

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

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

ナノマテリアルによる DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築  
共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築

研究分担者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所 発がん・予防研究分野 ユニット長

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、DNA 付加体の網羅的解析手法(DNA アダクトーム法)の構築に取り組んできた。これまでに、分析手法の構築や付加体同定に用いるデータベースの構築等を行い、ナノマグネタイトの遺伝毒性評価を *in vivo* モデルを用いて行ったところ、マグネタイト(MGT)を気管内投与したマウス肺で酸化ストレスや炎症に由来する DNA 付加体がスクリーニングされた。

このことから、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムの一部には、マクロファージ等を介した炎症反応が関与することが示唆された。そこで、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うため、*gpt delta* マウスより樹立した細胞株(GDL1 細胞)とマクロファージ由来培養細胞(RAW264.7)を共培養し、MGT の変異原性に対するマクロファージの影響を検討した。MGT 曝露群では、マクロファージの共存下において、GDL1 細胞の突然変異頻度の増加が観察された。更に各種ナノマテリアルによる変異パターンを解析したところ、共培養系で観察されたパターンは、単独培養で観察されたパターンと異なり、ナノマテリアルを気管内投与したマウス肺に観察された変異パターンと類似することがわかった。現在、これら試験系を用いて、金属ナノ粒子の毒性評価を行う準備をしている。

## A . 研究目的

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

一方、ナノマテリアルの気道毒性の *in vitro* リス

ク評価は主として肺胞上皮由来細胞を単独で用いた系で為されているが、当該毒性の発現機構には肺胞マクロファージによる貪食と液性因子放出が関与することが示唆されている。そこで、我々は、生体を模倣した新規 *in vitro* 試験系の構築が必要であると考え、マクロファージ様細胞と肺由来の細胞の共培養系を利用して、新しい *in vitro* 気道毒性試験系を開発することを試みた。

## B . 研究方法

ナノマテリアルによる DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築  
マグネタイト(MGT, 0.05% Tween20 に懸濁)を経気道的に ICR マウス(オス、7 週齢)に曝露した。その際、同時に 0.05% Tween20 のみを投与したマウスを準備しコントロールとした。投与から 24 時間後に屠殺し、肺を摘出した。肺から DNaseI、ヌクレアーゼ P1、アルカリホスファターゼ、ホス

ホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、水-メタノールの溶媒系を用い LC-QToF-MS で DNA 付加体を網羅的に分析した。得られたデータの主成分解析から複数の付加体が MGT 投与群に特徴的なものとしてスクリーニングされた。これら付加体の同定は既に構築済みの DNA 付加体リストとの比較により行った。

共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築

GDL1 細胞を播種して 24 時間培養した後、ThinCert™ (pore size; 0.4 μm, high density: greiner bio-one) を各 well に入れ、インサート内に RAW264 を播種し、24 時間培養した。MGT を曝露させた後にトリプシン処理により GDL1 を回収し、突然変異の解析に供した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

### C. 研究結果

ナノマテリアルによる DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築

MGT をマウスに経気道曝露し、投与後 24 時間後に肺を摘出し DNA を抽出後、HPLC-QToF-MS を用いて DNA 付加体を分析した。その結果、vehicle 投与群と比べて、MGT 投与群においてより多くの DNA 付加体が生成されていた (図 1)。PCA 解析の結果、幾つかの付加体が MGT 投与に特徴的なものとしてスクリーニングされた (図 2)。これら付加体の m/z 値を既知の DNA 付加体の標品と比較したところ、酸化ストレス及び炎症由来の付加体であるエテノ-dC (εdC) などであることが示唆された (表 1)。

共培養系を用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築

GDL1 と RAW264 を共培養し、MGT を GDL1 または RAW264 のみ、及び両細胞に 24 時間曝露した後、*gpt* 遺伝子における変異原性について評価した。その結果、MGT を RAW264 のみ及び GDL1 と RAW264 の両方に曝露させた時の変異頻度が、MGT を GDL1 のみに曝露させた変異頻度と比べ優位に上昇することがわかった (図 3)。さらに、MGT による変異スペクトラムの解析を行ったところ、MGT を両細胞に曝露させた場合のスペクトルは、それぞれの細胞単独で曝露させた場合とは異なり、MGT を *gpt* delta マウスに気管内投与した場合の肺における変異スペクトルに近くなることがわかった (図 3)。

### D. 考察

MGT を投与したマウスの肺から DNA を抽出し、アダクトーム法を用いて DNA 付加体の網羅的な解析を行なったところ、炎症及び酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。よって MGT 投与により、マウス肺に炎症及び酸化ストレスが誘

発され、これにより変異原性が誘発されることが推測された。このようなナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた *in vitro* 遺伝毒性評価法として、マウス肺由来の GDL1 細胞とマクロファージ様の RAW264 を共培養する系を考えた。本手法を用いて MGT の変異原性を評価してみたところ、変異頻度は RAW264 細胞の共存下で上昇することがわかった。変異スペクトル解析の結果、MGT の各細胞単独の曝露の場合と比べ、両細胞に曝露した場合に *in vivo* におけるパターンと類似することがわかった。これらのことから、*in vitro* 共培養系を用いた遺伝毒性評価は生体を模倣した新たな遺伝毒性評価システムとして、ナノマテリアルなどの化学物質の毒性評価に有用であることが示唆された。現在、これら試験系を用いて、金属ナノ粒子の毒性評価を行う準備をしている。

