

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する
in vitro/in vivo 評価手法開発のための研究

令和 2 年度 分担研究報告書

ナノマテリアルのTHP-1細胞への影響評価に関する研究
研究分担者 足利太可雄
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官

研究要旨

本分担研究は、様々な特徴を有する各種 NM の抗原提示細胞活性化能の評価を行うことで in vivo 試験や物性値の測定および情報収集から得られた知見と統合データセットを確立することを目的としている。

本年度は、THP-1 細胞の活性化を指標とする OECD 皮膚感作性試験テストガイドライン 442E (h-CLAT)を用いて、二酸化ケイ素ナノマテリアル（以下、ナノシリカ）5 種について検討を行った。被験物質は、OECD において物性と毒性情報が収集されている NM-200, NM-201, NM-202, NM-203 および NM-204 とした。まずそれぞれのナノシリカについて分散条件を検討した結果、5 品すべてのナノシリカが均一な分散状態で細胞に適用できる条件を見出した。そこで本分散条件により調製したナノシリカ懸濁液を用いて用量設定試験を行った結果、いずれの被験物質においても、細胞生存率が 75%以下となる用量が見られなかったため、1000 µg/mL を最高用量とし、公比√10 で希釈した計 8 用量を設定した本試験を各 3 回実施した。本試験では、被験物質を細胞に 24 時間曝露し、細胞表面の CD86 及び CD54 の発現量をフローサイトメトリーによって測定した。その結果、今回検討したすべてのナノシリカは in vitro で抗原提示細胞を活性化することが示された。特に NM-202, NM-203, NM-204 は CD54 の発現をコントロールに比べ 20 倍以上に亢進させ、非常に強い抗原提示活性化能があると考えられた。今後、本検討結果と、ナノシリカの物性および in vivo における毒性との比較を行うことで、毒性と物性の関係性および in vivo における毒性と in vitro 試験である h-CLAT との関係性を明らかにする。

A. 研究目的

本研究は、短期吸入曝露された各種 NM の免疫系に与える影響について in vitro/in vivo 試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行い、in vitro 試験法の確立と将来的な OECD ガイドライン化

を目指すための基盤的知見の収集を目的としている。そのため本分担研究では、様々な特徴を有する各種 NM の抗原提示細胞活性化能の評価を行うことで in vivo 試験や物性値の測定および情報収集から得られた情報との統合データセットを確立する。

B. 研究方法

今年度は二酸化ケイ素ナノマテリアル（以下、ナノシリカ）5種について検討を行った。被験物質は、OECDにおいて物性と毒性情報が収集されているNM-200, NM-201, NM-202, NM-203およびNM-204とした。LPSによる影響を避けるため、試験には乾熱滅菌（220°C、18時間）した被験物質を使用した。抗原提示細胞の活性化能を評価とする試験法として、皮膚感作性試験法であり、OECDテストガイドライン化されているh-CLAT (OECD TG442E)を用いた。h-CLATは被験物質が細胞適用時に均一に分散されていることが必要のため、プローブ型超音波装置 (Digital Sonifier 250D、最大出力200W) を用い、様々な条件で分散させ、最終的に細胞培養液中での分散状態を確認した。

h-CLAT試験は、被験物質適用のための懸濁液を調製し、以下のように行った。24ウェルプレートの各ウェルに 2.0×10^6 cells/ml THP-1細胞懸濁液500 μ lおよび各被験物質の分散液500 μ lを添加し、CO₂インキュベーター内で24時間静置した。被験物質の曝露濃度は予備試験の結果から最高濃度を1000 μ g/mlとし、公比 $\sqrt{10}$ で希釈して合計8濃度を設定した。暴露後のTHP-1細胞を10% BSA含有リン酸緩衝液 (PBS) (FB) で洗浄後、0.01%グロブリン、10% BSA含有PBSにて15分間ブロッキングした。96ウェルプレートの各ウェルに分注した細胞をそれぞれFITC修飾された抗CD54抗体、抗CD86抗体およびIgGで30分間処理した後、FBで細胞を洗浄、ヨウ化プロピジウムを添加した。フローサイトメトリーを用いてFL-1チャンネルおよびFL2チャンネルの強度を測定し、CD54, CD86の発現を培地処理群 (control)

