

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 *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

本研究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、各種 NM の短期吸入曝露による毒性発現の AOP 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。まず、前年度までに確立した THP-1 細胞の CD86, CD54 発現を指標とする手法により、二酸化セリウムおよび酸化亜鉛の各種ナノ粒子を評価した。二酸化セリウムはいずれも THP-1 細胞の CD86, CD54 発現を亢進せず、酸化亜鉛は主に CD54 発現を亢進した。次に、リポ多糖とシリカナノ粒子の共曝露について評価を行った。同時共曝露において顕著な CD54 発現亢進がみられ、シリカナノ粒子がリポ多糖による抗原提示細胞活性化を増強したと考えられた。本手法が NM 単体だけでなく、他の化合物との共曝露にも適用できる可能性が示唆された。また、気管支上皮細胞より作製した気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系を構築し、生体での短期吸入曝露を模倣した評価系の開発を行った。気管支上皮モデルの上部よりシリカナノ粒子分散液を適用すると、下部の THP-1 細胞の CD54 発現の発現が上昇した。これは、シリカナノ粒子が気管支上皮モデルを透過し作用した、もしくは、シリカナノ粒子に曝された気管支上皮モデルが分泌したサイトカインにより THP-1 細胞が活性化した、と考えられる。メンブレンアッセイにより、関連するサイトカイン候補として、IL-8、GRO- $\alpha/\beta/\gamma$ 、IL-6 が同定された。以上より、気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系が NM 吸入曝露の *in vitro* モデルとしての可能性が示された。

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、前年度までに確立した THP-1 細胞の CD86, CD54 発現を指標とした手法を用いて、二酸化セリウムおよび酸化亜鉛の各種ナノ粒子を評価するとともに、リポ多糖とシリカナノ粒子の共曝露に

についても評価を行い、本手法の有用性を評価することを目的とした。また、気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系を用い、生体での短期吸入曝露を模倣した評価系の開発を目指した。

B. 研究方法

B.1. 各種 NM 分散液の調製と評価

シリカナノ粒子

シリカナノ粒子は NM-204 (JRC) および Sicastar-F (micromod 社) を用いた。NM-204 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超純水に懸濁し、プローブ型超音波装置 (VP-050N, タイテック株式会社) を用いて氷中で 40 W, 5 分の条件で 2 回処理した。これを培養液を用いて所定濃度に希釈した。

二酸化セリウムナノ粒子

二酸化セリウムナノ粒子は NM-211, NM-212 (以上 JRC) および S211575 (Sigma-Aldrich) を用いた。二酸化セリウムナノ粒子もシリカナノ粒子と同様に乾熱滅菌を行った。25 mg/ml の濃度になるように二酸化セリウムナノ粒子を超純水に懸濁し、プローブ型超音波装置を用いて氷中で 40 W, 5 分の条件で 2 回処理した。これを培養液を用いて所定濃度に希釈した。

酸化亜鉛ナノ粒子

酸化亜鉛ナノ粒子は NM-110, NM-111 (以上 JRC), S677450 および S544906 (以上 Sigma-Aldrich) を用いた。酸化亜鉛ナノ粒子もシリカナノ粒子と同様に乾熱滅菌を行った。25 mg/ml の濃度になるように酸化亜鉛ナノ粒子を超純水に懸濁し、プローブ型超音波装置を用いて氷中で 40 W, 5 分の条件で 2 回処理した。NM-111 はあらかじめ少量の 99.5%エタノールを添加したのち

超純水で 25 mg/ml に懸濁し、同様の超音波処理を行った。これを培養液を用いて所定濃度に希釈した。培養液で CV75 の濃度に希釈し 24 時間 37°C でインキュベーションした酸化亜鉛ナノ粒子分散液の亜鉛イオン濃度を ICP-AES により測定した。

B.2. NM 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 ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞懸濁液 500 μ l および各被験物質の分散液または溶液 500 μ l を添加し、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で 24 時間静置した。被験物質の曝露濃度は CV75 を基準とし、公比 2 で上下合計 8 濃度を設定した。曝露後の THP-1 細胞を 10% ウシ血清アルブミン (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 CD86 抗体、抗 CD54 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。フローサイトメーター (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer) 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、CD86 および CD54 の発現を培養液処理群 (control) に対する相対蛍光強度 (RFI) として求め、EC150 (CD86 発現が 150%を超える濃度), EC200 (CD54 発現が 200%を超える濃度) を算出した。FL-2 チャネルより細胞生存率を求め、CV75 を算出した。

