

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）令和元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：生体を模倣した *in vitro* 試験系を用いた遺伝毒性評価

分担研究者：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。マグネタイトナノ粒子（MGT）を用いて本評価系の検証を行った。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。表面修飾を有する MGT(BMSC-5)は表面修飾を有さない MGT(BMS-10)に比べ細胞への取り込みが悪いにも関わらず、細胞毒性や変異原性が強かった。このことは、BMSC-5 懸濁液内の鉄イオン濃度がBMS-10に比べ高く、鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと推測した。今年度は、これを検証するために、BMSC-5 を遠心して鉄イオンを含む上清を取り除き、BMSC-5 を再懸濁して、*gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べた。その結果、予想に反して、GDL1 細胞の単培養条件下で鉄イオンを含む上清を取り除き、再懸濁した BMSC-5 が高い変異頻度誘発を示し、先行研究で観察された結果と同じ傾向を示した。今後、単培養条件下で BMSC-5 により誘発された変異スペクトルの解析および変異誘発メカニズムの検討を行う。また、今年度は本手法を用いて他のナノ粒子（各種二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、マテリアルの用量や培養条件などの検討を行っている。

## 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の状態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）を使用して検討している。先行研究において、表面修飾を有する BMSC-5 は表面修飾を有さない BMS-10 に比べ細胞への取り込みが悪いにも関わらず、細胞毒性や変異原性が強いことがわかった。このことは、BMSC-5 懸濁液内の鉄イオン濃度が BMS-10 に比べ高く、鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと推測した。今年度は、この推測を検証することを目的に、BMSC-5 を遠心して鉄イオンを含む上清を取り除き、BMSC-5 を再懸濁して、*gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べた。

また、本手法を他のナノマテリアル（二酸化チタン）の遺伝毒性評価に応用するための条件設定

についても検討する。

## B. 研究方法

### ① 共培養システムによる遺伝毒性試験法

まず、被験物質の調整を行なった。BMSC-5 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、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 組換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。さらに、MGT により誘発される変異スペクトルの解析は、変異コロニーを用いたダイレクト PCR 法により実施した。

### ② 共培養システムを用いて酸化チタンナノ粒子の遺伝毒性評価における各種条件検討

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、WST-1 法を用いて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 RAW246 の 2 種類。96well プレートにそれぞれ  $1 \times 10^4$  cells/well、 $4 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し、一

晩培養した。その後、TiO<sub>2</sub> を 1mg/ml から 2 段階希釈の濃度で 24 時間曝露させた。培養液に WST-1 試薬を加え、37°C で 2 時間インキュベートし、分光光度計にて 450nm の吸光度を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では該当しない。

## C. 研究結果

### ① 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 BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁を 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 1 に示す。BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁画分曝露群のいずれも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。さらに、遠心上清および下層の再懸濁画分曝露群で誘発された変異スペクトルについて解析を行ったところ、共培養条件下における再懸濁画分曝露群で特異的な変異スペクトルを示した (図 2)。

### ② 共培養システムを用いて酸化チタンナノ粒子の遺伝毒性評価における各種条件検討

酸化チタンナノ粒子による細胞毒性を調べるために、WST-1 Assay 試薬を用いた。この方法では、生細胞中のミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩(WST-1)のホルマザン色素への変換を検出する。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 RAW246 の 2 種類。96well プレートにそれぞれ  $1 \times 10^4$  cells/well、 $4 \times 10^4$  cells/well の濃度で播種し、一晩培養した。その後、酸化チタンナノ粒子を 1mg/ml から 2 段階希釈の濃度で 24 時間曝露させた。培養液に WST-1 試薬を加え、37°C で 2 時間インキュベートし、分光光度計にて 450nm の吸光度を測定した。この細胞数で実験したところ、細胞数が多かったため 0mg/ml で分光光度計の検出限界を超えていた。そのため最適な細胞数を決めるために、2 段階希釈で細胞濃度を変えて同様の実験をした。その結果、GDL1 では  $5 \times 10^3$  cells/well、RAW246 では  $1 \times 10^4$  cells/well が最適であることが観察された。今後は、分散性の確認された濃度を含む酸化チタンナノ粒子溶液に曝露させて細胞毒性を調べ、それを基に共培養系での曝露実験、遺

伝毒性試験へと進めていく予定である。

#### 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、その妥当性の評価を行ってきた。先行研究において、表面修飾を有する BMSC-5 は表面修飾を有さない BMS-10 に比べ細胞への取り込みが悪いにも関わらず、細胞毒性や変異原性が強いことがわかった。このことは、BMSC-5 懸濁液内の鉄イオン濃度が BMS-10 に比べ高く、鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと推測した。今年度は、この推測を検証することを目的に、BMSC-5 を遠心して鉄イオンを含む上清を取り除き、BMSC-5 を再懸濁して、*gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べた。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 BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁を曝露し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行ったところ、BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁画分の GDL1 単独曝露群のいずれも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。このことは、GDL1 単培養に対する遺伝毒性は鉄イオンと関係がないか、遠心分離では完全に鉄イオンが除去されていないか、あるいは BMSC-5 から常に飽和状態になるべく鉄イオンが放出されている等の可能性が考察された。

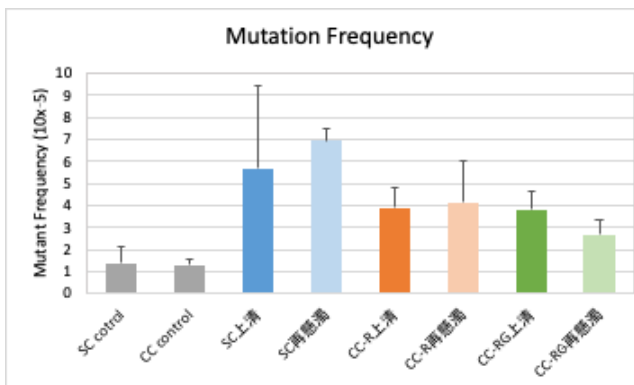


図1. BMSC-5の遠心上清および下層の再懸濁画分の遺伝毒性評価

さらに、変異原性誘発のメカニズム探索のため、各条件下で誘発される変異スペクトラムの解析を行ったところ、共培養条件下における再懸濁画分曝露群で GC>TA 変異の上昇が確認された。

今後は、再懸濁画分の鉄イオン濃度の測定を行い、鉄イオンが変異に及ぼす影響について検討す

る。さらに、酸化チタンナノ粒子においても、細胞毒性の有無を確認し、それを基に共培養系での曝露実験、遺伝毒性試験へと進めていく予定である。

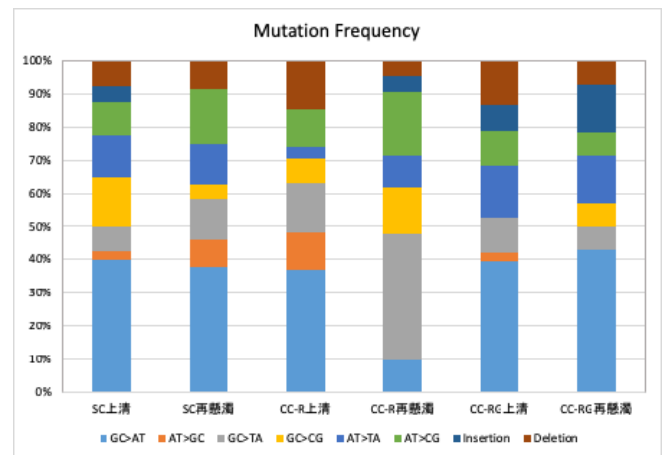


図2. BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁画分における変異スペクトラム

#### 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。先行研究において、表面修飾を有する BMSC-5 は表面修飾を有さない BMS-10 に比べ細胞への取り込みが悪いにも関わらず、細胞毒性や変異原性が強いことがわかった。このことは、BMSC-5 懸濁液内の鉄イオン濃度が BMS-10 に比べ高く、鉄イオンが直接細胞内に取り込まれ毒性が発現したと推測した。今年度は、この推測を検証することを目的に、BMSC-5 を遠心して鉄イオンを含む上清を取り除き、BMSC-5 を再懸濁して、*gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べた。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 BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁を曝露し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行ったところ、BMSC-5 の遠心上清および下層の再懸濁画分の GDL1 単独曝露群のいずれも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。このことは、GDL1 単培養に対する遺伝毒性は鉄イオンと関係がないか、もしくは、遠心分離では完全に鉄イオンが除去されていないか、あるいは

BMSC-5 から常に飽和状態になるべく鉄イオンが放出されている等の可能性が考察された。また、変異スペクトラムの解析を行ったところ、共培養条件下における再懸濁画分曝露群で GC>TA 変異の上昇が確認された。

今後は、再懸濁画分の鉄イオン濃度の測定を行い、鉄イオンが変異に及ぼす影響の有無を確認するとともに、BMSC-5 の細胞毒性や変異原性の要因についてさらなる検討を重ねる。さらに、酸化チタンナノ粒子においても、細胞毒性の有無を確認し、それを基に共培養系での曝露実験、遺伝毒性試験へと進めていく予定である。

また、今後、本手法を用いて他のナノマテリアルの遺伝毒性を検討するための条件検討を行っている。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

- 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*. 2019 Jun 20.
- Gi M, Fujioka M, Totsuka Y, Matsumoto M, Masumura K, Kakehashi A, Yamaguchi T, Fukushima S, Wanibuchi H. Quantitative analysis of mutagenicity and carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in F344 gpt delta transgenic rats. *Mutagenesis*. 34 (3), 279-287, 2019.
- Totsuka Y, Lin Y, He Y, Ishino K, Sato H, Kato M, Nagai M, Elzawahry A, Totoki Y, Nakamura H, Hosoda F, Shibata T, Matsuda T, Matsushima Y, Song G, Meng F, Li D, Liu J, Qiao Y, Wei W, Inoue M, Kikuchi S, Nakagama H, Shan B. DNA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China. *Chem Res Toxicol*. 32 (8), 1515-1527, 2019.
- Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL. High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Res*. 847, 403022, 2019.
- Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl- $\beta$ -carboline derivatives formed from co-mutagenic action of  $\beta$ -carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res*. 2019 in press.

### 2. 学会発表

- Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
- Iwamura K, Shimada H, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Endo O, Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
- Ono H, Nagai M, Narushima D, Hamamoto R, Totsuka Y, Kato M. Detection of DNA adducts by nanopore sequencing using deep learning. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)
- Totsuka Y. Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development, 日本癌学会学術総会シンポジウム。(京都、2019年9月)
- Totsuka Y. Exploration of Esophageal Cancer Etiology using Comprehensive DNA Adduct Analysis (DNA Adductome Analysis) 2nd Hebei International Forum on Theory and Practice of Cancer Prevention and Control (石家荘、2019年7月)
- Totsuka Y. How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting (リヨン、2019年7月)
- 戸塚ゆ加里. ナノマテリアルの遺伝毒性評価の動向 —JRC 会議に参加して— MMS 定例会 (京都、2019年6月)

8. 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 日本毒性学会シ  
ンポジウム (徳島、2019 年 6 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