

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	室長
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

研究要旨：一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる酸化ニッケル（NiO）ナノマテリアル懸濁液を用いて、ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 及びヒト血球系細胞株 THP-1 の細胞毒性に対する影響を検討した結果、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。その傾向は、A549 細胞において顕著に観察された。NiO 処理による THP-1 細胞の細胞表面マーカー CD54 及び CD86 の変化についてフローサイトメトリーにより解析した結果、CD54 の相対蛍光強度（RFI）は、用量依存的に上昇が観察されたが、二次粒子径による差異は認められなかった。NiO 処理後の THP-1 細胞をフローサイトメトリーにより前方散乱光（FSC）強度及び側方散乱光（SSC）強度について解析した結果、SSC 強度の分布の変化が観察された。さらに、NiO 処理により培養上清中のサイトカインは IL-8, IL-1 β , TNF の増加が観察され、TNF, IL-1 β 産生量は NiO の二次粒子径により差異が認められた。以上より、NiO の二次粒子径サイズの違いが、THP-1 細胞の細胞毒性や免疫応答に影響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。

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。ナノマテリアルの生体影響には、化学組成に加えて、形状、粒子径、凝集状態、表面積、表面荷電など、様々な物理化学的要因

が関与している。我々は、培養細胞を用い、十分にキャラクタリゼーション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てきた。

平成 28 年度は、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる酸化ニッケル（NiO）懸濁

液を用いて、ナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価して、ヒト血球系細胞株 THP-1 の細胞毒性及び細胞表面マーカー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への NiO ナノマテリアルの二次粒子径サイズの影響について検討した。

B. 研究方法

1) 材料及び物理化学的特性の測定

NiO ナノマテリアル (Sigma-Aldrich, 一次粒子径 : <50 nm) を用い、サイズの異なる粉碎用ジルコニアボール (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) と遊星ボールミル型粉碎機 NP-100 (シンキー) にて二次粒子径の異なる NiO 懸濁原液を調製した。この懸濁原液を血清を含む液体培地で希釈した。懸濁液及び培地懸濁液中での平均粒子径、粒径分布等を、動的光散乱光度計 ELSZ-2NPA (大塚電子) 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 CdSO₄ (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、1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) (Sigma-Aldrich), NiCl₂ (WAKO) を用いた。

2) 細胞株及び培養方法

ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 (JCRB) は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、1% non-essential amino acid (NEAA) を含む MEM (GIBCO) にて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。細胞株は、3-4 日ごとに継代培養した。

ヒト白血病由来単球細胞株 THP-1 (ATCC) は、10% 非働化 FBS、penicillin-streptomycin (PS)、0.055 mM 2-mercaptoethanol を含む RPMI 1640 (GIBCO) にて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。細胞株は、 1×10^5 から 8×10^5

cells/mL の範囲で継代培養した。実験には、培養開始後 2 週間以降 2 ヶ月以内の細胞を用いた。

3) 細胞毒性試験 (MTS 法)

A549 細胞は、96-well プレートに播種し (5×10^3 cells/well) 24 時間後に被験液を添加し、48 時間培養した。培地を除去後、100 μ L の Phenol Red-free 培地及び 20 μ L の MTS 試薬 (CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent, Promega) を添加し、5% CO₂ インキュベーターで 37°C、1 時間反応した。生成されるフォルマザンをマイクロプレートリーダー (490 nm) で測定した。

THP-1 細胞は、96-well プレートに Phenol Red-free 培地を用いて播種し (2×10^4 cells/well) 24 時間後に被験液を添加し、48 時間培養した。40 μ L の MTS 試薬を添加し、同様に生成されるフォルマザンをマイクロプレートリーダー (490 nm) 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 μ L の 0.01% ヒト γ 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 μ 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 μ L の冷 FACS buffer にて 2 回洗浄、400 μ L の冷 FACS

buffer に再懸濁し、2.5 µg/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) で測定し、FlowJo (Tomy Digital Biology) により解析した。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、以下の式に基づいて相対蛍光強度 (Relative fluorescence intensity (RFI)) により行なった。

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

MFI = Geometric mean fluorescence intensity

5) FSC-SSC ドットプロット解析

NiO 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、NiO で処理した THP-1 細胞をフローサイトメトリーで解析し、10,000 細胞について、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解析した。

6) 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、培養上清を蛋白低吸着チューブに移し、液体窒素で凍結後、-80°C 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、FCAP Array™ Software (Becton Dickinson) により解析した。(検出限界 IL-8 ; 3.6 pg/mL、IL-1β ; 7.2 pg/mL、IL-6 ; 2.5 pg/mL、IL-10 ; 3.3 pg/mL、TNF ; 3.7 pg/mL、IL-12p70 ; 1.9 pg/mL)

(倫理面への配慮)
該当なし。

C. 結果

1) NiO ナノマテリアルの A549 及び 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、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアル懸濁液を用いて、その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。) ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 細胞及びヒト血球系細胞株 THP-1 細胞を用いた評価系を用いて、細胞毒性について検討した。図 1 及び図 2 に、NiO ナノマテリアルの懸濁原液及び血清含有培地中での粒度分布 (散乱強度分布) を示した。3 種類のジルコニアボールを用いて調製した NiO 懸濁原液 (10 mg/mL) の平均粒子径は、それぞれ 102, 172, 310 nm であった。培地中では懸濁原液より若干平均粒子径は大きくなったものの、同様の傾向を示した。粒径分布も同様の傾向を示した。研究に用いた NiO ナノマテリアルの懸濁液中での平均粒子径と A549 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。A549 及び THP-1 細胞を用いて、細胞毒性試験を実施した結果、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。その傾向は、A549 細胞において顕著に観察された。

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

図 3 に、NiO 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。MTS 試薬を用いて細胞毒性について検討した結果と同様、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められたが、その差は僅かであった。図 4 及び図 5 に NiO 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。CD54 の相対蛍光強度 (RFI) は、NiO 用量依存的に上昇が観察され、NiO 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 783~883 %であったが、NiO 二次粒子径による差異は認められなかった。一方、CD86 の RFI は NiO 処理により NiO 50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで NiO 用量依存的な上昇が観察され、その RFI の程度は NiO 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 216~260 %であった。

3) NiO 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、NiO 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。NiO 処理 24 時間後の THP-1 細胞について解析した結果を、図 6 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、NiO 処理により変化がなかったのに対して、SSC は、NiO 処理により用量依存的な分布変化が観察された。また、懸濁液中の NiO の二次粒子径が大きくなるほど SSC の変化は大きかった。

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

NiO 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、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、NiO 処理により培養上清中の IL-8, IL-1 β , TNF の上昇が観察された (図 7)。IL-6, IL-10, IL-12p70 は検出限界未満であった。IL-8 産生量は、NiO 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で顕著に観察され、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理群の方が産生量が多かった。IL-1 β 及び TNF 産生量は NiO 用量依存的に上昇が観察され、IL-1 β は、NiO (粉碎ジルコニアボールの直径 0.5mm) 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において産生量が高かった。TNF 産生量は、NiO (直径 0.5 mm) 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、NiO (直径 0.05 mm) に比べると産生量が高かったが、IL-8, IL-1 β , TNF のいずれのサイトカインにおいても、NiO の二次粒子径の差異は影響しなかった。

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、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる NiO 懸濁液を用いて、水懸濁液及び血清含有培地懸濁液中での粒径分布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、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。

細胞毒性試験の結果を、A549 及び THP-1 細胞とで比較すると、どちらの細胞株も懸

濁液中の NiO の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められ、その傾向は、A549 細胞において顕著に観察された。昨年度実施した、2 種類の ZnO ナノマテリアル分散製品を用いた A549 及び THP-1 細胞に対する細胞毒性試験では、ZnO (sigma) と ZnO (alfa) を比較すると、どちらの細胞株も ZnO (sigma) の細胞毒性が強いという結果が得られた。IC50 値を比較すると、A549 細胞の方が ZnO の毒性の差が顕著に観察され NiO と同様であった。A549 及び THP-1 細胞は、共にヒトの細胞株であるが由来の組織が異なるため、ナノマテリアルに対する感受性や応答が異なることが予想される。また、細胞の培養状態に関しても接着と浮遊で異なるため、ナノマテリアルとの接触の状態が異なることが、細胞内への取り込み等へ影響を与えている可能性も考えられる。

THP-1 細胞における細胞表面マーカー CD54 の発現量は、NiO の用量依存的に増加したが、二次粒子径による差異は認められなかった。陽性対照物質として用いた NiCl₂ の応答と比較すると、NiO (粉碎用ジルコニアボールの直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 200 µg/mL と NiCl₂ 250 µM の CD54 RFI が同程度、NiO (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 400 µg/mL と NiCl₂ 500 µM の CD54 RFI が同程度であった。また、CD86 RFI においても、NiO (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 200 µg/mL と NiCl₂ 250 µM が同程度であった。THP-1 細胞において、Ni イオンは感作性物質として CD54 及び CD86 の応答に関与することが知られており、NiO ナノマテリアルに対する応答においても Ni イオンが作用している可能性が考えられる。NiO 処理 THP-1 細胞を、フローサイトメトリーにより 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。懸濁液中の NiO の二次粒

子径が大きくなるほど SSC の変化は大きく、細胞内に取り込まれている量が多いと考えられ、細胞内に取り込まれた NiO 量と細胞毒性との間に関連があると考えられた。サイトカイン産生は、NiO により、IL-8, IL-1β, TNF において用量依存的なサイトカイン産生の増加が観察された。TNF, IL-1β 産生量は NiO (直径 0.5 mm) において最も産生が多かったが、NiO (直径 0.05 mm) と NiO (直径 0.1 mm) 間では、二次粒子径による差が認められなかった。また、IL-8 産生量は、NiO (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 間で、二次粒子径による差が認められなかったことから、NiO によるサイトカイン産生に二次粒子径は影響を及ぼさないと考えられた。

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

1. 一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアル懸濁液を用いて、ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 及びヒト血球系細胞株 THP-1 の細胞毒性に対する影響を検討した結果、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。その傾向は、A549 細胞において顕著に観察された。
2. NiO 処理による THP-1 細胞の細胞表面マーカー CD54 及び CD86 の変化についてフローサイトメトリーにより解析した結果、CD54 の相対蛍光強度 (RFI) は、用量依存的に上昇が観察されたが、二次粒子径による差異は認められなかった。NiO 処理後の THP-1 細胞をフローサイトメトリーにより前方散乱光 (FSC) 強度及び側方散乱光 (SSC) 強度について

解析した結果、SSC 強度の分布変化が観察された。NiO 処理により培養上清中のサイトカインは IL-8, IL-1 β , TNF の増加が観察され、TNF, IL-1 β 産生量は NiO の二次粒子径により差異が認められた。

なし

以上より、NiO の二次粒子径サイズの違いが、THP-1 細胞の細胞毒性や免疫応答に影響していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) M. Usami, M Takamatsu, S. Kazama, K. Mitsunaga, A. Miyajima, T. Irie, O. Doi, T. Takizawa, T. Nagi, M. Sunouchi, Proteomic analysis of valproic acid-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos., Fundam. Toxicol. Sci., 2017, 4(1), 31-5.

2. 学会発表

1) 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, 二次粒子径の異なる酸化ニッケルナノ粒子に対する THP-1 細胞の細胞応答, 第 43 回日本毒性学会学術大会, 名古屋, 2016 年 6 月