B.3. ナノ粒子取り込み阻害剤の評価

ナノ粒子取り込み阻害剤として、Amiloride, Chlorpromazine, Colchicine, Cytochalasin D, Latrunculin A, および Nystatin を用いて評価した。各阻害剤を超

純水、PBS または DMSO で溶解し、培養液で所定濃度に希釈した。THP-1 細胞を 2.5×10^6 cells/ml に調製し、24 well プレートに阻害剤溶液 100 μ l と細胞懸濁液を 400 μ l ずつ播種して 37°C CO₂ インキュベータ内で 1 時間前培養した。阻害剤で前処理した THP-1 細胞に、500 μ g/ml に調製した Siacastar 溶液を 500 μ l 添加し、CO₂ インキュベータ内で 24 時間培養した。細胞を 1.5 ml チューブに移し、FB 1 ml で 2 回洗浄した。上清除去後、FB 500 μ l で再懸濁した。フローサイトメーターを用いて Siacastar に由来する平均蛍光強度 (MFI) を測定した。

B.4. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系の構築と NM の抗原提示細胞活性化能の評価

ヒト初代気管支上皮細胞を市販の分化誘導培地を用いてセルカルチャーインサート中で気-液界面培養を行い、気管支上皮モデルを作製した。作製した気管支上皮モデルは、光学顕微鏡による繊毛運動の確認、経上皮電気抵抗 (TEER) 測定、気管支上皮マーカー遺伝子発現、および標本の形態観察により評価した。ウェルプレートのウェ

ルに THP-1 細胞懸濁液を入れ、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た。セルカルチャーインサート上部より被検物質を添加し、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。

気管支上皮細胞から分泌されるサイトカインについてはメンブレンアッセイキット (Ray Bio® C-Series Human Cytokine Antibody Array C5) を用い、プロトコルに従い測定、解析を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

C.1. 各種 NM の評価

培養液中での各種 NM の一次径、流体力学的直径、多分散指数 (PDI) および ζ -ポテンシャルを表 1 に示す。一次径は、提供元から情報が提供されているものはその値を、提供されていないものは透過型電子顕微鏡または走査型電子顕微鏡を用いた観察により求めた値を示した。

表 1. 本研究で用いた二酸化セリウムナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子の物性値

Sample	Diameter (TEM, SEM)/ nm	Hydro-dynamic diameter(DLS) / nm	PDI / -	ζ -potential /mV
S211575	278 $\pm$ 106	388.3 $\pm$ 9.05	0.277 $\pm$ 0.01	-29.2 $\pm$ 2.07
CeO ₂ NM-211	10.1 $\pm$ 1.37	360.8 $\pm$ 3.44	0.257 $\pm$ 0.02	-17.8 $\pm$ 2.90
NM-212	19.1 $\pm$ 9.78	326.9 $\pm$ 5.68	0.209 $\pm$ 0.01	-22.5 $\pm$ 5.00
S677450	27.8 $\pm$ 23.1	611.6 $\pm$ 35.4	0.324 $\pm$ 0.02	-13.6 $\pm$ 3.34
S544906	104 $\pm$ 41.1	3567 $\pm$ 52.0	1.025 $\pm$ 0.02	2.41 $\pm$ 1.70
ZnO NM-110	133 $\pm$ 64.2 / 60.0 $\pm$ 17.5	626.4 $\pm$ 19.8	0.340 $\pm$ 0.01	-16.5 $\pm$ 0.57
NM-111	122 $\pm$ 60.2 / 49.0 $\pm$ 31.0	3454 $\pm$ 724	0.584 $\pm$ 0.09	N.D.