に対する相対蛍光強度 (RFI) として求めるとともに、細胞生存率を算出した。独立した試験を3回行った。陽性判定基準は、OECDテストガイドラインに従い、3回の試験のうち2回以上の試験で、1濃度でもCD86の発現量(RFI)が150%以上、またはCD54の発現量(RFI)が200%以上になった場合とした。

(倫理面への配慮)

全てin vitro試験であり、倫理上の問題はないと考える。

C. 研究結果

C.1. 分散条件

計10分間の超音波照射により良好な分散状態となると判断されたため、超音波照射条件は40W (200W×20%) で計10分間実施 (氷上で5分間超音波照射し、室温で15分間静置した後、氷上で5分間超音波照射) とした。

また、媒体検討としてPBS(-)及び超純水を用いた20 mg/mLの調製原液及び調製原液を培地で希釈した1 mg/mLの調製液について、媒体を検討し、より分散状態が良好であった超純水を媒体に選択した。

C.2. h-CLAT試験結果

定法に従い、濃度設定試験を行ったところ、5品すべてが最高用量である1000 μ g/mlにおいても細胞生存率が75%以上であり、細胞生存率75%に相当する適用濃度であるCV75を算出できなかったため、1000 μ g/mlを最高用量と設定した。各被験物質の3回の本試験におけるRFI及び細胞生存率の平均値及び標準偏差を表1に示す。いずれのナノシリカも陽性の判定基準を満たしたことがか

ら、*in vitro*で抗原提示細胞を活性化することが示された。図1から図5に、それぞれのナノシリカのCD86およびCD54の相対発現量と細胞生存率のグラフを示した。いずれのナノシリカも、細胞毒性を示さない濃度において陽性となった。

一方、図1から図5に示すように、CD54の発現を亢進させる最小濃度(EC200)や、CD54のRFIの最大値は、ナノシリカによって大きく異なっていた。それぞれのナノシリカの活性化能の指標となる値を表2に示した。EC200 (CD54発現濃度閾値)の値は、最小のNM-204で3.5 µg/mL、最大のNM-201で30.3 µg/mLと約8.7倍の差が見られた。これは、THP-1のCD54発現を亢進させるのに必要な濃度がナノシリカ間でも9倍近く異なることを示している。また、CD54の相対発現量(RFI)についても、最大のNM-202で4812.2%、最小のNM-201で434.7%と約11.1倍の差が見られた。

D. 考察

これまでナノシリカ処理により、*in vitro*において樹状細胞がCD86やIL-1βの発現を亢進することが報告されてきた^{1,2)}。今回検討した5種全てのナノシリカがTHP-1細胞のCD54発現を非常に強く亢進すること、さらにその亢進の程度が検体により異なることを明らかとした。

CD54の発現を亢進させる最小濃度(EC200)は、*in vivo*皮膚感作性試験であるLLNA (Local Lymph Node Assay, OECD TG429)における強度の指標であるEC3値と相関性が認められており³⁾、EC200が低いほど感作性強度が強くなる傾向がある。この点で今回検討した5種のナノシリカを検討

すると、毒性の強度は強い順に、NM-204, NM-200, NM-202, NM-203, NM-201となった。また、誘導されたCD54の相対発現量(RFI)も、最大のNM-204とNM-201では約8倍異なっており、こちらについても大きさの順に並べると、NM-202, NM-204, NM-203, NM-200, NM-201となった。

今回検討したナノシリカは、OECDにおいて様々な物性や*in vivo*における毒性がすでに評価されているため、今後今回得られたh-CLATの結果と、既知の物性や毒性情報との比較を行う予定である。こうして構築したデータセットを解析することで、標準化された試験系であるh-CLAT法のNMの免疫毒性試験としての有用性を検証し、ナノシリカの物性と抗原提示細胞活性化の関係を明らかにする予定である。

また、無機化合物の固体であるナノシリカがTHP-1細胞を活性化させるメカニズムは、抗原として提示される一般的な感作性物質によるそれとは異なり、いわゆるアジュバント効果と考えられる⁴⁾。生活環境中のNMによる免疫応答の増悪が指摘されており⁵⁾、ウイルスなどの抗原により生じる抗原提示細胞の活性化が、NMにより促進されるかどうかを検討する必要がある。この点については次年度検討を行う予定である。

- 1) Nanotechnology, 5 (3), 326-340, 2011.
- 2) J. Toxicol. Sci., 45 (10), 651-660, 2020.
- 3) Toxicology in Vitro, 26 (7), 1150-1160, 2012.
- 4) Toxicol. Lett., 118, 171-181, 2001.
- 5) Biochem. Biophys. Res. Commun., 392, 160-165, 2010.

E. 結論

NM-200, NM-201, NM-202, NM-203及び

NM-204は、いずれもin vitroで抗原提示細胞を活性化することが示された。特にNM-202, NM-203, NM-204はCD54の発現をコントロールに比べ20倍以上に亢進させ、非常に強い抗原提示活性化能があると考えられた。今後、今回検討したナノシリカの物性およびin vivoにおける毒性と、本検討結果の比較を行う。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

- 1) 山田 隆志, 足利 太可雄, 小島 肇, 広瀬 明彦: AOP (Adverse Outcome Pathway ; 有害性発現経路) に基づいた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ. *Yakugaku Zasshi*. 2020;140(4):481-484.[doi: 10.1248/yakushi.19-00190-1](https://doi.org/10.1248/yakushi.19-00190-1)
- 2) 小島幸一, 足利太可雄, 安達玲子, 佐藤一博, 瀬崎拓人, 武吉正博, 福山朋季: 皮膚感作性試験代替法 : ARE-Nrf2 luciferase LuSens Test Method (LuSens 法). *AATEX-JaCVAM*, 2020;9(1), 43-57.
- 3) 足利太可雄, 小島肇, 平林容子: 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 令和元年度報告書. *AATEX-JaCVAM*, 2020;9(1), 58-64.
- 4) 尾上誠良, 上月裕一, 豊田明美, 笛木修, 細井一弘, 小島 肇, 足利太可雄, 小野寺 博志: 光安全性評価の現状と課題. *YAKUGAKU ZASSHI*, 2021, 141(1), 111-124.
<https://doi.org/10.1248/yakushi.20-00148>

F.2. 学会発表

- 1) 足利太可雄, 鈴木政晴, 安部賀央里, 栗本雅之, 山田隆志, 頭金正博: 非動物実験による皮膚感作性のリスク評価と毒性学的懸念の閾値コンセプトの開発, 第 45 回日本化粧品学会 (2020.6.12-13, 誌上開催)
- 2) 鈴木政晴, 安部賀央里, 頭金正博, 山田隆志, 足利太可雄: IATA(統合的)アプローチに基づいた皮膚感作性における in silico 予測モデルの開発, 第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29-7.1, web 開催)
- 3) 吉田邦嵩, 石川晋吉, 橋爪恒夫, 足利太可雄: ヒト気管支上皮と抗原提示細胞の共培養系を用いた化学物質の in vitro 呼吸器感作性評価法 の開発, 第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29-7.1, web 開催)
- 4) 三浦結美, 足利太可雄, 板垣 宏, 飯島一智: 表皮モデルと免疫細胞を組み合わせたタンパク質感作性評価システムの開発, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
- 5) 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の解析, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
- 6) 鈴木政晴, 安部賀央里, 頭金正博, 山田隆志, 足利太可雄: Cosmetics Europe database を使用した in silico 皮膚感作性予測回帰モデルの開発, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)

- 7) 赤木隆美, 村上将登, 宮崎裕美, 田口浩之, 池田英史, 加藤雅一, 山田知美, Mura S, Couvreur P, 足利太可雄, 小島肇, 明石 満:三次元培養皮膚モデル LbL-3D Skin を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
- 8) 水町秀之, 渡辺美香, 生悦住茉友, 梶原三智香, 安田美智代, 水野 誠, 今井教安, 佐久間めぐみ, 芝田桃子, 渡辺真一, 上野順子, Basketter D, Eskes C, Hoffmann S, Lehmann D, 足利太可雄, 寒水孝司, 武吉正博, 宮澤正明, 小島肇:皮膚感作性試験代替法 Epidermal Sensitization Assay (EpiSensA) の Validation 研究(施設内再現性 Phase I), 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
- 9) 浅野哲秀, 笠松俊夫, 北本幸子, 山本美佳, 足利太可雄, 小島 肇, Bhas42 細胞形質転換試験法 (Bhas 42 CTA) の評価, 日本環境変異原学会第 49 回大会 (2020.11.27, 沼津,静岡および web 開催)
- 10) Iijima K, Nishida A, Ohno A, Hirose A, Ashikaga T: Comparison of Sensitization Potentials between Silver Nanoparticles and Silver Ions using Monocytic Cell Line THP-1, 2021 SOT Virtual Annual Meeting (2021.3.22,USA, web 開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 3回の本試験における各種ナノシリカのRFI及び細胞生存率の平均値及び標準偏差

| 処理群 | 用量 ($\mu\text{g/mL}$) | RFI | | | | 細胞生存率 (%) | |
|-----------|----------------------------|-------|------|--------|--------|--------------|------|
| | | CD86 | | CD54 | | 平均値 | 標準偏差 |
| | | 平均値 | 標準偏差 | 平均値 | 標準偏差 | | |
| 無処理対照(培地) | - | 100.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 98.24 | 0.21 |
| NM-200 | 0.316 | 101.3 | 25.2 | 70.0 | 17.7 | 97.62 | 0.18 |
| | 1.00 | 101.1 | 22.8 | 60.0 | 33.5 | 97.80 | 0.06 |
| | 3.16 | 88.9 | 35.5 | 82.4 | 56.4 | 97.35 | 0.18 |
| | 10.0 | 107.8 | 36.3 | 163.1 | 51.5 | 96.48 | 0.45 |
| | 31.6 | 102.5 | 35.0 | 727.5 | 215.4 | 91.86 | 1.55 |
| | 100 | 97.5 | 28.3 | 1120.8 | 254.0 | 88.08 | 1.90 |
| | 316 | 72.0 | 28.9 | 797.7 | 310.9 | 86.86 | 2.30 |
| | 1000 | 56.9 | 35.6 | 1131.5 | 366.5 | 82.89 | 2.45 |
| 無処理対照(培地) | - | 100.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 98.35 | 0.78 |
| NM-201 | 0.316 | 95.3 | 15.6 | 66.6 | 7.5 | 97.30 | 1.13 |
| | 1.00 | 92.7 | 23.7 | 79.4 | 1.3 | 97.38 | 0.44 |
| | 3.16 | 94.4 | 8.9 | 73.1 | 7.9 | 97.31 | 0.88 |
| | 10.0 | 86.7 | 10.7 | 97.2 | 8.9 | 97.10 | 1.03 |
| | 31.6 | 85.3 | 11.8 | 227.9 | 57.5 | 95.09 | 1.40 |
| | 100 | 70.2 | 16.7 | 314.1 | 88.1 | 93.59 | 2.10 |
| | 316 | 54.3 | 4.2 | 306.9 | 89.8 | 88.25 | 0.94 |
| | 1000 | 55.2 | 5.8 | 434.7 | 148.4 | 84.92 | 3.75 |
| 無処理対照(培地) | - | 100.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 97.51 | 0.73 |
| NM-202 | 0.316 | 102.9 | 17.2 | 87.6 | 26.2 | 97.37 | 0.72 |
| | 1.00 | 101.8 | 7.2 | 86.7 | 20.5 | 97.27 | 0.72 |
| | 3.16 | 101.3 | 8.4 | 85.0 | 25.0 | 97.04 | 0.15 |
| | 10.0 | 103.3 | 19.1 | 117.8 | 36.1 | 96.92 | 0.31 |
| | 31.6 | 102.4 | 13.3 | 259.3 | 108.1 | 95.81 | 0.68 |
| | 100 | 91.0 | 19.6 | 665.6 | 183.8 | 92.81 | 0.39 |
| | 316 | 48.8 | 8.2 | 541.4 | 88.9 | 91.68 | 0.20 |
| | 1000 | 61.4 | 28.2 | 4812.2 | 2781.6 | 70.34 | 3.25 |
| 無処理対照(培地) | - | 100.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 98.40 | 0.57 |
| NM-203 | 0.316 | 99.8 | 12.8 | 106.3 | 8.0 | 98.42 | 0.35 |
| | 1.00 | 107.7 | 17.3 | 111.6 | 16.3 | 97.64 | 0.91 |
| | 3.16 | 105.5 | 8.3 | 105.7 | 10.1 | 97.62 | 0.53 |
| | 10.0 | 103.7 | 10.1 | 123.0 | 11.1 | 96.75 | 1.01 |
| | 31.6 | 103.8 | 14.4 | 238.0 | 62.6 | 94.69 | 0.10 |
| | 100 | 104.1 | 6.7 | 641.4 | 214.0 | 90.19 | 1.03 |
| | 316 | 82.6 | 19.0 | 545.8 | 181.8 | 89.81 | 0.59 |
| | 1000 | 108.2 | 32.8 | 2795.3 | 255.3 | 71.30 | 4.18 |
| 無処理対照(培地) | - | 100.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 96.81 | 1.03 |
| NM-204 | 0.316 | 113.7 | 15.4 | 112.2 | 25.6 | 97.09 | 1.15 |
| | 1.00 | 113.0 | 15.2 | 94.8 | 18.3 | 96.90 | 0.80 |
| | 3.16 | 113.9 | 13.7 | 143.0 | 57.0 | 96.35 | 0.77 |
| | 10.0 | 112.0 | 25.5 | 576.8 | 383.5 | 94.19 | 1.50 |
| | 31.6 | 127.1 | 34.6 | 2281.2 | 1252.4 | 85.78 | 2.86 |
| | 100 | 120.9 | 34.9 | 3439.6 | 1155.8 | 78.67 | 3.86 |
| | 316 | 94.2 | 46.3 | 2961.9 | 778.0 | 79.36 | 0.92 |
| | 1000 | 77.1 | 35.2 | 2100.7 | 528.7 | 77.96 | 0.68 |

