

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究

令和5年度 分担研究報告書

In vitro評価系に関する研究

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

ナノマテリアル (NM) の短期吸入曝露による免疫毒性評価手法の開発を目指し、これまで NM 曝露後の THP-1 細胞の活性化を指標とした評価法および気管支上皮細胞と THP-1 細胞の共培養系の確立に取り組んできた。本研究では、THP-1 細胞の活性化を指標とした NM の免疫毒性評価について、新たな評価指標の探索および気管支上皮モデルとの共培養系を含めた条件最適化を行った。遺伝子発現解析より、すでに NM 曝露により発現が亢進することを示した *CD54*, *CD86*, *MMP-12* に加え、*IL-1b*, *CCL-3* の各遺伝子発現がシリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子曝露により亢進することを見出し、新たな評価指標としての可能性が示された。気管支上皮モデルと THP-1 細胞との共培養系では、気管支モデル上部からの NM 曝露では THP-1 細胞の *CD54* 発現に大きな変化は見られなかった。一方、モデル下部から曝露した際には単培養よりも高い *CD54* 発現が見られ、気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養系の有用性が部分的に示された。THP-1 細胞の活性化を指標とした手法、さらにそれを気管支上皮モデルと組み合わせた共培養系は NM の短期吸入曝露による免疫毒性評価手法として期待される。

### A. 研究目的

様々な産業において利用が拡大するナノマテリアル (NM) について、吸入曝露による健康影響に対する懸念が高まっている。従来の *in vivo* 吸入曝露試験のみでは NM の毒性評価を十分に行うことができず、NM は粒子径や結晶多形、表面状態などバリエーションが豊かであり、特性も大きく異なる。このような背景より、NM の毒性発現機序に基づいた *in vitro* 試験法の開発が強く求められている。

我々はこれまでに種々の NM が THP-1 細胞の *CD54* 発現を顕著に亢進させ、その度合いが NM の種類により異なることを見出した。また気管支上皮細胞と THP-1 細胞の共培養系も確立した。

本研究では、THP-1 細胞の活性化を指標とした NM の免疫毒性評価について、新たな評価指標の探索と気管支上皮モデルとの共培養系を含めた条件最適化を行い、短期吸入曝露された NM の免疫毒性評価手法の開発と将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的データの収集を目的とした。また、表面処理の異なる酸化亜鉛 NM を用い、物性と活性化能の関係の解明を進めた。

### B. 研究方法

B.1. 各種ナノマテリアル分散液の調製と評価

シリカナノ粒子は Sicastar-F (micromod 社) を用い、培養液を用いて所定濃度に希釈し

た。酸化亜鉛ナノ粒子は NM-110, NM-111 (以上 JRC), S677450, S544906 (以上 Sigma-Aldrich), MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP (以上テイカ) を用いた。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水中で 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。さらに培養液を用いて所定濃度に希釈した。

MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP について、培養液中 (31.6  $\mu\text{g/mL}$ ) での流体力学的直径および $\zeta$ -potential を ELS-Z2 (大塚電子)、溶出イオン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES, ICPE-9000, 島津製作所) によりそれぞれ測定した。

## B.2. 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  $2.0 \times 10^6$  cells/mL ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞懸濁液 500  $\mu\text{L}$  および各被験物質の分散液または溶液 500  $\mu\text{L}$  を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 内で 24 時間静置した。洗浄後、フローサイトメーター (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer) を用いて THP-1 細胞の CD54 および CD86 発現量を培養液処理群 (control) に対する相対蛍光強度 (RFI) として求め、EC200 (CD54 発現が 200%を超える濃度) を算出した。あわせて細胞生存率を求め、CV75 を算出した。

## B.3. 遺伝子発現に基づく NM の抗原提示細胞活性化能の評価

B.2.と同様に THP-1 細胞に対しナノマテリアルを曝露し、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて、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、CD54, CD86, IL-1 $\beta$ , MMP-12, CCL-3, CCL-5, GAPDH の各遺伝子の発現を解析し、GAPDH を対照とする $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により遺伝子発現量を定量した。曝露濃度はシリカナノ粒子では 100  $\mu\text{g/mL}$ 、酸化亜鉛ナノ粒子では 31.6  $\mu\text{g/mL}$  とした。

## B.4. 亜鉛の細胞内取り込みの定量

24 ウェルプレートの各ウェルに  $2 \times 10^6$  cells/ml THP-1 細胞分散液 500  $\mu\text{L}$  および同量の酸化亜鉛ナノ粒子分散液もしくは硝酸亜鉛溶液を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。上清を捨て、PBS で 3 回洗浄した。硝酸にて 30 分間処理したのち、氷上で 1 分間冷却した。それを超純水で希釈し、ICP-AES 測定を行い、亜鉛濃度を定量した。曝露濃度は NM-110, NM-111S677450, S544906 および亜鉛イオンはそれぞれの CV75 である 79.3, 112, 243, 144, 133  $\mu\text{g/ml}$ 、MZ-500 および MZ-500HP は 31.6  $\mu\text{g/ml}$  とした。

## B.5. NM 曝露により生じる細胞内活性酸素種 (ROS) の定量

$2 \times 10^6$  cells/mL THP-1 細胞分散液に終濃度 10  $\mu\text{M}$  CM-H2DCFDA を処理し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 内で 1 時間静置した。遠心し、上清を培地に交換した後、24 ウェルプレートの各ウェルに  $2.0 \times 10^6$  cells/mL ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞懸濁液 500  $\mu\text{L}$  および各被験物質の分散液または培地 500  $\mu\text{L}$  を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 内で 24 時間静置した。洗浄後、フローサイトメーターを用いて平均蛍光強度を測定した。曝露濃度は Sicastar

は 31.6, 100, 316, 1000  $\mu\text{g/mL}$ 、MZ-500 およ  
び MZ-500HP は 100  $\mu\text{g/mL}$  とした。

### B.6. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系の構築とナノマテリアル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および経上皮電気抵抗 (TEER) 測定により評価した。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または下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 の発現量を定量した。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C. 研究結果

### C.1 酸化亜鉛ナノ粒子分散液の評価

酸化亜鉛ナノ粒子 MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP の培養液中での流体力学的直径と $\zeta$ -potential は、それぞれ  $481.8 \pm 55.61 \text{ nm}$ 、 $598.4 \pm 17.12 \text{ nm}$ 、 $-19.89 \pm 2.76 \text{ mV}$ 、 $-12.96 \pm 1.37 \text{ mV}$  であった。

### C.2. 硝酸亜鉛の抗原提示細胞活性化能の評価

図 1 に硝酸亜鉛水溶液曝露後の THP-1 細胞の CD54 および CD86 発現を示す。濃度に依存した顕著な CD54 発現の増加が見られ、EC200 は  $19.2 \mu\text{g/mL}$  (亜鉛イオン換算) と算定された。CV75 は  $133 \mu\text{g/mL}$  (亜鉛イオン換算) であった。

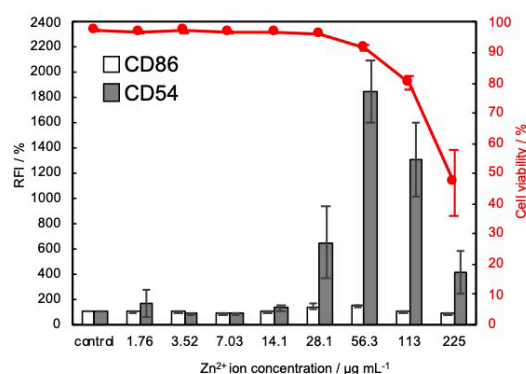


図 1 亜鉛イオン曝露 THP-1 細胞における CD86, CD54 発現.

各種酸化亜鉛ナノ粒子およびシリカナノ粒子曝露による抗原提示細胞活性化に対するマクロピノサイトーシス阻害剤 Amiloride の影響について検討を行なった。Amiloride 処理により酸化亜鉛ナノ粒子やシリカナノ粒子による CD54 の発現亢進が抑制される傾向が見られたものの、試行間差が大きかった。引き続き、検討を続ける。

### C.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

シリカナノ粒子曝露 THP-1 細胞において、未処理のものと比較して CD54、CD86、*IL-1b*、*MMP-12*、*CCL-3* の各遺伝子の発現が亢進する傾向が見られた (図 2)。酸化亜鉛ナノ粒子の暴露では、未被覆 MZ-500, 被覆 MZ-500HP どちらも、CD54、*IL-1b*、*CCL-3* の各遺伝子の発現亢進が見られたが、その発現パターンは被覆の有無によって異なっていた (図 3)。

