

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究年度終了報告書

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  
およびリスク低減化に関する研究

ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析

研究分担者	宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	室長
研究協力者	河上 強志	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	小森谷 薫	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	
研究協力者	加藤 玲子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	主任研究官
研究協力者	伊佐間 和郎	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：2種類のZnOナノマテリアル分散製品について、物理化学的性質について明らかにすると同時に、ナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答（細胞表面マーカーCD54及びCD86の発現、培養上清中のサイトカイン量）について検討した。その結果、ZnO(sigma)及びZnO(alfa)では、ZnO(sigma)が強い細胞毒性を示した。ZnOナノマテリアルは用量依存的にCD54発現量を増加させ、相対蛍光強度(RFI)はZnO(sigma)の方が高かった。サイトカインは、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNFにおいて産生の増加が観察され、その量は、ZnO(Sigma)の方が多かった。さらに、ZnO処理後のTHP-1細胞を、フローサイトメーターで解析した結果、側方散乱光強度（SSC強度）の変化が、用量依存的に観察され、その変化はZnO(sigma)処理細胞で多かった。今後、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なるNiOナノマテリアルについても同様の検討を行い、ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムについて明らかにする。

#### A. 研究目的

近年ナノマテリアルが我々の周りで広く使われるようになってきた。しかしながら、新規材料であるためその安全性は未知の部分が多く、生体影響の評価については、試験法や評価基準などが定められていない。本研究では、培養細胞を用い、十分にキャラクター化されたナノマテリアルによる細胞応答を捉え、ヒト由来細胞を用いたナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系構築を目指すと共に、ナノマテリアル

の細胞応答に及ぼす影響を解明するための基礎的検討を行った。

平成27年度は、2種類のZnOナノマテリアル分散製品について、水懸濁液及び血清含有培地懸濁液中での粒径分布、ゼータ電位等の物理化学的性質について動的光散乱光度計により明らかにすると同時に、ナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いた評価系を用いて、ATP法により細胞毒性を、細胞表面マーカーCD54、CD86の発現、培

養上清中のサイトカイン測定により免疫応答について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 材料

ナノマテリアルは酸化亜鉛 ZnO (Sigma-Aldrich 及び NanoTeK, Alfa Aesar)を用いた (以下、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)と略す)。ナノマテリアルの懸濁液中での粒径分布、ゼータ電位は、動的光散乱光度計(大塚電子 ELSZ-2NPA)により測定した。細胞毒性試験の陽性対照物質として、硫酸カドミウム  $\text{CdSO}_4$  (Cadmium sulfate hydrate (3/8) (Sigma-Aldrich)を用いた。細胞表面マーカー測定の陽性対照物質として、2,4-ジニトロクロロベンゼン(DNCB) (Sigma-Aldrich)を用いた。

### 2) 細胞株及び培養方法

ヒト白血病由来単球細胞株 THP-1 (ATCC)は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、penicillin-streptomycin (PS)、0.055 mM 2-Mercaptoethanol を含む RPMI 1640 (GIBCO)にて、37°C、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーターで培養した。細胞株は3 - 4日ごとに継代し、 $1 \times 10^5$  から  $8 \times 10^5$  cells/mL の範囲で培養した。実験には、培養開始後2週間以降の2ヶ月以内の細胞を用いた。

### 3) 細胞毒性試験 (ATP 法)

THP-1 細胞を 96-well プレートに播種し ( $2 \times 10^4$  cells/well)、24 時間後に被験液を添加し、4、24 及び 48 時間培養した。プレートを 30 分間室温間平衡化させた後、50  $\mu\text{L}$  の CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay 試薬 (ATP 試薬, Promega) を添加し、遮光、室温で 45 分または 90 分間反応させた。発光シグナルをルミノメーターで測定した。

