

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3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 室長

**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。

昨年度二酸化ケイ素ナノマテリアル（以下、ナノシリカ）がヒト単球細胞株 THP-1 の CD54 発現を著しく亢進することを見出したが、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、同様に活性化能がある皮膚感作性物質と発熱性物質についてナノシリカ NM-204 の混合曝露を検討した。その結果、代表的な皮膚感作性物質である DNCB は NM-204 による THP-1 細胞の活性化をむしろ抑制し、代表的な発熱性物質である LPS は NM-204 による THP-1 細胞の活性化を相乗的に亢進することが明らかとなった。さらに、カーボンナノチューブである T-MWCNT-7 も THP-1 の CD54 発現を強く亢進することを明らかとした。

**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**

前年度評価対象物質とした二酸化ケイ素ナノマテリアル（以下、ナノシリカ）5 種のうち、THP-1 細胞における CD54 の発現誘導能が最も高かった NM-204 を用いて、前年度結果の再現性および NM-204 と他の活性化物質との混合曝露について検討を行った。活性化物質として、代表的な皮膚感作性物質である 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB) および代表的な発熱性物質である Lipopolysaccharide (LPS) を用いた。

更に、新たな NM として分散性の異なるカーボンナノチューブ（分散型：T-

MWCNT-7、非分散型：N-MWCNT-7)を用いて、抗原提示細胞活性化能の評価を行った。

抗原提示細胞活性化能の評価方法は、前年度同様 THP-1 細胞の活性化を指標とする *in vitro* 皮膚感作性試験法である h-CLAT (OECD TG442E) に準拠して実施し、陽性・陰性の判断だけでなく強度の指標として発現の濃度閾値 (EC150 for CD86 と EC200 for CD54) を求めた。

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 $2.0 \times 10^6$  cells/ml THP-1細胞懸濁液500 mlおよび各被験物質の分散液500 mlを添加し、CO<sub>2</sub>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 µg/mlとし、公比 $\sqrt{10}$ で希釈して合計8濃度を設定した。曝露後の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分間ブロックした。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、倫理上の問題は無いと考える。

### C. 研究結果

ナノシリカ NM-204 単独の h-CLAT 試験を実施した結果、CD86 の発現誘導は認められず、CD54 については、10~100 µg/mL の濃度で濃度依存的に強い発現誘導が認められ、前年度の結果の再現性が得られた。結果を図 1 に示す。

次に DNCB の適用濃度を固定 (4 µg/mL) し、NM-204 と混合曝露 (適用濃度: 0.00316 ~ 100 µg/mL) した。CD86 の RFI は、294.3 ~ 316.8 となり、DNCB 単独の RFI である  $318.4 \pm 30.1$  (n=3) と同程度であったことから、混合曝露により相加・相乗効果はないと判断された。CD54 においては、混合曝露の場合の RFI は 462.8 ~ 518.3 と DNCB 単独曝露の場合の RFI である  $475.9 \pm 176.3$  (n=3) と同程度の値を示し、10 ~ 100 µg/mL の NM-204 単独曝露で認められた RFI の上昇は認められず、DNCB との混合曝露により抑制されていた。結果を図 2 に示す。

発熱性物質 LPS (1 ng/mL) 単独処理における RFI は、CD86 では 102.3 (陰性)、CD54 では 1404.6 であり、CD54 のみ非常に強い発現亢進が認められた。適用濃度を固定した LPS (1 ng/mL) と適用濃度を振った NM-204 (0.00316 ~ 100 µg/mL) との混合曝露では、NM-204 の 31.6 および 100 µg/mL で CD86 の RFI が 150 以上 (陽性) となった。NM-204 および LPS はいずれも単独曝露における CD86 の発現亢進はないため、混合曝露による相乗効果と考えられた。一方 CD54 については、NM-204 単独曝露で亢進作用の認められる 10

μg/mL 以上の濃度範囲で LPS による亢進作用との加算を上回る発現亢進が見られたことから、相乗効果と考えられた。結果を図 3 に示す。さらに、LPS と NM-204 の混合曝露の RFI 値から LPS 単独曝露の RFI の値を差し引いた結果について、図 4 a (CD86), と b (CD54) に示す。

カーボンナノチューブの評価に際し、まず試験に適用する媒体を検討した。ナノシリカで使用した超純水を用いて超音波処理による分散状態を確認したところ、均一な分散状態を得られなかった。そこで、吸入暴露試験で使用実績のある polysorbate 80 (HX2) で検討したところ、T-MWCNT-7 (分散型) では、ラボミキサーおよび超音波処理により、stock solution (0.1 mg/mL) および working solution (10.0 μg/mL) とともに良好な分散状態が得られた。N-MWCNT-7 (非分散型) についても、stock solution では粒子の凝集がみられたが、分散状態は良好であった。また、polysorbate 80 (HX2) の試験適用可能な添加量を検討した。その結果、0.1 v/v% 以下において、細胞生存率が 90% 以上となったことから、polysorbate 80 (HX2) の最終添加量を 0.1 v/v% とした。以上の検討よりカーボンナノチューブの最高適用濃度を 10.0 μg/mL とし、公比  $\sqrt{10}$  で希釈した 8 用量を設定して h-CLAT 試験を実施した。非分散型のカーボンナノチューブである N-MWCNT-7 について、CD86 では発現亢進作用が認められなかったが、CD54 では 3.16 μg/mL 以上で発現亢進が認められ、10 μg/mL において約 6 倍 (RFI=596.8) となり、陽性となる濃度閾値 (EC200 for CD54) は 3.20 μg/mL と算出された。分散型では、CD86 について弱い発現亢進作用が認められ陽

性となった。CD54 については 3.16 μg/mL 以上で強い発現亢進が認められ、10 μg/mL において約 10 倍 (RFI=1001.3) となった。分散型の陽性となる濃度閾値 (EC150 for CD86, EC200 for CD54) はそれぞれ 8.46 μg/mL, 1.35 μg/mL と出された。非分散型と分散型それぞれの結果を図 5 と図 6 に示す。

#### D. 考察

これまで本研究では、様々なナノマテリアルが抗原提示細胞株である THP-1 細胞を活性化することを見出したが、そのメカニズムを解明するために、同様に活性化能がある皮膚感作性物質と発熱性物質との混合曝露を検討した。その結果、代表的な皮膚感作性物質である DNCB は NM-204 による THP-1 の活性化をむしろ抑制し、代表的な発熱性物質である LPS は NM-204 による THP-1 の活性化を相乗的に亢進することが明らかとなった。以上のことから、ナノマテリアル NM-204 による THP-1 の活性化は、皮膚感作性物質や発熱性物質による活性化とは異なるメカニズムによる可能性が考えられた。今後はこれら活性化物質による THP-1 細胞のインフラマソームや NF-κB の活性化を解析することで、ナノマテリアルによる抗原提示細胞の活性化メカニズムを解明する予定である。

今回カーボンナノチューブが THP-1 細胞を活性化することを新たに見出した。分散型の活性化能が高かったのは、細胞への取り込みやすさに関連があると考えた。今後性質の異なるカーボンナノチューブについて h-CLAT 試験による評価を行い、物性と活性化の関連などの解析を行う。

研究分担者の渡辺は、本年度ナノマテリアルの短期全身曝露による感染性免疫系への影響を評価するため、ナノシリカNW-204の複数回のin vivo吸入曝露試験によるrespiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響評価を実施した。その結果、RSV感染マウスのマウスでは、RSV肺炎の代表的なマーカーであるCCL5 (RANTES) と炎症性ケモカインCCL3 (MIP-1 $\alpha$ )レベルは、NW-204曝露により有意に上昇していた。一方、非感染マウスにおいて、NW-204は全く影響が認められなかった。以上より、今回のNW-204の吸入曝露は、正常マウスにおいて単独では炎症を惹起するような免疫刺激にならず、RSV感染により、細胞に取り込まれていたNW-204が感染免疫応答を刺激して炎症を誘導したことが強く示唆された。これはナノシリカ粒子にプライミングを受けた肺胞マクロファージ類がRSV感染の刺激により遊走と貪食を進めていった結果と考えられる。

一方我々の分担研究においては、グラム陰性菌由来のLPSとナノシリカNM-204と同時曝露によるin vitro抗原提示細胞活性化について相乗効果が認められた。先行研究においても、THP-1細胞にナノシリカまたはLPSを暴露したTHP-1細胞の活性化が評価されており、ナノシリカそのものにはNF- $\kappa$ B活性化能はなかったが、LPSによるNF- $\kappa$ B活性化に対し、ナノシリカはプライミング効果を示したり。したがって、TRL (Toll-like receptor)を介したLPSやウイルスRNAなどのPAMPs (pathogen-associated molecular patterns)による抗原提示細胞の活性化に対し、ナノシリカは異なるメカニズムにより相乗的に働く可能性が考えられ、本研究班の知見はそれを裏付けるものと考えられる。

1) M. G. Bianchi et al., Pyrogenic and Precipitated Amorphous Silica, Nanoparticles Differentially Affect Cell Responses to LPS in Human Macrophages, *Nanomaterials* 2020, 10, 1395; doi:10.3390/nano10071395

## E. 結論

代表的な皮膚感作性物質 DNCB とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露し、活性化の指標である CD86 および CD54 の発現量を測定したところ、DNCB は NM-204 による THP-1 細胞の活性化を抑制した。また代表的発熱性物質である LPS とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露したところ、THP-1 細胞の活性化について相乗効果が認められた。以上より、ナノマテリアルによる活性化は皮膚感作性物質や発熱性物質による活性化とは異なるメカニズムによるものと考えられた。今後こうしたナノマテリアルによる抗原提示細胞の活性化メカニズムを解明するために、インフラマソーム活性化を検討する予定である。

さらに新たなナノマテリアルとしてカーボンナノチューブ(T-MWCNT-7)を評価したところ、分散状態にかかわらず THP-1 細胞を活性化し、活性化能は分散型の方が強かった。

## F. 研究発表

### F.1. 論文発表

1. Ambe K, Suzuki M, Ashikaga T, Tohkin M: Development of quantitative model of a local lymph node assay for evaluating skin sensitization potency applying machine learning CatBoost, *Regulatory*

