

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2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 横浜国立大学工学研究院 准教授

研究要旨

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関する in vitro 試験法の確立を目指し、本研究では銀ナノ粒子および種々の二酸化チタン NM について物性測定と抗原提示細胞活性化能の評価を行なった。銀ナノ粒子、二酸化チタン NM 共通して z-ポテンシャルおよび流体力学的直径の測定を行い、銀ナノ粒子については誘導結合プラズマ発光分光分析（ICP-AES）を用いて培養液中での溶出率についても測定した。抗原提示細胞活性化能の評価については、単球系細胞株 THP-1 細胞へ NM を 24 時間曝露した後の CD54, CD86 の発現亢進を指標として行った。

細胞培養条件下で銀ナノ粒子からの銀イオンの溶出が見られ、銀イオンとして作用している可能性が示唆された。銀ナノ粒子は銀イオン同様、THP-1 細胞の CD86 および CD54 発現を亢進したが、銀イオンの方がはるかに低濃度で活性が見られた。これは、銀イオンの方が高い抗原提示細胞活性化能力を有していることを表しており、銀ナノ粒子による抗原提示細胞活性化は溶出した銀イオンによるものと考えられた。一方、同程度の細胞生存率を示す濃度（CV75）で曝露した場合において、銀ナノ粒子の方が細胞内への取り込み量が多く、銀ナノ粒子が細胞に取り込まれてリンパへ移行し、溶出した銀イオンにより抗原提示細胞が活性化される可能性も考えられた。

二酸化チタン NM については、z-ポテンシャルに大きな差異は見られなかったが、流体力学的直径は大きく異なっていた。抗原提示細胞活性化能については、一部において CD86 および CD54 の発現増加傾向が見られたものの、明確な陽性とは言えなかった。今後、感作性物質との共処理による抗原提示細胞活性化能の評価を行い、アジュバンド効果についても検討を進める。

A. 研究目的

短期吸入曝露された各種ナノマテリアル（NM）の免疫系に与える影響について 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、毒性メカニズムの解明と評価系の開発にむけたデータ取得を

目的とした。銀ナノ粒子および物性の異なる種々の二酸化チタン NM について、物性の測定を行うとともに、単球系細胞株 THP-1 細胞の CD54, CD86 の発現を指標として抗原提示細胞活性化能の評価を行った。

B. 研究方法

B.1. 各種NM分散液の調製と評価

各種NMの分散液は以下の方法により調製した。分散後の ζ -ポテンシャルおよび粒子系分布はZeta-potential & particle size analyzer (ELS-Z25H, 大塚電子株式会社) を用いて測定した。

銀ナノ粒子

銀ナノ粒子はBioPure™ 銀ナノ粒子分散液 (nanoComposix, 一次粒径 10.3 ± 1.9 nm, 濃度 0.99 mg/ml) を用いた。40 mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA) 溶液 in 5%グルコース溶液を用いて希釈した後、培地を用いて所定濃度まで希釈した。購入時の銀ナノ粒子分散液および培地分散時の銀イオン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES, ICPE-9000, 島津製作所) により測定した。二酸化チタンNM

二酸化チタンNMは粒子状のMT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT-600 (以上テイカ株式会社) および針状のTiDWを用いた。二酸化チタンNM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。4 mg/mlの濃度になるように二酸化チタンNMを培地に懸濁し、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PWM 80%, 1分間の条件で処理した。培地を用いて所定濃度に希釈し、再度プローブ型超音波装置により同様の条件で処理した。

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 THP-1細胞懸濁液500 μl および各被験物質の分散液または溶液500 μl を添加し、CO₂インキュベーター内で 24時間静置した。被験物質の暴露濃度はTHP-1細胞の生存率

が75%となる濃度 (CV75) を基準とし、公比1.2で上下合計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。

B.3. 細胞内活性酸素種 (ROS) の定量

THP-1細胞を10 mM CM-H2DCFDA PBS溶液で1時間処理し、培地に再懸濁した。24プレートの各ウェルに 2.0×10^6 cells/ml THP-1細胞懸濁液500 μl および銀ナノ粒子分散液または硝酸銀溶液を500 μl 添加し、CO₂インキュベーター内で 24時間培養した。細胞を回収し、10% BSA含有PBSで 2回洗浄したのち、10% BSA含有PBSに再懸濁した。フローサイトメトリーを用いて、FL-1チャンネルの強度を測定した。

B.4. 細胞内に取り込まれた銀の定量

24ウェルプレートの各ウェルに 2×10^6 cells/ml THP-1細胞分散液500 μl および同量の402.50 $\mu\text{g/ml}$ 銀ナノ粒子分散液もしくは7.47 $\mu\text{g/ml}$ 硝酸銀溶液を添加し、CO₂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。HNO₃ 500 μl を加えて70°Cのウォーターバスで30分間処理したのち、氷上で1分間冷却した。それを3 mlの超純水で希釈し、ICP-AES測定を行い、銀濃

度を定量した。

C. 研究結果

C.1. 銀ナノ粒子の評価

培地中での銀ナノ粒子の ζ -ポテンシャルは -12.07 ± 0.73 mV、流体力学的直径は 37.5 ± 1.0 nmであった。銀ナノ粒子は購入時のクエン酸溶液中で5.0%、培地中24時間分散後で25.9%がそれぞれ銀イオンとして溶出していることがわかった。

C.2. 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の評価

銀ナノ粒子、銀イオンいずれの処理においてもCD86およびCD54の発現の増加が見られた(図1)。銀ナノ粒子のEC150 (CD86発現が150%を超える濃度)、EC200 (CD54発現が200%を超える濃度)は127.60 $\mu\text{g/ml}$ 、118.44 $\mu\text{g/ml}$ 、銀イオンは1.64 $\mu\text{g/ml}$ 、0.98 $\mu\text{g/ml}$ であり、銀イオンの方が銀ナノ粒子よりもはるかに低かった。

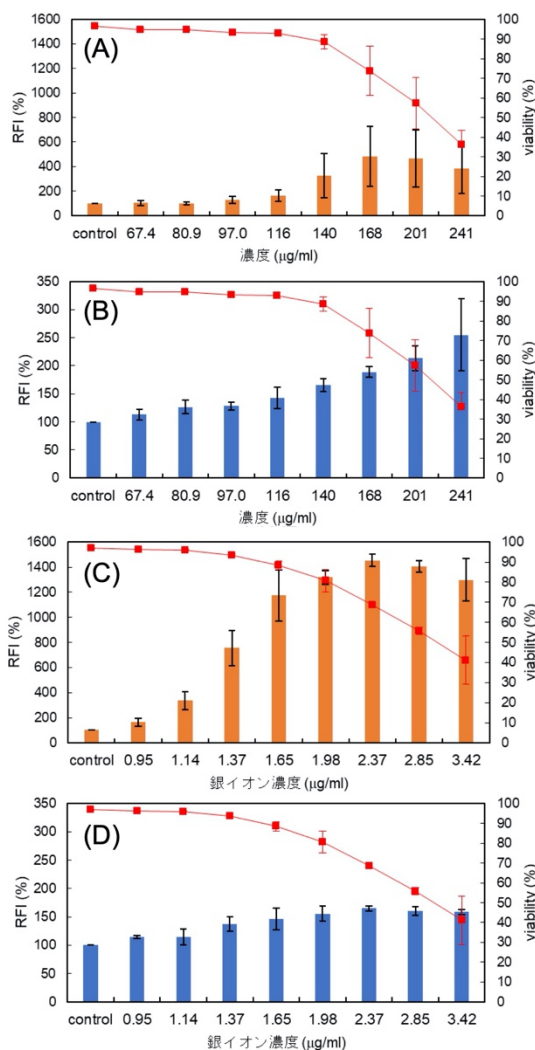


図1 銀ナノ粒子 (A, B) および硝酸銀 (C, D) 処理THP-1細胞のCD54 (A, C) およびCD86 (B, D) の発現

C.3. 銀ナノ粒子、銀イオン処理後の細胞内銀濃度の定量

同程度の生存率を示す濃度 (CV75) で暴露した場合において、銀ナノ粒子を処理したTHP-1細胞の方が細胞内の銀濃度が高く、取り込み量が多いことがわかった(図2A)。

