

平成 27 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

カーボンおよび金属ナノ材料による肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

ナノ材料の in vitro 毒性評価に関する研究

分担研究者 内野 正 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 主任研究官
研究協力者 神野 透人 名城大学薬学部 教授
五十嵐 良明 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 部長
秋山 卓美 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 室長

研究要旨

シリカ、酸化チタンなどの微粒子の細胞傷害が NLRP3 Inflammasome の活性化で生じることが明らかにされつつある。白金ナノ材料についても同様のメカニズムが働くのかを明らかにするため、Inflammasome 活性化に伴って生じることが知られる ASC Speck に着目し、その形成を発現指標とする評価系を構築することを目的とした。pCMV6-Entry ベクターに挿入されたヒト ASC (PYCARD) 遺伝子を、C-末端 mGFP 融合タンパク質発現ベクター-pCMV6-AC-mGFP ベクターにサブクローニングし、両鎖の塩基配列が NM_013258 に一致することを確認した。これをトランスフェクションした細胞では ASC-m GFP 融合タンパク質を発現し、Inflammasome 活性化評価系に適用できることがわかった。

白金イオンの細胞毒性強度を評価するとともに、白金ナノ粒子分散液を限外ろ過膜で分別してイオン濃度を定量した。白金イオンは試験した最高濃度で細胞毒性を示さず、分散液中に定量されなかったことから、白金ナノ粒子自体が毒性を示すことが改めて明らかとなった。ASC Speck タンパク質発現を指標とする評価系を確立し、表面非修飾の白金粒子を用いて試験することにより、白金ナノ粒子の細胞毒性発現機構として Inflammasome 活性化の関与について明らかにすることができると考える。

A. 研究目的

金属ナノ材料は化粧品、抗菌・消臭剤などの消費生活用製品から食品に至るまで様々な製品に用いられており、製品の使用や食品の摂取に伴う直接的な曝露に加えて、室内空気・ハウスダストなどの環境媒体を介した曝露が懸念される。酸化チタンナノ粒子など一部の金属ナノ材料の健康影響に関しては、比較的多くの情報

が集積されている。一方、白金はナノコロイドとして化粧品や健康食品に利用されており、有害性に関する報告はほとんど認められない。

26 年度までの研究では、保護剤としてポリアクリル酸を使用した白金ナノコロイド (PtNP-1)、ならびに保護剤を含まない水系白金ナノ分散液 (PtNP-2) について、Macrophage に分化させた THP-1 細胞に対する毒性を比較、検討した。その

結果、PtNP-2 が PtNP-1 に比べて強い細胞毒性を示すことが明らかとなった。

26年度の研究ではPtNP-1及びPtNP-2について遠心分離によるイオンと粒子の分別定量を試み、細胞毒性への関与について検討を行った。PtNP-2の細胞毒性は、分散液に存在するイオンではなく白金粒子自体によるものである可能性が示唆されたものの、イオンと粒子を完全に分離しているとは言えず、結論づけることはできなかった。今年度は限外ろ過膜を用いてイオンと粒子を分別し、改めてイオンの有無について調査するとともに、白金イオンの細胞毒性を検討した。

粒子の細胞毒性の発現機構として、シリカ、酸化チタン、Alumなどの粒子状物質はMacrophageなどのNLRP3(Nod-Like Receptor family Pyrin domain containing 3) Inflammasomeを活性化し、それに引き続いてCaspase-1の活性化及びInterleukin-1分泌の亢進を引き起こすとの報告がある。しかしながらこれを証明する評価系に対しての知見はほとんどない。そこで本年度はInflammasome活性化に伴って生じることが知られているASCの凝集体、すなわちASC Speck形成に着目し、これを指標とするInflammasome活性化評価系を構築することを目的として、評価系確立に必要なベクターにかかわる基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1. 材料及び試薬

平均一次粒子径 2 nm の白金ナノコロイド (PtNP-1; 水懸濁液、表面保護剤としてポリアクリル酸で処理) は田中貴金属から、平均一次粒子径 100 nm 未満の水系白金ナノ分散液 (PtNP-2; 50% Ethanol 懸濁液、保護剤なし、四国計測工業製) は関東化学から購入した。

2. 粒度分布の測定

ナノ白金粒子懸濁液は、超純水で 100 µg/mL に希釈した後、5 分間超音波処理し、動的光散乱法による粒度分布を測定した。

また、上記希釈懸濁液を 20 、10,000 g で 30

分間遠心後、上清をナノセップ 3K (分画分子量 3K, 透過分子サイズ 1~2 nm 以下) に入れ、PtNP-2 は 10,000 g で 1 時間の遠心を 1 回、PtNP-1 は 3 回行った後、ろ液の粒度分布を測定した。

3. 白金含量の定量

上記のようにろ過して得た試料溶液を 1%硝酸溶液で希釈し、0.2 µm のフィルターでろ過した後、ICP-MS で測定した。

4. 細胞毒性試験

THP-1 細胞を 96-well Plate に 10⁵ cells/well の細胞密度で播種し、Phorbol Myristate Acetate (PMA) 200 nM 処理 24 時間後に 10%FBS を含む RPMI1640 培地を除き、種々の濃度の白金イオン (H₂PtCl₆) 溶液 100 µL を添加した。試験は 1 濃度当たり 6 穴で実施した。被験物質を添加して 24 時間経過後に培地を交換し、各 Well に WST-8 試薬(同仁化学研究所製) 10 µL を添加して 2 時間インキュベーター内で反応させた。マイクロプレートリーダーを用いて測定波長 450 nm における吸光度を測定し、コントロールに対する吸光度の比から細胞生存率 (%) を算出した。

5. ASC Speck 遺伝子の THP-1 細胞へのトランスフェクション

pCMV6-Entry に挿入されたヒトASC(PYCARD)遺伝子を制限酵素 Sgf I および Mlu I で切り出し、C-末端 mGFP 融合タンパク質発現ベクターpCMV6-AC-mGFP ベクターにサブクローニングした。

Lipofectamine 3000 試薬を用いて THP-1 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に細胞を 96-well コラーゲンコートプレートに播き換え、200 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 処理を行った。さらに 24 時間培養したのちに、発現した GFP 融合タンパク質をオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 を用いて観察した。

C. 研究結果

1. 粒度分布

PtNP-1 及び PtNP-2 を水で（白金濃度）100 µg/mL に希釈した直後の平均粒子径はそれぞれ 86 nm 及び 70 nm であった（n=3 の平均）。散乱強度分布で見た場合、PtNP-1 は約 40% が、PtNP-2 は約 80% が 100 nm 以下であった。一方、個数分布で見た場合、ほとんどが 100 nm 以下であった（図 1）。各懸濁液の限外ろ過後のろ液については、測定可能な粒子濃度になかった。

2. 白金イオンの定量と細胞毒性

限外ろ過液の白金濃度を定量した。PtNP-2 については、定量下限値（約 0.03 ng/mL）以下であった。一方、PtNP-1 については 0.695 ± 0.021 µg/mL（n=3）であった。

白金イオンについては試験した最大濃度 1 µg/mL までは細胞生存率の有意な減少は認められなかった（図 2）。

3. ASC Speck 遺伝子発現ベクターの構築

pCMV6-Entry ベクターにクローニングされたヒト ASC cDNA を C-末端モノメリック GFP 融合タンパク質発現ベクター pCMV6-AC-mGFP にサブクローニングし、両鎖について CDS のシーケンシングを行い、塩基配列が NM_013258 に一致することを確認した。

得られた発現ベクターを THP-1 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に PMA 処理してマクロファージに分化させたところ、ASC-mGFP 融合タンパク質の発現を確認した（図 3）。

D. 考察

白金ナノ粒子の細胞毒性が粒子自体によるものか、それとも溶出した白金イオンによる影響なのか明らかにするため、限外ろ過膜を用いてイオンと粒子を分別すると共に、白金イオンの細胞毒性について検討した。PtNP-2 について、限外ろ過したろ液には定量下限値以上の白金は検出されなかった。試験した最高濃度の 1 µg/mL の白金イオンの曝露でも細胞毒性が見られなかったことから、PtNP-2 の毒性は白金粒子自体によるも