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

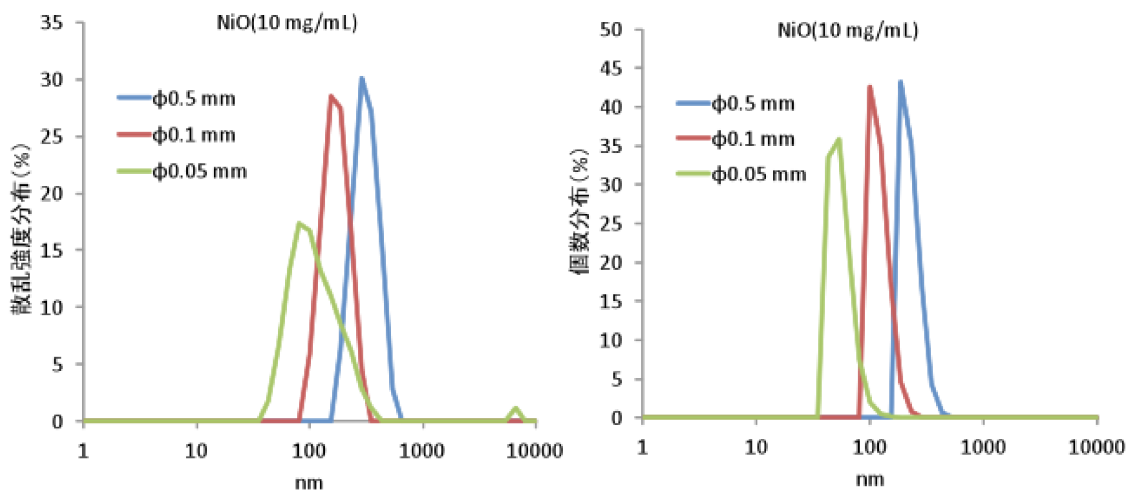


図1 NiO 懸濁原液(10 mg/mL)の散乱強度分布及び個数分布

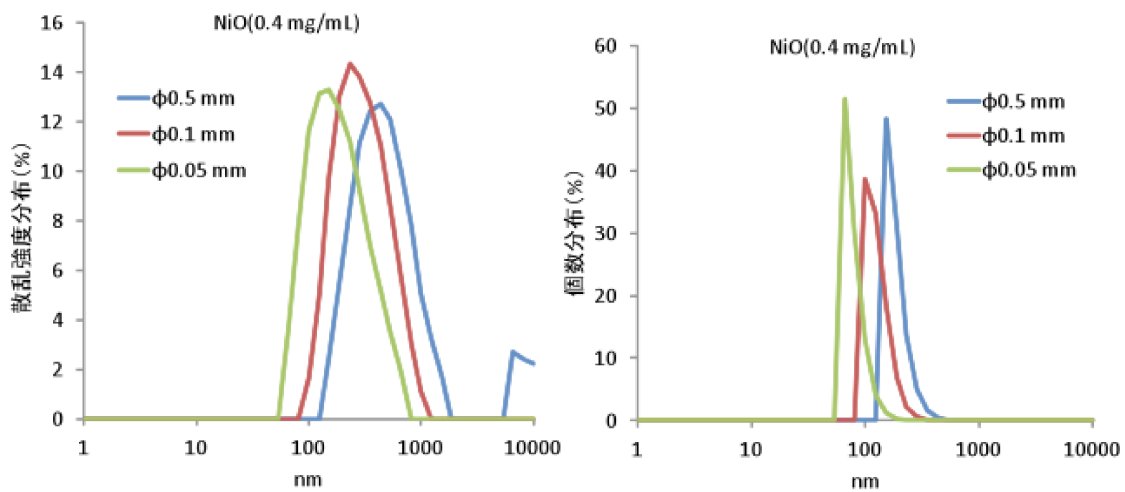


図2 NiO 懸濁液(培地中 0.4 mg/mL)の散乱強度分布及び個数分布

表1 NiOナノ粒子の物理化学的特性とA549, THP-1細胞に対する細胞毒性

	懸濁液中平均粒子径 ^a (nm ± SD) ^c					細胞毒性 (IC50)	
	注射用水	10%FBS-MEM培地				A549細胞	THP-1細胞
	(10 mg/ml)	(0.4 mg/ml)	(0.2 mg/ml)	(0.1 mg/ml)	(0.05 mg/ml)	MTS法 (48h) ($\mu\text{g/ml}$)	MTS法 (48h) ($\mu\text{g/ml}$)
NiO (ϕ 0.05nm) ^b	102.0 ± 0.5	154.8 ± 1.2	152.6 ± 2.5	151.2 ± 3.0	135.2 ± 1.5	147.5	35.8
NiO (ϕ 0.1nm) ^b	172.0 ± 2.8	234.7 ± 2.2	249.9 ± 4.2	258.0 ± 1.5	234.5 ± 17.8	83.5	34.2
NiO (ϕ 0.5nm) ^b	310.4 ± 6.7	373.1 ± 0.6	411.9 ± 13.1	345.1 ± 15.4	414.2 ± 5.8	33.4	30.0

^a 測定機器: 大塚電子ELSZ-2NPA ^b 粉体を秤量後、各サイズのジルコニアボールを用い遊星ボールミル型湿式破碎処理により調製。Tween80(0.1%(w/v))含有。

^c cumulant法より算出

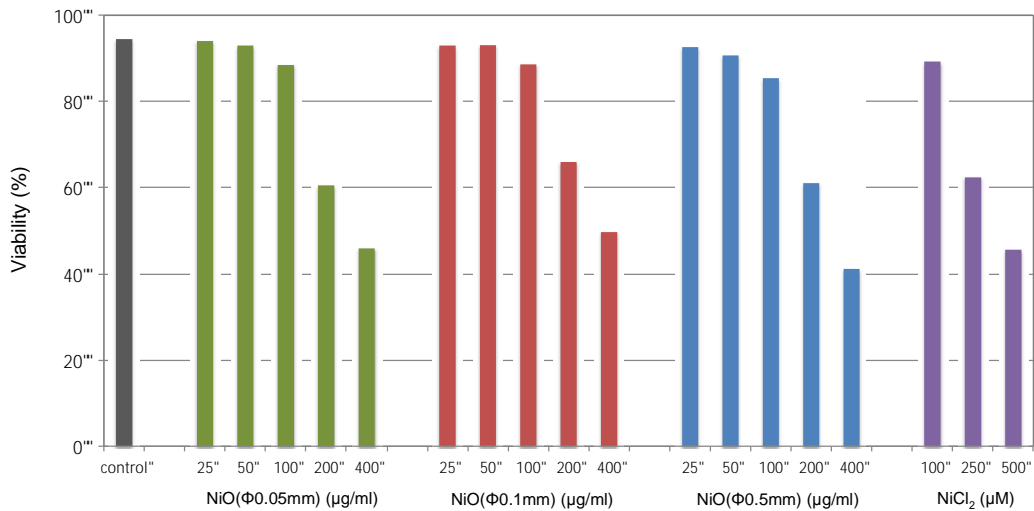


図3 NiO処理によるTHP-1細胞の細胞毒性(PI法)

