

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4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

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ナノマテリアル(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。

これまで様々な NM 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、またそうした活性化の程度は NM により大きく異なること、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などを見出した。さらに、カーボンナノチューブ(CNT)である NT-7 も THP-1 の CD54 発現を強く亢進することを明らかとした。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、OECD において物性と毒性情報が収集されている CNT である NM-400、NM-401、NM-402 及び NM-403 の評価を行い、今回検討したカーボンナノチューブすべてが CD54 発現を大きく亢進させ、*in vitro* で抗原提示細胞を活性化することが示された。今後物性と抗原提示活性化能の関連を解析するとともに、細胞レベルでの活性化メカニズムの解明や *in vivo* 吸入曝露試験における評価を行う予定である。

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

今年度は様々な物性を有するカーボンナノチューブ（以下、CNT）4 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-400、NM-401、NM-402 および NM-203 を欧州委員会 Joint Research Center より供給を受け抗原提示細胞活性化能を評価した。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 2.0×10^6 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、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 µg/mlとし、公比√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

今回検討した CNT について、すべての被験物質について、1000 mg/ml においても細胞生存率が 75%以上であったため、1000 mg/ml を最高用量と設定した。その結果、今回検討したカーボンナノチューブ 4 品す

べてが CD54 発現を大きく亢進させ、in vitro で抗原提示細胞を活性化することが示された。それぞれの被験物質の結果を図 1 から図 4 に示した。

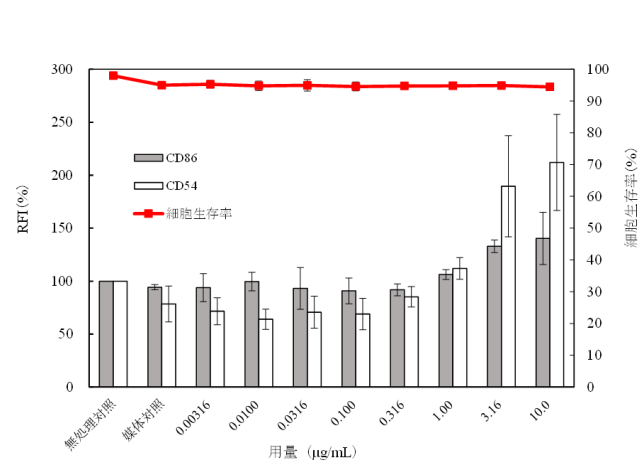


図 1 NM-400 の RFI 及び細胞生存率

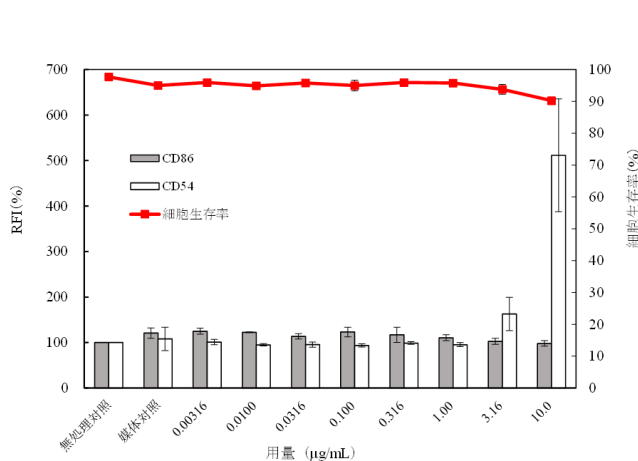


図 2 NM-401 の RFI 及び細胞生存率

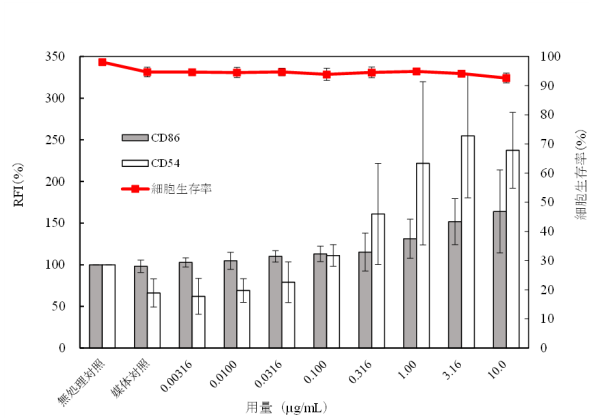


図3 NM-402 の RFI 及び細胞生存率

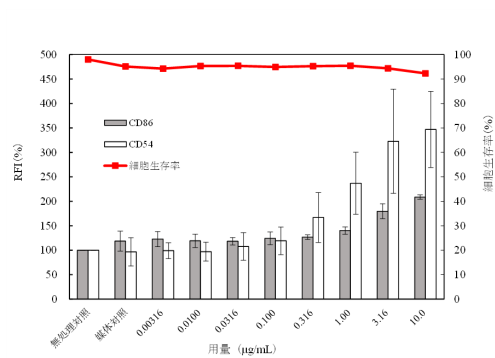


図3 NM-403 の RFI 及び細胞生存率

さらに各被験物質の EC150 (CD86 発現濃度閾値) と EC200 (CD54 発現濃度閾値) を算出し、表 1 にまとめた。

表 1 各 CNT の EC150 及び EC200

被験物質	EC150				EC200			
	本試験1回目	本試験2回目	本試験3回目	EC values	本試験1回目	本試験2回目	本試験3回目	EC values
NM-400	-	-	5.78	5.78	-	6.61	2.50	6.61
NM-401	-	-	-	-	3.66	5.26	3.22	3.66
NM-402	-	6.95	0.695	6.95	0.402	-	0.310	0.402
NM-403	1.92	1.06	1.77	1.77	1.66	0.244	0.803	0.803

EC values: 3回の本試験の中央値、2回の本試験の高い方の値又は1回の本試験の値

抗原提示活性化能は、CD54 の発現閾値である EC200 値が小さいほど強いことが知られている。今回検討した 4 品の EC200 値は、0.40-6.61 $\mu\text{g/mL}$ の範囲となり、最小の NM-402 の 0.40 $\mu\text{g/mL}$ と最大の NM-400 の 6.61 $\mu\text{g/mL}$ で約 16 倍の差があった。また順位としては、NM-400>NM-401>NM-403>NM-402 となった。

D. 考察

今回検討した CNT 全てにおいて *in vitro* で抗原提示細胞を活性化することが示された。また、本研究ではこれまで酸化チタン、二酸化ケイ素および銀の NM の評価を行ってきたが、CNT の EC200 値は他の NM のそれより低く、このことは少なくとも *in vitro* において CNT の抗原提示活性化能は高いと考えられた。したがってそのメカニズムの解明と共に、*in vivo* における CNT による炎症誘導能を評価すべきと考えられた。なお最近、ヒト抗原提示細胞における CNT の受容体が Tim4 や Siglec-14 であることが見いだされ、こうした受容体による CNT の細胞内取り込みにより NLRP3 インフラマソームが活性化することが報告された(Kato et al., Nature Nanotechnology, 2023, DOI:10.1038/s41565-023-01363-w)。今後 CNT のこうした受容体を介した抗原提示活性化と生体における炎症誘導能に関する詳細な研究が必要と考えられる。

E. 結論

今回 h-CLAT 法を用いて各種 CNT の抗原提示活性化能を評価したところ、NM-400、NM-401、NM-402 及び NM-403 は、程度に違いはあるものの、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。今後物性と抗原提示活性化能の関連を解析するとともに、細胞レベルでの活性化メカニズムの解明や in vivo 吸入曝露試験における評価を行う予定である。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

該当なし

F.2 学会発表

1. 安部賀央里, 成田和人, 小林睦, 立花滋博, 村崎亘, 鈴木政晴, 頭金正博, 足利太可雄. 機械学習アプローチを用いた in silico モデルによるヘアカラー原料の皮膚感作性強度予測, 第 47 回日本化粧品学会 (2022.6.10, On line)
2. 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(NM)の in vitro 免疫毒性試験法の開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30, 札幌)
3. 村崎亘, 安部賀央里, 頭金正博, 山田隆志, 大野彰子, 足利太可雄. 機械学習アプローチによる皮膚感作性強度を予測する回帰モデルの開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30, 札幌)
4. 飯島一智, 鈴尾美穂, 三浦結美, 西田明日香, 大野彰子, 足利太可雄. 未分化および分化 THP-1 細胞を用いたナノマテリアルの免疫毒性評価, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
5. 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智, 広瀬明彦, 足利太可雄. THP-1 細胞への活性化に及ぼす二酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性因子, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2, 札幌)
6. 山本直樹, 平松範子, 加藤由布, 西川千恵子, 横井友香, 足利太可雄, 小島肇. 医薬品の生殖毒性試験代替法に有用なヒト由来 iPS 細胞レポーター細胞株の作製と評価に関する研究, 日本組織培養学会第 94 回大会 (2022.7.7, 豊中,大阪)
7. Ohno A, Nishida A, Iijima K, Hirose A, Ashikaga T: in silico elucidation of physicochemical properties factor on activation of THP-1 cells of TiO2 NP, 264th ACS National Meeting & Exposition (2022.8.22, Chicago)
8. 木下啓, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博. 皮膚感作性の in vitro 試験法である KeratinoSens™ の結果を予測する機械学習モデルの構築, 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022.8.26, 東京)
9. 足利太可雄, 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智. 皮膚感作性物質あるいは発熱性物質とナノシリカの混合曝露による THP-1 細胞の活性化に関する研究, 第 29 回日本免疫毒性学会学術年会 (2022.9.12, 札幌)
10. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智. ヒト気管支上皮細胞 /THP-1 細胞共培養系によるナノマテリアルの吸入毒性評価法の開発, 日本動物実験代替法学会 第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
11. 伊藤潤, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博. 化学構造情報からヒトの皮膚感作性を予測する機械学習モデルの開発,

日本動物実験代替法学会 第 35 回大会
(2022.11.19, 静岡)

12. 荒井りおん, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智. h-CLAT を用いたナノマテリアルのアジュバント効果の評価とメカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
13. 飯島一智, 鈴尾美穂, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄. THP-1 細胞を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能評価における 新規指標の探索, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
14. 木下啓, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博. 皮膚感作性評価における *in vitro* 試験法の効率化を目指した機械学習モデルの開発, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
15. 山城真輝, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智. THP-1 細胞を用いた二酸化セリウムおよび酸化亜鉛ナノ粒子の免疫毒性の評価, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
16. Reinke EN, Corsini E, Ono A, Fukuyama T, Ashikaga T, Gerberick GF. Peer Review Report of the EpiSensA Skin Sensitization Assay, SOT 62nd Annual Meeting (2023.3.21, Nashville, USA)
17. Ashikaga T, Ohno A, Nishida A, Iijima K. Development of toxicity evaluation method for nanomaterials using activation of THP-1 cell as an index, SOT 62nd Annual Meeting (2023.3.22, Nashville, USA)
18. 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智, 足利太可雄. 様々なナノマテリアルを用いた THP-1 細胞の活性化に伴う指標の有効

性評価, 日本薬学会 第 143 年会
(2023.3.27, 札幌)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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