のと思われるが、TEM などろ液について粒子の存在の有無を確認する必要がある。

更にこの細胞毒性に Inflammasome 活性化が関与するかを評価するために ASC Speck を指標とする評価系の構築を試みた。遺伝子発現ベクターを構築し、THP-1 細胞へのトランスフェクションしたところ、細胞に ASC-mGFP 融合タンパク質の発現がみられた。

本研究でクローニングされたベクターを用いることによって Inflammasome 活性化評価法の構築が可能であり、表面非修飾の白金粒子を用いることによって、白金ナノ粒子の細胞毒性の発現機構について明らかにすることができると考えられた。

E. 結論

保護剤を含まない白金ナノマテリアルの細胞毒性は粒子自体が関与することが明らかとなった。Inflammasome 活性化の評価指標とする ASC Speck 遺伝子のクローニングを行った。ASC Speck タンパク質発現系と保護剤を含まない表面非修飾白金ナノ粒子懸濁液を用いて試験することにより、白金ナノ粒子の細胞毒性の発現機構を明らかにすることができると思われた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

内野 正，神野透人，香川聡子，秋山卓美，五十嵐良明：化粧品原料として用いられる白金ナノマテリアル粒子の分散状態とその細胞毒性等への寄与．第 52 回全国衛生化学技術協議会年会（2015.12）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

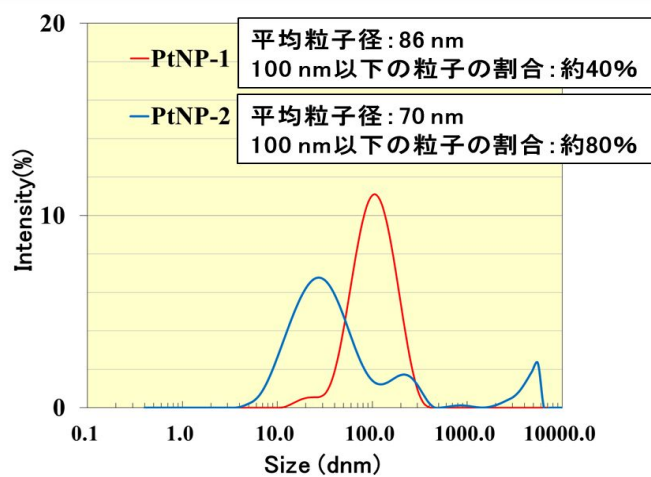
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