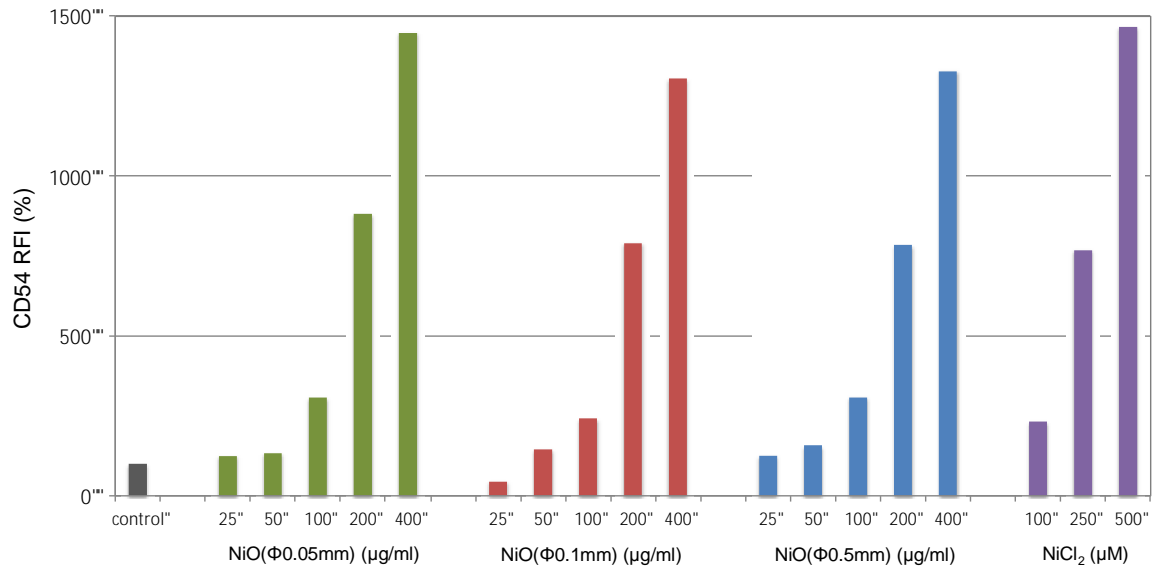


図4 NiO処理によるTHP-1細胞のCD54の発現強度

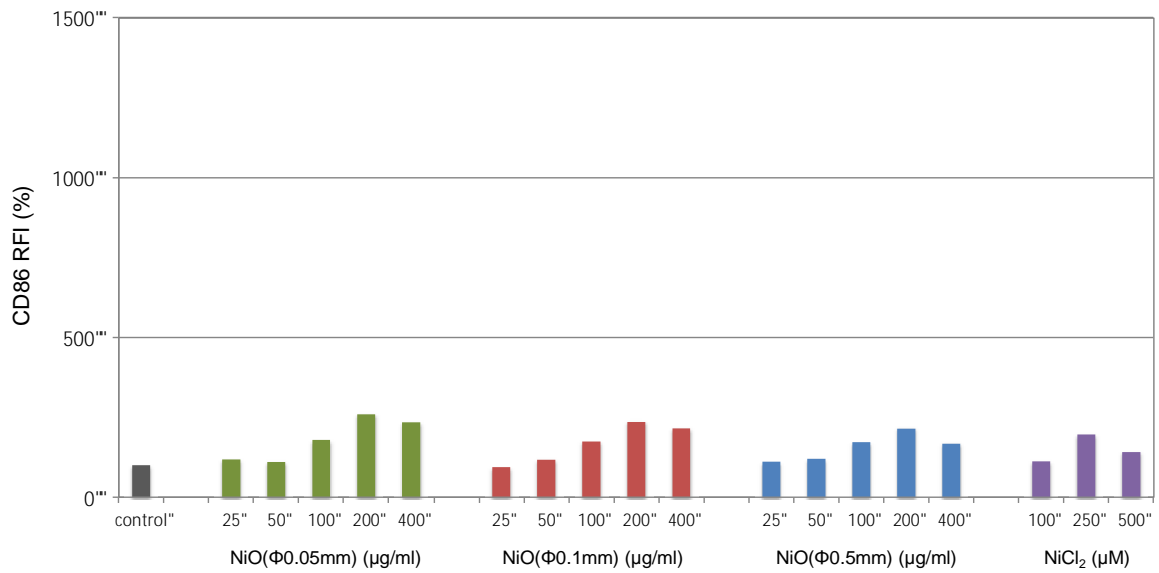


図5 NiO処理によるTHP-1細胞のCD86の発現強度

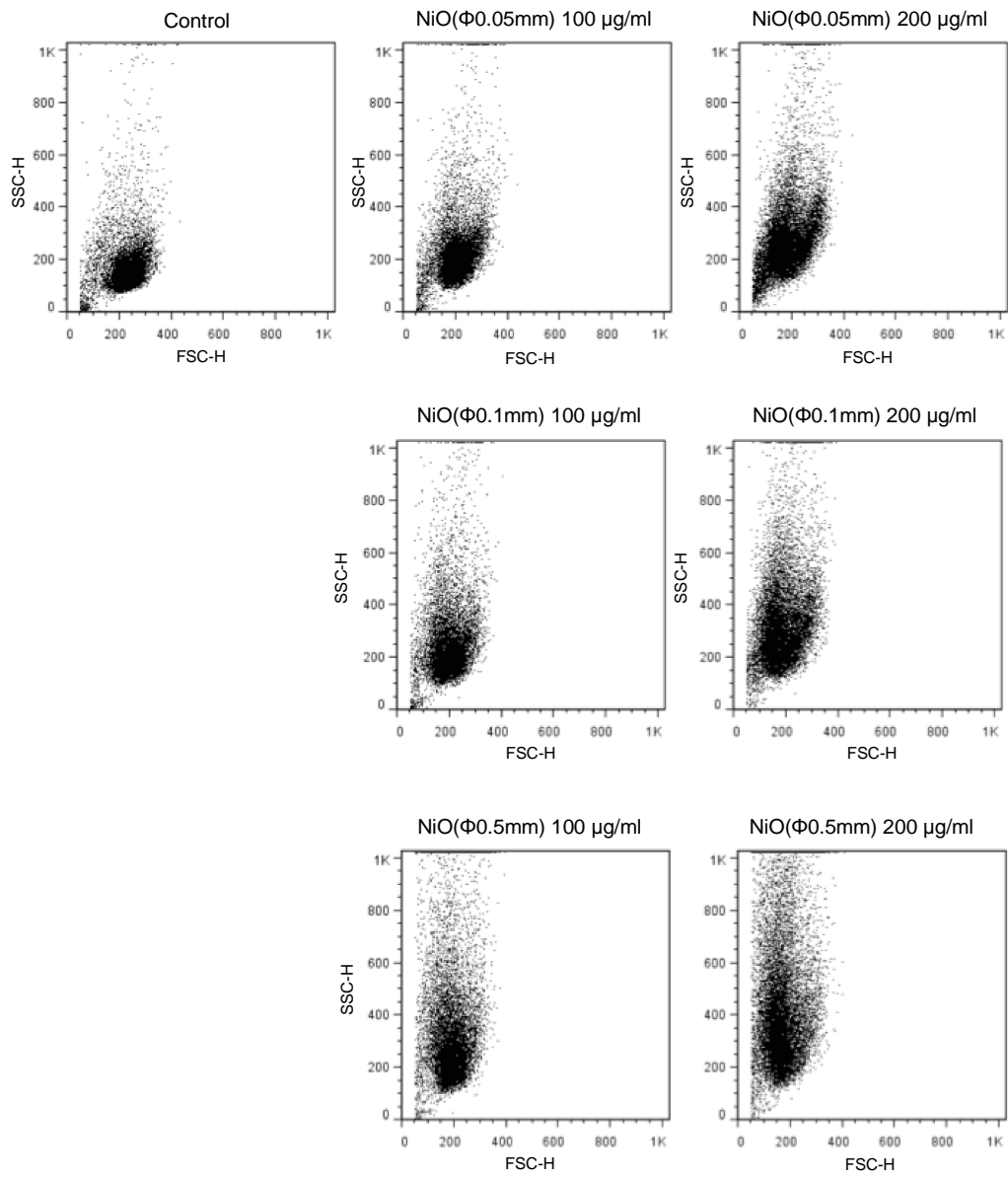


図6 NiO処理24時間後のTHP-1細胞のFSC-SSC ドットプロット

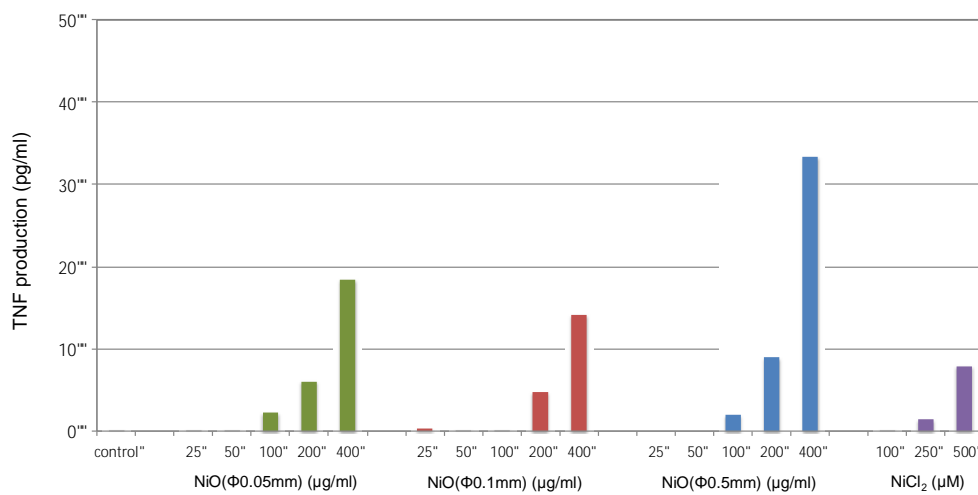