- Toxicology and Pharmacology, 2021;125, 105019.
2. Nishida H, Ohtake T, Ashikaga T, Hirota M, Onoue S, Seto Y, Tokura Y, Kouzuki H: In chemico sequential testing strategy for assessing the photoallergic potential, *Toxicology in Vitro*, 2021; 77, 105245
  3. Narita K, Okutomi H, Kawakami K, Sui H, Basketter D, Ashikaga T: Behavior of Chemical Respiratory Sensitizers in *in Vitro* Methods for Skin Sensitization, *AATEX*, 2021; 26(1), 9-18.
  4. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M. Establishment of a Threshold of Toxicological Concern Concept for Skin Sensitization by in Vitro/in Silico Approaches. *日本化粧品学会誌*. 2021;45(4):331-5.
  5. 足利太可雄: In vitro/in silico 試験による皮膚感作性の毒性学的懸念の閾値 (TTC) コンセプトの確立. *Cosmetology*, 2021;29, 62-66.
- F.2. 学会発表
1. 田邊郁也, 石川晋吉, 石森かな江, 橋爪恒夫, 善本隆之, 足利太可雄: 呼吸器特異的な免疫応答を再現した in vitro 呼吸器感作性試験の開発, 第 48 回日本毒性学会学術年会(2021.7.7-9)
  2. Ashikaga T: Skin Sensitization Testing Strategy for Japan, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11)(2021.8.24)
  3. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M: Establishment of a risk assessment method and threshold of toxicological concern (TTC) concept for skin sensitization by non-animal approaches, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11) (2021.8.27&31)
  4. 相場節也, 木村裕, 足利太可雄, 小島肇: Multi-ImmunoToxicity Assay とガイダンス化状況, 第28回日本免疫毒性学会学術年会(2021.9.7)
  5. 足利太可雄: 皮膚感作性-IATA に基づく OECD ガイドライン-, 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会(2021.9.7)
  6. 足利太可雄: 皮膚感作性-IATA に基づく OECD ガイドライン-, 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会(2021.9.7)
  7. 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, David Basketter, Chantra Eskes, Sebastian Hoffmann, David M. Lehmann, 足利太可雄, 寒水孝司, 武吉正博, 鈴木 将, 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, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会(2021.11.11-13)
  8. 足利太可雄: 非動物実験アプローチによる皮膚感作のリスク評価と TTC, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.13)
  9. 足利太可雄: 動物実験代替法の国際動向と国内への影響 -OECD ガイドライン No.497 を中心に-, 日本安全性試験受託研究機関協議会 第 3 回定期総会及び講演会(2021.11.19)
  10. Ashikaga T: In vitro method development for evaluating inhalation toxicity of nanomaterials, Second expert workshop for Applicability of Test Guideline 442D

in vitro skin sensitization for  
nanomaterials (2021. 12. 3)

11. 足利太可雄: THP-1 細胞の活性化を指標にしたナノマテリアルの免疫毒性評価の試み, 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.26)
12. 伊藤潤, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博: ヒト皮膚感作性データを用いた機械学習による in silico 予測モデルの開発, 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.27)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

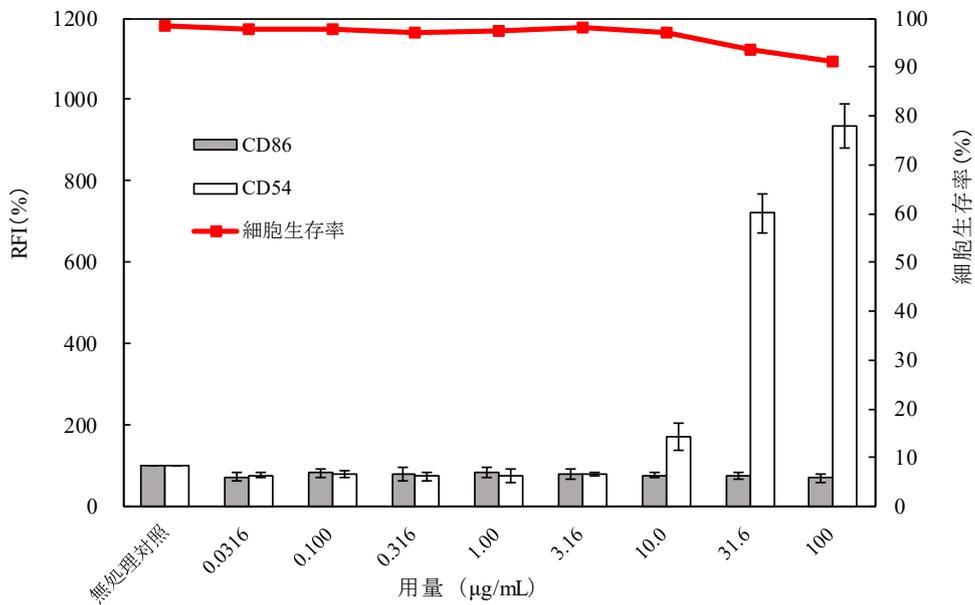


図1 NM-204のRFI及び細胞生存率 (n=3)

