

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）（分担）総合研究報告書

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

研究分担者：戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所 発がんモデル開発部門 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)を用い、共培養システムの構築を行なった。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 ug/ml で表面修飾を有する MGT(BMSC-5)は 6.25 ug/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。さらに、同手法を用いて酸化チタンナノ粒子の形状や粒径などの物理化学的な性質が毒性に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、5 種の酸化チタンナノ粒子 (JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A, AMT-100, TKP-102) を用いて検討した。まず、細胞毒性について調べた結果、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。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。これは RAW264 がマクロファージ様細胞であるため、酸化チタンを貪食した後、分解できずに細胞破裂が起こったと考えられた。さらに、RAW264.7 と GDL1 のどちらの細胞でもアナターゼ とルチルでの結晶の違いでの差は見られなかった。次に AMT-100 と TKP-102 曝露における *gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を実施した。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が、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。*In vitro* 変異原性試験において AMT-100 の方が TKP-102 より変異頻度が上昇する傾向が観察された。AMT-100 は一次粒子径が 6 nm で比表面積が 280 m²/g に対し TKP-102 は AMT より大きく一次粒子径が 15 nm で比表面積が 110 m²/g である。一般的には一次粒子径が小さく、比表面積が大きいほど細胞や組織に取り込まれやすく、毒性が現れることから、AMT-100 の方が変異が起きやすいという結果になったと考えられた。今後、酸化チタンナノ粒子の形状や粒径などの物理化学的な性質が遺伝毒性に及ぼす影響についてさらに詳細に明らかにするために、その他の酸化チタンナノ粒子 (JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A,) の *gpt* 遺伝子に対する変異原性についても解析することが必要だと思われる。

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を用いて検証してきた。本研究では、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するため、ポリアクリル酸修飾を施したマグネタイトナノ粒子 (MGT) である BMSC-5 と修飾を施していない BMS-10 を使用した。さらに、同手法を用いて各種酸化チタンナノ粒子の遺伝毒性評価についても実施した。

B. 研究方法

[MGT を用いた試験]

① MGT の細胞毒性試験

96well 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 \square 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

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。

③ ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み
6well 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 及び 50 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 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。Ferrozine assay にて培地中の鉄イオン濃度 ($\mu\text{g/dl}$) を算出した。

酸化チタンナノ粒子を用いた試験

① 酸化チタンナノ粒子の細胞毒性

まず、被験物質の調整を行なった。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いただいた。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。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、ナノマテリアルが凝集した際に 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、トリパンブルーの取り込みを指標に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。6well plate に RAW246 及び GDL1 を 1×10^6 cell/well 及び 5×10^5 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 RAW246 に 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 、GDL1 には 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ を各 well に添加し、24 時間曝露後にトリパンブルーを用いて細胞生存率を測定した。

⑦ 共培養システムによる遺伝毒性試験法

GDL1 細胞を播種した後、ThinCertTM (pore size; 0.4 μm , high density: greiner bio-one) を各 well に入れ、インサート内に RAW246 を播種し、24 時間培養した。各種酸化チタンナノ粒子を RAW246 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 組替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°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して突然変異頻度を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究では該当しない。

C. 研究結果

[MGT を用いた試験]

① 細胞毒性試験

各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を単培養の GDL1 に 6.25~200 $\mu\text{g/ml}$ で、RAW264.7 に 3.125~200 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ で BMSC-5 は 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 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)。

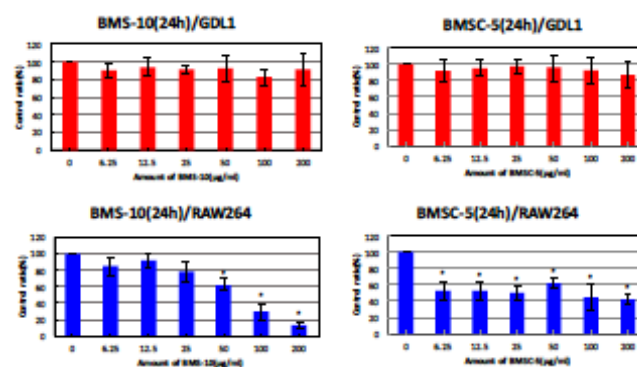


図 1. 表面修飾の異なる MGT の細胞毒性

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 (図 3)。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。

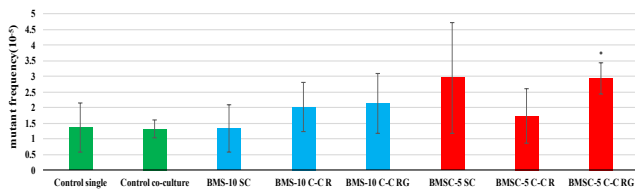


図2. GDL1細胞に観察された変異頻度

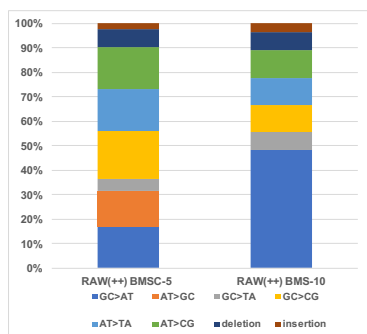


図3. 変異スペクトラム

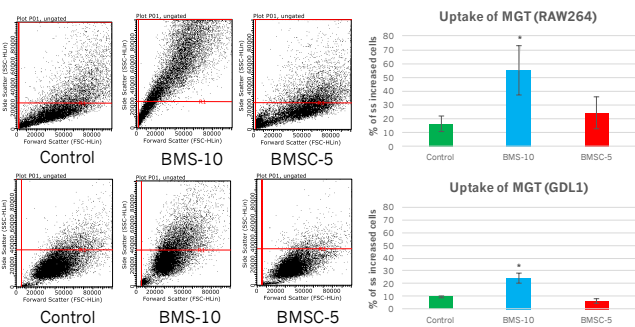


図4. 各 MGT の細胞への取り込み

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 $\mu\text{g/ml}$ 及び 50 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 及び 50 $\mu\text{g/ml}$ で TNF-a の有意な増加が見られ、BMSC-5 曝露群では 50 $\mu\text{g/ml}$ で有意な増加がみられた。また TNF-a 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。

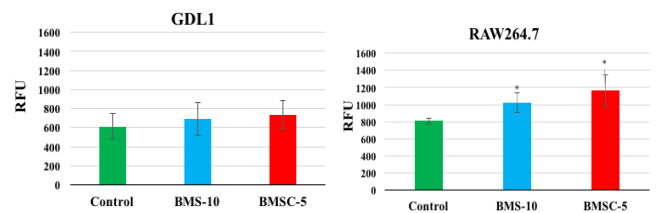


図5. 各 MGT 処理による活性酸素種産生

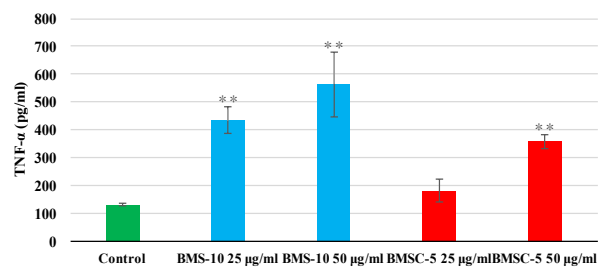


図6. RAW264.7 における各 MNP の TNF- α 産生

⑥ Ferrozine assay を用いた培地中の鉄イオン濃度

各 MNP において、BMS-10 を加えた培地からは 15.4 \pm 4.0 $\mu\text{g/dl}$ 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 $\mu\text{g/dl}$ 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。

[酸化チタンナノ粒子を用いた試験]

① 酸化チタンナノ粒子の細胞毒性

酸化チタンナノ粒子による細胞毒性を調べるために、トリパンプルー試薬を用いた。この方法は、生細胞はトリパンプルーを取り込まないが死細胞はその色素を取り込み青色に染色される、という原理に基づいている。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。6well plate に RAW264 及び GDL1 を 1x10⁶ cell/well 及び 5x10⁵

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 (JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A, AMT-100, TKP-102) 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ブルーを用いて細胞生存率を測定した。

RAW264.7 ではどの酸化チタンナノ粒子でも濃度依存的に細胞生存率減少が見られた(図 7)。コントロールと比べ、TKP-102、JRCNM01001a では有意な差が見られたが MT-150A では 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のみで有意な差が見られ、AMT-100 では 250, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、JRCNM01005a では 125, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の場合に有意な差が見られた。

GDL1 では今回使用した全ての酸化チタンナノ粒子でコントロールと比べ、濃度依存的に細胞数が優位に減少した(図 8)。

RAW264.7 と GDL1 のどちらの細胞でもアナターゼ とルチルでの結晶の違いでの差は見られなかった。

以上の結果から、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。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。

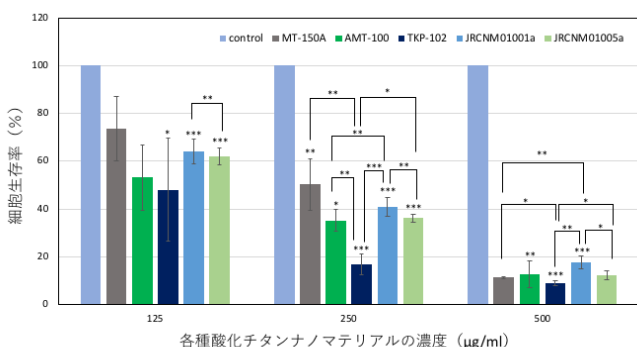


図7. 各種酸化チタンナノ粒子のRAW264に対する細胞毒性

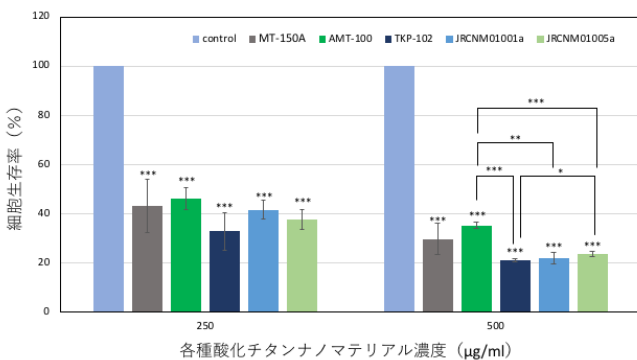


図8. 各種酸化チタンナノ粒子のGDL1に対する細胞毒性

② 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 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 曝露における *gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を実施した。変異頻度(MF)を算出した結果を表 1 に示す。

表 1. 酸化チタンナノ粒子を曝露した変異頻度 (MF)の結果

Treatment	sample	Number of colonies		MF($\times 10^{-5}$)	Average MF($\times 10^{-5}$)
		Mutant	Total		
control	1	5	280500	1.78	-
	2	3	205500	1.46	-
	3	5	370500	1.35	-
	-	-	-	-	1.53 \pm 0.23
AMT-100 125 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 単培養	1	6	31500	19.05	-
	2	0	15000	19.05	-
	3	0	22500	0.00	-
	-	-	-	-	12.70 \pm 11.00
AMT-100 250 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 単培養	1	5	243000	2.06	-
	2	12	526500	2.28	-
	3	18	435000	4.01	-
	-	-	-	-	2.13 \pm 1.14
AMT-100 125 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 共培養	1	2	40500	4.94	-
	2	3	100500	2.99	-
	3	3	21000	14.29	-
	-	-	-	-	7.40 \pm 6.04
AMT-100 250 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 共培養	1	8	123000	6.5	-
	2	7	459000	1.52	-
	3	3	199500	1.5	-
	-	-	-	-	3.19 \pm 2.88
TKP-102 125 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 単培養	1	0	16500	0.00	-
	2	5	40500	12.35	-
	3	2	24000	8.33	-
	-	-	-	-	6.89 \pm 6.30
TKP-102 250 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 単培養	1	13	658500	1.97	-
	2	11	282000	3.90	-
	3	13	217500	5.98	-
	-	-	-	-	3.95 \pm 2.00
TKP-102 125 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 共培養	1	3	271500	1.11	-
	2	2	64500	3.1	-
	3	8	252000	3.18	-
	-	-	-	-	2.46 \pm 1.17
TKP-102 250 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 共培養	1	5	228000	2.19	-
	2	6	555000	1.08	-
	3	22	579000	2.93	-
	-	-	-	-	2.01 \pm 0.93

gpt mutation assay を行なった結果をグラフにまとめた (図 9)。タイターが十分稼げていない結果もあり、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。

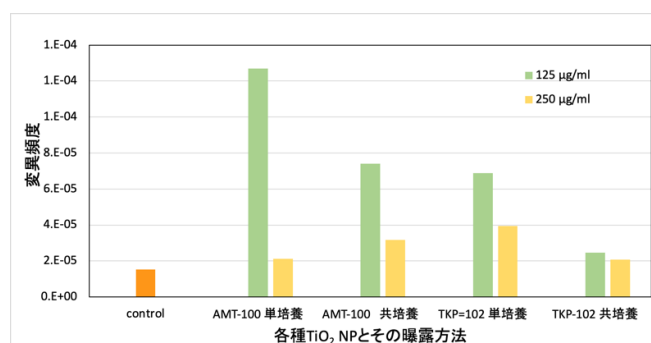


図 9. 酸化チタンナノ粒子の *gpt* 変異結果

D. 考察

先行研究で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)の共培養システムの構築を行った。本研究では、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。遺伝毒性が強くでしまっているため、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ナノマテリアルの安全性を検討していく。

また、更に、形状やサイズの異なるナノマテリアルの毒性評価について各種酸化チタンナノ粒子を用いて同手法により検討した。

まず、曝露濃度を検討するために、各種酸化チタンナノ粒子をRAW264.7及びGDL1に24時間曝露し、細胞生存率をトリパンブルーを用いて測定した。その結果RAW264とGDL1のどちらの細胞でも濃度依存的に減少した。また、RAW264はGDL1より酸化チタンの影響が大きいことが分かった。これはRAW264がマクロファージ様細胞であるため、酸化チタンを貪食した後、分解できずに細胞破裂が起こったと考えられた。また、以降の実験は125、250 µg/mlの曝露濃度で行なった。

次に、*gpt* 遺伝子に対する変異原性の結果、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。多層カーボンナノチューブの場合では、マクロファージ様細胞であるRAW264.7細胞がMWCNTを貪食した後、IL-1βやTNF-αが炎症性遺伝子の誘導を行い、さらに酸化窒素が誘導され、ROSが誘導されることで酸化ストレスによりGDL1に8-oxo-dGが形成され変異が誘発さ

れたと考えられている。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数からも、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。*In vitro* 変異原性試験においてAMT-100の方がTKP-102より変異頻度が上昇した。AMT-100は一次粒子径が6 nmで比表面積が280 m²/gに対しTKP-102はAMTより大きく一次粒子径が15 nmで比表面積が110 m²/gである。一般的には一次粒子径が小さく、比表面積が大きいほど細胞や組織に取り込まれやすく、毒性が現れることから、AMT-100の方が変異が起きやすいという結果になったと考えられた。

今後、その他の酸化チタンナノ粒子(JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A.)の*gpt* 遺伝子に対する変異原性を調べることで、酸化チタンナノ粒子の形状や粒径などの物理化学的な性質が遺伝毒性に及ぼす影響についてさらに詳細に明らかになるとと思われる。

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)を用い、共培養システムの構築を行なった。本研究では、この評価系の妥当性について、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 µg/mlで表面修飾を有するMGT(BMSC-5)は6.25 µg/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。さらに、同手法を用いて酸化チタンナノ粒子の形状や粒径などの物理化学的な性質が毒性に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、5種の酸化チタンナノ粒子(JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A, AMT-100, TKP-102)を用いて検討した。まず、細胞毒性について調べた結果、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。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。これはRAW264がマクロファージ様細胞であるため、酸化チタンを貪食した後、分解できずに細胞破裂が起こったと考えられた。さらに、RAW264.7とGDL1のどちらの細胞でもアナターゼとルチルでの結晶の違いでの差は見られなかった。

次に *gpt* 遺伝子における変異原性を調べた。まずはAMT-100とTKP-102曝露における *gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を実施した。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が、各サンプルのタイター数からも、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。 *In vitro* 変異原性試験においてAMT-100の方がTKP-102より変異頻度が上昇する傾向が観察された。AMT-100は一次粒子径が6 nmで比表面積が280 m²/gに対しTKP-102はAMTより大きく一次粒子径が15 nmで比表面積が110 m²/gである。一般的には一次粒子径が小さく、比表面積が大きいほど細胞や組織に取り込まれやすく、毒性が現れ

ることから、AMT-100の方が変異が起きやすいという結果になったと考えられた。

今後、酸化チタンナノ粒子の形状や粒径などの物理化学的な性質が遺伝毒性に及ぼす影響についてさらに詳細に明らかにするために、その他の酸化チタンナノ粒子(JRCNM01001a, JRCNM1005a, MT-150A,)の *gpt* 遺伝子に対する変異原性についても解析することが必要だと思われる。

また、本手法を用いて更に他のナノマテリアルについても検討し、毒性評価に資する情報として活用することを目指す。また、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についても検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, Jantarabekul 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.
2. Totsuka Y, Watanabe M, Lin Y. New horizons of DNA adductome for exploring environmental causes of cancer. *Cancer Science*, 112, 7-15, 2021.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

7. Totsuka Y, Wakabayashi K. Biological significance of aminophenyl-b-carboline derivatives formed from co-mutagenic action of b-carbolines and aromatic amines and its effect on tumorigenesis in humans: A review. *Mutation Res*, 850-851, 503148, 2020.
 8. 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, 279-287, 2019.
 9. 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. NA Adductome Analysis Identifies N-Nitrosopiperidine Involved in the Etiology of Esophageal Cancer in Cixian, China. *Chem Res Toxicol*, 32, 1515-1527, 2019.
 10. Dertinger SD, Totsuka Y, Bielas JH, Doherty AT, Kleinjans J, Honma M, Marchetti F, Schuler MJ, Thybaud V, White P, Yauk CL. (2019) High Information Content Assays for Genetic Toxicology Testing: A Report of the International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT). *Mutation Res*, 847, 403022, 2019.
 11. Fukai E, Sato H, Watanabe M, Nakae D, Totsuka Y. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci*, 109, 1024-1031, 2018.
 12. Toyoda T, Totsuka Y, Matsushita K, Morikawa T, Miyoshi N, Wakabayashi K, Ogawa K. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *J Appl Toxicol*, 38, 537-543, 2018.
2. 学会発表
 1. Totsuka Y : 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. Totsuka Y, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Nakagama H: 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. 斎藤春五、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、斎藤春五、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 のプ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関与する 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. 斎藤春吾、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)
 13. 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)
 14. 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)
 15. Totsuka Y, How Adductomics Can Inform Cancer Etiology, Mutgraph meeting (リヨン、2019年7月)

- | | |
|---|--|
| <p>16. <u>Totsuka Y</u>, 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 (石家庄、2019年7月)</p> <p>17. <u>Totsuka Y</u>, 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)</p> <p>18. <u>Totsuka Y</u>, Exploration of Esophageal Cancer Etiology using DNA Adductome Analysis, 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)</p> <p>19. Iwamura K, Shimada H, Matsuda T, Kato M, Elzawahry A, Nagai M, Endo O, <u>Totsuka Y.</u>, Whole genome sequencing analysis elucidates the association between environmental factors and human cancer development. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)</p> <p>20. Ono H, Nagai M, Narushima D, Hamamoto R, <u>Totsuka Y</u>, Kato M. Detection of DNA adducts by nanopore sequencing using deep learning. 6th ACEM-48th JEMS (東京、2019年11月)</p> <p>21. <u>戸塚ゆ加里</u> 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)</p> <p>22. <u>戸塚ゆ加里</u> 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)</p> <p>23. <u>戸塚ゆ加里</u> Prospects for elucidating the cancer etiology and prevention by multidisciplinary approach 第79回癌学会 (2020年10月、広島)</p> <p>24. <u>戸塚ゆ加里</u> 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)</p> <p>25. <u>戸塚ゆ加里</u> 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)</p> <p>26. <u>戸塚ゆ加里</u> 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)</p> <p>27. <u>戸塚ゆ加里</u> 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)</p> | <p>1. 特許取得
該当なし。</p> <p>2. 実用新案登録
該当なし。</p> <p>3. その他
該当なし</p> |
|---|--|

G. 知的財産権の出願・登録状況