

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。具体的には、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。小核試験に関して、CHL/IU 単層培養系において、非修飾マグネサイトは、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を明らかにした。細胞増殖活性が低く、CHL/IU 細胞を用いた常法と同条件で小核試験が実施できない NHEK を用いた小核試験に関しては、被験物質曝露後長時間培養することにより可能とし、細胞の大きさや増殖性の観点から NHEK を用いた小核試験を可能とするプロトコルが得られた。

7 種類の二酸化チタンナノ粒子（JRCNM01001a・JRCNM01005a・MT-150A・MT-500B・AMT-100・AMT-600・TKP-102）の経皮毒性について、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すると共に、ヒト 3D 皮膚再構成系を用いた小核試験法を確立する前段階として NHEK 単層培養系で行った。その結果、7 種類の二酸化チタンナノ粒子は、いずれも 72 時間以内に細胞毒性を示した。この細胞毒性については、一次粒子径・比表面積・凝集程度などと、細胞傷害の強さの間には明確な相関性がみられなかったが、結晶型についてはルチル型がアナターゼ型より細胞傷害性が強い傾向がみられた。一方、ヒト 3D 皮膚再構成系では、いずれの二酸化チタンナノ粒子も細胞毒性を發揮しなかった。このことは、ヒト 3D 皮膚再構成系において、表皮の重層構造に基づく、いわゆるバリア機能が働き、二酸化チタンナノ粒子の細胞毒性を防御したものと示唆された。さらに、角質形成が未熟な条件でも同様の結果が得られたことから、表皮のバリア機能は、必ずしも角質形成の完了による表皮の重層化構造の完成を必要とせず、一定程度の分化が終了していれば有効となるものと推察された。なお、二酸化チタンナノ粒子は凝集しやすく、その細胞毒性を正確に評価する為には分散制御が重要であると考えられた。

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

平成30年から令和元年までは、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準備、令和2年度は、班内で共通使用する二酸化チタンナノ粒子（JRCNM01001a・JRCNM01005a・MT-150A・MT-500B・AM-T100・AMT-600・TKP-102）の経皮毒性について、正常ヒト表皮由来ケラチノサイトNHEK（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

イッシュ・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すると共に、ヒト3D皮膚再構成系を用いた小核試験法を確立する前段階としてNKEK単層培養系で行った。

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NHEK(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：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(dH₂O)を用いた。

2-2) 金属ナノ粒子：マグネタイト。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(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、渡邊の報告書を参照されたい。

2-3) 金属ナノ粒子：二酸化チタン。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(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、JRCNM01001a・JRCNM01005a・MT-150A・MT-500B・AMT-100・AMT-600・TKP-102の7種類を用いた(表1)。

2-4) 遺伝毒性：小核試験の陽性対照物質としてマイトマイシンC(MMC)、陰性対照物質としてdimethyl sulfoxide(DMSO)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、ヒト3D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。詳細な実験条件は、結果の項に記す。

細胞毒性は、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)と、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の曝露から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、以下の解析も行った。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。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) 二酸化チタンナノ粒子の表皮系細胞毒性

1-1) NHEK 単層培養系

二酸化チタンナノ粒子は、最終濃度1000 µg/mLを最高濃度として7.82 µg/mLまで倍々希釈を行った8種の用量で24時間曝露してWST-8アッセイを実施した結果、AMT-100とAMT-600の500、1000 µg/mLとMT-150AとMT-500Bの1000 µg/mLで細胞傷害を認めた(表2)。JRCNM01001aとJRCNM01005aでは、1000 µg/mLで細胞生存率が若干低下したが、明らかでなかった(表2)。TKP-102では、1000 µg/mLまで、明らかな細胞傷害を認めなかった(表2)。

72時間曝露では、7種ともに125~250 µg/mLで細胞傷害を認め、表2に示すような50%致死用量を得た。

二酸化チタンナノ粒子は比較的容易に凝集したが、比較的低用量では図2に示すように、細胞外のみならず細胞内にも二酸化チタンナノ粒子が存在することを示唆する所見が観察された。二酸化チタンの凝集程度は、種類によって異なっていた(図3)。

1-2) ヒト3D皮膚再構成系

角質形成が成熟した13日間培養ヒト3D皮膚再構成系と、角質形成が未熟である6日間培養ヒト3D皮膚再構成系の両方において、二酸化チタンナノ粒子は、最終濃度0、0.2、2、20 mg/mLで24時間曝露した。MTTアッセイを試みた結果、いずれの二酸化チタンナノ粒子も細胞毒性を示さなかった。

2) 小核試験

2-1) NHEKを用いた小核試験

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。さらに条件検討のため、NHEKにMCC 10 µg/mLまたはDMSOを3または6時間曝露、24または72時間まで培養し、2核細胞1000個中の小核の有無と個数を解析した。その結果、24時間培養条件では2核細胞数が著しく少なく試験が実施できなかったが、72時間培養条件ではMMCで陽性結果、DMSOで陰性結果を得ることができた(表3)。

マグネタイトの遺伝毒性について、S9mix非存在下のCHL/IUにおいては、BMS-10あるいはBMSC-5の10-200 µg/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。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。

2-2) 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、いずれにおいても十分な小核を確認できなかった。

D. 考察

NHEK単層培養系において、AMT-100・AMT-600・TKP-102は、500 µg/mL以上の高濃度曝露(24時間)で細胞毒性を示した。この細胞毒性の強度は二酸化チタンナノ粒子の種類によって異なり、また、他の被験二酸化チタンナノ粒子については細胞毒性が検出されなかった。したがって、二酸化チタンナノ粒子のケラチノサイト毒性の有無と強度には、当該粒子の物理科学的性状が関与するものと示唆された。その詳細については、現在、解析中である。

一方、ヒト3D皮膚再構成系では、いずれの二酸化チタンナノ粒子も細胞毒性を発揮しなかった。したがって、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ことが示唆された。その詳細と背景メカニズムについては、二酸化チタンナノ粒子の表皮透過性も含め、現在、病理組織学的・分子生物学的に解析中である。

遺伝毒性に関して、NHEK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小核試験が実施できないことを明らかにした。しかし、細胞を被験物質曝露後長時間培養することにより、NHEKによる小核試験が可能となることが判明した。現在、このプロトコルに基づいて、二酸化チタンナノ粒子やマグネタイトを用いた小核試験を実施した。さらに、ヒト3D皮膚再構成系への応用については更なる検討が必要と考えられる。

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、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。

E. 結論

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NHEKを用いた小核試験を可能とするプロトコルが得られた。

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を明らかにした。

二酸化チタンナノ粒子のケラチノサイト毒性の有無と強度には当該粒子の物理科学的性状が関与し、また、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ことが示唆された。また、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は分散制御が重要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kannno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci*, 2021 Mar 4. doi: 10.1111/cas.14873.
2. Fukai E, Sato H, Watanabe M, Nakae D, Totsuka Y. Establishment of an *in vivo* simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci*, 109, 1024-1031, 2018.
3. Sakamoto Y, Hojo M, Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A, Inomata A, Suzuki T, Nakae D. 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-

2. 学会発表

1. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Hasegawa Y, Yuzawa K, Kubo Y, Nagasawa A, Yano N, Ohnuki A, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Nakae D. Histopathological features during development of the peritoneal mesothelioma in F344 rats administered multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) and a potential relationship between its pathogenesis and serum levels of apolipoproteins. EUROTOX 2020 (2020年9月6-9日, デンマーク王国コペンハーゲン市).
2. 宍戸健太, 煙山紀子, 政所陽菜, 小川絢子, 小川秀治, 阿部有加里, 山口彩音, 宇野絹子, 美谷島克宏, 中江 大. 3D ヒト皮膚再構成系による folpet の経皮毒性評価法の検討. 第47回日本毒性学会学術年会 (2020年6月29日~7月1日, リモート開催).
3. 前野 愛, 北條 幹, 坂本義光, 湯澤勝廣, 長谷川悠子, 久保喜一, 長澤明道, 安藤弘, 田中和良, 海鉾藤文, 生嶋清美, 山本行男, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 高橋祐次, 横田 理, 小林憲弘, 広瀬明彦, 中江 大. ラットによる多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の長期気管内反復投与試験: 1年経過時点における報告. 第47回日本毒性学会学術年会 (2020年6月29日~7月1日, リモート開催).
4. 坂本義光, 北條 幹, 前野 愛, 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) の長期反復気管内投与ラットにおける肺神経内分泌細胞 (PNEC) の増生. 第47回日本毒性学会学術年会 (2020年6月29日~7月1日, リモート開催).
5. 宍戸健太, 煙山紀子, 小川秀治, 大西未悠, 桑原みなみ, 波多野遥子, 渡邊 厚, 佐野龍平, 美谷島克宏, 中江 大. 金属ナノ粒子の経皮遺伝毒性に関する新規 *in vitro* 評価系の構築. 第37回日本毒性病理学会総会および学術集会 (2021年1月28日~2月26日, リモート開催).
6. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Ohnuki A, Maeno A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kannno J, Hirose A, Nakae D. Declines serum levels of apolipoproteins during the development of peritoneal mesothelioma by multiwalled carbon nanotube in rats. Virtual 2021 Society of Toxicology (SOT) Annual Meeting and ToxExpo (2021年3月12-26日, リモート開催).
7. 政所陽菜, 煙山紀子, 小川絢子, 小川秀治, 阿部有加里, 高臨風, 山口彩音, 宇野絹子, 龍完次朗, 美谷島克宏, 中江 大. 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).
8. 小川秀治, 煙山紀子, 大西未悠, 橋口ゆり, 浦崎涼子, 美谷島 克宏, 中江 大. 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).
9. 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).
10. 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).
11. 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).
12. 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).
13. 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. 高齢 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