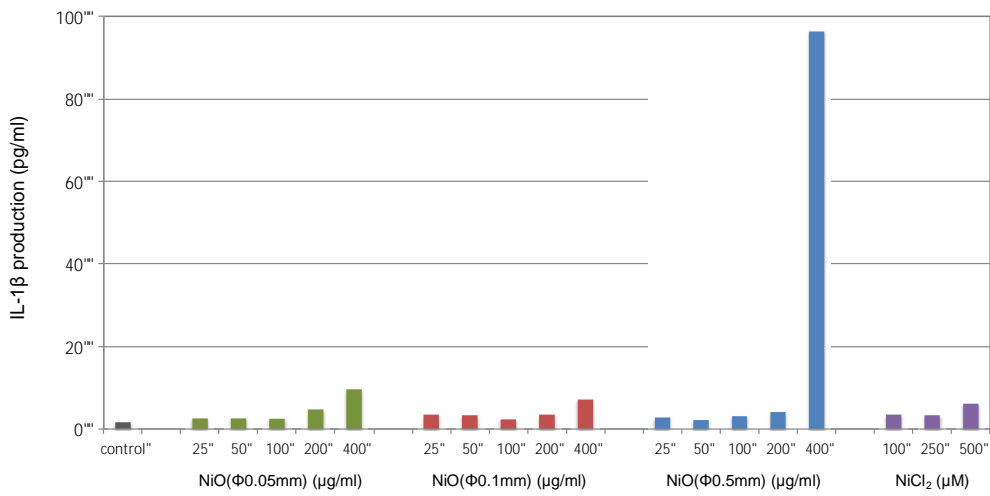
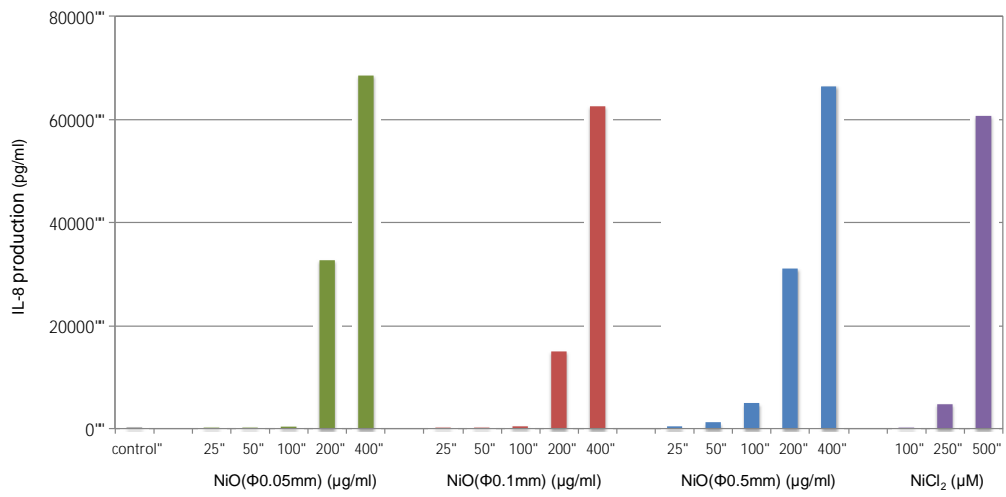


図7 NiO処理によるTHP-1細胞のサイトカイン産生