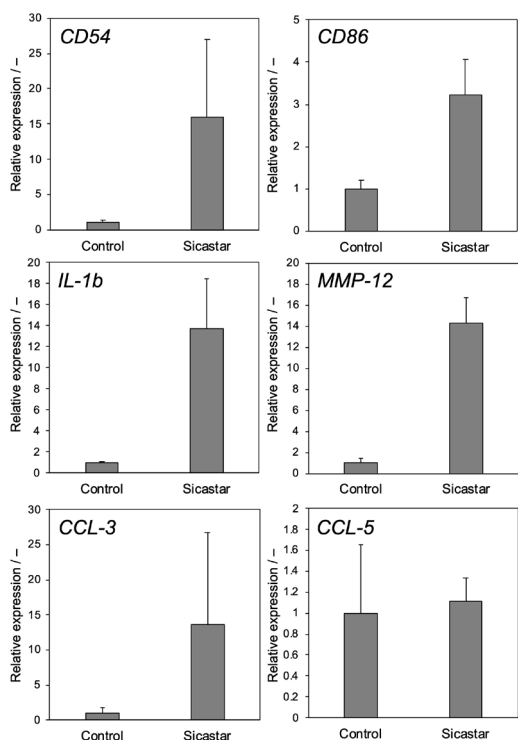


図2 シリカナノ粒子曝露 THP-1 細胞における各種遺伝子発現. 曝露濃度: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

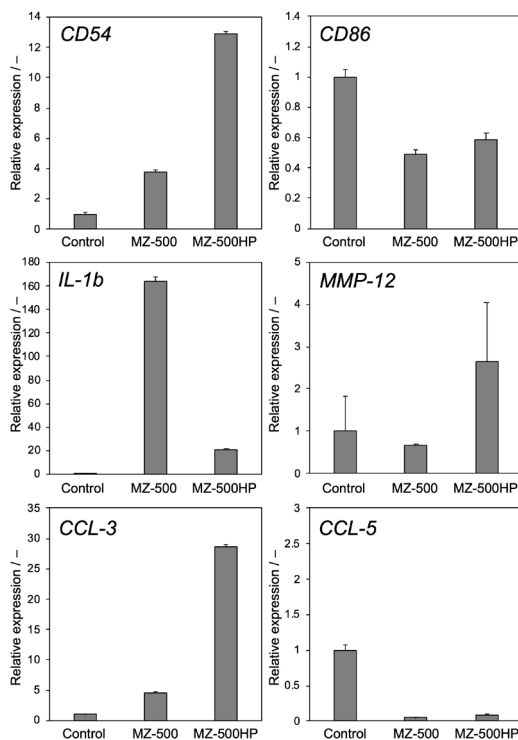


図3 酸化亜鉛粒子曝露 THP-1 細胞における各種遺伝子発現. 曝露濃度: 31.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### C.4. 亜鉛の細胞内取り込みの定量

酸化亜鉛ナノ粒子分散液および硝酸亜鉛水溶液に 24 時間曝露後の細胞内の亜鉛量を ICP-AES により定量した (図 4)。各試料の CV75 の濃度で曝露した NM-110, NM-111S677450, S544906 および亜鉛イオンの比較より、酸化亜鉛ナノ粒子曝露による亜鉛の細胞内取り込み量は亜鉛イオンと比較して非常に多いことがわかった。一方、同一濃度で曝露した MZ-500 と MZ-500HP との比較より、シリカにより被覆された MZ-500HP 曝露時の細胞内亜鉛取り込み量は顕著に少ないことが示された。

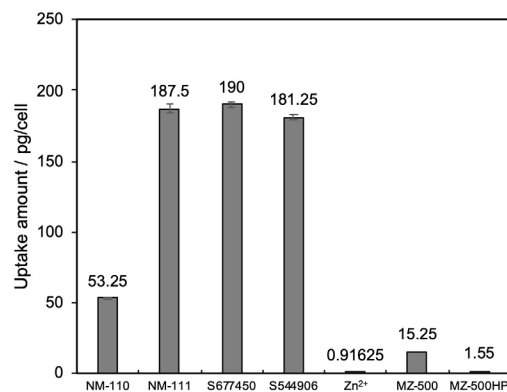


図4 ICP-AES により測定した THP-1 細胞への亜鉛取り込み量.

