

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 *in vitro* 評価系に関する研究
— 様々な特徴を有するナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能等の評価と
細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明に関する研究 —

研究分担者 飯島 一智 横浜国立大学大学院工学研究院 准教授

研究要旨

短期吸入曝露された各種ナノマテリアル (NM) が免疫系に与える影響に関する *in vitro* 試験法の確立を目指し、本研究では種々の銀ナノ粒子、シリカナノ粒子、二酸化チタン NM について抗原提示細胞活性化能の評価を行なった。評価としては、従来の h-CLAT に倣った、フローサイトメーターを用いて測定される THP-1 細胞の CD86, CD54 発現を指標とする手法に加え、未分化および分化 THP-1 細胞の CD86, CD54, マクロファージエラスターゼ *Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12)* 遺伝子の発現を指標とする新たな手法についても検討した。

銀ナノ粒子においては粒径により抗原提示細胞の活性化に差が見られ、取り込みや溶出銀イオン濃度の違いによる影響が推測された。シリカナノ粒子、二酸化チタン NM とともに、未分化および分化 THP-1 細胞いずれにおいても濃度依存的、粒子種依存的な MMP-12 の発現亢進が見られ、評価指標としての有効性が示唆された。CD54 と MMP-12 の発現の乖離も見られ、今後、毒性評価における意義について検討を進める。シリカナノ粒子においては粒子調製法や粒径、二酸化チタン NM においては結晶型や結晶形状による抗原提示細胞活性化能の違いが評価できることが示唆された。

また、気管支上皮細胞と抗原提示細胞との共培養系を確立した。共培養系において気管支上皮細胞の上部からシリカナノ粒子を曝露した際にも下部の THP-1 細胞の CD54 の発現亢進がみられ、気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系が、細胞間クロストークを含めたナノマテリアルの毒性評価系となりうる可能性が示された。

A. 研究目的

本研究では短期吸入曝露された各種ナノマテリアル (NM) が免疫系に与える影響について毒性メカニズムの解明と *in vitro* 評価系の開発を行い、得られた知見を基に各種 NM の短期吸入曝露による毒性発現の AOP (毒性発現経路) および *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する。今年度は、これまで抗原提示細胞の活性化の指標として用いてきた CD54,

CD86 の発現に加え、マクロファージエラスターゼ *Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12)* 遺伝子発現の有用性についても検討を行い、様々な特徴を有する各種 NM の解析を行った。また、気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の確立を目指した。

B. 研究方法

B.1. 各種ナノマテリアル分散液の調製

各種ナノマテリアルの分散液は以下の方法により調製した。

銀ナノ粒子

銀ナノ粒子は BioPure™ 銀ナノ粒子分散液 (nanoComposix, 一次粒径 10.3 ± 1.9 nm, 濃度 0.99 mg/ml および一次粒径 52 ± 6 nm, 濃度 1.04 mg/ml) を用いた。40 mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液 in 5% グルコース溶液を用いて希釈した後、培地を用いて所定濃度まで希釈した。購入時の銀ナノ粒子分散液の銀イオン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) により測定した。

シリカナノ粒子

シリカナノ粒子は NM-200, NM-201, NM-202, NM-203, NM-204 (以上 The European Commission's Joint Research Centre (JRC)) および Sicastar-F (micromod 社) を用いた。分散液として購入した Sicastar-F 以外のシリカナノ粒子はあらかじめバイアル瓶に移し、アルミホイルで包んで電気炉で 220°C , 18 時間の条件で乾熱滅菌を行った。25 mg/ml の濃度になるようにシリカナノ粒子を培地に懸濁し、プローブ型超音波装置 (VP-050N, タイテック株式会社) を用いて水中で PWM 80%, 5 min の条件で 2 回処理した。これを 2 倍希釈することで stock 溶液とし、培地を用いて所定濃度に希釈した。

