

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及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： 2 種類の酸化亜鉛 (ZnO) ナノマテリアル及び 3 種類の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) ナノマテリアルを用いて、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 及び再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。THP-1 細胞を用いた検討では、ZnO(sigma)及び ZnO(alfa)において、ZnO(sigma)が強い細胞毒性を示した。免疫応答に関しては、ZnO 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、ZnO 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。サイトカイン産生は、IL-8、IL-1 β 、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。NiO を用いて 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。NiO 処理により CD54 の 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 細胞の FSC 強度及び 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。サイトカイン産生は 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。これらの結果は 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。次に、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性試験を実施した結果、LabCyte EPI-MODEL は、陽性対照の 1% SDS で細胞毒性を示したが、ZnO、NiO 共に最高濃度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において細胞毒性を示さなかった。LabCyte EPI-MODEL のサイトカイン産生について確認した結果、1% SDS で IL-1 α 、MIF の増加が観察されたが、ZnO、NiO によるサイトカイン産生の変化は観察されなかった。以上より、LabCyte EPI-MODEL では、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。

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 27 年度は、2 種類の酸化亜鉛 (ZnO) ナノマテリアル分散製品について、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。平成 29 年度は、2 種類の ZnO ナノマテリアル及び 3 種類の NiO ナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) に対する細胞毒性試験を実施した。また、培養上清中のサイトカインを測定し免疫応答へ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

酸化亜鉛ナノマテリアル懸濁液は、Sigma-Aldrich 及び NanoTeK Alfa Aesar のナノ分散製品を用いた (以下、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)と略す)。注射用水にて 10 mg/mL

に調製し、懸濁原液とした。NiO ナノマテリアル懸濁液は、Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル (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 (10 mg/mL) を調製した。これらの懸濁原液を血清を含む液体培地で希釈した。懸濁原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、細胞毒性試験方法

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% CO₂ インキュベーターで培養した。細胞株は 3 - 4 日ごとに継代し、 1×10^5 から 8×10^5 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。細胞毒性試験は、THP-1 細胞を 96-well プレートに播種し (2×10^4 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 μ L の CellTiter-Glo[®] 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。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。

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 (JCRB)は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS) 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。コロニー形成試験は、ISO 10993-5:2009 に従い、24-well プレートに細胞を播種し (50 cells/ well)、24 時間後に培地を除き、被験液を添加し、さらに 4 日間培養した。培養終了後、培地を除去し、MeOH を添加して細胞を固定後、ギムザ染色液によりコロニーを染色した。陰性対照材料として PE シート、陽性対照材料として A (0.1% zinc diethyldithio-carbamate (ZDEC)-PU シート)、B (0.1% zinc dibutyldithio-carbamate (ZDBC) -PU シート) (食品薬品安全センター秦野研究所) を用いた。

3) 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。THP-1 細胞 (1 x 10⁶ cells/ 1 mL/ well/24-well plate) を各ナノマテリアルと 24 または 48 時間培養した。細胞を遠心により回収し、冷 FACS buffer (0.1% BSA 含有 PBS) にて 2 回洗浄後、600 μL 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 μL 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 μL の冷 FACS buffer にて 2 回洗浄、400 μL 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

4) THP-1 細胞培養上清中のサイトカインの測定

THP-1 細胞の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°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た。

5) FSC-SSC ドットプロット解析

各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 または 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、前方散乱光 (forward scattered light (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。

6) 再構築ヒト皮膚モデル及び培養方法、細胞毒性試験方法

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (以下 J-TEC))を用いた。前培養は、LabCyte EPI-MODEL を、維持培地が入った 4-well プレートへ移し、5% CO₂ インキュベーターで 15-30 時間、前培養した。試験液の添加は、溶媒コントロール、陽性対照、各試験液を 100 µL ずつ皮膚モデルの上に添加し、新しい維持培地が入った well へ皮膚モデルを移し、5% CO₂ インキュベーターで 18 時間、培養した。皮膚モデルを、維持培地が入った新しい 24-well プレートに移した後、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。皮膚モデルは、PBS で 10 回、ピペットを用いて洗浄し、MTT 溶液が入った 24-well プレートに移し、37°C、3 時間、反応させた。皮膚モデルを、0.5 mL のイソプロパノールが入った 1.5 mL tube に移し、2 時間、振とうしながら色素を抽出した。96-well プレートへ抽出液 200 µL を移し、OD 570 nm/ 650 nm を測定した。

7) 再構築ヒト皮膚モデル培養上清中のサイトカインの測定

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL の培養上清中の Interleukin-8 (IL-8)、IL-1β、Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)、IL-1α、MIF を ELISA により測定した。測定キットは、IL-8 (Human IL-8 ELISA Kit、Invitrogen)、IL-1β (Human IL-1β ELISA Kit、Invitrogen)、TNF-α (Human TNF-α ELISA Kit、Invitrogen)、IL-1α (Human IL-1α/IL-1F1 Quantikine ELISA kit、R&D systems)、MIF (Human MIF Quantikine ELISA kit、R&D systems)を用いた。(検出限界 IL-8 ; 1.0 pg/mL、IL-1β ; 5.0 pg/mL、TNF-α ; 1.7

pg/mL、IL-1α ; 1.0 pg/mL、MIF ; 0.068 ng/mL)

(倫理面への配慮)
該当なし。

C. 結果及び考察

1) ZnO ナノマテリアルの THP-1 細胞に対する細胞毒性評価

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。) 血清含有培地懸濁液中(0.2 mg/mL)では、ZnO(sigma)は粒径が変化したが、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) 50 μ g/mL 処理で弱い細胞毒性を示した。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) 50 μ g/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 β 、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 μ 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。

5) 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

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 8 及び図 9 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。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 2 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。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。

6) 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 10 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 11 及び図 12 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 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。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 NiCl_2 の応答と比較すると、NiO (粉砕用ジルコニアボールの直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と NiCl_2 250 μM の CD54 RFI が同程度、NiO (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と NiCl_2 500 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と NiCl_2 250 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

7) 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 FSC 強度及び 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 13 に示した。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。

8) 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 14)。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 (粉砕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。

9) 再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL を用いた細胞毒性試験系の構

築

化学物質の皮膚刺激性評価については、ヒト正常表皮角化細胞から構成された再構築ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 試験法の検証が完了し、既に動物試験代替法として適用されている (OECD TG439) (表 3)。医療機器及び医用材料の刺激性はウサギを利用した皮膚刺激性試験及び皮内反応試験により評価されているが、動物愛護の観点より再構築ヒト皮膚モデルによる評価の検討が進められてきた。ISO/TC194/WG8 において、2 種類の皮膚刺激性 *in vitro* 試験法の性能を検証する国際ラウンドロビンスタディ(RRS)を実施することになり、当部は昨年度、EPI-200 を用いた RRS に参加し (MatTek 社製 EpiDerm™ EPI-200 RhE モデル：22 施設、EPISKIN 社製 SkinEthic™ RHE モデル：7 施設が参加)、ISO 10993-23, Biological evaluation of medical devices -- Part 23: Determination of skin irritation of medical device extracts using Reconstructed human Epidermis (RhE)に収載準備中である。

一方、医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価においても、ナノマテリアルに対する評価について ISO/TC194/WG17 において検討がなされ、本年 4 月に、ISO 10993-22, Biological evaluation of medical devices -- Part 22: Guidance on nanomaterials が発出された。その中では、*in vitro* 評価法として従来の細胞毒性試験、遺伝毒性試験、刺激性試験法が引用されているが、今後、ナノマテリアルの *in vitro* 評価法についても、新規評価法の有用性が検証されれば、参照される可能性がある。

再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL は、J-TEC により開発された日本製の培養表皮モデルである。RRS で用いられたモデルにおいては、医療機器の皮膚刺激性試験用としてそれぞれ試験プロトコルの改良が行われたことから、当部と J-

TEC で LabCyte EPI-MODEL 24 の医療機器試験用に向けたプロトコルの改良を行った (表 4)。LabCyte EPI-MODEL は EpiDerm™ EPI-200、SkinEthic™ に比べると細胞毒性の感受性が高い傾向があることから、被験物質暴露後の細胞の洗浄の際に、他のモデルと同様に洗浄瓶を用いて洗浄を行うと、陽性対照物質として用いた 1% SDS では、三次元皮膚モデルが剥がれ、組織がボロボロになってしまったため、ピペットを用いて洗浄を行う方法に変更した。

10) ZnO ナノマテリアル処理による V79 細胞の細胞毒性の検討

医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、細胞毒性の評価に汎用されているチャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 を用いて、コロニー形成試験法により ZnO ナノマテリアルの細胞毒性を評価した。その結果、ZnO(sigma)の IC₅₀ は 9.8 µg/mL、ZnO(alfa)の IC₅₀ は 12.6 µg/mL で、ZnO(sigma)の方が ZnO(alfa)より細胞毒性が強かった (図 15)。IC₅₀ の値は、V79 細胞を用いたコロニー形成試験法では、A549 細胞の MTS 法、THP-1 細胞の ATP 法に比べて小さかった。

11) ZnO ナノマテリアルの三次元皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性の検討

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL(J-TEC)に、2 種類の ZnO ナノ分散製品(sigma, alfa)を、100 及び 400 µg/mL で 18 時間暴露し、ピペットを用いて PBS で 10 回洗浄後、MTT 試薬により細胞毒性について検討した。陰性対照として PBS を暴露した細胞の生存率を 100%として示した。その結果、陽性対照の 1% SDS では強い細胞毒性を示したが、ZnO では今回実施した最高濃度 400 µg/mL においても細胞毒性を示さなか

った (図 16)。

12) 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL 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培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL(におけるサイトカインの産生について、今回、ELISA kit により、5 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 α 、MIF は、LabCyte EPI-MODEL においてサイトカインの産生が観察されたが、IL-1 β 及び TNF- α は検出限界以下であった (図 17)。IL-8 は、陰性対照(PBS)、陽性対照 (1% SDS)、ZnO(sigma)及び ZnO(alfa)の暴露により産生が観察されたが、PBS、1% SDS 間で産生量に差はなく、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)の暴露により陰性対照に比べて産生量の増加傾向が観察されたが、有意な差はなかった。IL-1 α 、MIF では、陽性対照 (1% SDS)において、各サイトカイン産生の上昇が観察されたが、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)では、産生量の上昇は観察されなかった。

13) NiO ナノマテリアル処理による V79 細胞の細胞毒性の検討

医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、細胞毒性の評価に汎用されているチャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 を用いて、コロニー形成試験法により NiO ナノマテリアルの細胞毒性を評価した。その結果、NiO (粉砕ジルコニアボールの直径 0.05mm)の IC₅₀は 29.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、NiO (同直径 0.1mm)の IC₅₀は 13.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、NiO (同直径 0.5mm)の IC₅₀は 2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、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 (図 18)。IC₅₀の値は、V79 細胞を用いたコロニー形成試験法では、A549 細胞の MTS 法、THP-1 細胞の ATP 法に比べて小さかった。

14) NiO ナノマテリアルの三次元皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性の検討

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL に、二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアル懸濁液を、100, 200 及び 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 18 時間暴露し、ピペットを用いて PBS で 10 回洗浄後、MTT 試薬により細胞毒性について検討した。陰性対照として PBS を暴露した細胞の生存率を 100%として示した。その結果、陽性対照の 1% SDS では強い細胞毒性を示したが、NiO では、ZnO 同様、今回実施した最高濃度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても細胞毒性を示さなかった (図 19)。NiO では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、A549、THP-1 細胞と同様の結果を示した。LabCyte EPI-MODEL では、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。

15) 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL 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培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL におけるサイトカインの産生について、今回、ELISA kit により 5 種類のサイトカインを測定した。その結果、IL-8、IL-1 α 、MIF は、LabCyte EPI-MODEL においてサイトカインの産生が観察されたが、IL-1 β 及び TNF- α は検出限界以下であった (図 20)。IL-8 は、陰性対照 (PBS)、陽性対照 (1% SDS)、二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアルの暴露により産生が観察されたが、PBS、1% SDS 間で産生量に差はなく、二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルの暴露により陰性対照に比べて産生量の増加傾向が観察されたが、有意な差はなかった。IL-

1α、MIF では、陽性対照 (1% SDS)において、各サイトカイン産生の上昇が観察されたが、二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルにより、産生量の上昇は観察されなかった。THP-1 においては、ZnO ナノマテリアルの暴露では、IL-8、IL-1β、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。NiO ナノマテリアルの暴露では、IL-8、IL-1β、TNF において産生の増加が観察され、TNF、IL-1β 産生量は NiO の二次粒子径により差異が認められた。□これらは、再構築ヒト皮膚モデルと血球系細胞株では、共にヒトの細胞由来であるが、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。さらに、再構築ヒト皮膚モデルでは、皮膚のバリア機能があり、ナノマテリアルの細胞内への取り込みが異なり、細胞毒性が異なることが、サイトカインの産生へも影響を与えたと考えられた。

D. まとめ

- 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、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-1β、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。

- 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、物理化学的性質について明らかにすると同時に、A549 及び THP-1 の細胞毒性に対する影響を検討した結果、
 - THP-1 細胞に対する細胞毒性は、NiO 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 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-1β、TNF の増加が観察され、TNF、IL-1β 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。

- 2 種類の ZnO ナノマテリアル分散製品及び 3 種類の二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性試験を実施した結果、
 - LabCyte EPI-MODEL は、陽性対照の 1% SDS で細胞毒性を示したが、ZnO、NiO 共に最高濃度 400 µg/ml において細胞毒性を示さなかった。
 - LabCyte EPI-MODEL のサイトカイン産

生について確認した結果、1% SDS で IL-1 α 、MIF の増加が観察されたが、ZnO、NiO によるサイトカイン産生の変化は観察されなかった。

以上より、LabCyte EPI-MODEL では、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。

E. 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.*, 4, 31-35, 2017.

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
- 4) 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
- 5) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, Y. Haishima, K. Isama. Effects of different secondary particle sized nickel oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune responses, EuroTOX 2017, ブラチスラヴァ, 2017年9月

F. 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

種類	製造(販売)元	1次粒子径 ^a (nm)	懸濁液中平均粒子径 ^a (nm ± SD) ^c		Zeta電位 ^a (mV ± SD) ^d		細胞毒性 (IC50)		遺伝毒性
			注射用水	10%FBS-MEM培地	注射用水	10%FBS-MEM培地	A549細胞	THP-1細胞	A549細胞
			(10 mg/ml)	(0.2 mg/ml)	(10 mg/ml)	(0.2 mg/ml)	MTS法 (48h) (μg/ml)	ATP法 (48h) (μg/ml)	小核試験 (20 μg/ml)
ZnO ^e	Sigma-Aldrich	<35	65.8 ± 0.7	184.9 ± 0.8	44.9 ± 0.5	-13.9 ± 0.6	31.7	49.4	陽性
ZnO	Alfa Aesar	40	164.9 ± 0.5	163.9 ± 1.8	-7.5 ± 0.5	-10.7 ± 0.5	72.5	63.0	陽性

^a測定機器: 大塚電子ELSZ-2NPA ^bカタログより ^ccumulant法より算出 ^d10%FBS-MEM培地のZeta電位(-9.6±1.6 mV) ^e2%の3-Aminopropyltriethoxysilane含有

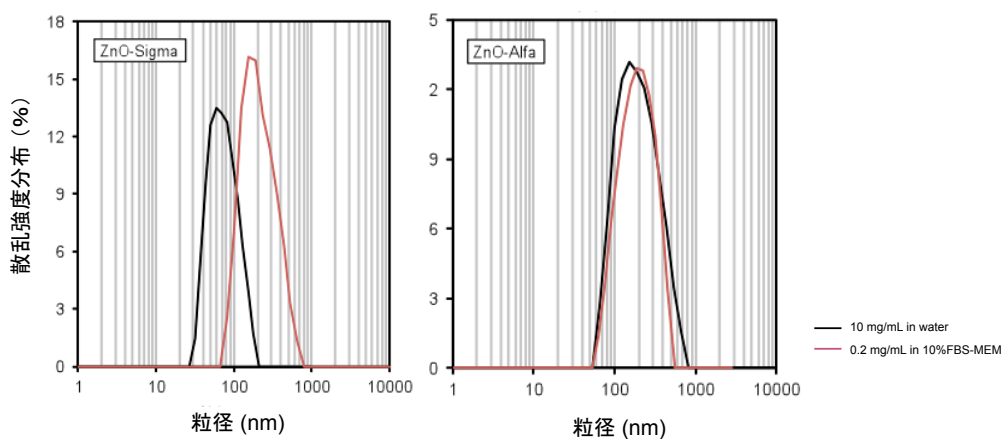


図1 ZnOナノマテリアル懸濁液中の粒径分布(散乱強度分布)

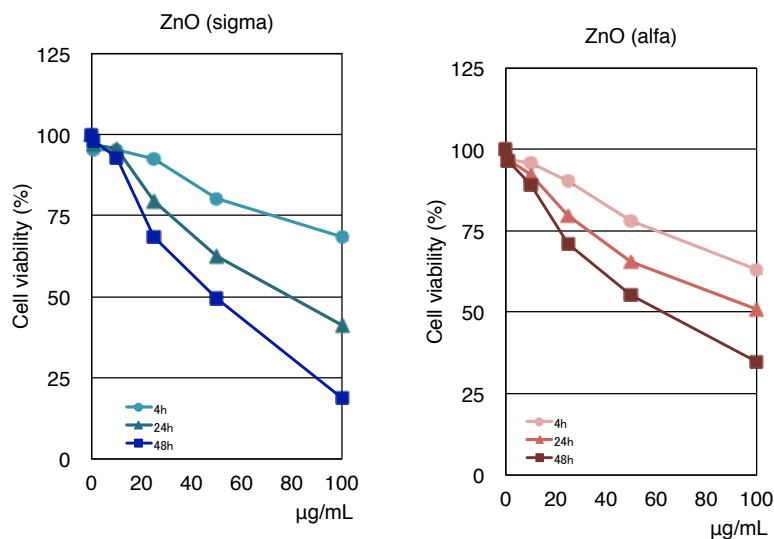


図2 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞の細胞毒性(ATP法)

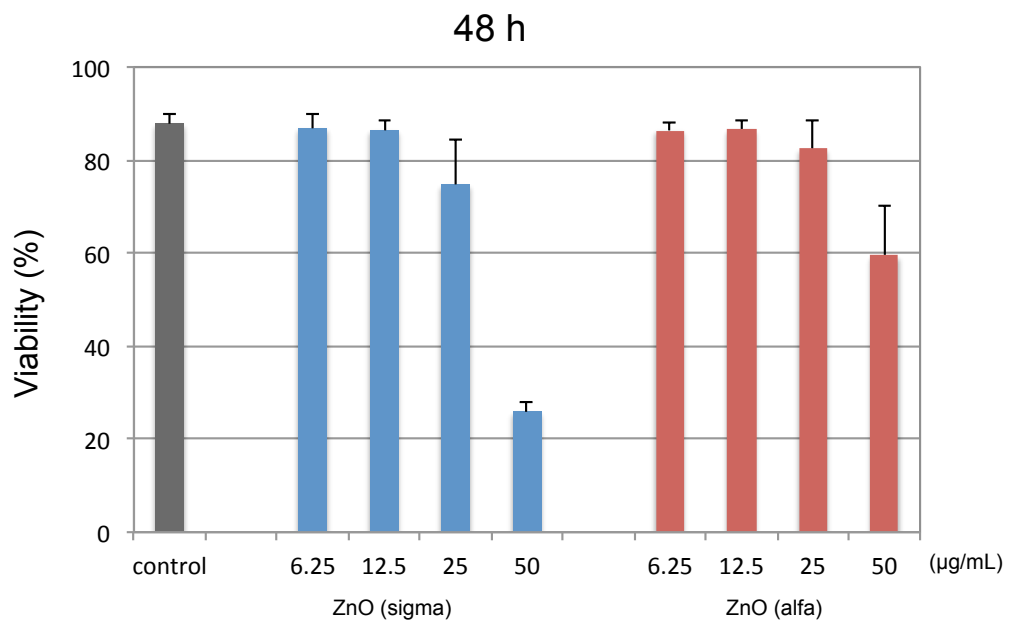
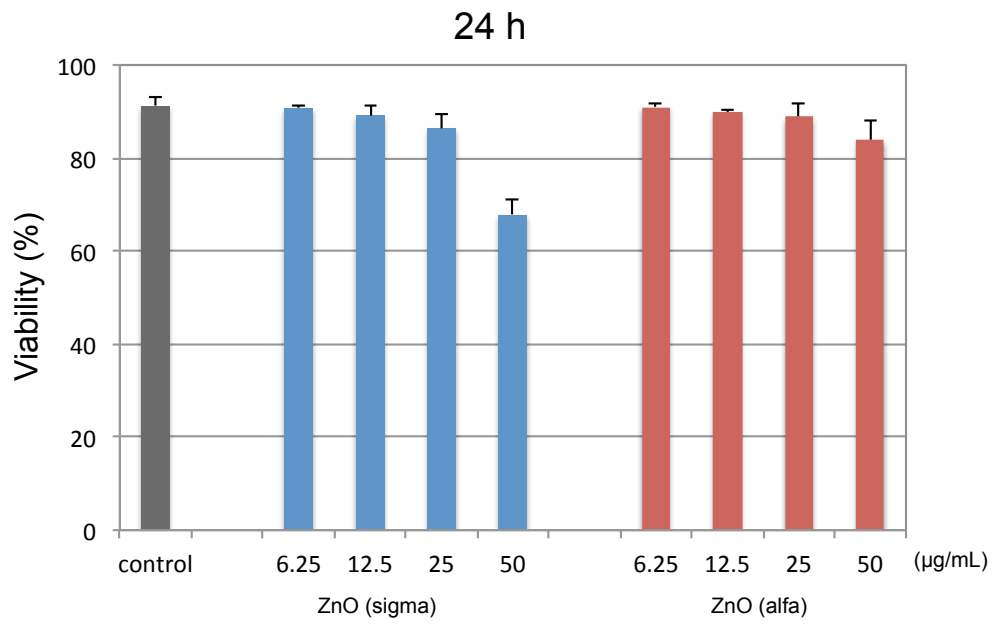


図3 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞の細胞毒性(PI法)

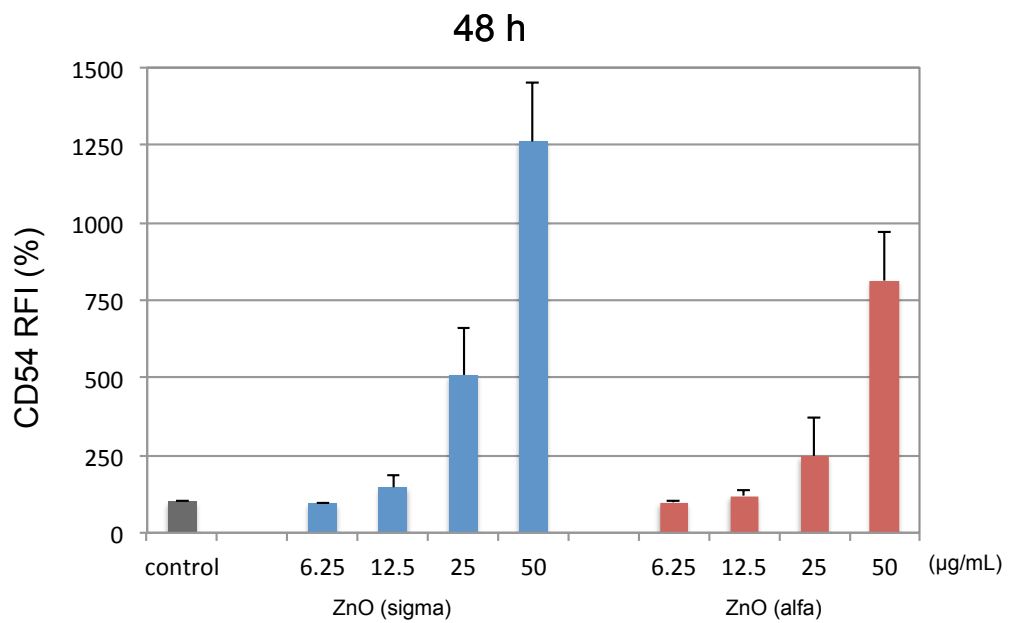
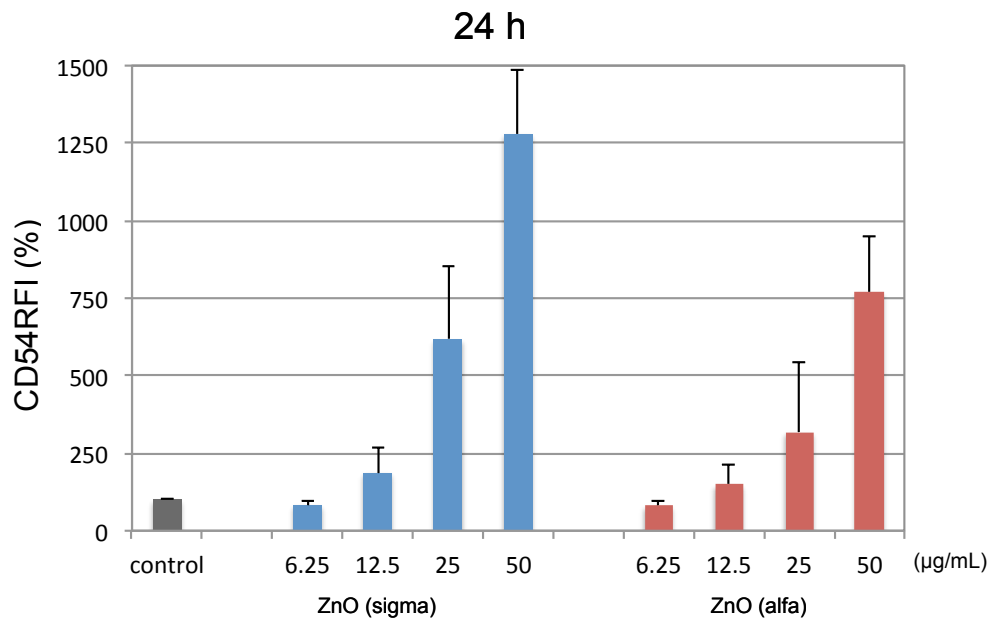


図4 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のCD54の発現強度

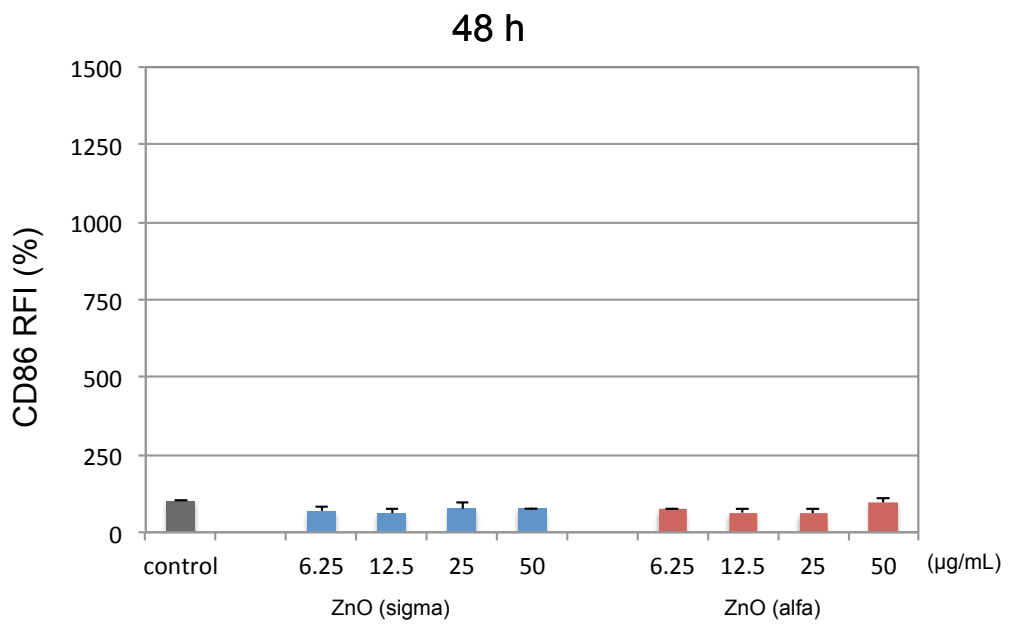
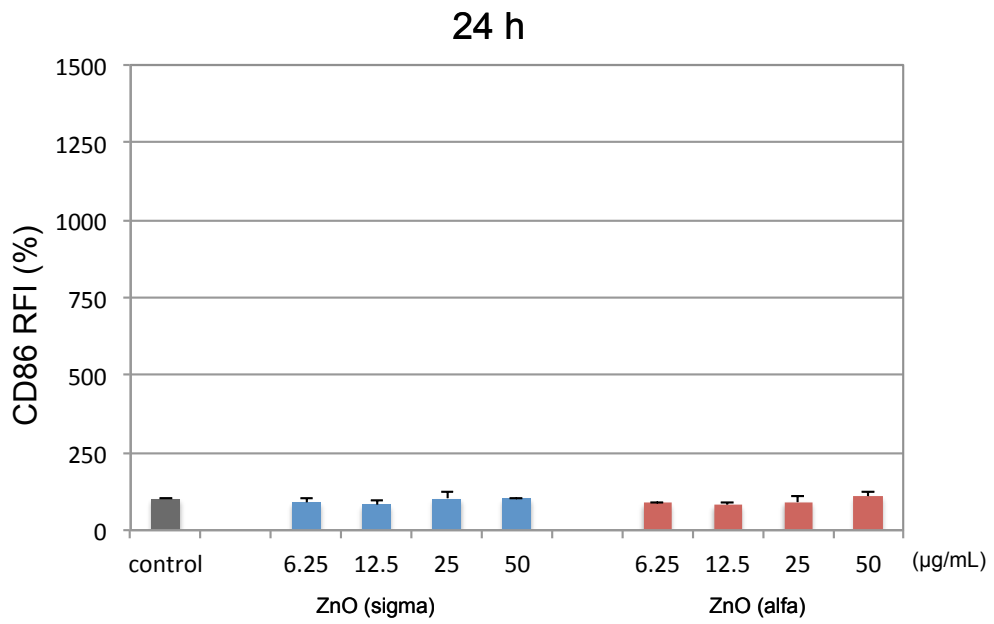


図5 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のCD86の発現強度

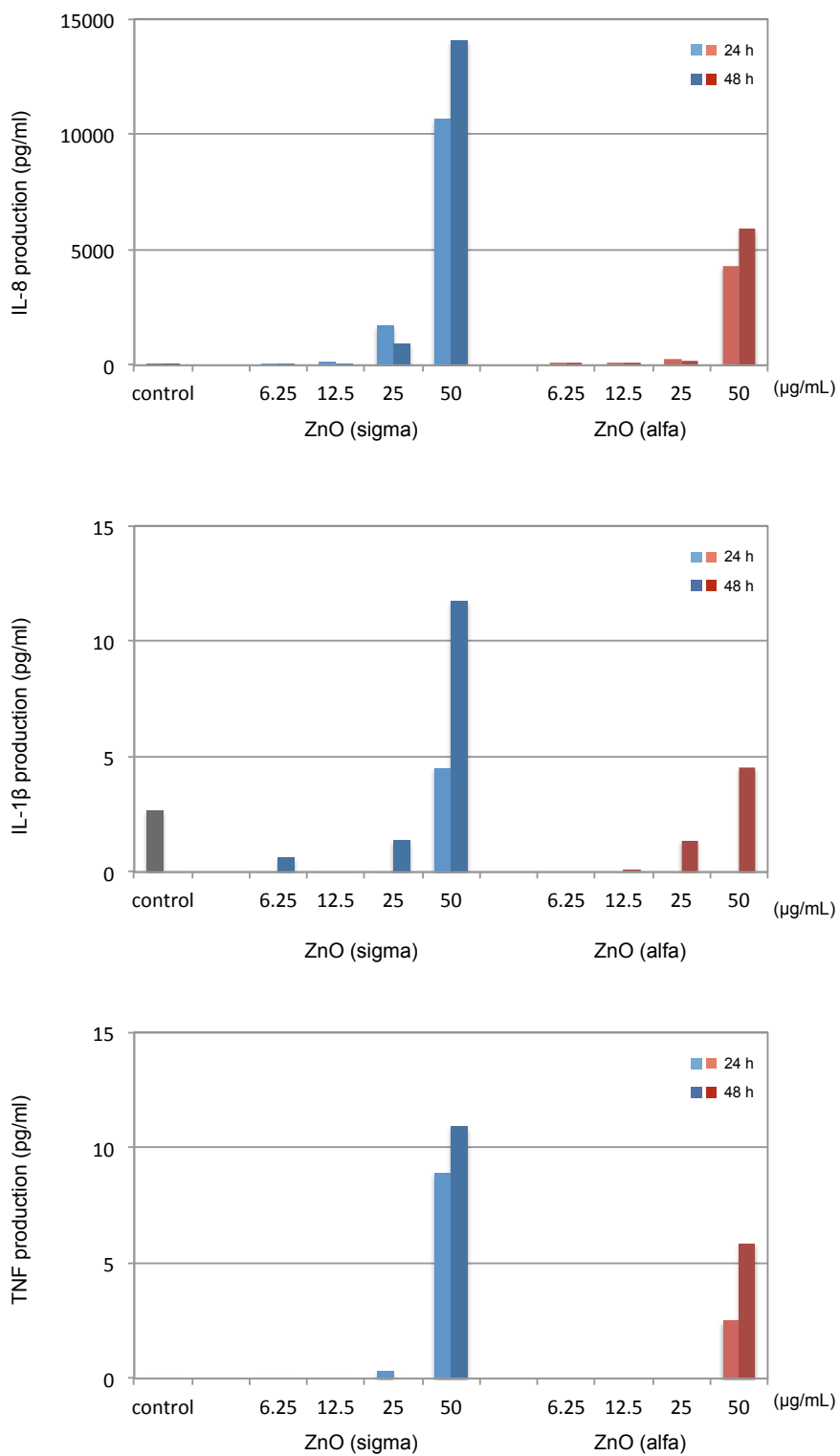


図6 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のサイトカイン産生

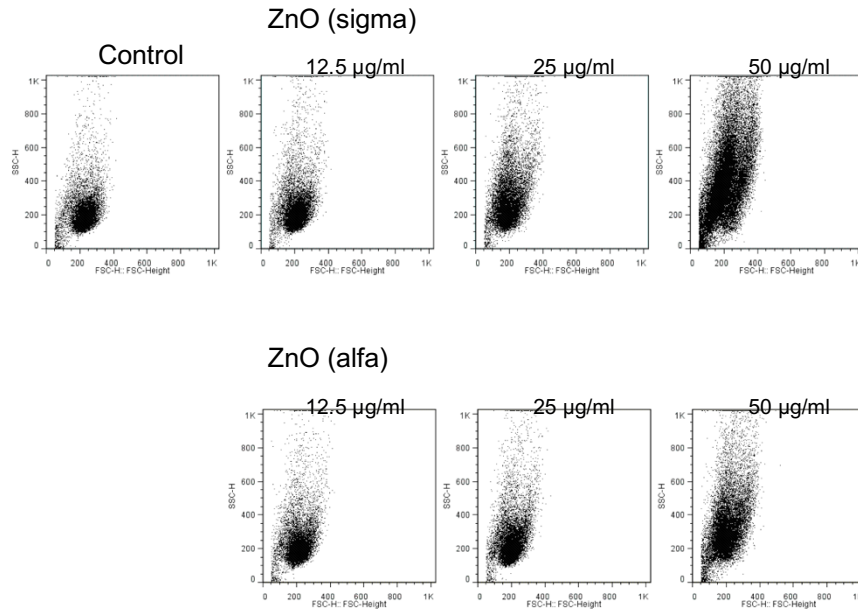


図7 酸化亜鉛ナノマテリアル処理 48 h 後の THP-1 細胞の FSC-SSC ドットプロット

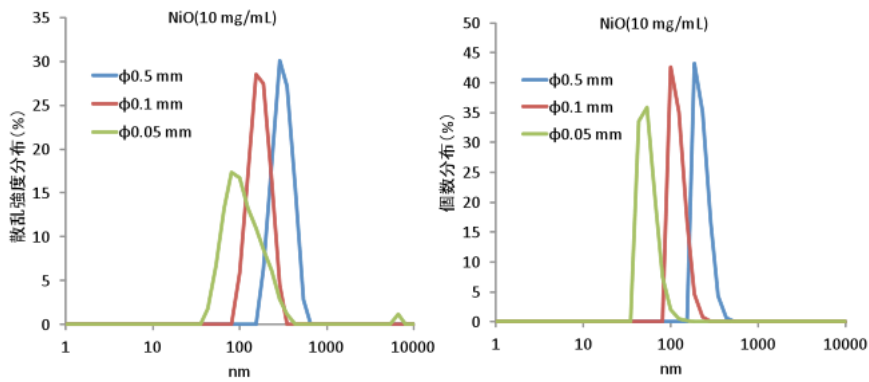


図8 NiO 懸濁原液(10 mg/mL)の散乱強度分布及び個数分布

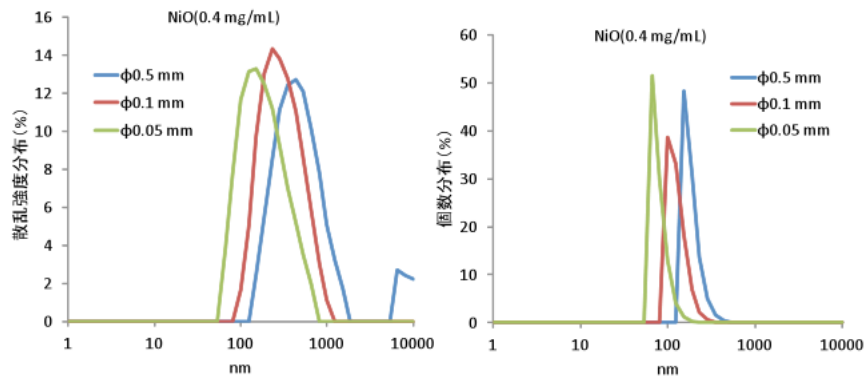


図9 NiO 懸濁液(培地中 0.4 mg/mL)の散乱強度分布及び個数分布

表 2 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) (μg/ml)	MTS法 (48h) (μg/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ELSZA-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

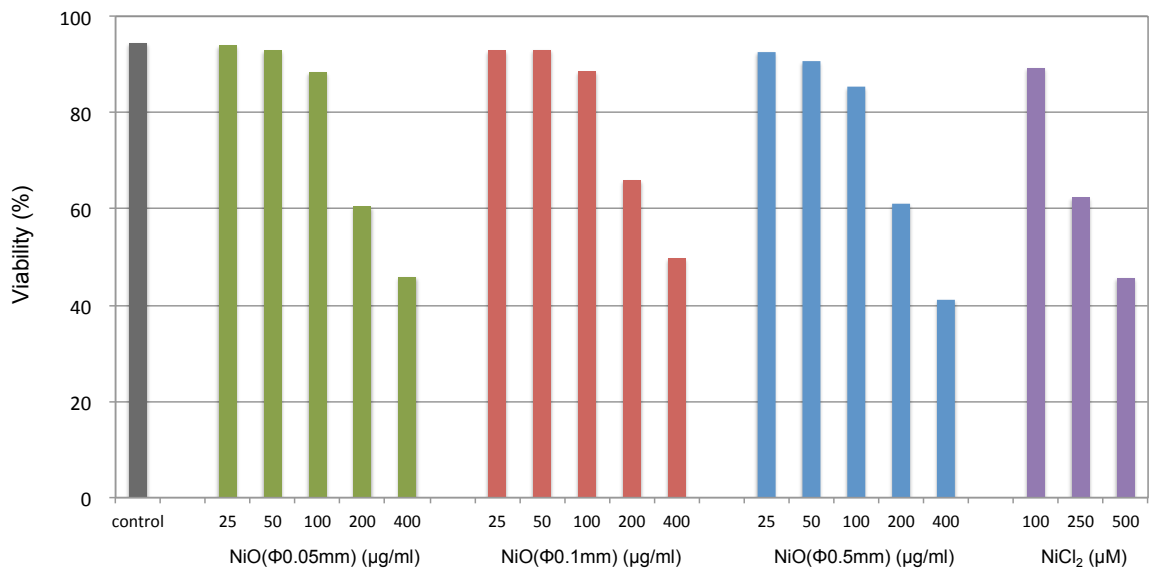


図 10 NiO 処理による THP-1 細胞の細胞毒性(PI 法)