図 1 MGT 投与群及びコントロール群の DNA 付加体マップ

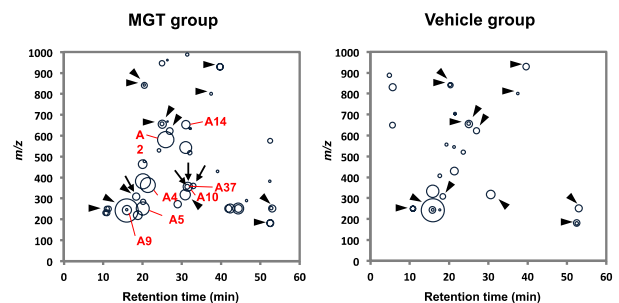


図 2 PCA 解析の結果

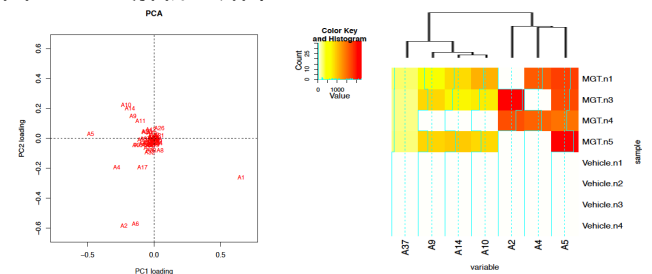
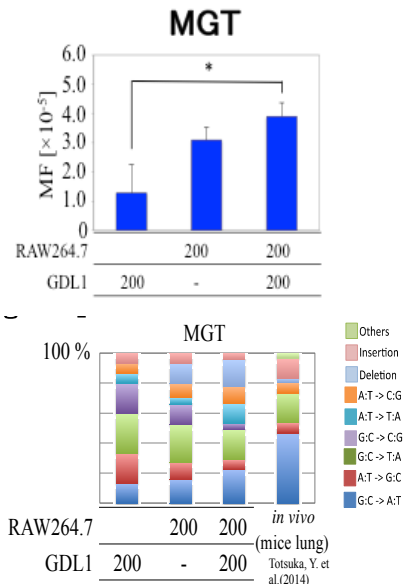
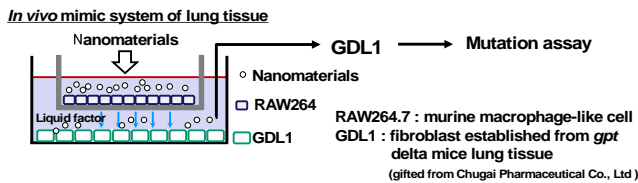


表 1 MGT 曝露に特徴的な付加体としてスクリーニングされたもの

| Adducts | M/Z [M+H] | Comparing with DNA adduct database [M+H]       | Derivation   |
|---------|-----------|--|--|
| A2      | 580.79    | Unknown  |  |
| A4      | 363.17    | βedA [363.1816 (+NH <sub>3</sub> )]            | Lipid peroxidation (4-OHE), inflammation-related adduct  |
| A5      | 252.11    | εdC [252.0984]                                 | Lipid peroxidation (4-hydroperoxy-2-nonenal), inflammation-related adduct Induce C to T transition |
| A9      | 243.12    | dT [243.0981], N <sup>3</sup> -MedC [243.1213] | 5-mdC deamination (dT), Alkylating agent (MNU)   |
| A10     | 355.23    | Unknown adduct in model reaction [355.23]      | DNA oxidation  |
| A14     | 652.37    | Unknown  |  |
| A37     | 356.24    | Unknown adduct in model reaction [356.24]      | DNA oxidation  |

図 3 共培養系を用いた MGT の遺伝毒性評価系



## E. 結論

MGTを投与したマウスの肺からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅的な解析を行なったところ、炎症及び酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。よってMGT投与により、マウス肺に炎症及び酸化ストレスが誘発され、これにより変異原性が誘発されることが推測された。ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた*in vitro*遺伝毒性評価法として、マウス肺由来のGDL1細胞とマクロファージ様のRAW264を共培養する系を用いてMGTの変異原性を評価してみたところ、変異頻度はRAW264細胞の共存下で上昇することがわかった。変異スペクトル解析の結果、MGTの各細胞単独の曝露の場合と比べ、両細胞に曝露した場合に*in vivo*におけるパターンと類似することがわかった。これらのことから、*in vitro*共培養系を用いた遺伝毒性評価は生体を模倣した新たな遺伝毒性評価システムとして、ナノマテリアルなどの化学物質の毒性評価に有用であることが示唆された。現在、これら試験系を用いて、金属ナノ粒子の毒性評価を行う準備をしている。

今後さらに、本解析の妥当性を検討するとともに、形状やサイズの異なるナノマテリアルや様々な表面修飾を施したナノマテリアルの毒性評価を行なうことで、有用なナノマテリアルのリスク低減化を検討する。

## F. 健康危険情報

特になし。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- K. Ishino, T. Kato, M. Kato, T. Shibata, M. Watanabe, K. Wakabayashi, H. Nakagama, Y. Totsuka. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(2), 3474-92.
- M. Komiya, G. Fujii, S. Miyamoto, M. Takahashi, R. Ishigamori, W. Onuma, K. Ishino, Y. Totsuka, K. Fujimoto, M. Mutoh. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and *Apc* mutant Min mice. *Cancer Sci.*, 2015, 106(11), 1499-1505.

### 2. 学会発表

- 戸塚ゆ加里、中釜 斉：質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明  
第42回日本毒性学会学術大会. 2015年7月
- Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama : Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis)日本癌学会学術総会. 2015年10月
- 戸塚ゆ加里：ゲノム解析およびDNA付加体の網羅的解析による発がん要因の探索、第44回日本環境変異原学会. 2015年12月
- 秋場 望、椎崎一宏、遠藤 治、三牧幸代、土原一哉、中釜 斉、戸塚ゆ加里：職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響、第44回日本環境変異原学会. 2015年12月

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし