

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
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・予防研究分野 ユニット長

研究要旨：先行研究により、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた *in vitro* 毒性評価システム確立の検討を行っており、肺の遺伝毒性評価系として共培養システムを構築した。本研究では、この評価系の妥当性について、マグネタイトナノ粒子 (MGT)を用いて検証した。また、毒性の低減化も考慮して表面修飾の有無の状態が遺伝毒性に対する影響についても観察した。MGT の細胞毒性を調べた結果、GDL1 単培養では、MGT の表面修飾の有無に関わらず、いずれの濃度においても殆ど毒性を示さなかった。一方、RAW264.7 単培養では、表面修飾を有さない MGT(BMS-10)は 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で表面修飾を有する MGT(BMSC-5)は 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生存率が減少し、毒性が見られ、表面修飾の有無で毒性強度に差があることがわかった。次に RAW264.7 と GDL1 細胞を共培養し、BMSC-5 及び BMS-10 を両細胞に曝露し、誘発される変異頻度を解析した。その結果、MGT 曝露群では溶媒対照群と比較して変異頻度の増加が認められた。また、BMS-10 と比較して BMSC-5 の方が変異頻度が高い傾向が観察された。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 MGT により誘発される変異スペクトルの解析を試みた結果、両者では観察された変異スペクトルが大きく異なることがわかり、また BMSC-5 曝露群では酸化ストレス由来の変異が多く観察された。さらに、細胞への取り込みを観察した結果、BMSC-5 は BMS-10 よりも細胞内に取り込まれなかった。変異スペクトルから酸化ストレス由来の変異が観察されたため活性酸素種(ROS)の産生を評価した結果、BMSC-5 曝露で BMS-10 よりも強い ROS 産生の増加が確認された。さらに RAW264.7 における炎症性サイトカイン TNF- α 産生を定量した結果、BMSC-5 曝露で有意な増加が見られた。BMSC-5 曝露で細胞毒性や強い変異原性および ROS や炎症性サイトカインの増加が確認されたが、ポリアクリル酸修飾による MGT の特性の変化から貪食細胞に認識されにくくなり、細胞内に取り込まれないためポリアクリル酸修飾による影響が示唆された。さらに酸化ストレス由来の変異が確認されたことから Fenton 反応による影響も示唆された。そこで BMSC-5 液内の鉄イオン濃度を調べた結果、BMS-10 の 9 倍近い鉄イオンが検出された。これらの結果から鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと考えられた。今後は、鉄イオンの発生場所や鉄キレート剤を加えて毒性が軽減するのかを調べることで毒性原因を追求していく。また、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。

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。

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、マグネタイトナノ粒子 (MGT)を用いて検証した。また、毒性の低減化も考慮して表面修飾の有無の

状態が遺伝毒性に対する影響についても観察した。なお、本研究では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)を使用した。

B. 研究方法

1) 細胞毒性試験

96 well plate に GDL1 及び RAW264.7 を 1.0×10^4 cells/well 及び 4.0×10^4 cells/well で播種し、24 時間前培養した。各細胞に BMS-10 及び BMSC-5 を 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から 2 段階希釈で各 well に加え、24 時間曝露した後、培地を吸引除去し、基本培地を 100 μl 加えた。

2) 共培養システムによる遺伝毒性試験法

GDL1 細胞を播種して 24 時間培養した後、ThinCert™ (pore size; 0.4 μm , high density: greiner bio-one) を各 well に入れ、インサート内に RAW264 を播種し、24 時間培養した。BMSC-5 及び BMS-10 を RAW264 のみ、または RAW 264 と GDL1 の両方に 24 時間曝露させた後にトリプシン処理により GDL1 を回収し、一定期間培養した後細胞から 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 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、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。

3) ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み

6 well plate に GDL1 及び RAW264.7 を 1.0×10^6 cells/well 及び 2.0×10^6 cells/well で播種し、24 時間前培養した。各細胞に BMS-10 及び BMSC-5 を 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 24 時間曝露した後、トリプシン処理により細胞を回収し、1ml の PBS で再懸濁した後、10% ホルマリン溶液を入れ細胞固定を行なった。フローサイトメーター (FCM) を用いて、得られた細胞固定サンプルの解析を行った。

4) マグネタイトナノ粒子処理による活性酸素種 (ROS) 産生

6well plate に GDL1 及び RAW264.7 を 2.0×10^6 cells/well で播種し、24 時間前培養した。各細胞に BMS-10 及び BMSC-5 を 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 2 時間曝露し

た後、Lysis buffer を加え、セルスクレイパーで細胞を剥がし、1.5 ml チューブに移した。遠心分離を行い上清を新しいチューブに回収し、OxiSelect *in vitro* ROS/RNS assay kit を用い ROS 産生評価を行った。

5) RAW264 細胞へのマグネタイトナノ粒子処理による炎症性サイトカイン放出

6 well plate に RAW264.7 を 2.0×10^6 cells/well で播種し、24 時間前培養した。細胞に BMS-10 および BMSC-5 をそれぞれ 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 24 時間曝露した後、培養上清をチューブに移した。この上清をサンプル液とし、Quantikine Mouse TNF- α を用いて培養上清中の TNF- α を定量した。

6) Ferrozine assay を用いた培地中の鉄イオン濃度の定量

1.5 ml のエッペンチューブに DMEM を 1 ml 加え、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように各 MNPs を加え、vortex を用いてよく混合した。4 °C、10000 rpm、10 min で遠心分離をし、上清をアッセイ検体とした。Ferozine assay にて培地中の鉄イオン濃度 ($\mu\text{g}/\text{dl}$) 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

1) 細胞毒性試験

各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を単培養の GDL1 に 6.25~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、RAW264.7 に 3.125~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 24 時間曝露し、曝露した際の細胞生存率を NR assay により測定した。GDL1 単培養では、MGT の表面修飾の有無に関わらず、いずれの濃度においても殆ど毒性を示さなかった。一方、RAW264 単培養では、BMS-10 は 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で BMSC-5 は 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で生存率が減少し、毒性が見られ、表面修飾の有無で毒性強度に差があることがわかった (図 1)。

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 の両細胞に各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を 24 時間曝露し、6~7 日間培養した後、GDL1 細胞から DNA を抽出し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。結果を図 2 に示す。MGT 曝露群では溶媒対照群と比較して変異頻度が増加する傾向が観察された。また、BMS-10 では、単培養に比較して RAW264.7 との共培養条件下で変異頻度が上昇する傾向が観察されたが、BMSC-5 では単培養条件下で高い変異頻度が観察されており、共培養条件

下では MF が減少する傾向が観察された。また、両 MGT を比較すると、BMSC-5 の方が高い変異頻度を示していた(図 2)。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 MGT により誘発される変異スペクトルの解析を試みた。その結果、両者では観察された変異スペクトルが大きく異なることがわかった。これらのことから、ポリアクリル酸の表面修飾が遺伝毒性発現に何かしらの影響を及ぼしていることがわかった。

3) ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み
各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を 24 時間曝露した各細胞固定サンプルをフローサイトメーターで解析を行った。FCM では、細胞の大きさの指標である前方散乱光(FS)と細胞内の複雑さの指標である側方散乱光(SS)を測定した。結果を図 4 に示す。BMS-10 曝露群は溶媒対照群と比較してどちらの細胞も SS 値が増加した細胞数が増加し、細胞内取り込み量が増加した。また貪食細胞である RAW264.7 の方が GDL1 よりも取り込み量が多いことが観察された。対して BMSC-5 曝露群は溶媒対照群と比較して、SS 値が増加した細胞数に変化がなく、細胞内に殆ど取り込まれていないことが観察された。

4) マグネタイトナノ粒子処理による活性酸素種(ROS)産生

各 MGT (BMS-10、BMSC-5)を 2 時間曝露した各細胞ライセート用いて ROS 産生を評価した。結果を図 5 に示す。各細胞の BMS-10 曝露群、BMSC-5 曝露群において非曝露群と比較して ROS 産生の増加が見られ、RAW264.7 では有意な増加が確認された。また BMS-10 曝露群と BMSC-5 曝露群を比較すると BMSC-5 曝露群の方が ROS が多く産生しており、より強い ROS 産生を誘導することが確認された。

