

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

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 (20KD1004)

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 足利太可雄

令和3(2021)年3月

目 次

I. 総括研究報告

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----- 1
足利 太可雄

II. 分担研究報告

1. ナノマテリアルの THP-1 細胞への影響評価-----22
足利 太可雄

2. ナノマテリアルの吸入曝露実験の実施と解析-----31
高橋 祐次

3. ナノマテリアルの in vitro 評価系に関する研究-----42
飯島 一智

4. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究----- 47
石丸 直澄

5. ナノマテリアルの in silico 評価系に関する研究----- 62
大野 彰子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 86

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 総括研究報告書

研究代表者 足利太可雄

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官

研究要旨

ナノマテリアル(NM)は細胞内に直接取り込まれるという性質を有するため、吸入曝露による健康リスクが強く懸念されるところであり、多様な NM の吸入曝露による毒性を効率的かつ高精度に評価できる試験法の開発および国際標準化が喫緊の課題である。そこで我々は、異物排除の根幹を担う抗原提示細胞に対する NM の影響に着目し、in vitro/in vivo 研究の連携体制による評価手法開発のための研究を行っている。具体的には、in vitro において NM が抗原提示細胞株に与える影響の検討、NM の物理化学的性状データの取得と有害性データの情報収集、さらに in vivo 短期吸入曝露試験を実施した。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、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。また、種々のナノシリカ粒子は THP-1 細胞の CD54 発現を非常に強く誘導し、一部の酸化チタン NM については CD54 発現の弱い誘導がみられた。さらに、RAW246.7 細胞にカーボンナノチューブである T-CNT を添加した結果、MMP12 や線維化に関与する遺伝子 mRNA 発現が上昇し、THP-1 細胞の LPS 刺激下で T-CNT を加えると、LPS 刺激のみの細胞に比較して有意に MMP-12 mRNA 発現が上昇した。物性と毒性の関係を解析するために、各種二酸化チタン NM について、公開された文献などから in vivo 有害性情報を取得するとともに、成分分析と細孔分布・比表面積測定を行い、データマイニングの結果、多変量解析手法の有用性を見出した。In vivo 研究としては、針状二酸化チタン NM が生体レベルで肺胞マクロファージに与える影響解析を目的として、先行研究で開発した Taquann 法を用いて短期吸入曝露試験を実施し、病理組織学的評価および免疫機能評価を行ったところ、曝露後 8 週において、CD54+AM の割合が対照群に比較して有意に増加していた。

研究分担者

高橋 祐次

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
動物管理室 室長

飯島 一智

横浜国立大学工学研究院 准教授
石丸 直澄
徳島大学大学院医歯薬学研究部
口腔分子病態学分野 教授

大野 彰子

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター

安全性予測評価部 主任研究官

A. 研究目的

短期吸入曝露された各種NMの免疫系に与える影響について、*in vitro/in vivo*試験法研究の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行い、得られた知見を基に*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。*In vitro*試験法研究では、様々な特徴を有する各種NMの抗原提示細胞活性化能の評価、物性の測定及び情報の収集・整理を行い、*in vivo*試験法研究では、先行研究で開発した高分散手法を用いてマウスへの短期全身曝露吸入を実施し、肺胞マクロファージに与える影響を病理組織的及びフローサイトメトリーを用いた免疫機能の評価を行うことで、*in vitro*試験法の改良や結果の生理的意義付けのための基盤的知見とする。

B. 研究方法

B.1. 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によるデータベース作成 (足利)

今年度は二酸化ケイ素ナノマテリアル(以下、ナノシリカ)5種について検討を行った。被験物質は、OECDにおいて物性と毒性情報が収集されている NM-200, NM-201, NM-202, NM-203 および NM-204 とした。抗原提示細胞の活性化能を評価とする試験法として、皮膚感作性試験法であり、OECD テストガイドライン化されている h-CLAT (OECD TG442E)を用いた(方法の詳細は B.3.2 に記載した)。h-CLAT は細

胞適用時に均一に分散されていることが必要なため、プローブ型超音波装置を用い、細胞培養液での分散条件を設定した。分散条件決定後、それぞれのナノシリカが THP-1 細胞の細胞生存率、CD86 および CD54 発現に与える影響を検討するために、測定濃度は予備試験である細胞毒性試験結果から、発現の濃度閾値(EC150 for CD86 と EC200 for CD54)が求まるよう、公比 $\sqrt[10]{10}$ 希釈で8段階設定した。

B.2. ナノマテリアルの物性と THP-1 細胞に与える影響の関連性解析および評価 (大野)

今年度の本研究で実施する対象化合物は6種の二酸化チタンナノ粒子(TiO₂ NPs: MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT600, TiDW)とした。

【有害性情報の調査対象情報源】

厚生労働科学研究成果データベース MHLW GRANTS SYSTEM に公表された厚労科学研究費補助金化学物質リスク研究事業研究報告書、及びこれらの研究成果として公表された原著論文を調査対象情報源とした。

【物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目】

物理化学的性状データは、凝集、結晶子サイズ、比表面積、ゼータ電位、表面化学、その他のプロパティ等について収集整理した。

【物理化学的性状の分析対象項目】

➤ 成分分析(化学分析): 蛍光 X 線法による定性分析(対象元素: Na~U: 下限 0.1%)、ICP 発光分光分析法による定量分析(対象元素: Fe, Si, P, Al, Cr, Zr, Ca, Mg, Ti, Ce, Nb: 下限 0.01%, Si・P は 0.05%)、原子吸光分析法による定量分析(対象元素: Na, K: 下限 0.01%)、

燃焼—赤外線吸収法による定量分析(対象元素：S、下限 0.01%)

- 細孔分布・比表面積測定(粒子解析)：窒素吸着 BET 多点法による細孔分布ならびに比表面積測定
- 親水性および疎水性評価(表面化学分析)：粒体浸透速度測定、粒体接触角測定

【情報整理及びデータベース(DB)搭載用のデータシートの作成】

収集した情報について MS-Excel のデータシートにて作成した。有害性情報に関しては、今後、HESS DB(「有害性評価支援システム統合プラットフォーム(Hazard Evaluation Support System Integrated Platform、通称：HESS)：ラットを対象(今回はマウスも対象)とした化学物質の反復投与毒性試験データ及び毒性にかかわる作用機序情報などを集積した毒性知識情報データベース」)に搭載できるように形式を整理し作成した。

【多変量解析法】

収集したデータについて多変量解析ソフトウェア SIMCA17 (Umetrix 社製)で以下の解析を実施した。これらの解析を行うことにより物質間の類似性や有害性(毒性)の変動に寄与している物理化学的性状について同定した。

- 物理化学的情報に基づく主成分分析法
- 収集したデータに基づく物理化学的性状情報と in vitro 試験での h-CLAT 試験法毒試験結果のデータとの関連性について直交部分的最小二乗回帰分析(OPLS : Orthogonal Partial Least Squares Regression)を実施した。
- OPLS 法 : $Y = f(x) = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots$ の回帰式から、Y 変数に連動する X 変数を探索する(X 変数を使って Y 変数のモデルを構築する)。今回の解析では物

性値を X の説明変数とし、毒性値(h-CLAT 試験法毒性試験結果)を Y の目的変数として設定し X 変数から Y 変数のモデルを構築し、予測する。

- 収集したデータに基づく in vivo 試験結果(腹腔内投与毒性試験・皮膚毒性試験結果)のデータについて PCA 法による検体間の傾向を検証した。
- in vitro 試験の h-CLAT 試験法毒性試験結果のデータと in vivo 試験毒性試験結果との紐付けの解析法の実施
- ①物性⇔②in vitro 毒性試験結果⇔③in vivo 毒性試験結果について、MOCA (Multiblock Orthogonal Component Analysis)による 3 ブロックの統合解析を実施し、共通する変動の変数について探索した(予試験)。
- MOCA 法 : O2PLS の改良版で、同じサンプルに対し複数の分析方法で得られた 2 つ以上のブロックデータを統合解析する。得られた全ブロックデータで共通の変動および各ブロックでの固有の変動を同時に可視化する。

B.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明(飯島)

B.3.1. 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) を用いて水中で 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.3.2. NM の抗原提示細胞活性化能の評価

24 ウェルプレート各ウェルに 2.0×10^6 cells/ml 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 インキュベーター内で 24 時間静置した。被験物質の曝露濃度は 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。曝露後の 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 チャネルおよび FL2 チャ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.3.3. 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 プレーートの各ウェルに 2.0×10^6 cells/ml THP-1 細胞懸濁液 500 μ l および銀ナノ粒子分散液または硝酸銀溶液を 500 μ l 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 チャネルの強度を測定した。

B.3.4. 細胞内に取り込まれた銀の定量

24 ウェルプレート各ウェルに 2×10^6 cells/ml THP-1 細胞分散液 500 μ l および同量の 402.50 μ g/ml 銀ナノ粒子分散液もしくは 7.47 μ 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 μ l 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。

B.4. 異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの機能に基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価法の基盤となる情報の整備 (高橋)

B4.1. 検体の高分散化処理の条件検討

1. 被験物質 :

被験物質として、針状酸化チタン TiDW を使用した。

2. 検体処理の条件検討 :

TiDW の原末 500 mg をビーカーに入れ、

35°Cに加熱して溶解した TBA500 mL を加えて懸濁液を調整した。TBA 懸濁液を超音波洗浄器 SU-3TH(柴田科学株式会社)にて、40W の出力により 2~15 分間の処理を行い、高分散性の懸濁液を得た。超音波処理前の懸濁液 (0 分)、並びに超音波処理後の懸濁液 (2 分、15 分) をそれぞれ 10 mL を分注し、形態観察に用いた。

3. TiDW の形態観察：

アルミナフィルター(Anodisc、孔径 0.02 μm 、 ϕ 12mm、ワットマン)をロート型ガラス濾過器 (51G-1、三商) に載せ、ピペッティングにより十分に分散させた Taquann 法処理 TiDW 懸濁液 1 mL を滴下し吸引濾過した。フィルターを室温で乾燥し、真鍮製 SEM 観察台 (S-GA、 ϕ 15 \times 5 mm、日新 EM) にカーボンシール (ϕ 12 mm、日新 EM) で固定した。オスミウムコーター (HPC-1 SW 型、真空デバイス) により 5 秒間処理を行い走査型顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) によって 2500 倍、加速電圧 2~2.5 kV の条件で観察した。TiDW の繊維長の計測は ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて行った。

B4.2. マウス全身曝露吸入実験

1. 動物：

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウスを 10 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 12 週齢にて使用した。このマウスは当研究部において、MWCNT を含めてナノマテリアルの吸入曝露実験に使用した実績がある。個体識別は耳パンチにより行った。

2. 飼育条件：

飼育ケージは、ポリカーボネイト製のアウトターケージと PET 製インナーケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1 ケージ当り 5 匹のマウスを収容した。ケージラックはケ

ミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置 (RAIR HD SUPER MOUSE 750TM 個別換気式飼育装置 特型) を使用した。飼育条件は、温度 ; 25 \pm 1°C、湿度 ; 55 \pm 5%、換気回数 ; 約 20 回/h、照明時間 ; 8 時~20 時点灯 (照明明暗サイクル 12 時間) とし、固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。ケージ内の環境を改善する目的で、シェファードシャック (Shepherd Specialty Papers 社) をケージ内に設置した。

3. 群構成：

HEPA フィルターを通した清浄空気のみを送気した群 (対照群)、TiDW 曝露群の 2 群構成とした。目標濃度は 30 mg/m³ と設定した。各群当たり 48 匹のマウスを使用し、肺沈着量測定用に 9 匹、病理組織用に 6 匹、免疫機能実験用に 10 匹を割り当てた (表 1)。1 日 6 時間 (10 : 00~16 : 00)、5 日間の連続の全身曝露吸入を行った。

4. ダスト発生装置

検体のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 を使用した (共同開発 柴田科学株式会社)。カートリッジへの検体の充填は、TiDW の tert-butyl alcohol (TBA) 懸濁液 (1mg/mL) を調整し、TBA 懸濁液を各カートリッジに 10 mL 分注して液体窒素で固化させた後、デシケーターに格納して溶媒回収型ポンプで TBA を昇華除去することで行った。噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は 0.48 Mpa、噴射時間は 0.2 秒、1 カートリッジ当たり 3 回の噴射を行った。曝露チャンバーの総換気流量は 32.5 L/min (基礎換気流量 ; 29.5 L/min、エアロゾルモニター用サンプリング (CPC) ; 1.5 L/min、質量濃度測定 ; 1.5 L/min) と設定した。目標濃度に速やかに到達させ

るため、曝露開始時に2本を1分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ4分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。2時間の吸入曝露実験において、合計88本のカートリッジを使用し、カートリッジの交換、噴射は完全自動化で実施した。曝露チャンバー内の温度、湿度並びに圧力変動を曝露時間の6時間を通してモニタリングした。

5. 曝露チャンバー

動物を収容し検体を曝露する曝露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものを、Ver3.0用に改変したものを使用した。(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。動物は、メインチャンバー内に設置した円筒形ステンレス金網製のケージに個別に収容する。

6. 曝露チャンバー内のエアロゾル濃度測定
曝露チャンバー内のエアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度(CPM; count per minutes)と質量濃度(mg/m³)測定を並行して行った。相対濃度測定は、凝縮粒子計数装置(Condensation Particle Counter: CPC、CPC-BL01、サンプリング流量: 1.5 L/min、柴田科学)を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。高濃度での測定は、CPCに負荷がかかるため、CPCの前段に希釈機(柴田科学)を設置して10倍希釈し測定した。質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、φ55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂バインダーガラス繊維フィルター(Model TX40HI20-WW、φ55mm、捕集効率(DOP 0.3 mm): 99.9%、東京ダイレック)を装着し、サンプリングポンプ(Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学)に接続して1.5 L/minの流量で曝露時間の2時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後の

フィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 1.5 L/min × 120min = 180 L から 1 m³ 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用した。

7. エアロゾルの空気動力学的中位径測定
Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) エアロゾルの空気動力学的中位径測定は、Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI)を用いた。吸引時間は20分とした。各分級ステージには専用のアルミホイールにシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。マイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用してアルミホイールの質量を、MOUDI装着前と、MWCNT回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

8. 解剖とサンプリング

肺と縦隔、顎下リンパ節のサンプリングのため、曝露終了直後(0W)、4週後(4W)及び8週後(8W)に定期解剖を行った。マウスは吸入麻酔器(TK-7、バイオマシナリー)を用いイソフルラン(DSファーマアニマルヘルス)麻酔下で、眼窩より採血を行い、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。病理標本用の動物は、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、喉頭部を絹糸で結紮して開胸時の肺の虚脱を防止した後、開胸し、右心室に翼状針(21G、SV-21CLK-2、テルモ株式会社)を刺入して生理食塩水(大塚生食注、大塚製薬工場)を約40cm水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入して血液を除去した後、回路を切り替えて4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(フジフィルム和光純薬工業、組織固定用、

用時調製)を同静水圧にて約3分灌流して固定後、同組成固定液に浸漬固定を行った。流量は点滴調節器により適宜調節した。組織沈着量測定用の動物は、開胸して肺を取り出し、肺門部で気管を除去して湿重量測定後ホルマリン固定した。免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針(サーフローラッシュ 18G、テルモ)を気管に挿入しPBSを1mL注入・吸引採取する操作を2回繰り返し、BALを採取した。

B.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究(石丸)

・マウスへの吸入曝露

Taquann 処理した針状酸化チタン(TiDW: Titanium dioxide whisker/FTL-300)を吸入曝露装置(国立医薬品食品衛生研究所)により吸入を実施し、吸入後4週及び8週で適切に屠殺後解析を行った。

・フローサイトメトリー解析

肺胞洗浄液(BALF)中の単核球を採取するために、気管にサーフロー留置針(SR-OT1851C, TERUMO)を留置し、1mlのシリンジ(SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO)に1mlのPBSを流し込み、回収後、洗浄、遠心し、組織保存液(MACS®Tissue Storage solution, Miltenyi Biotec)に浸漬した。また、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。その後、ホモジナイズ後、0.83%塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄、濾過を行った。蛍光色素標識された各種表面マーカーCD3, CD19, CD45.2, CD11b, CD11c, F4/80, CCR2 (CD192), CD206, CD54, CD136に対する抗体(eBioscience, San Diego, CA)にて染色ならびに7-amino-actinomycin D (7-AAD)処理、0.9%-formalin-PBSで固定後、解析装置(FACSCant BD Biosciences)にてそれらの発現を解析した。頸部リンパ節に

関しても、染色後固定した(未解析)。

・In vitro 実験系

マウス単球細胞株RAW264.7ならびにヒト細胞株THP-1、マウス線維芽細胞株NIH3T3を培養系に用いた。培養系でTaquan 処理MWCNT-7(T-CNT)を0~125ng/mlの濃度で刺激した。細胞数、細胞の大きさ、MMP-12 mRNAの発現、線維芽細胞関連因子のmRNA発現を定量RT-PCRで検討した。

・定量化RT-PCR法

培養系の細胞からのRNA抽出に関しても通法に従い全RNAを抽出後、逆転写反応によりcDNAを得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR反応によって各遺伝子mRNAを定量化した。転写レベルは7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いた。なお、BALF細胞および肺組織の一部をRNAlaterに浸漬し、冷蔵保存した(未解析)。

(倫理面への配慮)

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析、疫学研究は行っていない。動物試験を実施した研究は、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護の配慮の上で実施した。

C. 研究結果

C.1. 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によるデータベース作成(足利)

各ナノシリカ粒子を超純水、PBSおよび培地に懸濁し、超音波処理による分散状態の確認を行った。その結果、超純水にて懸濁(20mg/mL)後、40W, 5min処理+15min静置+5min超音波処理し、直ちに培地で希

積・濃度調製することで、均一な分散状態で細胞に適用することがわかった。

濃度設定試験を行ったところ、5品すべてが最高用量である 1000 µg/ml においても細胞生存率が 75%以上であり、細胞生存率 75%に相当する適用濃度である CV75 を算出できなかったため、1000 µg/ml を最高用量と設定した。いずれのナノシリカも CD54 の明らかな発現亢進が認められ、陽性の判定基準を満たしたことから、*in vitro* で抗原提示細胞を活性化することが示された。いずれのナノシリカも、細胞毒性を示さない濃度において陽性となった。

一方、CD54 の発現を亢進させる最小濃度 (EC200) や、CD54 の RFI の最大値は、ナノシリカによって大きく異なっていた。EC200 (CD54 発現濃度閾値) の値は、最小の NM-204 で 3.5 µg/mL、最大の NM-201 で 30.3 µg/mL と約 8.7 倍の差が見られた。これは、THP-1 の CD54 発現を亢進させるのに必要な濃度がナノシリカ間でも 9 倍近く異なることを示している。また、CD54 の相対発現量 (RFI) についても、最大の NM-202 で 4812.2% (すなわち約 48 倍)、最小の NM-201 で 434.7% (約 4.3 倍) と約 11.1 倍の差が見られた。

C.2. ナノマテリアルの物性と THP-1 細胞に与える影響の関連性解析および評価 (大野)

C.2.1 データマイニング

物理化学的性状データ項目は主に先行研究で得られた OECD からの試験情報に基づいて作成しており、約 30 項目のデータを収集した。収集・整理された物理化学的性状データシートおよび *in vitro* / *in vivo* 有害性情報シートは、多変量解析のため、データマイニングを実施した。

C.2.2 成分分析 (化学分析)

Ce(セリウム)は <0.01、Nb(ニオブ)は、<0.4 でそれぞれ検出された。

粒子解析は、比表面積は BET プロットの傾き及び切片を用い、BET 式より単分子層吸着量を求め、単分子層吸着量にガス分子一個の占める断面積 (分子占有断面積) をかけて算出した。一方、細孔分布は、BJH 解析による細孔分布曲線を用いて求めた。結果として MT-150A は、他の検体と比較すると大きな穴を占有されていた。TKP-102 は AMT-150A と同じ比表面積であるが、細孔径が小さく (1/3~1/4) なり、結果的にその容積も小さくなった。AMT-100 は比表面積が最大だが、MT-150A に比べて細孔径が非常に小さいため、その容積も小さくなり、小さな穴で占有されていることが推察された。AMT-600 に関しては比較的少数の大きな穴で占有されていることが推察された。MT-500B はガス吸着による細孔分布測定の上限 (100nm) 付近から上限以上においてガスの吸着が確認されたことから、細孔容積は求めることができなかった。また、TiDW の細孔は検出されなかった。

表面化学分析は、親水性および疎水性評価には二つの測定方法 (粒体浸透速度測定および粒体接触角測定) によって実施した。特に、TiDW の浸透速度は、4.9 と高い親水性の傾向を示した。一方、粉体接触角の結果より、TiDW、MT-150A、AMT-100、TKP-102 (ほぼ有意差なし) AMT-600 > MT500B となり、AMT-600、MT500B は疎水性の傾向を示した。6 検体の中で TiDW は浸透速度の結果と合わせて最も親水性が高いことが示唆された。

C.2.3 物理化学的性状の類似性評価 (階層的クラスタリング解析: HCA)

収集・整理した6種のTiO₂NPsの物理化学的性状についてデータマイニングをした後、PCA法および、階層的クラスタリング法(HCA)による類似度調査の解析を実施した。その結果、全6物質のTiO₂NPsの30項目についてクラスター化し類似性が示された。

C.2.4. *in vitro* 細胞毒性試験 (h-CLAT 試験法および MHLW GRANTS SYSTEM からの *in vitro* 細胞毒性試験報告結果)

TKP-102、AMT-600 の2物質間では Positive、AMT-100、TiDW の2物質間では Semipositive、MT-150A と MT-500B の2物質間では Negative の結果と判定された。

一方、MHLW GRANTS SYSTEM を情報源とした TiO₂ NPs の *in vitro* 細胞毒性試験結果報告については、1試験の酸化チタンの細胞毒性試験(細胞生存率%)および、1試験の酸化ストレス測定試験(8-OH-dG 測定)、酸化チタン A.B.C.D の4試験の免疫毒性試験(サイトカイン/アジュバント効果: IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、TNF α)について収集・整理した。

C.2.5. 物理化学的性状情報と *in vitro* 毒性試験結果 (h-CLAT 試験法) の多変量解析による関連性解析

物性データと *in vitro* 毒性試験結果データとの関連性解析について、直交部分的最小二乗回帰分析(OPLS: Orthogonal Partial Least Squares Regression)により実施した。毒性の Positive に影響している(傾向として高い)変数(物性)は Zr, Nb, Zeta potential(mV)が挙げられた。

C.2.6. *in vivo* 毒性試験 (MHLW GRANTS SYSTEM からの *in vivo* 毒性試験報告結果)

MHLW GRANTS SYSTEM から収集された TiO₂ NPs の *in vivo* 毒性試験報告結果について、肺への影響をエンドポイントとした4試験の吸入曝露試験、9試験の気管内投与試験、3試験の腹腔内投与試験、2試験の胸膜腔内投与試験データについて、HESS 搭載用に収集・整理した。

C.2.7 *in vivo* 試験結果について PCA 法による検体間の傾向についての多変量解析

MHLW GRANTS SYSTEM から収集された TiO₂ NPs の *in vivo* 免疫毒性試験報告結果(免疫毒性試験データ)について、6検体の TiO₂ NPs のうち3検体(MT-150A MT-500B AMT-100)の結果が得られていたことから、物性および *in vivo* 試験結果の共通の解析用検体として選択し、まず免疫毒性試験データだけを PCA 法により検体間の傾向を検証した。

C.2.8 *in vitro* 試験の h-CLAT 試験法毒性試験結果と *in vivo* 試験の毒性試験結果との関連性(紐付け)解析(OPLS法)

毒性が Positive に寄与する投与量は、インパクトが大きくエラーバーが小さい2変数(IgE_OVA2_125ng と IgG1_OVA2_125ng)がマーカーとして挙げられ、*in vivo* の免疫毒性試験では、この変数の上がり下がりを見ることで、毒性が Positive になる傾向があると考えられた。

C.2.9. ①物性⇔②*in vitro* 毒性試験データ⇔③*in vivo* 免疫毒性試験データ(腹腔内投与毒性試験・皮膚毒性試験の2試験結果)について、MOCA (Multiblock Orthogonal Component Analysis)による3ブロック間の統合解析の実施と共通変動の変数の探索(予試験)

①物性⇔②in vitro 毒性試験データ⇔③in vivo 免疫毒性試験データの3ブロック間では、in vivo 免疫毒性試験データは独立して変動をしていると推察された。

C.2.10 HESS DB 搭載のための情報整理およびデータシートの作成

HESS 搭載用に規格化されたシートをひな形として用いて今回情報収集した TiO₂ NPs のデータコンテンツに特化した項目を追加した。その結果、実施期間、被験物質、試験動物、試験条件情報等について約 28 項目と、毒性試験結果情報 (NOEL、LOEL) 血液学的検査、生理学的検査、尿の一般検査、病理組織学的所見等の約 511 項目について、新たな規格データシートを作成した。

C.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明 (飯島)

C.3.1. 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±11.0 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.3.2. 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。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 μg/ml, 118.44 μg/ml、銀イオンは 1.64 μg/ml, 0.98 μg/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。

C.3.3. 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) で曝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。

C.3.4. 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) での曝露において、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。

C.3.5. 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 TiDW 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.3.6. 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 細胞の CD86 および CD54 発現については、陽性と判断されるものもあったが、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。

C.4. 異物除去に重要な役割を果たすマクロ

ファージの機能に基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価法の基盤となる情報の整備 (高橋)

C.4.1 検体の高分散化処理の条件検討

TiDW 原末と TBA を混合し、超音波処理良好な懸濁液を得た。走査型電子顕微鏡による観察の結果、TiDW の原末の繊維長 $6.9 \pm 3.4 \mu\text{m}$ ($N=223$)、直径は $361.3 \pm 108.6 \text{nm}$ ($N=105$) であった。一方、超音波処理 2 分間、15 分間における繊維長は、それぞれ $7.0 \pm 3.3 \mu\text{m}$ ($N=245$)、 $7.0 \pm 3.5 \mu\text{m}$ ($N=240$) であり、原末と同等の繊維長、分布が維持されていた。TiDW の繊維長のヒストグラムから、 $2.5 \mu\text{m}$ 以下の繊維 5.4%、 $5 \mu\text{m}$ 以上は 94.6%、 $10 \mu\text{m}$ 以上は 17.9% であった。

C.4.2 マウス全身曝露吸入実験

TiDW の 5 日間反復全身曝露吸入実験における平均質量濃度は $25.0 \pm 3.2 \text{mg}/\text{m}^3$ (平均値 \pm SD) であった。3 回の測定を行った MMAD は $2,251 \text{nm}$ ($\sigma_g: 3.2 \sim 4.9$) であった。エアロゾルの累積分布から、粒子径 $1,000 \text{nm}$ から急激に立ち上がる分布であった。6 時間の吸入曝露実験において使用した総検体量は、 880mg である。6 時間の曝露チャンバーの総換気量は 11.7m^3 であることから名目上の濃度は $75.4 \text{mg}/\text{m}^3$ と計算される。実際に測定した濃度の平均は $25.0 \text{mg}/\text{m}^3$ から、エアロゾル化効率を計算すると 33.1% であった。CPC のデータは、6 時間の曝露実験の後半で値が低下する傾向にあった。

なお、実験に供したマウスは定期解剖までの間、いずれも体重推移に異常は認められなかった。

C.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究 (石丸)

C.5.1 TiDW の吸入曝露実験

TiDW の吸入曝露後 4 週での肺胞洗浄液 (BALF) 中の細胞数は、対照群と有意な差はないものの、増加する傾向にあった。曝露後 8 週においても TiDW 曝露群と対照群では有意な差は認められなかった。BALF 細胞の直径に関しては、曝露後 4 週ならびに 8 週で、TiDW 曝露群と対照群で差は見られなかった。

BALF 細胞に関して、フローサイトメータを用いて、各種免疫細胞分画を解析したところ、血球系細胞 ($\text{CD}45.2^+$) 中の肺胞マクロファージ (AM)、好酸球 (Eo)、単球 (Mo) の割合に関して、曝露後 4 週では対照群と TiDW 曝露群では差が認められなかった。また、AM ならびに Mo を含めた $\text{F}4/80^+$ (未熟ならびに成熟 AM を含む) の細胞分画においても両者で差は見られなかった。さらに、 $\text{F}4/80^+$ AM における各種マクロファージ分画を検討してみると、 $\text{CD}11\text{b}$ (正常マクロファージでは陰性)、 $\text{CD}192$ (M1 マクロファージマーカー / 炎症性)、 $\text{CD}206$ (M2 マクロファージマーカー / 抗炎症性) 分画に関して、対照群と TiDW 曝露群で差は認められなかった。曝露後 8 週における解析においても、AM、Eo、Mo ならびに $\text{F}4/80^+$ AM 分画の割合は TiDW 曝露で変化は認められず、 $\text{F}4/80^+$ AM の各種分画においても両者で変化は観察されなかった。それぞれの分画での経時的変化を検討すると、Eo、Mo、さらに、 $\text{CD}11\text{b}^+$ AM、 $\text{CD}192^+$ AM、 $\text{CD}206^+$ AM での 4 週と 8 週での割合に変化はあるものの、対照群と TiDW 曝露群では有意差は観察されなかった。

BALF 細胞中の $\text{F}4/80^+$ AM における活性化マーカーとして、 $\text{CD}54/\text{ICAM}-1$ の発現に関して検討すると、曝露後 4 週では対照群と TiDW 曝露群では変化は認められなかったが、曝露後 8 週では、TiDW 曝露によって対照と比較して有意に陽性分画が上昇していた。

また、CD54の発現を蛍光強度によって検討したところ、曝露後4週では対照群とTiDW曝露群では変化は見られず、曝露後8週では、割合と同様に対照群に比較してTiDW曝露群で高い値を示していたが、有意な変化ではなかった。

また、スカベンジャー受容体の一つであるCD136 (macrophage-stimulating protein receptor, protein-tyrosine kinase 8)の発現に関して検討を加えたところ、曝露後4週から8週で全体に発現の上昇は見られたものの、対照群とTiDW曝露群のAMにおける変化は観察されなかった。さらに、CD136⁺CD54⁺細胞の割合に関しても、曝露後4週から8週での増加は見られたものの、対照群とTiDW曝露群では有意な変化は認められなかった。

一方で、脾臓におけるCD54およびCD136の発現を確認したところ、曝露後4週ならびに8週において、対照群とTiDW曝露群でいずれも変化は観察されなかった。

C.5.2 In Vitroの実験

RAW264.7細胞にT-CNT (125 ng/ml)を添加して24時間経過後、トリパンブルー染色を施し細胞の形態を顕微鏡にて観察すると、対照細胞に比較してT-CNT細胞の刺激では細胞質が広がり、細胞が大きくなっていることが明らかになった。細胞の直径を自動計測装置で測定すると、T-CNT曝露にて有意に長くなることがわかった。また、トリパンブルー染色を用いた生死を評価すると、T-CNT添加細胞で対照細胞に比較して、有意にcell viabilityが低下することが判明した。T-CNT処理細胞におけるMMP-12 mRNA発現を定量RT-PCRで検討すると、対照細胞に比較して有意にMMP-12 mRNA発現が上昇していた。さらに、RAW264.7細胞をT-CNTで24時間した際の培養上清をNIH3T3細胞に添加後24時間での線維化関連因子のmRNA

発現を定量RRT-PCRで検討すると、対照上清にて刺激した細胞に比較して、Col1A2、Col3a1、ColIV、smooth muscle actin (SMA)のmRNA発現が有意に高い値を示していた。一方で、ヒト単球細胞株のTHP-1細胞を用いて、T-CNTの刺激を加えると、100 ng/mlでの刺激では対照処理細胞に比較して有意にMMP-12 mRNA発現が上がっているが、RAW264.7ほどの上昇効果はなかった。そこで、THP-1細胞のT-CNT刺激にLPSを共に刺激を加えると、LPS刺激のみの細胞に比較して有意にMMP-12 mRNA発現が上昇した。

D. 考察

D.1. 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によるデータベース作成 (足利)

これまでナノシリカ処理により、in vitroにおいて樹状細胞がCD86やIL-1bの発現を亢進することが報告されてきた。今回検討した5種全てのナノシリカがTHP-1細胞のCD54発現を非常に強く亢進すること、さらにその亢進の程度が検体により異なることを明らかとした。

CD54の発現を亢進させる最小濃度(EC200)は、in vivo皮膚感作性試験であるLLNA (Local Lymph Node Assay, OECD TG429)における強度の指標であるEC3値と相関性が認められており、EC200が低いほど感作性強度が強くなる傾向がある。この点で今回検討した5種のナノシリカを検討すると、毒性の強度は強い順に、NM-204, NM-200, NM-202, NM-203, NM-201となった。また、誘導されたCD54の相対発現量(RFI)も、最大のNM-204とNM-201では約8倍異なっており、こちらについても大きさの順に並べると、NM-202, NM-204, NM-203, NM-200, NM201となった。

今回検討したナノシリカは、OECDにおいて様々な物性や *in vivo* における毒性がすでに評価されているため、今後今回得られた h-CLAT の結果と、既知の物性や毒性情報との比較を行う予定である。こうして構築したデータセットを解析することで、標準化された試験系である h-CLAT 法の NM の免疫毒性試験としての有用性を検証し、ナノシリカの物性と抗原提示細胞活性化の関係を明らかにする予定である。

また、無機化合物の固体であるナノシリカが THP-1 細胞を活性化させるメカニズムは、抗原として提示される一般的な感作性物質によるそれとは異なり、いわゆるアジュバント効果と考えられる。生活環境中の NM による免疫応答の増悪が指摘されており、ウイルスなどの抗原により生じる抗原提示細胞の活性化が、NM により促進されるかどうかを検討する必要がある。この点については次年度検討を行う予定である。

D.2. ナノマテリアルの物性と THP-1 細胞に与える影響の関連性解析および評価 (大野)

成分分析の定性分析による Ce の検出は、定量分析結果から偏析の可能性として考えられた。Nb(ニオブ)は、製造元より酸化チタン製造に用いる原料に 0.1-0.2% 程度含まれている情報から、本試験結果と一致し二酸化チタンナノ粒子そのものに含有していたものではないことがわかった。また、TiDW に関して細孔が検出されなかった理由は、針状の形状によるものと考えられた。一方で、検出された細孔については微粒子の凝集による空壁である可能性も考えられた。TiDW は、他の検体に比べて、ばらつきが大きかったが、その原因 (要因)

として、検体調整で一様な状態の作成が難しくダメがしやすい様子がみられ、針状結晶で圧縮成形のばらつきが発生していることが示唆された。

6 種の TiO₂ NPs の物性データの階層的クラスタリング解析では、大きく 3 ブロックでクラス分類された。また、3 つのクラス分類された結果と *in vitro* 毒性試験結果 (h-CLAT 試験法結果) との比較では、毒性結果との関連性は見いだせなかった。そこで、物性データと有害性データとの関連性について調べるため、6 種の TiO₂ NPs について収集した物性データと *in vitro* 毒性試験データ (h-CLAT 試験法結果) を用いて、OPLS 法による多変量解析を実施した。その結果、毒性と関連する変数 (物性項目) が横軸から探索可能であることが示唆された。さらに解析を進めた結果、毒性に寄与する変数 (物性項目) として、毒性が Positive な結果に関連する相関の強い変数 (物性項目) は、Crystal Phase (Anatase)、P、Zr、Nb、Zeta potential (mV)、一方、毒性が Negative な結果に関連する相関の強い変数 (物性項目) は、Crystal Phase (Rutile)、Pore volume (cm³/g)、Ca、Na、Porediameter (nm) となり、毒性が Positive および Negative に対する相関の高い主な物性項目の組み合わせとして挙げられた。毒性が Positive である物性項目の組み合わせから、結晶形態の Anatase 型は Rutile 型よりも毒性情報として比較的報告があることや、impurity の量、一次粒子径よりも分散性に伴う二次粒子径の影響が毒性に寄与していることを反映していると考えられた。

次に、*in vitro* 試験の毒性試験データと *in vivo* 試験の毒性試験データとの関連性解析 (紐付け) を行うため、Y 変数を h-CLAT 試験法データ (h-CLAT2: 数値化したもの)、X 変数を *in vivo* 毒性試験データとして

OPLS 法にて検証した結果では、in vitro 毒性試験結果に関連する相関の高い in vivo 毒性結果が導き出された。従って、本解析法により in vitro/in vivo の毒性試験結果との紐付けが可能であることが示唆されるものであった。さらに、本解析結果は、in vivo 毒性試験データのための PCA 法による解析でも同様の傾向が得られていることから、本手法の有用性を証明するものであった。

MOCA 法はマルチブロック解析により全ブロック間で共通している部分だけを抽出してくる手法である。一方で、in vitro の h-CLAT 試験法の結果と in vivo の毒性試験結果の関連性については OPLS 法により検証されたにもかかわらず、MOCA 法ではこの情報が計算過程で埋もれてしまっていた。この要因として、今回、物性のデータが一番確からしくでていることより、物性のデータにかなりひっぱられていたと考えられた。さらに、in vivo 毒性試験結果での PCA 法の解析結果を見直すと、全体的にばらつきが大きかった要因もあり、MOCA 法による解析でこのような部分の影響が計算過程で埋もれてしまったものと考えられた。

D.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明 (飯島)

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、銀ナノ粒子の曝露において、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。

銀ナノ粒子の曝露において、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。

D.4. 異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの機能に基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価法の基盤となる情報の整備 (高橋)

粒子状物質の吸入において、粒径は内径が徐々に狭くなる鼻腔から肺胞に至る各部位への沈着量を決める重要な因子であり、一般に MMAD を指標としている。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。ヒトが現実的にナノマテリアルに曝露される環境下では、緩徐な風速であるため気相にナノマテリアルの凝集体/凝固体は速く沈降する。また、ヒトの上気道は長いため、凝集体/凝固体が効果的に取り除かれて肺胞レベルには高度に分散されたものが優先的に到達すると想定される。一方、実験動物を用い

た粉体の吸入曝露試験では、エアロゾルの均一性を保つためチャンバー内の空気は強く攪拌されている。凝集体/凝固体を含む検体をエアロゾル化すると、ヒトに比較して細く短い気道を有するげっ歯類では、この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊維の吸入を阻害あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。以上のことから、吸入曝露試験において実験動物からヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集体/凝固体を除去した上で分散性が高い検体を使用する必要がある。

本分担研究で用いた Taquann 法は TBA を用いて液相で検体を分散、効率的に濾過を行い、凍結乾燥により表面張力による検体の再凝集を防ぎ乾燥検体を得ることを特徴としている。検体の物理化学的性質に依存しない汎用性の高い方法である。濾過工程における検体の収率を上げるためには検体と TBA の混合液を超音波処理により十分に分散させる必要があり、ナノマテリアルでは超音波処理が汎用されている。超音波処理は溶液中に圧力差によるキャビテーションを発生させることで、溶液中の物質に激しい衝撃を与えて分散を図る方法であるため、強力な超音波処理では、TiDW の繊維長に影響を与える可能性がある。繊維状物質は、粉体とは異なり、繊維長に依存した生体反応を有するため繊維長の分布が処置後も保持される点は重要であると考えられる。

その代表例がアスベストによる中皮腫発がんである。過去にアスベスト代替品が多数開発された際に、これらの中皮腫誘発性と繊維長、繊維径との関係がラット腹腔内投与により検討されている。その結果、繊維長が 10 μm 程度、直径が 100 nm 程度の線維の中皮腫誘発性が高いことが示されている

(Stanton & Pott 仮説、1978)。一方、ナノマテリアルの生体影響評価の初期には、ナノマテリアルを分散することに注力した実験が行われ、その結果、過度な分散処理により原末の繊維長を短くするまで機械的分散処理を行い、多層カーボンナノチューブに中皮腫発がん性がないと結果された報告がある (Muller J et al., 2009)。

本分担研究では、原末の繊維長を維持した状態で高分散検体を得るため、分散条件のなかで最も影響の大きい超音波処理時間の検討を行い、各処理検体の繊維長を走査型電子顕微鏡像により測定して比較した。TiDW は TBA に比較的容易に分散し、少なくとも 15 分の超音波処理により繊維長が短縮することは認められなかったことから、原末の繊維長を維持した高分散検体を得ることが達成できた。

全身曝露吸入実験では、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 を使用した。本装置では、以前のバージョンに改良を行い、カートリッジ装填を自動化することにより OECD 吸入毒性ガイドライン (TG413) で必要とされる 6 時間/日の吸入曝露を可能とした装置であるが、連日稼働させる検討には至っていなかった。今年度、5 日間連続稼働を達成したことにより、より広い範囲の条件で曝露実験が可能であることが示された。一方、排気装置フィルターの負荷が大きくなり、HEPA フィルターの交換を頻繁に実施することが必要となるなど、連続稼働を行う際の課題も明らかになった。これは、粉体の吸入曝露装置に共通の課題であるが、効率的に実験を進めるためには排気フィルターの大型化に加えて、容易に交換可能な排気フィルター装置の開発が必要かもしれない。

TiDW のエアロゾル特性のうち、

MMAD_{2,251} nm であり肺胞領域まで到達可能とされる MMAD < 3 μm を達成している。エアロゾルの粒径分布の指標となる σ_g は 3.2~4.9 と TG413 で推奨される 1~3 と比較すると、若干広い範囲の粒度分布であることが示唆される。エアロゾルの累積分布 (図 3) において明らかであるように、TiDW エアロゾルは、累積粒子径が 1000nm から急激に立ち上がる分布であるため、このような値を示すと考えられる。CPC は曝露の後半で値が低下する傾向にあった。この理由として、曝露チャンバー内からのサンプリングに用いている管の目詰まりが考えられた。

TiDW 曝露によるマウスは、体重推移においては影響が認められていない。今後、サンプリングした肺の病理組織と肺負荷量測定を行い、TiDW の影響を明らかにする計画である。

D.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究 (石丸)

針状酸化チタン (TiDW) の吸入曝露後、4週間および8週間経過した時点でのBALF細胞の変化を検討したところ、細胞数、細胞の大きさに関して、対照群との有意な差は見出せなかった。さらに、肺胞マクロファージ、好酸球、単球の割合に関しても、TiDWの曝露による変化は4週、8週で観察されなかった。また、肺胞マクロファージのM1/M2タイプへの分化にもTiDWの曝露による影響は確認できなかった。T-CNT曝露によりCD11b+/highAMが増加することが報告されているが (PLoS One 2018)、TiDW曝露での変化は観察されなかった。8週までの経時的変化に関しても、対照群とTiDW曝露群で差は確認されなかった。肺胞マクロファージの活性化に関して、CD54+細胞が曝露8週に

においてTiDW曝露群が対照群に比較して有意に上昇していたことから、AMの活性化の指標として有用である。スカベンジャー受容体の一つであるCD136に関しては、この曝露系では変化が認められなかった。本吸入曝露実験において、針状酸化チタンの曝露ではMWCNTの曝露で見られたような大きな変化は観察されなかったNMの形状および性状によって肺におけるマクロファージによる免疫反応は大きく異なっているものと想定される。今後BALFおよび肺組織における各種遺伝子mRNA発現に関して解析、BALF中の炎症性サイトカインの解析などを進める予定である。

In vitroの実験では、NMのマクロファージに対する直接的な影響が評価可能になる。今年度の実験ではマウス単球細胞株であるRAW264.7細胞ならびにヒト細胞株であるTHP-1細胞を用いて、in vitroでのT-CNTの影響について検討した。すでに、T-CNTの吸入後の慢性影響に関して、T-CNTの曝露でMMP-12を高発現する肺胞マクロファージが増加することを報告している (PLoS One 2018) ことから、in vitroにおけるマクロファージへのT-CNT刺激による影響に関して、MMP-12発現を指標に評価検討したところ、in vivoで観察された所見を反映する結果が得られた。また、T-CNTの吸入曝露実験においても長期観察にて、肺組織の線維化が進み、コラーゲン (Type IV) の増生が亢進していることを報告している (PLoS One 2018)。今回のT-CNT処理RAW264.7細胞の培養上清を用いた実験系でも、線維芽細胞の線維化増生に関わる因子のmRNA発現が亢進していたことから、マクロファージから産生される因子が線維芽細胞を直接活性化している可能性が示された。MMP-12が直接作用していたかどうかは今後の検討が必要であ

るが、T-CNTに対する慢性炎症の機序を明らかにする契機になるものと考えられる。また、NMの影響を直接評価できるモデル系として、本培養系は有用であることが示された。

E. 結論

E.1. 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によるデータベース作成（足利）

今回 h-CLAT 法を検討した 5 種のナノシリカ(NM-200、NM-201、NM-202、NM-203 及び NM-204)は、いずれも *in vitro* で抗原提示細胞を活性化することが示された。特に NM-202、NM-203、NM-204 は CD54 の発現をコントロールに比べ 20 倍以上に亢進させ、非常に強い抗原提示活性化能があると考えられた。今後、今回検討したナノシリカの物性および *in vivo* における毒性と、本検討結果の比較を行うことで、物性と毒性、あるいは *in vitro* 試験結果と *in vivo* 試験結果との関係性を明らかとする。

さらに、無機化合物の固体であるナノシリカやカーボンナノチューブが抗原提示細胞を活性化させるメカニズムは、ウイルスなど抗原物質によるそれとは異なっていると考えられ、今後より詳細な解析が必要と考える。

E.2. ナノマテリアルの物性と THP-1 細胞に与える影響の関連性解析および評価（大野）

6種の二酸化チタンNMについて、物性は成分分析と細孔分布・比表面積測定の実施により、各種二酸化チタンナノ粒子のナノ特異的な物性を明らかにした。二酸化チタンナノ粒子の有害性情報に関する *in vitro* 毒性試験データは、OECDテストガイドライン

法h-CLAT試験において6種の二酸化チタンナノ粒子のTHP-1細胞を用いた細胞生存率、CD86およびCD54発現に与える影響の結果について纏めた。*in vivo*有害性情報は、二酸化チタンナノ粒子のこれまで厚生労働科学研究で実施された結果（厚生労働科学研究成果データベースMHLW）や、公開された文献等から取得した。特に、肺に炎症所見のある試験結果については、HESSデータベースへの搭載用にデータシートへ纏めた。その後、これらの収集した物性や*in vitro/in vivo*の有害性の収集データについては、解析用データに整理・データマイニングし、物性についての特性解析、物性と有害性データとを紐づける関連性解析、*in vitro/in vivo*毒性試験間での毒性を紐づける関連性解析、物性/*in vitro*毒性試験結果/*in vivo*毒性試験結果の3ブロック間の共通解析を実施した。その結果、有害性評価に鍵となる物理化学的性状の組み合わせや様々な多変量解析手法の有用性が見出された。今回のMOCA法による解析では、*in vivo*毒性試験結果の相関が見いだせなかった。これは、計算過程でインパクトの強い物性データに引っ張られてしまったと考えられた。物性と*in vitro*毒性試験結果の関連性については、これまで解析でできていたように、説明（計算）がされやすいことが示唆され、MOCA法では、物性と*in vitro*毒性結果の関連性の解析部分が、やはり一番に相関として見出されたものであった。従って、相関が見つけにくい*in vivo*毒性試験結果については計算されてこなかったことから、本試験解析結果で記載した3.から8.の解析手順で丁寧に作成モデルを検証し追っていくことが重要であると結論づける。

E.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明（飯島）

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。

E.4. 異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの機能に基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価法の基盤となる情報の整備（高橋）

TiDW の高分散乾燥検体の調製方法を確立した。この検体を用いて、マウスに1日6時間、5日間連続全身曝露吸入を実施した。その結果、25.0mg/m³の質量濃度で、MMAD 2,251 nmのエアロゾルを発生することが可能であった。

E.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究（石丸）

針状酸化チタンの吸入曝露実験では、肺胞マクロファージの分画に著変が見られなかったことから、NMの形状および性状によって免疫反応に相違がある可能性が示された。T-CNTを用いたin vitroの実験によってマクロファージからのMMP-12を介した慢性炎症機転が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

- 山田 隆志, 足利 太可雄, 小島 肇, 広瀬 明彦: AOP (Adverse Outcome Pathway ; 有害性発現経路) に基づいた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ. *Yakugaku Zasshi*. 2020;140(4):481-484. doi: 10.1248/yakushi.19-00190-1
- 小島幸一, 足利太可雄, 安達玲子, 佐藤一博, 瀬崎拓人, 武吉正博, 福山朋季: 皮膚感作性試験代替法 : ARE-Nrf2 luciferase LuSens Test Method (LuSens法). *AATEX-JaCVAM*, 2020;9(1), 43-57.
- 足利太可雄, 小島肇, 平林容子: 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 令和元年度報告書. *AATEX-JaCVAM*, 2020;9(1), 58-64.
- 尾上誠良, 上月裕一, 豊田明美, 笛木修, 細井一弘, 小島肇, 足利太可雄, 小野寺博志: 光安全性評価の現状と課題, *YAKUGAKU ZASSHI*, 2021; 141, 111-124.
- Hoyo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D, Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins, *Cancer Sci*, 2021 Mar 4. doi: 10.1111/cas.14873.
- Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y, Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat

- lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharm.* 2021 Feb 15;595:120241. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120241. Epub 2021 Jan 21.
7. 高橋祐次、ナノサイズプラスチックの評価、*BioIndustry*, 37(9)、p59-67, 2020.
 8. Sato M, Arakaki R, Tawara H, Tsunematsu T, Ishimaru N. Formation of Autoimmune Lesions is Independent of Antibiotic Treatment in NOD mice. *Int J Mol Sci*, 2021, 22,3239. doi: 10.3390/ijms22063239.
 9. Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A, Fujimori S, Ushio A, Yamashita F, Ishimaru N, Yin D, Cam M, Kelly M, Awasthi P, Takada T, Takahama Y. Thymoproteasome hardwires TCR repertoire of CD8+ T cells with cortical positive selection independent of negative selection. *J Exp Med.* 2021, 218(4):e20201904. doi: 10.1084/jem.20201904.
 10. Kurosawa M, Shikama Y, Furukawa M, Arakakai R, Ishimaru N, Matsushita K. Chemokines upregulated in epithelial cells control senescence-associated T cell accumulation in salivary glands of aged and Sjögren's syndrome model mice. *Int J Mol Sci.* 2021, 22:2302. doi: 10.3390/ijms22052302.
 11. Tsunematsu T, Arakaki R, Kawai H, Ruppert J, Yamada A, Tsuneyama K, Ishimaru N, Earnshaw WC, Pagano M, Kudo Y. APC/C-Cdh1 is required for the termination of CPC activity upon mitotic exit. *J Cell Sci.* 2020, 133(18): jcs251314. doi: 10.1242/jcs.251314.
 12. Kisoda S, Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Tsunematsu T, Jin S, Arakaki R, Ishimaru N, Kudo Y. Prognostic value of partial-EMT-related genes in head and neck squamous cell carcinoma by a bioinformatic analysis. *Oral Dis.* 2020, doi: 10.1111/odi.13351.
 13. 石丸直澄 (分担) わかりやすい病理学改訂第7版 45-70, 317-322, 2021 ISBN978-4-524-22654-2
 14. 石丸直澄 難病研究の進歩 シェーグレン症候群 生体の科学 71 (5) :476-747, 2020 ISSN 0370-9531
- G.2. 学会発表
1. 足利太可雄, 鈴木政晴, 安部賀央里, 栗本雅之, 山田隆志, 頭金正博: 非動物実験による皮膚感作性のリスク評価と毒性学的懸念の閾値コンセプトの開発, 第45回日本化粧品学会 (2020.6.12-13, 誌上開催)
 2. 鈴木政晴, 安部賀央里, 頭金正博, 山田隆志, 足利太可雄: IATA(統合的)アプローチに基づいた皮膚感作性における in silico 予測モデルの開発, 第47回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29-7.1, web 開催)
 3. 吉田邦嵩, 石川晋吉, 橋爪恒夫, 足利太可雄: ヒト気管支上皮と抗原提示細胞の共培養系を用いた化学物質の in vitro 呼吸器感作性評価法の開発, 第47回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29-7.1, web 開催)
 4. 高橋祐次, 種村健太郎, 相崎健一, 北嶋聡: 急性毒性試験の近代化によるテトロドトキシンの中枢影響評価, 第47回日本毒性学会学術年会(2020.6.29, web 開催)
 5. 大久保佑亮, 嘉本海大, 高橋祐次, 北嶋

- 聡、太田裕貴: 覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパルスオキシメーターの開発、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.30, web 開催)
6. 大野彰子, 渡邊昌俊, 広瀬明彦: 多変量解析を用いたナノマテリアルの毒性評価手法の開発, 第 47 回日本毒性学会学術集会 (2020. 6.29-7.1, web 開催)
 7. 新垣理恵子、佐藤真美、木曾田暁、Shao Wenhua、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄: 多層化カーボンナノチューブと酸化チタン吸入曝露による肺胞マクロファージの動態 第 109 回日本病理学会総会 (2020.7.1~31, web 開催)
 8. 石丸直澄 口腔腫瘍の病理と遺伝子異常—癌形質と微小環境—オーバービュー 第 109 回日本病理学会総会シンポジウム (2020.7.1-31, web 開催)
 9. 佐藤真美、新垣理恵子、牛尾綾、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群の標的臓器における IL-33 の役割 第 109 回日本病理学会総会 ポスター発表 (2020.7.1-31, web 開催)
 10. 常松貴明、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 染色体パッセンジャー複合体による胎児性癌の未分化性維持機構 第 109 回日本病理学会総会 (2020.7.1-31, web 開催)
 11. Fukuhara K, Ohno A: Generation of reactive oxygen species following photoirradiation of nitromusks, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
 12. Ohno A, Watanabe M, Hirose A: Application to toxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
 13. 佐藤真美、牛尾綾、新垣理恵子、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける肺病変の解析 ポスター発表 第 62 回歯科基礎医学会学術大会 (2020.9.11-10.9, web 開催)
 14. 常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 多角的アプローチによる口腔癌の発生・進展の分子機構の解明 第 62 回歯科基礎医学会学術大会 先端歯学国際教育研究ネットワーク・シンポジウム「歯学研究の今昔と次世代研究」(2020.9.11-10.9, web 開催)
 15. 吉田邦嵩, 石川晋吉, 橋爪恒夫, 足利太可雄: ヒト気管支上皮と抗原提示細胞の共培養系を用いた化学物質の in vitro 呼吸器感作性評価法 の開発, 第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29-7.1, web 開催)
 16. 三浦結美, 足利太可雄, 板垣 宏, 飯島一智: 表皮モデルと免疫細胞を組み合わせたタンパク質感作性評価システムの開発, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
 17. 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)
 18. 鈴木政晴, 安部賀央里, 頭金正博, 山田隆志, 足利太可雄: Cosmetics Europe database を使用した in silico 皮膚感作性予測回帰モデルの開発, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)

19. 赤木隆美, 村上将登, 宮崎裕美, 田口浩之, 池田英史, 加藤雅一, 山田知美, Mura S, Couvreur P, 足利太可雄, 小島肇, 明石 満: 三次元培養皮膚モデル LbL-3D Skin を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
20. 水町秀之, 渡辺美香, 生悦住茉友, 梶原三智香, 安田美智代, 水野 誠, 今井教安, 佐久間めぐみ, 芝田桃子, 渡辺真一, 上野順子, Basketter D, Eskes C, Hoffmann S, Lehmann D, 足利太可雄, 寒水孝司, 武吉正博, 宮澤正明, 小島 肇: 皮膚感作性試験代替法 Epidermal Sensitization Assay (EpiSensA) の Validation 研究(施設内再現性 Phase I), 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
21. Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J, Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice, 9th Nano Conference (2020.11.12, Virtual meeting)
22. 浅野哲秀, 笠松俊夫, 北本幸子, 山本美佳, 足利太可雄, 小島 肇, Bhas42 細胞形質転換試験法 (Bhas 42 CTA) の評価, 日本環境変異原学会第 49 回大会 (2020.11.27, 沼津, 静岡および web 開催)
23. 高橋祐次, 森田絃一, 辻 昌貴, 菅 康佑, 相崎健一, 大久保佑亮, 種村健太郎, 北嶋 聡, シンポジウム 4 『医薬品以外の毒性から学ぶ』, 急性毒性試験の近代化による毒性機序研究, 日本毒性学会 医薬品毒性機序研究会主催, 第 3 回医薬品毒性機序研究会 (2021.1.15, web 開催)
24. 石丸直澄 自己免疫疾患モデルを用いた発症機序の解明と治療戦略 東京工業大学化学生命科学研究soウェブ講演会 (2021.1.28, web 開催)
25. Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J: Interim report of the 4-week-interval intermittent whole body inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice, SOT 2021 Annual Meeting Virtual (2021.3.17, Virtual meeting)
26. 福原 潔, 中西郁夫, 大久保敬, 今井耕平, 水野美麗, 松本謙一郎, 大野彰子: C-メチルフィセチンのラジカル消去作用, 日本農芸化学会 2021 年度大会 (2021. 3.18-3.21, web 開催)
27. 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 Virtual Annual Meeting (2021.3.22, USA, Virtual meeting)
28. 大野 彰子, 沖山 佳生, 広瀬 明彦, 福原 潔: ニトロ多環芳香族炭化水素の構造と変異原性に関するドッキングスタディ, 日本薬学会第 141 年会 (2021. 3.26-3.29, web 開催)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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THP-1細胞への影響評価に関する研究
研究分担者 足利太可雄
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官

研究要旨

本分担研究は、様々な特徴を有する各種 NM の抗原提示細胞活性化能の評価を行うことで in vivo 試験や物性値の測定および情報収集から得られた知見と統合データセットを確立することを目的としている。

本年度は、THP-1 細胞の活性化を指標とする OECD 皮膚感作性試験テストガイドライン 442E (h-CLAT) を用いて、二酸化ケイ素ナノマテリアル（以下、ナノシリカ）5 種について検討を行った。被験物質は、OECD において物性と毒性情報が収集されている NM-200, NM-201, NM-202, NM-203 および NM-204 とした。まずそれぞれのナノシリカについて分散条件を検討した結果、5 品すべてのナノシリカが均一な分散状態で細胞に適用できる条件を見出した。そこで本分散条件により調製したナノシリカ懸濁液を用いて用量設定試験を行った結果、いずれの被験物質においても、細胞生存率が 75% 以下となる用量が見られなかったため、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を最高用量とし、公比 $\sqrt{10}$ で希釈した計 8 用量を設定した本試験を各 3 回実施した。本試験では、被験物質を細胞に 24 時間曝露し、細胞表面の CD86 及び CD54 の発現量をフローサイトメトリーによって測定した。その結果、今回検討したすべてのナノシリカは in vitro で抗原提示細胞を活性化することが示された。特に NM-202, NM-203, NM-204 は CD54 の発現をコントロールに比べ 20 倍以上に亢進させ、非常に強い抗原提示活性化能があると考えられた。今後、本検討結果と、ナノシリカの物性および in vivo における毒性との比較を行うことで、毒性と物性の関係性および in vivo における毒性と in vitro 試験である h-CLAT との関係性を明らかにする。

A. 研究目的

本研究は、短期吸入曝露された各種 NM の免疫系に与える影響について in vitro/in vivo 試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行い、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している。そのため本分担研究では、様々な特徴を有する各種 NM の抗原提示細胞活性化能の評価を行うことで in vivo 試験や物性値の測定および情報収集から得られた情報との統合データセットを確立する。

B. 研究方法

今年度は二酸化ケイ素ナノマテリアル（以下、ナノシリカ）5種について検討を行った。被験物質は、OECDにおいて物性と毒性情報が収集されているNM-200, NM-201, NM-202, NM-203およびNM-204とした。LPSによる影響を避けるため、試験には乾熱滅菌（220°C、18時間）した被験物質を使用した。抗原提示細胞の活性化能を評価とする試験法として、皮膚感作性試験法であり、OECDテストガイドライン化されているh-CLAT (OECD TG442E)を用いた。h-CLATは被験物質が細胞適用時に均一に分散されていることが必要のため、プローブ型超音波装置 (Digital Sonifier 250D、最大出力200W) を用い、様々な条件で分散させ、最終的に細胞培養液中での分散状態を確認した。

h-CLAT試験は、被験物質適用のための懸濁液を調製し、以下のように行った。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 μ lおよび各被験物質の分散液500 μ lを添加し、CO₂インキュベーター内で24時間静置した。被験物質の曝露濃度は予備試験の結果から最高濃度を1000 μ g/mlとし、公比 $\sqrt{10}$ で希釈して合計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。独立した試験を3回行った。陽性判定基準は、OECDテストガイドラインに従い、3回の試験のうち2回以上の試験で、1濃度でもCD86の発現量(RFI)が150%以上、またはCD54の発現量(RFI)が200%以上になった場合とした。

(倫理面への配慮)

全てin vitro試験であり、倫理上の問題はないと考える。

C. 研究結果

C.1. 分散条件

計10分間の超音波照射により良好な分散状態となると判断されたため、超音波照射条件は40W (200W \times 20%) で計10分間実施 (氷上で5分間超音波照射し、室温で15分間静置した後、氷上で5分間超音波照射) とした。

また、媒体検討としてPBS(-)及び超純水を用いた20 mg/mLの調製原液及び調製原液を培地で希釈した1 mg/mLの調製液について、媒体を検討し、より分散状態が良好であった超純水を媒体に選択した。

C.2. h-CLAT試験結果

定法に従い、濃度設定試験を行ったところ、5品すべてが最高用量である1000 μ g/mlにおいても細胞生存率が75%以上であり、細胞生存率75%に相当する適用濃度であるCV75を算出できなかったため、1000 μ g/mlを最高用量と設定した。各被験物質の3回の本試験におけるRFI及び細胞生存率の平均値及び標準偏差を表1に示す。いずれのナノシリカも陽性の判定基準を満たしたことがか

ら、*in vitro*で抗原提示細胞を活性化することが示された。図1から図5に、それぞれのナノシリカのCD86およびCD54の相対発現量と細胞生存率のグラフを示した。いずれのナノシリカも、細胞毒性を示さない濃度において陽性となった。

一方、図1から図5に示すように、CD54の発現を亢進させる最小濃度(EC200)や、CD54のRFIの最大値は、ナノシリカによって大きく異なっていた。それぞれのナノシリカの活性化能の指標となる値を表2に示した。EC200 (CD54発現濃度閾値)の値は、最小のNM-204で3.5 µg/mL、最大のNM-201で30.3 µg/mLと約8.7倍の差が見られた。これは、THP-1のCD54発現を亢進させるのに必要な濃度がナノシリカ間でも9倍近く異なることを示している。また、CD54の相対発現量(RFI)についても、最大のNM-202で4812.2%、最小のNM-201で434.7%と約11.1倍の差が見られた。

D. 考察

これまでナノシリカ処理により、*in vitro*において樹状細胞がCD86やIL-1βの発現を亢進することが報告されてきた^{1,2)}。今回検討した5種全てのナノシリカがTHP-1細胞のCD54発現を非常に強く亢進すること、さらにその亢進の程度が検体により異なることを明らかとした。

CD54の発現を亢進させる最小濃度(EC200)は、*in vivo*皮膚感作性試験であるLLNA (Local Lymph Node Assay, OECD TG429)における強度の指標であるEC3値と相関性が認められており³⁾、EC200が低いほど感作性強度が強くなる傾向がある。この点で今回検討した5種のナノシリカを検討

すると、毒性の強度は強い順に、NM-204, NM-200, NM-202, NM-203, NM-201となった。また、誘導されたCD54の相対発現量(RFI)も、最大のNM-204とNM-201では約8倍異なっており、こちらについても大きさの順に並べると、NM-202, NM-204, NM-203, NM-200, NM-201となった。

今回検討したナノシリカは、OECDにおいて様々な物性や*in vivo*における毒性がすでに評価されているため、今後今回得られたh-CLATの結果と、既知の物性や毒性情報との比較を行う予定である。こうして構築したデータセットを解析することで、標準化された試験系であるh-CLAT法のNMの免疫毒性試験としての有用性を検証し、ナノシリカの物性と抗原提示細胞活性化の関係を明らかにする予定である。

また、無機化合物の固体であるナノシリカがTHP-1細胞を活性化させるメカニズムは、抗原として提示される一般的な感作性物質によるそれとは異なり、いわゆるアジュバント効果と考えられる⁴⁾。生活環境中のNMによる免疫応答の増悪が指摘されており⁵⁾、ウイルスなどの抗原により生じる抗原提示細胞の活性化が、NMにより促進されるかどうかを検討する必要がある。この点については次年度検討を行う予定である。

- 1) Nanotechnology, 5 (3), 326-340, 2011.
- 2) J. Toxicol. Sci., 45 (10), 651-660, 2020.
- 3) Toxicology in Vitro, 26 (7), 1150-1160, 2012.
- 4) Toxicol. Lett., 118, 171-181, 2001.
- 5) Biochem. Biophys. Res. Commun., 392, 160-165, 2010.

E. 結論

NM-200, NM-201, NM-202, NM-203及び

NM-204は、いずれもin vitroで抗原提示細胞を活性化することが示された。特にNM-202, NM-203, NM-204はCD54の発現をコントロールに比べ20倍以上に亢進させ、非常に強い抗原提示活性化能があると考えられた。今後、今回検討したナノシリカの物性およびin vivoにおける毒性と、本検討結果の比較を行う。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

- 1) 山田 隆志, 足利 太可雄, 小島 肇, 広瀬 明彦: AOP (Adverse Outcome Pathway ; 有害性発現経路) に基づいた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ. *Yakugaku Zasshi*. 2020;140(4):481-484.[doi: 10.1248/yakushi.19-00190-1](https://doi.org/10.1248/yakushi.19-00190-1)
- 2) 小島幸一, 足利太可雄, 安達玲子, 佐藤一博, 瀬崎拓人, 武吉正博, 福山朋季:皮膚感作性試験代替法 : ARE-Nrf2 luciferase LuSens Test Method (LuSens 法). *AATEX-JaCVAM*, 2020;9(1), 43-57.
- 3) 足利太可雄, 小島肇, 平林容子:日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 令和元年度報告書. *AATEX-JaCVAM*, 2020;9(1), 58-64.
- 4) 尾上誠良, 上月裕一, 豊田明美, 笛木修, 細井一弘, 小島 肇, 足利太可雄, 小野寺 博志:光安全性評価の現状と課題. *YAKUGAKU ZASSHI*, 2021, 141(1), 111-124.
<https://doi.org/10.1248/yakushi.20-00148>

F.2. 学会発表

- 1) 足利太可雄, 鈴木政晴, 安部賀央里, 栗本雅之, 山田隆志, 頭金正博: 非動物実験による皮膚感作性のリスク評価と毒性学的懸念の閾値コンセプトの開発, 第 45 回日本香粧品学会 (2020.6.12-13, 誌上開催)
- 2) 鈴木政晴, 安部賀央里, 頭金正博, 山田隆志, 足利太可雄: IATA(統合的)アプローチに基づいた皮膚感作性における in silico 予測モデルの開発, 第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29-7.1, web 開催)
- 3) 吉田邦嵩, 石川晋吉, 橋爪恒夫, 足利太可雄: ヒト気管支上皮と抗原提示細胞の共培養系を用いた化学物質の in vitro 呼吸器感作性評価法 の開発, 第 47 回日本毒性学会学術年会 (2020.6.29-7.1, web 開催)
- 4) 三浦結美, 足利太可雄, 板垣 宏, 飯島一智: 表皮モデルと免疫細胞を組み合わせたタンパク質感作性評価システムの開発, 日本動物実験代替法学会第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
- 5) 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)
- 6) 鈴木政晴, 安部賀央里, 頭金正博, 山田隆志, 足利太可雄: *Cosmetics Europe database* を使用した in silico 皮膚感作性予測回帰モデルの開発, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)

- 7) 赤木隆美, 村上将登, 宮崎裕美, 田口浩之, 池田英史, 加藤雅一, 山田知美, Mura S, Couvreur P, 足利太可雄, 小島肇, 明石 満:三次元培養皮膚モデル LbL-3D Skin を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
- 8) 水町秀之, 渡辺美香, 生悦住茉友, 梶原三智香, 安田美智代, 水野 誠, 今井教安, 佐久間めぐみ, 芝田桃子, 渡辺真一, 上野順子, Basketter D, Eskes C, Hoffmann S, Lehmann D, 足利太可雄, 寒水孝司, 武吉正博, 宮澤正明, 小島肇:皮膚感作性試験代替法 Epidermal Sensitization Assay (EpiSensA) の Validation 研究(施設内再現性 Phase I), 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
- 9) 浅野哲秀, 笠松俊夫, 北本幸子, 山本美佳, 足利太可雄, 小島 肇,:Bhas42 細胞形質転換試験法 (Bhas 42 CTA) の評価, 日本環境変異原学会第 49 回大会 (2020.11.27, 沼津,静岡および web 開催)
- 10) 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 Virtual Annual Meeting (2021.3.22,USA, web 開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 3回の本試験における各種ナノシリカのRFI及び細胞生存率の平均値及び標準偏差

処理群	用量 ($\mu\text{g/mL}$)	RFI				細胞生存率 (%)	
		CD86		CD54		平均値	標準偏差
		平均値	標準偏差	平均値	標準偏差		
無処理対照(培地)	-	100.0	0.0	100.0	0.0	98.24	0.21
NM-200	0.316	101.3	25.2	70.0	17.7	97.62	0.18
	1.00	101.1	22.8	60.0	33.5	97.80	0.06
	3.16	88.9	35.5	82.4	56.4	97.35	0.18
	10.0	107.8	36.3	163.1	51.5	96.48	0.45
	31.6	102.5	35.0	727.5	215.4	91.86	1.55
	100	97.5	28.3	1120.8	254.0	88.08	1.90
	316	72.0	28.9	797.7	310.9	86.86	2.30
	1000	56.9	35.6	1131.5	366.5	82.89	2.45
無処理対照(培地)	-	100.0	0.0	100.0	0.0	98.35	0.78
NM-201	0.316	95.3	15.6	66.6	7.5	97.30	1.13
	1.00	92.7	23.7	79.4	1.3	97.38	0.44
	3.16	94.4	8.9	73.1	7.9	97.31	0.88
	10.0	86.7	10.7	97.2	8.9	97.10	1.03
	31.6	85.3	11.8	227.9	57.5	95.09	1.40
	100	70.2	16.7	314.1	88.1	93.59	2.10
	316	54.3	4.2	306.9	89.8	88.25	0.94
	1000	55.2	5.8	434.7	148.4	84.92	3.75
無処理対照(培地)	-	100.0	0.0	100.0	0.0	97.51	0.73
NM-202	0.316	102.9	17.2	87.6	26.2	97.37	0.72
	1.00	101.8	7.2	86.7	20.5	97.27	0.72
	3.16	101.3	8.4	85.0	25.0	97.04	0.15
	10.0	103.3	19.1	117.8	36.1	96.92	0.31
	31.6	102.4	13.3	259.3	108.1	95.81	0.68
	100	91.0	19.6	665.6	183.8	92.81	0.39
	316	48.8	8.2	541.4	88.9	91.68	0.20
	1000	61.4	28.2	4812.2	2781.6	70.34	3.25
無処理対照(培地)	-	100.0	0.0	100.0	0.0	98.40	0.57
NM-203	0.316	99.8	12.8	106.3	8.0	98.42	0.35
	1.00	107.7	17.3	111.6	16.3	97.64	0.91
	3.16	105.5	8.3	105.7	10.1	97.62	0.53
	10.0	103.7	10.1	123.0	11.1	96.75	1.01
	31.6	103.8	14.4	238.0	62.6	94.69	0.10
	100	104.1	6.7	641.4	214.0	90.19	1.03
	316	82.6	19.0	545.8	181.8	89.81	0.59
	1000	108.2	32.8	2795.3	255.3	71.30	4.18
無処理対照(培地)	-	100.0	0.0	100.0	0.0	96.81	1.03
NM-204	0.316	113.7	15.4	112.2	25.6	97.09	1.15
	1.00	113.0	15.2	94.8	18.3	96.90	0.80
	3.16	113.9	13.7	143.0	57.0	96.35	0.77
	10.0	112.0	25.5	576.8	383.5	94.19	1.50
	31.6	127.1	34.6	2281.2	1252.4	85.78	2.86
	100	120.9	34.9	3439.6	1155.8	78.67	3.86
	316	94.2	46.3	2961.9	778.0	79.36	0.92
	1000	77.1	35.2	2100.7	528.7	77.96	0.68

RFI: 相対蛍光強度

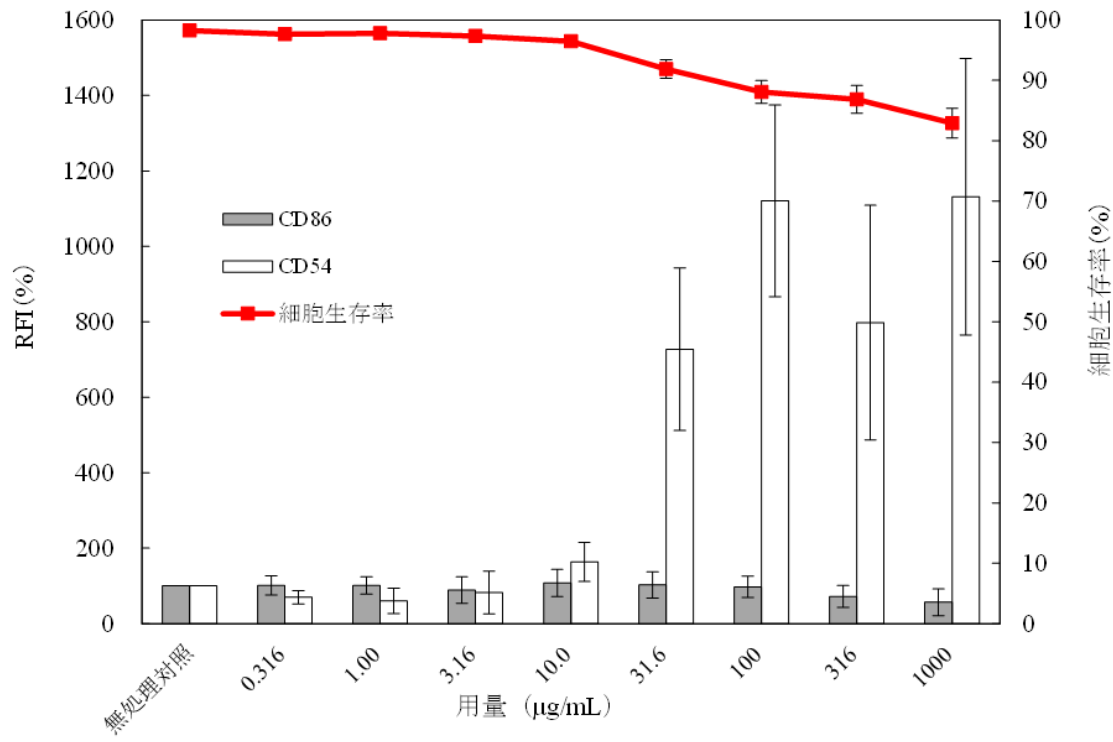


図1 NM-200のRFI及び細胞生存率 (n=3)

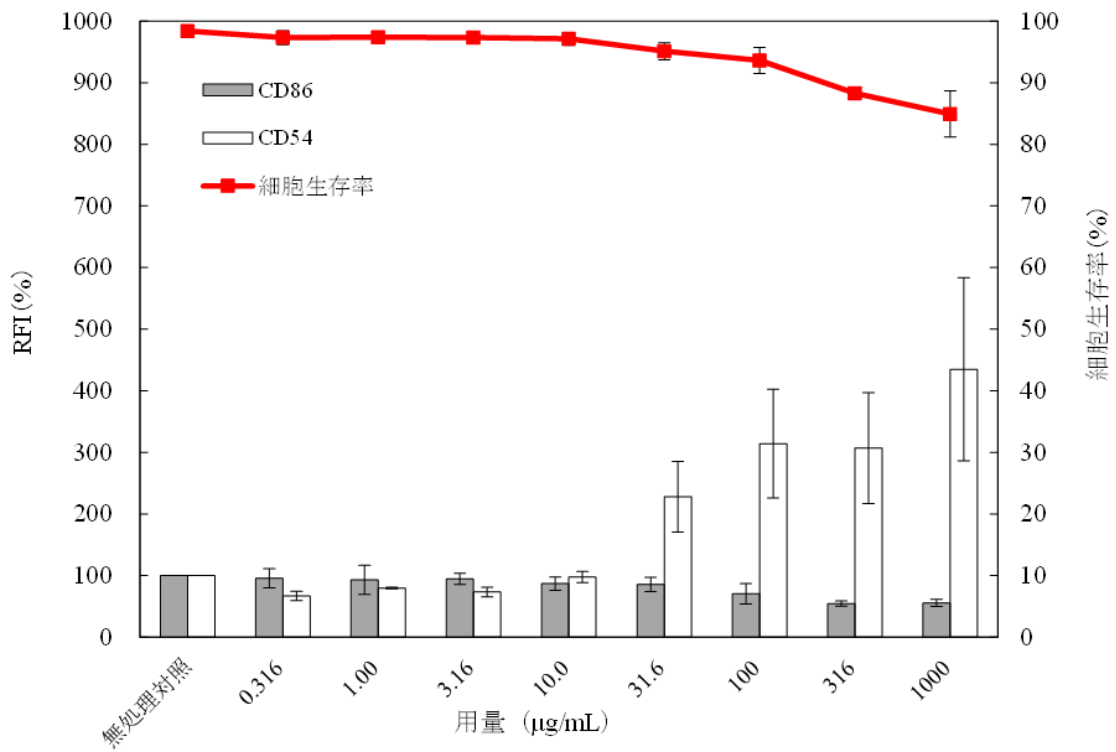


図2 NM-201のRFI及び細胞生存率 (n=3)

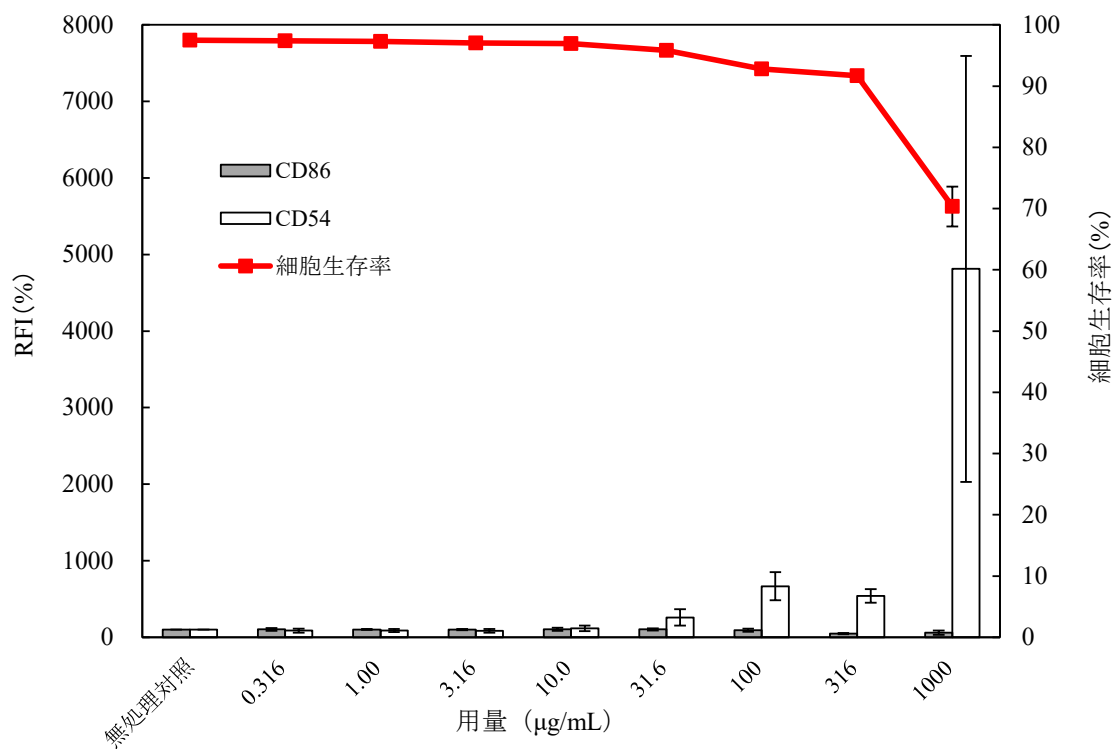


図3 NM-202のRFI及び細胞生存率 (n=3)

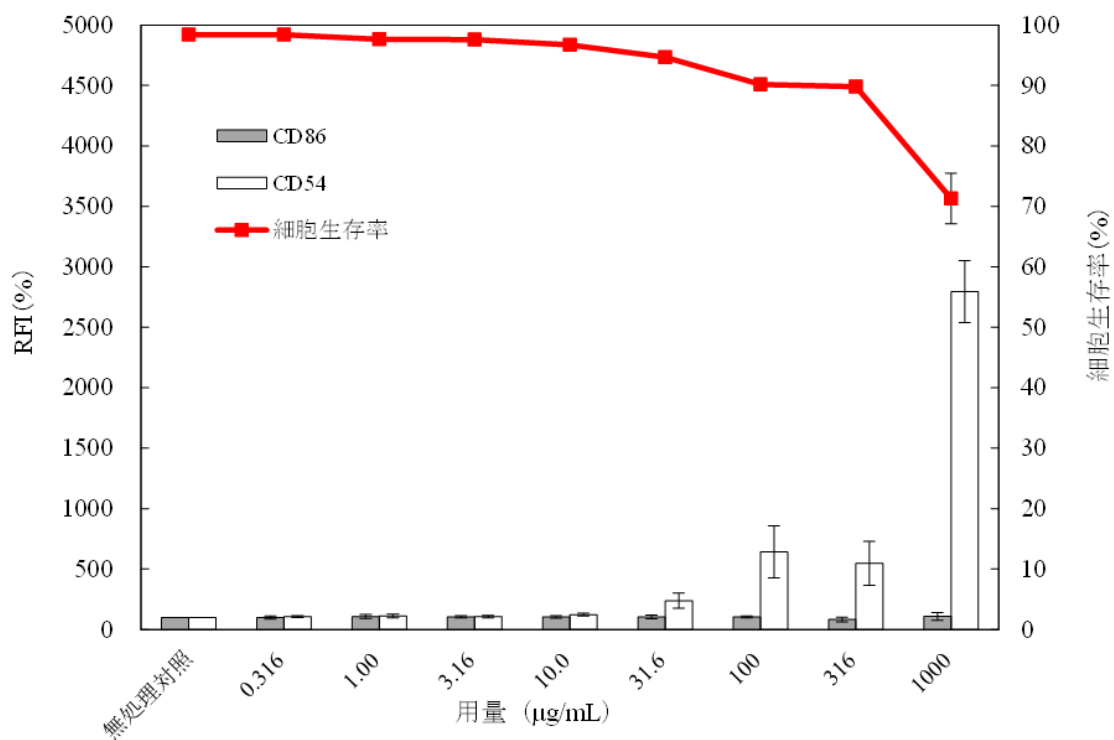


図4 NM-203のRFI及び細胞生存率 (n=3)

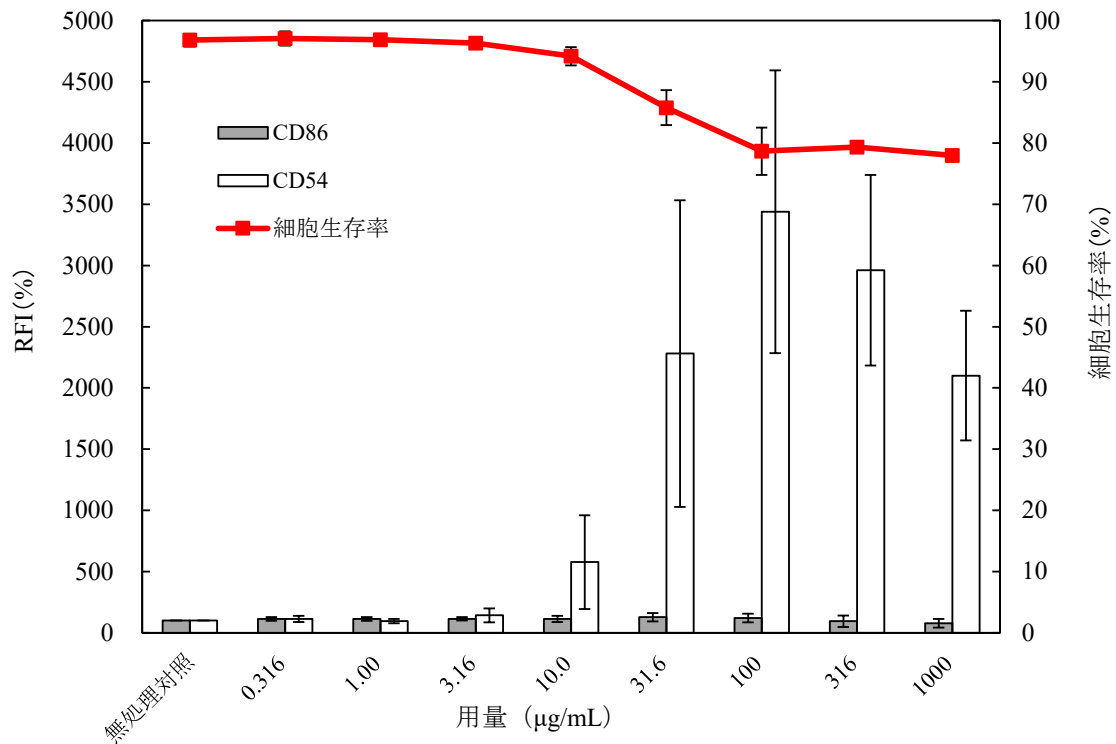


図5 NM-204のRFI及び細胞生存率 (n=3)

表2 各種ナノシリカのh-CLAT試験結果

	NM-200	NM-201	NM-202	NM-203	NM-204
EC200 (CD54 発現濃度閾値)(µg/mL)	10.3	30.3	19.5	24.8	3.5
CD54の相対発現量(RFI)の最大値(%)	1131.5	434.7	4812.2	2795.3	3439.6
CD54の相対発現量の最大値をとった濃度(µg/mL)	1000	1000	1000	1000	100
CD54の相対発現量の最大値をとった濃度における細胞生存率(%)	82.9	84.9	70.3	71.3	78.7

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

ナノマテリアルの吸入ばく露実験の実施と解析

研究分担者	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	室長
研究協力者	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	主任研究官
	森田 紘一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	
	辻 昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	
	菅 康佑			
	相田 麻子	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	

研究要旨

本研究の目的は、ナノマテリアル（NM）の Maus 吸入ばく露による肺胞マクロファージの機能解析を実施した先行研究（H29-化学-一般-003）を基盤として、短期吸入ばく露された各種 NM の免疫系に与える影響について in vitro/in vivo 試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行うことである。最終的には、得られた知見を基に各種 NM の短期吸入ばく露による毒性発現の AOP（毒性発現経路）および in vitro 試験法を確立する。本分担研究では、先行研究で開発した Taquann 法を用い、カートリッジ直噴式全身ばく露吸入装置（Taquann システム Ver3.0、国立衛研内に設置済）によりナノマテリアルを高分散エアロゾルとして Maus に、6 時間/日、5 日間連続の全身ばく露吸入実験を行い、定期解剖により試料のサンプリングし研究協力者に提供した。最初に、今年度実験に用いる針状酸化チタンの検体（TiDW）の分散方法の検討を行った。Taquann 法は第三級ブチルアルコール（TBA）を分散媒として液相で検体を分散、効率的に濾過を行い、凍結乾燥により表面張力による検体の再凝集を防ぎ乾燥検体を得る。乾燥検体の収率を上げるためには検体と TBA の混合液を超音波処理により十分に分散させる必要があるが、過剰な超音波処理は検体を破壊し繊維長を短くする可能性がある。そのため、超音波処理時間の検討を行い、各処理検体の繊維長を走査型電子顕微鏡像により計測を行って比較した。TiDW は TBA と容易に混合し超音波処理（40W）により分散可能であった。TiDW の原末の繊維長 $6.9\pm 3.4\mu\text{m}$ 、直径は $361.3\pm 108.6\text{nm}$ であった。一方、2 分間、15 分間の超音波処理における繊維長は、それぞれ $7.0\pm 3.3\mu\text{m}$ 、 $7.0\pm 3.5\mu\text{m}$ であり、原末と同等の繊維長、分布が維持されていた。次に、TiDW を検体として、目標濃度 $30\text{mg}/\text{m}^3$ 、動物は C57BL/NcrSlc 雄性 Maus 12 週齢を使用し、6hr/day、5 日間（合計 30 時間）の全身ばく露吸入を行った。対照群は HEPA フィルターで濾過したクリーンエアーを吸入させた。ばく露実験の結果、実際のばく露濃度は、 $25.0\pm 3.4\text{mg}/\text{m}^3$ 、MMAD は $2,251\text{nm}$ (σ : 3.2~3.9) であった。ばく露終了直後、4 および 8 週後に定期解剖を行って試料を採取した。採取した組織（肺と縦隔）負荷量の測定、病理組織学的評価および免疫機能評価の分担研究者に提供した。今後、肺負荷量、病理組織評価を行い、TiDW の吸入ばく露による生体影響を明らかにする計画である。

A. 研究目的

本研究の目的は、ナノマテリアル (NM) のマウス吸入ばく露による肺胞マクロファージの機能解析を実施した先行研究 (H29-化学-一般-003) を基盤として、短期吸入ばく露された各種NMの免疫系に与える影響について *in vitro/in vivo* 試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行うことである。得られた知見を基に各種NMの短期吸入ばく露による毒性発現の AOP (毒性発現経路) および *in vitro* 試験法を確立する。

本分担研究では、検体の分散方法として先行研究で開発した Taquann 法を用い、カートリッジ直噴式全身ばく露吸入装置 (Taquann システム Ver3.0、国立衛研内に設置済) によりナノマテリアルを高分散エアロゾルとしてマウスに5日間の全身ばく露吸入を行った。まず、今年度実験に用いる針状酸化チタンの検体 (TiDW) の分散方法の検討を行い、繊維長が原末と同等であることを確認し、5日間連続の全身ばく露吸入実験を行った。

B. 研究方法

B-1 検体の高分散化処理の条件検討

1. 被験物質:

被験物質として、針状酸化チタン TiDW を使用した。

2. 検体処理の条件検討:

TiDW の原末 500 mg をビーカーに入れ、35°Cに加熱して溶解した TBA500 mL を加えて懸濁液を調整した。TBA 懸濁液を超音波洗浄器 SU-3TH (柴田科学株式会社) にて、40W の出力により 2~15 分間の処理を行い、高分散性の懸濁液を得た。超音波処理前の懸濁液 (0 分)、並びに超音波処理後

の懸濁液 (2 分、15 分) をそれぞれ 10 mL を分注し、形態観察に用いた。

3. TiDW の形態観察:

アルミナフィルター (Anodisc、孔径 0.02 μm 、 ϕ 12mm、ワットマン) をロート型ガラス濾過器 (51G-1、三商) に載せ、ピペッティングにより十分に分散させた Taquann 法処理 TiDW 懸濁液 1 mL を滴下し吸引濾過した。フィルターを室温で乾燥し、真鍮製 SEM 観察台 (S-GA、 ϕ 15 \times 5 mm、日新 EM) にカーボンシール (ϕ 12 mm、日新 EM) で固定した。オスミウムコーター (HPC-1SW 型、真空デバイス) により 5 秒間処理を行い走査型顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) によって 2500 倍、加速電圧 2~2.5 kV の条件で観察した。TiDW の繊維長の計測は ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて行った。

B-2 マウス全身ばく露吸入実験

1. 動物:

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウスを 10 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 12 週齢にて使用した。このマウスは当研究部において、MWCNT を含めてナノマテリアルの吸入ばく露実験に使用した実績がある。個体識別は耳パンチにより行った。

2. 飼育条件:

飼育ケージは、ポリカーボネイト製の OUTER ケージと PET 製 INNER ケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1 ケージ当り 5 匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置 (RAIR HD SUPER MOUSE 750TM 個別換気式飼育装置 特型) を使用した。飼育条件は、温度; 25 \pm 1°C、

湿度；55±5%、換気回数；約 20 回/h、照明時間；8 時～20 時点灯（照明明暗サイクル 12 時間）とし、固型飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社）を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。

ケージ内の環境を改善する目的で、シェパードシャック（Shepherd Specialty Papers 社）をケージ内に設置した。

3. 群構成:

HEPA フィルターを通した清浄空気のみを送気した群（対照群）、TiDW ばく露群の 2 群構成とした。目標濃度は 30 mg/m³ と設定した。各群当たり 48 匹のマウスを使用し、肺沈着量測定用に 9 匹、病理組織用に 6 匹、免疫機能実験用に 10 匹を割り当てた（表 1）。1 日 6 時間（10：00～16：00）、5 日間の連続の全身ばく露吸入を行った。

4. ダスト発生装置

検体のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 を使用した（共同開発 柴田科学株式会社）。

この装置は、検体を充填する金属製カートリッジ、圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置、及び、噴射した検体を気相に分散させるサブチャンバーから構成される。カートリッジはインナーカートリッジとアウターカートリッジから構成される。検体を収容するインナーカートリッジ（容量：25 mL、内寸：直径 20 mm 高さ 80 mm）はステンレス製であり、これを樹脂製のアウターカートリッジに収容して使用する。カートリッジのキャップ部には圧縮空気を注入するセンターノズルと、エアロゾル噴出孔が設計されている。

カートリッジへの検体の充填は、TiDW

の tert-butyl alcohol (TBA)懸濁液(1mg/mL)を調整し、TBA 懸濁液を各カートリッジに 10 mL 分注して液体窒素で固化させた後、デシケーターに格納して溶媒回収型ポンプで TBA を昇華除去することで行った。

噴射装置は、サブチャンバー（容量：43 L）に接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーから側方に煙突状のダクトを設け、その先端部にはポリエチレン製の袋で覆った ULPA フィルターが接続されている。煙突部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体は煙突内に逆流した検体を含め、サブチャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつばく露チャンバーに導く構造となっている。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は 0.48 Mpa、噴射時間は 0.2 秒、1 カートリッジ当たり 3 回の噴射を行った。ばく露チャンバーの総換気流量は 32.5 L/min（基礎換気流量；29.5 L/min、エアロゾルモニター用サンプリング（CPC）；1.5 L/min、質量濃度測定；1.5 L/min）と設定した。

目標濃度に速やかに到達させるため、ばく露開始時に 2 本を 1 分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ 4 分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。2 時間の吸入ばく露実験において、合計 88 本のカートリッジを使用し、カートリッジの交換、噴射は完全自動化で実施した。

ばく露チャンバー内の温度、湿度並びに圧力変動をばく露時間の 6 時間を通してモニタリングした。

5. ばく露チャンバー

動物を収容し検体をばく露するばく露チャンバーは、先行研究において独自に開発し

たものを、Ver3.0用に改変したものを使用した。(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。動物は、メインチャンバー内に設置した円筒形ステンレス金網製のケージに個別に収容する。マウスは最大 25 匹収容が可能である。ばく露チャンバーはアクリル製のアウトターチャンバーと PET 樹脂で作製したインナーチャンバー(直径 660 mm、高さ 477 mm)の二重構造となっており、検体が触れるインナーチャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている。メインチャンバーの上部は円錐状となってサブチャンバーに接続されており、メインチャンバーの気積 179 L である。

6. ばく露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

ばく露チャンバー内のエアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度 (CPM; count per minutes) と質量濃度 (mg/m³) 測定を並行して行った。

相対濃度測定は、凝縮粒子計数装置 (Condensation Particle Counter : CPC、CPC-BL01、サンプリング流量 : 1.5 L/min、柴田科学) を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。高濃度での測定は、CPC に負荷がかかるため、CPC の前段に希釈機 (柴田科学) を設置して 10 倍希釈し測定した。

ばく露チャンバーと CPC を接続するチューブは、銅管を使用してサンプリングによる損失を最小限にした。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、φ 55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂バインダーガラス繊維フィルター (Model TX40HI20-WW、φ 55mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm) : 99.9%、東京ダイレック) を装着し、サンプリング

ポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学) に接続して 1.5 L/min の流量でばく露時間の 2 時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 1.5 L/min × 120min = 180 L から 1 m³ 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用した。

7. エアロゾルの空気動学的中位径測定 Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD)

エアロゾルの空気動学的中位径測定は、Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI)を用いた。10 L/min の流量でばく露チャンバー内のエアロゾルを吸引して MOUDI (Model 125 Nano MOUDI、KANOMAX、分級サイズ ; No.1 ; 10 μm、No.2 ; 5.6 μm、No.3 ; 3.2 μm、No.4 ; 1.8 μm、No.5 ; 1.0 μm、No.6 ; 0.56 μm、No.7 ; 0.32 μm、No.8 ; 0.1 μm、No.9 ; 0.10 μm、No.10 ; 0.056 μm、No.11 ; 0.032 μm、No.12 ; 0.018 μm、No.13 ; 0.01 μm) に導いた。吸引時間は 20 分とした。各分級ステージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。尚、シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に 50°C のインキュベーター内で 3 日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。マイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI 装着前と、MWCNT 回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

8. 解剖とサンプリング

肺と縦隔、顎下リンパ節のサンプリングのため、ばく露終了直後(0W)、4週後(4W)及び8週後(8W)に定期解剖を行った。

マウスは吸入麻酔器(TK-7、バイオマシナリー)を用いイソフルラン(DSファーマアニマルヘルス)麻酔下で、眼窩より採血を行い、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛からコンタミを防止するため、開胸前に全ての被毛を除去した。

病理標本用の動物は、気道内に吸引された検体の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、喉頭部を絹糸で結紮して開胸時の肺の虚脱を防止した後、開胸し、右心室に翼状針(21G、SV-21CLK-2、テルモ株式会社)を刺入して生理食塩水(大塚生食注、大塚製薬工場)を約40cm水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入して血液を除去した後、回路を切り替えて4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(フジフィルム和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を同静水圧にて約3分灌流して固定後、同組成固定液に浸漬固定を行った。流量は点滴調節器により適宜調節した。組織沈着量測定用の動物は、開胸して肺を取り出し、肺門部で気管を除去して湿重量測定後ホルマリン固定した。免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針(サーフローフラッシュ18G、テルモ)を気管に挿入しPBSを1mL注入・吸引採取する操作を2回繰り返し、BALを採取した。

(倫理面への配慮)

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し、国立医薬品食品衛生研究所

は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程(平成27年4月版)」に則って実施した。

C. 研究結果

C-1 検体の高分散化処理の条件検討

TiDW原末とTBAを混合し、超音波処理良好な懸濁液を得た。走査型電子顕微鏡による観察の結果、TiDWの原末の繊維長 $6.9\pm 3.4\mu\text{m}$ ($N=223$)、直径は $361.3\pm 108.6\text{nm}$ ($N=105$)であった(図1A、図2A、2B)。一方、超音波処理2分間、15分間における繊維長は、それぞれ $7.0\pm 3.3\mu\text{m}$ ($N=245$)、 $7.0\pm 3.5\mu\text{m}$ ($N=240$)であり、原末と同等の繊維長、分布が維持されていた(図1B、2C、2D)。

TiDWの繊維長のヒストグラムから、 $2.5\mu\text{m}$ 以下の繊維は5.4%、 $5\mu\text{m}$ 以上は94.6%、 $10\mu\text{m}$ 以上は17.9%であった。

C-2 マウス全身ばく露吸入実験

TiDWの5日間反復全身ばく露吸入実験における平均質量濃度は $25.0\pm 3.2\text{mg}/\text{m}^3$ (平均値 \pm SD)であった。3回の測定を行ったMMADは $2,251\text{nm}$ (σ :3.2~4.9)であった(表2、図3)。エアロゾルの累積分布から、粒子径 $1,000\text{nm}$ から急激に立ち上がる分布であった。6時間の吸入ばく露実験において使用した総検体量は、880mgである。6時間の曝露チャンバーの総換気量は 11.7m^3 であることから名目上の濃度は $75.4\text{mg}/\text{m}^3$ と計算される。実際に測定した濃度の平均は $25.0\text{mg}/\text{m}^3$ から、エアロゾル化効率を計算すると33.1%であった。

CPCのデータは、6時間のばく露実験の後半で値が低下する傾向にあった(図3)。

なお、実験に供したマウスは定期解剖まで

の間、いずれも体重推移に異常は認められなかった(図4)。

D. 考察

粒子状物質の吸入において、粒径は内径が徐々に狭くなる鼻腔から肺胞に至る各部位への沈着量を定める重要な因子であり、一般に MMAD を指標としている。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。ヒトが現実的にナノマテリアルにばく露される環境下では、緩徐な風速であるため気相にナノマテリアルの凝集体/凝固体は速く沈降する。また、ヒトの上気道は長いいため、凝集体/凝固体が効果的に取り除かれて肺胞レベルには高度に分散されたものが優先的に到達すると想定される。一方、実験動物を用いた粉体の吸入ばく露試験では、エアロゾルの均一性を保つためチャンバー内の空気は強く攪拌されている。凝集体/凝固体を含む検体をエアロゾル化すると、ヒトに比較して細く短い気道を有するげっ歯類では、この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊維の吸入を阻害あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。以上のことから、吸入ばく露試験において実験動物からヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集体/凝固体を除去した上で分散性が高い検体を使用する必要がある。

本分担研究で用いた Taquann 法は TBA を用いて液相で検体を分散、効率的に濾過を行い、凍結乾燥により表面張力による検体の再凝集を防ぎ乾燥検体を得ることを特徴としている。検体の物理化学的性質に依存しない汎用性の高い方法である。濾過工程における検体の収率を上げるために

は検体と TBA の混合液を超音波処理により十分に分散させる必要があり、ナノマテリアルでは超音波処理が汎用されている。超音波処理は溶液中に圧力差によるキャビテーションを発生させることで、溶液中の物質に激しい衝撃を与えて分散を図る方法であるため、強力な超音波処理では、TiDW の繊維長に影響を与える可能性がある。繊維状物質は、粉体とは異なり、繊維長に依存した生体反応を有するため繊維長の分布が処置後も保持される点は重要であると考えられる。

その代表例がアスベストによる中皮腫発がんである。過去にアスベスト代替品が多数開発された際に、これらの中皮腫誘発性と繊維長、繊維径との関係がラット腹腔内投与により検討されている。その結果、繊維長が 10 μm 程度、直径が 100 nm 程度の線維の中皮腫誘発性が高いことが示されている (Stanton & Pott 仮説、1978)。一方、ナノマテリアルの生体影響評価の初期には、ナノマテリアルを分散することに注力した実験が行われ、その結果、過度な分散処理により原末の繊維長を短くするまで機械的分散処理を行い、多層カーボンナノチューブに中皮腫発がん性がないと結果された報告がある (Muller J et al., 2009)。

本分担研究では、原末の繊維長を維持した状態で高分散検体を得るため、分散条件のなかで最も影響の大きい超音波処理時間の検討を行い、各処理検体の繊維長を走査型電子顕微鏡像により測定して比較した。TiDW は TBA に比較的容易に分散し、少なくとも 15 分の超音波処理により繊維長が短縮することは認められなかったことから、原末の繊維長を維持した高分散検体を得ることが達成できた。

全身ばく露吸入実験では、既設の

Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 を使用した。本装置では、以前のバージョンに改良を行い、カートリッジ装填を自動化することにより OECD 吸入毒性ガイドライン (TG413) で必要とされる 6 時間/日の吸入ばく露を可能とした装置であるが、連日稼働させる検討には至っていなかった。今年度、5 日間連続稼働を達成したことにより、より広い範囲の条件でばく露実験が可能であることが示された。一方、排気装置フィルターの負荷が大きくなり、HEPA フィルターの交換を頻繁に実施することが必要となるなど、連続稼働を行う際の課題も明らかになった。これは、粉体の吸入ばく露装置に共通の課題であるが、効率的に実験を進めるためには排気フィルターの大形化に加えて、容易に交換可能な排気フィルター装置の開発が必要かもしれない。

TiDW のエアロゾル特性のうち、MMAD_{2,251 nm} であり肺胞領域まで到達可能とされる MMAD_{3 μm} を達成している。エアロゾルの粒径分布の指標となる σ は 3.2~4.9 と TG413 で推奨される 1~3 と比較すると、若干広い範囲の粒度分布であることが示唆される。エアロゾルの累積分布 (図 3) において明らかであるように、TiDW エアロゾルは、累積粒子径が 1000nm から急激に立ち上がる分布であるため、このような値を示すと考えられる。CPC はばく露の後半で値が低下する傾向にあった。この理由として、ばく露チャンバー内からのサンプリングに用いている管の目詰まりが考えられた。

TiDW ばく露によるマウスは、体重推移においては影響が認められていない。今後、サンプリングした肺の病理組織と肺負荷量測定を行い、TiDW の影響を明らかにする計画である。

E. 結論

TiDW の高分散乾燥検体の調製方法を確立した。この検体を用いて、マウスに 1 日 6 時間、5 日間連続全身ばく露吸入を実施した。その結果、25.0mg/m³ の質量濃度で、MMAD_{2,251 nm} のエアロゾルを発生することが可能であった。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D, Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins, *Cancer Sci*, 2021 Mar 4. doi: 10.1111/cas.14873.
- 2) Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Imura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y, Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharm*. 2021 Feb 15;595:120241. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120241. Epub 2021 Jan 21.
- 3) 高橋祐次、ナノサイズプラスチックの評価、*BioIndustry*, 37(9)、p59-67、2020

F-2. 学会発表

- 1) 高橋 祐次、種村 健太郎、相崎 健一、北嶋 聡、急性毒性試験の近代化によるテトロドトキシンの中枢影響評価、第

- 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.29.) Web 開催、シンポジウム、口演
- 2) 大久保 佑亮、嘉本 海大、高橋 祐次、北嶋 聡、太田 裕貴、覚醒下非拘束ラットから血中酸素飽和度・心拍数・呼吸数を計測可能なウェアラブルパルスオキシメーターの開発、第 47 回日本毒性学会学術年会(2020.6.30.) Web 開催、口演
- 3) Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno, Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice, 9th Nano Conference November 12th 2020 Virtual Meeting、Web 開催、ポスター
- 4) 高橋祐次、森田紘一、辻 昌貴、菅 康佑、相崎健一、大久保佑亮、種村健太郎、北嶋 聡、シンポジウム 4 『医薬品以外の毒性から学ぶ』、急性毒性試験の近代化による毒性機序研究、日本毒性学会医薬品毒性機序研究部会主催、第 3 回医薬品毒性機序研究会 (2021.1.15) Web 開催、口演
- 5) Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno, Interim report of the 4-week-interval intermittent whole body inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice, SOT 2021 Annual Meeting Virtual (2021.3.17) Web 開催、ポスター
3. その他
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

表 1 群構成

Group	Examinations	Necropsy after inhalation exposure			
		N	Day 0	4W	8W
Control Clean air 6hr/day for 5days	• Lung Burden	9	3	3	3
	• Histopathology(perfusion)	6	2	2	2
	• Immune function	10	0	5	5
	subtotal	25			
TiDW 25 mg/m ³ 6hr/day for 5days	• Lung Burden	9	3	3	3
	• Histopathology(perfusion)	6	2	2	2
	• Immune function	10	0	5	5
	subtotal	25			

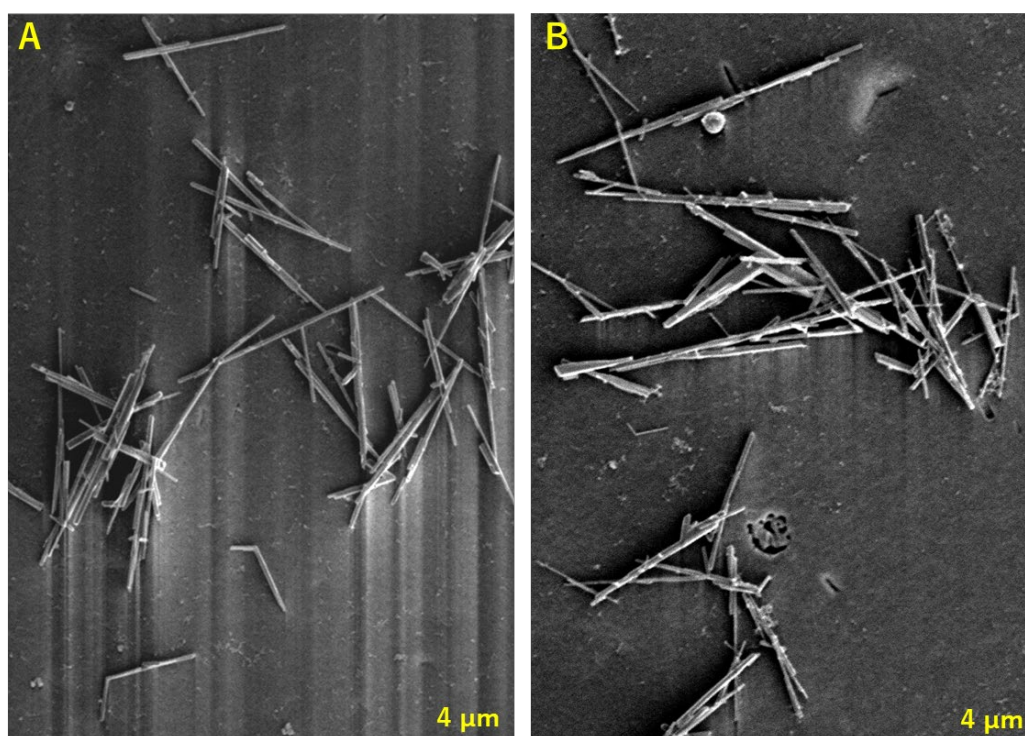


図 1 TiDW の走査型電子顕微鏡像

iDW 検体を TBA に懸濁し、超音波処理により分散処理した検体をアルミナフィルター (Anodisc、孔径 0.02 μm、φ12mm、ワットマン) に捕捉し、オスミウムコーター (HPC-1 SW 型、真空デバイス) により 5 秒間処理を行い走査型顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) によって 2500 倍、加速電圧 2~2.5 kV の条件で観察した。A : TiDW 原末、B : 15 分の超音波処理検体。

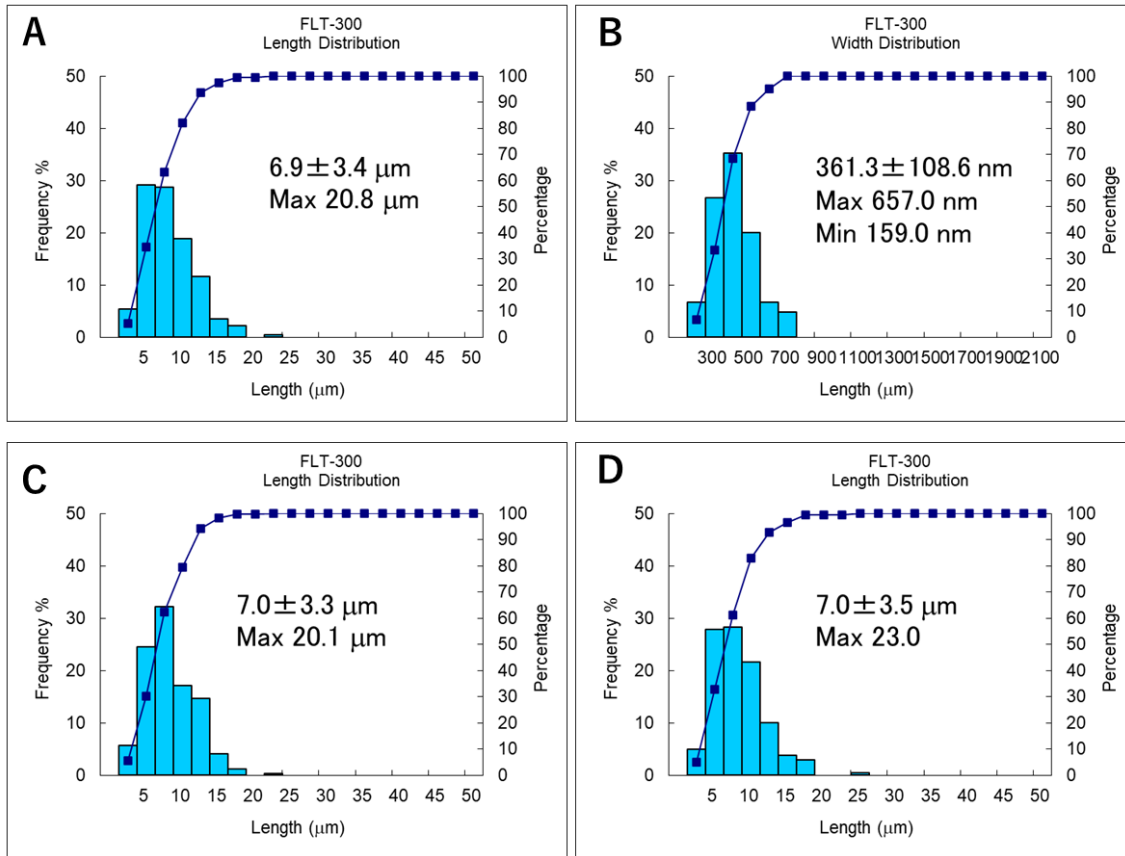


図 2 TiDW の繊維長分布

走査型電子顕微鏡による観察の結果 TiDW の原末の繊維長 $6.9 \pm 3.4 \mu\text{m}$ (N=223)、直径は $361.3 \pm 108.6 \text{ nm}$ (N=105) であった (A, B)。一方、2 分間、15 分間の超音波処理における繊維長は、それぞれ $7.0 \pm 3.3 \mu\text{m}$ (N=245)、 $7.0 \pm 3.5 \mu\text{m}$ (N=240) であり、原末と同等の繊維長、分布が維持されていた (図 C, D)。TiDW の繊維長のヒストグラムから、 $2.5 \mu\text{m}$ 以下の繊維は 5.4%、 $5 \mu\text{m}$ 以上は 94.6%、 $10 \mu\text{m}$ 以上は 17.9% であった。

表 2 吸入ばく露実験におけるエアロゾル特性のまとめ

TiDW (6hr/day for 5th consecutive day)	Mean	SD
Mass Concentration (mg/cubic meter)	25.0	3.2
Nominal Mass Concentration (mg/cubic meter)	75.4	0.4
Aerosolization efficiency (%)	33.1	4.1
MMAD (nm, Model125, KANOMAX, N=3)	2251	$\sigma: 3.2 \sim 3.9$
Experimental condition		
Load of TiDW per cartridge	10 mg	
Exposure time	6 hr/day	
Injection interval	4 min	
Number of cartridge used for 6hr exposure	88	
Ventilation air volume in a main chamber	32.5LPM	

CPC count over time

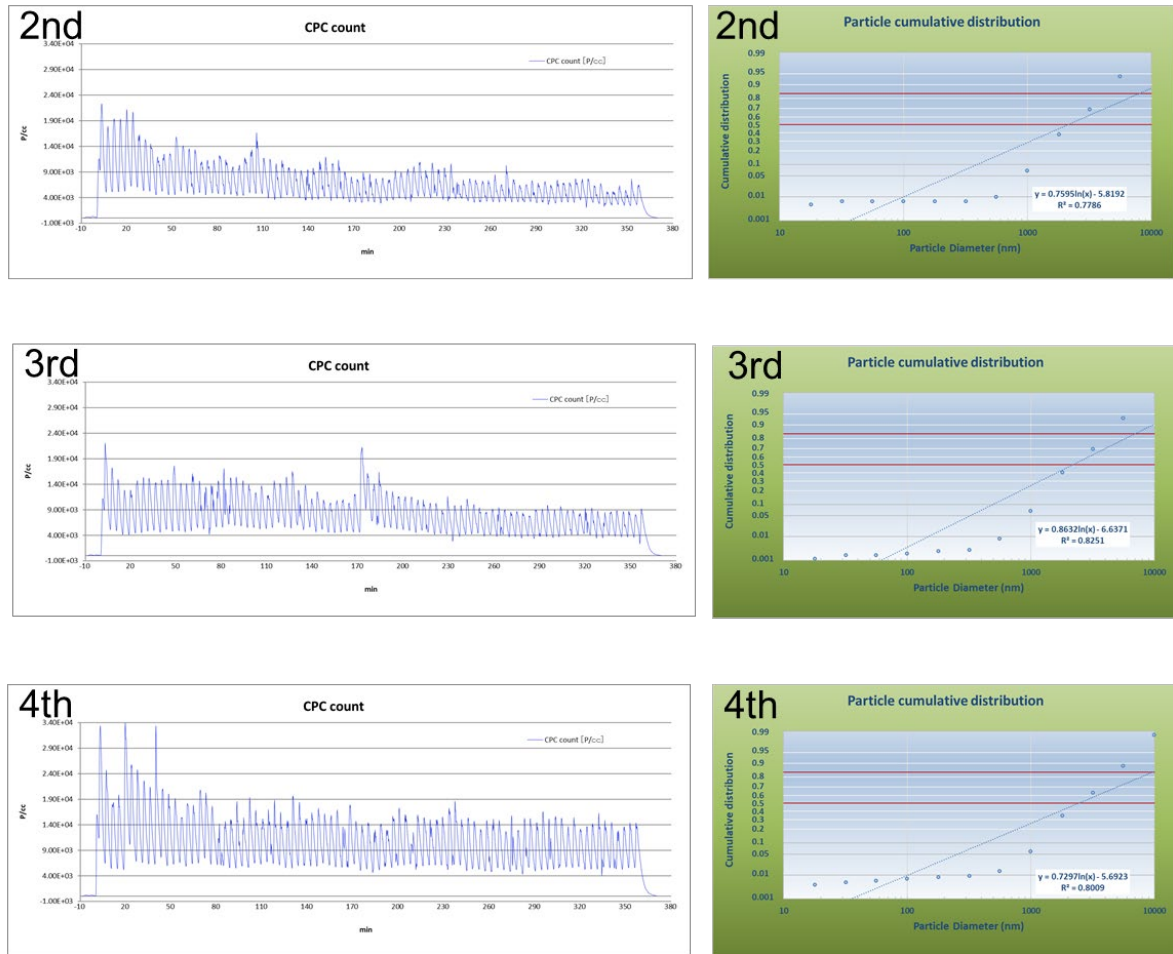


図3 吸入ばく露実験におけるエアロゾル特性 CPCデータとMMAD

CPCは5回のばく露実験全てにおいて、6時間のばく露時間を通して測定した。MMADは2回目、3回目、4回目のばく露実験において測定を行った。CPCはばく露の後半で値が低下する傾向にあった。

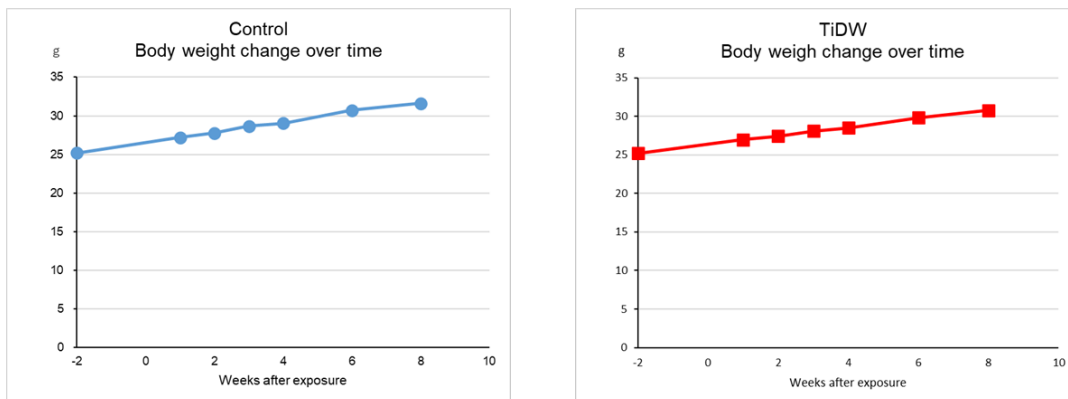


図5 吸入ばく露後のマウス体重推移

全身ばく露吸入後のマウスの体重推移には、対照群とTiDW群の間で有意な影響は見られなかった。

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。

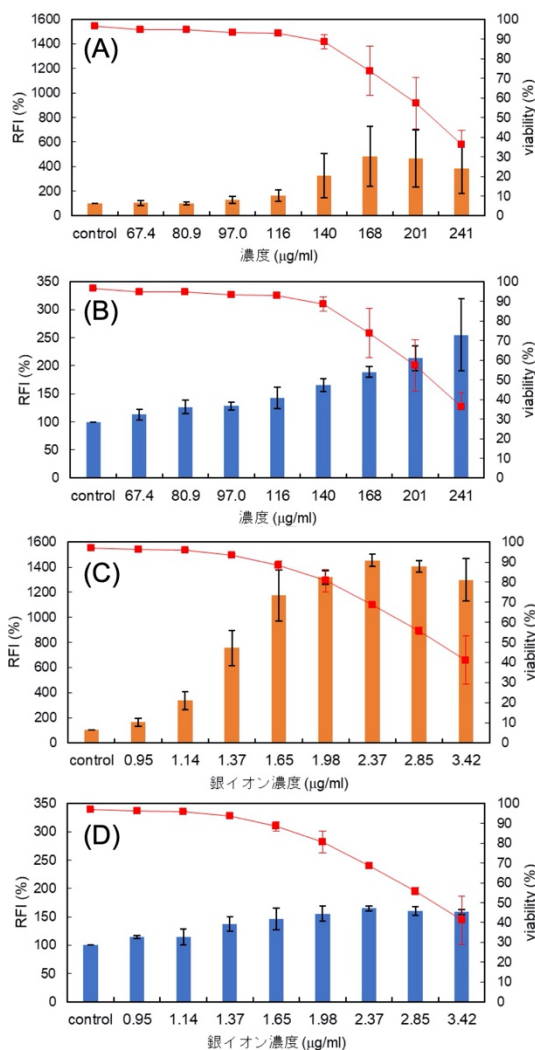


図1 銀ナノ粒子 (A, B) および硝酸銀 (C, D) 処理THP-1細胞のCD54 (A, C) およびCD86 (B, D) の発現

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)。

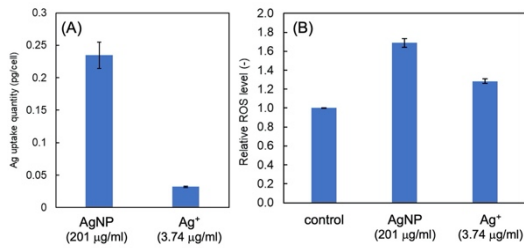


図2 銀ナノ粒子および硝酸銀処理におけるTHP-1細胞への銀の取り込み量 (A) およびROS産生量 (B)。

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。

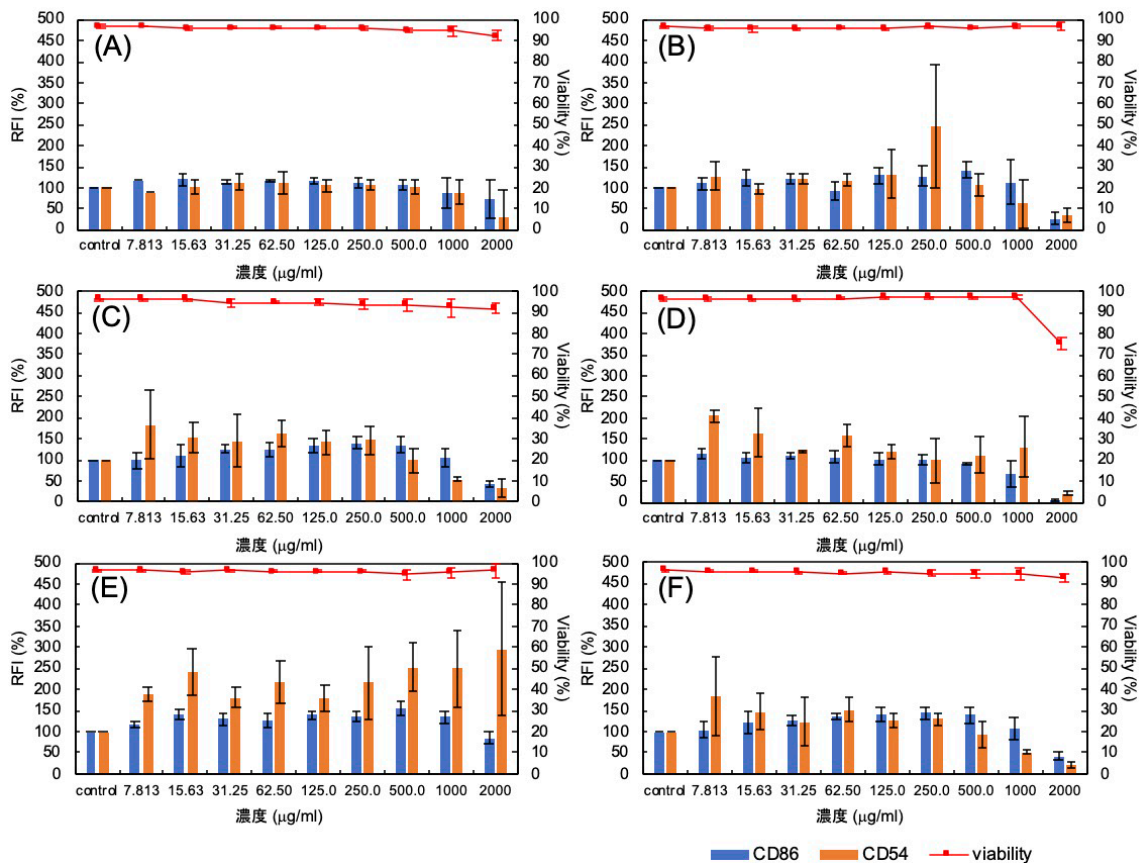


図3 各二酸化チタンナノマテリアル処理THP-1細胞のCD54およびCD86の発現. (A) MT-150A, (B) MT-500B, (C) AMT-100, (D) TKP-102, (E) AMT-600, (F) TiDW.

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

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

ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

研究分担者	石丸 直澄	徳島大学大学院医歯薬学研究部	教授
研究協力者	新垣 理恵子	徳島大学大学院医歯薬学研究部	
	常松 貴明	徳島大学大学院医歯薬学研究部	
	菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所	
	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所	
	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所	
	栞形 麻樹子	国立医薬品食品衛生研究所	
	辻 昌貴	国立医薬品食品衛生研究所	
	森田 紘一	国立医薬品食品衛生研究所	
	菅 康佑	国立医薬品食品衛生研究所	

研究要旨

ナノマテリアル (NM) はその組成や形状によってマクロファージなどの貪食細胞の反応性は大きく異なっている。令和2年度の本分担研究では、*in vivo* において針状酸化チタン (TiDW) の吸入曝露による肺の免疫システムに関して、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 細胞を中心に細胞表面分子、サイトカイン、ケモカインおよび炎症関連分子の遺伝子およびタンパク発現を免疫学的手法にて検討を加えた。さらに、NM とマクロファージの MMP-12 の役割に関して、*in vitro* での実験系を確立して検討を進めた。

Taquann 処理した TiDW の吸入曝露後、4 週および 8 週経過時点で BALF 細胞における肺胞マクロファージ (AM) の細胞数、各種分画に関して、対照群との有意な差は観察されなかった。TiDw 曝露後 8 週において、CD54⁺AM の割合が対照群に比較して有意に増加していた。

in vitro での RAW264.7 細胞および THP-1 細胞を用いて、Taquan 処理 MWCNT (T-CNT) による刺激では MMP-12 mRNA 発現が上昇することが判明した。また、T-CNT を処理された RAW264.7 細胞の培養上清を用いた実験で、NIH3T3 線維芽細胞における Col1A2, Col3a1, ColIIV, smooth muscle actin を含む線維化に関与する遺伝子 mRNA 発現が上昇していた。

NM の形状あるいは性状によって曝露に対する免疫反応が大きく異なっている可能性が示された。一方で、MWCNT に対する免疫反応に関して、マクロファージの MMP-12 を介した慢性化・線維化への機序の存在が示唆された。

A. 研究目的

ナノマテリアル (NM) の暴露による生体への影響については、様々な角度から研究が進展してきた。特に、多層化カーボンナノチューブ (MWCNT) を用いたマウスへの吸入暴露実験では、肺胞マクロファージの活性化、貪食、細胞死の分子機序が明らかにされてきた。一方で、NMの組成、性状、形状などの違いで、マクロファージを中心とした免疫反応が大きく異なることも知られている。本研究では、NMの性状に基づいた免疫反応の違いを吸入暴露による *in vivo* の研究からその詳細な分子機序を明らかにすることを目的としている。さらに、*in vitro* で NM のマクロファージへの直接の影響を探索できるモデル系を確立して、*in vivo* の実験に対応しうるシグナル分子機構の解明を目指す。

令和2年度での *in vivo* の研究として、針状酸化チタン (TiDW) の吸入暴露による短期毒性の評価を実施するとともに、RAW246.7 細胞あるいは THP-1 細胞、さらに、線維芽細胞を用いて MWCNT に対する炎症・免疫反応の分子機序の解明を目指したモデル系の確立を目指した。

B. 研究方法

・マウスへの吸入暴露

12 週齢の C57BL/6 (雄) を用い、各群 5 匹ずつで Taquann 処理した針状酸化チタン (TiDW: Titanium dioxide whisker / FTL-300) を吸入暴露装置 (国立医薬品食品衛生研究所) により吸入を実施し、吸入後 4 週及び 8 週で適切に屠殺後解析を行った。

・フローサイトメトリー解析

肺胞洗浄液 (BALF) 中の単核球を採取するために、気管にサーフロー留置針 (SR-OT1851C, TERUMO) を留置し、1ml のシリンジ (SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO)

に 1ml の PBS を流し込み、回収後、洗浄、遠心し、組織保存液 (MACS® Tissue Storage solution, Miltenyi Biotec) に浸漬した。また、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。その後、ホモジナイズ後、0.83% 塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄、濾過を行った。蛍光色素標識 (fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PerCP-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin : APC, APC-Cy7, APC-Alexa Fluor 700) された各種表面マーカー CD3, CD19, CD45.2, CD11b, CD11c, F4/80, CCR2 (CD192), CD206, CD54, CD136 に対する抗体 (eBioscience, San Diego, CA) にて染色ならびに 7-amino-actinomycin D (7-AAD) 処理、0.9%-formalin-PBS で固定後、解析装置 (FACSCant BD Biosciences) にてそれらの発現を解析した。頸部リンパ節に関しても、染色後固定した (未解析)。

・*In vitro* 実験系

マウス単球細胞株 RAW264.7 ならびにヒト細胞株 THP-1、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 を培養系に用いた。培養系で Taquann 処理 MWCNT-7(T-CNT) を 0~125 ng/ml の濃度で刺激した。細胞数、細胞の大きさ、MMP-12 mRNA の発現、線維芽細胞関連因子の mRNA 発現を定量 RT-PCR で検討した。

・定量化 RT-PCR 法

培養系の細胞からの RNA 抽出に関しても通法に従い全 RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA を得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR 反応によって各遺伝子 mRNA を定量化した。転写レベルは 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。

MMP12; forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATT-3', reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAACTTTTAGT-3', TGF- β 1: forward, 5'-GACCGCAACAACGCCATCTAT-3', and reverse, 5'-GGCGTATCAGTGGGGTCAG-3'; Col1A2: forward, 5'-CCAAGGGTAACAGTGGTGAA-3' and reverse, 5'-CCATCACTGCCCCGAGCACC-3'; Col3A: forward, 5'-AACGGAGCTCCTGGCCCAT-3' and reverse, 5'-CCATCACTGCCCCGAGCACC-3'; Col IV: forward, 5'-ATGCCCTTCTCTCTGCAA-3' and reverse, 5'-GAAGGAATAGCCGATCCACA-3'; mSMA-F: GTTCAGTGGTGCCTCTGTCA mSMA-R: ACTGGGACGACATGGAAAAG β -actin; forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGG-3'。なお、BALF細胞および肺組織の一部をRNAlaterに浸漬し、冷蔵保存した（未解析）。

（倫理面への配慮）

マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として国立医薬品食品衛生研究所および徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

C. 研究結果

TiDWの吸入暴露実験

TiDWの吸入暴露後4週での肺胞洗浄液（BALF）中の細胞数は、対照群と有意な差はないものの、増加する傾向にあった（**図1 A**）。暴露後8週においてもTiDW暴露群と対

照群では有意な差は認められなかった（**図1 A**）。BALF細胞の直径に関しては、暴露後4週ならびに8週で、TiDW暴露群と対照群で差は見られなかった（**図1 B**）。

BALF細胞に関して、フローサイトメータを用いて、各種免疫細胞分画を解析したところ（**図2**）、血球系細胞（CD45.2⁺）中の肺胞マクロファージ（AM）、好酸球（Eo）、単球（Mo）の割合に関して、暴露後4週では対照群とTiDW暴露群では差が認められなかった（**図3 A**）。また、AMならびにMoを含めたF4/80⁺（未熟ならびに成熟AMを含む）の細胞分画においても両者で差は見られなかった（**図3 A**）。さらに、F4/80⁺AMにおける各種マクロファージ分画を検討してみると、CD11b（正常マクロファージでは陰性）、CD192（M1マクロファージマーカー／炎症性）、CD206（M2マクロファージマーカー／抗炎症性）分画に関して、対照群とTiDW暴露群で差は認められなかった（**図3 A**）。暴露後8週における解析においても、AM、Eo、MoならびにF4/80⁺AM分画の割合はTiDW暴露で変化は認められず（**図3 B**）、F4/80⁺AMの各種分画においても両者で変化は観察されなかった（**図3 B**）。それぞれの分画での経時的変化を検討すると、Eo、Mo、さらに、CD11b⁺AM、CD192⁺AM、CD206⁺AMでの4週と8週での割合に変化はあるものの、対照群とTiDW暴露群では有意差は観察されなかった（**図4**）。

BALF細胞中のF4/80⁺AMにおける活性化マーカーとして、CD54/ICAM-1の発現に関して検討すると（**図5 A**）、暴露後4週では対照群とTiDW暴露群では変化は認められなかったが（**図5 B**）、暴露後8週では、TiDW暴露によって対照と比較して有意に陽性分画が上昇していた（**図5 B**）。また、CD54の発現を蛍光強度によって検討したところ、暴

露後4週では対照群とTiDW暴露群では変化は見られず、暴露後8週では、割合と同様に対照群に比較してTiDW暴露群で高い値を示していたが、有意な変化ではなかった(図5C)。

また、スカベンジャー受容体の一つであるCD136 (macrophage-stimulating protein receptor, protein-tyrosine kinase 8)の発現に関して検討を加えたところ、暴露後4週から8週で全体に発現の上昇は見られたものの、対照群とTiDW暴露群のAMにおける変化は観察されなかった(図5D)。さらに、CD136⁺CD54⁺細胞の割合に関しても、暴露後4週から8週での増加は見られたものの、対照群とTiDW暴露群では有意な変化は認められなかった(図5E)。

一方で、脾臓におけるCD54およびCD136の発現を確認したところ、暴露後4週ならびに8週において、対照群とTiDW暴露群でいずれも変化は観察されなかった(図6)。

In Vitroの実験

RAW264.7細胞にT-CNT (125 ng/ml)を添加して24時間経過後、トリパンブルー染色を施し細胞の形態を顕微鏡にて観察すると、対照細胞に比較してT-CNT細胞の刺激では細胞質が広がり、細胞が大きくなっていることが明らかになった(図7A)。細胞の直径を自動計測装置で測定すると、T-CNT暴露にて有意に長くなることがわかった(図7B)。また、トリパンブルー染色を用いた生死を評価すると、T-CNT添加細胞で対照細胞に比較して、有意にcell viabilityが低下することが判明した(図7C)。T-CNT処理細胞におけるMMP-12 mRNA発現を定量RT-PCRで検討すると、対照細胞に比較して有意にMMP-12 mRNA発現が上昇していた(図7D)。さらに、RAW264.7細胞をT-CNTで24時

間した際の培養上清をNIH3T3細胞に添加後24時間での線維化関連因子のmRNA発現を定量RRT-PCRで検討すると、対照上清にて刺激した細胞に比較して、Col1A2、Col3a1、ColIV、smooth muscle actin (SMA)のmRNA発現が有意に高い値を示していた(図8)。一方で、ヒト単球細胞株のTHP-1細胞を用いて、T-CNTの刺激を加えると、100 ng/mlでの刺激では対照処理細胞に比較して有意にMMP-12 mRNA発現が上がっているが、RAW264.7ほどの上昇効果はなかった(図9)。そこで、THP-1細胞のT-CNT刺激にLPSを共に刺激を加えると、LPS刺激のみの細胞に比較して有意にMMP-12 mRNA発現が上昇した(図9)。

D. 考察

針状酸化チタン (TiDW) の吸入暴露後、4週間および8週間経過した時点でのBALF細胞の変化を検討したところ、細胞数、細胞の大きさに関して、対照群との有意な差は見出せなかった。さらに、肺泡マクロファージ、好酸球、単球の割合に関しても、TiDWの暴露による変化は4週、8週で観察されなかった。また、肺泡マクロファージのM1/M2タイプへの分化にもTiDWの暴露による影響は確認できなかった。T-CNT暴露によりCD11b⁺AMが増加することが報告されているが(PLoS One 2018)、TiDW暴露での変化は観察されなかった。8週までの経時的変化に関しても、対照群とTiDW暴露群で差は確認されなかった。肺泡マクロファージの活性化に関して、CD54⁺細胞が暴露8週においてTiDW暴露群が対照群に比較して有意に上昇していたことから、AMの活性化の指標として有用である。スカベンジャー受容体の一つであるCD136に関しては、この暴露系では変化が認められなかった。本吸入暴

露実験において、針状酸化チタンの暴露ではMWCNTの暴露で見られたような大きな変化は観察されなかったNMの形状および性状によって肺におけるマクロファージによる免疫反応は大きく異なっているものと想定される。今後BALFおよび肺組織における各種遺伝子mRNA発現に関して解析、BALF中の炎症性サイトカインの解析などを進める予定である。

*In vitro*の実験では、NMのマクロファージに対する直接的な影響が評価可能になる。今年度の実験ではマウス単球細胞株であるRAW264.7細胞ならびにヒト細胞株であるTHP-1細胞を用いて、*in vitro*でのT-CNTの影響について検討した。すでに、T-CNTの吸入後の慢性影響に関して、T-CNTの暴露でMMP-12を高発現する肺マクロファージが増加することを報告している (PLoS One 2018) ことから、*in vitro*におけるマクロファージへのT-CNT刺激による影響に関して、MMP-12発現を指標に評価検討したところ、*in vivo*で観察された所見を反映する結果が得られた。また、T-CNTの吸入暴露実験においても長期観察にて、肺組織の線維化が進み、コラーゲン (Type IV) の増生が亢進していることを報告している (PLoS One 2018)。今回のT-CNT処理RAW264.7細胞の培養上清を用いた実験系でも、線維芽細胞の線維化増生に関わる因子のmRNA発現が亢進していたことから、マクロファージから産生される因子が線維芽細胞を直接活性化している可能性が示された。MMP-12が直接作用していたかどうかは今後の検討が必要であるが、T-CNTに対する慢性炎症の機序を明らかにする契機になるものと考えられる。また、NMの影響を直接評価できるモデル系として、本培養系は有用であることが示された。

E. 結論

針状酸化チタンの吸入暴露実験では、肺マクロファージの分画に著変が見られなかったことから、NMの形状および性状によって免疫反応に相違がある可能性が示された。T-CNTを用いた*in vitro*の実験によってマクロファージからのMMP-12を介した慢性炎症機転が示唆された。

F. 健康危険情報

本実験を通してマウスへの健康危機に関する症状、兆候などは観察されなかった。

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Sato M, Arakaki R, Tawara H, Tsunematsu T, Ishimaru N. Formation of Autoimmune Lesions is Independent of Antibiotic Treatment in NOD mice. *Int J Mol Sci*, 2021, 22,3239. doi: 10.3390/ijms22063239.
2. Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A, Fujimori S, Ushio A, Yamashita F, Ishimaru N, Yin D, Cam M, Kelly M, Awasthi P, Takada T, Takahama Y. Thymoproteasome hardwires TCR repertoire of CD8+ T cells with cortical positive selection independent of negative selection. *J Exp Med*. 2021, 218(4):e20201904. doi: 10.1084/jem.20201904.
3. Kurosawa M, Shikama Y, Furukawa M, Arakakai R, Ishimaru N, Matsushita K. Chemokines upregulated in epithelial cells control senescence-associated T cell accumulation in salivary glands of aged and Sjögren's syndrome model mice. *Int J Mol Sci*. 2021, 22:2302. doi: 10.3390/ijms22052302.

4. Tsunematsu T, Arakaki R, Kawai H, Ruppert J, Yamada A, Tsuneyama K, Ishimaru N, Earnshaw WC, Pagano M, Kudo Y. APC/C-Cdh1 is required for the termination of CPC activity upon mitotic exit. J Cell Sci. 2020, 133(18): jcs251314. doi: 10.1242/jcs.251314.
 5. Kisoda S, Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Tsunematsu T, Jin S, Arakaki R, Ishimaru N, Kudo Y. Prognostic value of partial-EMT-related genes in head and neck squamous cell carcinoma by a bioinformatic analysis. Oral Dis. 2020, doi: 10.1111/odi.13351.
 6. 石丸直澄 (分担) わかりやすい病理学改訂第7版 45-70, 317-322, 2021 ISBN978-4-524-22654-2
 7. 石丸直澄 難病研究の進歩 シェーグレン症候群 生体の科学 71 (5) :476-747, 2020 ISSN 0370-9531
- G.2. 学会発表
1. 新垣理恵子、佐藤真美、木曾田暁、Shao Wenhua、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 多層化カーボンナノチューブと酸化チタン吸入暴露による肺胞マクロファージの動態 第109回日本病理学会総会 ポスター発表 2020.7.1-31 (ウェブ)
 2. 石丸直澄 口腔腫瘍の病理と遺伝子異常—癌形質と微小環境—オーバービュー 第109回日本病理学会総会シンポジウム 2020.7.1-31 (ウェブ)
 3. 佐藤真美、新垣理恵子、牛尾綾、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群の標的臓器における IL-33 の役割 第109回日本病理学会総会 ポスター発表 2020.7.1-31 (ウェブ)
 4. 常松貴明、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 染色体パッセンジャー複合体による胎児性癌の未分化性維持機構 第109回日本病理学会総会 口演 2020.7.1-31 (ウェブ)
 5. 佐藤真美、牛尾綾、新垣理恵子、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける肺病変の解析 ポスター発表 第62回歯科基礎医学会学術大会 2020.9.11-10.9 (ウェブ)
 6. 常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 多角的アプローチによる口腔癌の発生・進展の分子機構の解明 第62回歯科基礎医学会学術大会 先端歯学国際教育研究ネットワーク・シンポジウム「歯学研究の今昔と次世代研究」2020.9.11-10.9 (ウェブ)
 7. 石丸直澄 自己免疫疾患モデルを用いた発症機序の解明と治療戦略 東京工業大学化学生命科学研究soウェブ講演会 2021.1.28 (ウェブ)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得：なし
 2. 実用新案登録：なし
 3. その他：特記事項なし

図 1

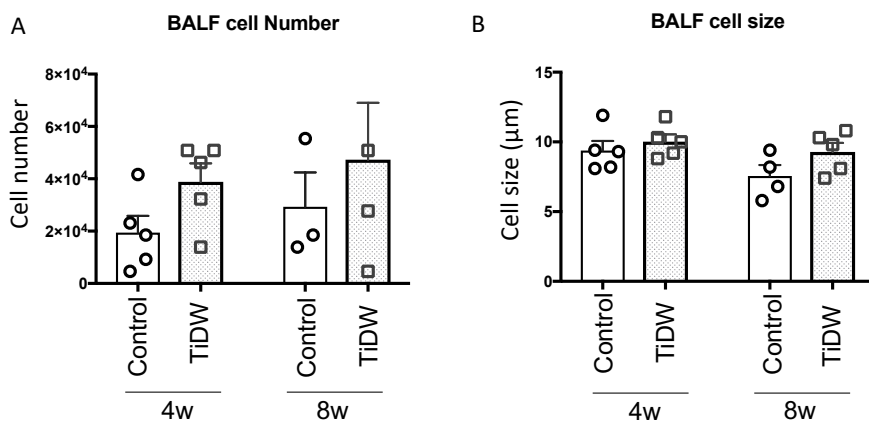


図 1 TiDW吸入暴露後のBALF細胞の変化

A:吸入曝露後4週、8週におけるBALF細胞数 結果(number)=平均値±SD (n=3~5/group)

B:吸入曝露後4週、8週におけるBALF細胞の大きさ 結果(μm)=平均値±SD (n=4~5/group)

細胞数および細胞直径はいずれも自動細胞計測器で測定した。

図 2

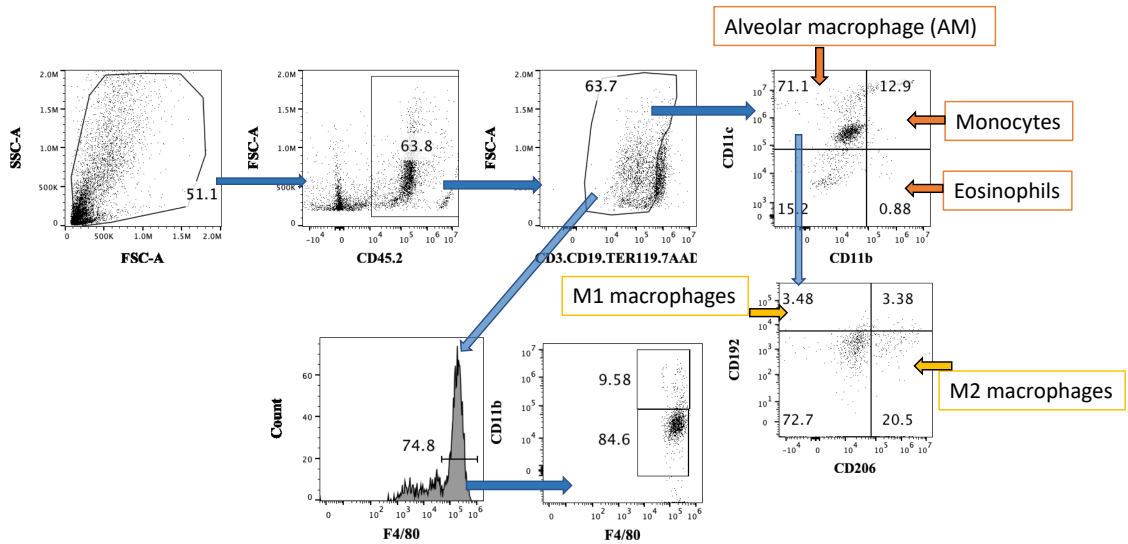


図 2 BALF細胞を用いたGating strategy

採取されたBALF細胞を用いて、各種標識抗体による反応、洗浄、固定後にフローサイトメータによる解析を実施した。SSC/FSC分画にてdebrisなどを除去し、CD45.2陽性血球細胞分画におけるCD3⁺CD19⁻TER119⁻7AAD⁻でゲートをかけた後に、CD11c/CD11bで展開してAM、Mo、Eo分画とした。さらに、AM分画をCD192 (M1マクロファージ)、CD206 (M2マクロファージ)を検出した。一方で、F4/80ならびにCD11bを用いたAM分画を確認した。

図 3

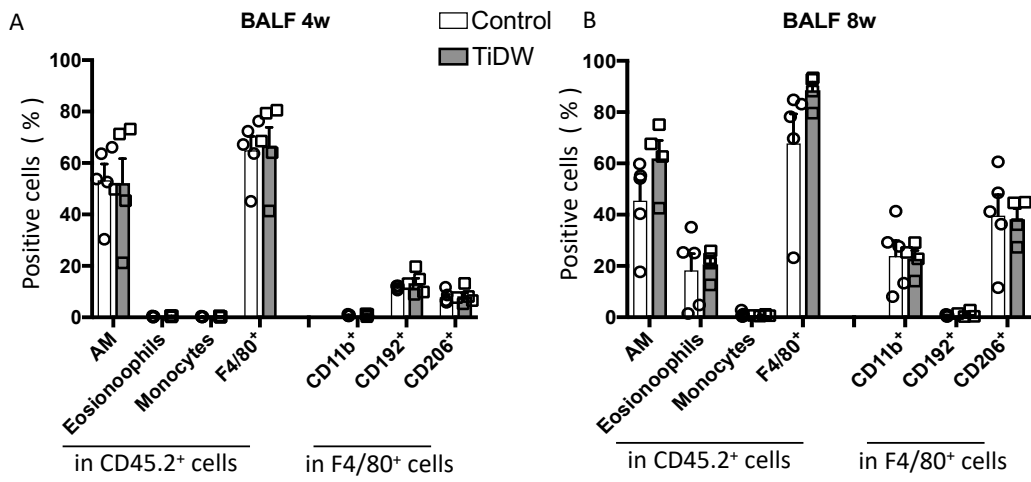


図 3 TiDW吸入暴露後のBALF細胞における免疫細胞分画
 A:吸入曝露後4週におけるBALF細胞における各種免疫細胞分画
 B:吸入曝露後8週におけるBALF細胞における各種免疫細胞分画
 結果 (%) = 平均値 ± SD (n=4~5/group)

図 4

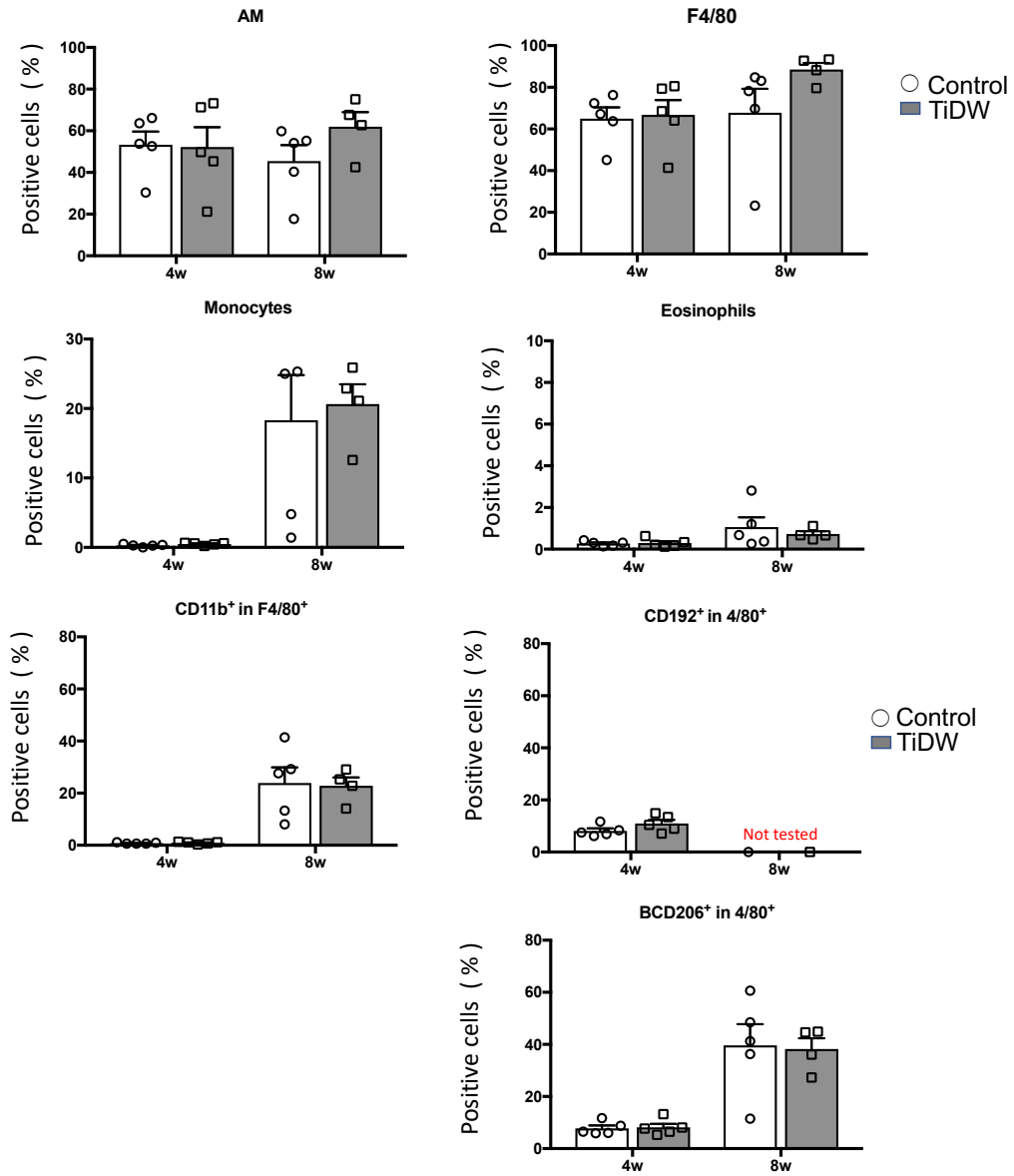


図 4 TiDW吸入暴露後のBALF細胞中の免疫細胞の経時的変化
 吸入暴露後 4 週、8 週における BALF 細胞中における各種免疫細胞およびマクロファージ分画の経時的変化を示す。
 結果 (%) = 平均値 ± SD (n=4~5/group)

図 5

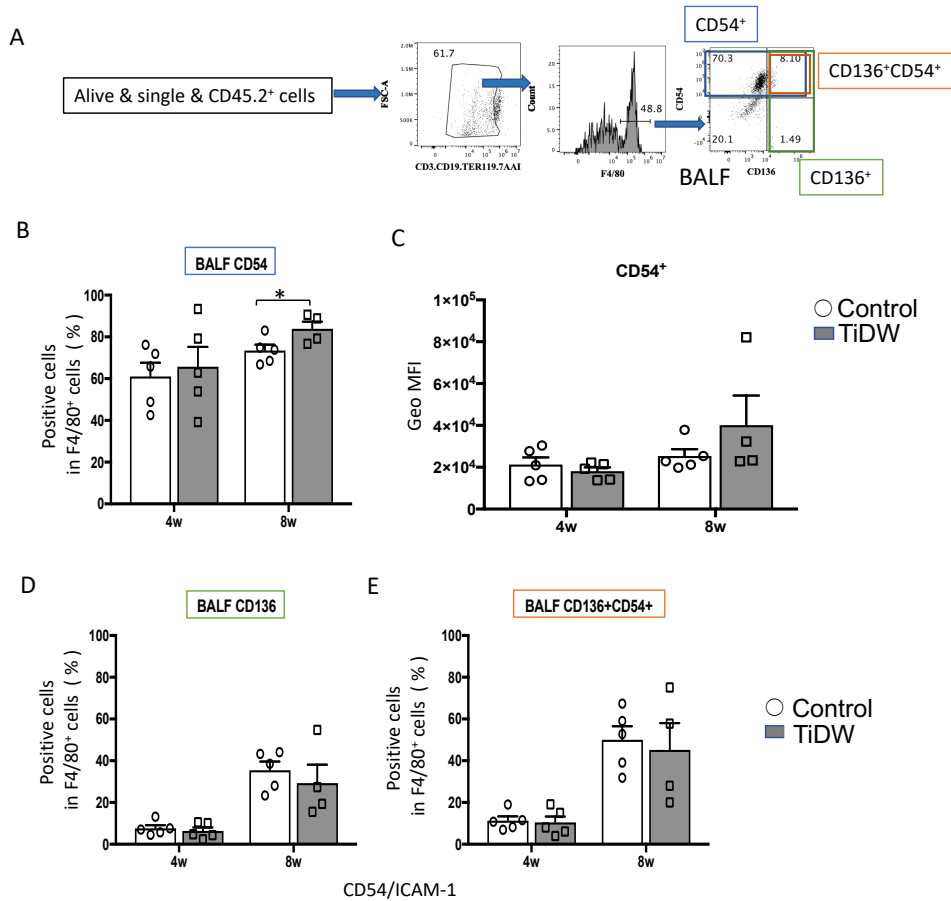


図 5 TiDW吸入暴露後のAMにおけるCD54及びCD136発現
 A: BALF細胞を用いたCD54及びCD136発現解析に関するgating strategy
 B: 吸入暴露後4週、8週におけるAMにおけるCD54発現結果 (%) = 平均値 ± SD (n=4~5/group), *p < 0.05
 C: 吸入暴露後4週、8週におけるAMにおけるCD54発現結果 (mean fluorescence intensity/MFI) = 平均値 ± SD (n=4~5/group)
 D: 吸入暴露後4週、8週におけるAMにおけるCD136発現結果 (%) = 平均値 ± SD (n=4~5/group)
 E: 吸入暴露後4週、8週におけるCD136+CD54+AM結果 (%) = 平均値 ± SD (n=4~5/group)

図 6

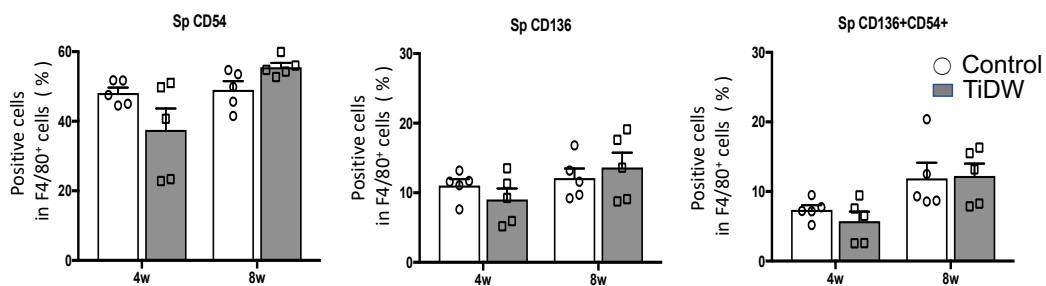


図 6 TiDW吸入暴露後の脾臓マクロファージにおけるCD54及びCD136の発現
吸入暴露後4週、8週における脾細胞におけるマクロファージ中 (F4/80*)の
CD54*、CD136*及びCD54*細胞の割合。
結果 (%)=平均値±SD (n=4~5/group)

図 7

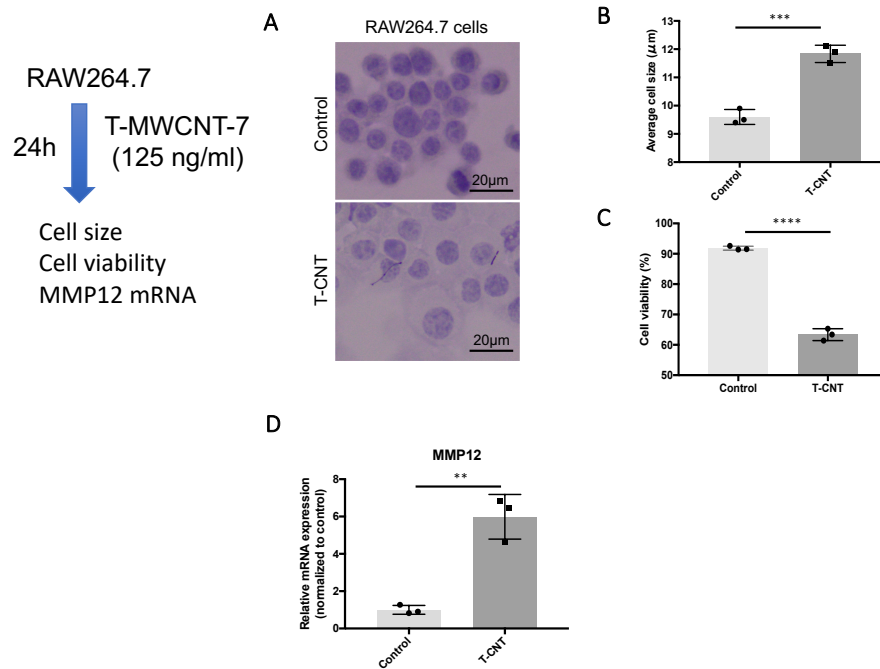


図 7 RAW264.7細胞へのT-CNT曝露による変化

RAW264.7細胞にT-CNT(125 ng/ml)を添加し、24時間後に細胞を回収した。

A:トリパンブルー染色処理を施された細胞を顕微鏡にて観察。T-CNT線維が観察される。

B:自動細胞計測装置にて細胞直径を計測した。

結果(μm)=平均値±SD (triplicate), *** $p < 0.00005$

C:細胞のviabilityをトリパンブルー染色によって自動細胞計測装置で判定した。

結果(%)=平均値±SD (triplicate), *** $p < 0.000005$

D:MMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて評価した。

結果(対照処理細胞に対する相対値)=平均値±SD (triplicate), *** $p < 0.005$

A~Dの結果は同様の実験を3回実施し、再現性を確認している。

図8

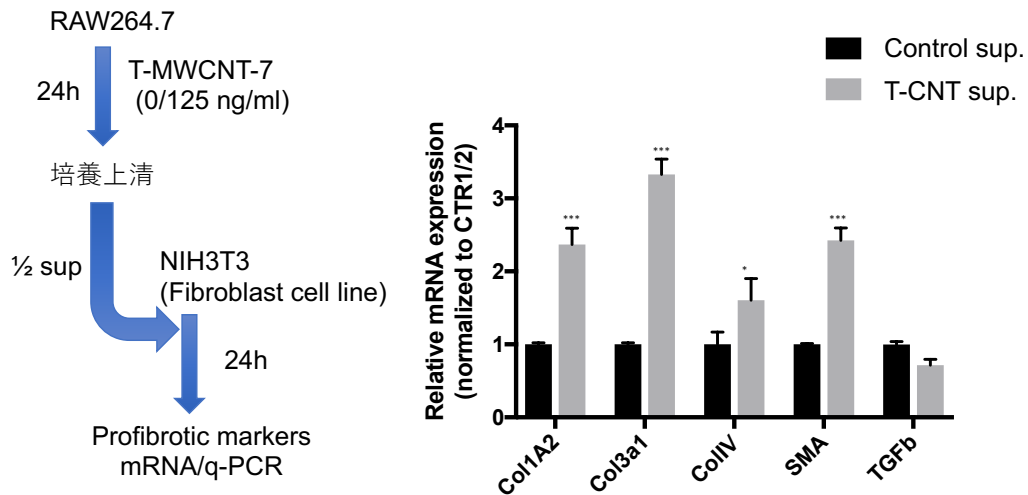


図8 T-CNT刺激RAW264.7細胞の培養上清を用いた線維芽細胞への影響
RAW264.7細胞にT-CNT(125 ng/ml)を添加し、24時間後に培養上清をNIH3T3細胞の培養液の1/2相当に添加し24時間後のNIH3T3細胞を回収し、各種遺伝子プライマーを用いてmRNA発現を定量RT-PCR法にて検討した。
結果(対照処理細胞に対する相対値)=平均値±SD (triplicate), *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005 同様の実験を3回実施し、再現性を確認している。

図9

THP-1 cell

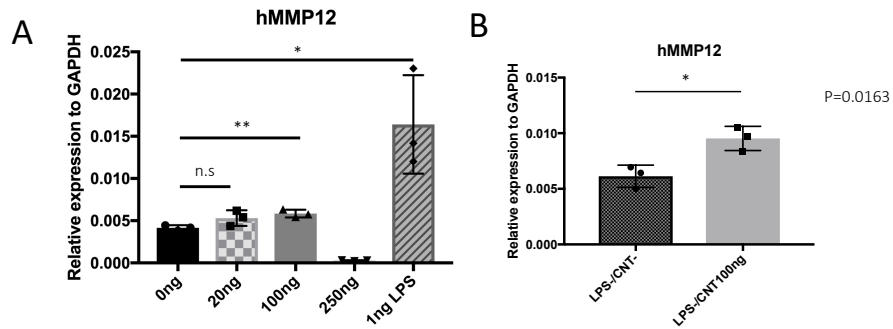


図9 THP-1細胞へのT-CNT曝露の影響

A: THP-1細胞にT-CNT(0~250 ng/ml)あるいはLPS (1 ng/ml)を添加し、24時間後に細胞を回収し、MMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて検討した。結果 (GAPDH mRNAに対する相対値)=平均値 ±SD (triplicate), * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

B:: THP-1細胞にT-CNT(100 ng/ml)およびLPS (1 ng/ml)を添加し、24時間後に細胞を回収し、MMP-12 mRNA発現を定量RT-PCR法にて検討した。対照細胞はLPS刺激のみとした。結果 (GAPDH mRNAに対する相対値)=平均値 ±SD (triplicate), * $p < 0.05$

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

in silico 評価系に関する研究

研究分担者 大野 彰子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官
研究協力者 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長

研究要旨

本研究では、短期吸入曝露された各種ナノマテリアル（NMs）の免疫系に与える影響について *in vitro/in vivo* 試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発と共に、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毒性発現経路（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。令和2年度は、6種の二酸化チタンナノ粒子を対象化合物（TiO₂ NPs: MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT600, TiDW）として物理化学的性状（物性）の測定および各種 *in vitro/in vivo* 試験の有害性情報の情報収集・整理を行う。更に、物理化学的性状の特性評価や、ナノマテリアルの物性と THP-1 細胞に与える影響の関連性解析および評価として、物理化学的性状データと有害性（毒性）データとの関連性解析を実施し、*in silico* 評価系に資する解析手法の確立と毒性メカニズムの予測を目指す。

A. 研究目的

ナノマテリアルは、同じ物質でも粒径サイズが1–100 nmと定義されており結晶構造など物性の違いにより、多彩な機能を生ずる特性を有している。近年、ナノマテリアルは、生産現場のほか家庭用品などへの利用の拡大と共に、ヒトへの健康影響の評価が重大な課題となっている。ナノマテリアルの有害性については、物理化学的性状や表面修飾により有害性が異なることが知られており、物理化学的性状と有害性情報を関連付けるような評価法や、有害性を示すような物理化学的性状の特徴を見出すことが必要とされる。諸外国ではナノマテリアルの規制への枠組みが進められているが、国内では未だ整備が進んでいない。

二酸化チタンナノ粒子（TiO₂ NP）は、化粧品の日焼け止めや顔料の他、塗料や繊維やインキ、食品添加物など幅広く使用されている。TiO₂の材料は、平均一次粒子径が200–400nmや、100nm以下の粒子体（TiO₂ NP）がある。また、TiO₂の結晶構造は、アナタース型とルチル型の2種類が存在し、さらに材料の種類によってはアナタース型とルチル型の混合型を有するものもある。これまで、TiO₂ NPの結晶構造や、粒子径、表面積などで*in vitro/in vivo*試験による毒性の違いについては議論されてきている。しかし、物理化学的性状は一部のデータ情報のみであり、詳細な物理化学的性状と有害性情報（毒性）との関連性はあまり分かっていない。さらに、TiO₂ NPsの毒性試験結果の報

告件数が未だ少ないことから、より多くのデータを収集・整備していく必要がある。

本研究では、短期吸入曝露された各種NMの免疫系に与える影響について、*in vitro/in vivo*試験法研究の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行い、得られた知見を基に*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。令和2年度は、対象化合物は6種の二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs: MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT600, TiDW) とし、物理化学的性状 (物性) ・有害性情報の収集・情報整理を行った。二酸化チタンナノ粒子の情報収集源については、物理化学的性状は化学分析の測定を実施し、収集した。さらに、本研究班で今年度実施された*in vitro*試験でのh-CLAT試験法による毒性試験結果や、厚生労働科学研究成果データベースMHLW GRANTS SYSTEM への公表分についても収集・整理した。その後、ナノマテリアルの物性とTHP-1細胞に与える影響の関連性解析および評価として、解析に資する物性データと有害性データは、多変量解析法による関連性解析にて検証した。

B. 研究方法

今年度の本研究で実施する対象化合物は6種の二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂ NPs: MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT600, TiDW) とした (Table 1)。

【物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目】

➤ 物理化学的性状データは、凝集、結晶子サイズ、比表面積、ゼータ電位、表面化学、その他のプロパティ等 について測定・収集・整理した。

➤ 有害性情報データは、本研究班で今年度実施された6種の二酸化チタンナノ粒子による*in vitro*試験でのh-CLAT試験法による毒性試験結果の他、厚生労働科学研究成果データベースMHLW GRANTS SYSTEMで公表された二酸化チタンナノ粒子の厚労科学研究費補助金化学物質リスク研究事業研究報告書、及びこれらの研究成果として公表された原著論文の公表分 (*in vitro*試験結果：細胞毒性試験、遺伝毒性試験等のEC50値等、*in vivo*試験結果：吸入ばく露試験、気管内投与試験、腹腔内投与・経口投与試験による急性毒性、免疫毒性、アジュバント効果等) を調査対象情報源とし、収集・整理した。(Table 2)

【物理化学的性状の分析対象項目】

- 成分分析 (化学分析)：蛍光 X 線法による定性分析 (対象元素：Na～U：下限 0.1%) (Table 3)、ICP 発光分光分析法による定量分析 (対象元素：Fe, Si, P, Al, Cr, Zr, Ca, Mg, Ti, Ce, Nb：下限 0.01%、Si・P は 0.05%)、原子吸光分析法による定量分析 (対象元素：Na, K：下限 0.01%)、燃焼-赤外線吸収法による定量分析 (対象元素：S、下限 0.01%)
- 細孔分布・比表面積測定 (粒子解析)：窒素吸着 BET 多点法による細孔分布ならびに比表面積測定 (Table 4)
- 親水性および疎水性評価 (表面化学分析)：粒体浸透速度測定、粒体接触角測定 (Figure 1)

【情報整理及びデータベース (DB) 搭載用のデータシートの作成】

収集した情報について MS-Excel のデータシートにて作成した。有害性情報に関しては、今後、HESS DB(「有害性評価支援システム統合プラットフォーム (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform、通称:HESS):ラットを対象(今回はマウスも対象)とした化学物質の反復投与毒性試験データ及び毒性にかかわる作用機序情報などを集積した毒性知識情報データベース」)に搭載できるように形式を整理し作成した (Table 7)。

【多変量解析法】

収集したデータについて多変量解析ソフトウェア SIMCA17 (Umetrix 社製)で以下の解析を実施した。これらの解析を行うことにより物質間の類似性や有害性 (毒性)の変動に寄与している物理化学的性状について同定した。

- 物理化学的情報に基づく主成分分析法 (PCA: Principal Component Analysis) からの階層的クラスタリング解析法 (HCA: Hierarchical Clustering Analysis) の実施により、サンプル間の距離が近いものからクラスターを形成し、類似度の高いクラス分類した (Figure 2A, 2B)
- 収集したデータに基づく物理化学的性状情報と *in vitro* 試験での h-CLAT 試験法毒試験結果のデータとの関連性について直交部分的最小二乗回帰分析 (OPLS: Orthogonal Partial Least Squares Regression) の実施した (Figure 3A, 3B, 3C)
- OPLS 法: $Y = f(x) = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots$ の回帰式から、Y 変数に連動する X 変数

を探索する (X 変数を使って Y 変数のモデルを構築する)。今回の解析では物性値を X の説明変数とし、毒性値 (h-CLAT 試験法毒性試験結果)を Y の目的変数として設定し X 変数から Y 変数のモデルを構築し、予測する。

- 収集したデータに基づく *in vivo* 試験結果 (腹腔内投与毒性試験・皮膚毒性試験結果) のデータについて PCA 法による検体間の傾向を検証した。(Figure 4A, 4B, 4C)
- *in vitro* 試験の h-CLAT 試験法毒性試験結果のデータと *in vivo* 試験毒性試験結果との紐付けの解析法の実施 (Figure 5A, 5B)
- ①物性⇔②*in vitro* 毒性試験結果⇔③*in vivo* 毒性試験結果について、MOCA (Multiblock Orthogonal Component Analysis) による 3 ブロックの統合解析を実施し、共通する変動の変数について探索した (予試験)。
- MOCA 法: O2PLS の改良版で、同じサンプルに対し複数の分析方法で得られた 2 つ以上のブロックデータを統合解析する。得られた全ブロックデータで共通の変動および各ブロックでの固有の変動を同時に可視化する。

C. 研究結果

1. データマイニング

物理化学的性状データ項目は主に先行研究で得られた OECD からの試験情報に基づいて作成しており、約 30 項目のデータを収集した。収集・整理された物理化学的

性状データシートおよび *in vitro / in vivo* 有害性情報シートは、このあとの多変量解析のため、以下についてデータマイニングを実施した。

- **Composition: impurity** の各項目についての検出限界以下 (<) は、「0」と定義した。
- 未測定データ・測定不能データは「空欄」と定義した。
- **Crystal : Phase, system, size1, size 2** に分類し定義した。
- **Size1,2 : TiDW** の needle 状の length (Vertical x Horizontal) を別々の項目にて定義した。
- **O (wt%) : TiO₂ (%)** の値から換算し算出した。
- **h-CLAT 試験法毒性試験結果** : 欠損データについては 10000 と定義した。
- **h-CLAT2 試験法毒性試験結果** : negative, positive(semipositive), positive は、「0, 1, 2」と数値化により定義した。
- **in vivo 毒性試験結果 (MHLW GRANTS SYSTEM)** : IgE, IgG1, IgG2 の測定結果の「増加、増加傾向、変化なし」は「0, 1.5, 2」と数値化により定義した。

2. 成分分析 (化学分析)

➤ 定性分析は日本電子(株)製エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 JSX-3100RII を用いて蛍光 X 線分析 (EDX) によって実施した (Table 3)。定量分析は ICP 発光分光分析装置 島津製作所 ICPS8100、原子吸光装置 Varian AA240、炭素・硫黄分析装置 CS-844 を用いて ICP 発光分光分析法、原子吸光分析法、燃焼-赤外線吸収法によって実施した。その結果、Ce(セリウム)は <0.01、Nb(ニ

オブ)は、<0.4 で検出された。

- 細孔分布・比表面積測定 (粒子解析)は、マイクロメリティクス製 細孔分布測定装置 ASAP-2020 を用いて真空中、300°C×3Hr 前処理を行い、窒素吸着 BET 多点法によって実施した (Table 4)。
- 粒子解析は、比表面積は BET プロットの傾き及び切片を用い、BET 式より単分子層吸着量を求め、単分子層吸着量にガス分子一個の占める断面積 (分子占有断面積) をかけて算出した。一方、細孔分布は、BJH 解析による細孔分布曲線を用いて求めた。結果として MT-150A は、他の検体と比較すると大きな穴を占有されていた。TKP-102 は AMT-150A と同じ比表面積であるが、細孔径が小さく (1/3~1/4) なり、結果的にその容積も小さくなった。AMT-100 は比表面積が最大だが、MT-150A に比べて細孔径が非常に小さいため、その容積も小さくなり、小さな穴で占有されていることが推察された。AMT-600 に関しては比較的少数の大きな穴で占有されていることが推察された。MT-500B はガス吸着による細孔分布測定の上限 (100nm) 付近から上限以上においてガスの吸着が確認されたことから、細孔容積は求めることができなかった。また、TiDW の細孔は検出されなかった (Table 4)。
- 表面化学分析は、親水性および疎水性評価には二つの測定方法 (粒体浸透速度測定および粒体接触角測定) によって実施した (Figure 1)。

- ・ 粒体浸透速度測定は、協和界面科学製 高機能表面張力測定装置 DY-500 (温度: 26±1°C湿度: 40±5°C液体: 蒸留水、粉体カラム半径: 5mm) によって実施し、試料をカラムに充填し、カラムを液体表面に鉛直に接液させた。その後、毛管現象により液体が粉体粒子の空壁 (毛管) を上昇 (浸透) したことによるカラムの重量変化を測定することにより浸透速度を求めた。
- ・ 粒体接触角測定は、協和界面科学製 高機能表面張力測定装置 DY-500 (温度: 26±1°C湿度: 40±5°C、毛管半径測定用液体: イソプロパノール (IPA) 粉体カラム半径: 5mm) を用いて、浸透速度法によって分析した。Figure 1 に親水性および疎水性の傾向をプロットした結果から、特に、TiDW の浸透速度 (青色のプロット) は、4.9 と高い親水性の傾向を示した。一方、粉体接触角の結果より、TiDW、MT-150A、AMT-100、TKP-102 (ほぼ有意差なし) AMT-600 > MT500B となり、AMT-600、MT500B は疎水性の傾向を示した。6 検体の中で TiDW は浸透速度の結果と合わせて最も親水性が高いと示唆された。

3. 物理化学的性状の類似性評価 (階層的クラスタリング解析: HCA)

収集・整理した 6 種の TiO₂ NPs の物理化学的性状についてデータマイニングをした後、PCA 法 (Figure 2A) および、階層的クラスタリング法 (HCA) による類似度調査の解析を実施した (Figure 2B)。その結果、全 6 物質の TiO₂ NPs の 30 項目についてクラスタ化し類似性が示された (Figure 2B)。

4. *in vitro* 細胞毒性試験 (h-CLAT 試験法 および MHLW GRANTS SYSTEM から の *in vitro* 細胞毒性試験報告結果)

in vitro 細胞毒性試験 (h-CLAT 試験法) の 6 種の TiO₂ NPs の試験報告について収集・整理した (Table 5)。その結果、TKP-102、AMT-600 の 2 物質間では Positive、AMT-100、TiDW の 2 物質間では Semipositive (総合的な判定は Positive だが Negative の判定項目も有するために不確定な Positive として扱うことからデータマイニング上、TKP-102、AMT-600 の 2 物質間の Positive と区別をするために Semipositive と定義)、MT-150A と MT-500B の 2 物質間では Negative の結果と判定された。

一方、MHLW GRANTS SYSTEM を情報源とした TiO₂ NPs の *in vitro* 細胞毒性試験結果報告については、1 試験の酸化チタンの細胞毒性試験 (細胞生存率%) および、1 試験の酸化ストレス測定試験 (8-OH-dG 測定)、酸化チタン A.B.C.D の 4 試験の免疫毒性試験 (サイトカイン/アジュバント効果: IL-1α、IL-1β、IL-6、TNFα) について収集・整理した (Table 6)。1 試験の前立腺正常上皮細胞株 RWP を用いた Alamar Blue Assay による細胞毒性試験 (細胞生存率%) の結果は、毒性を示さなかった (data not shown)。また、1 試験の前立腺癌細胞株 DU145 を用いた酸化ストレス測定試験の結果は、DNA 付加体形成が認められた (data not shown)。さらに、Table 6 に示すように酸化チタン A.B.C.D を検体として用いた 4 試験の免疫毒性試験では、培養ヒト角化細胞における IL-1β、IL-1α 誘導は見られなかった (酸化チタン A.B.C) が、THP-1 マクロファージからの NLRP3 インフレイマソーム活性を介した IL-1β 産生 (酸化チタン A.B.C)、THP-1 マクロファージか

らの TNF α 、IL-6 分泌(酸化チタン A.B.C)、THP-1 マクロファージからのサイトカイン放出(酸化チタン A.D)で誘導が見られた。

(酸化チタン A : MT-150A、酸化チタン B : MT-500B、酸化チタン C : AMT-100、酸化チタン D : 不明)

5. 物理化学的性状情報と *in vitro* 毒性試験結果 (h-CLAT 試験法) の多変量解析による関連性解析

物性データと *in vitro* 毒性試験結果データとの関連性解析については、直交部分的最小二乗回帰分析 (OPLS: Orthogonal Partial Least Squares Regression) により実施された (Figure 3A-C)。

その結果、Scores plot より横軸の第一主成分の正の方向(右側)に行くほど Positive の結果と一致した (Figure 3A)。さらに Loadings plot から棒グラフで表示させた Figure 3B より、毒性に関連する変数(物性)は、正の相関が大きくなるに伴い、毒性の Positive に関連する変数(物性)が示唆された (Figure 3B, 3C)。従って、OPLS 法により第一主成分(横軸)で毒性と関連する物性項目が探査可能であることが示唆された。Loadings plot から棒グラフで表示させた Figure 3B から、毒性が Negative である MT-150A MT-500B に寄与する変数(物性) (インパクトが大きく、エラーバーが比較的落ち着いている)は、Crystal Phase(Rutile)、Pore volume(cm³/g)、Ca が挙げられた。また、毒性が Positive な TKP-102 AMT-600 に寄与する変数(物性) (インパクトが大きく、エラーバーが比較的落ち着いている)は、Crystal Phase(Anatase)、P が挙げられた (Figure 3B)。一方、インパクトが大きく、ばらつきも大きいような、毒性が Negative に影響している(傾向として高い)変数(物

性)は、Na Porediameter(nm)が挙げられ、毒性の Positive に影響している(傾向として高い)変数(物性)は Zr,Nb,Zeta potential(mV)が挙げられた。(Figure 3C)

6. *in vivo* 毒性試験 (MHLW GRANTS SYSTEM からの *in vivo* 毒性試験報告結果)

MHLW GRANTS SYSTEM から収集された TiO₂ NPs の *in vivo* 毒性試験報告結果については、肺への影響をエンドポイントとした 4 試験の吸入暴露試験、9 試験の気管内投与試験、3 試験の腹腔内投与試験、2 試験の胸膜腔内投与試験データについて、HESS 搭載用に収集・整理した (Table 7)。その他、免疫毒性試験でのサイトカイン_アジュバント効果をエンドポイントとした腹腔内投与試験、経皮適応、経口投与試験データの合計 9 試験について収集・整理した (Table 6)。

➤ 反復投与吸入毒性試験結果

反復投与毒性試験(吸入暴露および気管内投与試験)の有害性情報は、Taquann 法による吸入暴露試験が 4 試験、気管内投与試験が 9 試験の毒性試験データの結果について収集した。これらの収集項目では、試験種類、動物種、試験条件(約 28 項目)の他、Endpoint として BAL 細胞数の増加、炎症、生化学値等の変動が生じた LOAEL 等(約 511 項目)の合計約 539 項目について調査し、収集・整理を行った (Table 7)。

その結果、MT-500 (ルチル型、粒子径: 35 nm) B は 2 試験実施されていた。そのうちの 1 試験では、C57BL/6NcrSlc、野生型、p53^{+/+}-マウス (5 回 (2h/day, 合計 10h)への全身吸入暴露直後のマウス

肺には、細気管支の気管支上皮に接するように、微細な粒状物質を貪食したマクロファージを認めた。さらに CC-10 の免疫染色で CC-10 陽性のクララ細胞の増殖を伴い、粒状物質は CD68 陽性の活性型マクロファージに貪食されていることを確認した。暴露終了後 13 週目の肺では肉眼的に顕著な変化は見られず、また、病理組織学的にも変化に乏しく、酸化チタンの全身吸入暴露による影響はほとんど認めなかったが、限局的に肺胞の線維化を伴うリンパ球の集簇像を認め、小肉芽腫様変化と考えた。同部位は CC-10 陽性の細胞に変化は見られず、SPC 陽性の二型肺胞上皮細胞増生が見られた。また、CD68 陽性の活性型マクロファージの集簇像も認めた。ただし、これらの変化はごく限局的に認められたのみであり、酸化チタンの全身吸入暴露後 13 週での変化としては極軽微な変化であった。

AMT-600 (アナターゼ型、粒子径 : 6 nm) は 1 試験実施されており、C57BL/6NcrSlc マウス (5 回 (2h/d, 1 回/w, 合計 10h) への T-TiO₂ の組織負荷量の肺負荷量では暴露直後で 150.11±9.05 µg/g; 1 週目: 112.47±13.94 µg/g; 4 週目 63.05±7.21 µg/g; 8 週目: 25.85±11.36 µg/g (8 週後の負荷量は約 1/6 の減衰傾向)、縦隔負荷量では TiO₂ の負荷は認められなかった。肺組織負荷量の測定結果から、本実験の吸入暴露条件では、マクロファージの運動機能についての影響はみられていないと考えられた。病理組織学的検査では、暴露終了日 (0 週) から暴露終了後 8 週までいずれの解剖期にも毒性病変を認められなかった。BALF 塗抹細胞の百

分比では、各群の 0、1、4 週での BALF 塗抹細胞はほとんど全てがマクロファージであり、T-TiO₂ 曝露群 4 週でマクロファージの他に単球 0.4%、リンパ球 0.1%であった。BALF 塗抹肺胞マクロファージにおける検体の貪食率では、0 週から 4 週までほとんどすべての肺胞マクロファージが検体粒子を貪食していたと述べられていた。

MT-500B、AMT-600 とともに、肺胞マクロファージの影響による増加はみられたが、全身吸入暴露による顕著な病変への影響は認められなかったと述べられていた。

▶ 免疫毒性試験

① 腹腔内投与試験

抗原腹腔内投与によるマウス感作におけるアジュバント効果の検討【平成 26 年度:掲載報告書 No.201624004B および 201428014A】

試験検体

- 酸化チタン MT-150A (ルチル型、粒子径 : 15 nm)
- 酸化チタン MT-500B (ルチル型、粒子径 : 35 nm)
- 酸化チタン AMT-100 (アナターゼ型、粒子径 : 6 nm)

モデル抗原 (卵白アルブミン ; OVA、20 µg) 及び酸化チタン (2mg あるいは 10mg) を生理食塩水 300 µL に懸濁し、BALB/c マウス (雌性、7 週齢、1 群 5 匹) に腹腔内投与した (1 次免疫)。14 日後に再度投与し (2 次免疫)、翌日に血液を採取して、血清中の OVA 特異的 IgE 及び IgG1 抗体を ELISA 法で測定した。試験

結果は、3種の酸化チタン（MT-150A、MT-500B、AMT-100）とも、陽性対照アジュバントとして用いた Alum と同様に、OVA 特異的な IgE 及び IgG1 抗体の産生を用量依存的に増強すると述べられていた。

② 経皮適用試験

抗原経皮感作時の共存効果の検討[平成26-28年度：掲載報告書 No.201624004B および 201428014A]

試験検体

- ・ 酸化チタン MT-150A（ルチル型、粒子径：15 nm）
- ・ 酸化チタン MT-500B（ルチル型、粒子径：35 nm）
- ・ 酸化チタン AMT-100（アナターゼ型、粒子径：6 nm）

モデル抗原 OVA(1-2 μ g)及び酸化チタン(12.5 ng-1.25 mg)の混合懸濁液を BALB/c マウス（7週齢、1群5匹）に経皮感作し、血液を採取して、血清中の OVA 特異的 IgE 及び IgG1 抗体を ELISA 法で測定した。試験結果は、粒子径が最も小さい酸化チタン AMT-100（6 nm、アナターゼ型）では、OVA 貼付時に 125 ng を添加した場合に、抗原特異的抗体産生、アレルギー反応惹起時の体温低下、アナフィラキシースコア、血中ヒスタミン濃度の全てにおいて、OVA 単独群と比較して有意な増大が見られた。酸化チタン MT-150A（15 nm、ルチル型）では、OVA 貼付時に 12.5 μ g を添加した場合に、アレルギー反応惹起時の体温低下及びアナフィラキシースコアにおいて、OVA 単独群と比較して有意な増大が見られ、

抗体産生や血中ヒスタミン濃度においては増大する傾向が見られた。また、1.25 μ g、125 μ g を添加した場合にも同様の傾向が見られた。一方、粒子径が最も大きい酸化チタン MT-500B では、どの用量の場合も有意な変化は見られなかった。これらの結果より、酸化チタンナノマテリアルが抗原タンパク質の経皮感作を増強すること、また、この効果は粒子径に依存する（粒子径が小さい方が効果が大きい）こと、結晶構造（ルチル型、アナターゼ型）による顕著な差は見られないと述べられていた。

今回、MHLW GRANTS SYSTEM から収集された TiO₂ NPs の *in vivo* 毒性試験報告結果の肺への影響をエンドポイントとした有害性情報について、今年度を実施した TiO₂ NPs の6検体のうち2検体(MT-500B、AMT-600)が同一検体で試験されていたが、解析用データには検体数が少ないため（n=3以上）適応できなかった。従って、*in vivo* の免疫毒性試験の予試験的な解析には、今年度を実施した TiO₂ NPs の6検体のうち3検体(MT-150A、MT-500B、AMT-600)が同一検体であったマウスを使用した腹腔内投与試験と皮膚適応の上記2試験について収集した *in vivo* の免疫毒性試験結果の解析用データに適応した。

7. *in vivo* 試験結果について PCA 法による検体間の傾向についての多変量解析

MHLW GRANTS SYSTEM から収集された TiO₂ NPs の *in vivo* 免疫毒性試験報告結果（免疫毒性試験データ）について、6検体の TiO₂ NPs のうち3検体(MT-150A MT-500B AMT-100)の結果が得られていたことから、物性および *in vivo* 試験結果の共通の

解析用検体として選択し、まず免疫毒性試験データだけを PCA 法により検体間の傾向を検証した (Figure 4)。

一方、*in vitro* 試験による h-CLAT 試験法の結果から、AMT-100 は、Semiposi (MT-150A MT-500B: Negative) であることから、*in vivo* 免疫毒性試験データからの PCA 法で照らし合わせると、第2主成分(縦方向)で毒性の相関がみられた (Figure 4A)。Figure 4B の loadings plot から、第2主成分の正に相関 (左上部分) する IgE_OVA2_125ng と IgG1_OVA2_125ng の2つの変数が、毒性の Positive に寄与していることが示唆された。また、Figure 4C に示されるように、同じく正に相関している (右上の) IgE_OVA2_12.5ng と IgG1_OVA2_12.5ng の2つの変数に関しては、AMT100 と MT150A の2検体に共通に上がってきていることが示された。従って、低濃度 (12.5ng) の投与では、AMT100 と MT150A の2検体間で、IgE_OVA2 と IgG1_OVA2 が上がり (Figure 4C)、さらに10倍濃い濃度 (125ng) の投与では、AMT100のみ毒性がでていることが示唆された (Figure 4B)。従って、h-CLAT 試験法の結果と比較すると AMT100 は Positive (Semipositive) な傾向であることから、*in vivo* 免疫毒性試験データからの PCA 法の結果から IgE_OVA2 と IgG1_OVA2 が、h-CLAT 試験法の毒性結果の Positive (Semipositive) に寄与する変数であることが推察された。

従って、次の 8. で h-CLAT 試験法の毒性結果データと紐付ける解析をすることで検証した。

8. *in vitro* 試験の h-CLAT 試験法毒性試験結果と *in vivo* 試験の毒性試験結果との関連性 (紐付け) 解析 (OPLS 法)

in vitro 試験の h-CLAT 試験結果は、データマイニングより、0, 1, 2 と数字が高いと Positive に相当するように定義した (h-CLAT2)。前述の 7. で *in vivo* 試験による免疫毒性試験データの PCA 法による解析結果から、IgE_OVA2_125ng と IgG1_OVA2_125ng が h-CLAT 試験結果と正の相関を持つことが推測されたことから、*in vitro* 試験の毒性試験結果データ (h-CLAT2) を Y 変数として、*in vivo* 試験結果データ (投与条件) を X 変数とした OPLS 法の実施により、*in vitro/in vivo* 毒性試験結果間の関連性について検証した (Figure 5A, 5B)。

解析結果より、Figure 5A の Scores plot で第一主成分の正の相関が毒性の Positive に寄与していることが示唆された。そこで、Loadings plot で表示させると、横軸で正の相関 (毒性が Positive) のある変数 (投与条件) は、IgE_OVA2_125ng と IgG1_OVA2_125ng であることが示唆された (Figure 5A)。さらに Loadings plot の棒グラフで寄与している変数 (投与条件) について詳細をみるとエラーバーが大きいインパクトのある2変数 (IgE_OVA2_125ng と IgG1_OVA2_125ng) が、毒性の Positive と正の相関を持つ傾向であることが示唆された (Figure 5B)。一方、横軸で負の相関 (左側) の変数 (IgE_OVA20-2, IgE_OVA2-125 μg, IgG1_OVA2-125 μg, IgE_OVA2-12.5 μg, IgG1_OVA2-12.5 μg, IgE_OVA2-1.25 μg, IgG1_OVA2-1.25 μg) の値が大きくなると毒性の Negative な結果になる傾向であることが示唆された (Figure 5B)。従って、毒性が Positive に寄与する投与量

は、インパクトが大きくエラーバーが小さい 2 変数 (IgE_OVA2_125ng と IgG1_OVA2_125ng) がマーカとして挙げられ、*in vivo* の免疫毒性試験では、この変数の上がり下がりを見ることで、毒性が Positive になる傾向があると考えられた。

9. ①物性⇔②*in vitro* 毒性試験データ⇔③*in vivo* 免疫毒性試験データ (腹腔内投与毒性試験・皮膚毒性試験の 2 試験結果) について、MOCA (Multiblock Orthogonal Component Analysis) による 3 ブロック間の統合解析の実施と共通変動の変数の探索 (予試験)

MOCA 法は、同じサンプルに対し複数の分析方法で得られた 2 つ以上のブロックデータを統合解析できる。また、全ブロックで共通の変動、各ブロックでの固有の変動について同時に可視化を可能とする解析手法である。*in vivo* 免疫毒性試験で使用した検体は MT-150A、MT-500B、AMT-100 の 3 検体であったことから、MOCA 法による解析は、この 3 検体に絞っての 3 ブロック間の統合解析の実施と、共通変動の変数を探索した。

解析結果は、Figure 6A の Scores plot で、まず 3 ブロック其々に Scores プロットが作成され、Scores plot の凡例 (単位) は $tj(\text{avg})[1]$ は average (平均) で表示されていることから、3 ブロック其々に Scores plot の重ね合わせの結果の MOCA 法による Scores plot となる (Figure 6A)。しかし、Figure 6A の loadings plot および Figure 6B の Score Correlation Matrix の結果から、*in vivo* 試験の免疫毒性結果が計算されなかった。これは *in vivo* 毒性試験結果と共通で関連しているところが示されず、物性と *in vitro* 毒性試験結果の関連性

のみが見出されたと考えられた (*in vitro* との共通な部分が見つけられなかったので、成分として抽出されなかった)。

Figure 6C に示される Joint components と 3 ブロック間の R2X から、第一主成分

(Joint components 1 の R2X) では物性と *in vitro* 毒性試験結果は、累積指数が 0.733 の 0.67 となり、相関がみられたものの、*in vivo*(皮膚_毒性)の累積指数は、「---」と表示され、相関がなかったことを示唆した。一方で、下段の unique component 1 は *in vivo* 免疫毒性試験データのみ 71% と計算されてきたことから、*in vivo* 免疫毒性試験データは、(かなり) 独立していることが示唆された。従って、①物性⇔②*in vitro* 毒性試験データ⇔③*in vivo* 免疫毒性試験データの 3 ブロック間では、*in vivo* 免疫毒性試験データは独立して変動をしていると推察された。

10. HESS DB 搭載のための情報整理およびデータシートの作成

HESS 搭載用に規格化されたシートをひな形として用いて今回情報収集した TiO₂ NPs のデータコンテンツに特化した項目を追加した。その結果、実施期間、被験物質、試験動物、試験条件情報等について約 28 項目と、毒性試験結果情報 (NOEL、LOEL) 血液学的検査、生理学的検査、尿の一般検査、病理組織学的所見等の約 511 項目について、新たな規格データシートを作成した (Table 7)。

D. 考察

成分分析の定性分析による Ce の検出は、定量分析結果から偏析の可能性として考えられた。Nb(ニオブ)は、製造元より酸化チタン製造に用いる原料に 0.1-0.2%程度

含まれている情報から、本試験結果と一致し二酸化チタンナノ粒子そのものに含有していたものではないことがわかった。また、TiDW に関して細孔が検出されなかった理由は、針状の形状によるものと考えられた。一方で、検出された細孔については微粒子の凝集による空隙である可能性も考えられた。TiDW は、他の検体に比べて、ばらつきが大きかったが、その原因(要因)として、検体調整で一樣の状態の作成が難しくダマができやすい様子がみられ、針状結晶で圧縮成形のばらつきが発生していることが示唆された。

6種のTiO₂NPsの物性データの階層的クラスタリング解析では、大きく3ブロックでクラス分類された。また、3つのクラス分類された結果と*in vitro*毒性試験結果(h-CLAT試験法結果)との比較では、毒性結果との関連性は見いだせなかった。そこで、物性データと有害性データとの関連性について調べるため、6種のTiO₂NPsについて収集した物性データと*in vitro*毒性試験データ(h-CLAT試験法結果)を用いて、OPLS法による多変量解析を実施した。その結果、毒性と関連する変数(物性項目)が横軸から探査可能であることが示唆された。さらに解析を進めた結果、毒性に寄与する変数(物性項目)として、毒性がPositiveな結果に関連する相関の強い変数(物性項目)は、Crystal Phase (Anatase)、P、Zr、Nb、Zeta potential (mV)、一方、毒性がNegativeな結果に関連する相関の強い変数(物性項目)は、Crystal Phase (Rutile)、Pore volume (cm³/g)、Ca、Na、Porediameter (nm)となり、毒性がPositiveおよびNegativeに対する相関の高い主な物性項目の組み合わせとして挙げられた。毒性がPositiveである物性項目の組み合わせから、結晶形態

のAnatase型はRutile型よりも毒性情報として比較的報告があることや、impurityの量、一次粒子径よりも分散性に伴う二次粒子径の影響が毒性に寄与していることを反映していると考えられた。

次に、*in vitro*試験の毒性試験データと*in vivo*試験の毒性試験データとの関連性解析(紐付け)を行うため、Y変数をh-CLAT試験法データ(h-CLAT2:数値化したもの)、X変数を*in vivo*毒性試験データとしてOPLS法にて検証した結果では、*in vitro*毒性試験結果に関連する相関の高い*in vivo*毒性結果が導き出された。従って、本解析法により*in vitro*/*in vivo*の毒性試験結果との紐付けが可能であることが示唆されるものであった。さらに、本解析結果は、*in vivo*毒性試験データのみでのPCA法による解析でも同様の傾向が得られていることから、本手法の有用性を証明するものであった。

MOCA法はマルチブロック解析により全ブロック間で共通している部分だけを抽出してくる手法である。一方で、*in vitro*のh-CLAT試験法の結果と*in vivo*の毒性試験結果の関連性についてはOPLS法により検証されたにもかかわらず、MOCA法ではこの情報が計算過程で埋もれてしまっていた。この要因として、今回、物性のデータが一番確からしくでていることより、物性のデータにかなりひっぱられていたと考えられた。さらに、*in vivo*毒性試験結果でのPCA法の解析結果を見直すと、全体的にばらつきが大きかった要因もあり、MOCA法による解析でこのような部分の影響が計算過程で埋もれてしまったものと考えられた。

E. 結論

6種の二酸化チタンNMについて、物性は

成分分析と細孔分布・比表面積測定の実施により、各種二酸化チタンナノ粒子のナノ特異的な物性を明らかにした。二酸化チタンナノ粒子の有害性情報に関する*in vitro*毒性試験データは、OECDテストガイドライン法h-CLAT試験において6種の二酸化チタンナノ粒子のTHP-1細胞を用いた細胞生存率、CD86およびCD54発現に与える影響の結果について纏めた。*in vivo*有害性情報は、二酸化チタンナノ粒子のこれまで厚生労働科学研究で実施された結果（厚生労働科学研究成果データベースMHLW）や、公開された文献等から取得した。特に、肺に炎症所見のある試験結果については、HESSデータベースへの搭載用にデータシートへ纏めた。その後、これらの収集した物性や*in vitro/in vivo*の有害性の収集データについては、解析用データに整理・データマイニングし、物性についての特性解析、物性と有害性データとを紐づける関連性解析、*in vitro/in vivo*毒性試験間での毒性を紐づける関連性解析、物性/*in vitro*毒性試験結果/*in vivo*毒性試験結果の3ブロック間の共通解析を実施した。その結果、有害性評価に鍵となる物理化学的性状の組み合わせや様々な多変量解析手法の有用性が見出された。今回のMOCA法による解析では、*in vivo*毒性試験結果の相関が見いだせなかった。これは、計算過程でインパクトの強い物性データに引っ張られてしまったと考えられた。物性と*in vitro*毒性試験結果の関連性については、これまで解析でされてきていたように、説明（計算）がされやすいことが示唆され、MOCA法では、物性と*in vitro*毒性結果の関連性の解析部分が、やはり一番に相関として見出されたものであった。従って、相関が見つけにくい*in vivo*毒性試験結果については計算されてこなかったこ

とから、本試験解析結果で記載した3から8.の解析手順で丁寧に作成モデルを検証し追っていくことが重要であると結論づける。

G. 研究発表

G.1. 論文発表

該当なし

G.2. 学会発表

- 1) 大野彰子, 渡邊昌俊, 広瀬明彦: 多変量解析を用いたナノマテリアルの毒性評価手法の開発, 第47回日本毒理学学会学術集会 (2020.6.29-7.1, web開催)
- 2) ○ Ohno A, Watanabe M, Hirose A: Application to toxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
- 3) Fukuhara K, Ohno A: Generation of reactive oxygen species following photoirradiation of nitromusks, 260th ACS National Meeting (August 16-20, 2020, virtual meeting)
- 4) 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)
- 5) 大野彰子, 沖山佳生, 広瀬明彦, 福原 潔: ニトロ多環芳香族炭化水素の構造と変異原性に関するドッキングスタディ, 日本薬学会第141年会 (2021.3.26-29, web開催)
- 6) 福原 潔, 中西郁夫, 大久保敬, 今井耕平, 水野美麗, 松本謙一郎, 大野彰子: C-メチルフィセチンのラジカル消

去作用, 日本農芸化学会 2021 年度大会 (2021. 3.18-3.21, web 開催)

- 7) 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 Virtual Annual Meeting (2021.3.22, USA, web 開催)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

Table 1 Surveyed substances: Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs).

NM	Crystal type	Crystal system	Crystal size	Surface coating	Composition (TiO ₂ , %)
MT-150A	Rutile	tetragon	15	uncoating	92.9
MT-500B	Rutile	tetragon	35	uncoating	99.5
AMT-100	Anatase	tetragon	6	uncoating	86.9
TKP-102	Anatase	tetragon	15	uncoating	97.5
AMT-600	Anatase	tetragon	30	uncoating	97.5
TiDW	Rutile	needle	5.15x0.27	uncoating	100

Table 2 Target materials (TiO₂ NPs) collected from database of the MHLW GRANTS SYSTEM.

研究課題名	代表	研究報告書等	研究対象 ナノマテリアル
ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究-全身暴露吸入による毒性評価研究-	今井田克己	- 平成26 (2014) - 28 (2016) 年度_201624003B 総合研究報告書 - 平成26 (2014)_ 201428013A総括 - 平成27 (2015)_ 201524009A総括 - 平成28 (2016)_ 201624003A総括	TiO ₂ (MT-500B)
ナノマテリアルの吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究-生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築	相磯成敏	- 平成29 (2017) 年度_201725011A総括 - 平成30 (2018)年度_201825007A総括	TiO ₂ (AMT-600)
ナノマテリアル曝露による慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究	広瀬明彦	- 平成27 (2015) - 29 (2017) 年度_201725017B総合研究報告書 - 平成27 (2015) 年度_201524021A総括 - 平成28 (2016) 年度_201624019A総括 - 平成29 (2017) 年度_201725017A総括	チタン酸カリウムTiO ₂ (anatase型及びrutile型)
食品用途となるナノマテリアルの暴露による毒性評価に関する研究	小川久美子	- 平成29 (2017) - 令和元 (2019) 年度_201924002B 総合研究報告書 - 平成29 (2017) 年度_201723022A総括 - 平成30 (2018) 年度_201823008A総括 - 令和元 (2019) 年度_201924002A総括	TiO ₂
抗原性物質への免疫応答に対するナノマテリアル経皮曝露の影響に関する評価手法の開発研究	安達玲子	- 平成26 (2014) - 平成28 (2016) 年度_201624004B 総合研究報告書 - 平成26 (2014) 年度_201428014A総括 - 平成27 (2015) 年度_201524010A総括 - 平成28 (2016) 年度_201624004A総括	TiO ₂
生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案	渡邊昌俊	- 平成30 (2018) 年度_201825013A総括 - 令和元 (2019) 年度_201926009A総括	TiO ₂ (MT-150A、MT-500B、AMT-100、TKP-102、AMT-600)

Table 3 Results of X-ray fluorescence analysis using TiO₂ NPs (estimated presence ratio).

	推定存在比(%)		
	Ti	Ce	Nb
MT-150A	99.8	<0.1	0.2
MT-500B	99.7	<0.1	0.3
AMT-100	98.7	0.9	0.4
TKP-102	99.6	<0.1	0.4
AMT-600	99.7	<0.1	0.3
TiDW	100	<0.1	<0.1

Table 4 Results of multipoint BET nitrogen adsorption analysis using TiO₂ NPs.

	比表面積 (m ² /g)	メソポー領域 BJH 解析 (1~100nm)	
		細孔容積 (cm ³ /g)	細孔径※1 (nm)
MT-150A	109	0.44	46
MT-500B	35	-	-
AMT-100	325	0.36	2.7
TKP-102	109	0.32	13
AMT-600	55	0.24	26
TiDW	2.8	-	-

Table 5 Results of the h-CLAT test using TiO₂ NPs.

		MT-150A	MT-500B	AMT-100	TKP-102	AMT-600	TiDW
h-CLAT 判定	h-CLAT	Negative	Negative	Positive (Semipositive)	Positive	Positive	Positive (Semipositive)
EC200 (CD54発現濃度閾値)(ug/mL)	EC200	10000	10000	7.81	11.95	18.36	10000
CD54の相対発現量の最大値(%)	CD54Max	112.39	246.36	204.65	295.81	224.05	183.66
CD54の相対発現量の最大値をとった濃度における生存率(%)	CD54MaxS	96.27	96.5	96.05	96.41	96.31	95.9
CD54の相対発現量の最大値をとった濃度(ug/mL)	CD54MaxConc	31.25	250	7.813	2000	125	7.813
EC150 (CD86発現濃度閾値)(ug/mL)	EC150	10000	10000	10000	831.44	10000	177.73
CD86の相対発現量の最大値(%)	CD86Max	120.06	141.34	116.72	157.15	127.71	144.31
CD86の相対発現量の最大値をとった濃度における生存率(%)	CD86MaxSR	96.15	96.4	96.05	94.59	96.18	94.92
1000ug/mLにおける生存率(%)	1000SR	94.6	96.95	97.11	95.36	98.26	94.27

注釈 1 : 陰性の場合、欠損値として 10000 を入力

注釈 2 : AMT100, TiDW は Positive の判定だが Negative な要素もあることから解析データで区別のため Semipositive と記載

Figure 1 Results of permeation velocity and contact angle measurements using TiO₂ NPs (hydrophilic and hydrophobic trends).

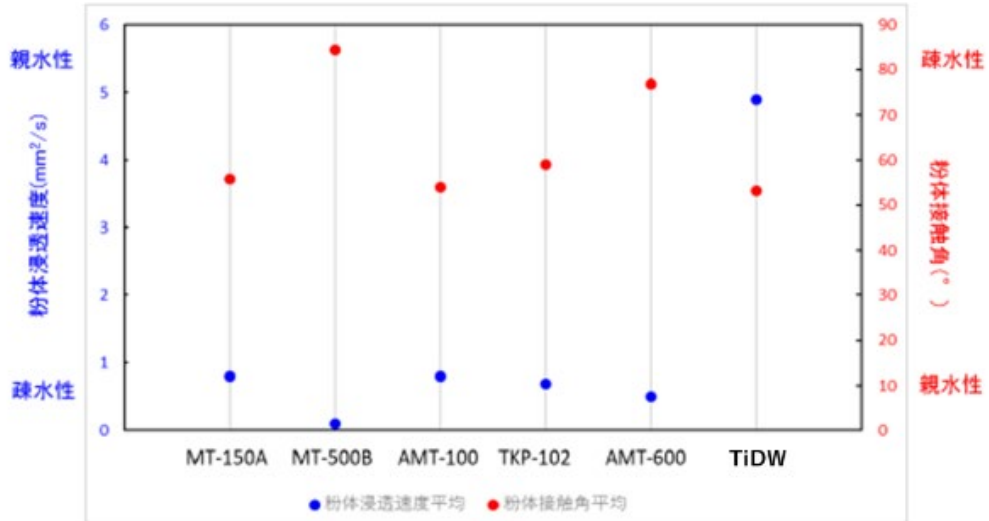


Figure 2A PCA based on data of physicochemical properties of TiO₂ NPs.

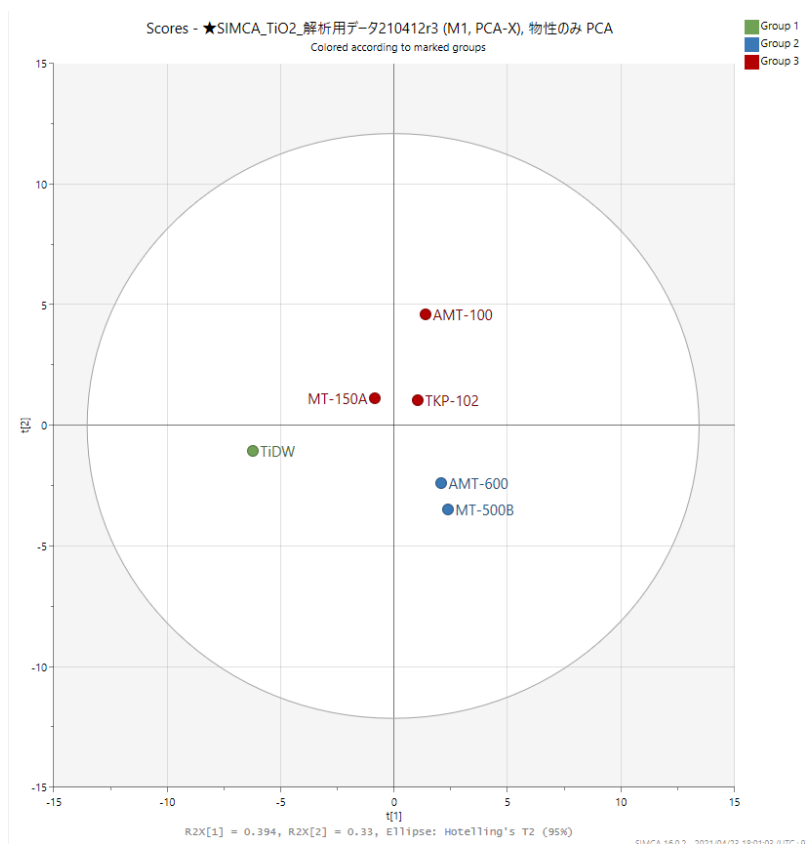


Figure2B Dendrogram for PCA based on data of physicochemical properties of TiO₂ NPs.

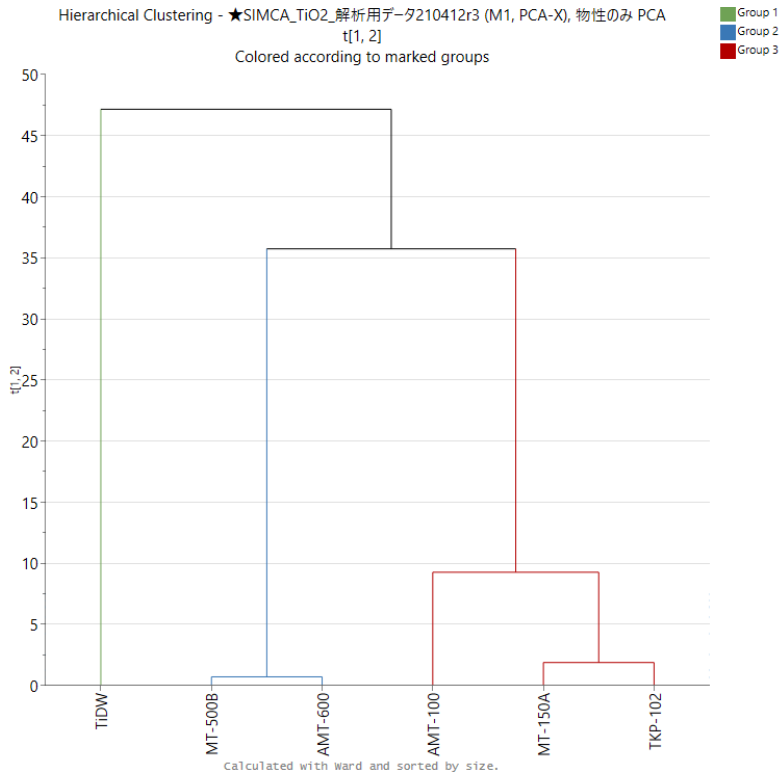


Figure 3A Results of OPLS analysis of the relationship between data of physical properties and *in vitro* toxicity test results (h-CLAT) among TiO₂ NPs.

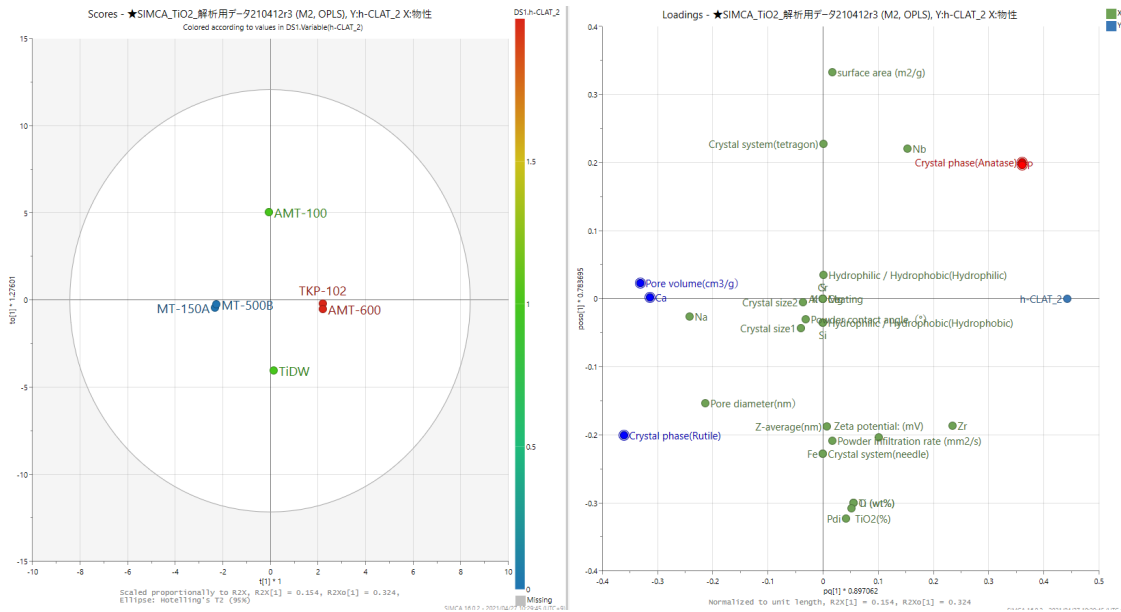
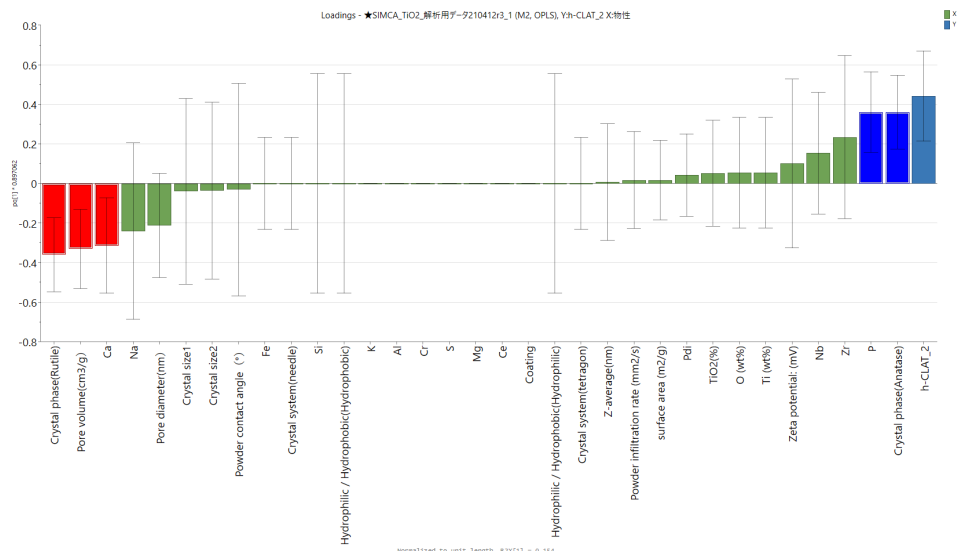


Figure 3B, 3C Results of OPLS analysis (loading plot) of the relationship between data of physical properties and *in vitro* toxicity test results (h-CLAT) : calculation of variables (physical properties) contributing to toxicity by bar graphing of loading plots.

3B) インパクトが大きく、エラーバーが小さい物性↓



3C) インパクトおよびエラーバーが大きい物性↓

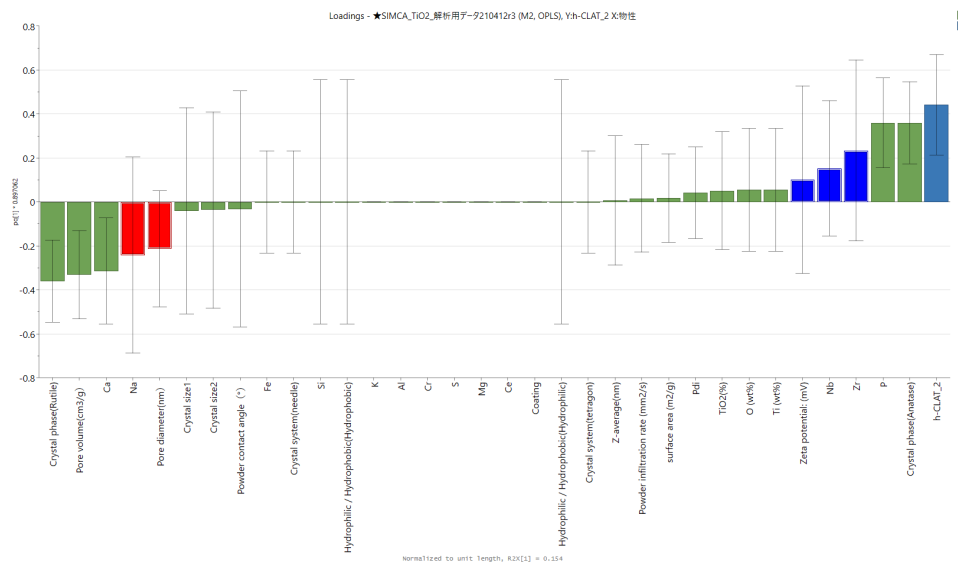
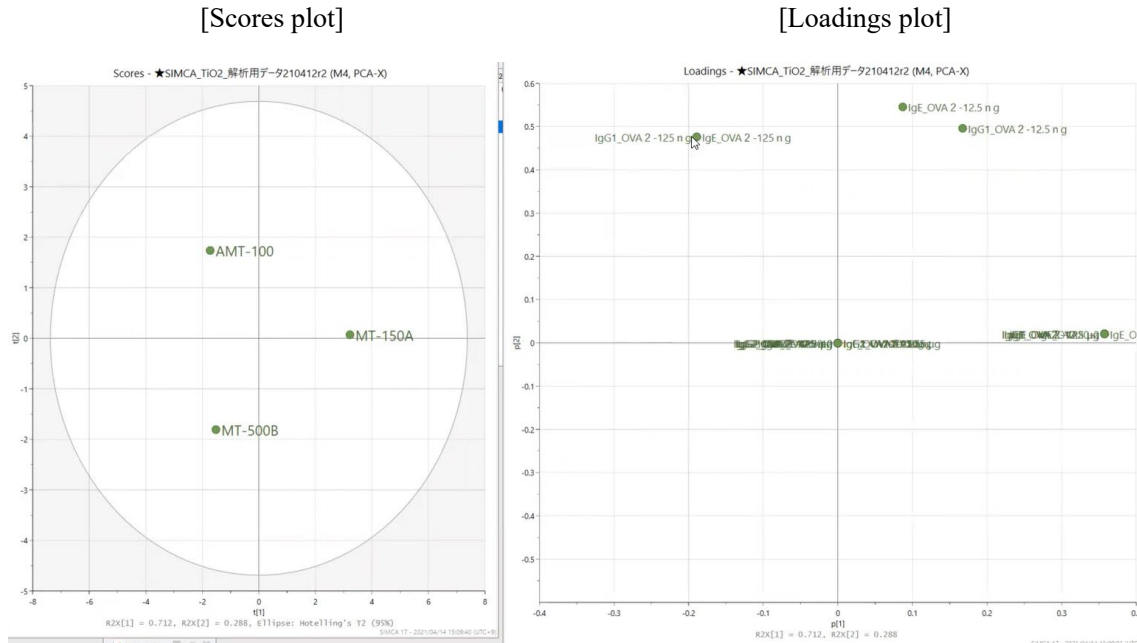


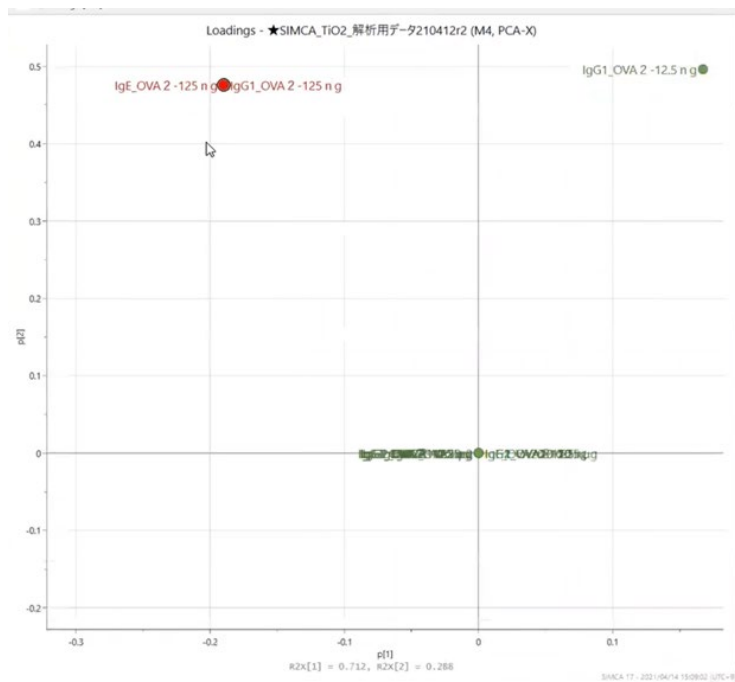
Figure 4 PCA results of *in vivo* toxicity test results data between three TiO₂ NPs (MT-150A MT-500B AMT-100) collected from database of the MHLW GRANTS SYSTEM.

4A)

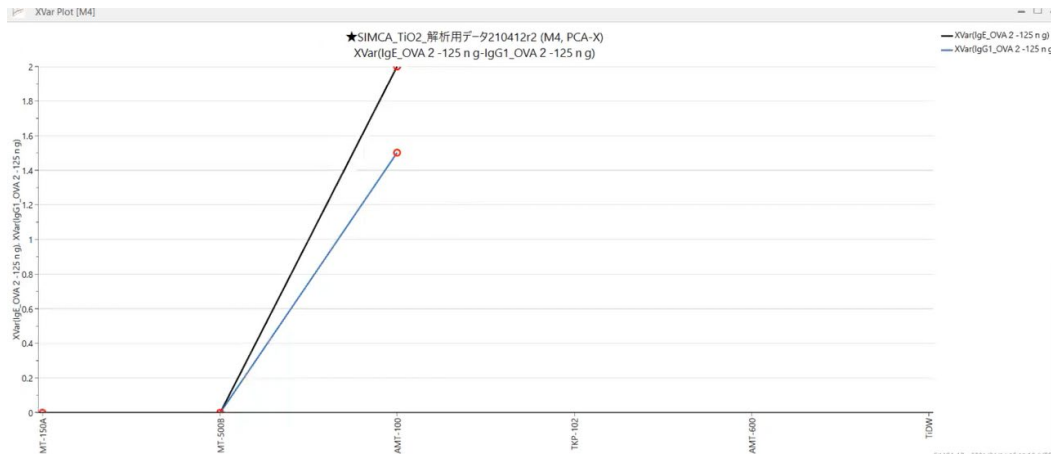


4B)

Loading Plot: IgE_OVA2_125ng と IgG1_OVA2_125ng

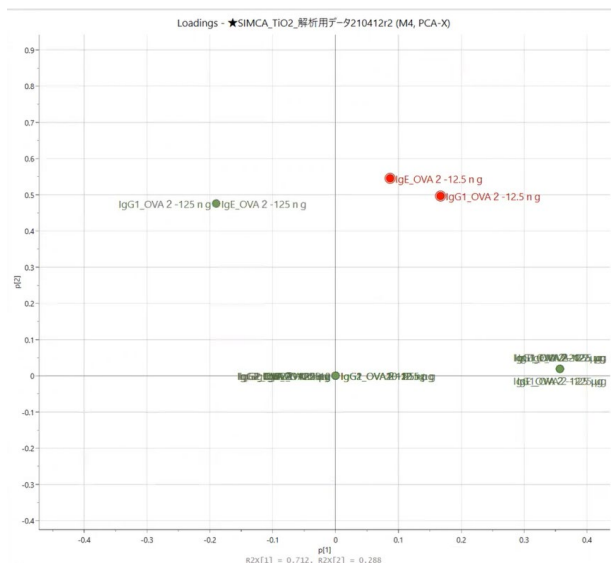


AMT100 だけに寄与している変数 (投与条件)



4C)

Loading Plot: IgE_OVA2_12.5ng と IgG1_OVA2_12.5ng



AMT100 と MT150A に寄与している変数 (投与条件)

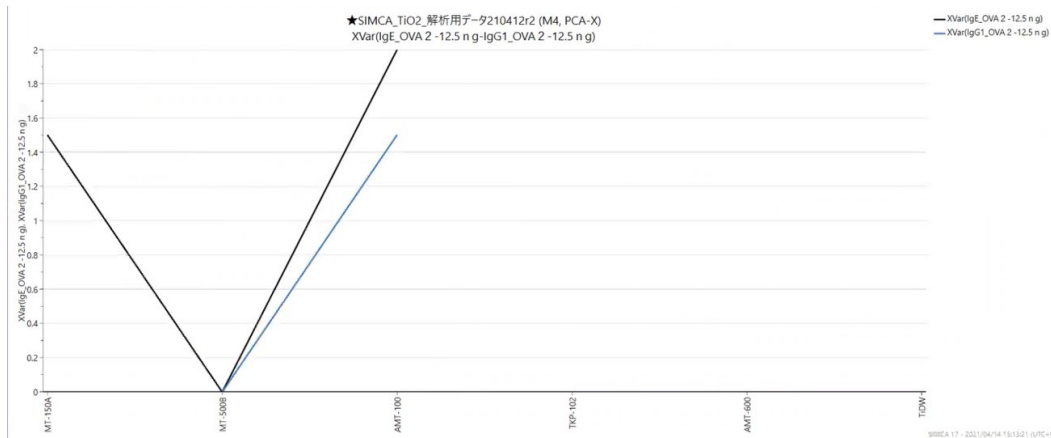
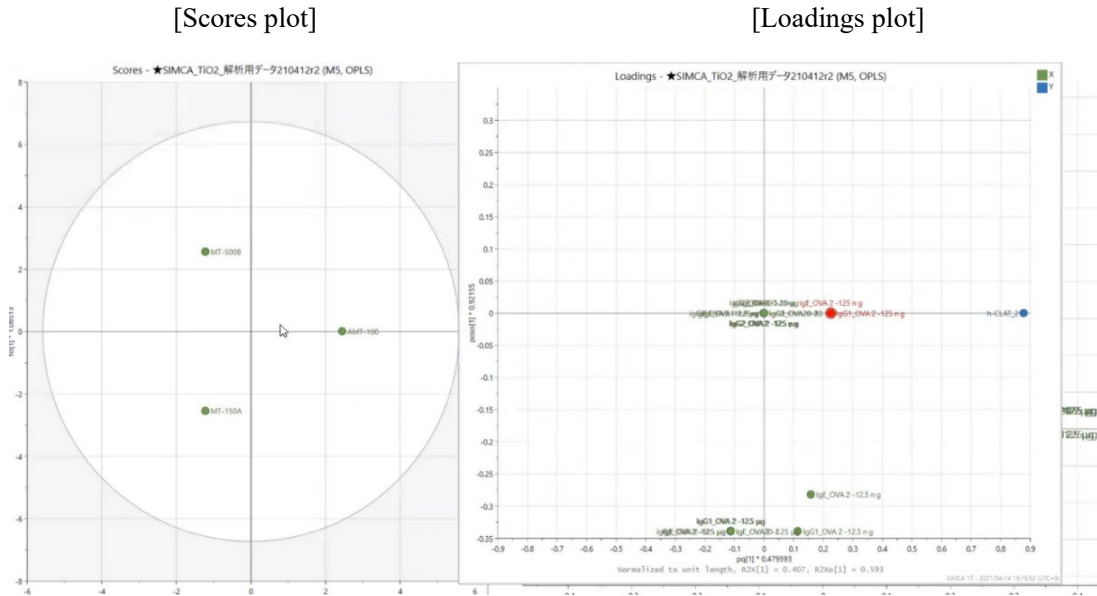


Figure 5 Results of OPLS analysis of the relationship between *in vitro* h-CLAT toxicity test results data and *in vivo* toxicity test results among three TiO₂ NPs (MT-150A MT-500B AMT-100)

5A)



5B) Calculation of variables (dosing conditions) contributing to toxicity by bar graphing of loading plots.

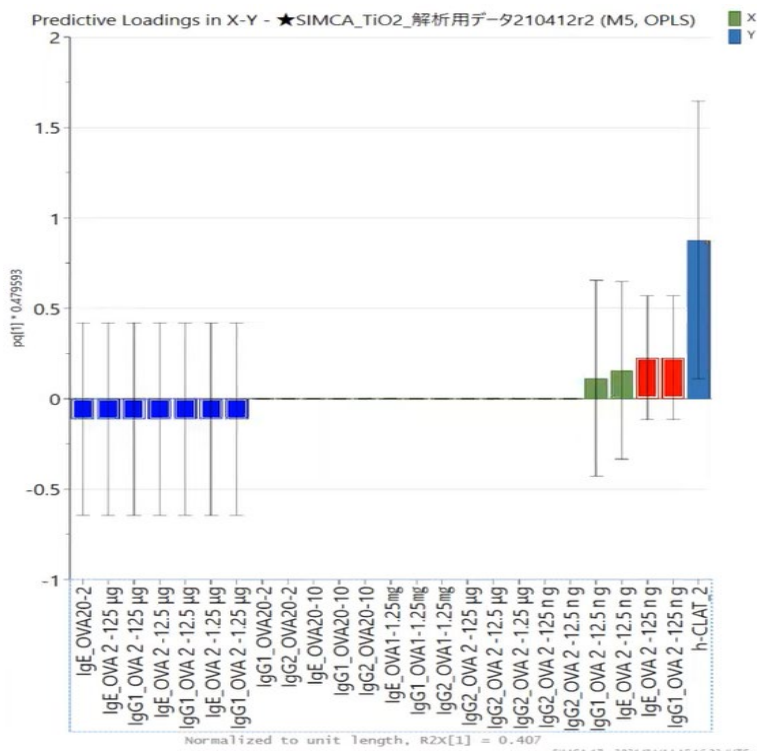
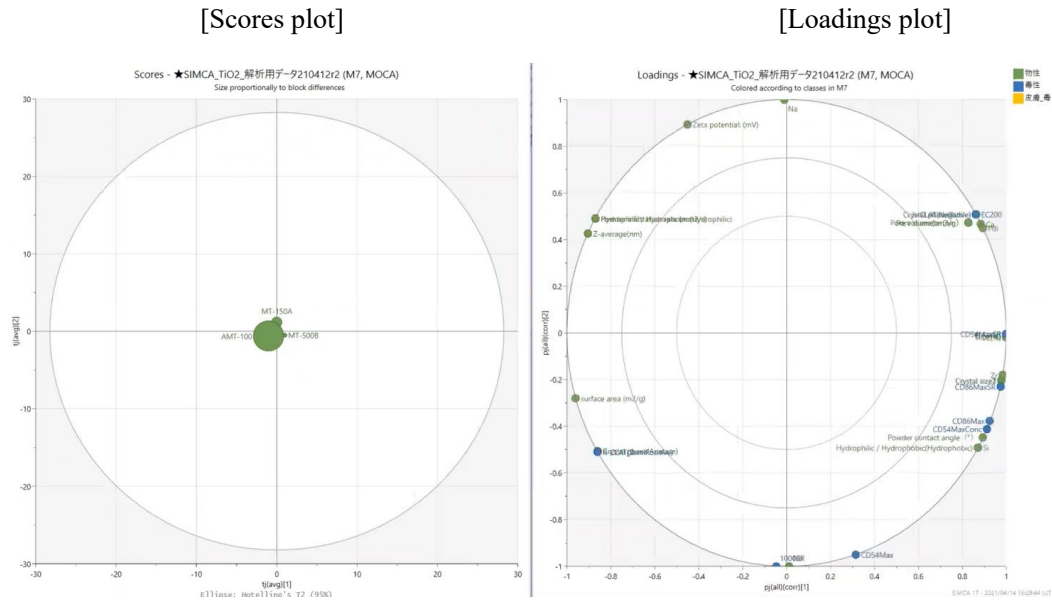
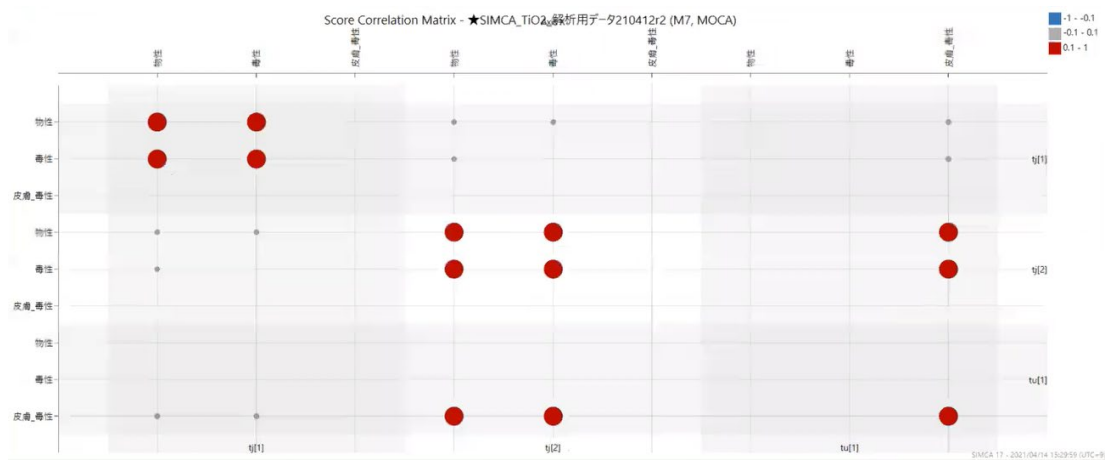


Figure 6 Results of MOCA analysis between 3 blocks (3 samples/data of physical properties/*in vitro* h-CALT toxicity test results data/*in vivo* toxicity test results data)

6A)



6B) Score Correlation Matrix



6C)

Component	R2X	R2X(cum)	R2X	R2X(cum)	R2X	R2X(cum)
Model		0.993		1		0.712
Blocks	物性		毒性		皮膚_毒性	
Joint ...		0.993		1		0
1	0.7...	0.733	0.67	0.67	--	--
2	0.26	0.993	0.33	1	--	--
Uniqu...		0		0		0.712
1	--	--	--	--	0.712	0.712

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
石丸直澄 (分担)	炎症と免疫	小田義直	わかりやすい 病理学 改訂 第7版	南江堂	東京都	2021年	45-70

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山田隆志, 足利 太可雄, 小島 肇, 広瀬 明彦	AOP (Adverse Outcome Pathway ; 有害性発現経路) に 基づいた化学物質の 安全性評価へ向けた チャレンジ	Yakugaku Zasshi	140(4)	481-484	2020
小島幸一, 足利 太可雄, 安達玲 子, 佐藤一博, 瀬崎拓人, 武吉 正博, 福山朋季	皮膚感作性試験代替 法: ARE-Nrf2 luciferase LuSens Test Method (LuSens 法	AATEX- JaCVAM	9(1)	43-57	2020
足利太可雄, 小 島肇, 平林容子	日本動物実験代替法 評価センター (JaCVAM)令和元年 度報告書	AATEX- JaCVAM	9(1)	58-64	2020
尾上誠良, 上月 裕一, 豊田明 美, 笛木修, 細 井一弘, 小島 肇, 足利太可雄, 小野寺 博志	光安全性評価の現状 と課題	Yakugaku Zasshi	141(1)	111-124	2021

Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D	Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins	Cancer Sci			2021
Yamamoto E, <u>Taquahashi Y</u> , Ku wagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu KI, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Honma M, Okuda H, Goda Y	Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- μ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging	Int J Pharm			2021
高橋 祐次	ナノサイズプラスチ ックの評価	BioIndustry	37(9)	59-67	2020
Sato M, Arakaki R, Tawara H, Tsunematsu T, <u>Ishimaru N</u> .	Formation of Autoimmune Lesions is Independent of Antibiotic Treatment in NOD mice.	Int J Mol Sci	22	3239	2021
Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A, Fujimori S, Ushio A, Yamashita F, <u>Ishimaru N</u> , Yin D, Cam M, Kelly M, Awasthi P, Takada T, Takahama Y.	Thymoproteasome hardwires TCR repertoire of CD8+ T cells with cortical positive selection independent of negative selection.	J Exp Med	218(4)	e20201904	2021

Kurosawa M, Shikama Y, Furukawa M, Arakakai R, <u>Ishimaru N</u> , Matsushita K.	Chemokines upregulated in epithelial cells control senescence-associated T cell accumulation in salivary glands of aged and Sjögren's syndrome model mice.	Int J Mol Sci	22	2302	2021
Tsunematsu T, Arakaki R, Kawai H, Ruppert J, Yamada A, Tsuneyama K, <u>Ishimaru N</u> , Earnshaw W C, Pagano M, Kudo Y.	APC/C-Cdh1 is required for the termination of CPC activity upon mitotic exit.	J Cell Sci	133(18)	jcs251314	2020
Kisoda S, Shao W, Fujiwar N, Mouri Y, Tsunematsu T, Jin S, Arakaki R, <u>Ishimaru N</u> , Kudo Y.	Prognostic value of partial-EMT-related genes in head and neck squamous cell carcinoma by a bioinformatic analysis.	Oral Dis.	On line ahead of print		2020
石丸直澄	難病研究の進歩 シェーグレン症候群	生体の科学	71 (5)	476-747	2020

令和3年 3 月 29 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性予測評価部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 足利太可雄・アシカガ タカオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年 3 月 29 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 合田 幸広 印



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・動物管理室・室長
(氏名・フリガナ) 高橋 祐次・タカハシ ユウジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

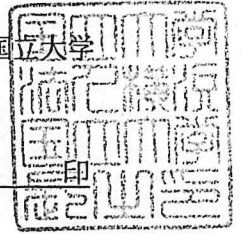
令和3年4月5日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立大学法人横浜国立大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 梅原 出



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 工学研究院 准教授
(氏名・フリガナ) 飯島 一智 イイジマ カズトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年3月9日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 徳島大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 野地 澄



次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医歯薬学研究部・教授
(氏名・フリガナ) 石丸 直澄・イシマル ナオズミ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和3年 3 月 29 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 合田 幸広 印

次の職員の令和2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性予測評価部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 大野 彰子・オオノ アキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。