

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、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、THP-1 細胞の活性化を指標とした評価法の開発に向け、ナノマテリアル曝露による THP-1 細胞の活性化メカニズムについて、特に、細胞内取り込みおよび活性酸素種の関与を中心に解析を進めるとともに、新規評価マーカーの探索を行った。まず、酸化亜鉛ナノ粒子についてシリカによる表面被覆の影響を解析した。亜鉛イオンの溶出抑制による CD54 発現抑制の予想に反し、シリカ被覆体による CD54 発現の亢進は未被覆よりも高かった。被覆による細胞取り込みの変化や被覆されたシリカの活性化への寄与が考えられた。また、低分子および金属イオンの感作性物質および銀ナノ粒子曝露による CD86 および CD54 の発現亢進は活性酸素種阻害剤 *N*-アセチルシステイン処理により抑制されたのに対し、シリカナノ粒子による CD54 の発現亢進は *N*-アセチルシステインにより抑制されなかったことから、活性酸素種に依存しない経路により活性化されている可能性が示唆された。また、酸化亜鉛ナノ粒子曝露により増加した CD54 発現はマクロピノサイトーシス阻害剤 Amiloride 処理により部分的に抑制され、少なくとも細胞にナノ粒子として取り込まれたものが活性化に寄与していることが示された。一方、Amiloride による抑制効果は、過去に評価したイオン化しないシリカナノ粒子に対する効果よりも低く、亜鉛イオンによる活性化の可能性も考えられた。THP-1 細胞の CD54 発現を亢進する多層カーボンナノチューブの細胞内取り込みを観察し、時間、濃度依存的に細胞内に取り込まれることがわかった。さらに、新規評価マーカーの探索を行い、*IL1A* 遺伝子が利用できる可能性が示された。

A. 研究目的

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、THP-1 細胞の活性化を指標とした NM の in

vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発に向け、NM 曝露による THP-1 細胞活性化メカニズム、特に細胞内取り込み、活性酸素種 (ROS) の関与の解析を進めるとともに、新規評価マーカーの探索も行った。

B. 研究方法

B.1. 各種 NM 分散液の調製と評価

本研究では、シリカナノ粒子 (SiO₂ NPs) として Sicastar-red F (micromod), NM-201, NM-202 (以上 JRC)、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) として T-MWCNT-7 (分散型)、酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO NPs) として MZ-500 および MZN-B0、それらのそのシリカ被覆体である MZ-500HP および MZN-B0HP (以上テイカ)、銀ナノ粒子 (Ag NPs) として BioPure™ AGCB10 (nanoComposix) をそれぞれ用いた。SiO₂ NPs のうち、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。MWCNT は分散剤として Polysorbate 80 を用い、プローブ型超音波装置を用いて分散液を調製した。ZnO NPs は 1 mg/mL の濃度になるように水に懸濁し、ボルテックスミキサーで 2 分間処理した。Ag NPs は 40 mg/ml ウシ血清アルブミン溶液 in 5% グルコース溶液を用いて希釈した後、培養液を用いて所定濃度に希釈した。

ZnO NPs の形態および元素分布は、透過型電子顕微鏡 (TEM) およびエネルギー分散型 X 線分光器 (EDS) (日本電子, JEM-2100F) を用いて解析した。ZnO NPs からの亜鉛イオンの溶出は、水または培養液を用いて 31.6 mg/mL の分散液を調製し、CO₂ インキュベーター (37 °C, 5% CO₂) 内で 24 時間静置し、遠心分離後の上清中の亜鉛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.2. MWCNT の細胞内取り込み挙動の解析

ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞に各濃度の MWCNT 分散液を曝露し、CO₂ インキュベーター (37 °C, 5% CO₂) 内で所定時間培

養後に光学顕微鏡 (ライカマイクロシステムズ DMI3000 B) により観察した。

B.3. NMs の THP-1 細胞活性化能の評価

2.0×10⁶ cells/mL THP-1 細胞懸濁液 500 μL を分注した 24 ウェルプレート各ウェルへ各 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.4. 遺伝子発現に基づく NM の THP-1 細胞活性化能の評価

B.3 の手法にて NM 分散液を曝露した THP-1 細胞より RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いてトータル 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 CD86, CD54, CCL3, CCL5, MMP-12, IL1A, IL1B, GAPDH 各遺伝子の発現を解析した。

B.5. NMs による THP-1 細胞活性化能メカニズムの解析

ROS の阻害は、NM 曝露前に THP-1 細胞を 5 mM または 10 mM の ROS 阻害剤 N-Acetyl cysteine (NAC) で 1 時間処理することで行った。NM の細胞内取込の阻害は、NM 曝露前に THP-1 細胞を 250 μM のマクロピノサイトーシス阻害剤 Amiloride で 2 時間処理することで行った。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

C.1. ZnO NPs のキャラクタリゼーション

MZ-500 および MZN-B0、それらのそのシリカ被覆体である MZ-500HP および MZN-B0HP の TEM 観察および TEM-EDX による元素マッピングを行った。TEM 形態観察において、MZ-500HP では表面に透過性の異なる被覆層が観察されたが、MZN-B0HP では見られなかった (図 C.1.)。一方、元素マッピングにおいては、いずれのシリカ被覆 ZnO NPs についても表面にケイ素原子に由来するシグナルが観察され、同様に酸素に由来するシグナルもほぼ同様の分布でみられたことから、MZ-500HP および MZN-B0HP はその表面がシリカにより被覆されていることが確認された (図 C.2.)。

ボルテックスを用いて調製した MZ-500 および MZN-B0、それらのそのシリカ被覆体である MZ-500HP および MZN-B0HP の流体力学的直径および ζ -potential は、 $2736.9 \pm 824.6 \mu\text{m}$, $1081.6 \pm 92.1 \mu\text{m}$, $3479.0 \pm 748.0 \mu\text{m}$, $2036.8 \pm 231.1 \mu\text{m}$ 、 $-12.4 \pm 2.42 \text{ mV}$, $-14.3 \pm 0.42 \text{ mV}$, $-9.45 \pm 1.69 \text{ mV}$, $-7.65 \pm 1.74 \text{ mV}$ であった。次に、ICP-AES を用いてボルテックスを用いて調製した ZnO NPs 分散液における ZnO NP からの亜鉛イオン溶出率を求めた (図 C.3.)。シリカ被覆体である MZ-500HP および MZN-B0HP からの亜鉛イオン溶出率は、水中においては未被覆のものと比較して抑制されていることが示された。一方、培地中においては溶出率に差はみられなかった。

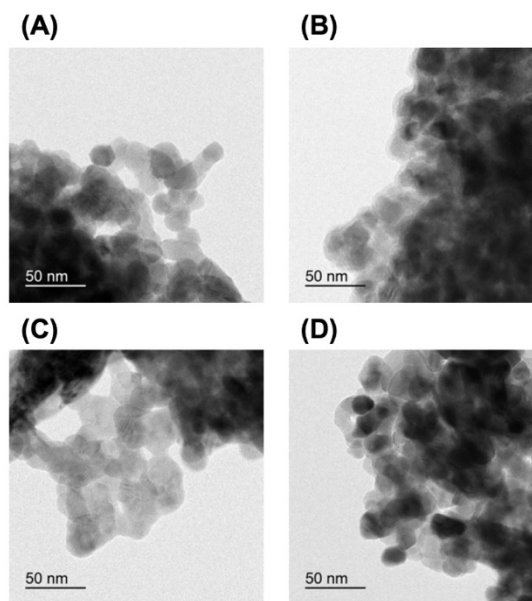


図 C.1. ZnO NPs の TEM 像. (A) MZ-500, (B) MZ-500HP, (C) MZN-B0, (D) MZN-B0HP.

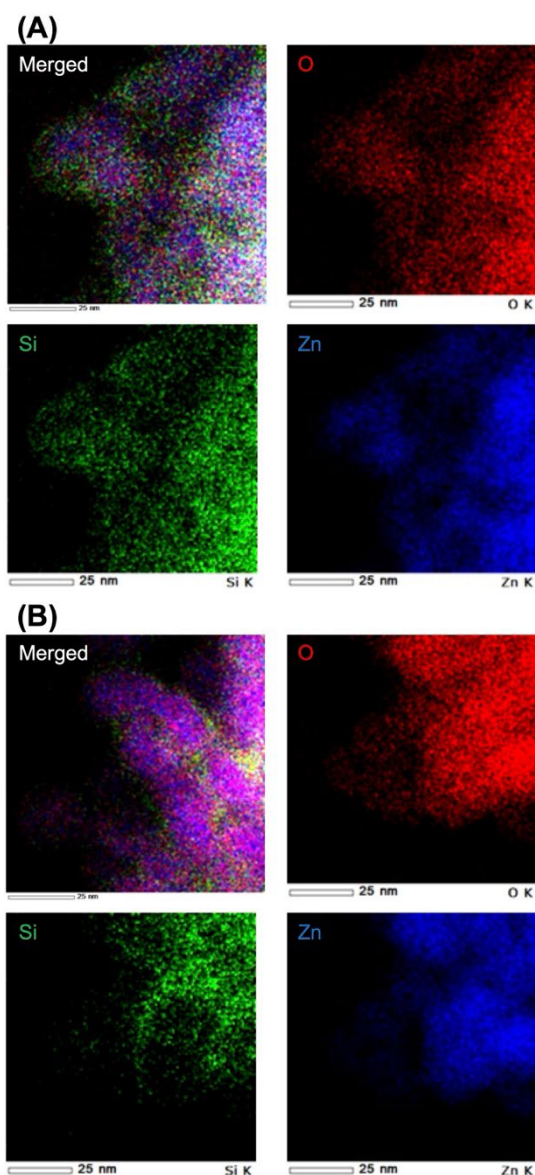


図 C.2. 被覆 ZnO NPs の TEM-EDX 元素マッピング. (A) MZ-500HP, (B) MZN-B0HP.

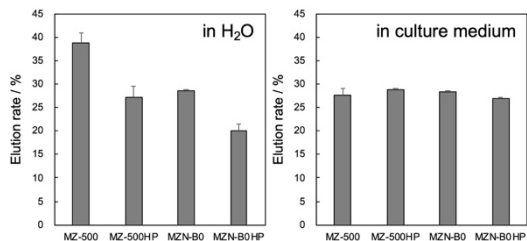


図 C.3. 水および培地中での分散 24 時間後における ZnO NPs からの亜鉛イオンの溶出率.

C.2. 被覆 ZnO NP による THP-1 細胞活性化能の評価

未処理 ZnO NPs である MZN-B0 およびそのシリカ被覆体 MZN-B0HP 曝露後の THP-1 細胞における CD86 および CD54 発現を解析した (図 C.4.). 細胞生存率が 50%以上である 31.6 $\mu\text{g/mL}$ において、MZN-B0HP 曝露 THP-1 細胞における CD54 発現は MZN-B0 を曝露したものよりも高かった。

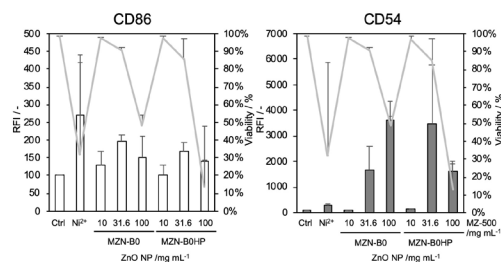


図 C.4. MZN-B0 および MZN-B0HP 曝露後の THP-1 細胞における CD86, CD54 の発現.

C.3. MWCNT の細胞内取り込み挙動の解析

THP-1 細胞における MWCNT の取り込み挙動を光学顕微鏡にて観察した。特に高濃度での曝露条件において、曝露 4 時間後に細胞表面への吸着、8 時間後において細胞表面への吸着と細胞内への部分的な取り込み、曝露 24 時間後において細胞への取り込みがそれぞれ観察された (図 C.5.). 細胞とほぼ同サイズの MWCNT を取り込んだ細胞も観察された。

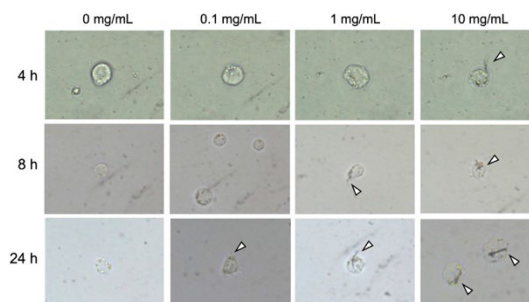


図 C.5. MWCNT 分散液曝露後の THP-1 細胞の光学顕微鏡像. $\triangle$ は MWCNT を示す

C.4. NM による THP-1 細胞活性化能メカニズムの解析

NM による THP-1 細胞活性化能メカニズムの解析として、まず、SiO₂ NP 曝露 THP-1 細胞における CD86 および CD54 発現に対する ROS 阻害の影響を評価した (図 C.6.)。感作性物質である 2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) および硫酸ニッケル、Ag NPs の曝露による CD86 および CD54 の発現亢進は、ROS 阻害剤 NAC での処理により抑制された。一方、SiO₂ NPs による CD54 の発現亢進は NAC により抑制されなかった。

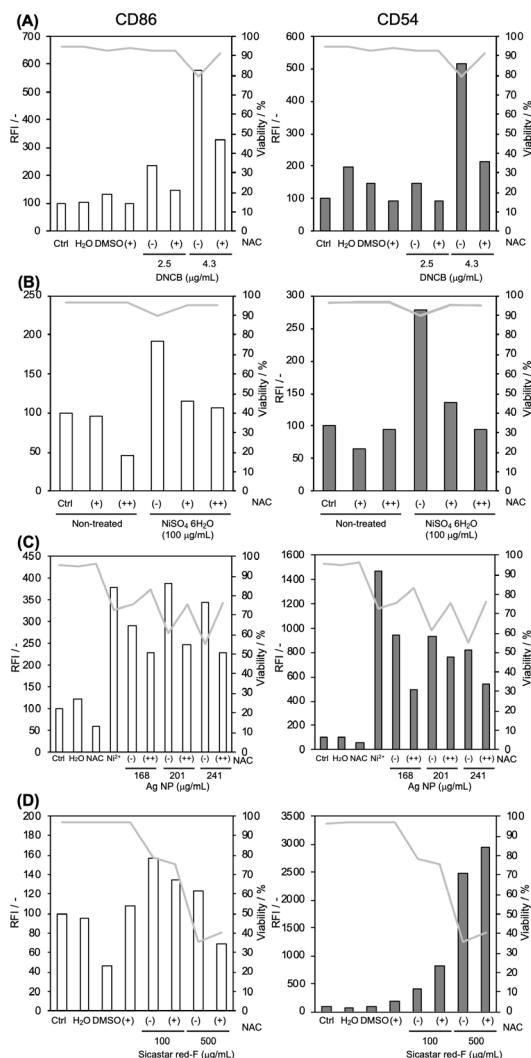


図 C.6. 感作性物質および NM 曝露 THP-1 細胞における CD86, CD54 発現に対する NAC 処理の影響. (A) DNCB, (B) NiSO₄ 6H₂O,

(C) Ag NPs, (D) SiO₂ NPs, NAC conc. 5 mM (+), 10 mM (++).

次に、ZnO NP 曝露 THP-1 細胞における CD86 および CD54 発現に対するマクロビノサイトーシス阻害剤 Amiloride の効果を評価した (図 C.7.). ZnO NP 曝露により増加した CD54 発現が Amiloride 処理により部分的に抑制された。

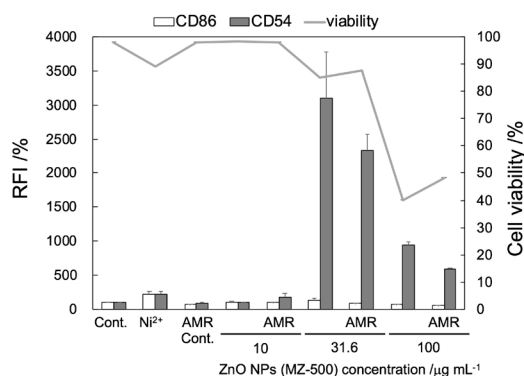


図 C.7. ZnO NP 曝露 THP-1 細胞における CD86, CD54 発現に対する Amiloride (AMR) 処理の影響.

C.5. 遺伝子発現に基づく NM の抗原提示細胞活性化能の評価

ZnO NPs (MZ-500 および MZ-500HP) 曝露後の THP-1 細胞における遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した (図 C2.8.). これまでに NM 曝露により THP-1 細胞において発現が亢進することを確認済みの CD86, CD54, MMP-12, CCL3, CCL5, IL1B に加えて、IL1A 遺伝子の発現亢進が示された。

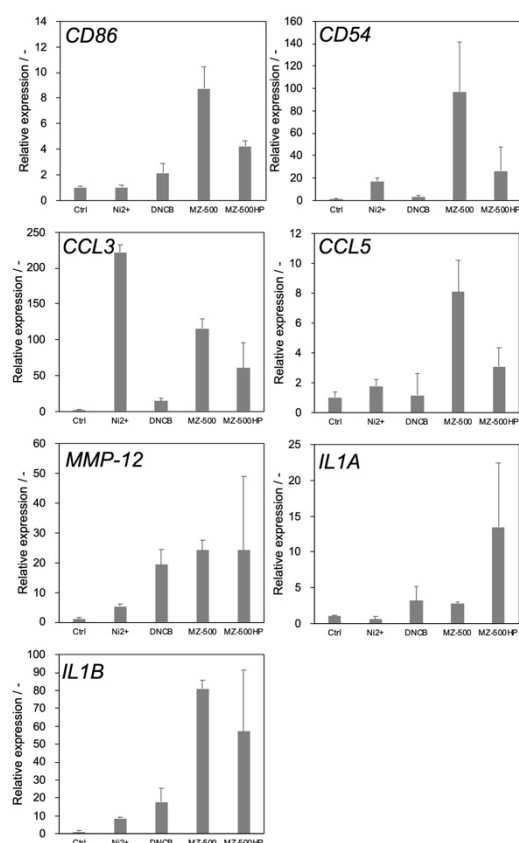


図 C.8. ZnO NPs 曝露後の THP-1 細胞における遺伝子発現。

D. 考察

D.1. ZnO NPs のキャラクターゼーション

ZnO NPs について、TEM 形態観察および TEM-EDX による元素マッピングを行い、MZ-500HP および MZN-B0HP がシリカにより被覆されていることが確認された。これまでのプローブ型超音波装置により分散させた ZnO NPs 分散液を用いた検討では、被覆の有無により ZnO NPs 分散液からの亜鉛イオンの溶出および THP-1 細胞曝露後の CD54 発現の差異はみられなかった。プローブ型超音波装置による分散過程で被覆層が剥離している可能性を考え、ボルテックスにより懸濁液を調製した。結果、水中においては被覆による亜鉛イオンの溶出の抑制がみられた。

D.2. 被覆 ZnO NPs による THP-1 細胞活性化能の評価

D.1. の通り、超音波処理による分散が ZnO NPs の被覆にダメージを与えている可能性が示されたため、改めてボルテックスにより分散させた MZN-B0 および MZN-B0HP 分散液を用い、被覆が ZnO NPs による THP-1 細胞活性化能に与える影響を評価したところ、MZN-B0HP 曝露 THP-1 細胞における CD54 は MZN-B0 曝露のものより高発現であった。亜鉛イオンの溶出抑制による CD54 発現抑制を予想していたが、それと反する結果であった。SiO₂ NPs も THP-1 細胞における CD54 発現を亢進することから、被覆されたシリカによっても活性化が誘起された可能性が考えられる。

D.3. MWCNT の細胞内取り込み挙動の解析

これまでに MWCNT T-MWCNT-7 (分散型) への曝露が THP-1 細胞において CD54 の発現を亢進することが示されている。光学顕微鏡観察より、THP-1 による T-MWCNT-7 の取り込みが示され、取り込みにより THP-1 細胞が活性化している可能性が示唆された。

D.4. NM による THP-1 細胞活性化能メカニズムの解析

低分子および金属イオンの感作性物質および Ag NPs 曝露による CD86 および CD54 の発現亢進は ROS 阻害剤 NAC による処理により抑制され、それらの物質による THP-1 細胞の活性化は ROS を介する経路により引き起こされていることが示された。一方、SiO₂ NPs による CD54 の発現亢進は NAC により抑制されなかったことから、ROS に依存しない経路により活性化されている可能性が示唆された。

また、ZnO NP 曝露により増加した CD54 発現は Amiloride 処理により部分的に抑制され、ZnO NPs 曝露による THP-1 細胞の活性化には少なくとも粒子として取り込まれた ZnO NPs が寄与していることが示された。一方、Amiloride による抑制効果は、過去に評価したイオン化しない SiO NPs に対する効果よりも低く、亜鉛イオンによる活性化の可能性も考えられた。

D.5. 遺伝子発現に基づく NM の抗原提示細胞活性化能の評価

NM 曝露による遺伝子変化の解析は、活性化メカニズムの解明および新たな評価指標の探索につながる。今回、ZnO NPs のうち MZ-500 および MZ-500HP 曝露により THP-1 細胞において発現が亢進することを確認済みの遺伝子に加え、*IL1A* 遺伝子の発現が亢進することを見出した。*IL1A* 遺伝子がコードする IL-1 α は研究分担者黒田教授のグループにおいて微粒子に応答してマクロファージより放出される因子として同定されており、THP-1 細胞においても NM に応答して *IL1A* 遺伝子が発現亢進されること、新たな評価指標として使用できる可能性が示された。

E. 結論

本研究では、THP-1 細胞の活性化を指標とした評価法の開発に向け、ナノマテリアル曝露による THP-1 細胞の活性化メカニズムについて、特に、細胞内取り込みおよび ROS の関与を中心に解析を進めた。ZnO NPs による THP-1 細胞活性化においては、ナノ粒子取り込みが活性化に関与している可能性が示され、SiO₂ NPs については ROS に依存しない経路による活性化が示唆された。評価マーカーの探索を行い、*IL1A* 遺伝子が利用できる可能性を示した。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

F.2 学会発表

1. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智. シリカナノ粒子による THP-1 細胞活性化における酸化ストレスと吸着イオンの影響, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会, ポスター発表 (2025.11.1-3, 横浜)
2. 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智. イオン溶出および細胞内取り込みに着目した酸化亜鉛ナノ粒子による THP-1 細胞活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会第 38 回大会, ポスター発表 (2025.11.1-3, 横浜)
3. Iijima K, Ishibashi N, Sakamoto R, Nishida A, Arai R, Ohno A, Ashikaga T. Activation of Human Monocytic Cell Line THP-1 Cells after Exposure to Nanomaterials in Monoculture and Co-culture with Bronchial Models, Materials Research Meeting 2025 (MRM2025), Oral Presentation (2025.12.8-13, 横浜)

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