

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

*In vitro* 評価系の高度化、毒性病理学的研究監修

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用いて、金属ナノ粒子の経皮一般/遺伝毒性に関する新規 *in vitro* 評価系を構築することである。本年度は、3D ヒト皮膚再構成系を用いた小核試験法を確立するための予備的検討を行った。本研究は、チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞 CHL/IU の単層培養系において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小核誘発性について解析した。本研究は、また、正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NKEK（クラボウ）の単層培養系および 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、それらへの小核試験の導入を試みた。その結果、CHL/IU 単層培養系において、非修飾マグネタイトは、一定の条件下で小核誘発性を持つ可能性が示唆された。カルボキシル基修飾は、この小核誘発性を減弱させることが判明した。NHEK 単層培養系または 3D ヒト皮膚再構成系への小核試験導入については、細胞の大きさや増殖性の観点から、さらなる検討が必要であることが判明した。

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

開発・使用されているナノマテリアルの社会的受容には、十分な安全性評価と、仮にリスクがある場合、ベネフィット・リスクバランスを考慮した低減化が必要である。加えて、欧米では、これらの安全性評価やリスク低減が通商政策で戦略的に実施され、我が国でも同様の戦略が必須であり、安全性評価の高度化・標準化も必須である。当該リスク評価に当たっては、動物愛護の 3R 原則の観点から、動物実験代替法の開発も重視される。本研究は、全体として、①共

培養・切片担体培養・3Dヒト皮膚再構成系などのナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化と *in vivo* 実験による当該評価法の検証、②自験・文献などのデータによる有害性発現経路の確立、③ナノマテリアル毒性試験データベースの作成、④それらの成果に機械学習などによる *in silico* 生体影響予測を組合せたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法を構築すること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一般/遺伝毒性に関する新規 *in vitro* 評価系を構築することである。本年度は、3D ヒト皮膚再構成系を用いた小核試験法を確立するための予備的検討を行った。

## B. 研究方法

### 1) 細胞

#### 1-1) 単層培養系

単層培養系としては、チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞 CHL/IU または正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NKEK (クラボウ) を適宜継代して用いた。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、代謝活性化の関与を解析するため、S9mix の存在・非存在条件で試験を行った。

#### 1-2) 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。

### 2) 被験物質

#### 2-1) 対照物質

陽性対照物質としては、マイトマイシン C またはベンツピレンを用いた。陰性対照物質としては、蒸留水 (dH<sub>2</sub>O) を用いた。

#### 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 ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) およびマグネタイト (Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) 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。本研究では、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (BMS-10) および Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-COOH (BMSC-5) の 2 種類のマグネタイトを用いた。

#### 3) 実験および解析

被験物質への曝露は、単層培養系において培地中へ、3D ヒト皮膚再構成系において表皮組織上面から (図 1)、それぞれ行った。小核試験は、基本的に常法に従って実施した。

#### (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) 単層培養系

#### 1-1) 陽性対照物質

S9mix 非存在下の CHL/IU においては、マイトマイシン C を 3 または 24 時間曝露すると、2 核の「小核あり」が増加した (表 1)。

S9mix 存在下の CHL/IU においては、ベンツピレンを 3 時間曝露すると、2 核の「小核あり」が若干増加したが、2 核細胞が少なく、それ以外が多かった (表 2)。

S9mix 非存在下の NHEK においては、マイトマイシン C を 3 または 24 時間曝露しても、主に 1 核が多く、細胞分裂が行われていないようで、細胞の数も少なかった (表 3)。

#### 1-2) マグネタイト

S9mix 非存在下の CHL/IU においては、BMS-10 の 10-200  $\mu$ g/mL で 24 時間曝露しても、2 核細胞中の小核出現頻度が陰性対照と同等であった (表 4)。

S9mix 非存在下の CHL/IU においては、BMSC-5 の 10-200  $\mu$ g/mL で 24 時間曝露しても、2 核細胞中の小核出現頻度が陰性対照と同等であった (表 5)。

S9mix 非存在下または存在下の CHL/IU においては、3 時間曝露した BMS-10 で 2 核細胞中の小核出現頻度が陰性対照より高かった。3 時間曝露した BMSC-5 の 2 核細胞中の小核出現頻度は、S9mix 非存在下で陰性対照よりやや高く、存在下で同等であった。

なお、両マグネタイト共、S9mix 存在下の方が非存在下より、2 核細胞中の小核出現頻度が高かった(表 6)。

#### 2) 3D ヒト皮膚再構成系

マイトマイシン C を用いて 3 回実施したが、1 回目は、2 核細胞を確認するものの 500 個に満たず小核を確認できなかった。2 回目は、わずかに小核を認めたが、そもそも細胞数が極めて少なく、その中でも 1 核細胞が大多数を占め、2 核細胞が 500 個に満たなかった。3 回目は、2 核細胞を確認するものの 500 個に満たず小核を確認できなかった。

#### D. 考察

CHL/IU 単層培養系を用い、S9mix の非存在下または存在下で実施したオーソドックスな 24 時間曝露小核試験において、非修飾マグネタイト BMS-10 とカルボキシル基修飾マグネタイト BMSC-5 は、いずれも陰性であった。3 時間曝露試験において、BMS-10 は、S9mix の非存在下または存在下で陽性を示し、当該小核誘発性が S9mix の存在によって増強した。BMSC-5 は、S9mix 非存在下で陽性、存在下で陰性であった。以上の結果より、BMS-10 については、代謝活性化を必要としないが、それによって増強される遺伝毒性がある可能性がある、しかしながら、24 時間曝露で陰性であることを考え合わせると、この非修飾マグネタイトの「遺伝毒性」については、この段階で結論できず、Ames 試験など他の *in vitro* 試験や *in vivo* 試験の結果と併せて総合的に評価すべきである。一方、BMSC-5 については、S9mix 非存在下 3 時間培養で陽性であったが、当該陽性の程度が弱く、S9mix 存在下、また、その非存在・存在にかかわらず 24 時間培養で陰性であったことから、総合的に遺伝毒性を有しないと考える。もちろん、このカルボキシル基修飾マグネタイトの「遺伝毒性」については、前述の BMS-10

の場合と同様、他の *in vitro* 試験や *in vivo* 試験の結果と併せて総合的に評価すべきである。

マグネタイトのカルボキシル基修飾は、昨年度までに実施した厚生労働科学研究費補助金による先行研究により、マグネタイトの単層培養ケラチノサイト傷害性を減弱させることが明らかとなっている。したがって、CHL/IU 単層培養系においても、カルボキシル基修飾がマグネタイトの小核誘発性を減弱させたものと考ええる。一般に、ナノ材料は付着・凝集性が著しく高く、ナノ材料を材料原料として利用するには分散制御が極めて重要である。カルボキシル基修飾は、疎水性粒子を水中や極性溶媒に分散させる場合の表面修飾としてよく使われる手法で、ナノ材料の分散制御にも有用であるものと考えられている。たとえば、シリカ (SiO<sub>2</sub>) については、カルボキシル基・水酸基・アミノ基などによる修飾を施すと表面電位の変化に基づいて毒性が減弱ないし消失することが知られている。マグネタイトの場合も、同様のメカニズムが働いているものと示唆される。

本年度の実験条件においては、3D ヒト皮膚再構築系への小核試験導入ができなかった。要因として、現在のところ細胞の大きさと細胞増殖活性の 2 点に関係しているものと考えている。3D ヒト皮膚再構成系では、細胞の大きさが単層培養系よりも小さく、光学顕微鏡の 40 倍程度の倍率では、2 核細胞や小核の観察が困難である。また、共焦点顕微鏡を用いたが、問題の解決に至らなかった。来年度は、油浸レンズを用いて高高倍率での観察を試みるほか、細胞回収方法についても検討する予定である。

細胞増殖活性については、十分な増殖が得られなかった可能性がある。このことは、NHEK 単層培養系でも小核試験が困難であったことから推察できる。これらの培養

に用いている培養液は，keratinocyte growth factor (KGF) を含んでいないが，KGF 含有培養液の使用を推奨する論文もある．来年度は，KGF の使用も含め，培養液について検討する予定である．

## E. 結論

CHL/IU 単層培養系において，非修飾マグネタイトは，一定の条件下で小核誘発性を持つ可能性が示唆された．カルボキシル基修飾は，この小核誘発性を減弱させることが判明した．

NHEK 単層培養系または 3D ヒト皮膚再構成系への小核試験導入については，細胞の大きさや増殖性の観点から，さらなる検討が必要であることが判明した．

## 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, 1024-1031, 2018.
- (2) Y.Sakamoto, M.Hojo, Y.Kosugi, K.Watanabe, A.Hirose, A.Inomata, T.Suzuki, D.Nakae. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.*, 43, 587-600, 2018.

### 2. 学会発表

- (1) 坂本義光，北條 幹，鈴木俊也，猪又明子，守安貴子，広瀬明彦，中江 大．多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を単回経気管噴霧投与した後終生飼育したラットの肺および中皮組織における増殖性病変の発生．第 45 回日本毒性

学会学術年会 (2018 年 7 月 19 日，大阪府大阪市)．

- (2) 北條 幹，小林憲弘，長谷川悠子，安藤 弘，久保喜一，海鉾藤文，田中和良，五十嵐海，村上詩歩，多田幸恵，生嶋清美，湯澤勝廣，坂本義光，前野愛，鈴木俊也，猪又明子，守安貴子，高橋祐次，広瀬明彦，中江 大．多層カーボンナノチューブのマウス気管内投与による発生毒性と肺の炎症との関連性．第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018 年 7 月 19 日，大阪府大阪市)．
- (3) M.Hojo, N.Kobayashi, Y.Hasegawa, Y.Sakamoto, S.Murakami, Y.Yamamoto, Y.Tada, A.Maeno, Y.Kubo, H.Ando, M.Shimizu, Y.Taquahashi, T.Suzuki, D.Nakae, A.Hirose. Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018) (2018 年 9 月 2 日，Belgium 王国 Brussels 市)．
- (4) 坂本義光，多田幸恵，北條 幹，前野愛，鈴木俊也，猪又明子，守安貴子，中江 大．ラットにおいて DHPN で誘発されたメソテリン陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性状．第 35 回日本毒性病理学会学術集会 (2019 年 2 月 1 日，東京都江戸川区)．
- (5) 前野 愛，坂本義光，北條 幹，湯澤勝廣，長谷川悠子，鈴木俊也，猪又明子，守安貴子，煙山紀子，美谷島克宏，中江 大．高齡 F344 ラットに自然発生した退形成ジンバル腺癌 (anaplastic Zymbal's gland carcinoma) を疑う 2 例．第 35 回日本毒性病理学会学術集会 (2019 年 1 月 31 日，東京都江戸川区)．

## 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

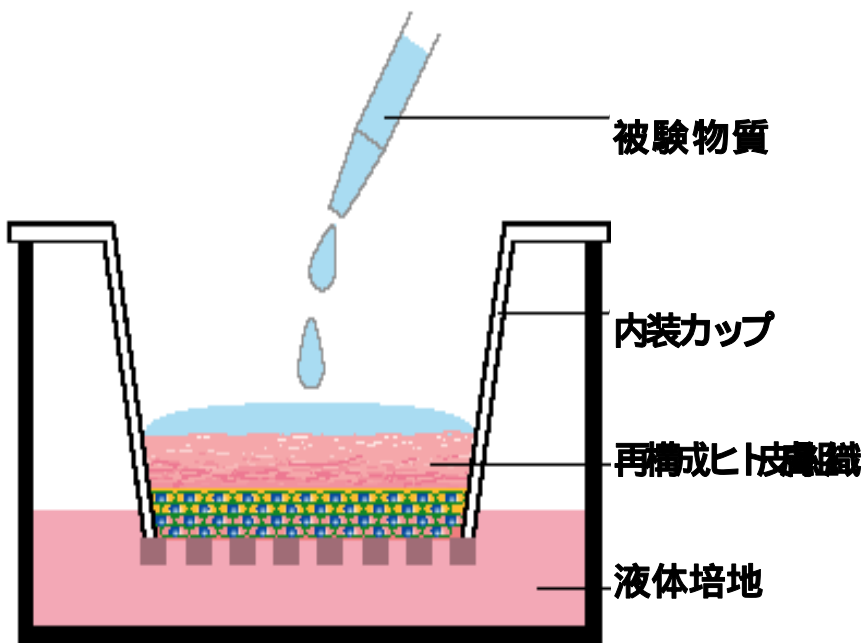


表 1 . S9mix 非存在下の CHL/ IU における陽性対象物質による小核試験

Group	1核		2核		3核以上		2核の細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBPI)	細胞増殖 抑制率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO3h	2	122	30	2446	42	773	1.2	2.2	-
MMC3h	6	182	312	1869	123	249	14.3	2.1	11.2
BP3h	35	1765	62	1938	16	75	3.1	1.6	84.2
DMSO24h	55	3555	98	1902	23	194	4.9	1.4	-
MMC24h	342	3825	271	1748	71	431	13.4	1.5	-8.2

表 2 . S9mix 存在下の CHL/ IU における陽性対象物質による小核試験

Group	1核		2核		3核以上		2核の細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBPI)	細胞増殖 抑制率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO3h	13	611	38	1980	20	248	1.9	1.9	-
BP3h	41	1524	52	373	12	38	12.2	1.26	70.4

表 3 . S9mix 非存在下の NHEK における陽性対象物質による小核試験

Group	1核		2核		3核以上		2核細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBPI)	細胞増殖 抑制率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO3h	1	294	2	81	3	3	2.4	1.25	-
MMC3h	1	833	2	304	0	19	0.7	1.3	-20
DMSO24h	5	585	4	124	2	16	3.1	1.22	-
MMC24h	0	62	0	24	0	6	0	1.39	-75.6

表 4 . S9mix 非存在下の CHL/ IU における BMS-10 による小核試験 (24 時間)

Group	1核		2核		3核以上		2核細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBTI)	細胞増殖 抑制率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO 24h	388	3683	131	1890	52	372	6.48	1.44	-
MMC 24h	858	5032	438	1565	127	359	21.87	1.36	19.36
0µg/ml 24h	42	4113	58	1955	36	401	2.88	1.44	-
10µg/ml 24h	33	3696	20	1984	12	456	1.00	1.47	-8.47
100µg/ml 24h	31	2619	71	1929	46	596	3.55	1.62	-41.97
200µg/ml 24h	6	2705	21	1980	6	70	1.05	1.45	-2.88

表5. S9mix 非存在下の CHL/IU における BMSC-5 による小核試験 (24 時間)

Group	1核		2核		3核以上		2核細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBTI)	細胞増殖 抑止率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO 24h	105	5350	138	1862	44	257	6.90	1.34	-
MMC 24h	153	7789	236	1764	37	311	11.80	1.26	21.90
0µg/ml 24h	77	5630	46	1954	21	783	2.30	1.42	-
10µg/ml 24h	16	5989	16	2000	9	174	0.79	1.29	31.51
100µg/ml 24h	78	7185	52	1948	8	229	2.60	1.26	38.57
200µg/ml 24h	49	2970	46	1957	35	718	2.30	1.61	-43.33

表6. S9mix 非存在下または存在下の CHL/IU における BMS-10 または BMSC-5 による小核試験 (3 時間)

Group	1核		2核		3核以上		2核の細胞中の 小核出現頻度(%)	細胞質分裂阻害 増殖指数(CBTI)	細胞増殖 抑止率(%)
	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし	小核あり	小核なし			
DMSO S9(-)	18	1014	32	1970	19	75	1.60	1.70	-
DMSO S9(+)	20	665	25	1977	14	237	1.25	1.85	-
MMC S9(-)	537	3718	485	1515	63	169	24.25	1.38	45.75
BP S9(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0µg/ml S9(-)	18	1046	26	1975	20	216	1.30	1.75	-
0µg/ml S9(+)	72	568	127	1873	85	566	6.35	2.00	-
非修飾マグネタイト 200µg/ml S9(-)	36	974	69	1934	13	261	3.44	1.78	-3.59
非修飾マグネタイト 200µg/ml S9(+)	178	1197	148	1854	113	364	7.39	1.77	23.56
修飾マグネタイト 200µg/ml S9(-)	30	974	89	1913	36	608	4.45	1.90	-20.32
修飾マグネタイト 200µg/ml S9(+)	48	873	103	1897	49	466	5.15	1.88	12.11