5) RAW264 細胞へのマグネタイトナノ粒子処理による炎症性サイトカイン放出

各 MGT (BMS-10、BMSC-5)を単培養 RAW264.7 に 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 24 時間曝露後、培養上清を回収し TNF- α を定量した。結果を図 6 に示す。BMS-10 曝露群では 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で TNF-a の有意な増加が見られ、BMSC-5 曝露群では 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で有意な増加がみられた。また TNF- α 産生量は BMS-10 曝露群の方が BMSC-5 曝露群よりも多いということが確認された。

6) Ferrozine assay を用いた培地中の鉄イオン濃度
各 MNPs において、BMS-10 を加えた培地からは 15.4 \pm 4.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の鉄イオンが検出された。一方、BMSC-5 を加えた培地からは 138.4 \pm 9.89 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の鉄イオンが検出され、BMS-10 と比較すると有意な差が見られた

D. 考察

ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた肺の遺伝毒性評価系として共培養システムを構築した。今年度は、この評価系を用い、MGT の遺伝毒性を行い、同時に遺伝毒性に対する表面修飾(ポリアクリル酸)の有無の影響を観察した。表面修飾の異なる MGT (BMS-10 及び BMSC-5) の RAW264.7 および GDL1 細胞に対する毒性は、GDL1 に対しては BMS-10 の方が強い毒性が見られ、RAW264.7 に対しては BMSC-5 の方が強い毒性が見られた。これは表面修飾の違いによってそれぞれの細胞に対する毒性メカニズムが異なっているのではないかと考えられる。

また、共培養系による *in vitro* 遺伝毒性試験系では、BMS-10 と BMSC-5 で異なる変異頻度の増加が観察された。BMS-10 は共培養条件下で MF が増加しており、対して、BMSC-5 は単培養条件下で MF の増加が観察された。さらに共培養で両方の細胞に曝露することで MF の有意な増加が確認された。このことから、BMS-10 は RAW264.7 による間接的な影響が強くでており、BMSC-5 は GDL1 への直接的な影響および間接的な影響との相乗効果が強く出ており、これは遺伝毒性メカニズムが異なり、遺伝毒性に違いが出たと考えられる。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MGT により誘発される変異スペクトルの解析を試みたところ、各 MGT で大きく異なる変異スペクトルが確認された。GC>CG や AT>CG といった酸化ストレスが増大することによって増える変異や、AT>GC といった BMS-10 曝露群では確認されなかった変異が確認された。表面修飾の違いにより大きく異なる変異スペクトルを示したことから、表面修飾が遺伝毒性発現に強い影響を示していると考えられる。さらに、細胞への取り込みを観察した結果、BMSC-5 は BMS-10 よりも細胞内に取り込まれなかった。このことからポリアクリル酸の表面修飾を施すことによって、貪食細胞に認識されず貪食されにくくなり、細胞内に取り込まれにくくなったと考えられる。

変異スペクトラムから酸化ストレス由来の変異が確認されたため各 MGT 曝露細胞の活性酸素種産生を評価した。結果は、BMSC-5 曝露群の方が活性酸素種を多く産生する傾向が確認された。このことから BMSC-5 は活性酸素種をより多く産生していたため突然変異頻度が増加したと考えられる。また免疫細胞による間接的な影響が確認されたため RAW264.7 から産生された炎症性サイトカイン TNF- α の定量を行った。結果は、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 曝露ではどちらの MGT も TNF- α の有意な増加が見られ、BMS-10 の方が BMSC-5 よりも多くの TNF- α を産生していた。このことから BMS-10 曝露群で間接

的な影響が強く出ていたのは炎症性サイトカインが原因であると考えられる。

一方、Ferrozine assayによって鉄イオン濃度を定量した結果、BMSC-5を含んだ培地からBMS-10を含んだ培地の9倍近い鉄イオン濃度を検出した。このことから培地中の多量の鉄イオンが細胞内に直接取り込まれたのではないかと考えられる。実際に細胞には培養培地中に存在するトランスフェリンを介した鉄イオン取り込み機構が存在することや、MNPの毒性は溶出した鉄イオンがFenton反応によってヒドロキシラジカルなどのROSを生成することで発現するとされており、deferoxamineのような鉄キレート剤を使用することでMNPの毒性を軽減させたという報告も知られている。またアスベストの細胞毒性において鉄 (Fe²⁺) の含有量が多いほど毒性が強くなったという報告もある。このことからMNPの毒性には鉄イオンが大きく関わっており、BMS-10よりも強いBMSC-5の毒性は鉄イオンの含有量が大きく関係していると考えられる。

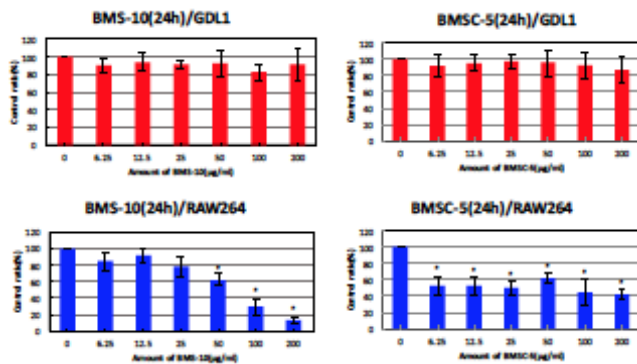


図1 表面修飾の異なるMGTの細胞毒性

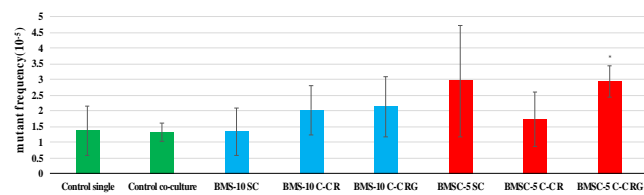


図3 GDL1細胞に観察された変異頻度

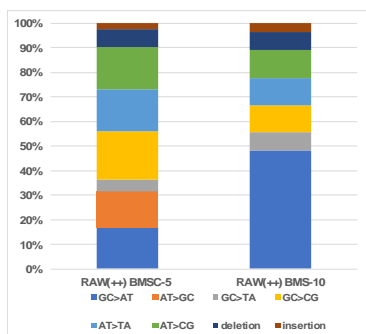


図3 変異スペクトラム

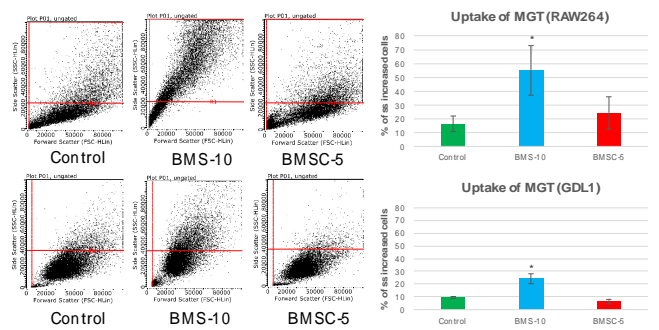


図4 各MGTの細胞への取り込み

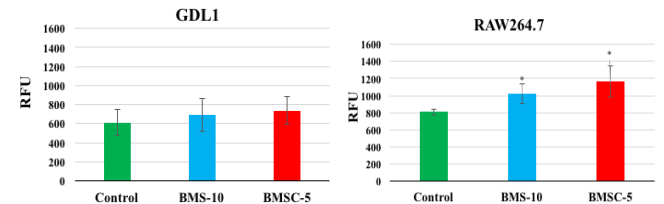


図5 各MGT処理による活性酸素種産生

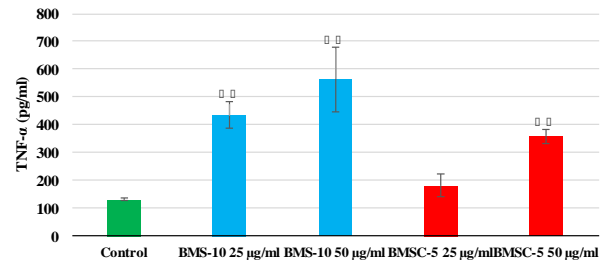


図6 RAW264.7における各MNPのTNF-α産生

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、MGT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、表面修飾の違いに対する影響についても観察した。修飾を施していないMGTと比較して、ポリアクリル酸の表面修飾を施したMGTは細胞種によって異なる細胞毒性を示し細胞内には取り込まれにくい、遺伝毒性は強く、また変異スペクトルは全く異なり、ROSや炎症性サイトカイン産生の増加がみられるという結果となった。貪食細胞に貪食されにくくなることから、表面修飾によりMGTの特性は変化したが、遺伝毒性が強くでてしまっているため、ポリアクリル酸自身の細胞毒性や遺伝毒性への影響やFenton反応による酸化ストレスの増大による影響が考えられ、事実、培地中の鉄イオンを測定したところ、各MGTによる毒性の違いは鉄イオン濃度が異なっていることが原因であると推察された。今後はBMSC-5液内に存在している鉄イオンは製造過程に発生した夾雑物なのか、安定性の低下等によりBMSC-5自体から発生したのかを調べる

ことや、鉄キレート剤を加えることでBMSC-5の毒性が軽減するのかを調べることで毒性原因を追求すると共にMNPの安全性を検討していく。

また、今後更に、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. 研究発表

1. 論文発表

- (1) E.Fukai, H.Sato, M.Watanabe, D.Nakae, Y.Totsuka. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 109, 1024-1031, 2018.
- (2) T.Toyoda, Y.Totsuka, K.Matsushita, T.Morikawa, N.Miyoshi, K.Wakabayashi, K.Ogawa. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *Journal of Applied Toxicology*, 38, 537-543, 2018

2. 学会発表

- (1) Y.Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics (コルカタ、2018年1月)
- (2) 戸塚ゆ加里、秋場 望、佐藤春菜、前迫有也、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉. 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第33回発がん病理研究会 (御殿場、2018年8月)
- (3) 三好規之、田島悠也、豊田武士、戸塚ゆ加里、松下幸平、小川久美子、若林敬二. 芳香族アミン類の代謝物分析とDNA付加体 第33回発がん病理研究会 (御殿場、2018年8月)
- (4) Y.Totsuka, T.Matsuda, M.Kato, A.Elzawahry, Y.Totoki, T.Shibata, H.Nakagama. Whole genome sequencing analysis elucidates the interaction between environmental factors and causes of human cancer. 第77回日本癌学会総会 (大阪、2018年9月)
- (5) 齋藤春五、高橋沙奈衣、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊. ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第77回日本癌学会総会 (大阪、2018年9月)
- (6) 高橋沙奈衣、齋藤春五、新田見 匡、戸塚ゆ加里、中川泰久、渡邊昌俊. Fe_3O_4 ナノ粒子の曝露された癌細胞における microRNAs のブ

ロファイリングについて (II) 第77回日本癌学会総会 (大阪、2018年9月)

- (7) 戸塚ゆ加里、佐藤春菜、松田知成、加藤 護、アスマ・エルザワハリ、遠藤 治. 全ゲノム解析データを用い、化学物質のヒト発がんへの関与を明らかにする 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
- (8) 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
- (9) 前迫侑也、椎崎一宏、高村岳樹、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47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
- (10) 神尾翔真、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里. ナノマテリアルの表面修飾が及ぼす遺伝毒性への影響 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
- (11) 齋藤春吾、渡邊昌俊、戸塚ゆ加里. ナノマテリアル毒性評価のための組織切片担体を用いたシステムの確立 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)
- (12) 石野孔祐、前迫侑也、内藤善哉、戸塚ゆ加里. 質量分析データに基づくDNA付加体データベースの整備 第47回日本環境変異原学会 (京都、2018年11月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。