表 1. 被験二酸化チタンナノ粒子の概要

二酸化チタンナノ粒子	一次粒子径(nm)	pH	比表面積(m ² /g)	結晶型
MT-150A	15			ルチル
MT-500B	35			ルチル
AMT-100	6	中性	280	アナターゼ
AMT-600	30	弱酸性	53	アナターゼ
TKP-102	15	弱酸性	110	アナターゼ
JRCNM01001a	5.6		170/316	アナターゼ
JRCNM01005a	15-24		46	ルチル

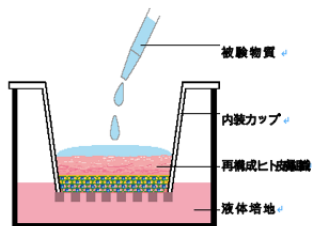


図 1. LabCyte EPI 24 モデル

表 2. NHEK 単層培養系における二酸化チタンナノ粒子の細胞毒性

TiO ₂ の種類	1000µg/ml における細胞生存率(24 時間)	50% 生存率を示した曝露濃度(72 時間)	凝集のしやすさ
MT150A	84%	62.5 µg/mL	+
MT500B	61%	125 µg/mL	++
AMT100	63%	250 µg/mL	±
AMT600	62%	250 µg/mL	±
TKP102	116%	125 µg/mL	+
JRCNM01001a	72%	250 µg/mL	++
JRCNM01005a	85%	125 µg/mL	++

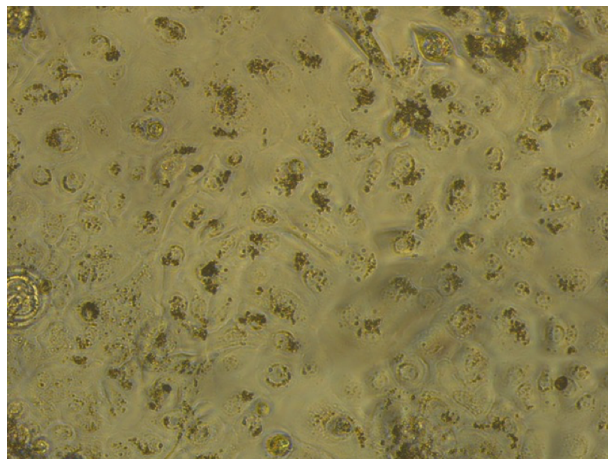


図 2. NHEK 光学顕微鏡像 (MT-150A 15.63 µg/mL, 24 時間, 200 倍)

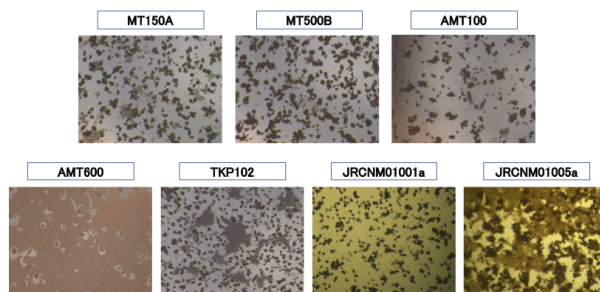


図 3. NHEK 光学顕微鏡像 (125 µg/mL, 24 時間, 200 倍)

表 3. NHEK を用いた小核試験

培養時間 (h)	被験物質	曝露時間 (h)	1 核細胞	2 核細胞	3 核以上細胞	CBPI	2 核細胞		2 核細胞中の小核細胞比率(%)
							小核あり	小核なし	
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*

