

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

研究要旨：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。本研究は、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フォルペット（農薬，陽性対照物質）とカルボキシル基による表面修飾をされた、またはされていないマグネタイトの表皮傷害性と表皮侵入性について、正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NKEK（クラボウ）またはヒト肝癌由来細胞 HepG2 の単層培養系において、それら化学物質の細胞傷害性について、それぞれ解析した。その結果、再構成表皮は化学物質の皮膚毒性の強さに応じた傷害性を示し、マグネタイトは単層培養ケラチノサイトに対して弱い傷害性を示した。表皮の重層構造は化学物質の皮膚毒性に対する防御効果があり、（成熟した）角質層は当該防御効果を増強するものと判明した。したがって、皮膚一般毒性を *in vitro* で評価する目的に対して、単層培養系のみでは不十分であり、3D 皮膚再構成系を用いることが有用である可能性が示された。再構成系の表皮組織は化学物質の傷害性に対して一定の「バリア機能」を有しており、当該機能の発揮には成熟した角質層の存在が（少なくとも部分的に）関与している。表皮の重層構造や（成熟した）角質層の存在は、金属ナノ粒子の表皮通過を必ずしも防御できないことが判明した。しかし、金属ナノ粒子の表皮通過性には物理化学的性質（今回の場合はマグネタイトの表面修飾の有無）が関与し、その状況（今回の場合は、マグネタイトの表面修飾がないこと）によっては表皮の重層構造や（成熟した）角質層の存在が表皮通過を防御できることも判明した。マグネタイトの表面修飾は、単層培養ケラチノサイト傷害性を減弱させ、また、再構成系における表皮組織通過性を獲得させた。以上より、3D ヒト皮膚再構成系は、*in vivo* に外挿できる皮膚一般毒性評価系として有用である可能性が示された。

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

煙山 紀子 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 助教

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

1-1) 3Dヒト皮膚再構成系

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。実験時の培養条件は、温度37°C、受動湿潤、気相条件95%空気・5%二酸化炭素とした。なお、実験には、角質層が成熟した13日培養品のほか、角質層が未成熟の3日培養品および6日培養品を用いた。

1-2) 単層培養系

単層培養系としては、正常ヒト表皮由来ケラチノサイトNKEK(クラボウ)またはヒト肝癌由来細胞HepG2を、適宜継代したものを用いた。実験時の培養条件は、前項と同様とした。

2) 被験物質

2-1) 陽性対照物質

陽性対照物質としては、農薬として用いられるフタルイミド系殺菌剤で、皮膚毒性が報告されているフォルペット(*N*-(トリクロメチルチオ)フタルイミド)(シグマ・アルドリッチ)を、ジメチルスルホキシド(DMSO)を溶媒として用いた。

2-2) 金属ナノ粒子

マグネタイト(酸化鉄ナノ粒子)は、本研究の研究代表者である渡邊 昌俊 博士(三重大学大学院医学系研究科)が、本研究班全体に分配したものである。詳細は、渡邊博士の報告書を参照されたい。マグネタイトは、一次粒径1-100 nmのマグヘマイト(Γ - Fe_2O_3)およびマグネタイト(Fe_2O_4)粒子から成り、蒸留水(pH 9.6)を媒体とし、表面をカルボキシル基で修飾されたもの(表面修飾マグネタイト)が2.2%、されていないもの(表面非修飾マグネタイト)が2%の濃度の懸濁

液として供給された。

3) 実験および解析

被験物質への曝露は、3Dヒト皮膚再構成系において表皮組織上面から(図1)、単層培養系において培地中へ、それぞれ行った。詳細な実験条件は、結果の項に記す。

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)、生細胞によるニュートラルレッド取り込み(NRアッセイ)、生細胞による3-(4,5-ジ-メチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム臭化物取り込み(MTTアッセイ)、生細胞によるレザズリン取り込み(Alamar Blueアッセイ)を指標として、それぞれ生化学的に解析した。

3Dヒト皮膚再構成系においては、さらに、以下の解析を行った。

3-1) ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い表皮傷害性および表皮内侵入性について病理組織学的に解析した。

3-2) マグネタイトの表皮透過性について解析するため、培地を回収して鉄の含有量をICP-MSにより測定した(東海技術センター)。

3-3) RNAを抽出し、表皮角質層の構成蛋白で皮膚の「バリア機能」に関与するとされるフィラグリン(FLG)、細胞接着因子で同じく皮膚の「バリア機能」に関与するクローディン1(CLDN1)、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子アルファ($\text{TNF-}\alpha$)遺伝子発現をreal-time PCRで解析した。

(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) フォルペット

1-1) 3Dヒト皮膚再構成系

フォルペットは、最終濃度0・100・1000・2000(遺伝子発現解析のみ1500) $\mu\text{g}/\text{mL}$ で24時間

曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)では2000 µg/mLのみで、角質非成熟再構成系の6日培養品では1000 µg/mL以上で、それぞれ強い細胞毒性を示した(図2)。

病理組織学的解析では、角質層成熟再構成系(13日培養品)において、2000 µg/mL群のみで基底層細胞の配列の乱れと、有棘層・基底層細胞の肥大を観察した(図3)。

遺伝子発現については、角質層成熟再構成系(13日培養品)において、FLGとCLDN1に関して100 µg/mL以上で濃度依存的に減弱し、一方、TNF-αに関して1000 µg/mL以上で増強した(図4)。

1-2) NKEK単層培養系

フォルペットは、最終濃度0・1・10・30・60・100 µg/mLで24時間曝露した。MTTアッセイを試みた結果、30 µg/mL以上で強い細胞毒性を示した(図5)。

1-3) HepG2単層培養系

フォルペットは、最終濃度0・1・10・30・60・100 µg/mLで24時間曝露した。MTTアッセイを試みた結果、60 µg/mL以上で強い細胞毒性を示した(図5)。

2) マグネタイト

2-1) 表面修飾マグネタイト

2-1-1) 3D皮膚再構成系

表面修飾マグネタイトは、最終濃度0・2・6.7・20 mg/mLで24時間曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)(図6)・角質非成熟再構成系(6または3日培養品)のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった。

病理組織学的解析において、表面修飾マグネタイトは、角質層成熟再構成系(13日培養品)の表皮内に侵入せず、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7)。

ICP-MS解析は、表面修飾マグネタイトの投与用量に依存して、角質層成熟再構成系(13日培養品)培地中に鉄を検出した(図8)。

遺伝子発現については、角質層成熟再構成系(13日培養品)の20 mg/mL群において、FLGに関して低下し、CLDN1とTNF-αに関して変化しなかった(図9)。

2-1-2) NKEK単層培養系

表面修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 µg/mLで24または72時間曝露した。Alamar Buleアッセイを試みた結果、24時間培養ではいずれの用量でも細胞毒性を示さなかったが、72時間培養では200 µg/mL群で強い細胞毒性を示した(図10)。

2-1-3) HepG2単層培養系

表面修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 µg/mLで24または72時間曝露した。Alamar Buleアッセイを試みた結果、24または72時間培養のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図11)。

2-2) 表面非修飾マグネタイト

2-2-1) 3D皮膚再構成系

表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・2・6.7・20 mg/mLで24時間曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)(図6)・角質非成熟再構成系(6または3日培養品)のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった。

病理組織学的解析において、表面非修飾マグネタイトは、角質層成熟再構成系(13日培養品)の表皮内に侵入せず、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7)。

ICP-MS解析は、表面非修飾マグネタイトのいずれの用量でも、角質層成熟再構成系(13日培養品)培地中に鉄を検出なかった(図8)。

遺伝子発現については、角質層成熟再構成系(13日培養品)の20 mg/mL群において、FLGに関して低下し、CLDN1とTNF-αに関して変化しなかった(図9)。

2-2-2) NKEK単層培養系

表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 µg/mLで24または72時間曝露した。Alamar Buleアッセイを試みた結果、24時間培

養では200 µg/mL群で、72時間培養では100および200 µg/mL群で用量依存性に、それぞれ強い細胞毒性を示した(図12)。

2-2-3) HepG2単層培養系

表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 µg/mLで24または72時間曝露した。Alamar Blueアッセイを試みた結果、24または72時間培養のいずれにおいても、いずれの用量でも明らかな細胞毒性を示さなかった(図13)。

D. 考察

本研究で用いた、ヒト3D皮膚再構成系は、培養カップの底にメンブレンフィルターがあり、その上に表皮細胞が培養されている。表皮細胞は、*in vivo*の場合と同様、上部に向かって増殖・分化し、培養時間経過と共に表層部に角質層を構築する。したがって、組織学的には、ヒト正常皮膚と類似する。J-TEC, LabCyte EPI-MODELは他の表皮組織のみタイプのヒト3D皮膚再構成系に類似し、OECD TG431 (*in vitro*皮膚腐食性試験)には記載されていないものの、OECD TG439 (*in vitro*皮膚刺激性試験)には後から記載された。なお、OECD TG431/439は、定量的評価ができないという欠点がある。