散乱強度分布曲線



個数分布曲線

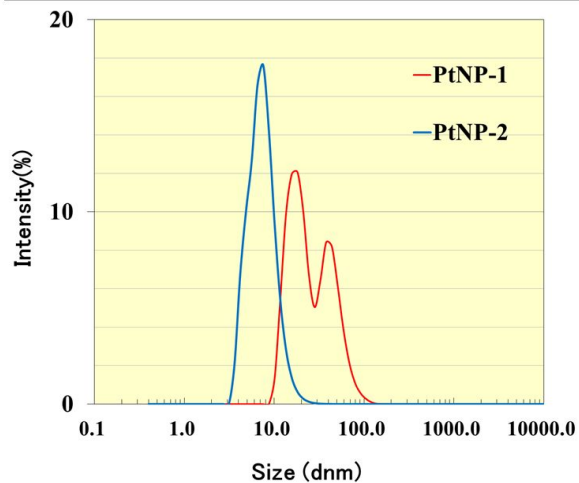


図 1 . 白金ナノ粒子懸濁液の粒度分布

白金粒子として 100 として懸濁の濃度になるよう水で希釈して 5 分間超音波処理後、粒度分布を測定した。

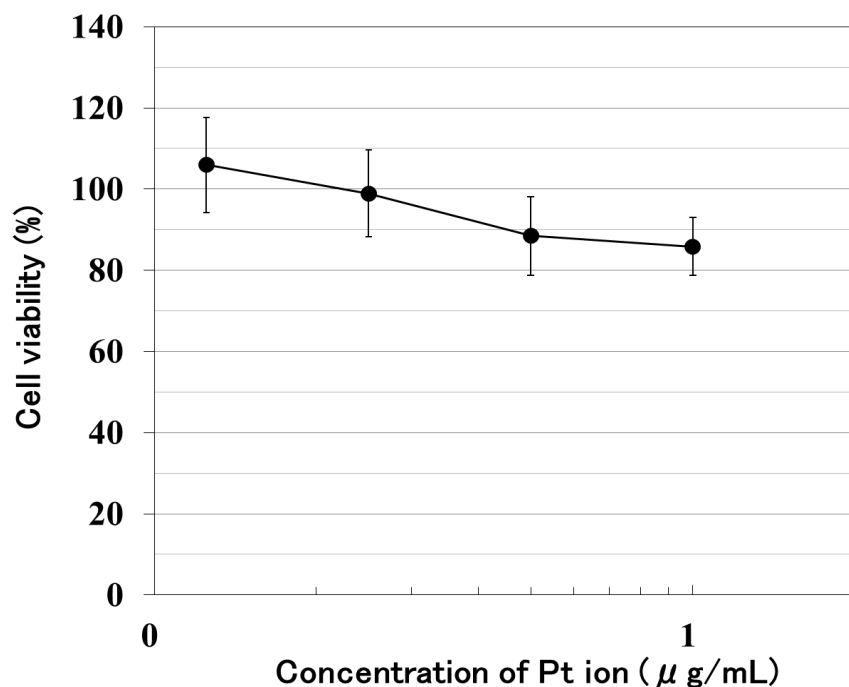


図 2 . 白金イオンの細胞毒性

PMA で処理した THP-1 細胞 (10^5 cells/well) に H_2PtCl_6 の溶液を 24 時間曝露したのち生存率を測定した。

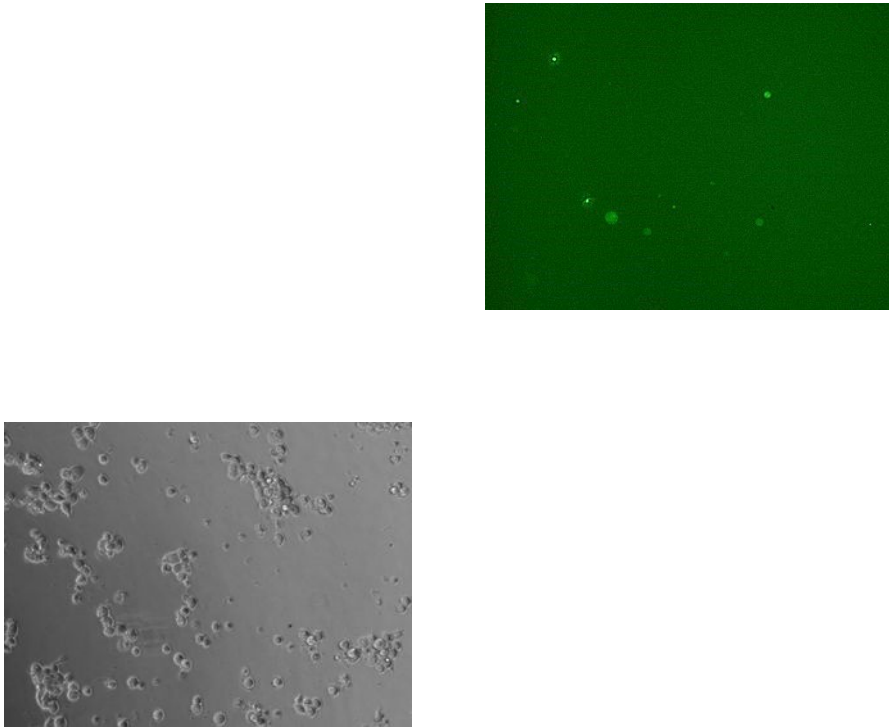


図 3 . ASC-mGFP 融合タンパク質を発現させた THP-1 細胞の位相差 (Left) および蛍光 (Right) 顕微鏡像