#### C.5. ナノ粒子曝露により生じる細胞内活性酸素種 (ROS) の定量

シリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子曝露後の細胞内 ROS について、蛍光プローブ CM-H2DCFDA を用いて定量した。シリカナノ粒子曝露では 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において蛍光強度の増大が見られ、細胞内 ROS の増加が示された。一方、酸化亜鉛ナノ粒子では、MZ-500 においてのみ蛍光強度の増大が見られ、シリカ被覆 MZ-500HP では蛍光強度の増大は見られなかった。

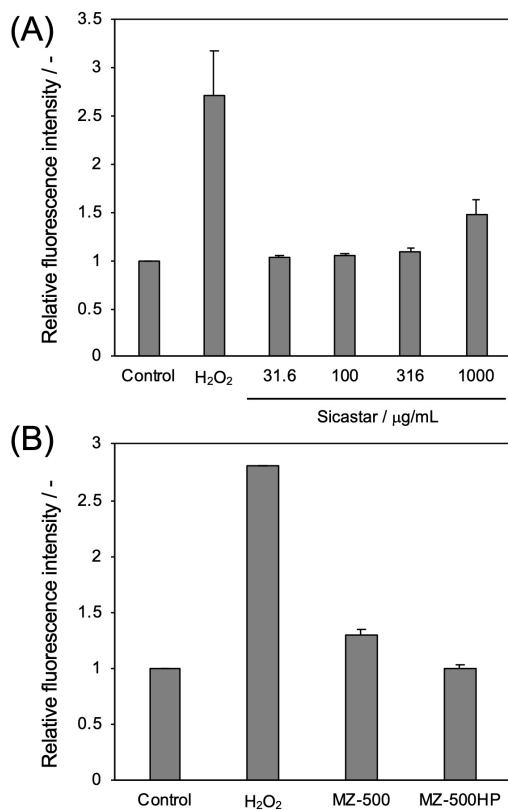


図 5 シリカナノ粒子 (A) および酸化亜鉛ナノ粒子 (B) 曝露 THP-1 細胞における細胞内 ROS の定量. 酸化亜鉛ナノ粒子曝露濃度: 100 µg/mL. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露濃度: 226 µM.

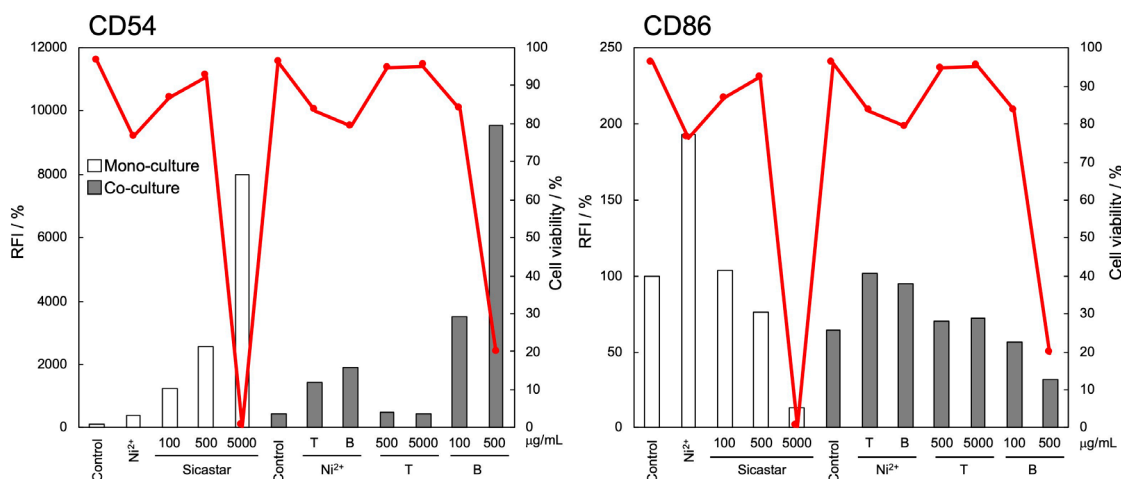


図 6 気管支上皮モデル/THP-1 共培養系へのシリカナノ粒子曝露による THP-1 細胞における CD54, CD86 発現. T: インサート上部より曝露, B: インサート下部より曝露. Ni<sup>2+</sup>: NiSO<sub>4</sub>, 4500 µg/mL (T), 50 µg/mL (B および単培養).

## C.6 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系の構築とナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

光学顕微鏡により繊毛運動が観察され、TEER 値の増大より、気管支上皮モデルの作製を確認した。THP-1 細胞懸濁液が入ったウェルに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、セルカルチャーインサート上部 (T) または下部 (B) より被検物質を添加し、24 時間培養後、THP-1 細胞の CD54 および CD86 タンパクの発現を定量した。気管支上皮モデルとの共培養のみによって THP-1 細胞の CD54 発現が亢進した (図 6, 7)。硫酸ニッケルでは気管支上皮モデル上部および下部いずれからの曝露においても CD54 の発現の亢進が見られた。シリカナノ粒子 (図 6) および酸化亜鉛ナノ粒子 (図 7) では、気管支上皮モデルの下部から曝露した場合のみ CD54 の発現亢進が見られた。

## D. 考察

### D.1 酸化亜鉛ナノ粒子による抗原提示細胞活性化メカニズムについて

硝酸亜鉛を用いた亜鉛イオンによる抗原

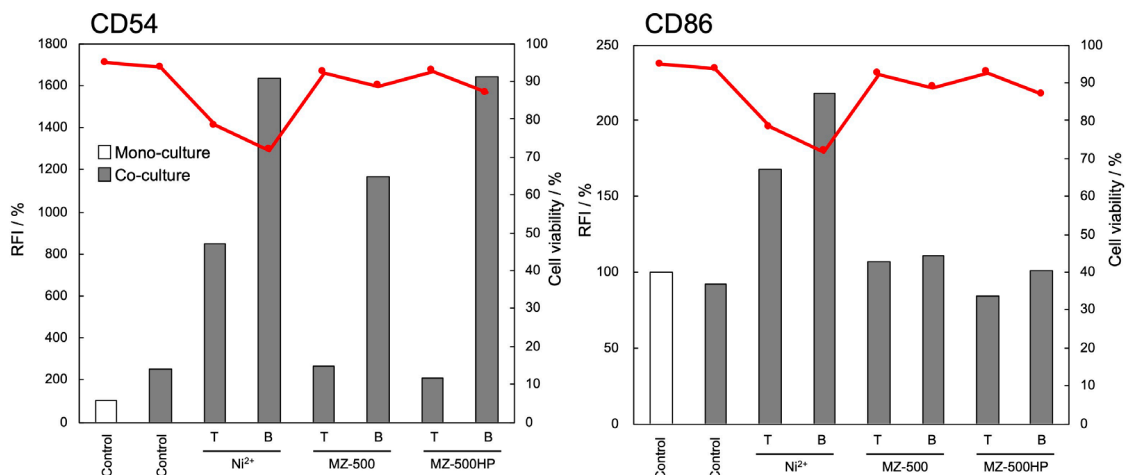


図 7 気管支上皮モデル/THP-1 共培養系への酸化亜鉛粒子曝露による THP-1 細胞における CD54, CD86 発現. T: インサート上部より曝露, B: インサート下部より曝露. Ni<sup>2+</sup>: NiSO<sub>4</sub>, 4500 μg/mL (T), 100 μg/mL (B). MZ-500 および MZ-500HP: 2000 μg/mL (T), 31.6 μg/mL (B).

提示細胞活性化の評価において、亜鉛イオンの EC200 は 19.2 μg/ml (亜鉛イオン換算) と算定された。CV75 は 133 mg/ml (亜鉛イオン換算) であった。以前の検討より、NM-110, NM-111, S677450, S544906 の各酸化亜鉛ナノ粒子を培地中に CV75 の濃度にて分散させた際の、24 時間後の溶出亜鉛イオン濃度はそれぞれ 0.977, 1.13, 1.45, 1.05 μg/ml であった。これより、酸化亜鉛ナノ粒子による THP-1 細胞の活性化には、細胞外で溶出した亜鉛イオンだけでなく、粒子としての作用が関与していることが示唆された。また、ICP-AES を用いた細胞内に取り込まれた亜鉛の定量より、酸化亜鉛ナノ粒子の曝露により細胞内に取り込まれていること、その取り込み量は亜鉛イオンと比較して非常に多いことがわかった。今後、取り込み阻害剤を用いた実験とともに、検討を進める。また、酸化亜鉛ナノ粒子はシリカによる被覆により、培地中における流体力学的直径はわずかに増加し、ζ-potential は中性に近づいた。培地中に同一濃度 (31.6 μg/ml) にて

分散させた際の、24 時間後の溶出亜鉛イオン濃度はそれぞれ 1.02, 0.875 μg/ml であり、シリカ被覆により亜鉛イオンの溶出は抑制されていた。細胞内取り込み量はシリカにより被覆された MZ-500HP において顕著に低かった。シリカ被覆による細胞内取り込みの減少のほか、シリカ被覆による硝酸での溶解が阻害された可能性もあるため、抽出条件の検討を今後行い、確認する。

#### 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

すでにナノマテリアル曝露により発現が亢進することを示した *CD54*, *CD86*, *MMP-12* に加え、*IL-1b*, *CCL-3* の各遺伝子もシリカナノ粒子曝露によりその発現が亢進し、新たな評価指標としての可能性が示された。酸化亜鉛ナノ粒子 MZ-500 とシリカ被覆酸化亜鉛ナノ粒子 MZ-500HP とで発現パターンは異なっており、複数遺伝子の発現に基づく分類の可能性なども考えられる。今後、多種の NM 曝露による遺伝子発現を解析し、

比較を行う。

### D.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

シリカナノ粒子および未被覆酸化亜鉛ナノ粒子曝露による THP-1 細胞活性化において細胞内 ROS が増加していることが示された。細胞内 ROS の増加は NLRP3 インフラマソームを活性化することが知られており、NM による THP-1 細胞は NLRP3 インフラマソームを介する可能性が示唆された。

### D.4. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系の構築とナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

共培養系でのシリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子いずれにおいても、気管支上皮モデル上部からの曝露では THP-1 細胞の CD54 の発現亢進は見られなかった。イオン化する硫酸ニッケルでは気管支上皮モデル上部からの曝露においても CD54 の発現が増加しており、イオンとナノ粒子の気管支上皮モデルの透過能が異なることが示唆された。今後、曝露条件（曝露経路、曝露濃度、曝露時間、測定指標など）について、検討を進める。

一方、シリカナノ粒子の気管支モデル下部からの曝露では、単培養 THP-1 への曝露と比べてより高い CD54 発現が見られ（図 6）、シリカナノ粒子による直接的な THP-1 細胞の活性化に加えて、気管支モデルを介した THP-1 細胞の刺激が示唆された。シリカナノ粒子が気管支モデルの下部側の基底細胞などに作用し、産生されたサイトカインが THP-1 の CD54 の発現を増加させている可能性が考えられる。

## E. 結論

シリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子を用い、NM による THP-1 細胞の活性化のメカニズムを部分的に明らかにした。また、以前に NM 曝露により発現が亢進することを示した *CD54*, *CD86*, *MMP-12* に加え、*IL-1b*, *CCL-3* の各遺伝子もシリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子曝露により発現が亢進していることを見出し、新たな評価指標としての可能性が示された。気管支上皮モデルとの共培養では、特にモデル下部から曝露した際に単培養よりも強い CD54 発現亢進が見られ、共培養系を用いることの有用性が部分的に示された。THP-1 細胞の活性化を指標とした手法、さらにそれを気管支上皮モデルと組み合わせた共培養系は NM の短期吸入曝露による免疫毒性評価手法として期待される。

## F. 研究発表

### F.1. 論文発表

該当なし

### F.2 学会発表

1. 荒井りおん, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: THP-1 細胞を用いたシリカナノ粒子とリポ多糖共曝露による抗原提示細胞活性化能の評価, 第 50 回日本毒性学会学術年 (2023.6.21, 横浜)
2. 飯島一智, 西田明日香, 高橋遥, 中浜美月, 荒井りおん, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄: 気管支モデル/単球系細胞株共培養系を用いたナノマテリアル吸入毒性評価と細胞間相互作用の解析, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21, 横浜)
3. 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 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の評価法の開発

とその活性化メカニズムの解析, 第 30 回  
日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11, 川  
崎)

4. 荒井りおん, 西田明日香, 高橋遥, 中浜  
美月, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智:  
気管支上皮モデルと THP-1 細胞を組み合  
わせたナノマテリアルの吸入毒性評価法  
の開発に向けた気管支上皮分泌サイトカ  
インの解析, 第 30 回日本免疫毒性学会学  
術年会 (2023.9.11, 川崎)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他