RFI: 相対蛍光強度

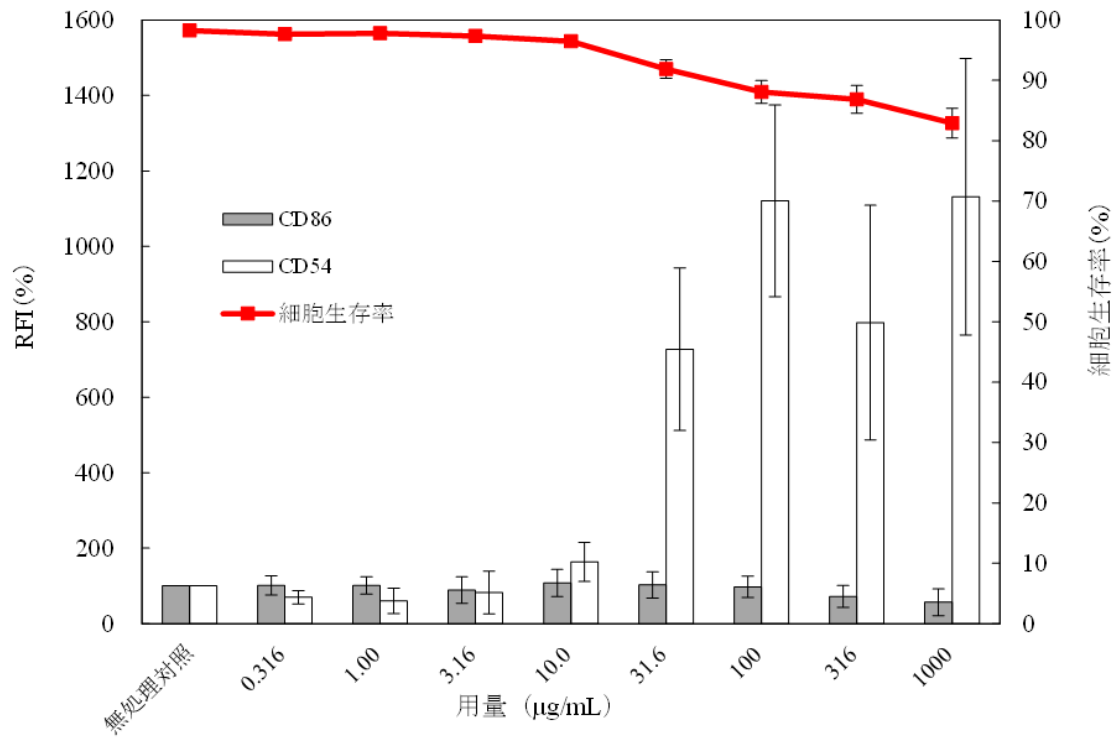


図1 NM-200のRFI及び細胞生存率 (n=3)

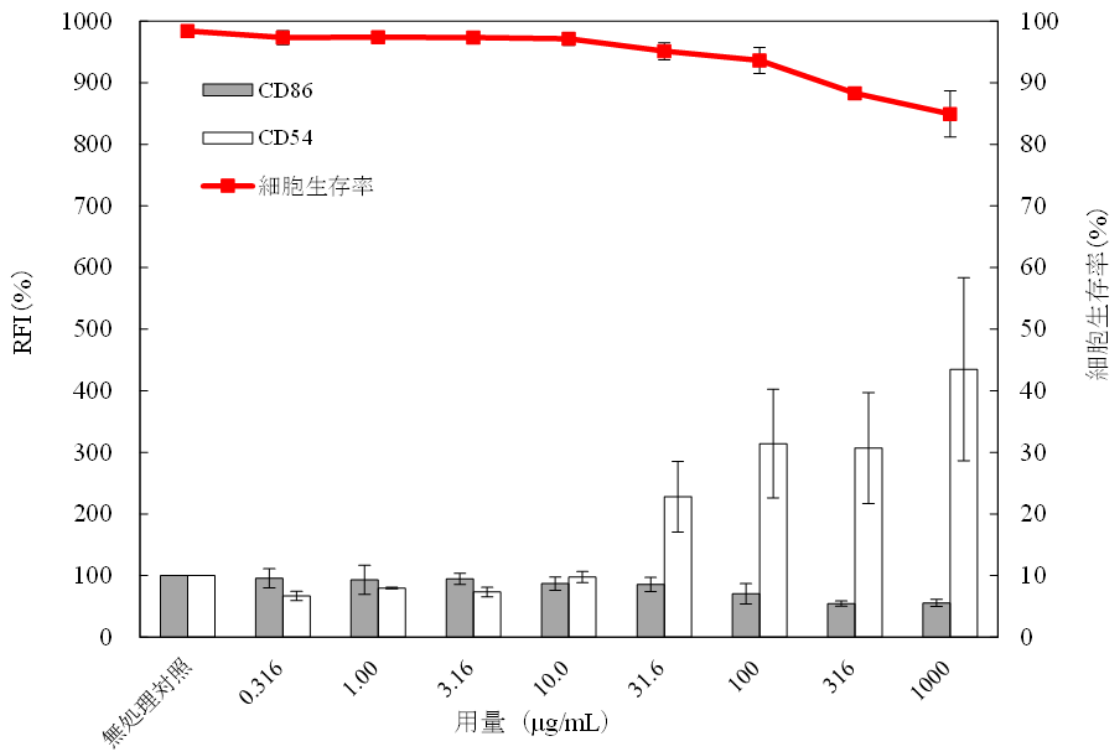


図2 NM-201のRFI及び細胞生存率 (n=3)

