

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

*In vivo* 動物実験による新規 *in vitro* リスク評価系の有効性の検証

研究分担者 中江 大 東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 教授

本分担研究は、再構成ヒト皮膚培養系を用いて、ナノ粒子の皮膚毒性に関する新規 *in vitro* スクリーニング評価系を開発することを目的に、現在市販されている再構成ヒト皮膚培養系の中から、本研究で使用すべきものとして、POCA ヒト 3D HADA モデルと LabCyte EPI モデルを選定した。LabCyte EPI モデルを用いて金ナノ粒子の細胞毒性を試験したところ、60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （300  $\mu\text{M}$  に相当）でわずかな細胞死（5%）を認めるのみであった。

研究協力者：

煙山 紀子 東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 助教

ヒト皮膚培養系を用いて、ナノ粒子の皮膚毒性に関する新規 *in vitro* スクリーニング評価系を開発することである。

A. 研究目的

ナノマテリアルの社会的受容の実現には十分なリスク評価を行うことが必須であり、その結果仮にリスクがある場合にはベネフィット・リスクバランスを考慮した適切なリスク低減を図ることが必要である。当該リスク評価に当たっては、動物愛護の3Rの観点から、動物実験代替法の開発も要求される。本研究は、全体として、ナノマテリアルの物性解析、新規 *in vitro* リスク評価系の確立、細胞内応答機構等を指標とした当該 *in vitro* リスク評価系と従来の評価系の比較、新たなリスク評価バイオマーカーの確立、適切な動物実験等による当該 *in vitro* リスク評価系の妥当性検証、などを目的として行われている。

その中で、本分担研究の目的は、再構成

B. 研究方法

1) 現在市販されている再構成ヒト皮膚培養系について情報を集めて精査した後、複数の取扱業者にヒアリングを行い、再構成ヒト皮膚培養系として本研究で使用すべきものを選定した。

2) LabCyte EPI モデルを用い、金ナノ粒子（一次粒径、4-10 nm；媒体、水；入手濃度、2 mg/mL）を 0, 2, 10, 30, 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ （0, 50, 150, 300  $\mu\text{M}$  に相当）の用量で 24 時間曝露し、細胞毒性を生化学的（LDH アッセイ）および病理学的に検索し、再構成皮膚組織下部の培地中金ナノ粒子の存在同定と定量のための培地を回収・保存した。

（倫理面への配慮）

細胞生物学的研究に関する国際的・国内的・東京農業大学学内的な諸規則に基づき、必要な倫理的配慮を施した。

### C. 研究結果

1) 下記の2種類の再構成ヒト皮膚培養系を用いることに決定した。

・POCA ヒト3D HADA モデル (DS ファーマ・バイオメディカル取扱；ヒト幹細胞 (Muse 細胞，東北大学・出澤教授が発見した間葉系幹細胞) 由来のメラノサイトとヒト・ケラチノサイトとヒト線維芽細胞から作成；「表皮」と「真皮」とメラノサイトを有する。)

・LabCyte EPI モデル (J-TEC 取扱；ヒト正常皮膚細胞から作成；「表皮」のみを有する。)

2) LDH アッセイによっては、最高用量でわずかな細胞死 (5%) を認めるのみであった。なお、病理学的試験は標本作成中であり、機器分析は準備中である。

### D. 考察

本年度は、研究の準備段階の作業が終了し、本格的な段階における作業を開始したところである。

今後の予定は、以下の通りである。

- ・高用量の用量相関性試験 (着手済)。
- ・毒性用量でのタイムコース試験。
- ・再構成皮膚培養系間のデータ比較 (着手済)。
- ・金ナノ粒子結果を参考に、他の金属ナノ粒子を用いて順次試験。
- ・動物実験による妥当性評価。

### E. 結論

本研究は、2種類の再構成ヒト皮膚培養系の選定が終わり、合成に成功した金ナノ粒子の再構成ヒト皮膚培養系への応用を始めた。本研究においては、今後、ナノマテリアルの皮膚への影響を再構成ヒト皮膚培養系で解析し、*in vivo*動物実験により、その妥当性を評価する予定である。

### F. 研究発表

なし

### G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし