

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

3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築

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
研究協力者 美谷島 克宏 東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 准教授
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

本分担研究の目的は、3D ヒト皮膚再構成系を利用して、ナノマテリアルの経皮毒性の新しい *in vitro* スクリーニング評価モデルを開発することである。本年度は、LabCyte EPI モデル（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）を用いた 3D ヒト皮膚再構成系において金ナノ粒子および銀ナノ粒子の表皮傷害性と表皮侵入性について、ヒト肝細胞癌由来の HepG2 細胞を用いた単層培養系において、当該ナノ粒子の細胞傷害性について、それぞれ解析した。その結果、3D ヒト皮膚再構成系においては、細胞死による培養液中への乳酸脱水素酵素漏出を指標として解析した結果、金ナノ粒子・銀ナノ粒子共に最高 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで表皮傷害性を示さなかった。また、病理組織学的に検索したところ、金ナノ粒子・銀ナノ粒子は、いずれも、表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった。単層培養系においては、細胞死による培養液中への乳酸脱水素酵素漏出または生細胞によるニュートラルレッド取り込みを指標として解析した結果、金ナノ粒子・銀ナノ粒子共に最高 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで細胞傷害性を示さなかった。以上より、金ナノ粒子・銀ナノ粒子は、本実験条件下において明らかな細胞傷害性を示さず、また、表皮内に侵入しないことが明らかとなった。また、LabCyte EPI モデルは、ナノマテリアルの経皮毒性の新しい *in vitro* スクリーニング評価モデルに利用し得るものと評価された。

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、3Dヒト皮膚再構成系を用いて、金属ナノ粒子の経皮毒性に関する新規*in vitro*評価系を構築することである。

B. 研究方法

1) 細胞

3D ヒト皮膚再構成系としては、LabCyte EPI 24 モデル (株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)(図 1)を、当該モデルに添付の培養液と共に用いた。培養条件は、温度 37℃、受動湿潤、気相条件 95% 空気・5% 二酸化炭素とした。なお、LabCyte EPI 24 モデルは、14 日齢にて納入され、24 時間培養後の 15 日齢にて実験に供した。

単層培養系としては、HepG2細胞を、Low-Glucose-D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)にL-グルタミン酸溶液・ペニシリンストレプトマイシンを添加して胎仔ウシ血清を10%混合した培養液で継代したものを用いた。培養条件は、前項と同様とした。

2) 金属ナノ粒子

金ナノ粒子・銀ナノ粒子は、本研究の研究分担者である林 幸孝朗 博士 (名古屋大学エコトピア科学研究所) が作成し、本研究班全体に分配したものである。詳細は、林博士の報告書を参照されたい。

金ナノ粒子 (一次粒径4-10 nm) は、システイン水溶液 (2260 µg/mL) を媒体とし、濃度7300 µg/mLの懸濁液として供給された。一方、銀ナノ粒子 (一次粒径4-10 nm) は、同様のシステイン水溶液を媒体とし、濃度5500 µg/mLの懸濁液として供給された。

3) 生化学的細胞毒性解析

細胞毒性は、細胞死による培養液中への乳酸脱水素酵素漏出 (LDHアッセイ)、ま

たは生細胞によるニュートラルレッド取り込み (NRアッセイ) を指標として、解析した。詳細な実験条件は、結果の項に記す。

4) 病理学的表皮傷害性および表皮侵入性解析

3Dヒト皮膚再構成系においては、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色に加え、金染色・銀染色を行い、表皮傷害性および表皮内侵入性について解析した。詳細な実験条件は、結果の項に記す。

5) その他

3Dヒト皮膚再構成系においては、今後の金・銀の含有量に関する分析学的解析に供するため、実験終了時に培地を回収すると共に、表皮組織の一部を凍結保存した。

(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) 3D ヒト皮膚再構成系における金属ナノ粒子の表皮傷害性および表皮内侵入性

金ナノ粒子については、最終濃度 1・3・7・15・31・62.5・125・250・500・1000 µg/mL (システイン最終濃度 2260 µg/mL) で 24 時間曝露した。陰性対照には蒸留水を、媒体対照にはシステイン (最終濃度 2260 µg/mL) を、それぞれ投与した。被験物質または対照物質は、いずれの場合も、3D ヒト皮膚再構成系の表皮表面に 100 µL の容量で投与した。LDH アッセイによる解析を行った結果、金ナノ粒子は、いずれの用量でも有意な表皮傷害性を示さなかった (図 2)。また、HE 染色および金染色による病理組織学的検索を行った結果、金ナノ粒子は、表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に