C.4. 銀ナノ粒子、銀イオン処理後の細胞内活性酸素種 (ROS) 産生の定量

同程度の生存率を示す濃度 (CV75) での暴露において、銀ナノ粒子と銀イオンどちらも細胞内ROS量を増加させたが、銀ナノ

粒子の方がROS産生量は多かった (図2B)。

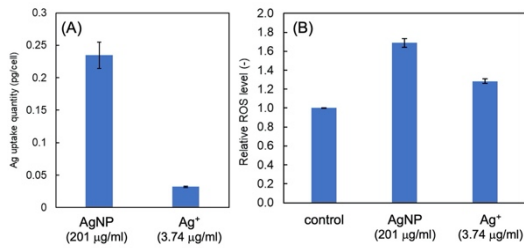


図2 銀ナノ粒子および硝酸銀処理におけるTHP-1細胞への銀の取り込み量 (A) およびROS産生量 (B).

C.5. 二酸化チタンNMの評価

培地中での二酸化チタンNM MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT-600, TiDW のζ-ポテンシャルはそれぞれ -20.5 ± 3.33 mV, -23.9 ± 4.0 mV, -22.4 ± 0.8 mV, -

23.8 ± 1.3 mV, -16.7 ± 3.9 mV, -14.9 ± 2.6 mV、流体力学的直径はそれぞれ 222.2 ± 20.8 nm, 82.16 ± 3.32 nm, 234.7 ± 60.1 nm, 61.27 ± 13.2 nm, 260.5 ± 23.9 nm, 781.7 ± 45.4 nmであった。走査型電子顕微鏡観察により、針状二酸化チタンはプローブ型超音波装置を用いた分散処理によって形態は変化しないことが確認された。

C.6. 二酸化チタンNMの抗原提示細胞活性化能の評価

各種二酸化チタンNM処理後のTHP-1細胞におけるCD86, CD54発現を図3に示す。陽性になったものもあるが、いずれも陽性判定基準 (CD86発現が150%, CD54発現が200%) をわずかに超える程度であった。

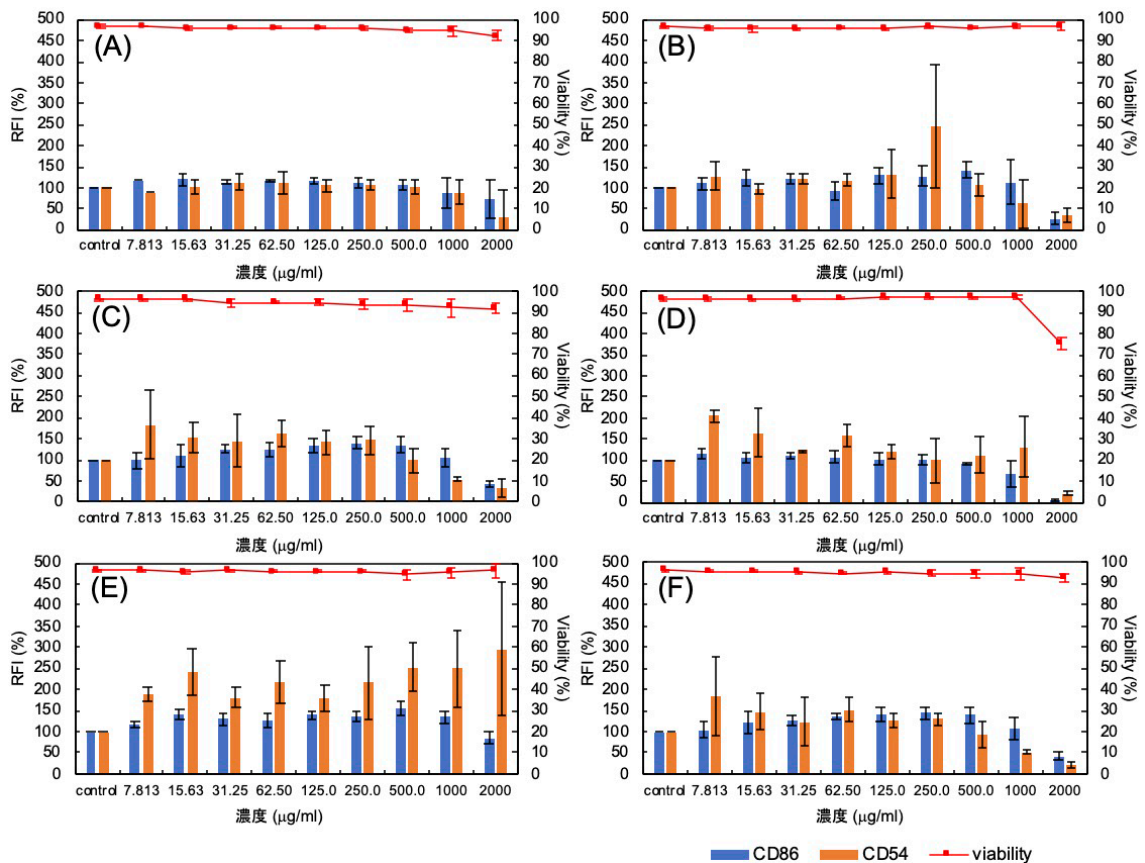


図3 各二酸化チタンナノマテリアル処理THP-1細胞のCD54およびCD86の発現. (A) MT-150A, (B) MT-500B, (C) AMT-100, (D) TKP-102, (E) AMT-600, (F) TiDW.

D. 考察

銀ナノ粒子は細胞培養条件下で銀イオンの溶出が認められたことから、銀ナノ粒子の暴露において、銀ナノ粒子としてだけでなく銀イオンとして作用していることが示唆された。銀ナノ粒子は銀イオン同様、THP-1細胞のCD86およびCD54発現を亢進したが、銀イオンの方がはるかに低濃度で活性が見られた。これは、銀イオンの方が高い抗原提示細胞活性化能力を有していることをあらわしている。

銀ナノ粒子の暴露において、銀ナノ粒子としてだけでなく銀イオンとして作用していることと合わせると、銀ナノ粒子によるTHP-1細胞の活性化は溶出した銀イオンによるものと考えられた。

一方、同程度の細胞生存率を示す濃度(CV75)で暴露した場合において、銀ナノ粒子の方が細胞内への取り込み量が多いことがわかった。銀ナノ粒子が細胞に取り込まれてリンパへ移行し、溶出した銀イオンにより抗原提示細胞が活性化される可能性も考えられた。

二酸化チタンNMについてはζ-ポテンシャルに大きな差異は見られなかったが、流体力学的直径は大きく異なっていた。抗原提示細胞活性化能においては、一部において増加傾向が見られたものの、明確な陽性とは言えなかった。今後、感作性物質との共処理による抗原提示細胞活性化能の評価を行い、アジュバンド効果についても検討を進める。

E. 結論

銀ナノ粒子は銀イオン同様、THP-1細胞のCD86およびCD54発現を亢進したが、銀イオンの方がはるかに低濃度で活性が見られ、銀ナノ粒子は細胞培養条件下で銀イオンの

溶出が認められたことから、銀ナノ粒子によるTHP-1細胞の活性化は溶出した銀イオンによるものと考えられた。一方、二酸化チタンナノ粒子については、一部においてTHP-1細胞のCD86およびCD54発現増加傾向は見られたものの、明確な陽性とは言えなかった。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

該当なし

F.2. 学会発表

- 1) 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の解析, 日本動物実験代替法学会 第33回大会, 2020.11.12, web開催
- 2) Iijima K, Nishida A, Ohno A, Hirose A, Ashikaga T: Comparison of Sensitization Potentials between Silver Nanoparticles and Silver Ions using Monocytic Cell Line THP-1, 2021 SOT Annual Meeting and ToxExpo, 2021.3.22, Virtual Meeting

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし