

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6年度 分担研究報告書

In vitro評価系に関する研究

—ナノマテリアルのin vitro抗原提示細胞活性化試験法の開発に関する研究—

研究分担者 飯島一智

横浜国立大学大学院工学研究院

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 曝露後の単球系細胞株 THP-1 細胞の活性化を指標とした評価法の開発と THP-1 細胞と気管支上皮細胞との共培養系の確立に取り組んできた。本研究では、NM による THP-1 細胞活性化のメカニズムの解析および気管支上皮モデルとの共培養系における条件最適化を行った。シリカナノ粒子による THP-1 細胞の活性化において、シリカナノ粒子へ亜鉛イオンをあらかじめ吸着させた場合、処理した亜鉛イオン溶液の濃度依存的に活性化の指標である CD54 の発現が増加した。NM による免疫細胞活性化は、NM 自体の持つ活性化能に加え、吸着物質による影響を受けうる可能性が示唆された。気管支上皮モデルと THP-1 細胞との共培養系では、気管支モデル上部よりシリカナノ粒子曝露した 72 時間後において THP-1 細胞の CD54 の発現増加傾向がみられた。NM の気管支上皮モデルへの取り込み、透過を考慮すると、単培養の THP-1 細胞での曝露時間（24 時間）より長い曝露時間が必要であったと考えられる。また、シリカナノ粒子の種類により気管支上皮モデル下部の THP-1 細胞の活性化が異なっていた。THP-1 細胞の活性化を指標とした手法、さらに気管支上皮モデルと THP-1 の共培養系は 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

ナノマテリアル（NM）の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 の毒性評価は十分ではなく、さらに 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とが知られている。このような背景より、NM の毒性発現機序に基づいたハイスループットな 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

の主に CD54 発現を顕著に亢進し、その度合いが NM の種類により異なることを見出している。また、生体における NM 吸入曝露環境を模倣した呼吸器 THP-1 細胞気管支上皮細胞との共培養系の確立にも取り組んできた。

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、シリカナノ粒子と酸化亜鉛ナノ粒子を用いて、THP-細胞と気管支上皮モデルとの共培養系における条件最適化と機序解析を行い、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進めた。

B. 研究方法

B.1. 各種 NM 分散液の調製と評価

シリカナノ粒子は Sicastar-red F (micromod), NM-201, NM-202 (以上 JRC) を用いた。分散液として市販されている Sicastar-red F は培養液を用いて所定濃度に希釈した。NM-201, NM-202 は 5 mg/mL の濃度になるように培養液に懸濁し、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 1 回処理した。酸化亜鉛ナノ粒子は MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP、MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出が抑制された MZN-B0HP (以上テイカ) を用いた。1 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。MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出を抑制した MZN-B0HP については超純水 (1000 µg/mL) での流体力学的直径およびζ-potential を ELS-Z2 (大塚電子) により測定した。

B.2. NM の抗原提示細胞活性化能の評価

2.0×10^6 cells/mL ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞懸濁液 500 µL を分注した 24 ウェルプレートの各ウェルへ各 NM 分散液または対照物質の溶液 500 µL を添加し、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で 24 時間培養した。細胞を洗浄後、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 CD86 および CD54 発現量を培養液処理群 (control) に対する相対蛍光強度 (RFI) として定量するとともに、ヨウ化プロピジウム PI 染色より細胞生存率を求めた。

B.3. イオン吸着シリカナノ粒子の調製と

の抗原提示細胞活性化能の評価

シリカナノ粒子 Sicastar-red F を所定濃度の硝酸亜鉛水溶液および塩化カルシウム水溶液にて 24 時間処理した後、超純水にて 3 回洗浄した。処理済み Sicastar-red F を再分散させ、B.2. の手法により THP-1 細胞の活性化能を評価した。Sicastar-red F への各イオンの吸着量は、処理後の溶液および洗液の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) により測定し、算出した。

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

市販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内で気-液界面培養を行い、気管支上皮モデルを構築した。気管支上皮モデルは、光学顕微鏡による繊毛運動の観察および経上皮電気抵抗 (TEER) 測定により評価した。THP-1 細胞懸濁液を分注した 24 ウェルプレートの各ウェルに、気管支上皮モデルを設置し、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、所定時間培養した。

培養後、THP-1 細胞については B.2.3 の手法にて CD86 および CD54 の発現量および細胞生存率を測定した。気管支上皮モデルについては RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて cDNA を合成し、THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて、リアルタイム PCR により、各遺伝子の発現を解析した。

C. 研究結果

C.1. 各種 NM 分散液の評価

MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出を抑

制した MZN-B0HP の超純水中での流体力学的直径および ζ -potential は、それぞれ 483.8 ± 26.68 nm、 707.4 ± 49.14 nm、 -26.52 ± 1.09 mV、 -46.45 ± 3.80 mV であった。

C.2. イオン吸着シリカナノ粒子の調製と抗原提示細胞活性化能の評価

亜鉛イオンおよびカルシウムイオンを吸着させた Sicastar-red F を調製し、THP-1 細胞の活性化能の評価を行なった。亜鉛イオンをあらかじめ吸着させた場合、処理した亜鉛イオン溶液の濃度依存的に CD54 の発現が増加した (図 C.1 (A).)。一方、カルシウムイオンをあらかじめ吸着させた場合は、今回設定した条件で最も高濃度の 250 mg/ml においてのみ CD54 発現の増加がみられた (図 C.2.1 (B).)。

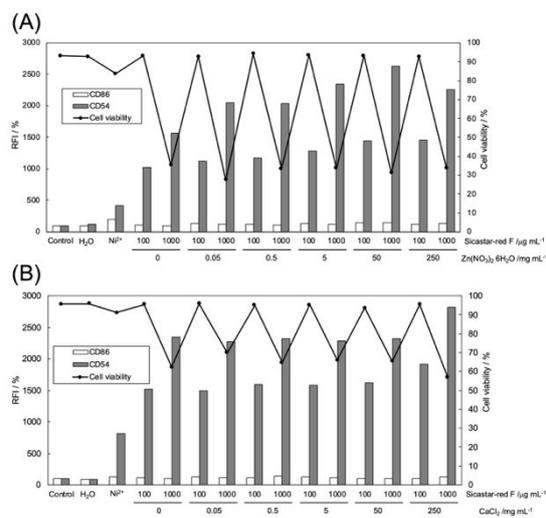


図 C.1. イオン吸着シリカナノ粒子による THP-1 細胞の活性化. (A)亜鉛イオン, (B)カルシウムイオン

C.3. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系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

まず、シリカナノ粒子 Sicastar-red F を用いて、曝露時間の検討を行なった。気管支

上皮モデル上部よりシリカナノ粒子 Sicastar-red F 分散液を曝露し、24, 48, 72 時間後に THP-1 細胞の活性化能を評価した (図 C.2 (A).)。72 時間後において、Sicastar-red F 曝露により CD54 の発現が亢進する傾向がみられた。一方、72 時間曝露での粒子間の比較では (図 C.2 (B).)、NM-201, NM202 の曝露は CD54 の発現を亢進しなかった。気管支モデルの遺伝子発現解析において、モデル上部からの Sicastar-red F 分散液曝露により *CXCL-3*, *CCL-20* 遺伝子の発現亢進傾向がみられた。下部からの曝露では、*CXCL-3*, *CCL-20* に加えて *CXCL-1*, *CXCL-2* 遺伝子の発現亢進傾向もみられた。

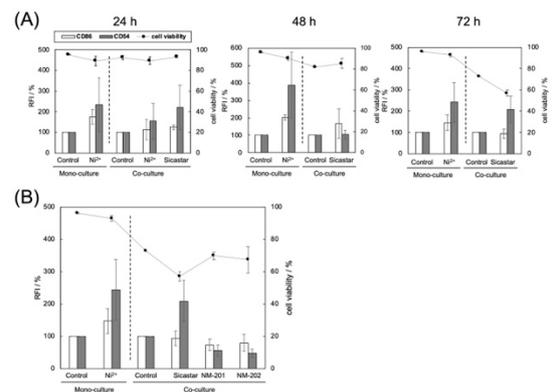


図 C.2. 気管支上皮モデル-THP-1 細胞共培養系を用いたシリカナノ粒子の評価. (A)曝露時間の検討, (B)シリカナノ粒子間の比較.

また、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 の評価を行なった (図 C.2.3)。24 時間後において CD86 および CD54 の発現亢進はみられなかった。72 時間後では、MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP いずれにおいても細胞生存率の大幅な低下が見られ、CD86 および CD54 の発現量を定量することはできなかった。一方、MZ-500 およ

びMZ-500HPの流体力学的直径より小さなポアを有するセルカルチャーインサートを用いた場合は、72時間においても細胞生存率の大幅な低下は見られなかった。気管支モデルの遺伝子発現解析において、モデル上部からのMZ-500およびMZ-500HP分散液の曝露により*IL-6*、*CXCL-3*、*CXCL-12*、*CCL-22*など各遺伝子の発現亢進傾向がみられた。

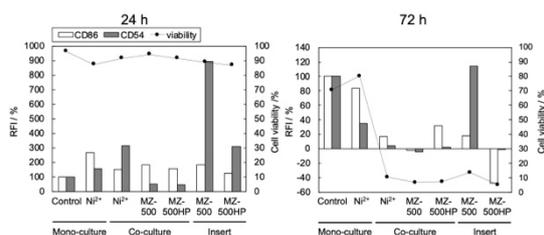


図 C.3. 気管支上皮モデル-THP-1 細胞共培養系を用いた酸化亜鉛ナノ粒子の評価。

D. 考察

D.2.2. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系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

亜鉛イオンを吸着させた Sicastar-red F において、CD54 の発現が増加した。我々はこれまでに亜鉛イオン曝露が THP-1 細胞の CD54 発現を亢進することを見出している。シリカナノ粒子表面に主に静電相互作用により吸着した亜鉛イオンがシリカナノ粒子とともに THP-1 細胞に取り込まれ、後期エンドソーム〜リソソームにおける pH の低下により粒子表面より脱離し、THP-1 細胞を活性化したと考えられる。シリカナノ粒子による THP-1 細胞の活性化は、シリカナノ粒子自体の持つ活性化能に加え、その高い物質吸着性による吸着物質によっても引き起こされている可能性が示唆された。今後、細胞内の環境を模倣した溶液中でのシリカナノ粒子からのイオ

ンの乖離挙動の評価を進める。

D.2.3. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系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

シリカナノ粒子 Sicastar-red F を用いた曝露時間の検討により、72 時間が適している可能性が示された。これまで、気管支モデル-THP-1 細胞共培養系における曝露時間は THP-1 細胞に直接 NM を作用させる際と同じ 24 時間としていたが、NM の気管支上皮モデルへの取り込み、透過を考慮すると、より長い曝露時間が必要であったと考えられる。興味深いことに、シリカナノ粒子の種類により気管支上皮モデル下部の THP-1 細胞の活性化が異なっていた。気管支モデルの透過挙動や曝露された気管支モデルの分泌するサイトカインの種類や量が異なっている可能性が考えられる。気管支モデルの遺伝子発現解析やサイトカインアッセイにより共培養系での THP-1 細胞の活性化メカニズムの解析を引き続き行う。

酸化亜鉛ナノ粒子を対象とした試験では、24 時間後において CD86 および CD54 の発現亢進はみられず、72 時間後では細胞生存率の大幅な低下がみられた。シリカナノ粒子で得られた知見と同様に、共培養系への NM の曝露では 24 時間の曝露時間は不十分であることが示唆された。酸化亜鉛ナノ粒子の流体力学的直径より小さな径 0.4 μm のポアを有するセルカルチャーインサートを用いた場合には細胞生存率の大幅な低下は見られなかったことから、72 時間後における細胞生存率の大幅な低下は亜鉛イオンによる作用ではなく、気管支上皮モデルを透過した酸化亜鉛粒子による作用であることが考えられた。単培養 THP-1 細胞を用いた評価においても、酸化亜鉛ナノ粒子は狭い濃度域において CD54

の発現亢進および細胞生存率の低下がみられており、共培養系を用いた THP-1 細胞活性化能の評価においても試験濃度をいかに設定するかが重要であることが示唆された。

E. 結論

シリカナノ粒子による THP-1 細胞の活性化はシリカナノ粒子自体に加え、表面に吸着するイオンも関与している可能性が示唆された。NM による抗原提示細胞活性化の評価法の確立、その活性化メカニズムの解明のいずれにおいても表面吸着分子を考慮することが重要である。

気管支モデル-THP-1 細胞共培養系を用いた評価においては、曝露時間の検討を行い、その他のシリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子を対象とした評価を行った。曝露する NM により下部の THP-1 細胞の活性化挙動や気管支上皮モデルにおいて変化するサイトカイン遺伝子が異なっており、NM による抗原提示細胞活性化能を評価できる可能性が示された。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Nishida A, Sawada Y, Arai R, Ishibashi N, Suzuo M, Ohno A, Ashikaga T, Iijima K, Evaluation of the immunotoxicity potential of nanomaterials using THP-1 cells, *Frontiers in Toxicology*, 2024: 6: 1293147. doi: 10.3389/ftox.2024.1293147.

F.2 学会発表

1. 飯島 一智, 山城 真輝, 坂本 玲奈, 大野 彰子, 足利 太可雄, 種々の酸化亜鉛ナノ粒子を対象とした抗原

提示細胞活性化能の評価と活性化機序の解析, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.3-5)

2. 荒井 りおん, 大野 彰子, 足利 太可雄, 飯島 一智, ナノマテリアル吸入毒性試験法の開発に向けた、各種シリカナノ粒子曝露による THP-1 細胞活性化のメカニズム解析と新規評価指標候補遺伝子の発現解析, 日本動物実験代替法学会第 37 回大会 (2024.11.29-12.1)
3. 石橋 直樹, 大野 彰子, 足利 太可雄, 飯島 一智, 気管支モデルとの共培養系を用いた各種シリカナノ粒子の THP-1 細胞活性化能の評価と活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.29-12.1)
4. 坂本 玲奈, 山城 真輝, 大野 彰子, 足利 太可雄, 飯島 一智, 気管支モデル/THP-1 細胞共培養系を用いた酸化亜鉛ナノ粒子の免疫細胞活性化能の評価, 日本動物実験代替法学会 第37回大会 (2024.11.29-12.1)

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