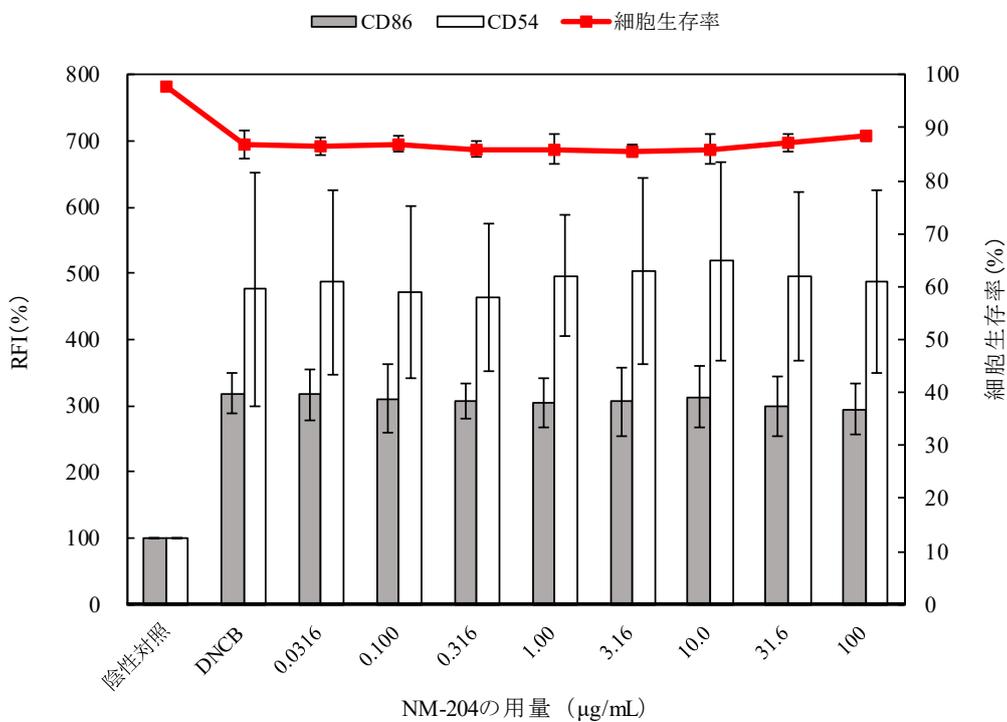


図2 DNCB (4µg/mL)存在下でのNM-204のRFI及び細胞生存率 (n=3)

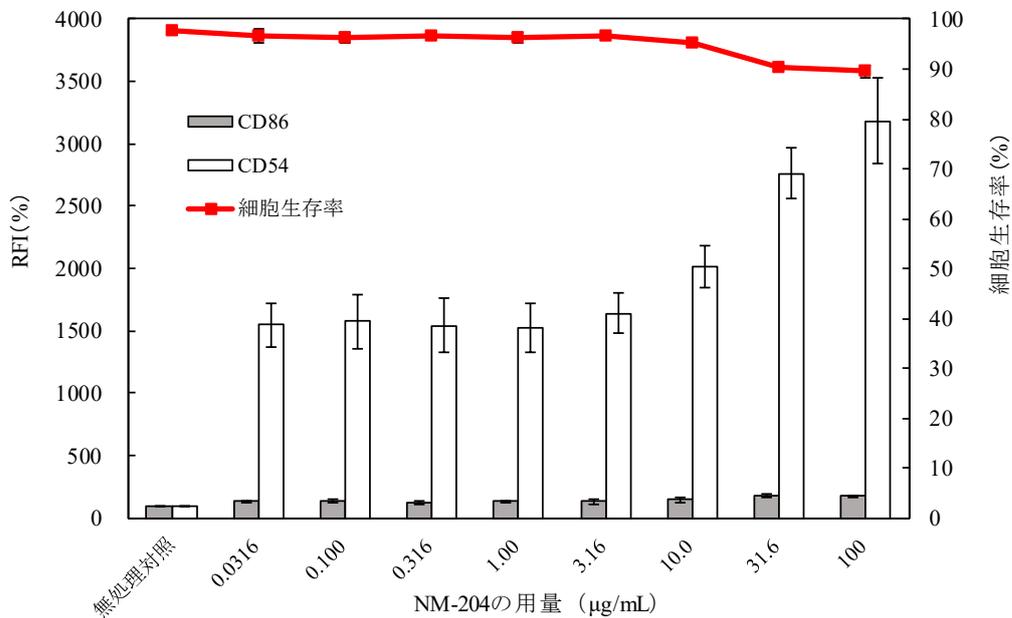


図3 LPS (1ng/mL)存在下でのNM-204のRFI及び細胞生存率 (n=3)

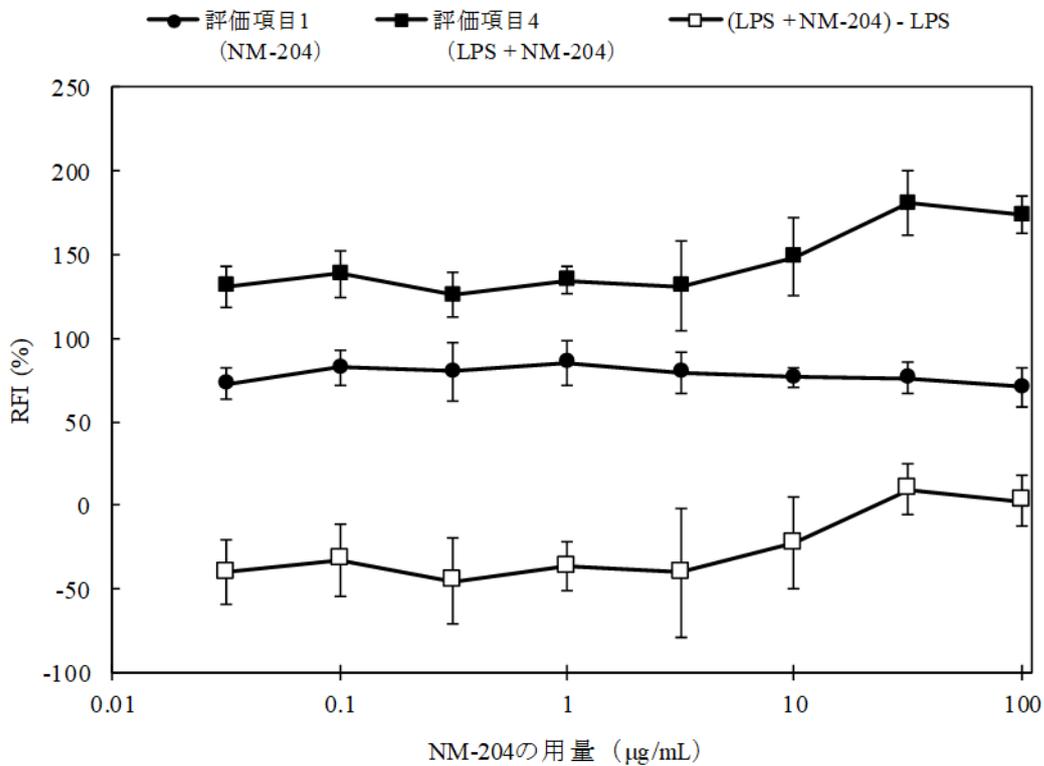


図4-a LPSとNM-204混合曝露のRFI (CD86)とNM-204単独のRFI (CD86)の差

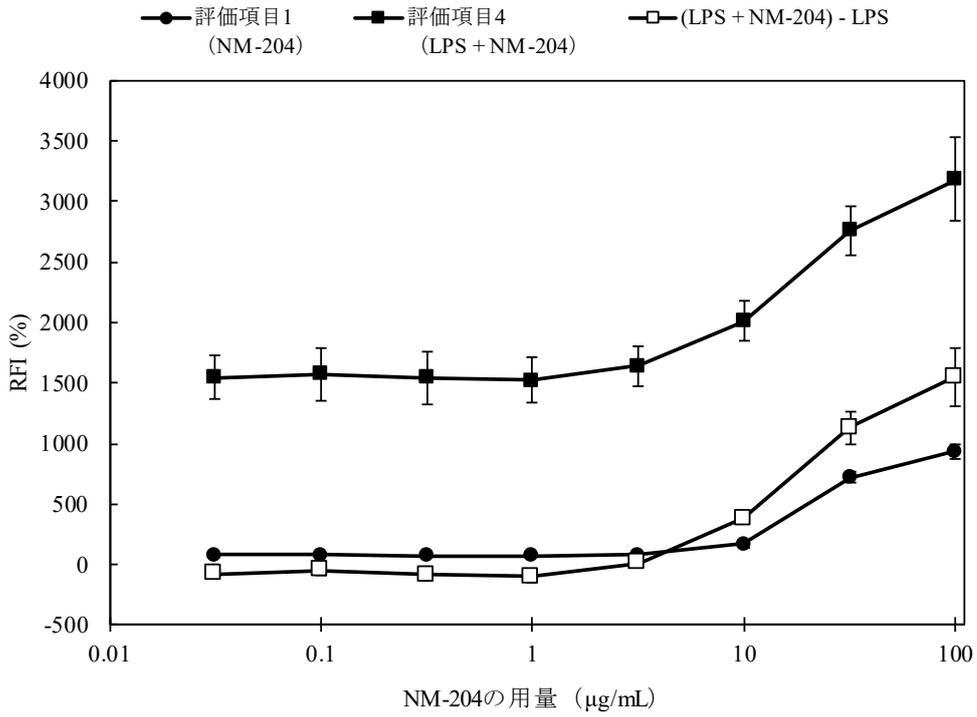


図4-b LPSとNM-204混合曝露のRFI (CD54)とNM-204単独のRFI (CD54)の差

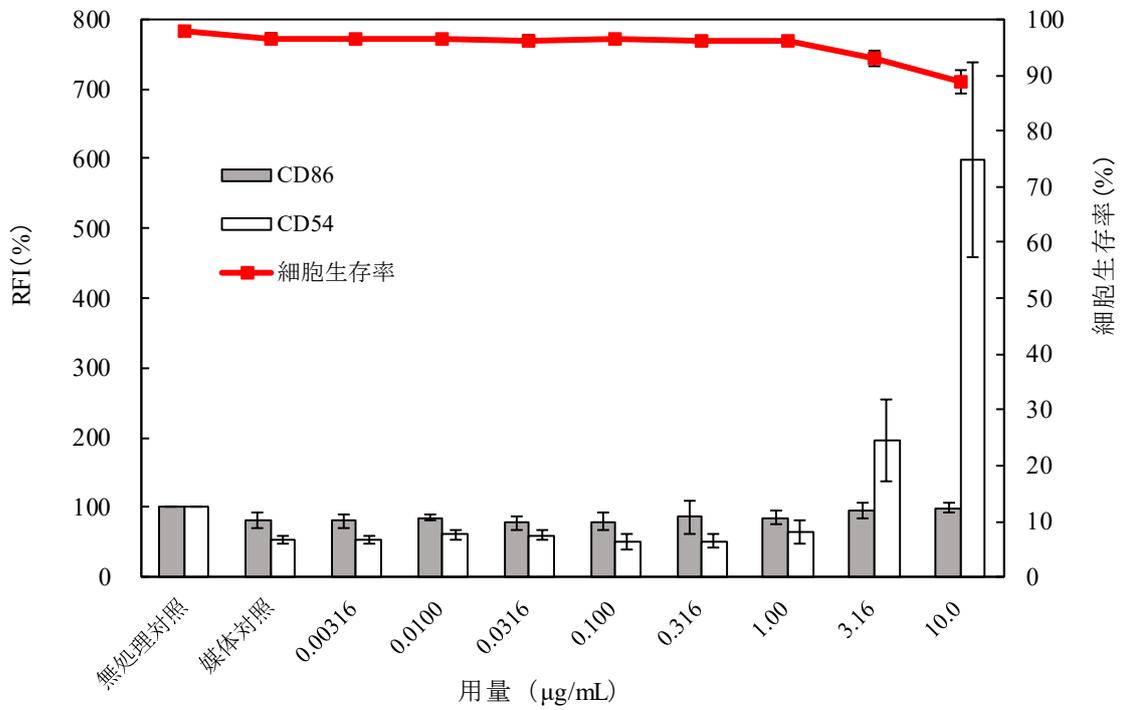


図5 N-MWCNT-7 (非分散型) のRFI及び細胞生存率 (n=3)

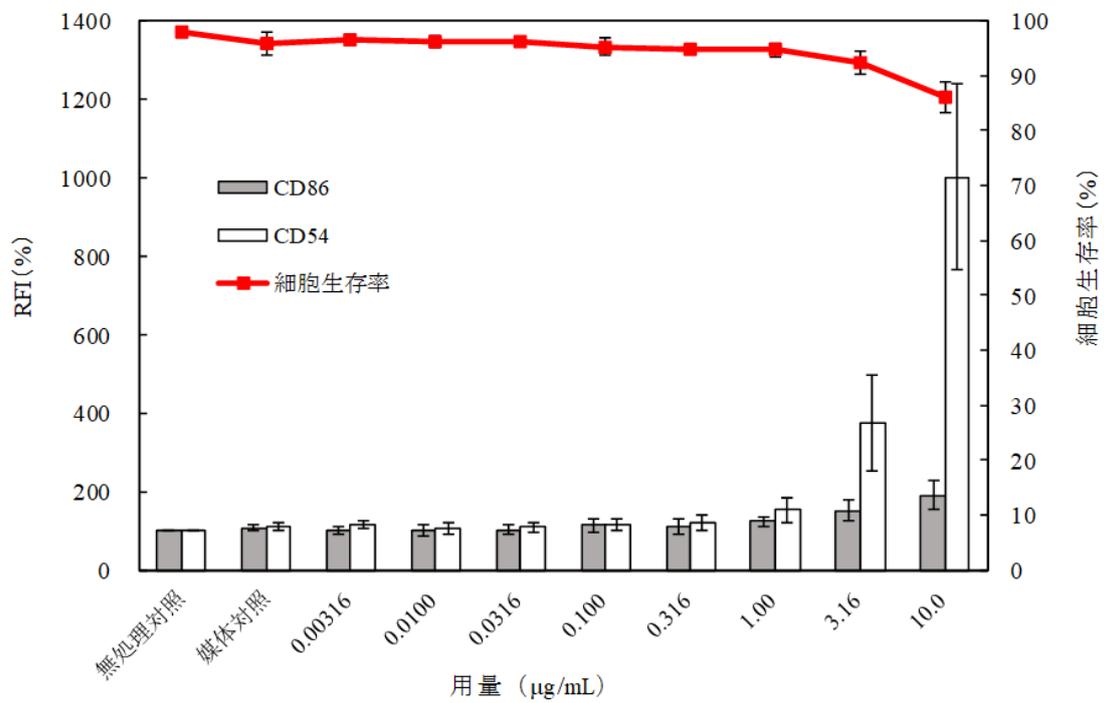


図6 N-MWCNT-7 (分散型) のRFI及び細胞生存率 (n=3)