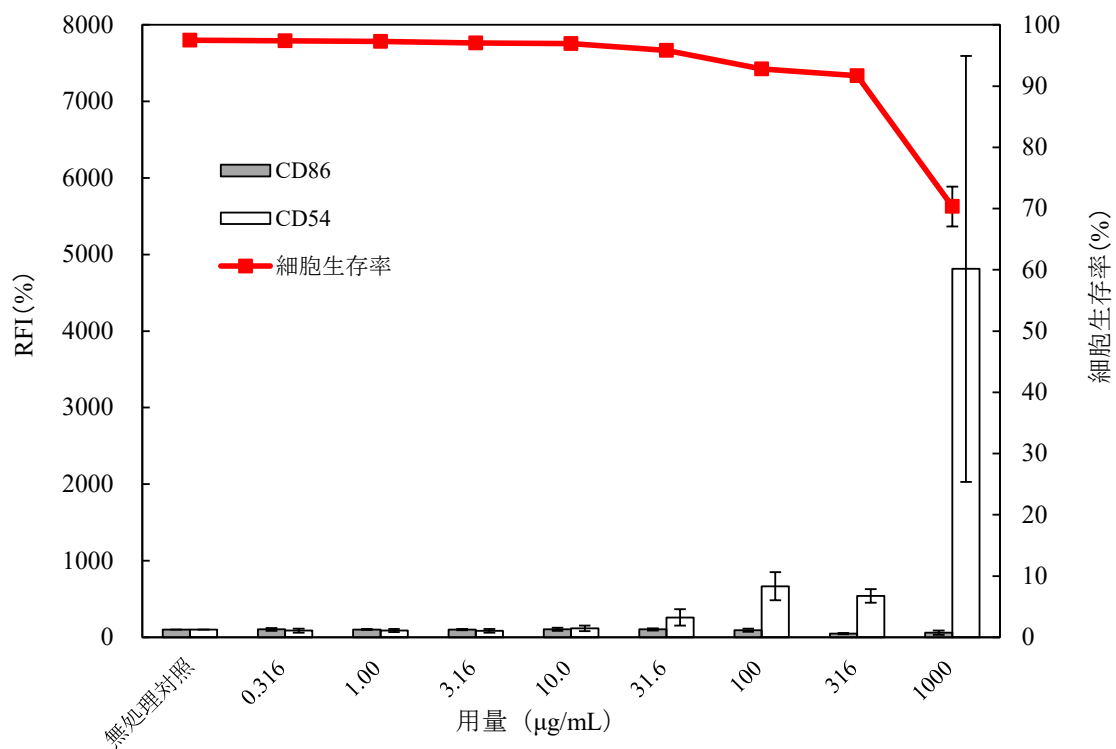


図3 NM-202のRFI及び細胞生存率 (n=3)

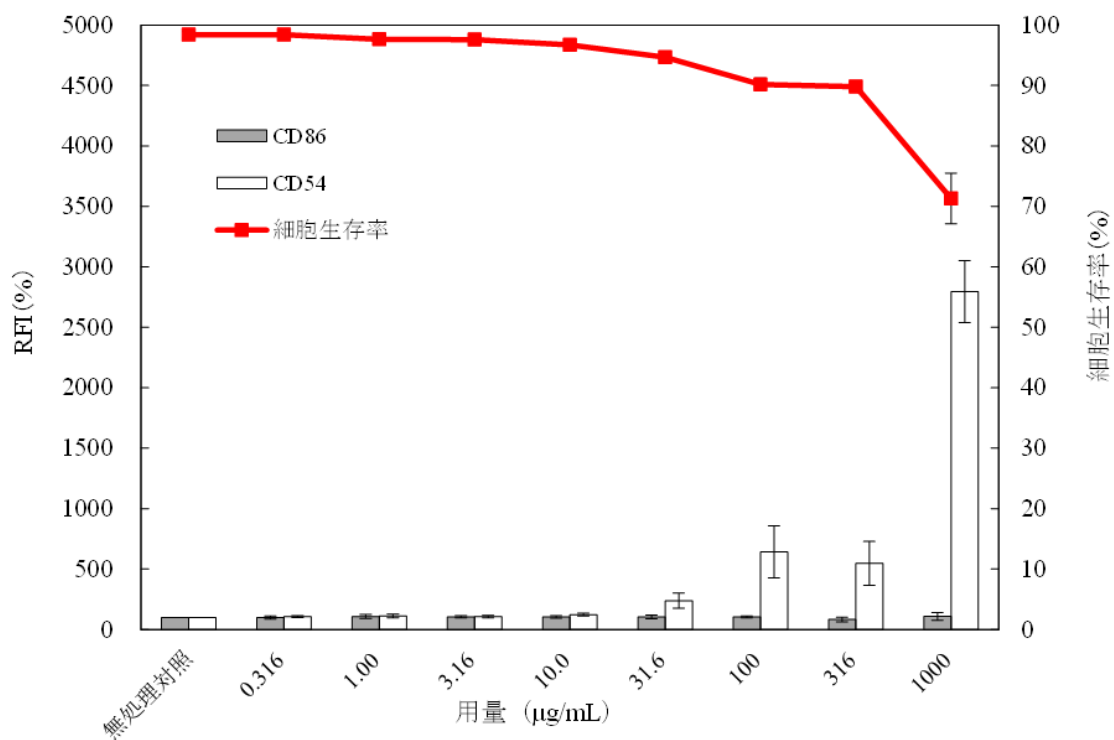


図4 NM-203のRFI及び細胞生存率 (n=3)

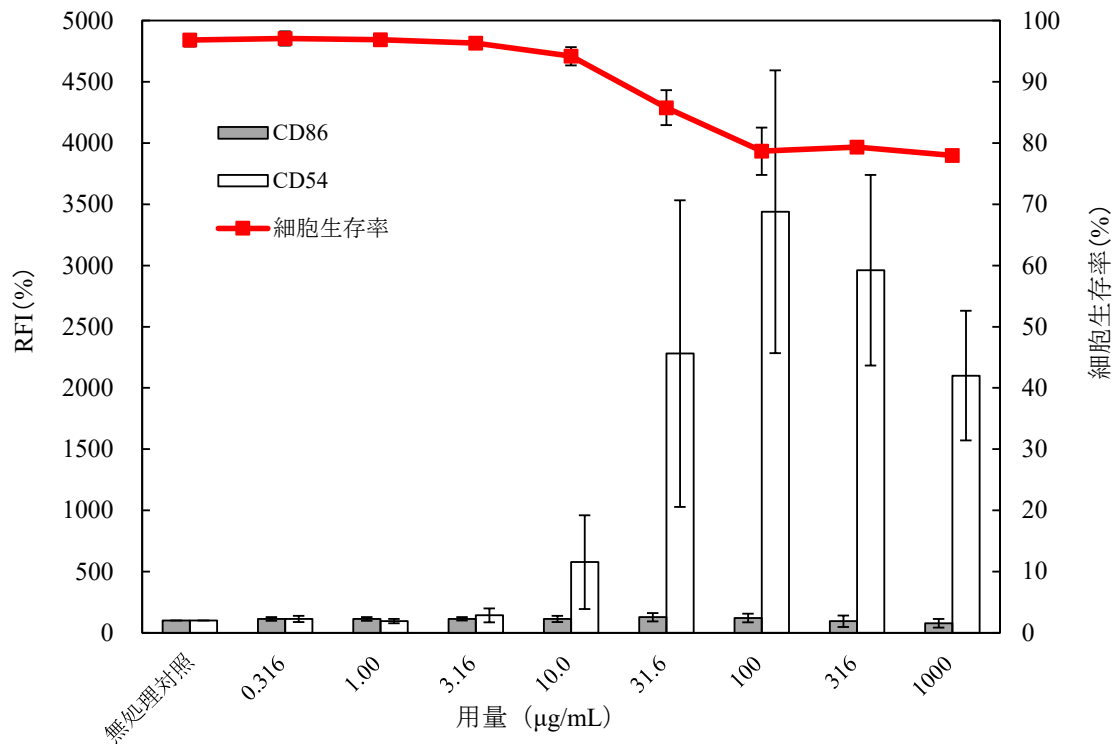


図5 NM-204のRFI及び細胞生存率 (n=3)

表2 各種ナノシリカのh-CLAT試験結果

| | NM-200 | NM-201 | NM-202 | NM-203 | NM-204 |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| EC200 (CD54 発現濃度閾値)(µg/mL) | 10.3 | 30.3 | 19.5 | 24.8 | 3.5 |
| CD54の相対発現量(RFI)の最大値(%) | 1131.5 | 434.7 | 4812.2 | 2795.3 | 3439.6 |
| CD54の相対発現量の最大値をとった濃度(µg/mL) | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 100 |
| CD54の相対発現量の最大値をとった濃度における細胞生存率(%) | 82.9 | 84.9 | 70.3 | 71.3 | 78.7 |