### 4) THP-1 細胞の細胞表面マーカー測定

THP-1 細胞の表面マーカーの測定は、Human Cell Line Activation Test (h-CLAT 法) の改変法により実施した。各ナノマテリアルを 24 時間又は 48 時間処理した細胞を回収し、冷 FACS buffer (0.1% BSA 含有 PBS) にて 2 回洗浄後、600  $\mu\text{L}$  の 0.01% ヒト  $\gamma$  グロブリン含有 PBS に懸濁し、4°C で 15 分間静置して FcR のブロッキングを行なった。ブロッキング後、遠心して上清を除き、120  $\mu\text{L}$  の冷 FACS buffer に懸濁し、3 種類の抗体で染色した。抗体は FITC ラベルされた、anti-human CD54 (clone: 6.5B5, DAKO) 3/5 希釈、anti-human CD86 (clone: Fun-1, BD PharMingen) 3/5 希釈、アイソタイプコントロールとして mouse IgG1 (clone: DAK-G01, DAKO) 3/10 希釈を使用した。4°C で 30 分間静置して抗体染色後、200  $\mu\text{L}$  の冷 FACS buffer にて 2 回洗浄、400  $\mu\text{L}$  の冷 FACS buffer に再懸濁し、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の Propidium Iodide (PI, Life Technologies)を添加して、5 分後にフローサイトメトリー (FACS Calibur Cell Quest, Becton Dickinson) で解析した。死細胞は PI により染め分け、生細胞が 10,000 個になるまで測定した。細胞の生存率は、PI 陰性細胞の割合より算出した。

CD54 及び CD86 発現の評価は、相対蛍光強度 (Relative fluorescence intensity (RFI)) により行なった。

$$\text{RFI} (\%) = (\text{MFI of chemical treated cells} - \text{MFI of chemical treated isotype control cells}) / (\text{MFI of vehicle control cells} - \text{MFI of vehicle control isotype control cells}) \times 100$$

MFI= Geometric Mean fluorescence intensity

### 5) 培養上清中のサイトカインの測定

細胞表面マーカー測定試験を実施する際

に、培養上清を別のチューブに移し、液体窒素で凍結後、-80℃で保存した。

Interleukin-8 (IL-8), IL-1β, IL-6, IL-10, Tumor Necrosis Factor (TNF), IL-12p70 の測定は、BD™ Cytometric Bead Array (CBA) human inflammation kit (Becton Dickinson)を用いて、フローサイトメトリーにより測定した。

## 6) FSC-SSC ドットプロット解析

ZnO ナノマテリアルの細胞内への取り込みについて検討するため、ZnO で処理した THP-1 細胞をフローサイトメトリーで解析し、前方散乱光 (forward scattered (FSC)) 強度及び、側方散乱光 (side scattered light (SSC)) 強度の相関について検討した。10,000 細胞について解析した。

(倫理面への配慮)  
該当なし。

## C. 結果

### 1) ZnO ナノマテリアルの THP-1 細胞に対する細胞毒性評価

ナノマテリアルの気道及び皮膚毒性新規評価系の開発およびマーカーの開発を目指すと共に、経気道及び経皮曝露を想定した毒性メカニズムを解明するための研究を進めるため、2 種類の ZnO ナノマテリアル分散製品を対象として、その物理化学的性質について明らかにすると同時に、THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性について検討した。研究に用いた ZnO ナノマテリアルの一次粒子径、懸濁液中での粒径分布、ゼータ電位、形状・凝集状態等の物理化学的性質と A549 細胞及び THP-1 細胞に対する細胞毒性について表 1 にまとめた。また、図 1 に、ZnO ナノマテリアルの水懸濁液及び血清含有培地懸濁液中での粒度分布 (散乱強度分布) を示した。(ナノマテリアル

溶液の物理化学的性質の測定に関しては、分担研究者・河上の報告参照。) 2 種類の ZnO ナノ分散製品(sigma 及び alfa)は、一次粒子径がそれぞれ <35 nm, 40 nm、水懸濁液中(10 mg/mL)での平均粒子径は、それぞれ 66 nm, 165 nm、ゼータ電位は 44.9 mV, -7.5 mV であった。血清含有培地懸濁液中(0.2 mg/mL)では、ZnO(sigma)は粒径が変化した。ZnO(alfa)は殆ど変化せず、ゼータ電位は共に血清含有培地に近い値を示した。図 2 に、ZnO ナノマテリアルの THP-1 細胞に対する細胞毒性試験の結果を示した。細胞毒性の検討は、THP-1 が浮遊細胞であり、細胞の血球系の細胞で大きさも小さいことから、ATP 法により測定した。THP-1 細胞に対する細胞毒性は、A549 細胞同様、ZnO(sigma)が ZnO(alfa)より強かった。

### 2) THP-1 細胞における ZnO ナノマテリアルによる細胞表面マーカーの変化

THP-1 細胞の表面マーカーの測定は、Human Cell Line Activation Test (h-CLAT 法)の改変法により実施した。図 3 に、ZnO ナノマテリアルによる THP-1 細胞に対する細胞毒性を PI 染色により評価した結果を示した。ZnO 処理 24 時間では、ZnO (alfa)は細胞毒性を示さず、ZnO(sigma) 50µg/mL 処理で弱い細胞毒性を示した。48 時間では、ZnO 50µg/mL では、viability が ZnO(sigma)処理で 26%、ZnO(alfa)処理で 59%まで低下した。図 4, 5 に ZnO ナノマテリアルによる THP-1 細胞における細胞表面マーカーの変化について検討した結果を示した。ZnO は共に、CD54 を用量依存的に活性化し、ZnO(Sigma)の方が相対蛍光強度(RFI) は高かった。ZnO(sigma) 50µg/mL 処理では、24 時間で RFI は 1270%まで上昇し、48 時間目でも殆ど同じ結果を示した。ZnO(alfa)では、RFI は

750%まで上昇した。これに対して、CD86 においては ZnO による発現量の変化は観察されなかった。

### 3) THP-1 細胞における ZnO ナノマテリアルによるサイトカイン産生

ZnO ナノマテリアルによる THP-1 細胞におけるサイトカインの産生について、今回、CBA Human inflammation kit を用いて、フローサイトメトリーにより、6 種類のサイトカインを同時に測定した。その結果、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF において産生の増加が観察され、その量は ZnO(Sigma)の方が多かった(図 6)。IL-6、IL-10 は検出限界未満で、IL-12p70 は ZnO 50 $\mu$ g/mL 処理で僅かに検出できた程度であった。

### 4) ZnO ナノマテリアルの細胞内への取り込み

フローサイトメトリーにより、ZnO ナノマテリアル処理 THP-1 細胞の前方散乱光(FSC)強度及び側方散乱光(SSC)強度について検討した。ZnO 処理 48 時間後に、10,000 細胞について解析した結果を、図 7 に示した。FSC 強度は、レーザーの光軸に対して前方で検出される光で、細胞の面積、大きさに関連する指標である。SSC 強度は、レーザーの光軸に対して 90°の角度で検出される光で、細胞の顆粒性状、内部構造に関連する指標である。FSC は、ZnO 処理により変化がなかったのに対して、SSC は、ZnO 処理により、用量依存的な増加が観察された。また、ZnO(sigma)と ZnO(alfa)を比較すると、ZnO(sigma)の方が SSC が増加していた。

## D. 考察

ナノマテリアルの気道及び皮膚毒性新規評価系の開発およびマーカーの開発を目指すと共に、経気道及び経皮曝露を想定した

毒性メカニズムを解明するための研究を進める上で、血球系由来細胞株を用いた評価系は有用であると考えられる。THP-1 細胞を用いた h-CLAT 法は、皮膚感作誘導過程において、抗原提示に関わる表面抗原 CD54 及び CD86 の発現が変化することから、遅延型炎症性反応(感作性)を調べる *in vitro* 評価法として、化粧品材料をはじめとする化学物質の評価に汎用され、多くのデータを有している。本研究では、2 種類の ZnO ナノマテリアル分散製品について、水懸濁液及び血清含有培地懸濁液中での物理化学的性質について明らかにすると同時に、THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性、免疫応答について検討した。先行する A549 細胞を用いた ZnO ナノマテリアル分散製品に対する細胞毒性試験の結果と比較すると、両細胞株で共に、ZnO(Sigma) の細胞毒性が強いという結果が得られた。細胞表面マーカー CD54 の発現量は、ZnO の用量依存的に増加が観察され、ZnO(Sigma)の方が ZnO(alfa)に比べて高かった。また、サイトカイン産生は、ZnO 処理により、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF において産生の増加が観察され、その量は ZnO(Sigma)の方が多かった。ZnO 処理 THP-1 細胞をフローサイトメトリー解析により、FSC-SSC ドットプロット解析した結果、FSC は変化せず、細胞の顆粒性状、内部構造に関連する指標 SSC が用量依存的に増加していた。ZnO(sigma)と ZnO(alfa)を比較すると、ZnO(sigma)の方がより SSC が増加しており、細胞内に取り込まれた ZnO 量と細胞毒性との間に関連があると考えられた。ZnO(sigma)と ZnO(alfa)の細胞影響の違いは、両 ZnO の物理化学的な性質が関連していると考えられた。

今後、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルについても同様の検討を行い、ナノマテリアルの細胞毒

性及び遺伝毒性発現メカニズムについて明らかにする予定である。

## E. 結論

2種類のZnOナノマテリアル分散製品について、物理化学的性質について明らかにすると同時に、ヒト血球系細胞株THP-1を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答（細胞表面マーカーCD54及びCD86の発現、培養上清中のサイトカイン量）について検討した結果、

- ・ THP-1細胞に対する細胞毒性は、A549細胞同様、ZnO(sigma)がZnO(alfa)より強かった。
- ・ ZnOは共に用量依存的にCD54発現量を増加させ、RFIはZnO(sigma)の方が高かった。
- ・ ZnO処理によりTHP-1細胞におけるIL-8、IL-1 $\beta$ 、TNFの産生が観察され、その量はZnO(sigma)の方が多かった。
- ・ ZnO処理後のTHP-1細胞をフローサイトメーターで解析した結果、SSC強度の変化が、用量依存的に観察された。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

## 2. 学会発表

- 1) 河上強志, 宮島敦子, 小森谷薫, 加藤玲子, 伊佐間和郎, NiOナノ粒子の二次粒子径が細胞毒性に及ぼす影響, 第24回環境化学討論会, 札幌市, 2015年6月
- 2) 宮島敦子, 河上強志, 小森谷薫, 加藤玲子, 新見伸吾, 伊佐間和郎, 物理化学的性質の異なる酸化亜鉛ナノマテリアルの細胞応答, 第42回日本毒性学会学術大会, 石川, 2015年6月
- 3) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, S. Niimi, K. Isama. Effects of zinc oxide nanomaterials on the cellular responses in THP-1 cells, The 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, USA, March, 2016.

## G. 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

表1 ZnOナノマテリアルの物理化学的特性とA549細胞、THP-1細胞に対する細胞毒性、遺伝毒性

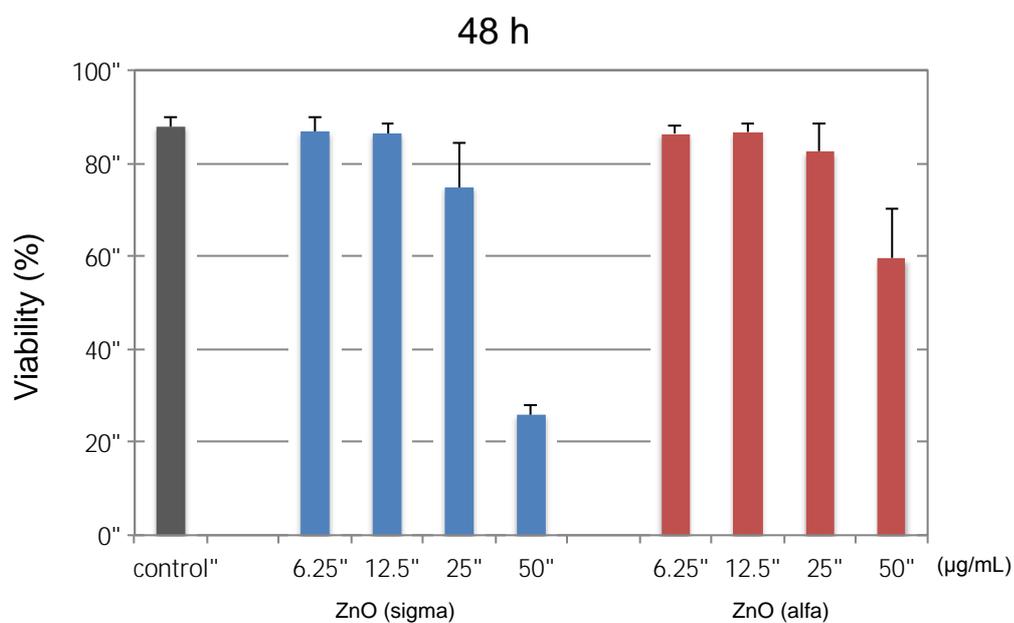
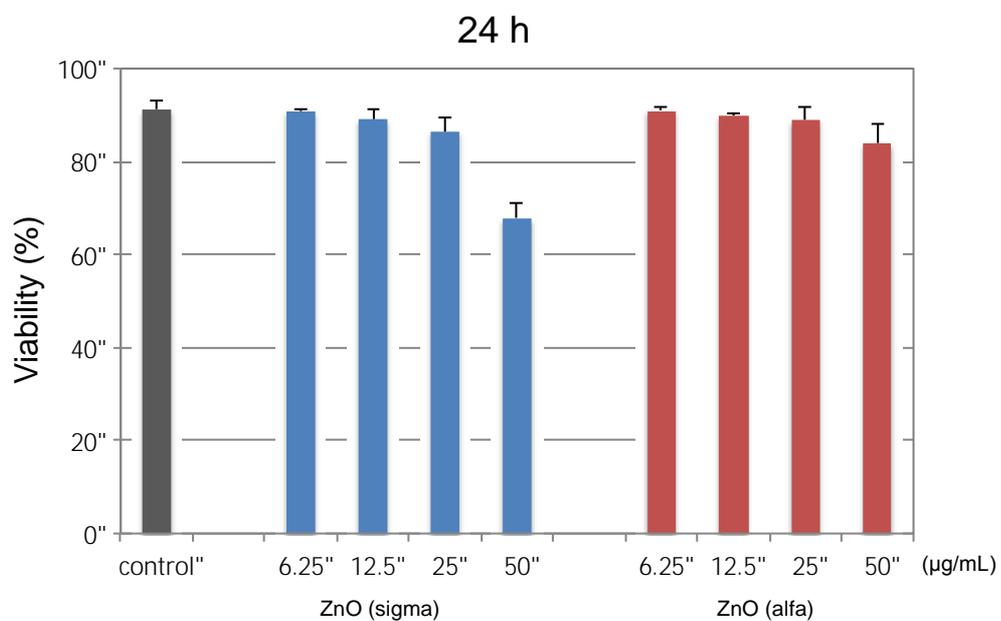


図3 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞の細胞毒性(PI法)

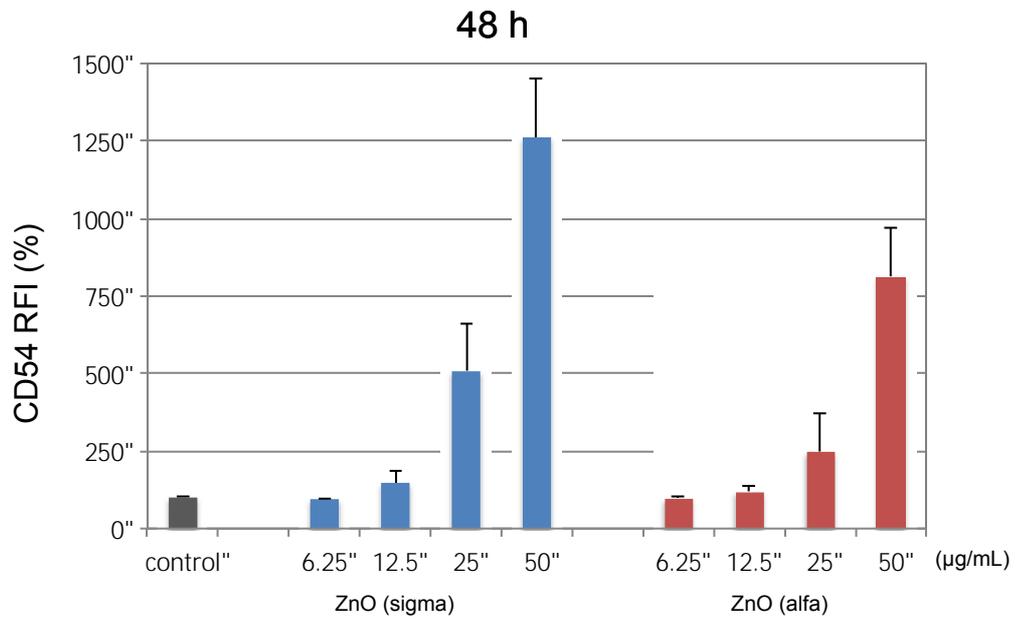
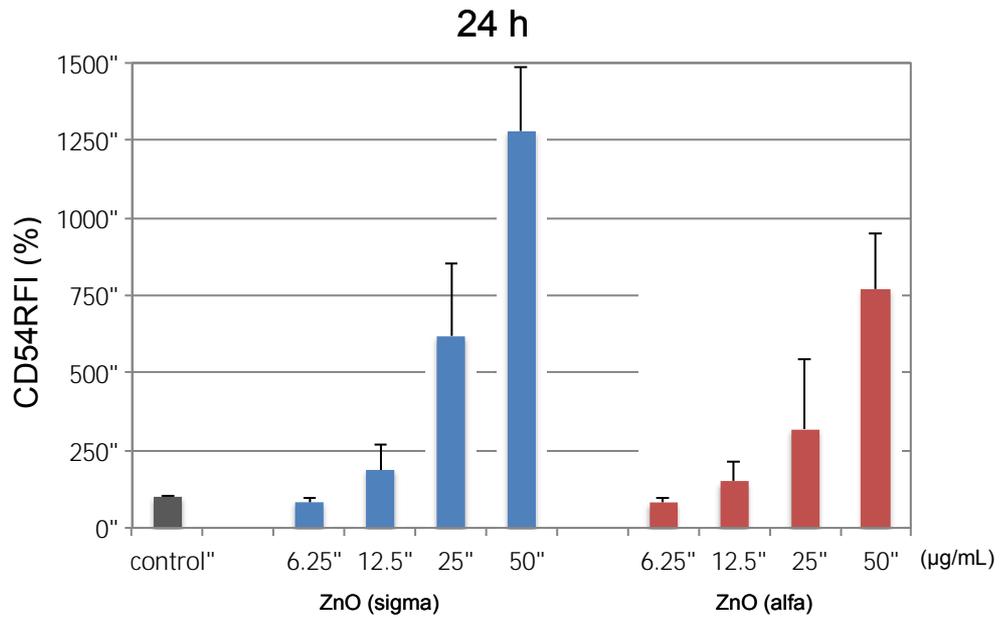


図4 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のCD54の発現強度

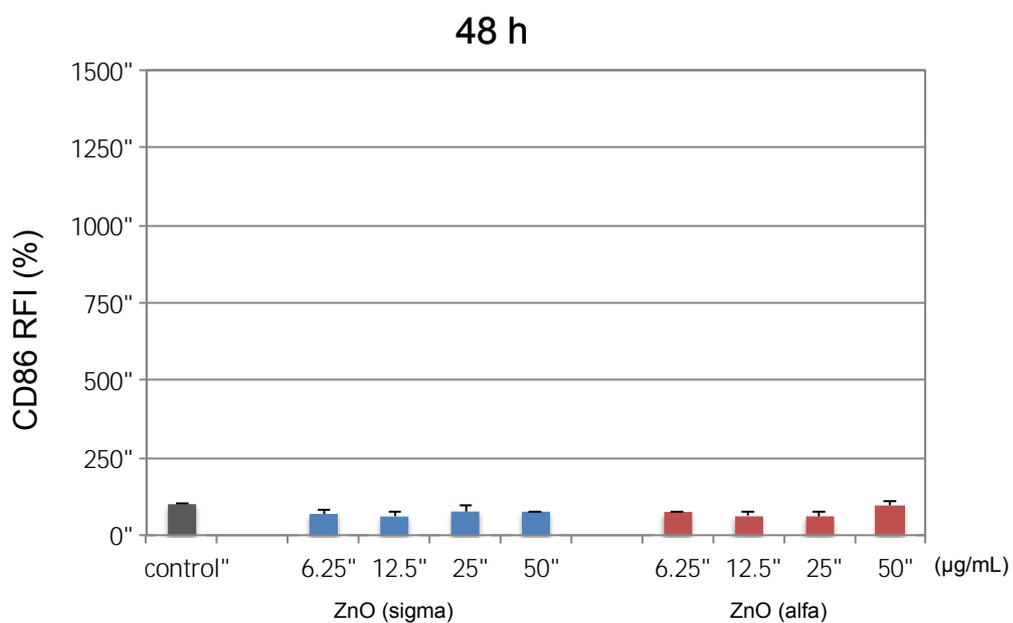
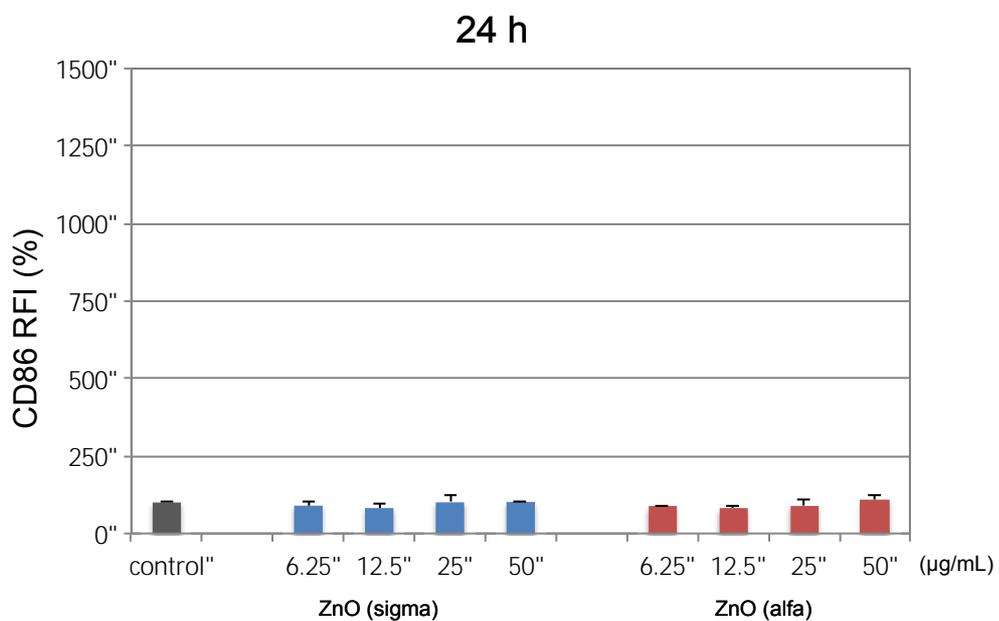


図5 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のCD86の発現強度

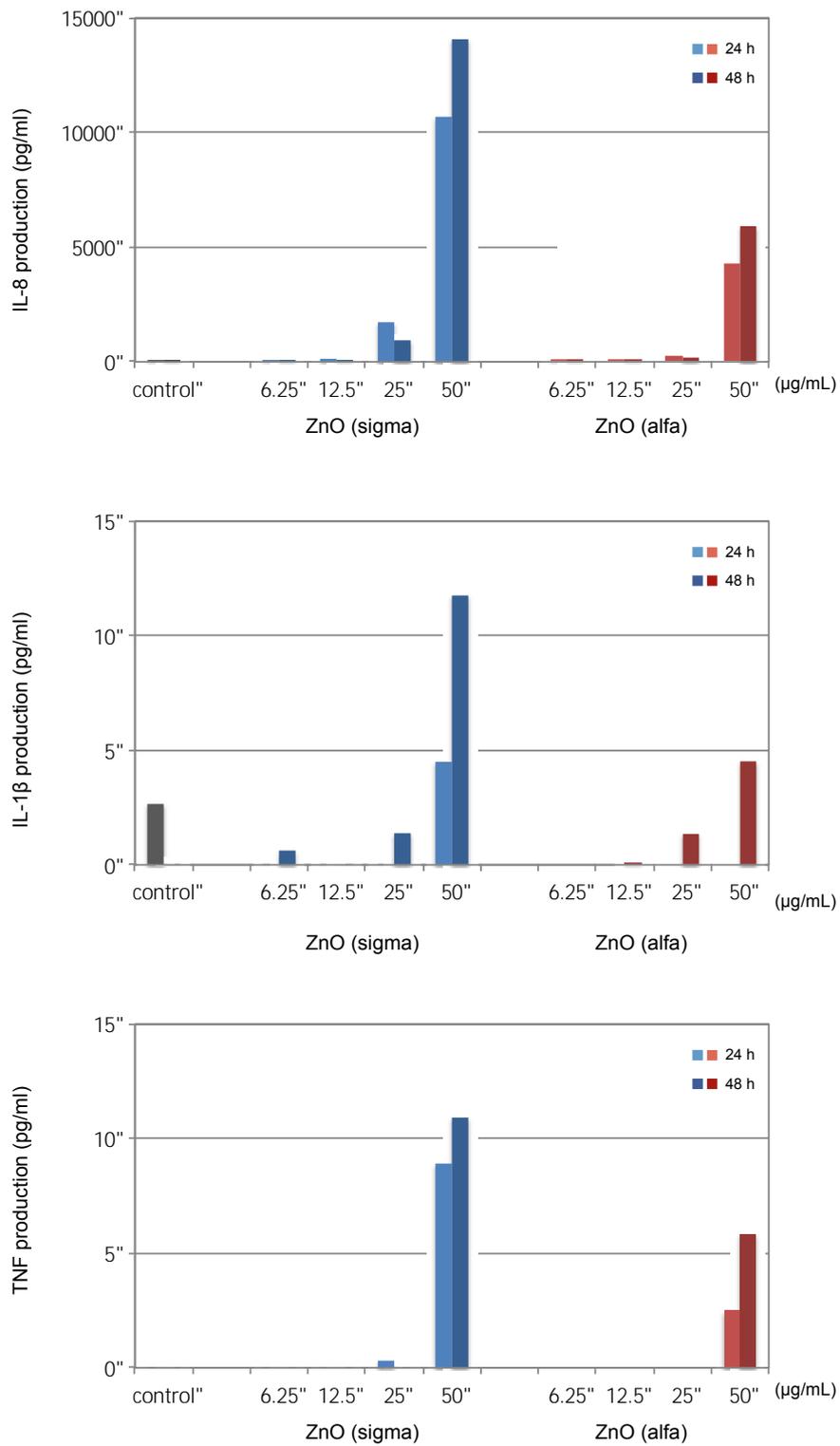


図6 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のサイトカイン産生

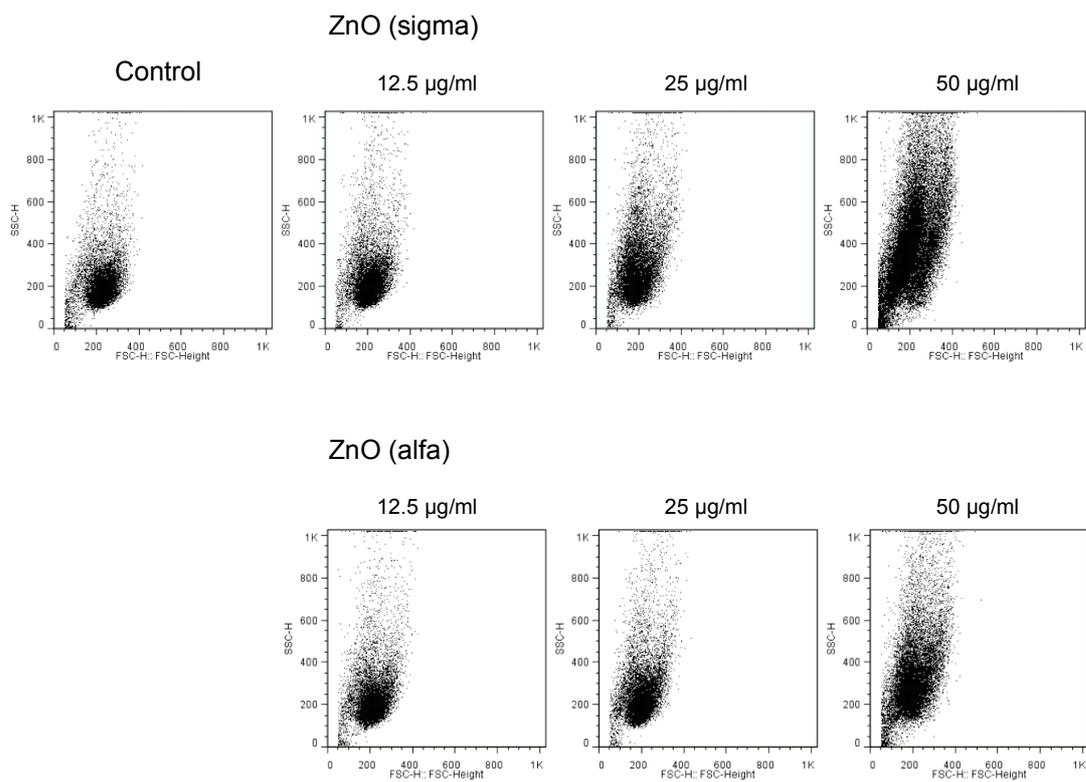


図7 酸化亜鉛ナノマテリアル処理48 h後のTHP-1細胞のFSC-SSC ドットプロット