二酸化チタンナノ粒子

二酸化チタンナノ粒子は MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT-600 (以上テイカ株式会社) および TiDW (石原産業株式会社) を用いた。二酸化チタンナノ粒子はあらかじめバイアル瓶に移し、アルミホイルで包んで電気炉で 220°C , 18 時間の条件で乾熱滅菌を行った。4 mg/ml の濃度になるように二酸化チタンナノ粒子を培地に懸濁し、プローブ型超音波装置 (VP-050N, タイテック株式会社) を用いて水中で PWM 80%, 1 min の条件で処理した。培地

を用いて所定濃度に希釈し、再度プローブ型超音波装置により同様の条件で処理した。

B.2. 表面マーカー発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

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 μl および各被験物質の分散液または溶液 500 μl を添加し、 CO_2 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 THP-1 細胞の生存率が 75% となる濃度 (CV75) を基準とし、公比 1.2 で上下合計 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 チャネルおよび FL2 チャ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。

B.3. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化は、24 ウェルプレートの各ウェルに 2.0×10^6 cells の THP-1 細胞を播種し、400 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を含む培地で 3 日間、その後 PMA 不含培地で 5 日間培養することで行った。

24 ウェルプレートに播種・培養された未分化および分化 THP-1 細胞に対し、所定濃度の各被験物質の分散液を添加し、 CO_2 インキュベーター内で 24 時間静置した。培養後の未分化および分化 THP-1 細胞は PBS で 2 回洗浄し、RNeasy mini を用いて添付

のプロトコルに従い、total RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いて添付のプロトコルに従い、cDNA を合成した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて、リアルタイム PCR により、*CD86*, *CD54*, *MMP-12*, *GAPDH* 遺伝子の発現を測定し、*GAPDH* を対照とする $\Delta\Delta C_t$ 法により遺伝子発現量を定量した

B.4. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

プロトコルに従い、市販のヒト気管支上皮細胞の気-液界面培養を行い、気管支上皮モデルを作製した。気管支上皮モデルの作製は経上皮電気抵抗 (TEER) 測定および標本の形態観察により評価を行なった。ウェルプレートのウェルに未分化 THP-1 細胞の懸濁液を入れ、気管支上皮モデルを含むセルカルチャーインサートを設置し、上部もしくは下部よりシリカナノ粒子 (Sicstar-F) 分散液を加えた。24 時間培養後、B.2.の手法にて THP-1 細胞の *CD86*, *CD54* の発現および細胞生存率を測定した。この際、培地として THP-1 細胞の培養に用いる 10% ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地を用いた。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

C.1. 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の評価

直径約 10 nm および 50 nm いずれの銀ナノ粒子処理においても *CD86* および *CD54* の発現の増加が見られた (図 1)。直径約 10 nm の銀ナノ粒子の EC150 (*CD86* 発現が 150%を超える濃度), EC200 (*CD54* 発現が 200%を超える濃度) は 127.6 $\mu\text{g/ml}$, 118.4 $\mu\text{g/ml}$ であり、直径約 50 nm の銀ナノ粒子

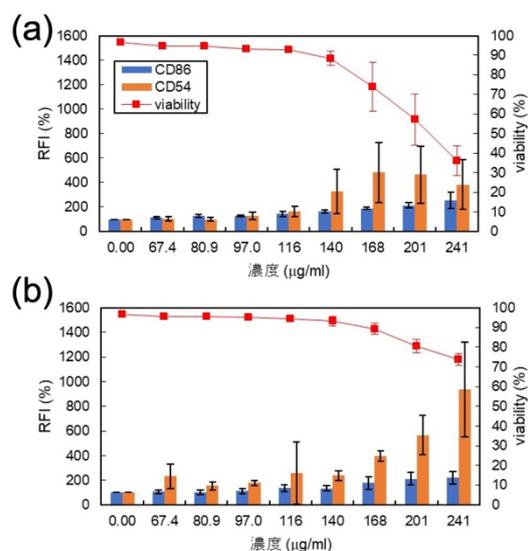


図 1 直径約 10 nm (a) および直径約 50 nm (b) 銀ナノ粒子処理 THP-1 細胞の *CD86* および *CD54* の発現

は 159.5 $\mu\text{g/ml}$, 122.9 $\mu\text{g/ml}$ であり、直径約 10 nm の銀ナノ粒子の方がわずかに低濃度であった。

C.2. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

各種シリカナノ粒子処理後の未分化および、分化 THP-1 細胞における *MMP-12*, *CD86*, *CD54* 遺伝子の発現を図 2 および図 3 に示す。ナノ粒子の種類により、異なる *MMP-12* および *CD54* の発現亢進が見られた。全体的な傾向として、未分化 THP-1 の方が遺伝子発現の上昇幅が大きい傾向が見られた。一方、ナノ粒子曝露による *CD86* の発現変化はほとんど認めなかった。

二酸化チタンナノ粒子処理後の未分化および、分化 THP-1 細胞における *MMP-12*, *CD86*, *CD54* 遺伝子の発現を図 4 および図 5 に示す。ナノ粒子の種類により、異なる *MMP-12* および *CD54* の発現亢進が見られた。ナノシリカ粒子と同様にナノ粒子曝露による *CD86* の発現変化はほとんど認めなかった。

各

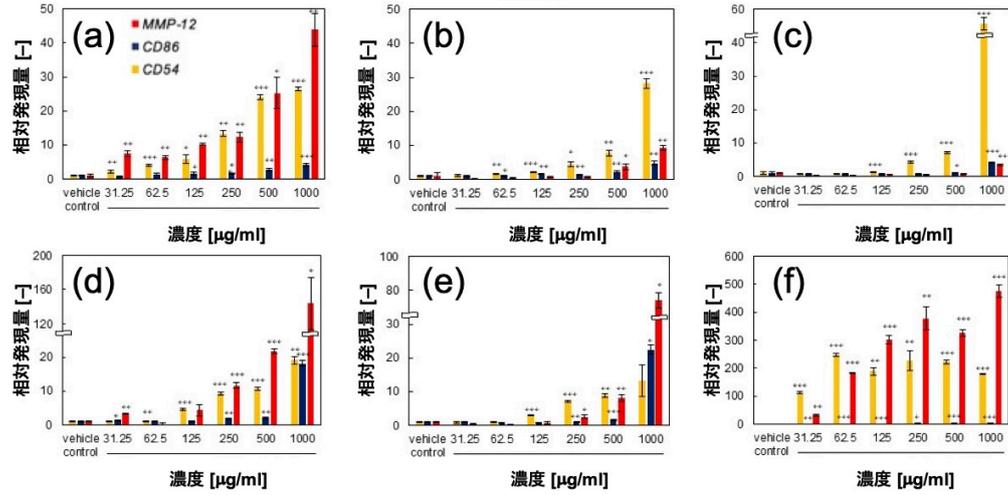


図2 各シリカナノ粒子処理未分化THP-1細胞のMMP-12, CD86およびCD54遺伝子の発現量. (a)NM-204, (b)NM-200, (c)NM-201, (d)NM-203, (e)NM-202, (f)Sicastar-F. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

