

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

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
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

研究代表者 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

昨年度より、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた *in vitro* 毒性評価システム確立の検討を行っており、肺の遺伝毒性評価系として共培養システムを構築した。今年度は、この評価系の妥当性について、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を用いて検証した。また、毒性の低減化も考慮して、繊維長の違いの状態が遺伝毒性に対する影響についても観察した。繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-S 及び MWCNT-L)を *gpt delta mouse* に気管内反復投与し、肺における点突然変異の解析をおこなった結果、コントロールと比較して両 MWCNT ともに変異頻度の上昇が観察されたものの、繊維長の違いによる変異頻度への影響は観察されなかった。同じ MWCNT を用いて行った、共培養系による *in vitro* 試験系でも、MWCNT の曝露による変異頻度の上昇は観察されたが、繊維長の違いによる変異頻度の影響は観察されず、*in vivo* 変異原性試験の結果を支持するものとなった。更に、変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MWCNT により誘発される変異スペクトルの解析を試みた。何の MWCNT 投与でも G:C→A:T 変異が増加しており、繊維長の違いによる変異スペクトルの影響は殆どないものと思われた。これらのことから、共培養システムは、生体を模倣する試験系として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、表面修飾の異なる金属ナノ粒子の毒性評価を行っている。

A. 研究目的

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

一方、ナノマテリアルの気道毒性の *in vitro* リスク評価は主として肺胞上皮由来細胞を単独で用いた系で為されているが、当該毒性の発現機構には肺胞マクロファージによる貪食と液性因子放出が関与することが示唆されている。そこで、我々は、生体を模倣した新規 *in vitro* 試験系の構築が必要

であると考え、マクロファージ様細胞と肺由来の細胞の共培養系を利用して、新しい *in vitro* 気道毒性試験系を開発することを試みている。本年度は、毒性の低減化も考慮して、繊維長の違いが遺伝特性に対する影響について観察した。

B. 研究方法

in vivo 遺伝毒性試験法

10 週齢の雄性 *gpt delta* マウスに、繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-L; 85~200 nm, MWCNT-S; 40~70 nm)を 2%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水に懸濁し、0.2 mg/body の用量で気管内反復投与（1 回/週 x 4 週）を行った。最終投与 2 ヶ月後にマウスを屠殺後、肺を摘出し、突然変異の解析に用いた。*gpt* 遺伝子解析は、ゲノム DNA を抽出して行った。

共培養システムによる遺伝毒性試験法

GDL1 細胞を播種して 24 時間培養した後、ThinCert™ (pore size; 0.4 μm, high density; greiner bio-one) を各 well に入れ、インサー

ト内に RAW264 を播種し、24 時間培養した。MWCNT-L 及び MWCNT-S 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突然変異の解析に供した。

gpt 遺伝子を指標とした変異原性試験気管内投与及び共培養系において、ナノマテリアルを曝露した組織、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 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

in vivo 遺伝毒性試験法

繊維長の異なる MWCNT の遺伝毒性を *in vivo* 及び *in vitro* 共培養系で評価し、得られた遺伝毒性の結果を比較した。まず *in vivo* 遺伝毒性試験から検討を行った。MWCNT-L 及び MWCNT-S を *gpt* delta mouse に気管内反復投与し、肺における点突然変異の解析をおこなった。解析の結果、MWCNT 投与により肺の変異頻度は溶媒対象群(2% CMC)に比べて約 3~4 倍に上昇したが、繊維長の違いによる変異頻度に対する影響は観察されなかった(図 1)。次に、繊維長の異なる MWCNT による変異パターンを解析した。まだ、変異クローンの解析数が少ないが、コントロールの変異パターンと比較

して、MWCNT 投与により G:C→A:T 変異が上昇する傾向が観察された。また、変異頻度と同様に、繊維長の違いによる変異スペクトルへの影響はほとんど観察されなかった(図 2)。

共培養システムによる遺伝毒性試験法

共培養条件下の RAW 細胞または RAW 及び GDL1 の両細胞に繊維長の異なる MWCNT を 24 時間曝露し、6~7 日間培養した後、GDL1 細胞から DNA を抽出し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。MWCNT の RAW のみ、及び RAW と GDL1 の両細胞への曝露群ともに、コントロールと比較して変異頻度の上昇傾向が観察された。また、この時に観察された変異頻度に対して、MWCNT の繊維長の違いは影響していないことがわかった(図 2)。

D . 考察

昨年度、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた肺の遺伝毒性評価系として共培養システムを構築した。今年度は、この評価系を用い、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の遺伝毒性に対する繊維長の影響を観察した。

繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-S 及び MWCNT-L) を *gpt* delta mouse に気管内反復投与し、肺における点突然変異の解析をおこなった結果、コントロールと比較して両 MWCNT ともに変異頻度の上昇が観察されたものの、繊維長の違いによる変異頻度への影響は観察されなかった。同じ MWCNT を用いて行った、共培養系による *in vitro* 試験系でも、MWCNT の曝露による変異頻度の上昇は観察されたが、繊維長の違いによる変異頻度の影響は観察されず、*in vivo* 変異原性試験の結果をサポートするものとなった。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MWCNT により誘発される変異スペクトルの解析を試みた。現在のところ、*in vivo* 試験で得られた一部の変異クローンの解析データのみではあるが、何の MWCNT 投与でも G:C→A:T 変異が増加しており、繊維長の違いによる変異スペクトルの影響は殆どないものと思われた。(一部 A:T→T:A 変異が MWCNT-L で増加しているように思われるが、解析サンプル数が少なく、まだ結論できない。さらに解析数を追加し

て検討する必要がある)我々の以前の報告によると、本研究で用いたものとは異なるMWCNT (MWCNT-7)を用いて行った*in vivo*遺伝毒性試験の結果では、MWCNT-7投与により、マウス肺ではG:C→C:G変異が上昇したことを見出している。このことは、変異誘発のメカニズムがMWCNT-7と本研究で用いたMWCNT-S/-Lでは異なる可能性が考えられる。その要因にはどのようなメカニズムが存在し、こういった物理的な性質が寄与するのかについてはまだよくわかっていない。おそらく、細胞内への取り込みやROS産生能などを介したものと推測されるので、今後は、これらの点についても検討を行う必要があると思われる。毒性誘発のメカニズムが明らかになれば、有用なナノ材料の毒性低減化方法の提言へとつながるとと思われる。

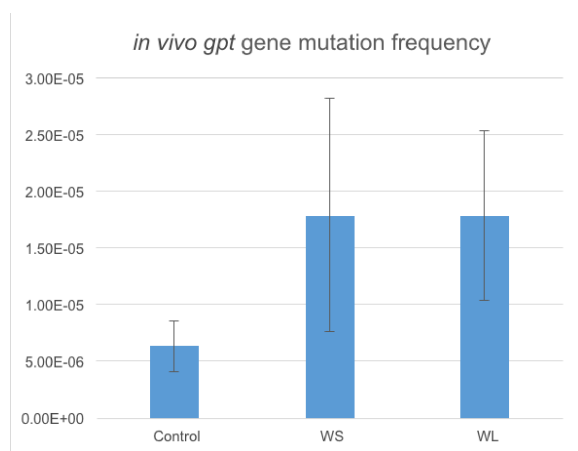


図1. 繊維長の異なるMWCNTの*in vivo*遺伝毒性

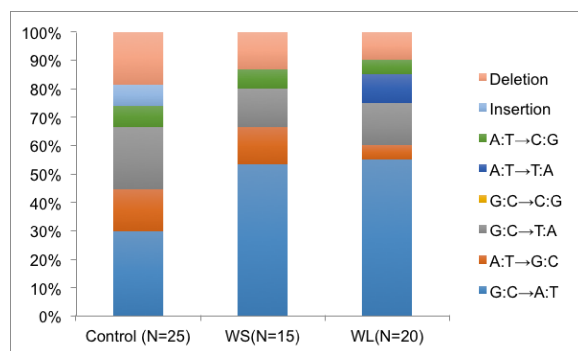


図2. gpt deltaマウス肺に観察された変異スペクトル

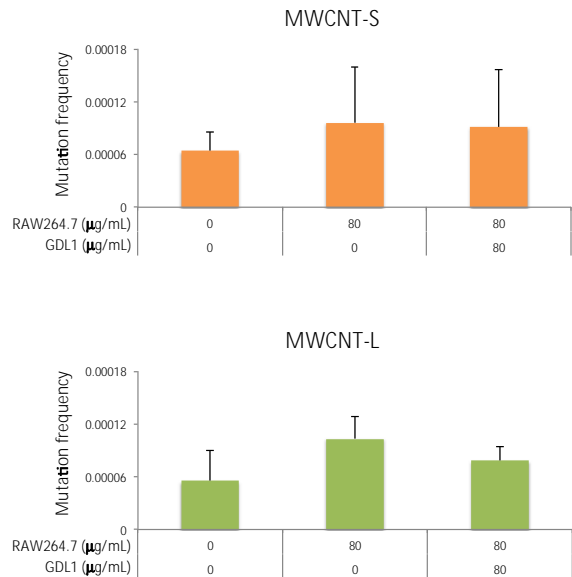


図3. 単培養及び共培養下にGDL1細胞に観察されたgpt変異頻度

E. 結論

昨年度までに肺毒性試験系として、マウス肺より樹立した細胞株(GDL1細胞)とマクロファージ(RAW264.7)を共培養システムの構築を行った。本年度は、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を用いて、本システムの妥当性の検証及び、毒性の低減化も考慮して、繊維長の違いに対する影響についても観察した。繊維長の異なるMWCNT (MWCNT-S及びMWCNT-L)をgpt delta マウスに気管内反復投与し、肺における点突然変異の解析をおこなった結果、コントロールと比較して両MWCNTともに変異頻度の上昇が観察されたものの、繊維長の違いによる変異頻度への影響は観察されなかった。同じMWCNTを用いて行った、共培養系による*in vitro*試験系でも、MWCNTの曝露による変異頻度の上昇は観察されたが、繊維長の違いによる変異頻度の影響は観察されず、*in vivo*変異原性試験の結果をサポートするものとなった。これらのことから、共培養システムは、生体を模倣する試験系として有用であることが示唆された。また、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材料や様々な表面修飾を施したナノ材料の毒性評価を行なうことで、有用なナノ材料のリスク低減化を検討する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) S. Mimaki, Y. Totsuka, Y. Suzuki, C. Nakai, M. Goto, M. Kojima, H. Arakawa, S. Takemura, S. Tanaka, S. Marubashi, T. Matsuda, T. Shibata, H. Nakagama, A. Ochiai, S. Kubo, S. Nakamori, H. Esumi, K. Tsuchihara. Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis* 2016, 37, 817-26.
- (2) T. Kato, T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, M. Watanabe, Y. Totsuka. Effect of physicochemical character differences on the genotoxic potency of Kaolin. *Genes Environ.*, 2017, 39, 12.

2. 学会発表

- (1) Y. Totsuka, Y. Lin, M. Kato, A. Elzawahry, Y. Totoki, T. Shibata, Y. Matsushima, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis). 50th Anniversary Conference IARC, Lyon, 2016年6月.
- (2) Y. Totsuka, M. Watanabe, K. Hayashi, D. Nakae. Development of a novel in vitro mechanism-based evaluation system of the genotoxicity of nanomaterials. 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society, Copenhagen, 2016年8月.
- (3) 戸塚ゆ加里, 林櫻松, 加藤護, 十時 泰, 柴田龍弘, 松島芳隆, 中釜斉. DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する. 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.
- (4) 伴野勸, 山地太樹, 岩崎基, 成島大智, 加藤護, 戸塚ゆ加里, 三好規之, 今井俊夫. 血漿中 cis-4-decenal の大腸がんリスクマーカーとしての可能性, 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.

- (5) 三牧幸代, 中森正二, 久保正二, 木下正彦, 戸塚ゆ加里, 中釜斉, 落合淳志, 江角浩安, 土原一哉. 職業性胆管がん1症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較, 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.
- (6) 戸塚ゆ加里. ゲノム解析およびDNA付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索. 第59回日本放射線影響学会, 広島, 2016年10月.
- (7) 前迫裕也, 善家茜, 古川英作, 加藤 護, 椎崎一宏, 中釜斉, 戸塚ゆ加里. 職業性胆管がん発生に關与する1,2-ジクロロプロパンのDNA付加体の網羅的な解析(アダクトーム解析), 第45回日本環境変異原学会, つくば, 2016年11月.
- (8) 戸塚ゆ加里, 善家茜, 古川英作, 加藤護, 十時泰, 柴田龍弘, 中釜斉. 次世代シーケンサーとDNAアダクトーム解析の統合による発がん要因の探索, 第45回日本環境変異原学会, つくば, 2016年11月.
- (9) Y. Totsuka, H. Sato, N. Akiba, D. Nakae, N. Suzui-Kemuriyama, M. Watanabe, K. Hayashi. Construction of novel *in vitro* evaluation systems based on the genotoxic mechanisms of nanomaterials. International Council of Chemical Associations' Long-Range Research Initiative (ICCA-LRI) and Japan's National Institute of Health Sciences (NIHS) International Workshop: Meeting the Global Challenge of Applying New Scientific Methods to Improve Environmental and Human Health Risk Assessments, 兵庫県淡路市, 2016年6月.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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