

## 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 幸彦朗 九州大学大学院歯学研究院 准教授

### 研究協力者：

煙山 紀子 東京農業大学応用生物学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。

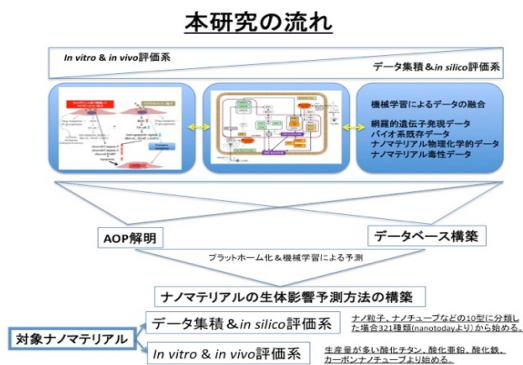


図 1. 本研究の流れ

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  $1 \times 10^6$  cell/well 及び  $5 \times 10^5$  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。

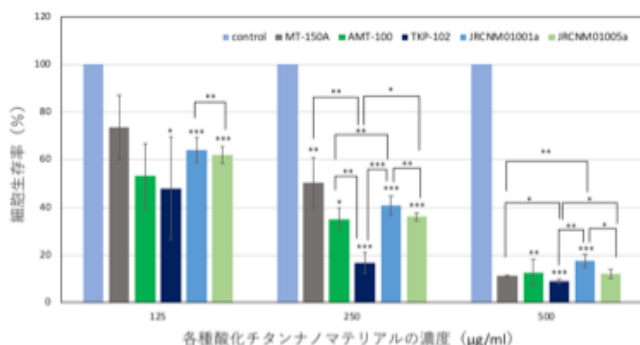


図2. 各種酸化チタンナノ粒子のRAW264に対する細胞毒性

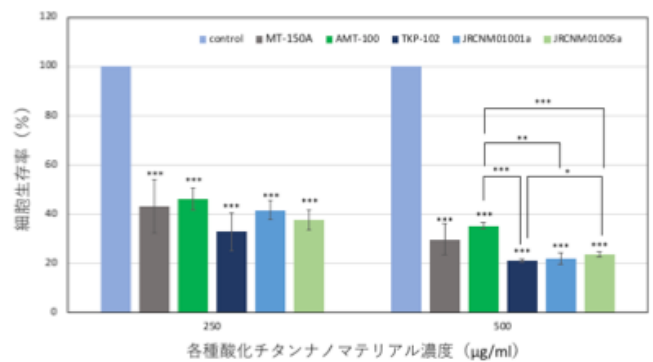


図3. 各種酸化チタンナノ粒子のGDL1に対する細胞毒性

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  $4^\circ\text{C}$ 、10000 rpm、10 min で遠心分離をし、上清と沈殿に分けた。沈殿したBMSC-5は超純水で再懸濁して遺伝毒性試験に供した。GDL1細胞を播種して24時間培養した後、ThinCert<sup>TM</sup> (pore size; 0.4  $\mu\text{m}$ 、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 $\lambda\text{EG10}$ をファージ粒子として回収した。回収したファージをCre組替え酵素発現している大腸菌YG6020株に感染させると、 $\lambda\text{EG10}$ 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  $37^\circ\text{C}$  で培養すると、プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TGを含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cmを含むM9寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出する。

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ない結果もあり、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  $\text{TiO}_2$  の希釈系列を作製した。

① 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の  $\text{TiO}_2$  を作製のため 15 mL チューブに 20 mg の  $\text{TiO}_2$  を量り 5 mL のメディウムに溶かした。

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

③  $\text{TiO}_2$  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  $\mu\text{L}$  で播種した。播種して 24 時間後に、すべての well の上清を 50  $\mu\text{L}$  抜いて、希釈系列  $\text{TiO}_2$  溶液を 50  $\mu\text{L}$  添加し計 100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\text{TiO}_2$ +メディウム+CCK8 : Blank

② メディウム+Cells+CCK8 : Control

③  $\text{TiO}_2$ +メディウム+Cells+CCK8 : Sample

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

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	曝露時間 (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 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs) の細胞への影響解析 (渡邊・林・花方) :** 酸化鉄ナノ粒子 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-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 (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-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。

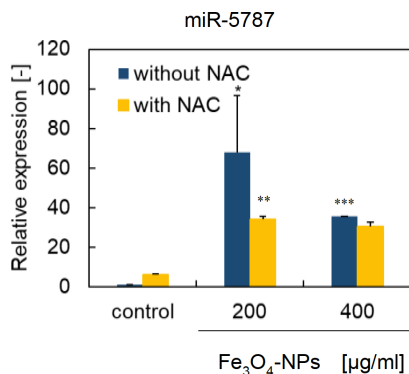


図 4. 磁性体ナノ粒子曝露による miR-5787 発現量変化

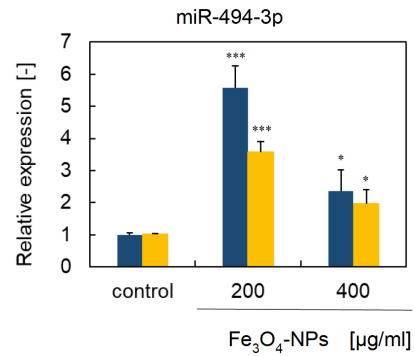


図 5. 磁性体ナノ粒子曝露による miR-494-3p 発現量変化

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。

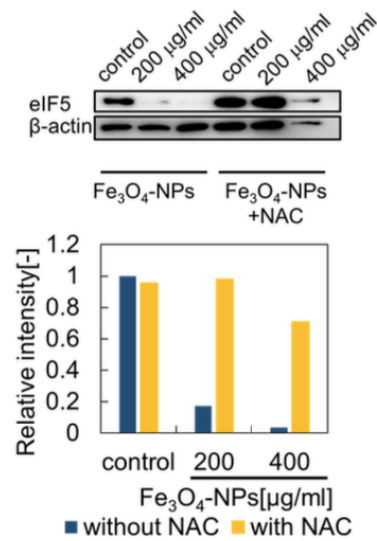


図 6. 酸化鉄ナノ粒子曝露後の eIF5 の発現

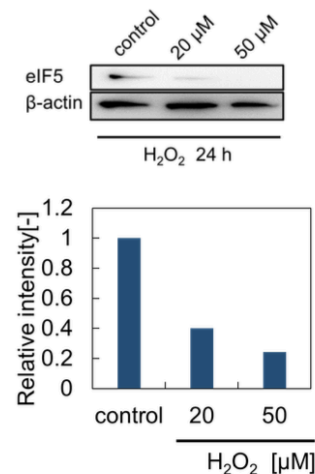


図 7. 過酸化水素曝露時の eIF5 タンパク質発現

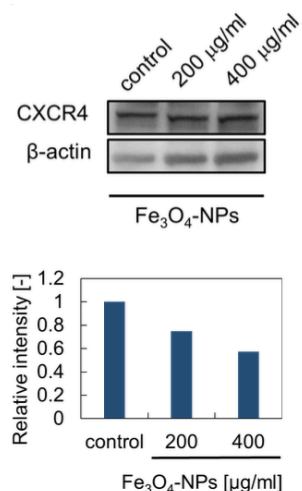


図 8. 磁性体ナノ粒子暴露時の CXCR4 タンパク質発現

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)。

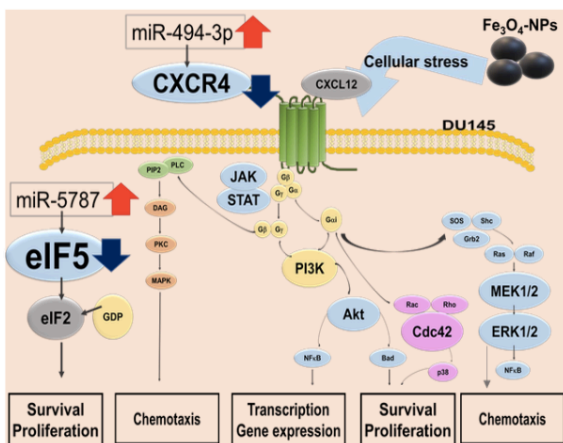


図9. まとめ

### 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)。

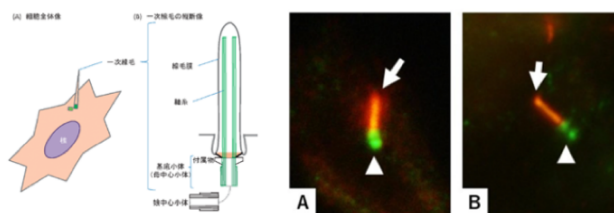


図10. 一次線毛について

### 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/cm<sup>3</sup>) 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/cm<sup>3</sup>)、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 (nm<sup>2</sup>) 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。

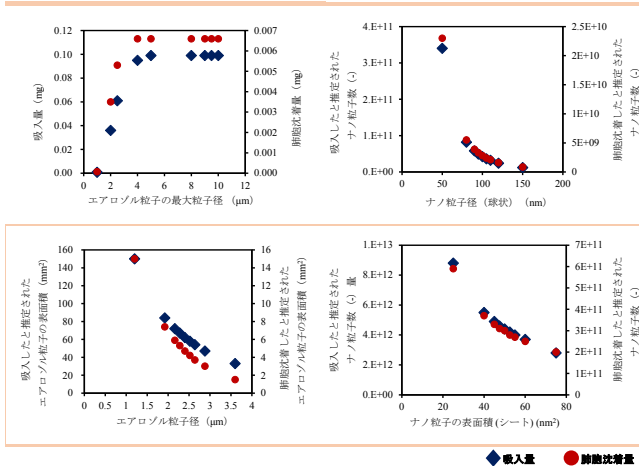


図 11. 非線形関係にあった入力パラメータと推定された曝露量の感度解析の結果

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。

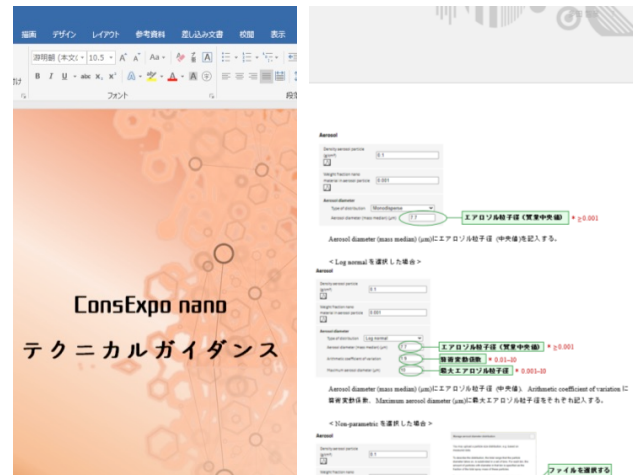


図 12. ConsExpo-nano テクニカルガイドランス

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 (TiO<sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> , %)
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) : 粒子体浸透速度測定、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 <sub>2</sub> (%) (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 <sup>2</sup> /g) (括弧内はdata-sheetの値)	BET	109	35	325(280)	109(110)	55(62)
micropore distribution (細孔容積 cm <sup>3</sup> /g)	BET	0.44	-	0.36	0.32	0.24
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 (R<sup>2</sup>=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。

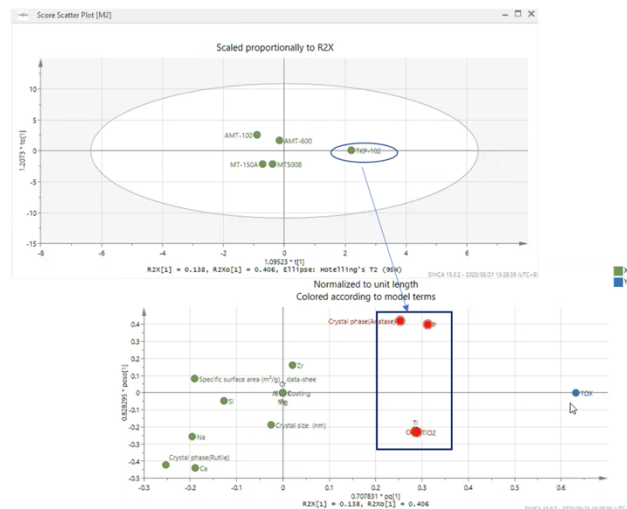


図 13. 物性と細胞毒性試験と物性との多変量解析 (OPLS 解析)

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 (EC<sub>50</sub> 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, TiO<sub>2</sub>-1001, TiO<sub>2</sub>-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, TiO<sub>2</sub>-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, TiO<sub>2</sub>-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。

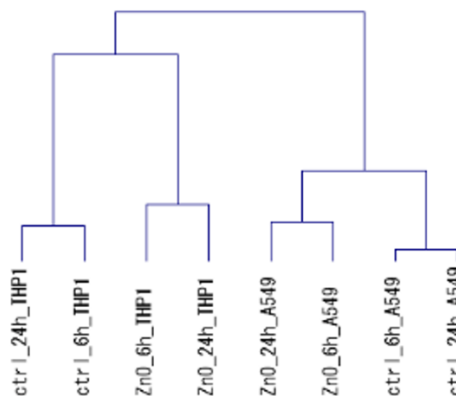




図 14. 階層的クラスタリング

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(TiO<sub>2</sub> 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。

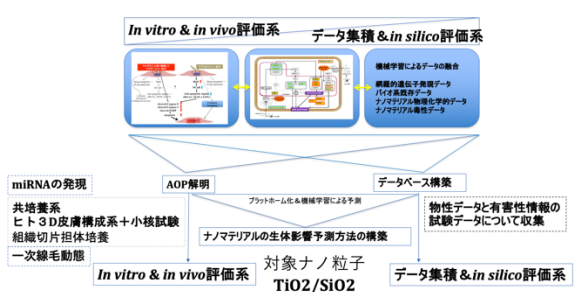


図15 本研究のまとめ

(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, 260<sup>th</sup> 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, 260<sup>th</sup> 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 60<sup>th</sup> 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.