C.2. 各種 NM の抗原提示細胞活性化能の評価

各種 NM 曝露後の THP-1 細胞の EC150 (CD86 発現が 150%を超える濃度), EC200 (CD54 発現が 200%を超える濃度) および CV75 を表 2 に示す。

表 2. 各ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能

Sample	CV75/ $\mu\text{g ml}^{-1}$	EC150 (CD86)/ $\mu\text{g ml}^{-1}$	EC200 (CD54)/ $\mu\text{g ml}^{-1}$
S211575	-	-	-
CeO ₂ NM-211	-	-	-
NM-212	-	-	-
S677450	244	-	13.1
S544906	144	-	14.0
ZnO NM-110	79.3	-	13.3
NM-111	112	10.0	15.9

二酸化セリウムナノ粒子

S211575, NM-211, NM-212 いずれのナノ粒子においても CD86, CD54 の発現は基準値を上回らなかった。

酸化亜鉛ナノ粒子

S677450, S544906, NM-110, NM-111 いずれの酸化亜鉛ナノ粒子においても CD54 発現は基準値を超え、EC200 には大きな差を認めなかった。NM-111 のみ CD86 発現が基準値を上回った。

C.3. NM 取り込み阻害剤の評価と取り込み阻害の抗原提示細胞活性化への影響

FCM を用いた THP-1 細胞の蛍光標識シリカナノ粒子 (Sicastar) の取り込み量の評価より、Amiloride, Colchicine, Cytochalasin D および Latrunculin A が THP-1 細胞のシリカナノ粒子取り込み阻害能を有することがわかった。しかし、Colchicine および Cytochalasin D は阻害剤のみで THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現を亢進することがわかった。シリカナノ粒子による THP-1 細胞活性化に対する Amiloride 処理の効果を解析した (図 1)。Amiloride 処理によ

り、シリカナノ粒子 (Sicastar) による CD54 の発現亢進は顕著に抑制された。

C.4. リポ多糖とシリカナノ粒子の共曝露

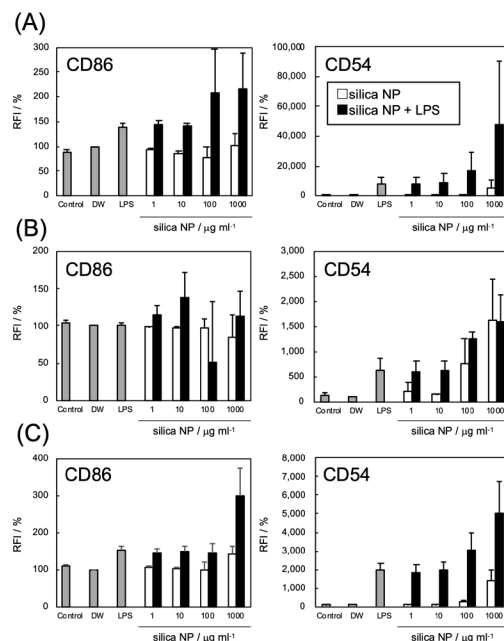


図2. シリカナノ粒子とLPSの共曝露によるTHP-1細胞活性化. (A) 同時共曝露, (B) 時差共曝露 (シリカナノ粒子>LPS), (C) 時差共曝露 (LPS>シリカナノ粒子)

リポ多糖 (LPS) とシリカナノ粒子をあらかじめ混合した上で THP-1 へ曝露する共曝露により、LPS およびシリカナノ粒子をそれぞれ単独で曝露した場合と比較して CD54 の発現が顕著に亢進した (図 2A)。一方、シリカナノ粒子を 24 時間曝露し洗浄後に LPS を曝露した場合 (図 2B)、または、LPS を 24 時間曝露し洗浄後にシリカナノ粒子を曝露した場合 (図 2C) ではそのような顕著な CD54 の発現亢進は見られなかった。

遺伝子発現解析では、同時共曝露において CD54 および CD86 遺伝子の発現亢進が確認された。その他、MMP-12, CCL-3 遺伝子の発現も同時共曝露において顕著に増加した。

C.5. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系の構築と NM の抗原提示細胞活性化能の評価

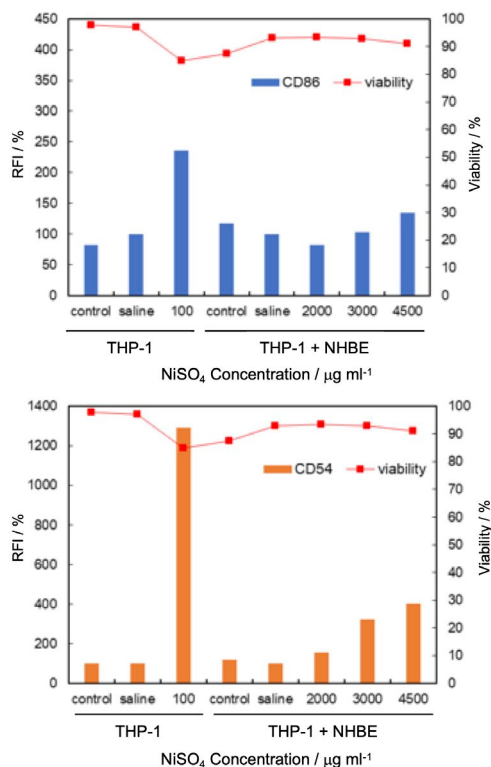


図3. 気管支上皮モデルとTHP-1細胞共培養への硫酸ニッケル水溶液曝露によるTHP-1細胞の活性化.

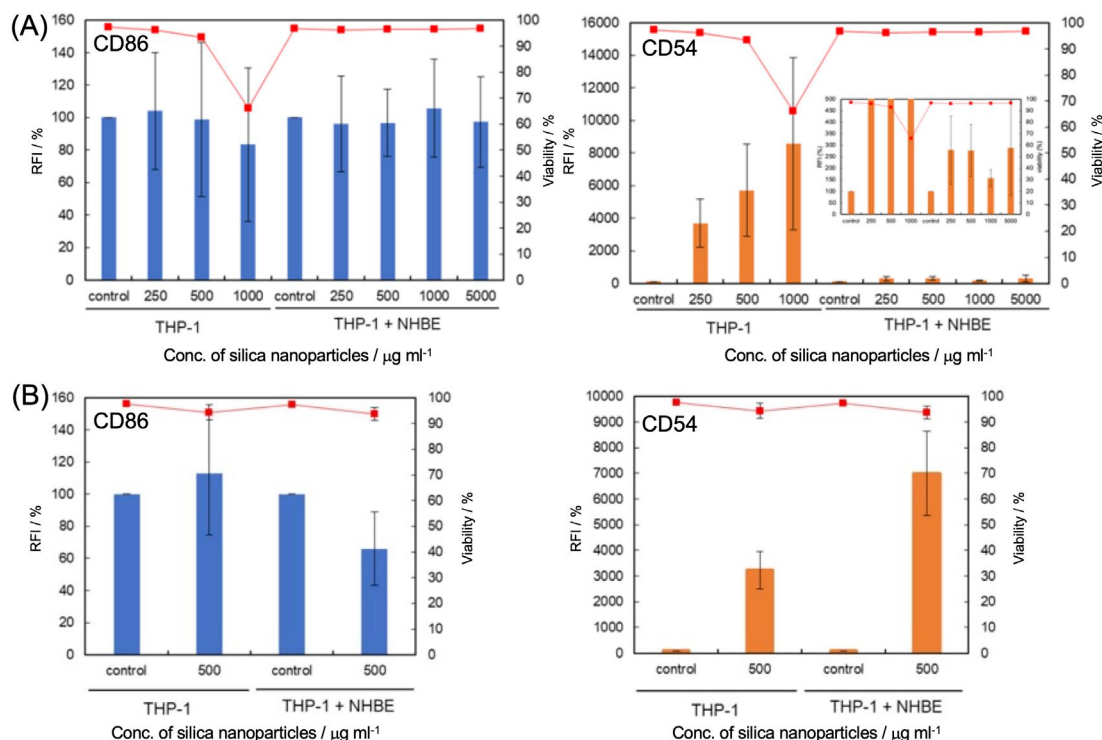


図4. 気管支上皮モデルとTHP-1細胞共培養へのシリカナノ粒子曝露によるTHP-1細胞の活性化. (A) 気管支上皮モデル上部より曝露, (B) 気管支上皮モデル下部より曝露

気-液界面培養後、繊毛運動がみられ、経上皮電気抵抗 (TEER) の上昇、気管支上皮マーカー遺伝子の発現亢進より、気管支上皮モデルの作製が確認された。まず、気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養における培養液について検討した。単培養と気管支上皮モデルとの共培養いずれにおいても、THP-1 細胞用培養液である RPMI-1640 を用いた場合には CD86, CD54 の発現や細胞生存率に差は見られず、気管支上皮細胞用培養液を用いた場合には CD54 の発現が顕著に上昇した。よって、気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養においては RPMI-1640 を用いることとした。

次に、h-CLAT において陽性対照として用いられる硫酸ニッケル水溶液を気管支上皮モデルの上部より曝露し、24 時間後に下部の THP-1 細胞の CD86, CD54 発現を測定した (図 3, n=1)。単培養と比較し、はるかに高い濃度において CD54 の発現亢進が見られた。

シリカナノ粒子分散液を気管支上皮モデルの上部および下部より曝露し、24 時間後

に下部の THP-1 細胞の CD86, CD54 発現を測定した (図 4)。気管支上皮モデルの上部からの曝露において、CD54 の発現亢進が見られた (図 4A)。気管支上皮モデルの下部からの曝露において、CD54 の発現亢進が見られ、単培養での発現よりも高かった (図 4B)。

メンブレンアッセイより、気管支上皮モデル培養後の培地に IL-8 が含まれること、シリカナノ粒子の曝露により培地中への GRO- $\alpha/\beta/\gamma$ および IL-6 の分泌が増加することがわかった。

D. 考察

D.1. 各種 NM の抗原提示細胞活性化能の評価

二酸化セリウムナノ粒子

二酸化セリウムナノ粒子はいずれも CD86, CD54 の発現を亢進しなかった。二酸化セリウムは ROS スカベンジャーとしての作用が報告されている。二酸化セリウムナノ粒子の結果は、その ROS スカベンジャー作用と対応している可能性が考えられた。

酸化亜鉛ナノ粒子

酸化亜鉛ナノ粒子はいずれも CD54 発現を亢進し、流体力学径による EC200 の大きな差異は見られなかった。また、7-15%が亜鉛イオンとして溶出していた。酸化亜鉛粒子は取り込まれず、溶出する亜鉛イオンにより活性化が引き起こされている可能性が考えられる。

D.2. シリカナノ粒子による抗原提示細胞活性化の機序について

Amiloride によりシリカナノ粒子の取り込みと CD54 の発現亢進が抑制されたことから、シリカナノ粒子が主にマクロピノサイトーシスにより THP-1 に取り込まれること、細胞内に取り込まれることが抗原提

示細胞の活性化に重要であることが示唆された。

D.3. リボ多糖とシリカナノ粒子の共曝露

LPS とシリカナノ粒子をあらかじめ混合した上で THP-1 へ曝露する共曝露により、CD54 の発現が顕著に亢進し、時差共曝露ではそのような作用は見られなかった。シリカナノ粒子表面へ LPS が吸着し、細胞膜受容体 TLR4 に多価効果を示す可能性、または、それぞれの経路で細胞に作用し、細胞内でシグナル伝達が増強される可能性、が考えられる。また、抗原提示細胞活性化能を指標とする本手法は、NM 単体だけでなく、他の化合物との共曝露にも適用できることがわかり、有用性が示された。

D.4. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系を用いた抗原提示細胞活性化能の評価

気管支上皮モデルの上部よりシリカナノ粒子分散液を適用すると、下部の THP-1 細胞の CD54 発現の発現が上昇した。これは、シリカナノ粒子が気管支上皮モデルを透過し作用した、もしくは、シリカナノ粒子に曝された気管支上皮モデルが分泌したサイトカインにより THP-1 細胞が活性化し、と考えられる。後者の気管支上皮モデルから THP-1 細胞へのシグナル伝達を担うサイトカインの候補として、メンブレンアッセイの結果より IL-8、GRO- $\alpha/\beta/\gamma$ 、IL-6 が同定された。

E. 結論

前年度までに進めてきた単球系細胞株 THP-1 細胞の CD54, CD86 を指標とした抗原提示細胞活性化能の評価法による NM の解析について、新たに二酸化セリウム、酸化

亜鉛を対象としてデータを得た。また、NM と LPS の同時共曝露により活性化が顕著に亢進することが明らかとなり、NM と他物質との共曝露の評価も可能であることが示唆された。気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養系を用いた、吸入曝露を模した評価法を開発し、気管支モデル上部（体外側）より曝露された NM によりモデル下部（体内側）の抗原提示細胞が活性化することを示し、吸入曝露の in vitro モデルとしての可能性が示された。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

該当なし

F.2 学会発表

1. 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(2022.6.30～7.2)
2. 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(2022.11.18-20)
3. 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(2022.11.18-20)
4. 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(2022.11.18-20)
5. 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(2022.11.18-20)

6. Iijima K, Nishida A, Ohno A, Ashikaga T: Construction of co-culture system of human bronchial epithelial cells and immune cells for evaluation of inhalation toxicity potential of nanomaterials, 第32回日本MRS年次大会 (2022.12.5-7)

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