

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：(1)ナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築、  
(2)機械学習による生体影響予測の試み

研究分担者：花方信孝 物質・材料研究機構 技術開発・共用部門 部門長

**研究要旨**：過去2年間で構築した基礎的なデータベースに対して、機械学習のアルゴリズムやパラメータの検討を行ない、生体影響予測を試みた。特に機械学習のラベリング方法および入力特徴量の調整を検討や、マイクロアレイ解析の一色法と二色法のデータ変換法の開発を進めた。また、実測遺伝子発現データを得るために、標準ナノマテリアルとして酸化チタンを用いた曝露毒性試験の実施および遺伝子発現マイクロアレイ解析を行なった。

## A. 研究目的

現在一般社会で開発・使用されているナノマテリアルが社会的に受容されるためには、そのリスクについて十分な安全評価手法が必要である。しかしながら、その手法として代表的な動物実験は費用的にも時間的にも高コストであることに加えて、近年の動物愛護原則から敬遠され、代替手法が求められている。そこでin vitro評価法の一環として、ナノマテリアルによる細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築方法および機械学習による生体影響予測モデルを検討することを研究目的とした。

具体的には、データベースを構築する上で元データとして使用する既存のデータベースを選定するために生命科学系データベースの調査、データベースの構築法および機械学習における学習用サンプル情報のラベリング方法および入力特徴量の調整など予測モデルの検討、マイクロアレイ解析の一色法と二色法のデータ変換法の開発、標準ナノマテリアルとして酸化チタン曝露時の毒性試験の実施および遺伝子発現マイクロアレイ解析を目指した。

## B. 研究方法

（酸化チタンの毒性評価）

標準ナノマテリアルとして酸化チタンのナノ粒子を使用することとし、まずは毒性評価を行なうためWST-8アッセイを実施した。評価を行なった

酸化チタンは国立医薬品食品衛生研究所より分与された以下の7サンプル。

- MT-150A (Lot#651105)
- MT-500B (Lot#1880902)
- AMT-100 (Lot#181102)
- TKP-102 (Lot#4190101)
- AMT-600 (Lot#6553)
- TiO<sub>2</sub> (Lot#1001)
- TiO<sub>2</sub> (Lot#1005)

WST-8アッセイには株式会社同仁化学研究所のCell Counting Kit-8 (CCK-8)を使用した。細胞はTHP-1細胞とRAW264細胞を用いて、それぞれ500,000cells/mL, 70,000cells/mLに調製した。96ウェルプレートにそれぞれ50μL/well, 100μL/wellで播種した。THP-1細胞には酸化チタンを50μL/well添加し、37°Cで24時間後にCCK-8を10μL/well添加し4時間後に波長450nmで吸光度を測定した。RAW264細胞は播種から24時間後に培地を除去してから酸化チタンを100μL/well添加し、さらに24時間後にCCK-8を同様に添加して測定した。

なお、酸化チタンのナノ粒子の大きさは動的光散乱光度計（DLS）により測定した。

（ZnO曝露細胞の一色法マイクロアレイ解析）

- 細胞： THP-1細胞およびA549細胞
- 曝露ナノマテリアル： 酸化亜鉛（ZnO）
- 曝露濃度： 300μg/mL (THP-1細胞) または 60μg/mL (A549細胞)

- ・ 曝露時間： 6時間または24時間
- ・ マイクロアレイ： Agilent SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60K Ver. 3.0 (G4851C; GEO platform:GPL21185) 1枚
- ・ ハイブリダイゼーション： 一色法
- ・ マイクロアレイの割り当て: not shown
- ・ マイクロアレイスキャナー： Agilent Surescan G2600D
- ・ 画像数値化処理ソフトウェア： Agilent Feature Extraction v11.5  
(倫理面への配慮)  
本研究では該当しない。

### C. 研究結果

(酸化チタンの毒性評価)

標準ナノマテリアルとして酸化チタンのナノ粒子の使用することとした。これにより各分担研究間の比較も可能となる。まずはMMT-8アッセイによる毒性評価を行なった(図1、図2)。浮遊細胞のTHP-1細胞に対しては7種類とも顕著な影響は認められなかった。

一方で付着細胞のRAW264細胞においては、MT-150A, MT-500B, TiO<sub>2</sub>-1005の3種類では影響がみられなかったものの、AMT-100, AMT-600, TKP-102, TiO<sub>2</sub>-1001の4種類では毒性が認められた。THP-1細胞とRAW細胞で実験の日時に差があり、ナノ粒子径はその都度DLSにより測定したが多少のばらつきがある。しかしながら、RAW細胞に毒性を示した酸化チタンとナノ粒子径との間に相関は認められなかった。

(ZnO曝露細胞のマイクロアレイ解析)

発現強度(ノーマライズ)： ノーマライズ方法は第3四分位値を基準とする75パーセンタイル法を使用した。発現強度の分布は概ね均等であった。

発現強度(プローブ)： 今回使用したマイクロアレイスライドはスポット数としては1アレイあたり60,901個あるが、1つのプローブが複数のスポットにある場合があるので、プローブ単位で発現強度をまとめた。なお、プローブの総数は58,201個である。

階層的クラスタリング： 全8アレイのデータのうち8アレイとも発現比が求めたプローブ22,003個の発現強度データで階層的クラスタリングを行なった(図3)。まず、THP-1細胞とA549細胞でクラスタが大きく分かれている。そしてそれ

ぞれの細胞においてZnOに曝露したかしていないかでクラスタが分かれた。6時間後と24時間後の違いは比較的小さいことが分かった。また、A549細胞よりもTHP-1細胞の方がZnOの影響が大きいことが明らかになった。

### D. 考察

機械学習を実行する上で、ヒトの遺伝子の数はRefSeqデータベースに限っても26,000個ほどもあるため、入力特徴量としては扱いにくい。そのため顕著な遺伝子に限って1/10程度の量に減らしてモデルを作成し機械学習を実行させている。この部分の効率的なデータの選択が本研究において重要である。

実測データとしてZnOを曝露した細胞の系を扱っていたが、他の分担研究と協調するためにも共通となる標準ナノマテリアルを使うことが適切として酸化チタンのナノ粒子を用いることとした。今回は7種類に酸化チタンについて毒性評価を行なったが、THP-1細胞とRAW264細胞で異なる結果を示すナノ粒子もあった。これらについてマイクロアレイ解析も実測し、機械学習のモデルを検証するデータとして利用できる。

### E. 結論

細胞内網羅的遺伝子発現データベースの構築法および機械学習の予測モデルを開発することを目的として、既存データベースを調査して、それらからデータを抽出し適切なラベリングやデータ処理を行なって基礎的なデータベースを構築した。機械学習における学習用サンプル情報のラベリング方法および入力特徴量の削減方法について検討した。分担研究間で共通して使用する標準ナノマテリアルとして酸化チタンのナノ粒子を採用し曝露時の毒性試験を実施した。

### F. 研究発表

#### 論文発表

1. Chinnathambi S, Hanagata N, Yamazaki T, Shirahata N. Nano-Bio Interaction between Blood Plasma Proteins and Water-Soluble Silicon Quantum Dots with Enabled Cellular Uptake and Minimal Cytotoxicity. *Nanomaterials*. 10(11), 2250, 2020.

#### G. 知的所有権の取得状況

本年度はなし。

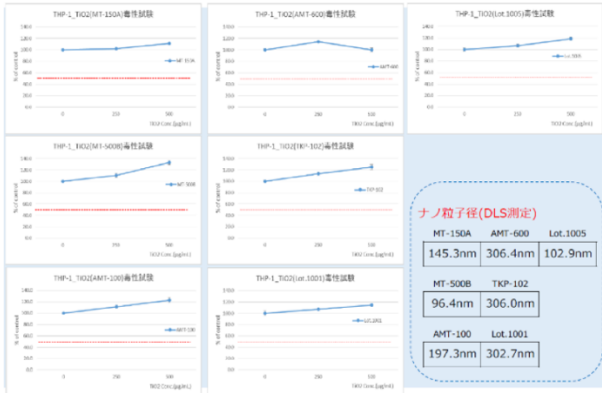


図1. THP-1細胞に対する酸化チタンの毒性評価

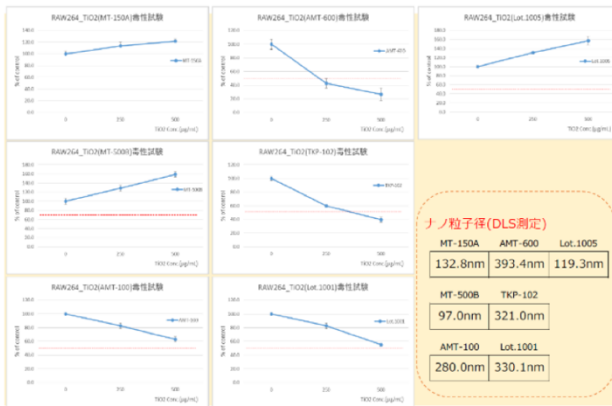


図 2. RAW264 細胞に対する酸化チタンの毒性評価

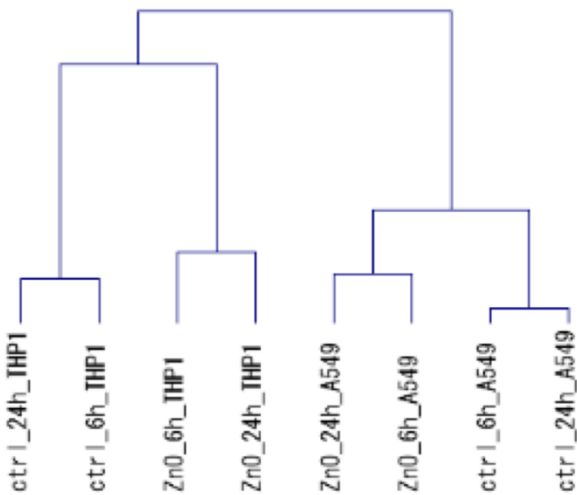


図3.階層的クラスタリング