フォルペットは、フタルイミド系殺菌剤(農薬)で、皮膚傷害性がある。角質層成熟再構成系(13日培養品)では2000 µg/mLの24時間曝露で細胞毒性を示したが、角質層未熟再構成系(6日培養品)では1000 µg/mL、単層培養ヒトケラチノサイトでは30 µg/mLから細胞毒性を示した。病理組織学的には、角質層成熟再構成系・2000 µg/mLの24時間曝露で、表皮細胞の変性がみられた。角質層成熟再構成系・2000 µg/mLの24時間曝露では、細胞毒性が検出できない100 µg/mLの濃度より濃度依存性に角質層バリア機能を示すFLGと、基底層のタイトジャンクションに関わるCLDN1の発現が減弱し、炎症性サイトカインであるTNF- α の発現が増強した。加えて、フォルペットは、ケラチノサイト単層培養系において、3D皮膚再構成系より強い細胞毒性を示

す。以上より、表皮の重層構造はフォルペットの細胞毒性に対して防御効果を発揮し、(成熟した)角質層はさらに当該防御効果を増強する「バリア機能」を發揮することが示唆された。

表面修飾マグネタイトは角質層成熟再構成系で表皮組織を傷害しなかったが、単層培養ケラチノサイトを傷害し、角質層成熟再構成系の培地においては鉄が検出された。角質層成熟再構成系で、FLGの発現が減少した。したがって、表面修飾マグネタイトはケラチノサイトに対する毒性があるが、表皮の重層構造はその細胞毒性に対して防御効果を發揮するものの、角質層の存在や表皮の重層構造はこの物質の表皮通過を防ぐことができないものと示唆された。表皮通過性については、後述の通り表面非修飾マグネタイトが培地に検出されなかったことから、表皮とカップの間をすり抜けたことによるアーティファクトでないことが担保されている。表皮通過性は、表面修飾マグネタイトが真皮細胞を傷害したり、*in vivo*なら脈管に入って全身影響を發揮したりする恐れを否定できないことを示唆している。

表面非修飾マグネタイトは角質層成熟再構成系で表皮組織を傷害しなかったが、単層培養ケラチノサイトを表面修飾マグネタイトより強く傷害し、しかし、角質層成熟再構成系の培地においては鉄が検出されなかった。したがって、表面非修飾マグネタイトはケラチノサイトに対する毒性が表面修飾マグネタイトより強く、表皮の重層構造はその細胞毒性に対して防御効果を發揮し、また、角質層の存在や表皮の重層構造は「バリア機能」を發揮して、この物質の表皮通過を防ぐことができるものと示唆された。

E. 結論

成熟した角質または未成熟な角質を持つヒト3D皮膚再構成系は、ヒトケラチノサイト単層培養系と併用することにより、ナノマテリアルを含む化学物質の皮膚一般毒性を定量的に評価する系として有用である可能性が示された。

再構成表皮は化学物質の皮膚毒性の強さに応じた傷害性を示し、金属ナノ粒子はいずれも皮膚傷害性が低かったが、マグネタイトは単層培養したケラチノサイトに対して弱い傷害性を示した。

表皮の重層構造は化学物質の皮膚毒性に対する防御効果があり、(成熟した)角質層は当該防御効果を増強するものと判明した。したがって、皮膚一般毒性を*in vitro*で評価する目的に対して、単層培養系のみでは不十分であり、3D皮膚再構成系を用いることが有用である可能性が示された。

再構成系の表皮組織は化学物質の傷害性に対して一定の「バリア機能」を有しており、当該機能の発揮には成熟した角質層の存在が(少なくとも部分的に)関与している。

表皮の重層構造や(成熟した)角質層の存在は、金属ナノ粒子の表皮通過を必ずしも防御できないことが判明した。しかし、金属ナノ粒子の表皮通過性には物理化学的性質(今回の場合はマグネタイトの表面修飾の有無)が関与し、その状況(今回の場合は、マグネタイトの表面修飾がないこと)によっては表皮の重層構造や(成熟した)角質層の存在が表皮通過を防御できることも判明した。

マグネタイトの表面修飾は、単層培養ケラチノサイト傷害性を減弱させ、また、再構成系における表皮組織通過性を獲得させた。

以上より、3Dヒト皮膚再構成系は、*in vivo*に外挿できる皮膚一般毒性評価系として有用である可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) E. Fukai, H. Sato, M. Watanabe, D. Nakae, Y. Totsuka. Establishment of an *in vivo* simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci* 109, 1024-31, 2018.

(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* 39, 4, 2017.

(3) 多田幸恵, 中江 大, 北條 幹, 湯澤勝廣, 安藤 弘, 久保喜一, 長澤明道, 海鉦藤文, 長谷川悠子, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子. NNK イニシエートによる A/J マウスの肺における磁性ナノ粒子マグネタイト気管内投与の影響. 東京都健安研セ研究年報 68, 277-84, 2017.

2. 学会発表

(1) 坂本義光, 北條 幹, 鈴木俊也, 猪又明子, 広瀬明彦, 中江 大. 多層カーボンナノチューブの経気管反復投与によりラット肺に誘発された増殖性病変の免疫組織化学解析. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2018 年 1 月 26 日, 沖縄県那覇市).

(2) 北條 幹, 坂本義光, 山本行男, 長谷川悠子, 村上詩歩, 前野 愛, 広瀬明彦, 中江 大. ラットにおける多層カーボンナノチューブおよびクリソタイル誘発中皮腫の病理学的性状の比較. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2018 年 1 月 25 日, 沖縄県那覇市).

(3) H. Sato, Y. Sakamoto, D. Nakae, M. Watanabe, Y. Totsuka. Differences in physicochemical characteristics on genotoxic potency of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). The 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens with 33rd Annual Meeting of Korean Society of Toxicology/Korean Environmental Mutagen Society(2017 年 11 月 12-16 日, 大韓民国仁川広域(Incheon) 市).

- (4) 堀端克良, 鵜飼明子, 小縣昭夫, 中江大, 安藤 弘, 久保喜一, 長澤明道, 湯澤勝廣, 本間正充. F344 *gpt* delta rats を用いた多層カーボンナノチューブ単回気管内投与による *in vivo* 遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第 46 回大会 (2017 年 11 月 6-7 日東京都千代田区).
- (5) 坂本義光, 広瀬明彦, 中江大. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の経気管投与ラットに見られた肺胞過形成病変の免疫組織学的性状. 第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年 9 月 29 日, 神奈川県横

浜市).

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

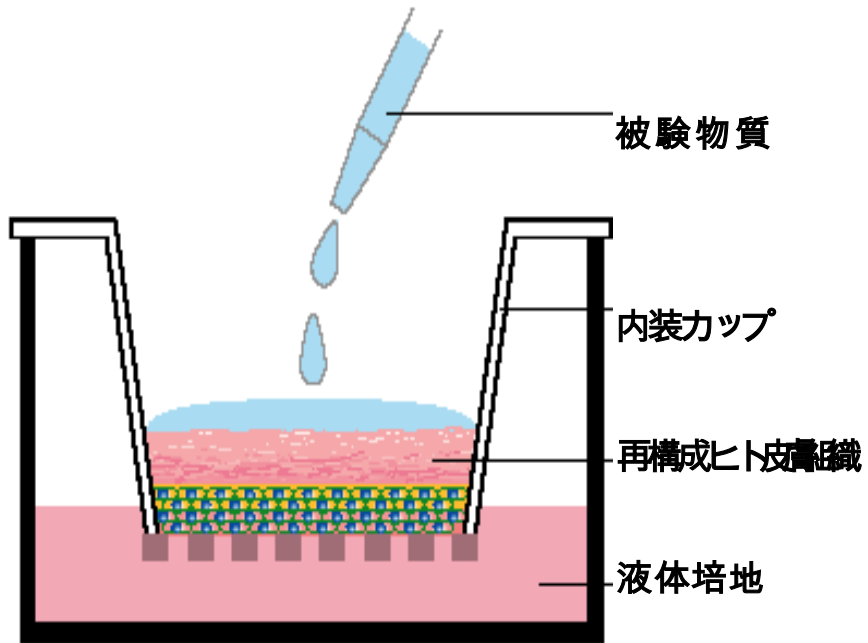
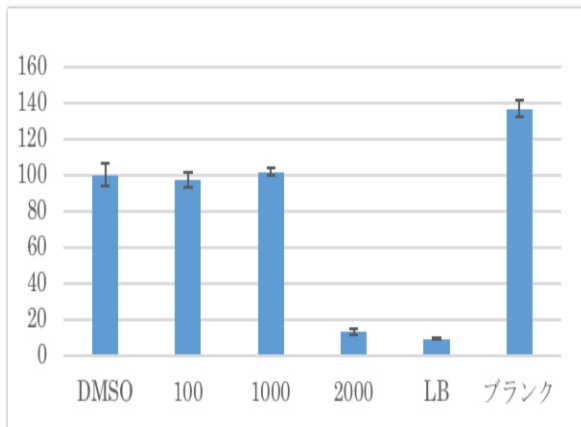
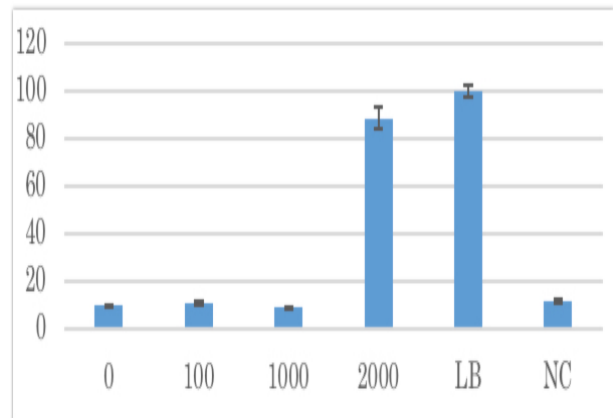


図 1. LabCyte EPI 24 モデル

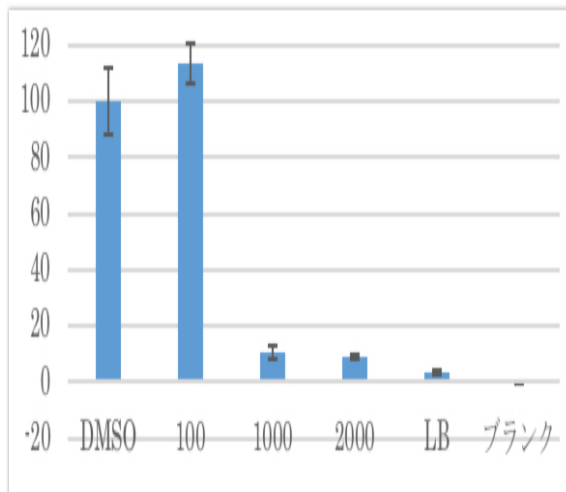
13 日培養品
MTT アッセイ



LDH アッセイ



6 日培養品
MTT アッセイ



LDH アッセイ

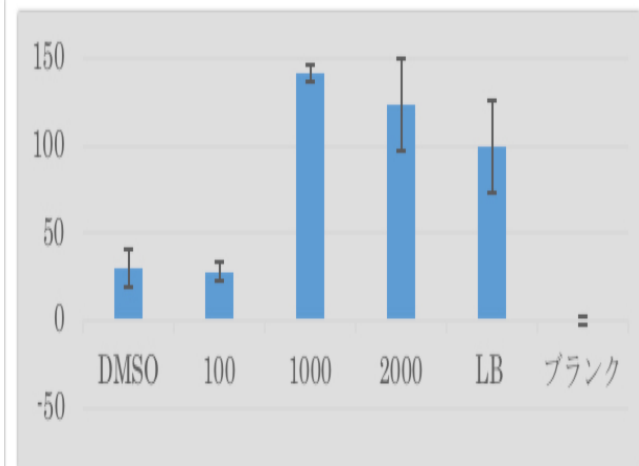


図 2. フォルペット, 3D 皮膚再構成系, 細胞毒性(縦軸, %;横軸, $\mu\text{g}/\text{mL}$)

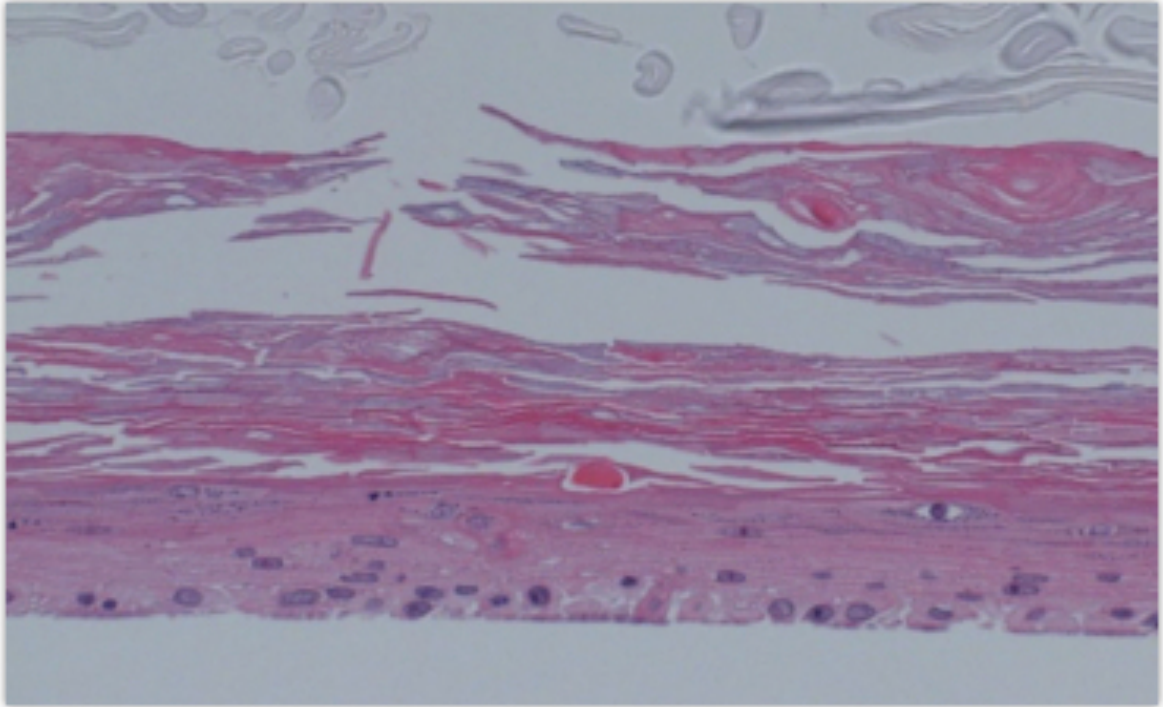
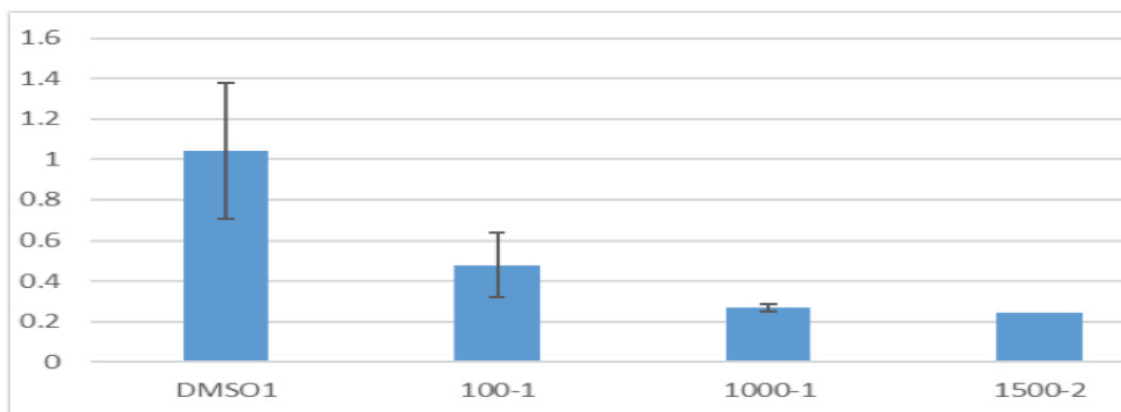


図 3. フォルペット, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 病理組織学的解析 (HE; 2000 $\mu\text{g/mL}$)

FLG
CLDN1



TNF- α

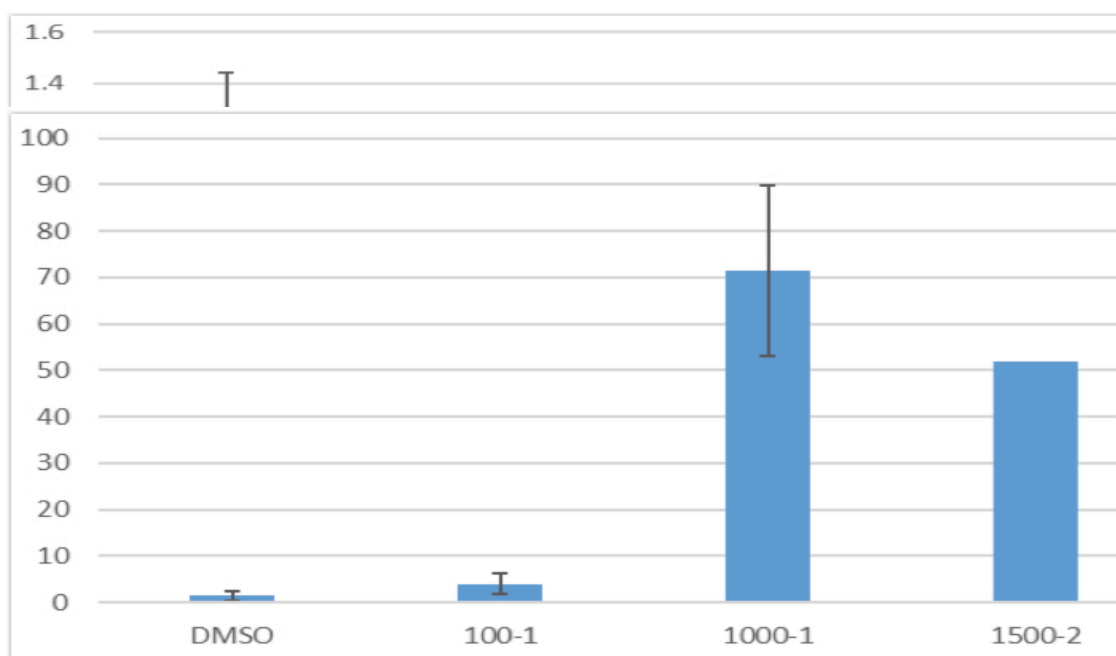
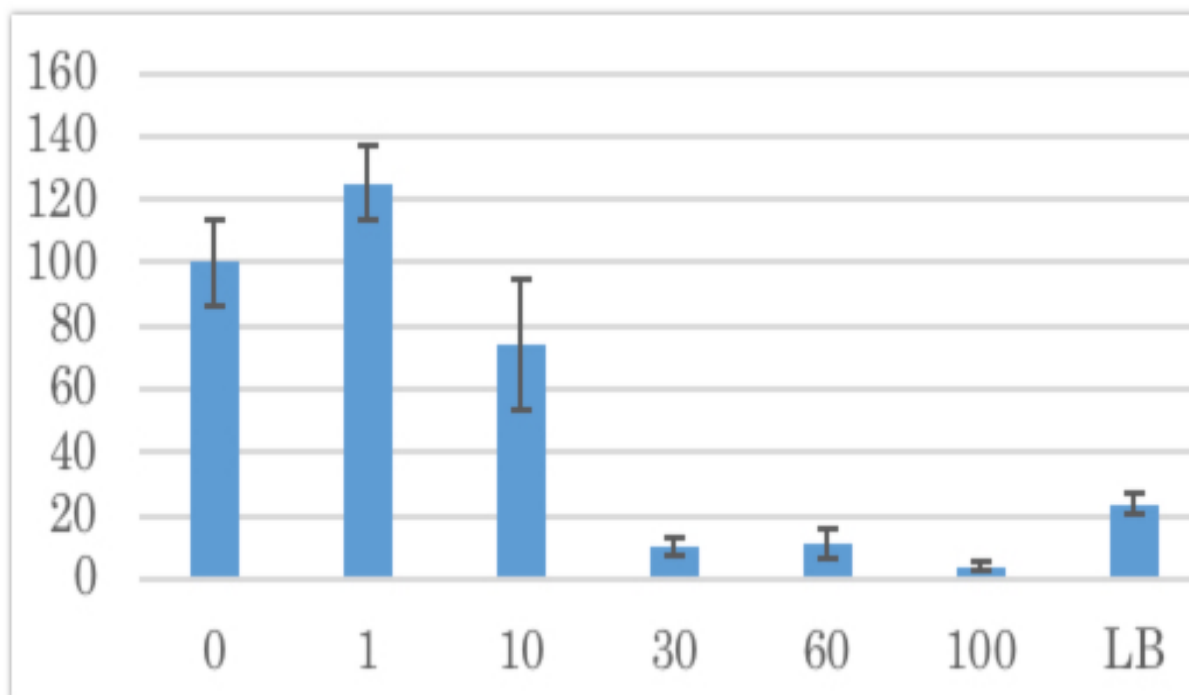


図 4. フォルペット, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 遺伝子発現(縦軸, 任意単位;横軸, $\mu\text{g/mL}$)

NKEK



HepG2

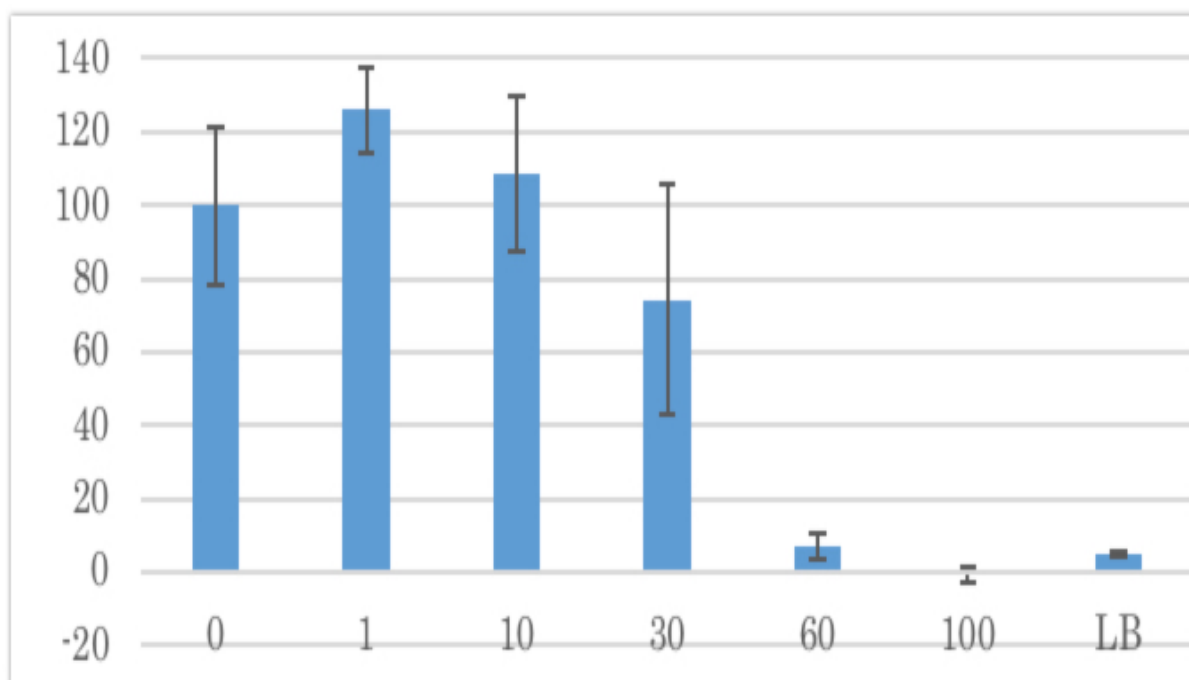
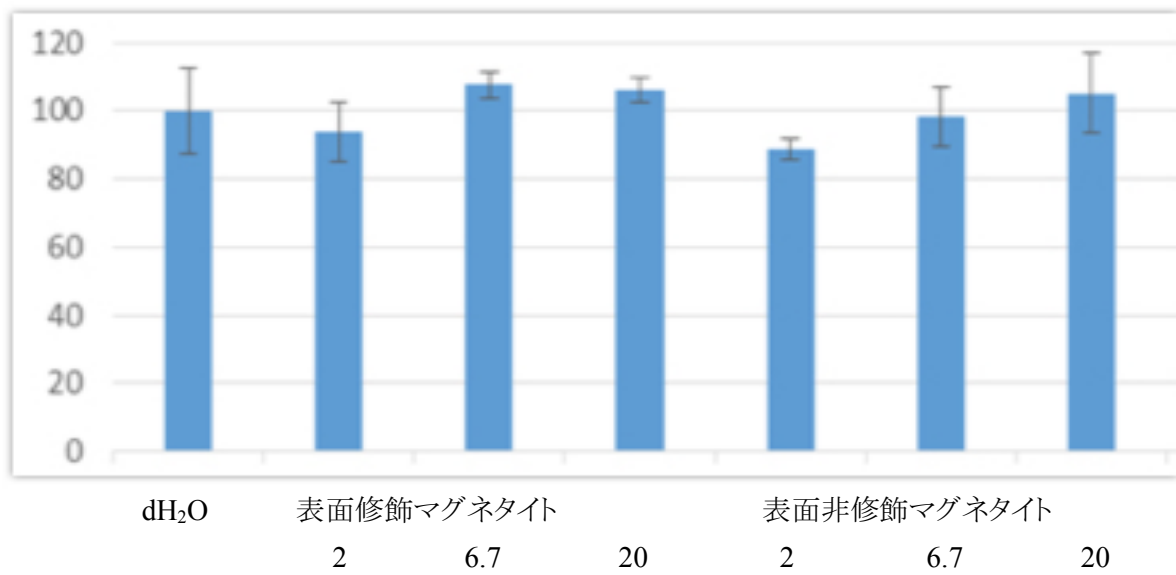


図 5. フォルペット, 単層培養系, 細胞毒性 (MTT アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

MTT アッセイ



LDH アッセイ

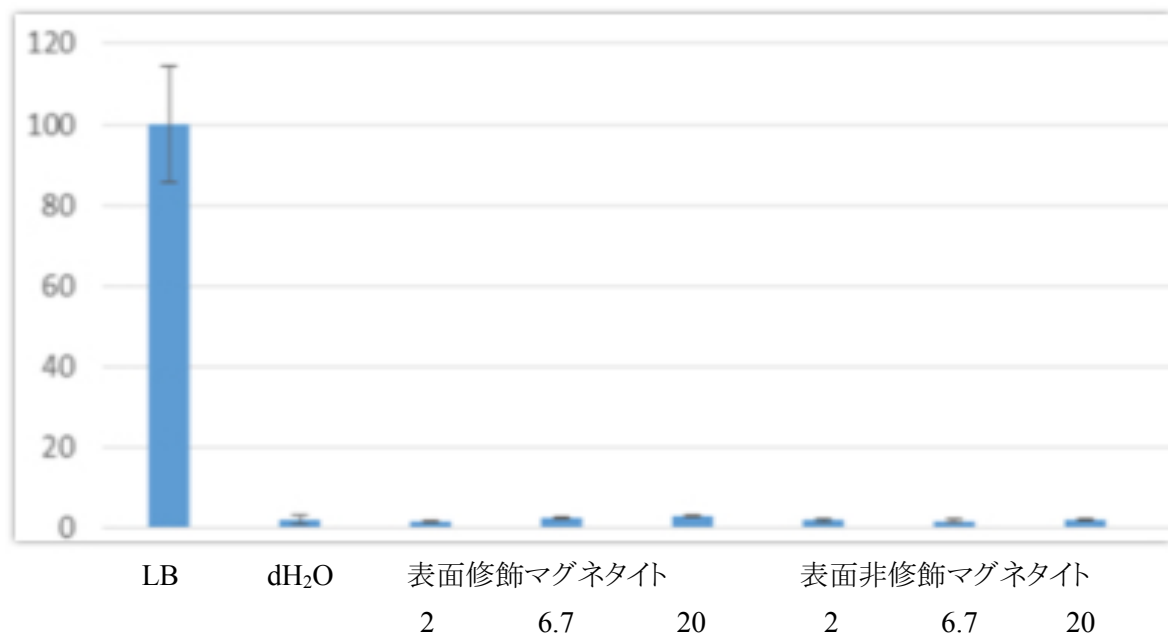
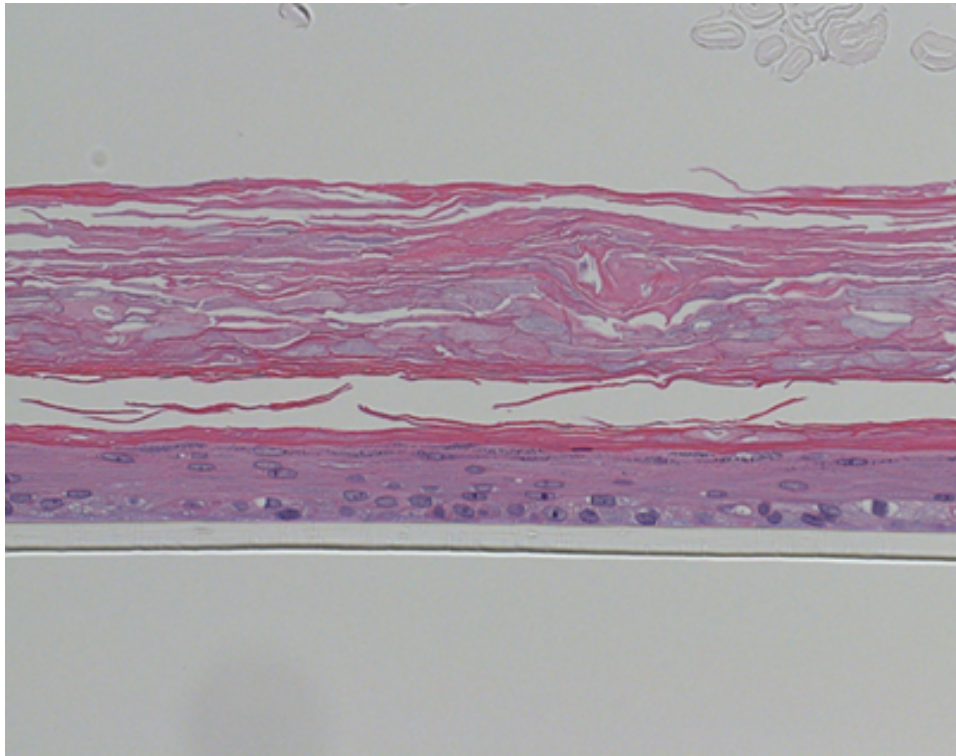


図 6. マグネタイト, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 細胞毒性 (縦軸, %; 横軸, mg/mL)

表面修飾マグネタイト



表面非修飾マグネタイト

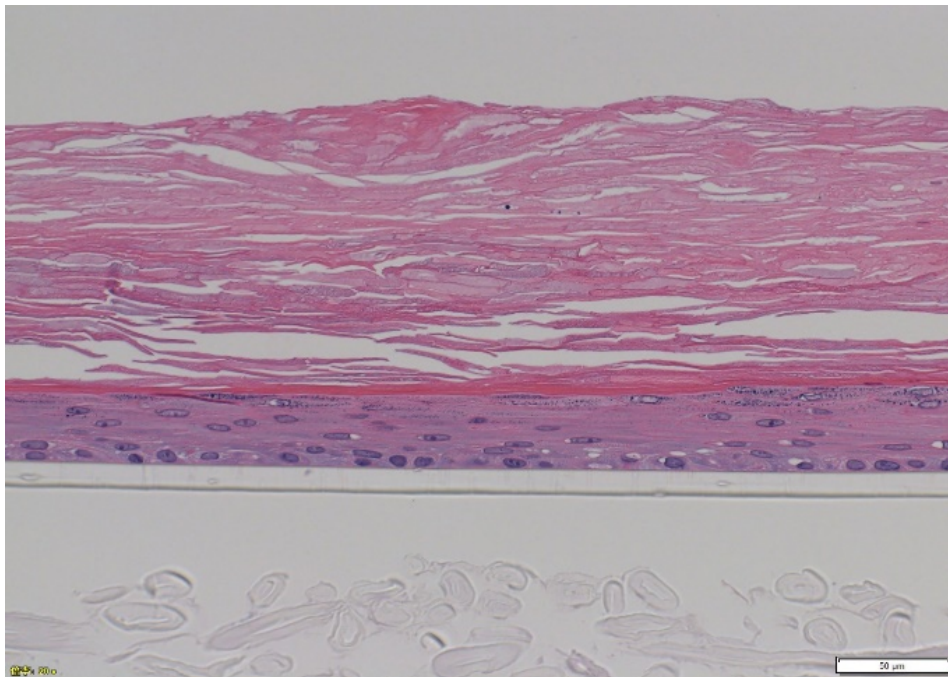


図 7. マグネタイト, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 病理組織学的解析 (HE; 20 mg/mL)

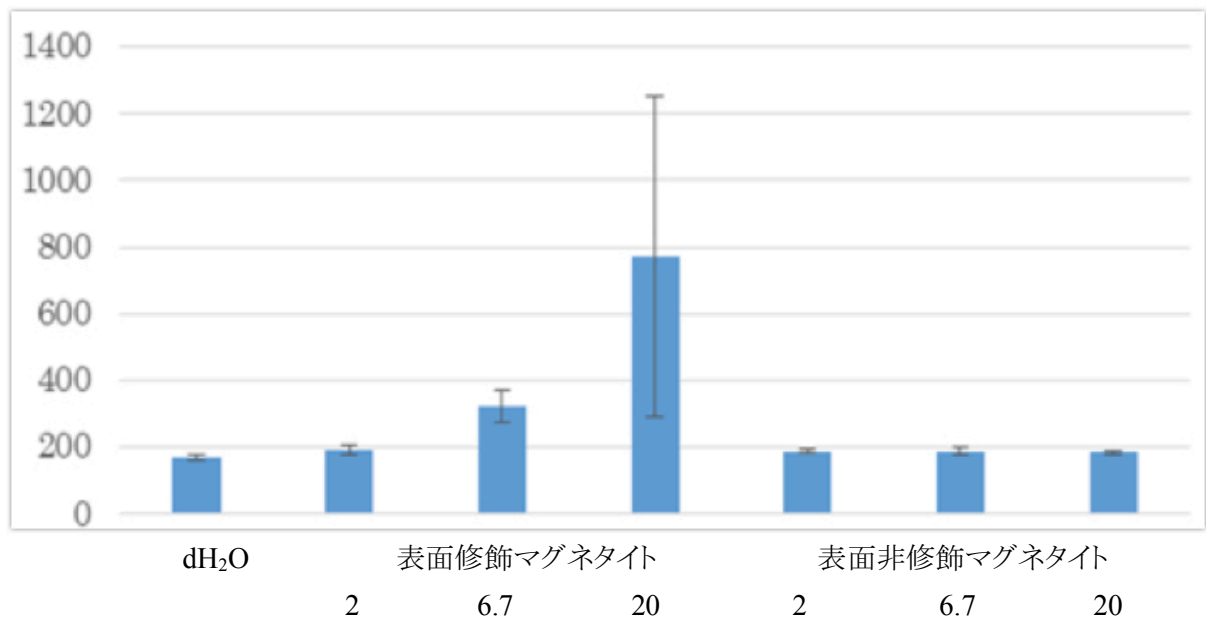
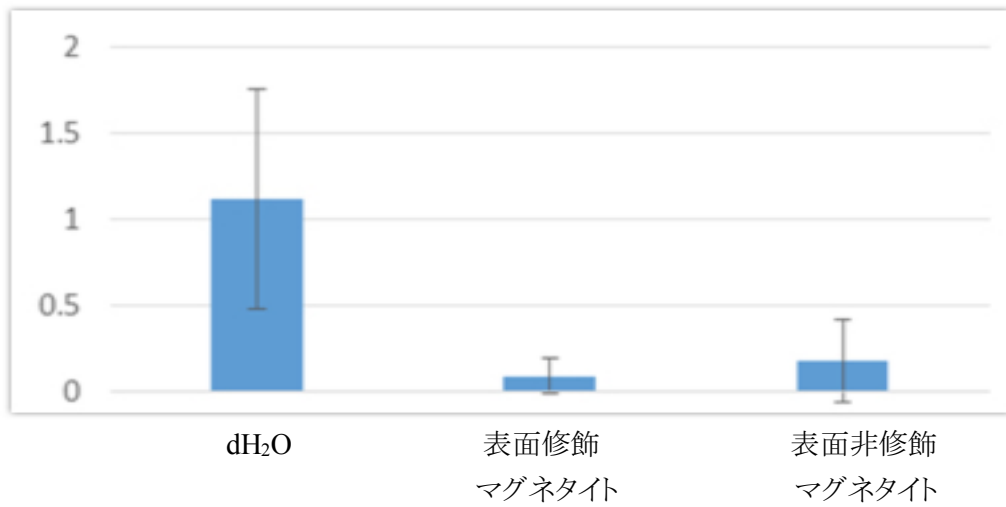
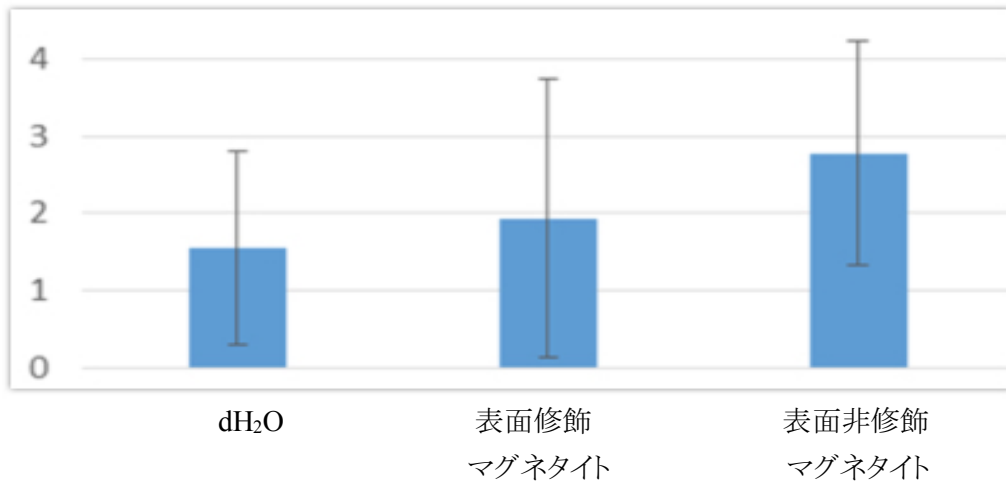


図 8. マグネタイト, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 培地中铁含有量(縦軸, μg/kg;横軸, mg/mL)

FLG



CLDN1



TNF- α

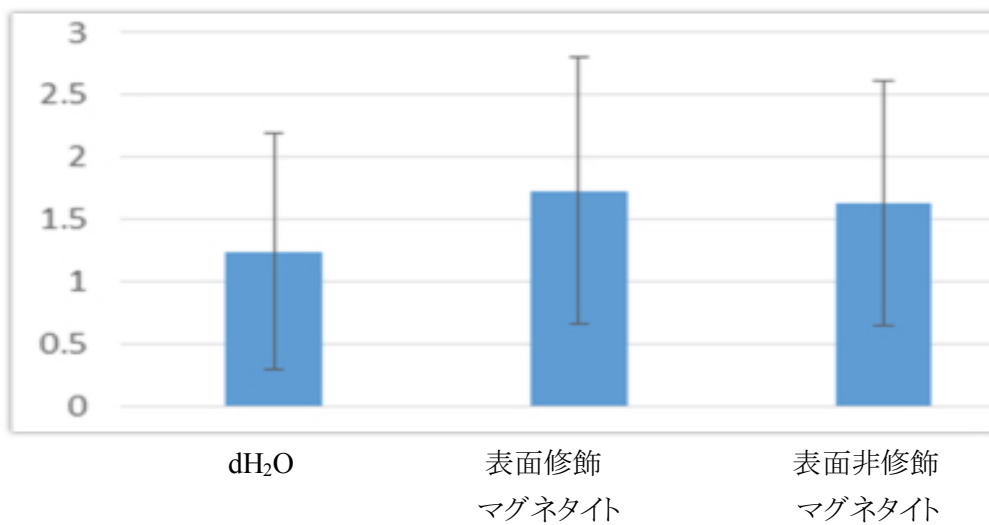
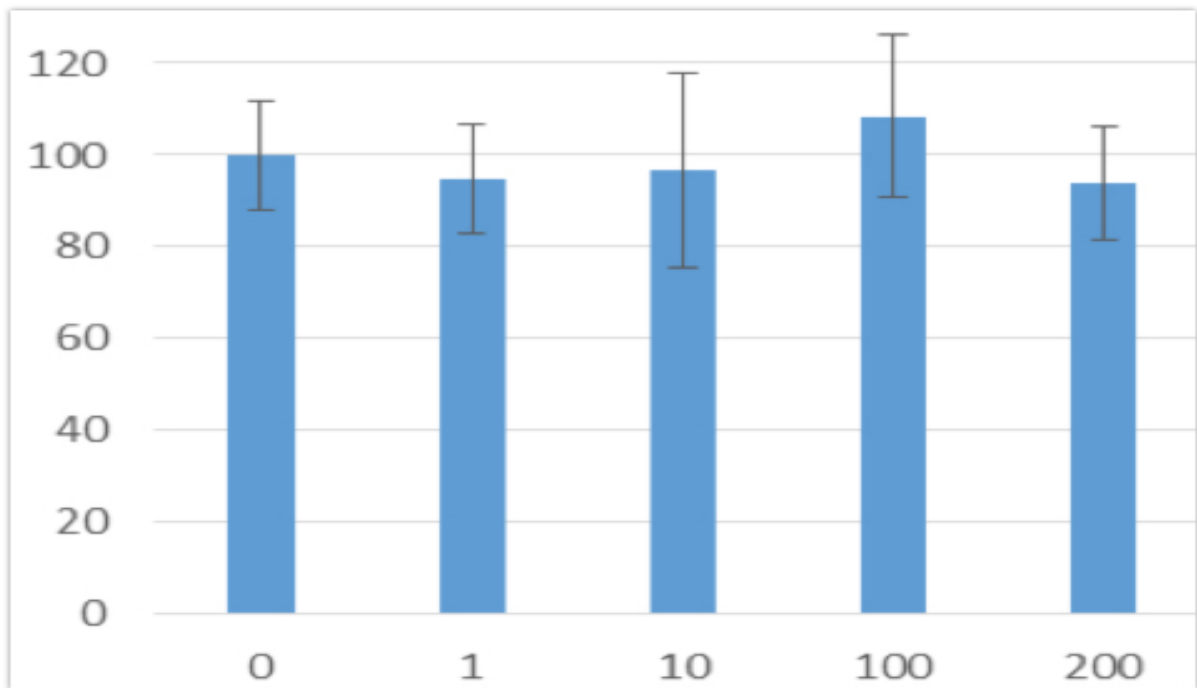


図 9. マグネタイト, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 遺伝子発現 (20 mg/mL; 縦軸, 任意単位; 横軸, $\mu\text{g/mL}$)

24 時間培養



72 時間培養

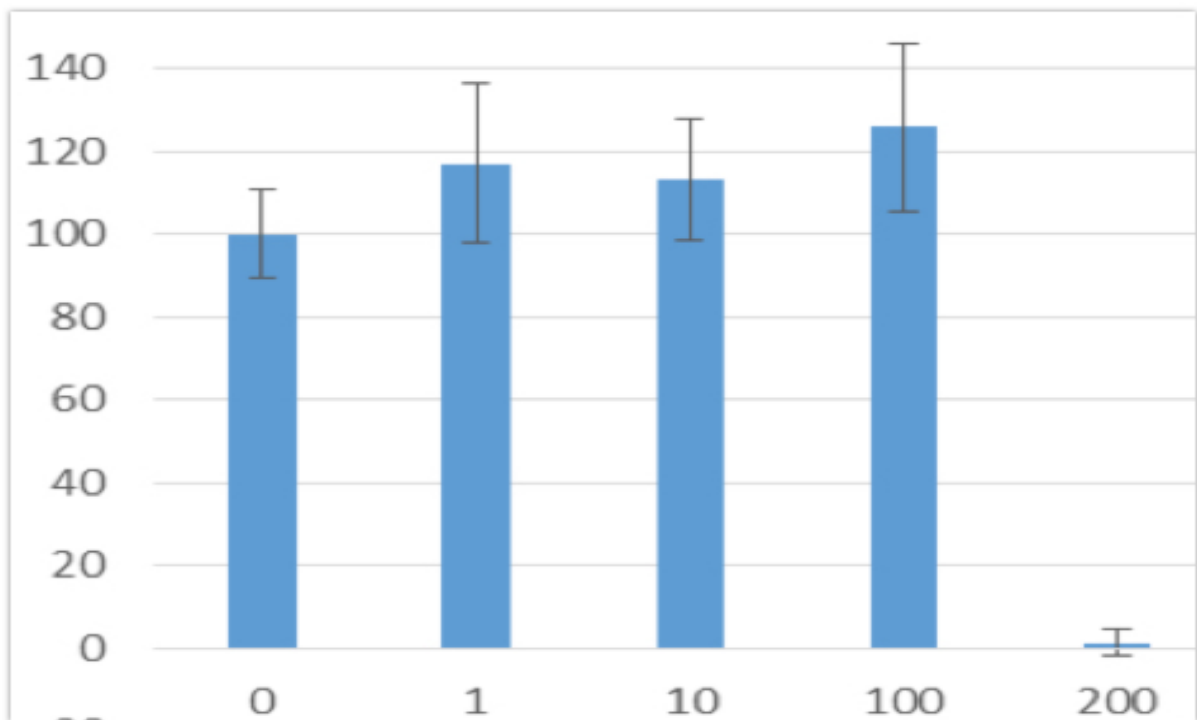
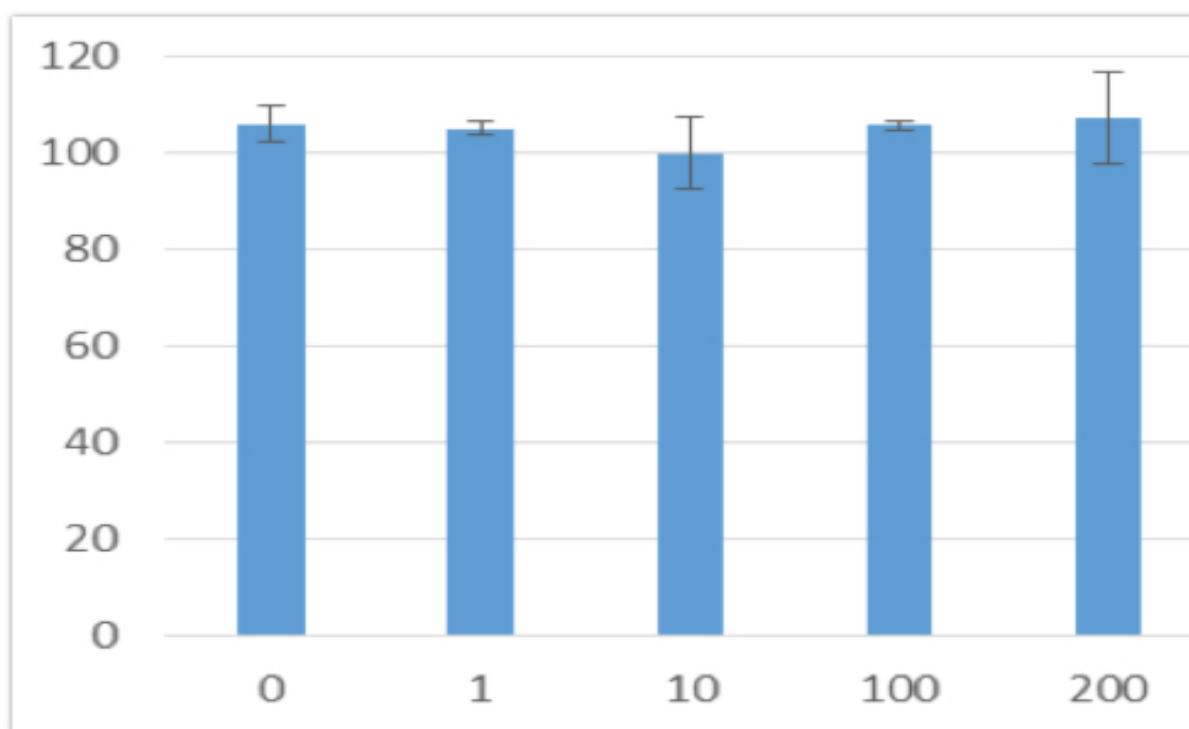


図 10. 表面修飾マグネタイト, NKEK 単層培養系, 細胞毒性 (Alamar Blue アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

24 時間培養



72 時間培養

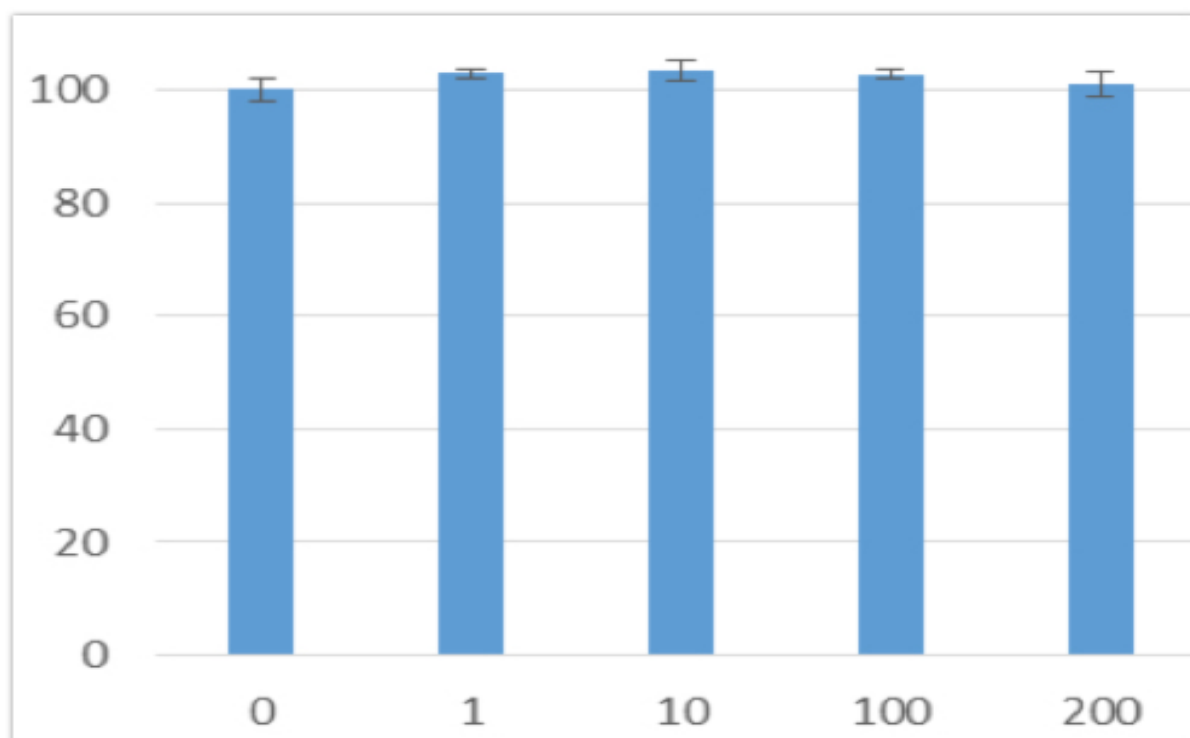
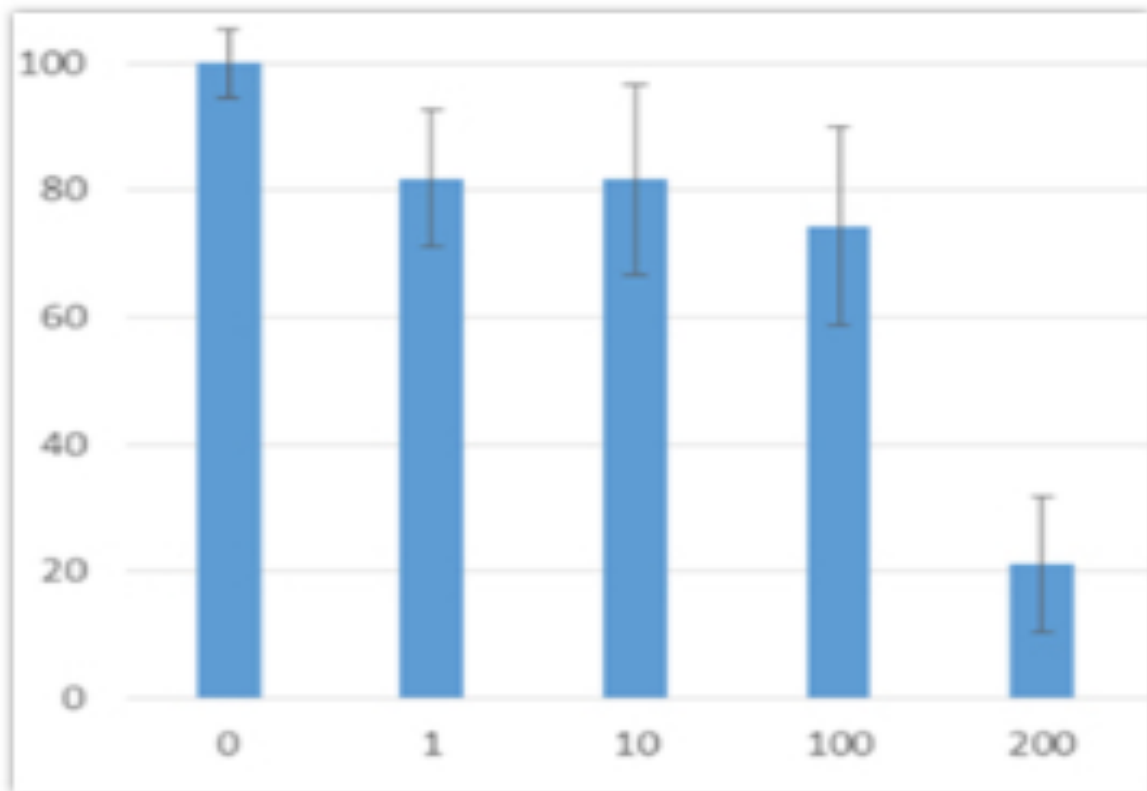


図 11. 表面修飾マグネタイト, HepG2 単層培養系, 細胞毒性 (Alamar Blue アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

24 時間培養



72 時間培養

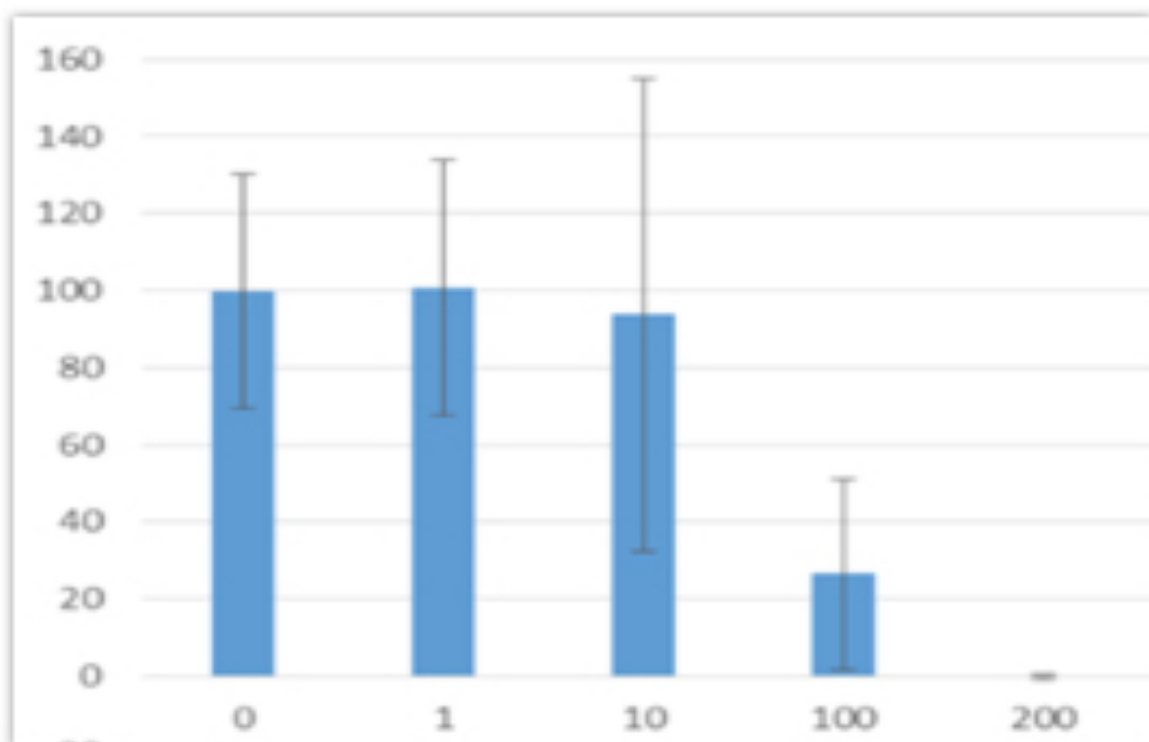
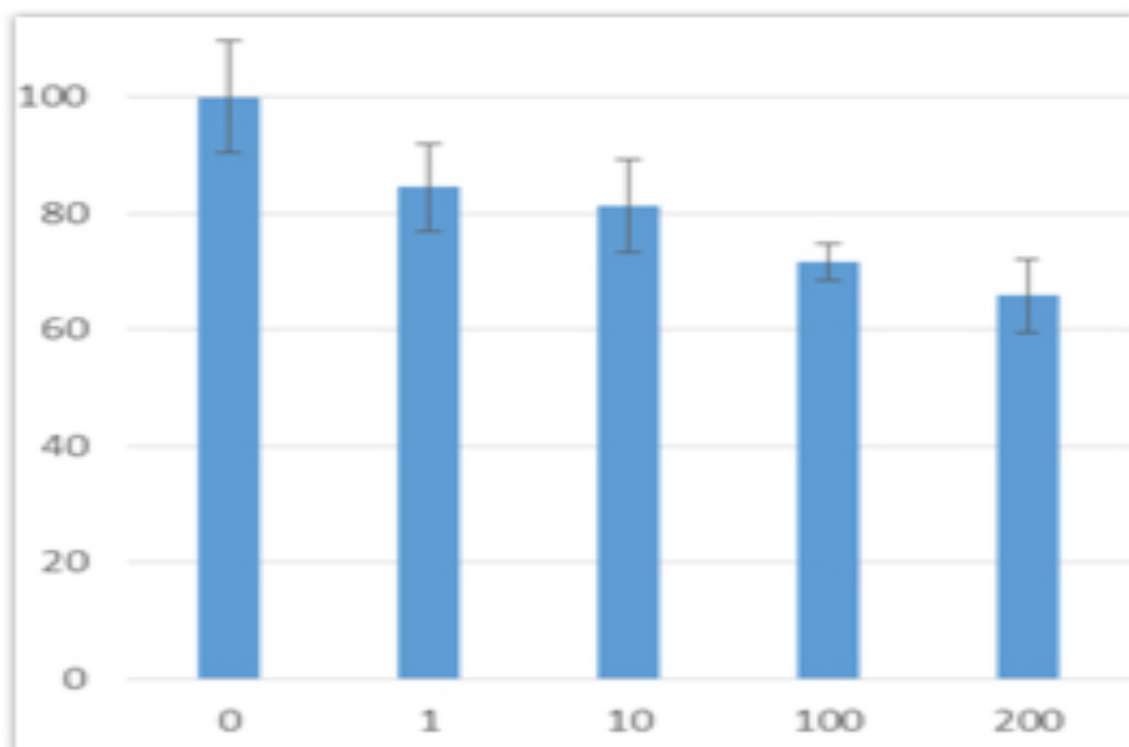


図 12. 表面非修飾マグネタイト, NKEK 単層培養系, 細胞毒性 (Alamar Blue アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

24 時間培養



72 時間培養

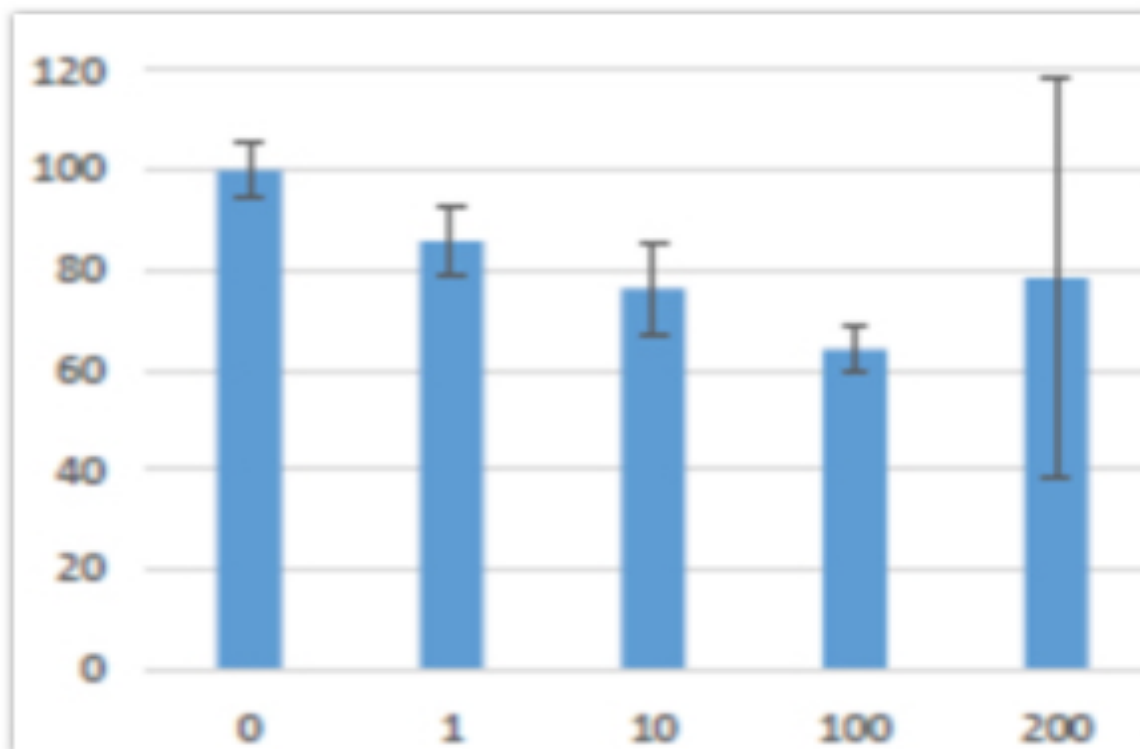


図 13. 表面非修飾マグネタイト, HepG2 単層培養系, 細胞毒性 (Alamar Blue アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)