明らかな傷害を与えなかった(図3)。

銀ナノ粒子については、最終濃度 31・125・500・1000 µg/mL (システイン最終濃度 2260 µg/mL) で 24 時間曝露した。陰性対照には蒸留水を、媒体対照にはシステイン(最終濃度 2260 µg/mL)を、それぞれ投与した。被験物質または対照物質は、いずれの場合も、3D ヒト皮膚再構成系の表皮表面に 100 µL の容量で投与した。LDH アッセイによる解析を行った結果、銀ナノ粒子は、いずれの用量でも有意な表皮傷害性を示さなかった(図4)。また、HE 染色および銀染色による病理組織学的検索を行った結果、銀ナノ粒子は、表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった(図5)。

2) 単層培養系における金属ナノ粒子の細胞傷害性

金ナノ粒子については、最終濃度 0.3・0.7・1.5・3.1・6.2・12.5・25・50・100 µg/mL (システイン最終濃度 226 µg/mL) で 24 時間曝露した。陰性対照には蒸留水を、媒体対照にはシステイン(最終濃度 226 µg/mL)を、それぞれ投与した。被験物質または対照物質は、いずれの場合も、ウェルあたり 100 µL の培養液中に 10 µL の容量で投与した。LDH アッセイ(図6)および NR アッセイ(図7)による細胞毒性解析を行った結果、金ナノ粒子は、いずれの用量でも有意な毒性を示さなかった。

銀ナノ粒子については、最終濃度 0.3・0.7・1.5・3.1・6.2・12.5・25・50・100 µg/mL (システイン最終濃度 226 µg/mL) で 24 時間曝露した。陰性対照には蒸留水を、媒体対照にはシステイン(最終濃度 226 µg/mL)を、それぞれ投与した。被験物質または対照物質は、いずれの場合も、3D ヒト皮膚再構成系の表皮表面に 100 µL の容量で投与した。被験物質または対照物質は、いずれの場合も、ウェルあたり 100 µL の培

養液中に 10 µL の容量で投与した。LDH アッセイ(図8)および NR アッセイ(図9)による細胞毒性解析を行った結果、金ナノ粒子は、いずれの用量でも有意な毒性を示さなかった。

D. 考察

以上の結果より、金ナノ粒子・銀ナノ粒子は、少なくとも本実験条件下において、3D ヒト皮膚再構成系・単層培養系いずれでも明らかな細胞傷害性を示さず、また、3D ヒト皮膚再構成系で表皮内に侵入しないことが明らかとなった。なお、金ナノ粒子の最大無毒性量(NOEL)は、3D ヒト皮膚再構成系で 1000 µg/mL (= 5.08 mM)、単層培養系で 100 µg/mL (= 0.51 mM)であった。一方、銀ナノ粒子の NOEL は、3D ヒト皮膚再構成系で 1000 µg/mL (= 5.26 mM)、単層培養系で 100 µg/mL (= 0.53 mM)であった。

金ナノ粒子の細胞毒性量については、実験に供する金ナノ粒子の物性や細胞の種類などに依存して異なるためばらつきが大きい。種々の哺乳類細胞培養系を用いて 1 nM から 300 µM で有意に検出された例が報告されている(1-3)。これに対して、本研究では、それら先行報告よりはるかに高い用量で細胞傷害性がみられていない、このことは、本研究が実験に供した金ナノ粒子がそれら先行報告で使用されたものに比べて毒性が低いものであったか、肝(癌)細胞や再構成皮膚組織が金ナノ粒子の毒性に対して感受性が低かったか、または、それらの両者であったことを示唆する。また、3D ヒト皮膚再構成系においては、5.08 mM という莫大な用量で曝露しても表皮傷害性を示さず、表皮内に侵入しなかった。金属ナノ粒子の皮膚透過性について、現時点では透過しないという理解が支配的であるが、そうでないことを示す知見も報告されている(4-11)。したがって、本研究の結果は金ナ

ノ粒子が表皮細胞内に侵入すらできないことを明確に示したものであるが、本研究で用いた 3D ヒト皮膚再構成系は毛孔とその付随組織や汗腺などがいないため、それらを介した侵入の可能性については評価できない。しかし、先行研究の多くは、それらの経路を介した金属ナノ粒子の皮膚透過性がないか、あったとしても明らかな毒性を誘導するレベルのものでないとしている(4,6,7,10,11)。なお、ヒトや動物の皮膚には、バリア機能があり、外来化学物質に対する防御機構の一翼を担っている(12)。本研究の 3D ヒト皮膚再構成系における金ナノ粒子の表皮侵入性の欠如には、このバリア機能が再現されて関与しているものと推察される。

銀ナノ粒子の細胞毒性量についても、金ナノ粒子の場合と同様に、種々の哺乳類細胞培養系を用いて 5 nM から 2.36 μ M の 50% 毒性量が報告されている(13,14)。これに対して、本研究では、それら先行報告よりはるかに高い用量で細胞傷害性がみられていない、このことは、金ナノ粒子の場合と同様に、本研究が実験に供した銀ナノ粒子がそれら先行報告で使用されたものに比べて毒性が低いものであったか、肝(癌)細胞や再構成皮膚組織が銀ナノ粒子の毒性に対して感受性が低かったか、または、それらの両者であったことを示唆する。また、3D ヒト皮膚再構成系においては、5.26 mM という莫大な用量で曝露しても表皮傷害性を示さず、表皮内に侵入しなかった。本研究の結果は、銀ナノ粒子が表皮細胞内に侵入すらできないことを、明確に示したものである。この点に関する考察は金ナノ粒子の場合と同様であるので、ここでは繰り返さない。

本研究は、少なくとも本実験条件の下で金ナノ粒子・銀ナノ粒子の毒性が低いことを明らかにしたが、これらが明確な遺伝毒

性を持たない(15)ことを考え合わせると、金ナノ粒子・銀ナノ粒子の安全性を比較的高く評価してよいことが示唆された。

E. 結論

以上より、金ナノ粒子・銀ナノ粒子は、本実験条件下において明らかな細胞傷害性を示さず、また、表皮内に侵入しないことが明らかとなった。また、LabCyte EPI モデルは、ナノマテリアルの経皮毒性の新しい *in vitro* 評価系として利用し得るものと評価された。

F. 参考文献

- (1) Jain S, Coulter JA, Butterworth KT, Hounsell AR, McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Dickson GR, Prise KM, Currell FJ, Hirst DG and O'Sullivan JM "Gold nanoparticle cellular uptake, toxicity and radiosensitisation in hypoxic conditions." *Radiotherapy and Oncology* 110(2), 342-347, 2014.
- (2) Vetten MA, Tlotleng N, Tanner Rascher D, Skepu A, Keter FK, Boodhia K, Koekemoer LA, Andraos C, Tshikhudo R and Gulumian M "Label-free *in vitro* toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines." *Particle and Fibre Toxicology* 10:50, 2013.
- (3) Bajak E, Fabbri M, Ponti J, Gioria S, Ojea-Jiménez I, Collotta A, Mariani V, Gilliland D, Rossi F, Gribaldo L "Changes in Caco-2 cells transcriptome profiles upon exposure to gold nanoparticles." *Toxicology Letters* 233(2), 187-99, 2015.
- (4) Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC and Wong JK "The dynamic anatomy and patterning of skin." *Experimental Dermatology* 25(2), 92-98,

- 2016.
- (5) Matsuo K , Hirobe S, Okada N and Nakagawa S “Analysis of skin permeability and toxicological properties of amorphous silica particles.” *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 39 (7), 1201-1205, 2016.
 - (6) Xie G , Lu W and Lu D “Penetration of titanium dioxide nanoparticles through slightly damaged skin *in vitro* and *in vivo*.” *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials* 13(4), e356-e361, 2015.
 - (7) Shakeel M , Jabeen F , Shabbir S , Asghar MS , Khan MS and Chaudhry AS “Toxicity of nano-titanium dioxide (TiO₂-NP) through various routes of exposure: A review.” *Biological Trace Element Research* 172 (1), 1-36, 2016.
 - (8) Hirai T , Yoshikawa T, Nabeshi H, Yoshida T, Akase T, Yoshioka Y, Itoh N and Tsutsumi Y “Dermal absorption of amorphous nanosilica particles after topical exposure for three days.” *Pharmazie* 67 (8), 742-743, 2012.
 - (9) Nabeshi H , Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Matsuo K, Arimori A, Isobe M, Tochigi S, Kondoh, S, Hirai T, Akase T, Yamashita T, Yamashita K, Yoshida T, Nagano K, Abe Y, Yoshioka Y, Kamada H, Imazawa T, Itoh N, Nakagawa S, Mayumi T, Tsunoda S and Tsutsumi Y “Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application.” *Biomaterials* 32 (11), 2713-2724, 2011.
 - (10) Sadrieh N , Wokovich AM, Gopee NV, Zheng J, Haines D, Parmiter D, Siitonen PH, Cozart CR, Patri AK, McNeil SE, Howard PC, Doub WH and Buhse LF “Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles.” *Toxicological Sciences* 115 (1), 156-166, 2010.
 - (11) Wu J , Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xu H, Yang X and Zeng FD “Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure.” *Toxicological Letters* 191 (1) 1-8, 2009.
 - (12) Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC and Wong JK “The dynamic anatomy and patterning of skin.” *Experimental Dermatology* 25(2), 92-98, 2016.
 - (13) Ivask A, Juganson K, Bondarenko O, Mortimer M, Aruoja V, Kasemets K, Blinova I, Heinlaan M, Slaveykova V and Kahru A “Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells *in vitro*: A comparative review.” *Nanotoxicology* 8 (51), 57-71, 2014.
 - (14) Reidy B, Haase A, Luch A, Dawson KA, and Lynch I “Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications.” *Materials* 6 (6), 2295-2350, 2013.
 - (15) Nam S-H, Kim SW and An Y-J “No evidence of the genotoxic potential of gold, silver, zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in the SOS chromotest.” *Journal of Applied Toxicology* 33 (10), 1061-1069, 2013.

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 大久保智子, 保坂三継, 中江 大, ヒト肺上皮由来細胞 A549 における有機酸ばく露による細胞傷害に関する研究, 薬学雑誌, 2016, 136 (10), 1433-38 .
- (2) K. Horibata, A. Ukai, A. Ogata, D. Nakae, H. Ando, Y. Kubo, A. Nagasawa, K. Yuzawa, M. Honma, Absence of *in vivo* mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 *gpt* delta rats, Genes Environ., 2017, 39, 42.

2. 学会発表

- (1) Y. Totsuka, H. Sato, N. Akiba, D. Nakae, N. Suzui-Kemuriyama, M. Watanabe, K. Hayashi, Construction of novel *in vitro* evaluation systems based on the genotoxic mechanisms of nanomaterials, International Council of Chemical Associations' Long-Range Research Initiative (ICCA-LRI) and Japan's National Institute of Health Sciences (NIHS) International Workshop: Meeting the Global Challenge of Applying New Scientific Methods to Improve Environmental and Human Health Risk Assessments, 兵庫県淡路市, 2016 年 6 月 .
- (2) 北條幹, 坂本義光, 藤谷知子, 山本行男, 長谷川悠子, 多田幸恵, 久保喜一, 長澤明道, 海鉾藤文, 高橋 博, 湯澤勝廣, 安藤弘, 田中和良, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江 大, MWCNT によるラット中皮腫誘発過程の経時的解析, 第 43 回日本毒性学会学術年会, 愛知県名古屋市, 2016

年 7 月 .

- (3) 坂本義光, 広瀬明彦, 中江 大, 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を経気管反復投与したラットに見られた肺胞過形成病変に対する病理組織学的解析, 第 75 回日本癌学会総会, 神奈川県横浜市, 2016 年 10 月 .
- (4) 佐藤春菜, 坂本義光, 中江 大, 戸塚ゆかり, 多層カーボンナノチューブの線維長の違いが遺伝毒性に及ぼす影響, 日本環境変異原学会第 46 回大会, 東京都千代田区, 2016 年 11 月 .
- (5) 坂本義光, 北條 幹, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江 大, ラットにおける多層カーボンナノチューブ (CNT) の発がん性と phenyl *N-tert-butyl* nitron (PBN) 併用が及ぼす影響, 第 33 回日本毒性病理学会学術集会, 大阪府堺市, 2017 年 1 月 .
- (6) 北條幹, 坂本義光, 山本行男, 長谷川悠子, 多田幸恵, 湯澤勝廣, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大, 多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発過程の経時的観察 . 第 33 回日本毒性病理学会学術集会, 大阪府堺市, 2017 年 1 月 .

H. 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

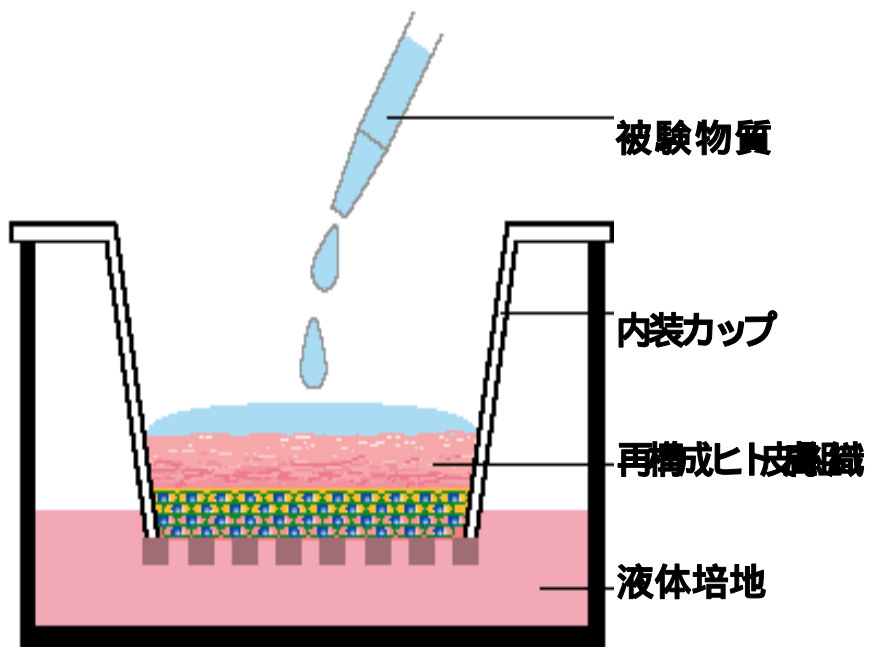


図1 . 3D ヒト皮膚再構成系としての LabCyte EPI 24 モデル

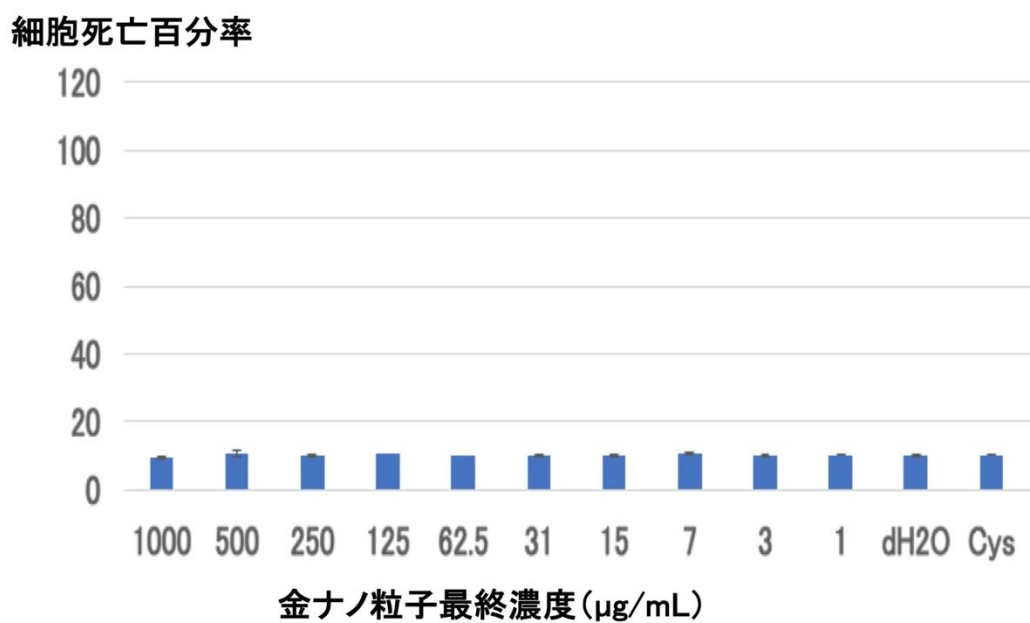


図 2 . 3D ヒト皮膚再構成系における金ナノ粒子の表皮傷害性 (LDH アッセイ) 平均 ± 標準偏差 .

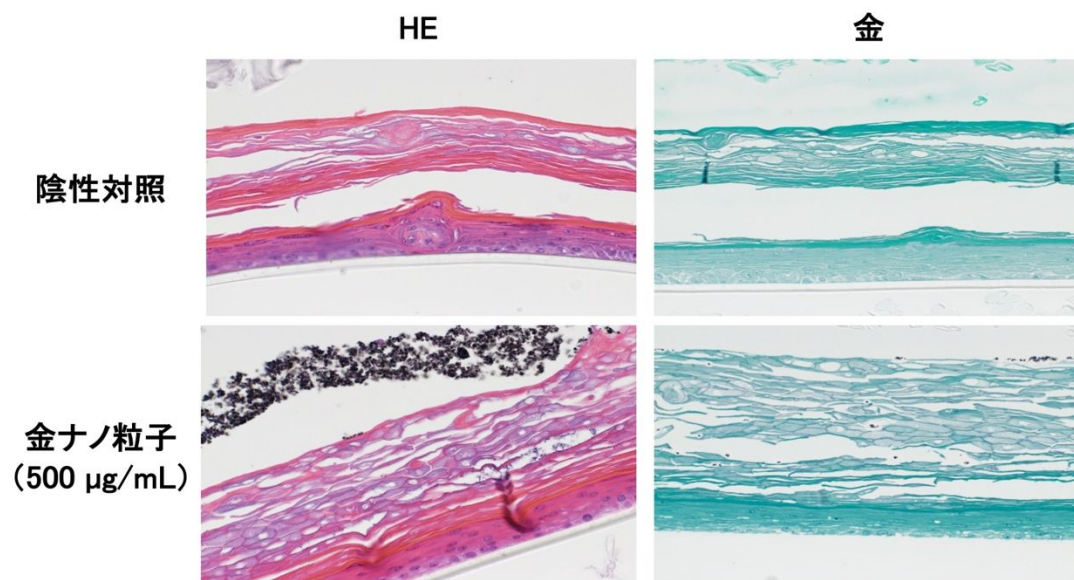


図 3 . 3D ヒト皮膚再構成系における金ナノ粒子の表皮傷害性および表皮侵入性 (HE 染色および金染色)

細胞死亡百分率

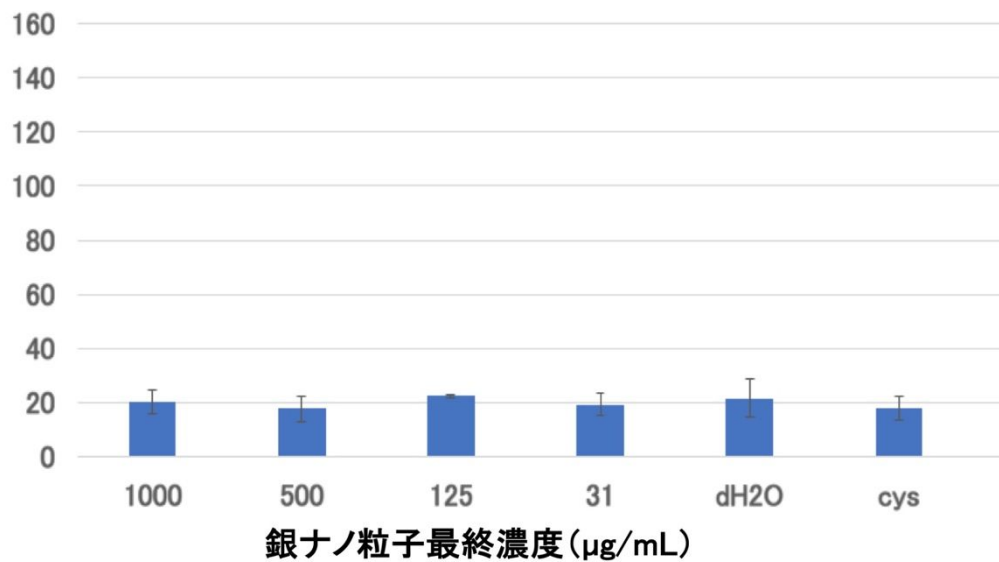


図 4. 3D ヒト皮膚再構成系における銀ナノ粒子の表皮傷害性 (LDH アッセイ) 平均 ± 標準偏差.

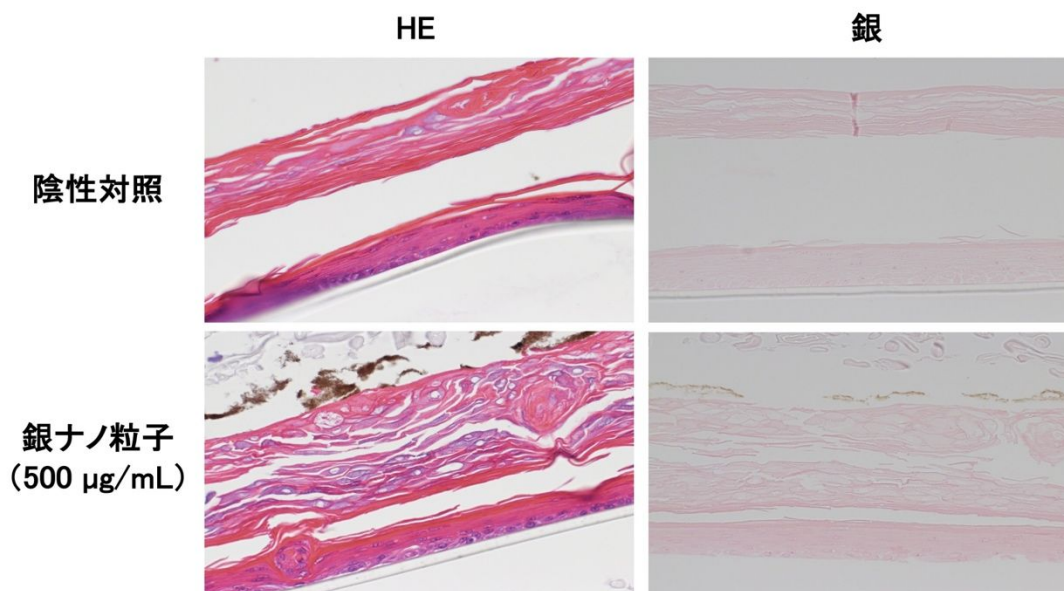


図 5. 3D ヒト皮膚再構成系における銀ナノ粒子の表皮傷害性および表皮侵入性 (HE 染色および銀染色)

細胞死亡百分率

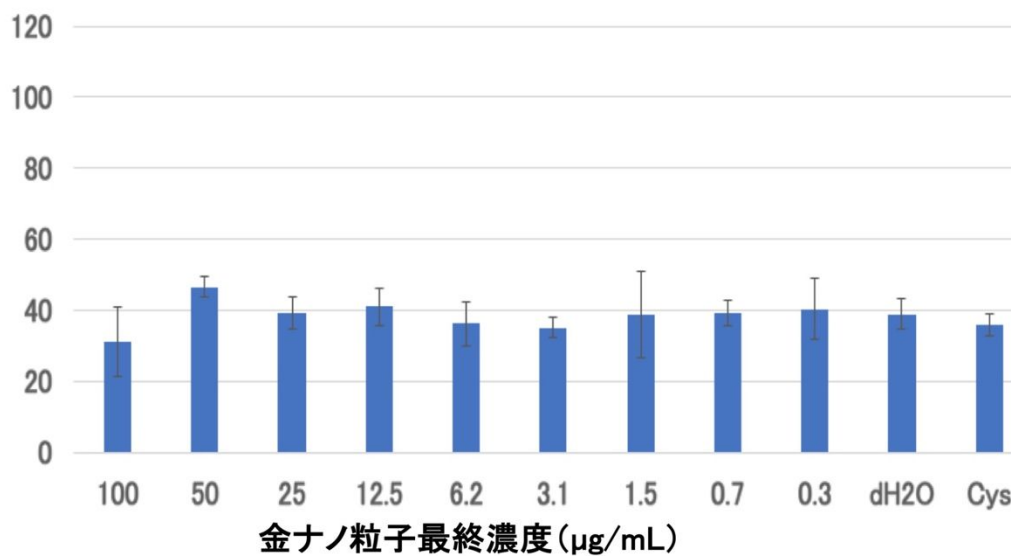


図6. 単層培養系における金ナノ粒子の表皮傷害性 (LDH アッセイ) 平均 ± 標準偏差 .

細胞生存百分率

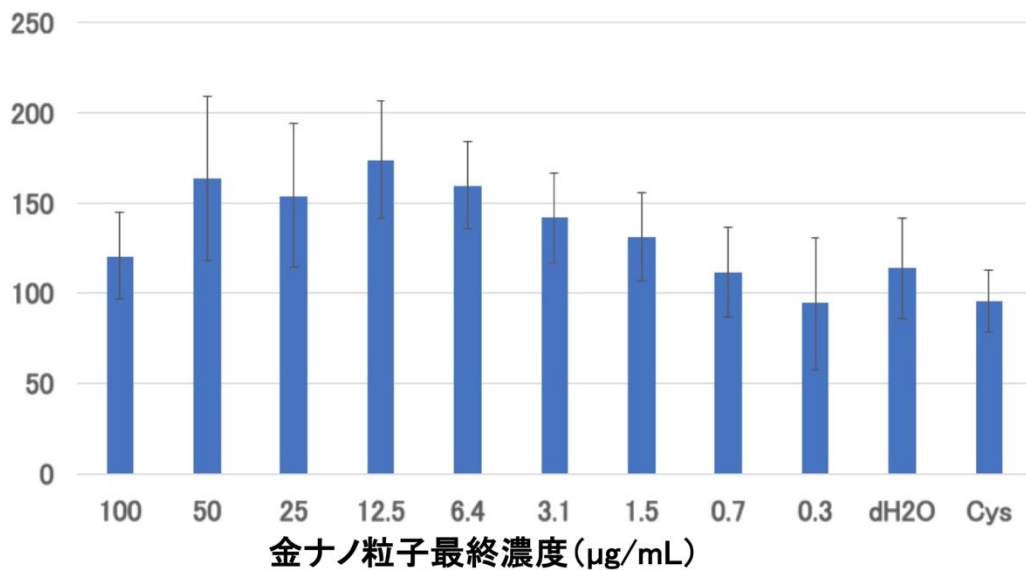


図7. 単層培養系における金ナノ粒子の表皮傷害性 (NR アッセイ) 平均 ± 標準偏差 .

細胞死亡百分率

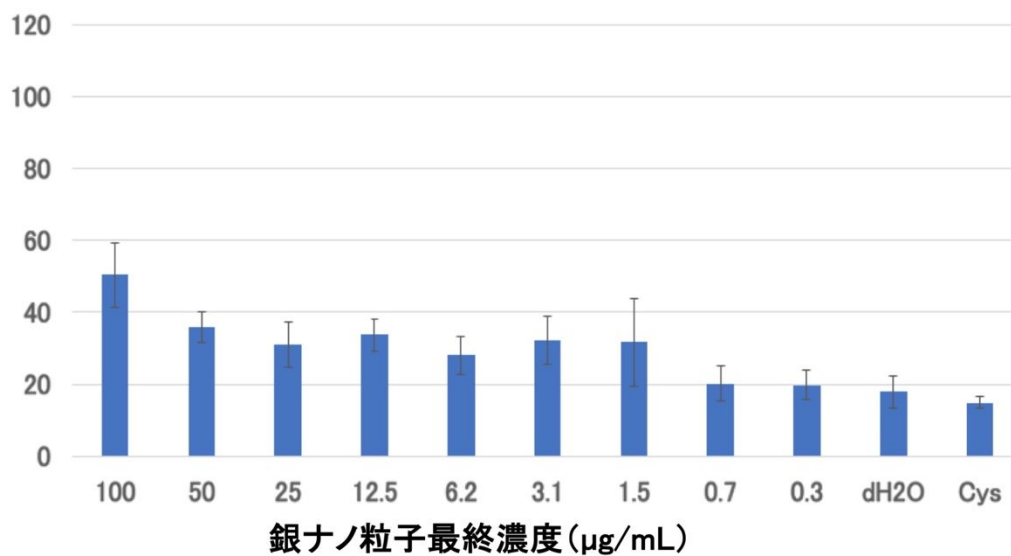


図8. 単層培養系における銀ナノ粒子の表皮傷害性 (LDH アッセイ) 平均 ± 標準偏差 .

細胞生存百分率

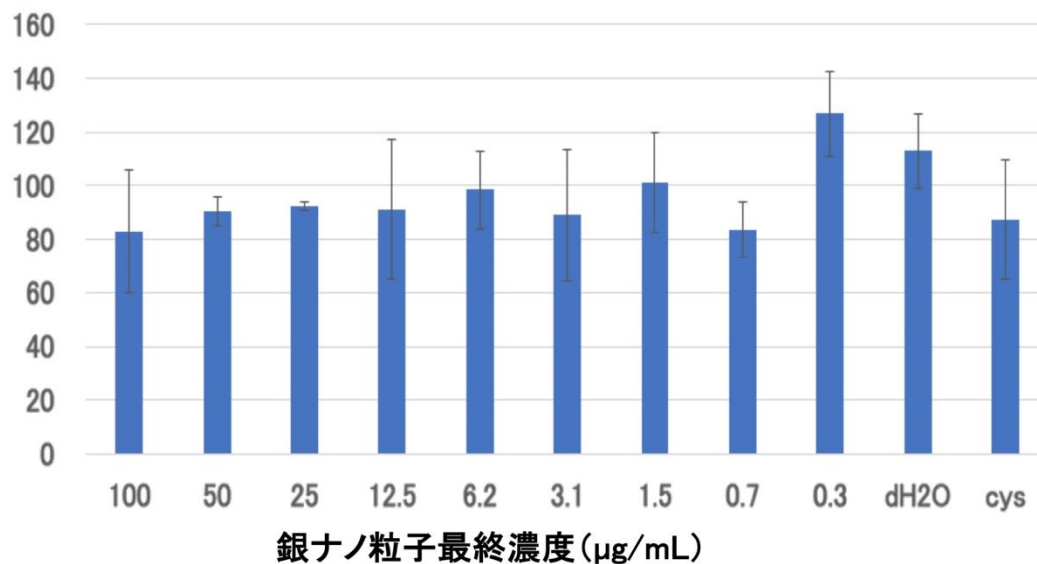


図9. 単層培養系における銀ナノ粒子の表皮傷害性 (NR アッセイ) 平均 ± 標準偏差 .