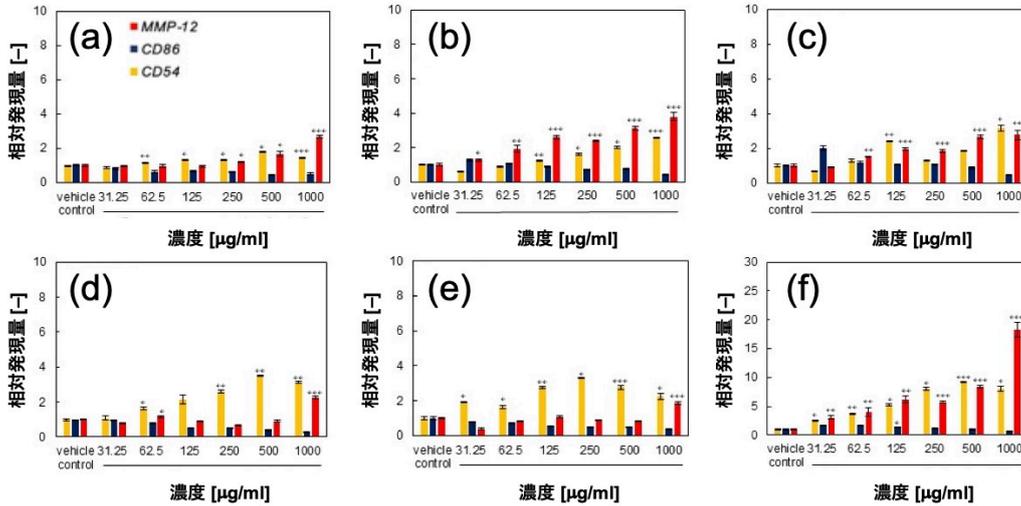


図3 各シリカナノ粒子処理分化THP-1細胞のMMP-12, CD86およびCD54遺伝子の発現量. (a)NM-204, (b)NM-200, (c)NM-201, (d)NM-203, (e)NM-202, (f)Sicastar-F. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

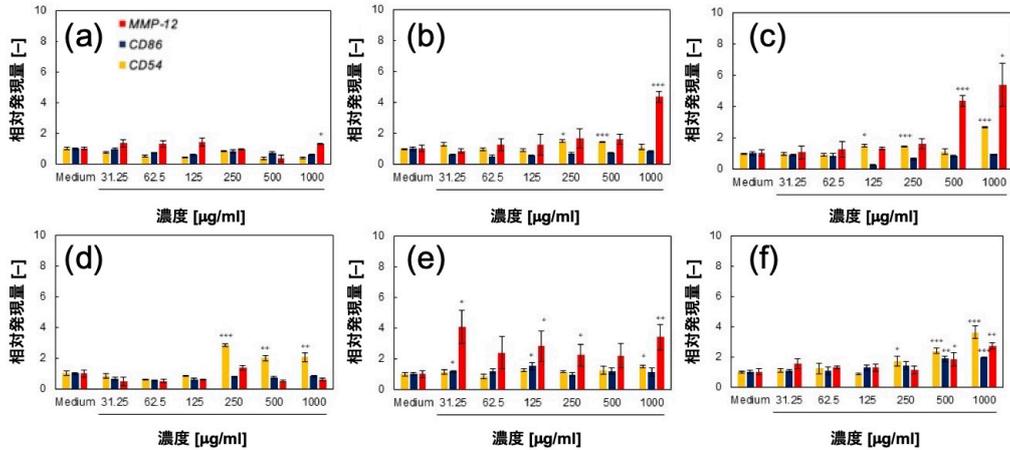


図4 各二酸化チタンナノ粒子処理未分化THP-1細胞のMMP-12, CD86およびCD54遺伝子の発現量. (a)MT-150A, (b)MT-500B, (c)TiDW, (d)AMT-100, (e)AMT-600, (f)TKP-102. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

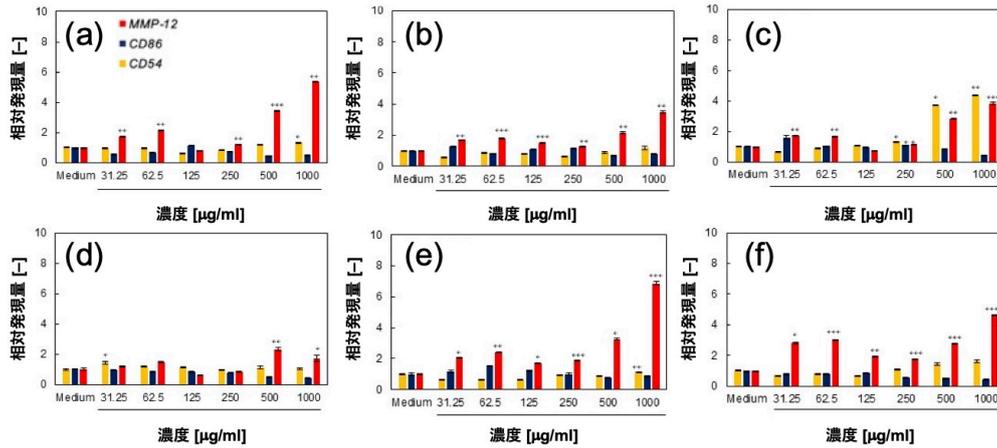


図5 各二酸化チタンナノ粒子処理分化THP-1細胞のMMP-12, CD86およびCD54遺伝子の発現量. (a)MT-150A, (b)MT-500B, (c)TiDW, (d)AMT-100, (e)AMT-600, (f)TKP-102. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

C.3. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

気管支上皮細胞の気-液界面培養 14 日目 (図 6) において緻密な構造が見られるとともに繊毛の運動が観察された。TEER 測定では $500\text{-}600 \text{ } \Omega \text{cm}^2$ となり未分化状態での約 $70 \text{ } \Omega \text{cm}^2$ より上昇していた。

作製された気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養を行った。単培養と気管支上皮細胞との共培養の THP-1 細胞との間で CD54, CD86 の発現や細胞生存率に差は見られなかった。次に、気管支上皮細胞の上部または下部よりシリカナノ粒子 (Sicastar-F) を添加した。気管支上皮細胞の上部からの曝露においては、単培養 THP-1 への曝露よりも低いものの CD54 の発現

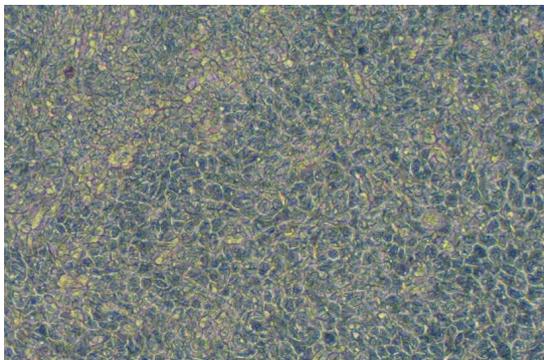


図 6 気-液界面培養 14 日目の気管支上皮細胞の光学顕微鏡像

の増加が見られた。気管支上皮細胞の下部からの曝露においては、単培養 THP-1 への曝露のおよそ 2 倍の CD54 の発現が見られた。

D. 考察

D.1. 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の評価

EC150 (CD86 発現が 150%を超える濃度) の比較において、直径約 10 nm の銀ナノ粒子の $127.6 \text{ } \mu\text{g/ml}$ に対し、直径約 50 nm の銀ナノ粒子は $159.5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ であり、直径約 10 nm の銀ナノ粒子の方が、抗原提示細胞活性化能がわずかに高い可能性が示された。

この要因として、粒子径による取り込み挙動の変化と溶出銀イオン濃度の影響が考えられる。銀ナノ粒子からは銀イオンの溶出が見られ、溶出率は直径約 50 nm の銀ナノ粒子の 0.1% に対し、直径約 10 nm の銀ナノ粒子では 2.0% と高くなっていた。銀ナノ粒子としてだけでなく銀イオンとして作用していることが示唆された。

