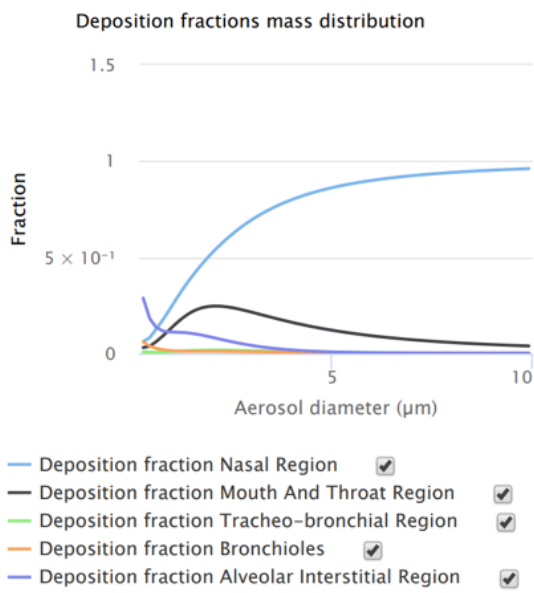


図3. ナノマテリアルの粒径ごとの沈着部位別の沈着比率

Deposited mass distribution

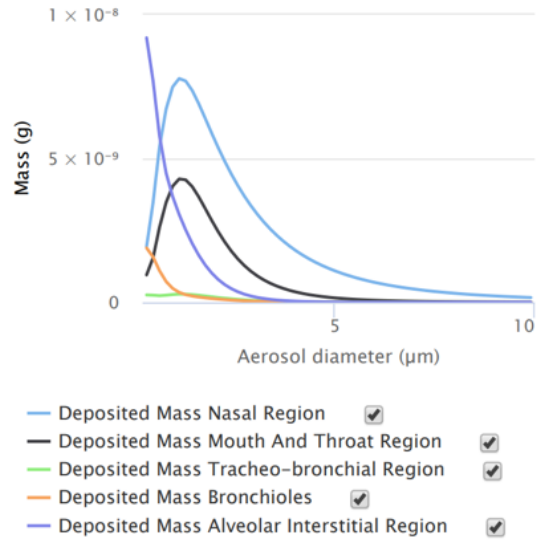


図4. ナノマテリアルの粒径ごとの沈着部位別の沈着量

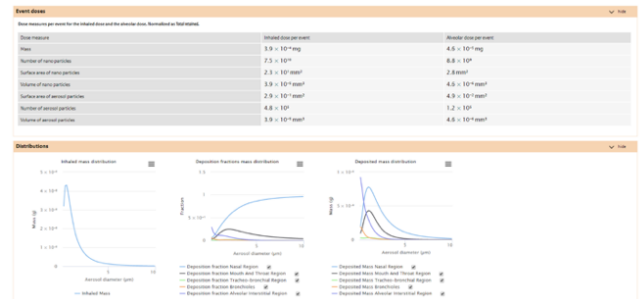


図5. スプレー型の消費者製品を使用した際のナノマテリアルの曝露量の推定結果の例

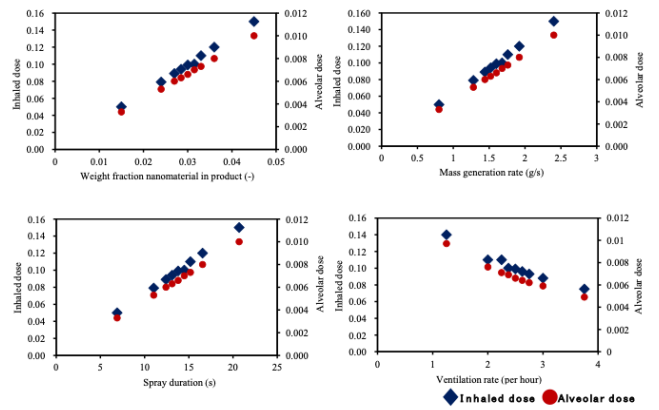


図6. 曝露量と線形関係にあったパラメータ

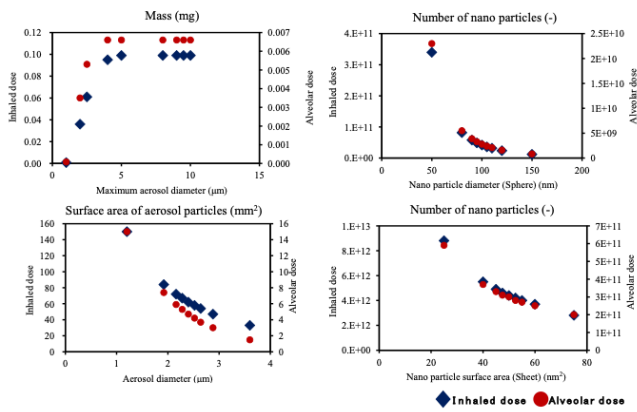


図7. 曝露量と非線形関係にあったパラメータ

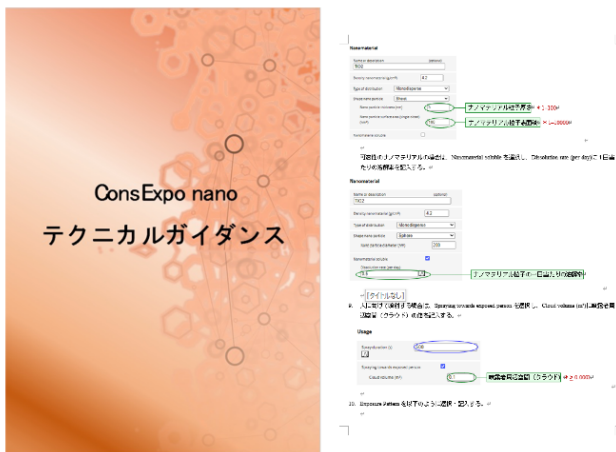


図8. テクニカルガイダンス

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> , Kato N, Kato M, Ishikawa K.	Impacts of channel direction on bone tissue engineering in 3D-printed carbonate apatite scaffolds.	Mater Des,		DOI: 10.1016/j.matdes. 2021.109686.	2021
Sakemi Y, <u>Hayashi K.</u> , Akira Tsuchiya A, Nakashima Y, Ishikawa K.	Reconstruction of critical-size segmental defects in rat femurs using carbonate apatite honeycomb scaffolds.	J Biomed Mater Res A		DOI: 10.1002/jbm.a.37157.	2021
<u>Hayashi K.</u> , Ishikawa K.	Honeycomb scaffolds fabricated using extrusion molding and sphere packing theory for bone regeneration.	ACS Appl Bio Mater	4(1)	721-730	2021
Kim H, Röth D, Isoe Y, <u>Hayashi K.</u> , Mochizuki C, Markus K, Nakamura M.	Protein corona components of polyethylene glycol-conjugated organosilica nanoparticles modulates macrophage uptake.	Colloids Surf B Biointerfaces	199	111527	2021
<u>Hayashi K.</u> , Ishikawa K.	Effects of nanopores on the mechanical strength, osteoclastogenesis, and osteogenesis in honeycomb scaffolds.	J Mater Chem B	8(37)	8536-8545	2020
Nakamura M, <u>Hayashi K.</u>	Near-infrared fluorescent thiol-	Chem Mater	32(17)	7201-7214	2020

Nakamura J, Mochizuki C, Murakami T, Miki H, Ozaki S, Abe M.	organosilica nanoparticles that are functionalized with IR-820 and their applications for long-term imaging of in situ labeled cells and depth-dependent tumor in vivo imaging.				
Putri TS, <u>Hayashi K</u> , Ishikawa K.	Fabrication of three-dimensional interconnected porous blocks composed of robust carbonate apatite frameworks.	Ceram Int	46(12)	20045-20049	2020
<u>Hayashi K</u> , Tokuda A, Nakamura J, Sugawara- Narutaki A, Ohtsuki C.	Tearable and fillable composite sponges capable of heat generation and drug release in response to alternating magnetic field.	Mater	13(16)	3637	2020
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	46(11)	17881-17890	2020
<u>Hayashi K</u> , Munar ML, Ishikawa K.	Effects of macropore size in carbonate apatite honeycomb scaffolds on bone regeneration.	Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl	111	110848	2020
Yamakawa D,	Primary cilia	Cell Res	34(10)	108817	2021

Katoh D, Kasahara K, Shiromizu T, Matsuyama M, Matsuda C, Maeo Y, <u>Watanabe M</u> , Inagaki M.	dependent-lipid rafts/caveolin dynamics regulate adipogenesis.				
<u>Totsuka Y</u> , <u>Watanabe M</u> , Lin Y.	New horizons of DNA adductor for exploring environmental causes of cancer.	Cancer Sci	112(1)	7-15	2021
Kajiwara S, Ishii K, Sasaki T, Kato M, Nishikawa K, Kanda H, Arima K, <u>Watanabe M</u> , Sugimura Y.	Castration-induced stromal remodeling disrupts the reconstituted prostate epithelial structure.	Lab Invest	100(5)	670-681	2020
Yamamoto N, Eguchi A, Hirokawa Y, Ogura S, Sugimoto K, Iwase M, <u>Watanabe M</u> , Takei Y.	Expression pattern of PLXDC2 in human hepatocellular carcinoma.	Monoclon Antib Immunodiagn Immunother	39(2)	57-60	2020
Mahmud MRA, Ishii K, Bernal- Lozano C, Delgado-Sainz I, Toi M, Akamatsu S, Fukumoto M,	TDP2 suppresses genomic instability induced by androgens in the epithelial cells of prostate glands.	Genes to Cells	00	1-16	2020

<u>Watanabe M</u> , Takeda S, Cortes-Ledesma F, Sasanuma H.					
Sonoda Y, Sasaki Y, Gunji A, Shirai H, Araki T, Imamichi S, Onodera T, Rydén AM, <u>Watanabe M</u> , Itami J, Honda T, Ashizawa K, Nakao K, Masutani M.	Reduced tumorigenicity of mouse ES cells and the augmented anti- tumor therapeutic effects under Parg deficiency.	Cancers	12(4)	1056	2020
Mizutani K, Shirakami E, Ichishi M, Matsushima Y, Umaoka A, Okada K, Yamaguchi Y, <u>Watanabe M</u> , Morita E, Yamanaka K.	Long-lasting severe dermatitis affect visceral adipose tissue via skin-derived inflammatory cytokines.	Int J Med Sci	21	3367	2020
Kanayama K, Imai H, Usugi E, Matsuda C, Ichishi M, Hirokawa Y, <u>Watanabe M</u> .	Cancer-related gene mutations and intratumoral genetic heterogeneity in human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneous gastric	Pathol Int	70(11)	865-870	2020

	cancer.				
Hirokawa YS, Kanayama K, Kagaya M, Shimojo N, Uchida K, Imai H, Ishii K, <u>Watanabe M.</u>	SOX11-induced decrease in vimentin and an increase in prostate cancer cell migration attributed to cofilin activity.	Exp Mol Pathol	117	104642	2020
Wakai E, Suzumura Y, Ikemura K, Mizuno T, <u>Watanabe M.</u> Takeuchi K, Nishimura Y.	An integrated in silico and in vivo approach identifies protective effects of palonosetron in cisplatin-induced nephrotoxicity.	Pharmaceuticals	13	480	2020
Lu KT, Yamamoto T, McDonald D, Li W, Tan M, Moi ML, Park EC, Yoshimatsu K, Ricciardone M, Hildesheim A, <u>Totsuka Y.</u> Nanbo A, Putcharoen O, Suwanpimolkul G, Jantarabekkul W, Paitoonpong L, Handley G, K. Bernabe G, Noda	U.S.-Japan cooperative medical sciences program: 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim.	Virol	555	71-77	2021

M, Sonoda M, Brennan P, Griffin DE,, Kurane I.					
<u>Totsuka Y</u> , Maesako Y, Ono H, Nagai M, Kato M, Gi M, Wanibuchi H, Fukushima S, Shiizaki S, Nakagama H.	Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1,4-dioxane.	Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci	96	180-187	2020
Tajima Y, Toyoda T, Hirayama Y, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, <u>Totsuka Y</u> , Wakabayashi K, Miyoshi N.	Novel <i>o</i> -Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis.	Chem Res Toxicol	33	1907-1914	2020
Kawanishi M, Yoneda R, <u>Totsuka Y</u> , Yagi T.	Genotoxicity of micro- and nano-particles of kaolin in human primary dermal keratinocytes and fibroblasts.	Genes Environ	42	16	2020
Mimaki S, Watanabe M, Kinoshita M, Yamashita R,	Multifocal origin of occupational cholangiocarcinoma revealed by comparison	Carcinogenesis	41	368-376	2020

Haeno H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, <u>Totsuka Y</u> , Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Nakamori S, Kubo S, Tsuchihara K.	of multilesion mutational profiles.				
Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kannno J, Hirose A, <u>Nakae D</u> .	Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins.	Cancer Sci		doi: 10.1111/cas .14873	2021
Chinnathambi S, <u>Hanagata N</u> , Yamazaki T, Shirahata N.	Nano-Bio Interaction between Blood Plasma Proteins and Water- Soluble Silicon Quantum Dots with Enabled Cellular Uptake and Minimal Cytotoxicity. Nanomaterials.	Nanomaterials	10(11)	2250	2020

令和3年2月16日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学

所属研究機関長 職名 総長

氏名 石橋 達

次の職員の令和2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用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 幸彦朗・ハヤシ コウイチロウ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、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 3 年 5 月 27 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人三重大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 伊藤 正明

次の職員の令和 2 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)

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 (厚生労働省) に準拠して行った

(※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3年 4月 1日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立研究開発法人国立がん研究センター

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 中釜 斉

次の職員の令和2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) 研究所がんモデル開発部門・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 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3年 4月 1日

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 江口 文陽

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

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

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和 3 年 4 月 15 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 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2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) 国立研究開発法人物質・材料研究機構技術開発・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。

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸

次の職員の令和2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3年4月8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 尾池 和夫

次の職員の令和2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。