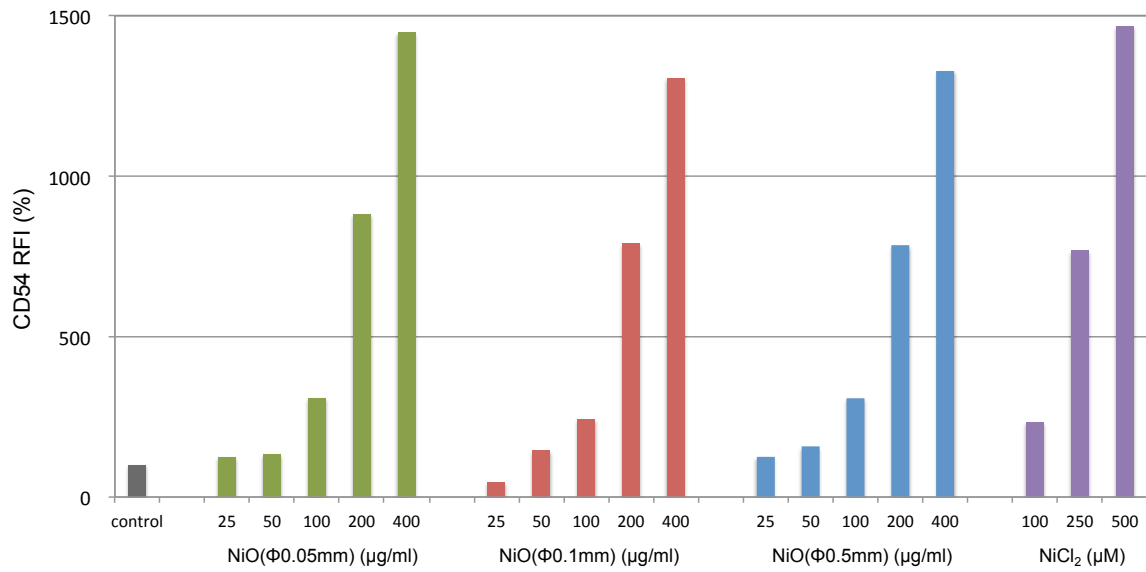


図 11 NiO 処理による THP-1 細胞の CD54 の発現強度

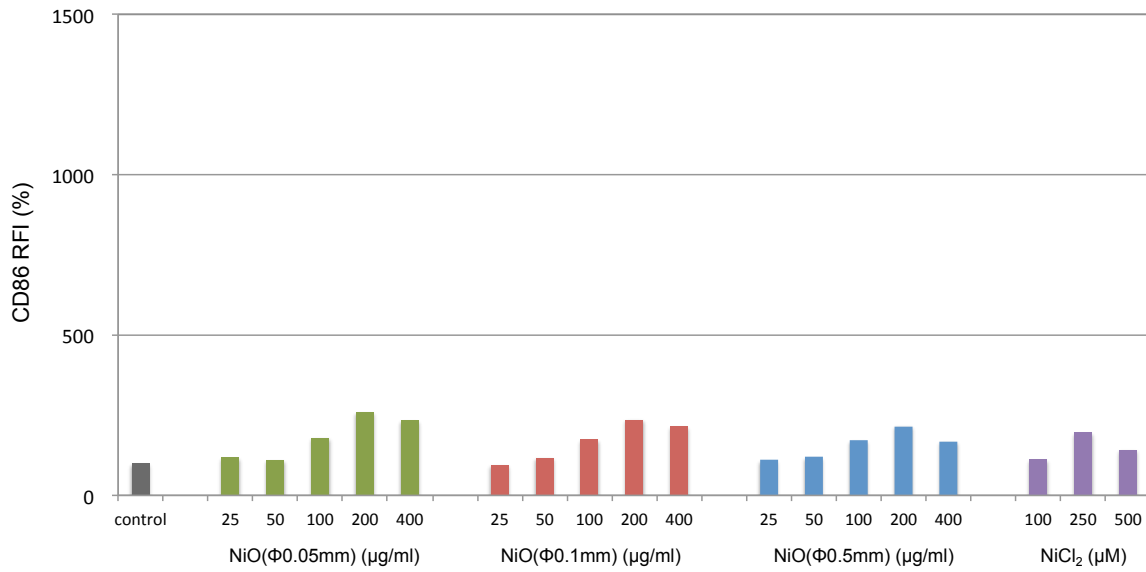


図 12 NiO 処理による THP-1 細胞の CD86 の発現強度

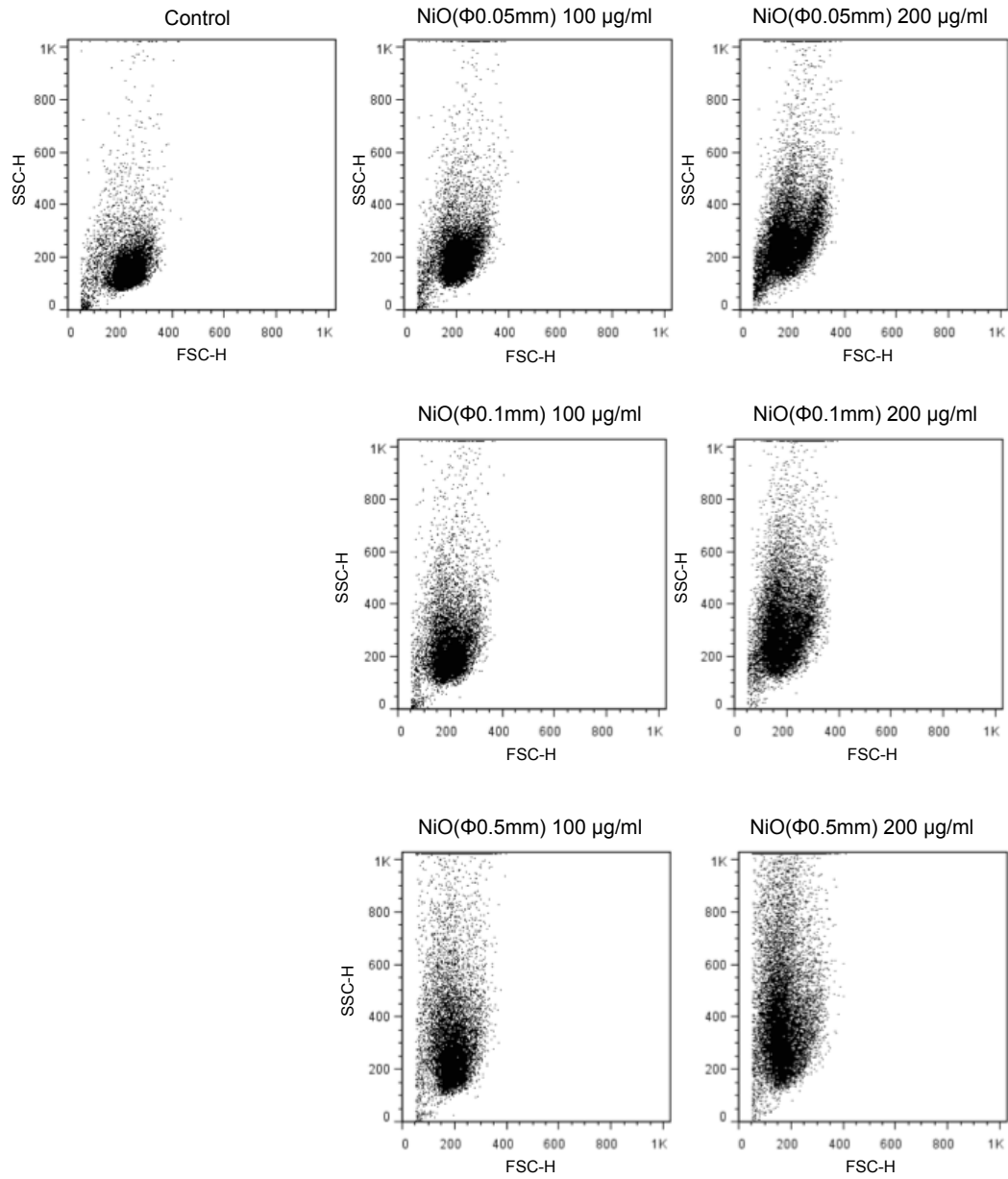


図 13 NiO 処理 24 時間後の THP-1 細胞の FSC-SSC ドットプロット

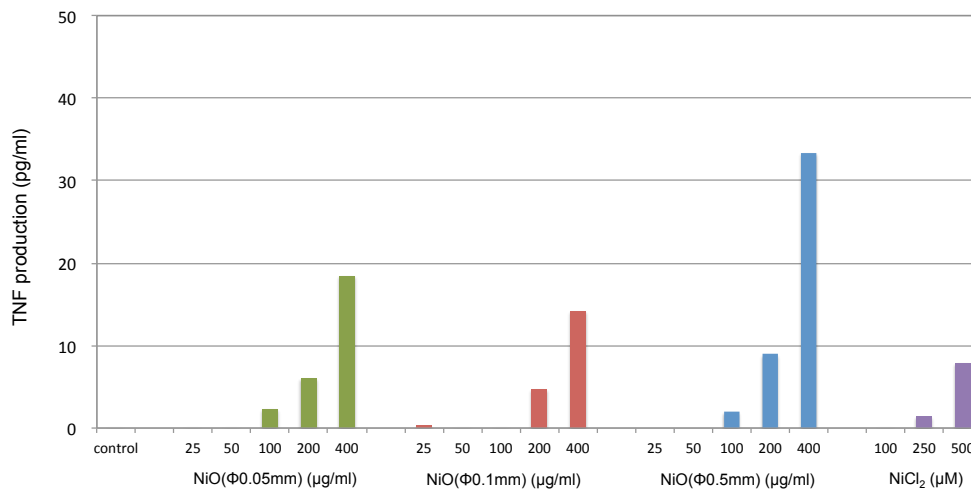
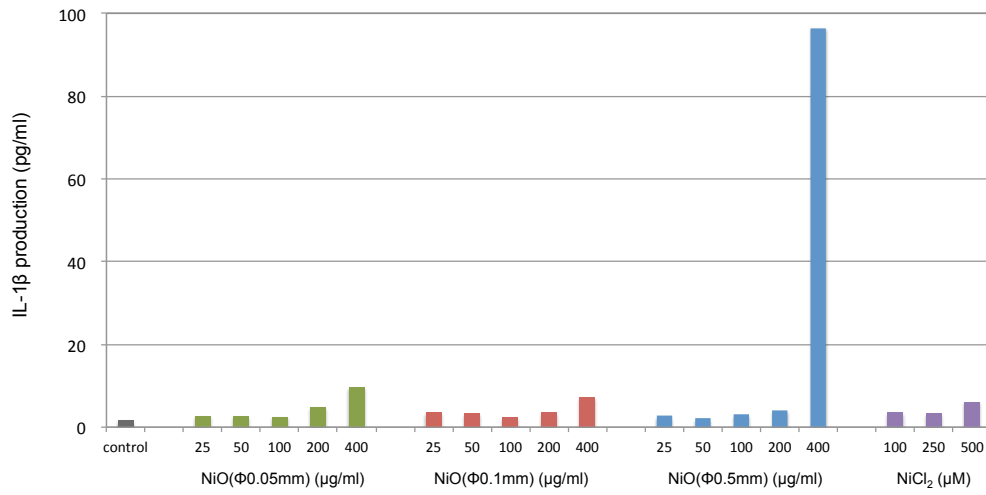
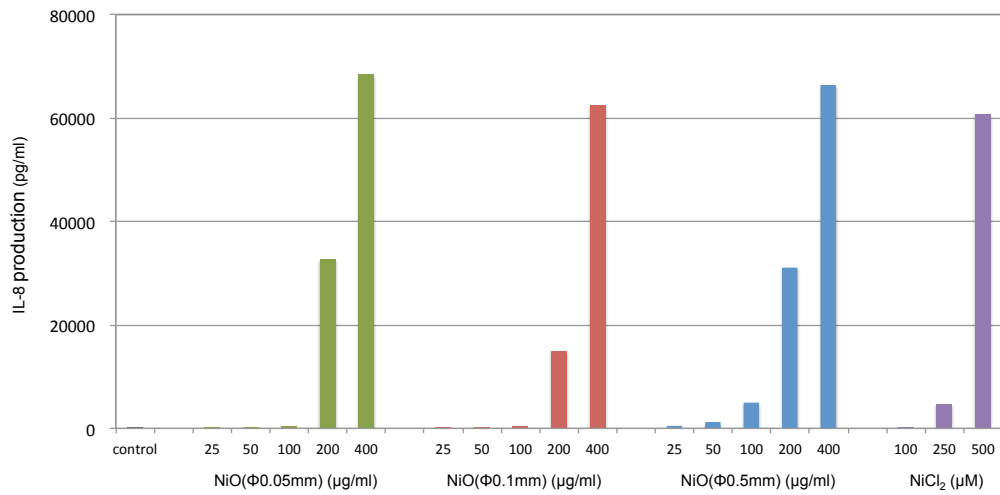


図 14 NiO 処理による THP-1 細胞のサイトカイン産生

表 3 OECD TG439 における各試験法のプロトコルパラメータ

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte E PI-MODEL2 4 SIT
A) インキュベーション前				
インキュベーションの時間	18~24 時間	18~24 時間	2 時間未満	15~30 時間
培地量	2 mL	0.9 mL	0.3 mL	0.5 mL
B) 化学物質の適用				
液体の場合	10 µL (26 µL/cm ²)	30 µL (47 µL/cm ²)	16 µL (32 µL/cm ²)	25 µL (83 µL/cm ²)
固体の場合	10 mg (26 mg/cm ²) + DW (5 µL)	25 mg (39 mg/cm ²) + DPBS (25 µL)	16 mg (32 mg/cm ²) + DW (10 µL)	25 mg (83 mg/cm ²) + DW (25 µL)
ナイロンメッシュの使用	使用しない	適宜使用する	使用する	使用しない
総適用時間	15 分間	60 分間	42 分間	15 分間
適用温度	室温	a) 室温で 25 分間 b) 37°C で 35 分間	室温	室温
C) インキュベーション後の量				
培地量	2 mL	0.9 mL x 2	2 mL	1 mL
D) 最大許容変動				
連間の標準偏差	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18

表 4 ISO/TC194 WG8 Round Robin Study における各試験法のプロトコルパラメータ

	MatTek	Episkin	J-TEC
	EPI-200-SIT	SkinEthic	LabCyte
	0.63 cm ²	0.5 cm ²	0.32 cm ²
前培養	preincubation 1 : 60 ± 5 min	2 hr / 0.3 ml or -24 hr / 1 ml	15-30 hr
	preincubation 2 : 18-24 hr		
被験物質容量	100 µl	100 ± 2 µl	100 µl
共培養時間	18 hr ± 30 minutes	24 hr ± 1 hr	18 hr ± 1 hr
適用温度	37 ± 1°C	37°C	37°C
CO ₂	5 ± 1%	5%	5%
RH	95%	95%	high humidity
MTT	1 mg/ml, 0.3 ml / well of 24 well plate	1 mg/ml, 0.3 ml / well of 24 well plate	1 mg/ml, 0.3 ml / well of 24 well plate
	37 ± 1°C, 5 ± 1% CO ₂ , 95% RH	37°C, 5 % CO ₂ , 95% RH	37°C, 5 % CO ₂ , high humidity
	3 hr ± 5 minutes	3 hr ± 15 minutes	3 hr
Extraction	2 ml isopropanol/well of 24 well plate	1.5 ml isopropanol/well of 24 well plate	0.5 ml isopropanol in 1.5 ml tube
	2 hr at RT with shaking (-120 rpm)	2 hr ± 5 min at RT with shaking (-150 rpm)	2 hr at RT with shaking

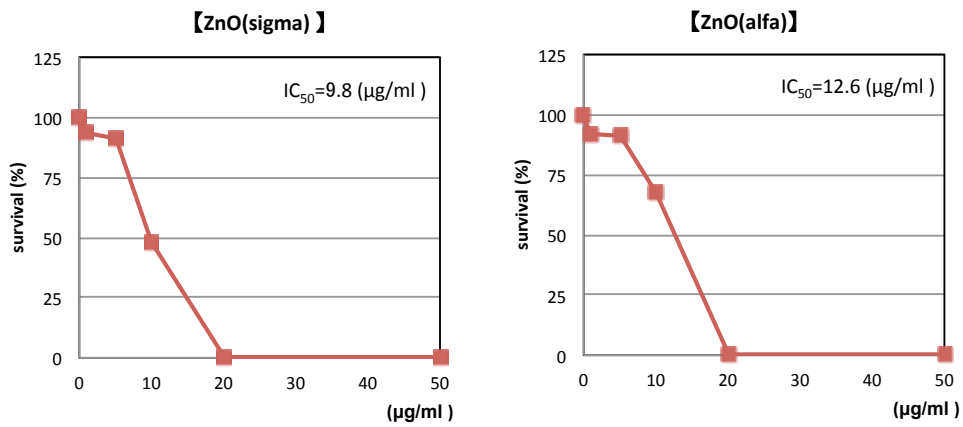


図 15 ZnO 処理による V79 細胞の細胞毒性(コロニー法)

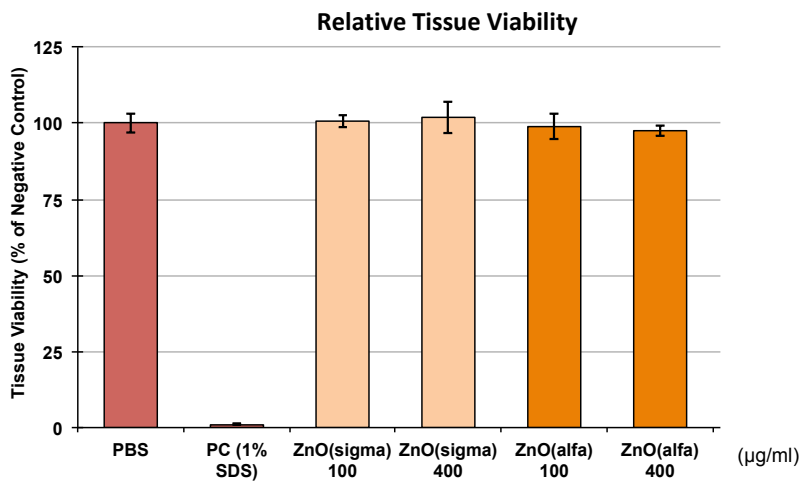
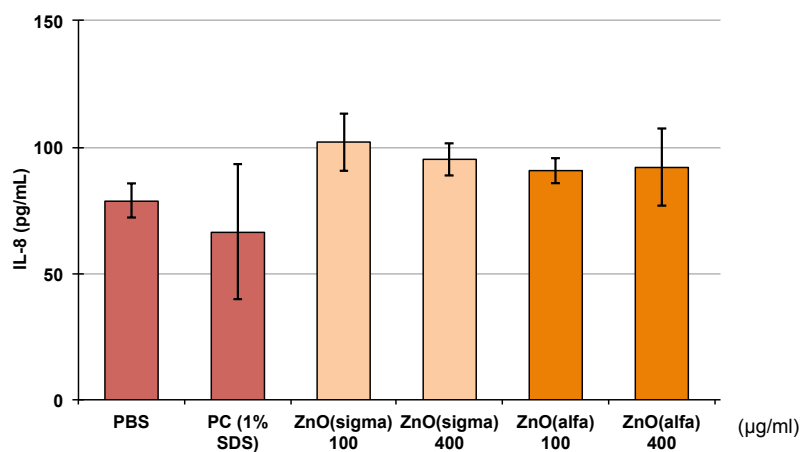
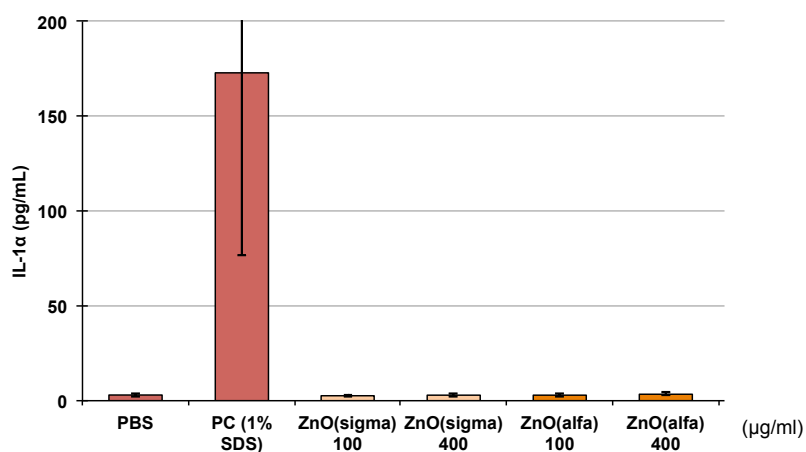


図 16 ZnO 処理による再構築ヒト皮膚モデルの細胞毒性(MTT 法)

(A) IL-8



(B) IL-1 α



(C) MIF

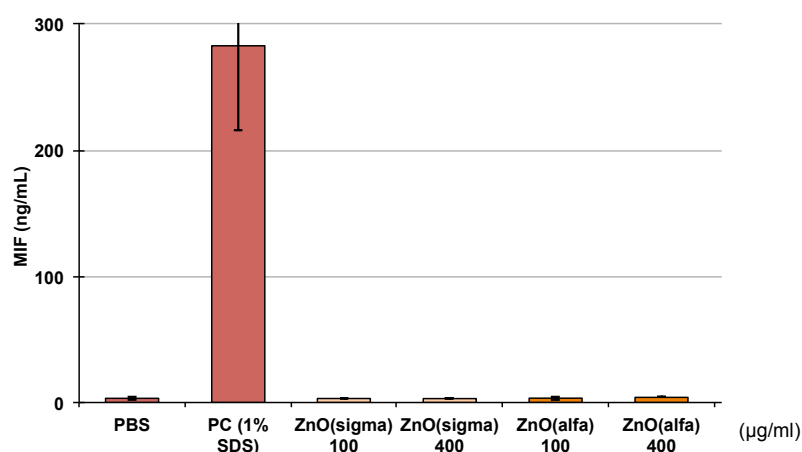


図 17 ZnO 処理による再構築ヒト皮膚モデルのサイトカイン産生

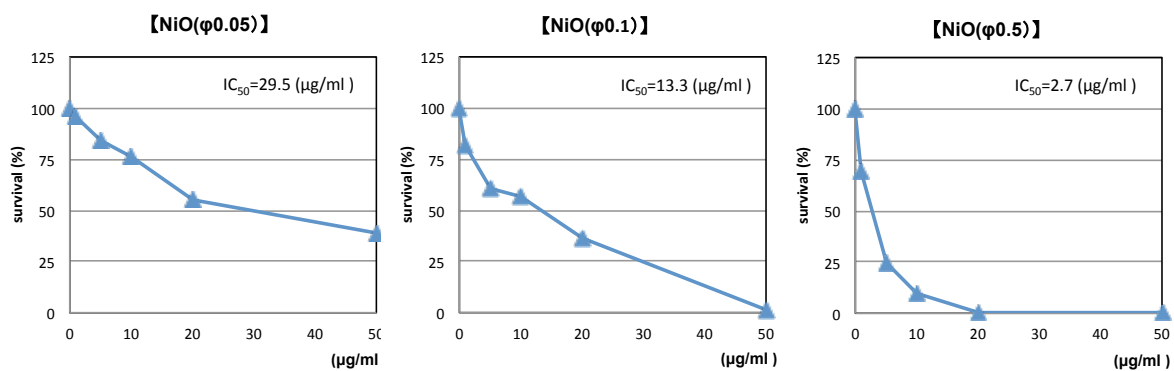


図 18 NiO 処理による V79 細胞の細胞毒性(コロニー法)

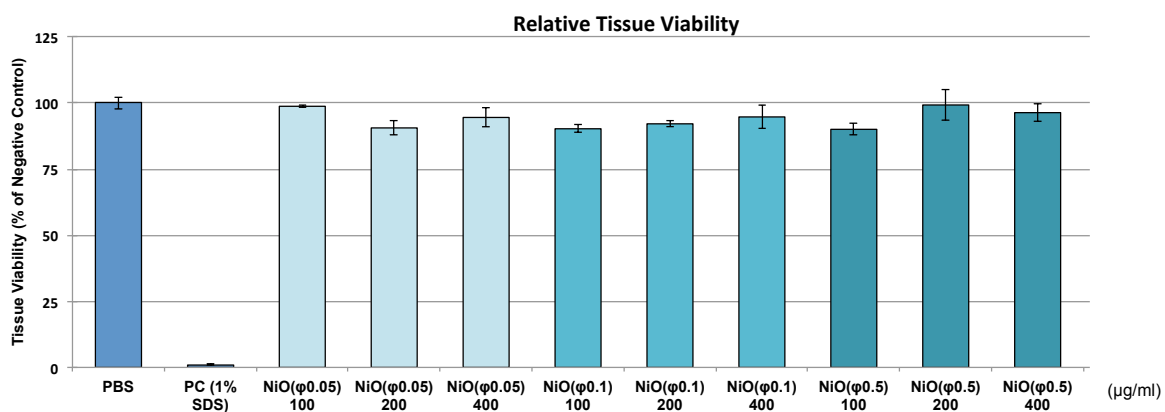
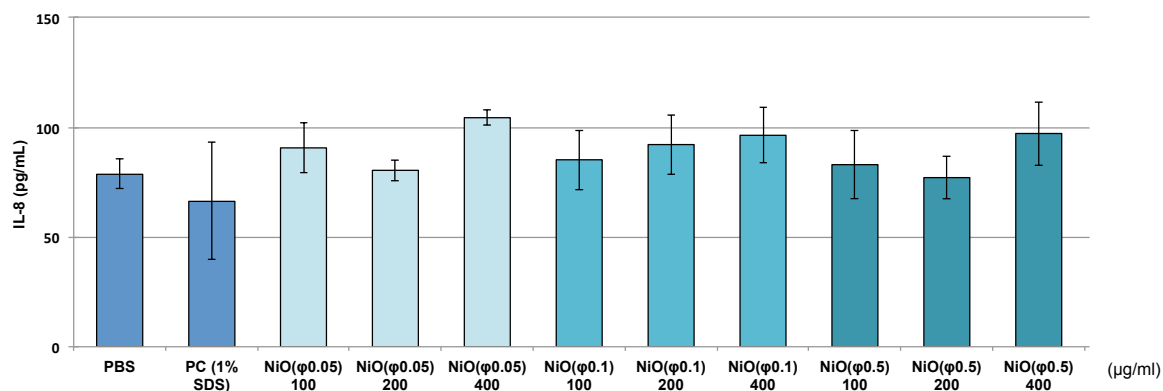
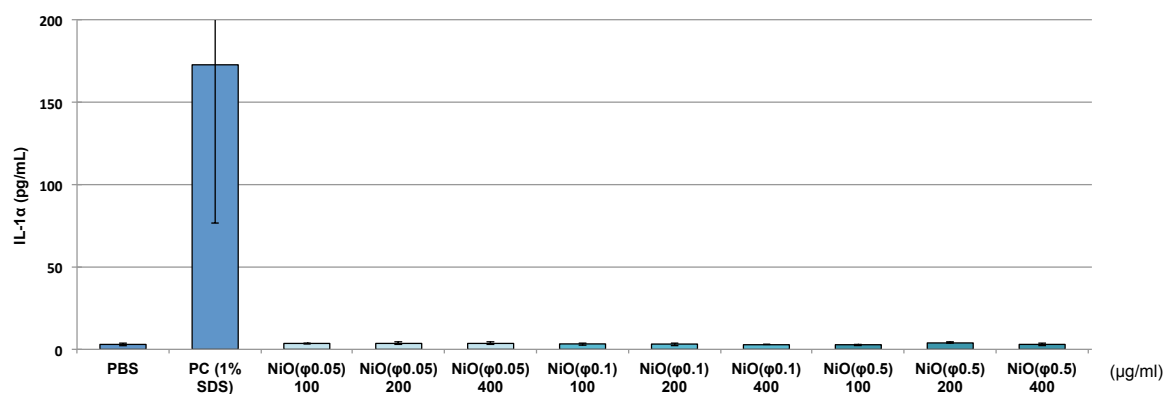


図 19 NiO 処理による再構築ヒト皮膚モデルの細胞毒性(MTT 法)

(A) IL-8



(B) IL-1α



(C) MIF

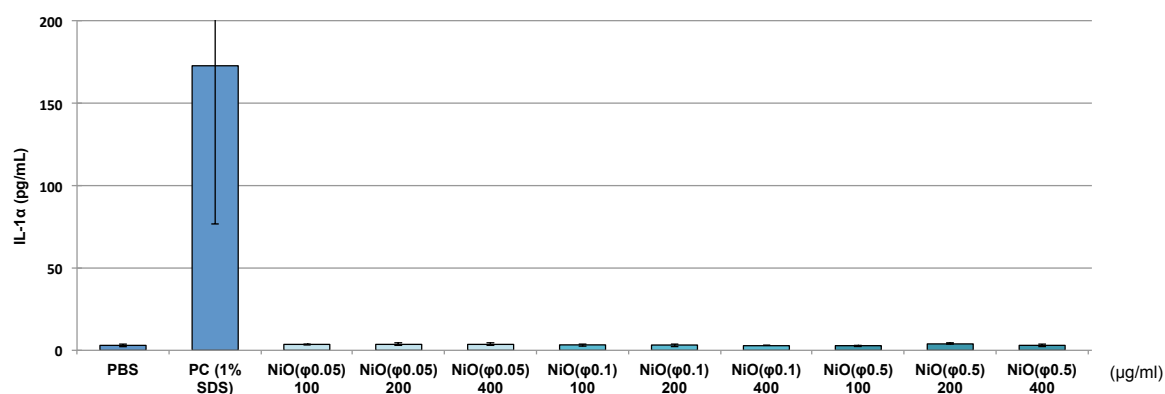


図 20 NiO 処理による再構築ヒト皮膚モデルのサイトカイン産生