D.2. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

シリカナノ粒子処理において、未分化お

よび分化 THP-1 細胞いずれにおいても濃度依存的、粒子種依存的な *MMP-12* の発現亢進が見られ、ナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の新たな指標としての有効性が示された。未分化 THP-1 においては、沈降法により調製された粒子 (NM-204, NM200, NM201) と比較して、高熱法 (NM-203、NM-202) およびストーバー法 (Sicastar-F) により調製された粒子の方が *CD54*, *MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、粒子調製法による抗原提示細胞活性化能の違いが評価できることが示唆された。同一調製法においては、流体力学径が小さいものほど *CD54*, *MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、抗原提示細胞の活性化は粒子の細胞への取り込みに依存している可能性が示唆された。一方、分化 THP-1 においては、流体力学径の影響はほとんど見られず、分化による貪食能が高まったためと考えられた。高熱法により調製されたナノ粒子において *CD54* が発現亢進したのに対し、*MMP-12* の発現はほとんど変化せず、*CD54* と *MMP-12* の発現の乖離が見られた。今後、この原因や毒性評価における意義について検討を進める。

二酸化チタンナノ粒子処理においても、未分化および分化 THP-1 細胞いずれにおいても濃度依存的、粒子種依存的な *MMP-12* の発現亢進が見られ、指標としての有効性が示された。未分化 THP-1 においては、ルチル型粒子 (MT-150A, MT-500B) と比較して、アナターゼ型粒子 (AMT-100, AMT-600, TKP-102) の方が *CD54*, *MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、結晶型による抗原提示細胞活性化能の違いが評価できることが示唆された。ルチル型での比較においては、流体力学径が小さいものほど *CD54*, *MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、シリカナノ粒子と同様に細胞への

取り込みの依存が考えられた。未分化・分化 THP-1 いずれにおいても、ルチル型の中で針状結晶の TiDW が *CD54* と *MMP-12* の高発現を誘導し、形状による抗原提示細胞活性化能の違いも示唆された。

D.3. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

気管支上皮細胞との共培養において気管支上皮細胞の上部からシリカナノ粒子を曝露した際にも THP-1 細胞の *CD54* の発現亢進がみられた。気管支上皮細胞を透過した Sicastar-F もしくは Sicastar-F を曝露された気管支上皮細胞からの分泌物により THP-1 細胞の *CD54* 発現量が増加したことが示唆された。気管支上皮細胞の下部から直接曝露した際の *CD54* の発現量は、THP-1 単培養時の 2 倍ほどであった。気管支上皮細胞からの分泌物が抗原提示細胞の活性化能 (*CD54* 発現量) に影響を及ぼすことが示唆され、気管支上皮細胞の分泌する液性因子の影響と考えられる。本共培養系が、気管支上皮細胞と抗原提示細胞との細胞間クロストークを含めた評価系となりうる可能性が示された。

E. 結論

銀ナノ粒子においては粒径により抗原提示細胞の活性化に差が見られ、取り込みや溶出銀イオン濃度の違いによる影響が推測された。現在、ウェスタンブロッティングを用いて、毒性発現における細胞内経路の解析も進めている。

従来の h-CLAT に倣った、フローサイトメーターを用いて測定される THP-1 細胞の *CD86*, *CD54* 発現を指標とする手法に加え、未分化および分化 THP-1 細胞の *CD86*, *CD54*, *MMP-12* 遺伝子の発現を指標とする新たな評価手法を確立し、その有効性を示すことができた。また、気管支上皮細胞と抗

原提示細胞との共培養系を確立した。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

該当なし

F.2 学会発表

- 1) ○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, 第48回日本毒性学会学術年会(2021.7.7-9)
- 2) ○西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子,
飯島一智: THP-1細胞を用いたナノマテリアルによる抗原提示細胞活性化能の評価, 日本動物実験代替法学会第34回大会(2021.11.11-13)
- 3) ○鈴尾美穂, 三浦結美, 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 未分化および分化THP-1細胞を用いたシリカナノ粒子による抗原提示細胞の活性化およびMMP-12遺伝子発現の解析, 日本動物実験代替法学会第34回大会(2021.11.11-13)
- 4) ○Iijima K, Nishida A, Suzuo M, Miura Y, Ashikaga T, Ohno A: Analysis of Antigen-presenting Cell Activation by Nano materials Using Monocytic Cell Line, AP A NANOFORUM-2022 (2022.2.24-26) (Invited talk)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし