

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
(H30—化学-一般-004)令和元年度分担研究報告書

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：*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 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

研究要旨：本分担研究の目的は、ヒト 3D 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、ヒト 3D 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うと共に、二酸化チタンナノ粒子（JRCNM01001a・01005a）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）を用いた単層培養系、または 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）を用いたヒト 3D 皮膚再構成系において解析を行った。その結果、NHEK 単層培養系による試行では、24 時間培養だと 2 核細胞数が著しく少なくて試験が実施できず、72 時間培養することで実施可能になることが判明した。二酸化チタンナノ粒子における検討では、NHEK 単層培養系において 62.5 µg/mL 以上の 72 時間暴露において細胞障害性を示したのに対し、ヒト 3D 皮膚再構成系においては 20 mg/mL の 72 時間暴露においても細胞傷害性・病理組織学的な変化・表皮通過を示さなかった。このことから、表皮の重層構造は、二酸化チタンナノ粒子の細胞毒性を防御し得るものである可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年急ピッチで開発と実用化が進んでいるナノマテリアルの社会的受容には、十分なリスク評価と、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その低減化が必要である。加えて、欧米ではこれらのリスク評価や リスク低減が通商政策上から戦略的に実施されいていて、我が国でも同様の戦略が必須であり、そのためにはリスク評価の高度化・標準化も必須である。また、当該リスク評価に当たっては、動物福祉の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・ヒト3D皮膚再構成系 などを用いたナノマテリアルの*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、ヒト 3D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、ヒト 3D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うと共に、二酸化チタンナノ粒子（JRCNM01001a・01005a）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）を用いた単層培養系、または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）を用いたヒト3D皮膚再構成系において解析を行った。

B. 研究方法

1) 細胞

1-1) 単層培養系

単層培養系としては、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。

1-2) ヒト3D皮膚再構成系

ヒト3D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

NHEKの細胞増殖性を検討するため、keratinocyte growth factor (KGF) を用いた。小核試験の陽性対照物質としては、マイトマイシンCを用いた。陰性対照物質としては、dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いた。

2-2) 金属ナノ粒子

金属ナノ粒子としては、二酸化チタンを用いた。二酸化チタン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）から、本研究班構成者に配布されたものであるため、その物性等の詳細については渡邊博士の報告書を参照されたい。本年度の本研究では、配付されたものの内、JRCNM01001a01およびJRCNM01005aの2種類を用いた。

3) 実験および解析

被験物質への曝露は、ヒト3D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）、生細胞によるテトラゾリウム塩ホルマゼン生成（WST-1またはWST-8アッセイ）を指標として、そ

れぞれ生化学的に解析した。

小核試験は、チャイニーズハムスターの肺由来線維芽細胞CHL/IUを用いた常法の条件を改変し、マイトマイシンCの暴露から24時間後と72時間後の小核誘発について解析した。

ヒト3D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、表皮傷害性について病理組織学的に解析した。

3-2) 金属ナノ粒子の表皮透過性について解析するため、培地を回収してチタンの含有量をICP-MSにより測定した（東海技術センター）。

（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) 小核試験

1-1) NHEK 増殖に対する KGF の影響

培養液に KGF を 10・20・40 ng/mL とするよう添加し、3日間培養したが、KGF は NHEK の増殖に影響しなかった（図2）。

1-2) NHEK 単層培養系における小核試験

CHL/IU 細胞を用いた小核試験は常法として24時間培養で行うが、NHEK 細胞では24時間培養だと2核細胞数が著しく少なく、試験が実施できなかった。一方、マイトマイシンC（0.2 μg/mL）を3時間または6時間暴露し、計72時間培養を行って解析したところ、マイトマイシンC3時間および6時間暴露両方において、小核細胞比率を有意に増加させた（表1）。

2) 二酸化チタンナノ粒子

2-1) NKEK 単層培養系

JRCNM01001a01 は、最終濃度 500 μg/mL を最高濃度として 3.91 μg/mL まで倍々希釈を行い、24 または 72 時間曝露した。WST-8

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62.5 µg/mL 群より濃度依存的に強い細胞毒性を示した(図3)。JRCNM01001a05も、最終濃度500 µg/mLを最高濃度として3.91 µg/mLまで倍々希釈を行い、24または72時間曝露した。WST-8アッセイを試みた結果、24時間培養では500 µg/mLの濃度曝露で細胞毒性を示した。72時間培養では濃度依存的に細胞毒性を示す傾向にあった。しかしながら、24時間・72時間培養ともに結果のバラツキが大きかった(図4)。

なお、JRCNM01001a01・001a05ともに、62.5 µg/mL以上の濃度になると、著しく凝集した。

2-2) ヒト3D皮膚再構成系

JRCNM01001a01は、最終濃度0・0.2・2・20 mg/mLで24時間または72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、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図5)。しかし凝集が強かったため、凝集がみられない濃度を含む0・25・50・100 µg/mLで72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、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図6)。

JRCNM01001a05、最終濃度0・0.2・2・20 mg/mL、または0・25・50・100 µg/mLで、それぞれ24時間または72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、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図7、図8)。

病理組織学的解析において、

JRCNM01001a01・001a05は、接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった(表2、表3)。

ICP-MS解析は、JRCNM01001a01・001a05のいずれの用量でも、ヒト3D皮膚再構成系培地中にチタンを検出しなかった

(JRCNM001a05 20 mg/mLの1試料において検出限界をわずかにこえる値が得られたが、他の3試料が検出限界未満なので有意

でないと判断した)(表4)。

D. 考察

ヒト3D皮膚再構成系は、一般に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。本研究で用いた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、経済協力開発機構(OECD)テストガイドライン(TG)431(*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。

二酸化チタンナノ粒子JRCNM01001a01は、単層培養ヒトケラチノサイトで62.5 µg/mL以上の72時間曝露で細胞毒性を示したが、ヒト3D皮膚再構成系において、20 mg/mL・72時間という高濃度・長時間の曝露においても細胞毒性を示さなかった。また、62.5 µg/mL以上の濃度になると、著しく凝集したため、ナノ粒子としての特性を失っている可能性を考慮し、凝集がみられない濃度を含む0・25・50・100 µg/mLでも試験を試みたが、やはり細胞毒性は認められなかった。JRCNM01005aにおいても、結果は同様の傾向であったが、粒子がきわめて細かいため、結果のバラつきが大きかった。以上より、表皮の重層構造は二酸化チタンナノ粒子の細胞毒性に対して防御効果を発揮することが示唆された。二酸化チタンナノ粒子が単層培養したヒトケラチノサイトを傷害した事実は、それをサポートするものである。さらに、ヒト3D皮膚再構成系の培地においてチタンを検出しなかったことから、本研究で用いた二酸化チタンナノ粒子JRCNM01001a01・001a05は表皮の重層構造を通過しないと考えられ、そのことが表皮

の重層構造が二酸化チタンナノ粒子の細胞傷害作用に対する防御効果に関与する可能性が示唆された。

なお、本研究で用いた二酸化チタンナノ粒子JRCNM01001a01・001a05は、いずれも凝集がしやすく、正確な評価の為に、分散制御方法の見直しも必要だと考えられた。

本年度の小核試験の試行において、NHEKを用いた小核試験では細胞増殖活性が低く、CHL/IU細胞を用いた常法と同条件では2核細胞および小核の検出が極めて困難であった。この課題を解決するため、KGF処置による細胞増殖促進と、培養時間延長の2つの実験条件の効果を検討した。その結果、KGF添加によってもNHEKの細胞増殖率にはほぼ変化が見られず、この方法は有用でないことが判明した。一方、培養時間を常法の24時間から72時間まで延長させる条件下では、マイトマイシンC暴露による小核の誘発を確認した。以上の結果から、NHEKを用いた小核試験は、72時間培養を行うことで実施可能であることが判明した。ヒト3D皮膚再構成系における小核試験については、来年度に検討する予定である。

E. 結論

NHEKを用いた小核試験は、培養時間を72時間まで延長することで実施が可能と判明した。今後はヒト3D皮膚再構成系を用いた小核試験への応用について検討していく予定である。

本研究で用いた二酸化チタンナノ粒子は、NHEK単層培養系において細胞傷害を示したが、ヒト3D皮膚再構成系において当該傷害

が防御された。この細胞傷害防御には、表皮の重層構造と、それによる二酸化チタンナノ粒子の通過阻止が関与している可能性が示唆された。一方、二酸化チタンナノ粒子は凝集しやすく、これらの正確な評価の為に分散制御方法の再検討が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 政所陽菜 他. ヒト3D皮膚再構成系によるfolpetの経皮毒性評価法の検討. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2020年2月13日，東京都世田谷区）.
2. 小川秀治 他. ヒト3D皮膚再構成系を用いた金属ナノマテリアルの経皮膚毒性評価. 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2020年2月14日，東京都世田谷区）.

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

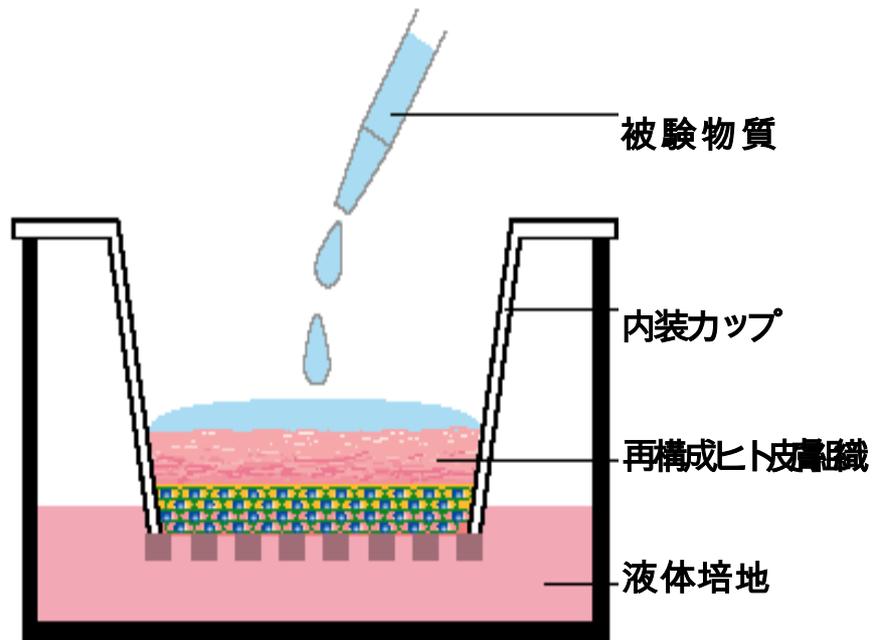


図1. LabCyte EPI 24 モデル

WST-1 assay

(800 cells/well)

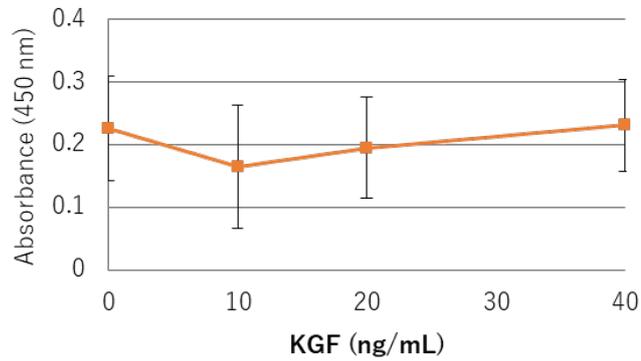


図 2. NHEK の増殖に及ぼす KGF の影響

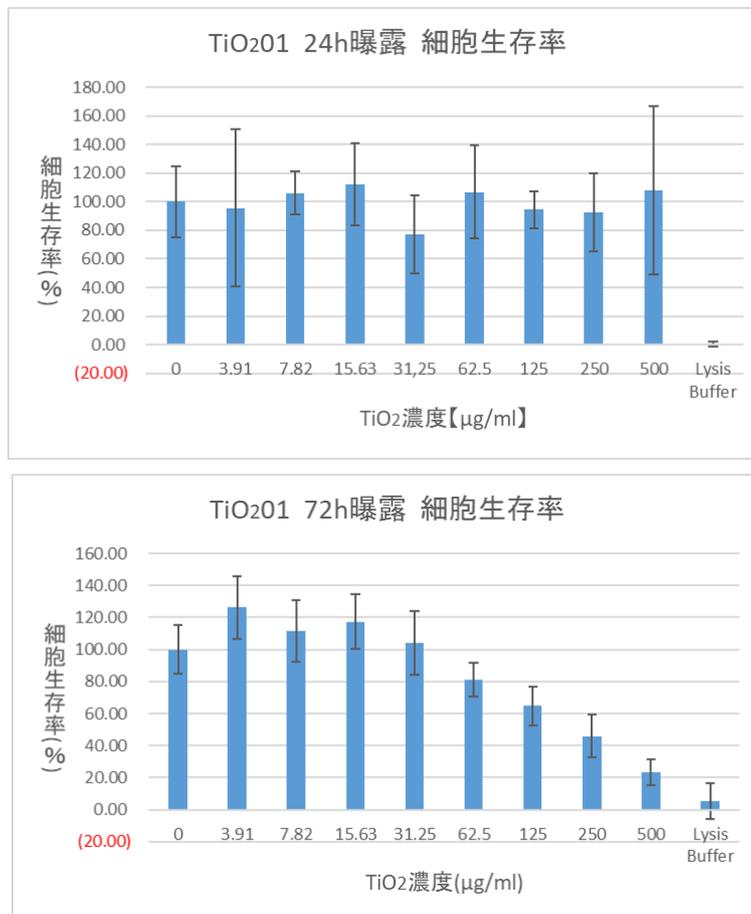


図 3. JRCNM01001a01, NHEK 単層培養系, 細胞毒性 (WST-8 アッセイ; 縦軸, %; 横軸, μg/mL)

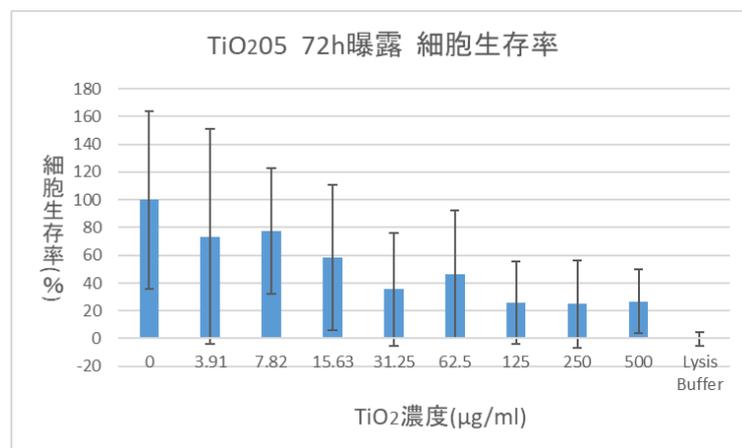
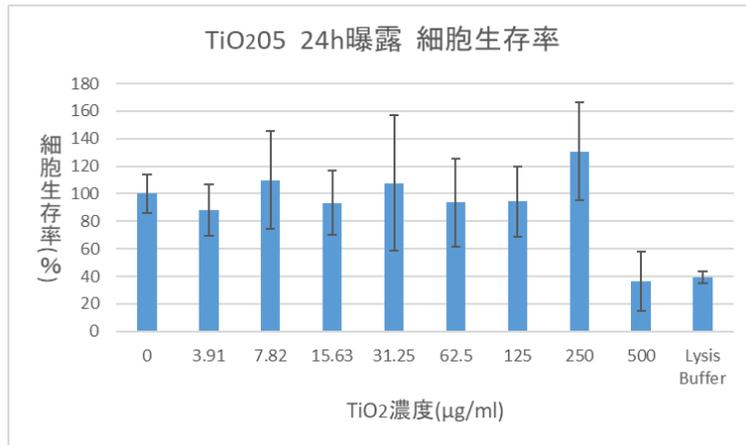


図 4. JRCNM01001a05, NHEK 単層培養系, 細胞毒性 (WST-8 アッセイ; 縦軸, %; 横軸, μg/mL)

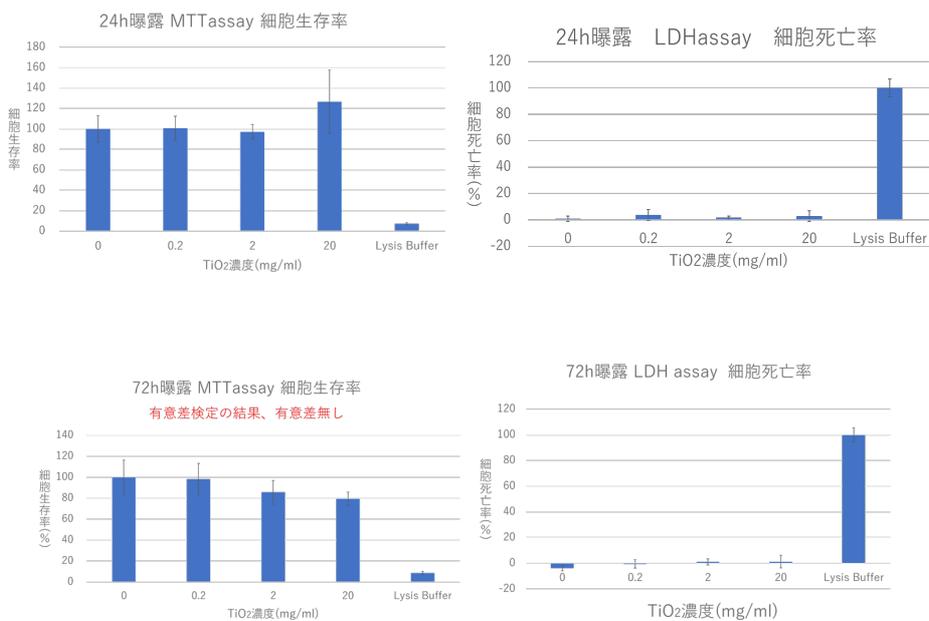


図 5. JRCNM01001a01, ヒト 3D 皮膚再構成系, 細胞毒性 (MTT アッセイ; 縦軸, %; 横軸, μg/mL)

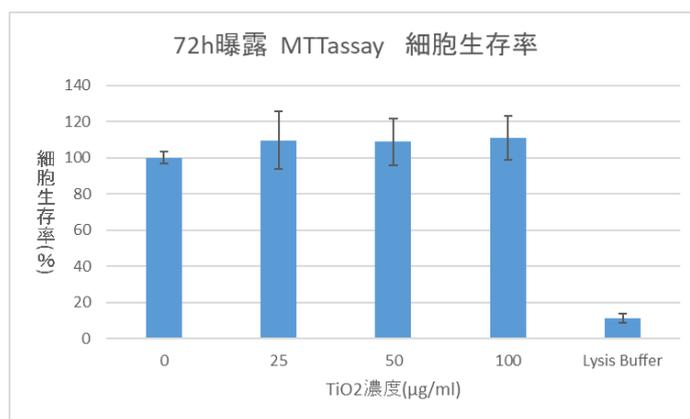


図 6. JRCNM01001a01, ヒト 3D 皮膚再構成系, 細胞毒性 (MTT アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

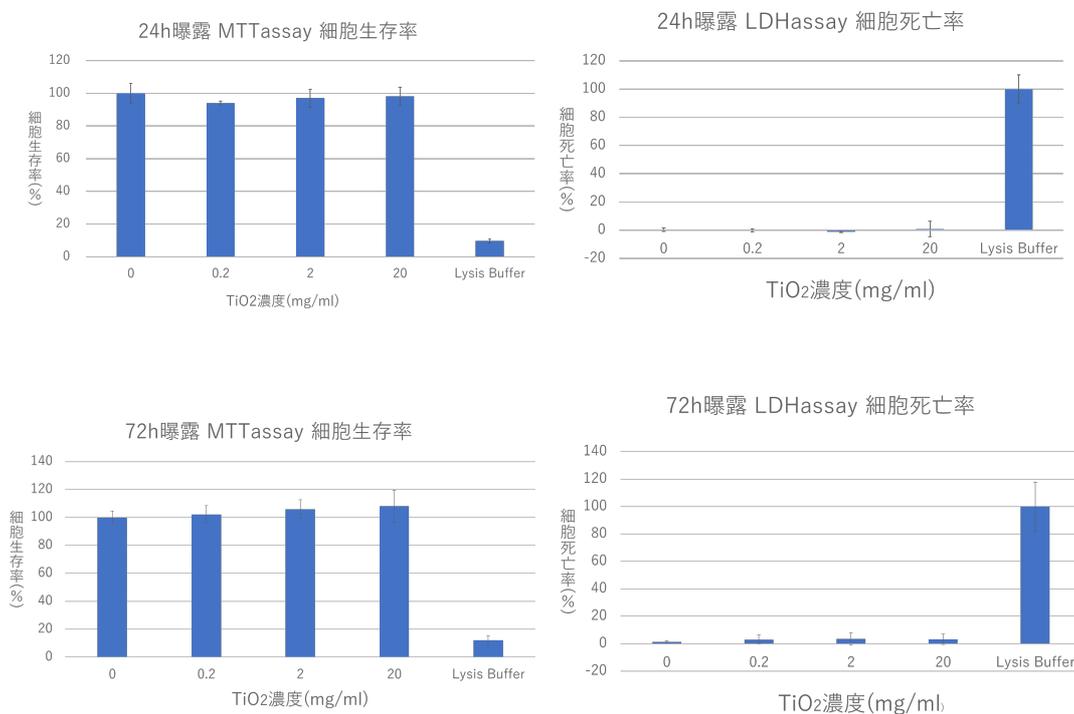


図 7. JRCNM01001a05, ヒト 3D 皮膚再構成系, 細胞毒性 (MTT アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

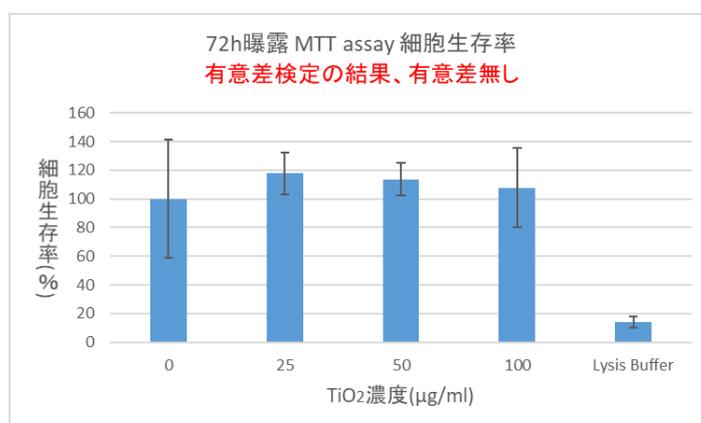


図 8. JRCNM01001a05, ヒト 3D 皮膚再構成系, 細胞毒性 (MTT アッセイ; 縦軸, %; 横軸, µg/mL)

表 1. NHEK を用いた小核試験における培養時間の検討*: p < 0.01 (カイ2乗検定): 2核細胞が少数のため実施せず

培養時間 (h)	被験物質	暴露時間 (h)	1核細胞	2核細胞	3核以上細胞	CBPI	2核細胞		小核細胞比率 (%)
							小核有り	小核無し	
24	MMC	3	478	29	0	1.1	-	-	-
72	DMSO	3	332	130	39	1.4	134	882	13.2
	MMC	3	420	227	27	1.4	298	703	29.8*
	DMSO	6	319	232	19	1.5	92	960	8.7
	MMC	6	320	166	15	1.4	226	776	22.6*

表 2. ヒト 3D 皮膚再構成系 組織観察 所見
TiO₂JRCNM01001, 0・0.2・2・20 mg/mL 72 時間暴露

項目	ミリQ-1	ミリQ-2	ミリQ-3	ミリQ-4	0.2-1	0.2-2	0.2-3	0.2-4	2.0-1	2.0-2	2.0-3	2.0-4	20.0-1	20.0-2	20.0-3	20.0-4
基底層の層数	8	9	9	9	9	9	8	9	9	10	8	10	8	8	9	8
角質近くの核の個数(1視野当たり)	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1
顆粒の出現	4	4	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5
顆粒の塊の有無	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
細胞整列の乱れ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
変性																
①空胞化の有無	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
②核の隣以外での空胞化の有無	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
③角質での核の有無	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

表 3. 3D 再構成皮膚系 組織観察 所見
TiO₂JRCNM01005, 0・0.2・2・20 mg/mL 72 時間暴露

項目	0.2-1	0.2-2	0.2-3	0.2-4	2.0-1	2.0-2	2.0-3	2.0-4	20.0-1	20.0-2	20.0-3	20.0-4	Lysis Buffer-1	Lysis Buffer-2	Lysis Buffer-3	Lysis Buffer-4
基底層の層数	8	8	9	7	8	7	6	7	8	8	7	10	7	8	7	8
角質近くの核の個数(1視野当たり)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	0	0	0
顆粒の出現	5	5	5	5	6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
顆粒の塊の有無	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
細胞整列の乱れ	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
変性																
①空胞化の有無	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
②核の隣以外での空胞化の有無	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
③角質での核の有無	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

尚, 表 2 と表 3 における陰性対照群(ミリ Q) および陽性対照群(Lysis Buffer)は, 共通とする。

表 4. ヒト 3D 皮膚再構成系 培地中チタン濃度

試料名	Ti 結果(μ g/g)
Control 1	<0.5
Control 2	<0.5
Control 3	<0.5
Control 4	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 0.2mg/mL 1	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 0.2mg/mL 2	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 0.2mg/mL 3	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 0.2mg/mL 4	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 2mg/mL 1	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 2mg/mL 2	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 2mg/mL 3	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 2mg/mL 4	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 20mg/mL 1	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 20mg/mL 2	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 20mg/mL 3	<0.5
TiO2 JRCNM 01001a 20mg/mL 4	<0.5
Control 5	<0.5
Control 6	<0.5
Control 7	<0.5
Control 8	<0.5
TiO2 JRCNM 01005a 0.2mg/mL 1	<0.5
TiO2 JRCNM 01005a 0.2mg/mL 2	<0.5
TiO2 JRCNM 01005a 0.2mg/mL 3	<0.5
TiO2 JRCNM 01005a 0.2mg/mL 4	<0.5
TiO2 JRCNM 01005a 2mg/mL 1	<0.5
TiO2 JRCNM 01005a 2mg/mL 2	<0.5
TiO2 JRCNM 01005a 2mg/mL 3	<0.5
TiO2 JRCNM 01005a 2mg/mL 4	<0.5
TiO2 JRCNM 01005a 20mg/mL 1	1.0
TiO2 JRCNM 01005a 20mg/mL 2	<0.5
TiO2 JRCNM 01005a 20mg/mL 3	<0.5
TiO2 JRCNM 01005a 20mg/mL 4	<0.5