

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

ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等
による免疫毒性評価手法開発のための研究
(23KD1001)

令和 6 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 足利太可雄

令和 7 (2025) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発 のための研究-----	1
--	---

足利 太可雄

II. 分担研究報告

1. 化学物質のin vitro呼吸器感作性試験法とNMのin vitro抗原提示細胞活性化試験法 の開発に関する研究-----	24
---	----

国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部 足利 太可雄

2. In vivo吸入曝露実験方法の開発-----	30
----------------------------	----

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 高橋 祐次

3. 化学物質の呼吸器感作性試験法の開発-----	38
---------------------------	----

東京医科大学 医学総合研究所 免疫制御研究部門 善本 隆之

4. 肺胞マクロファージの免疫学的解析-----	45
--------------------------	----

東京科学大学大学院医歯学総合研究科 石丸 直澄

5. In vitro評価系に関する研究-----	62
---------------------------	----

横浜国立大学大学院工学研究院 飯島 一智

6. 肺胞マクロファージ細胞株を用いた微粒子応答の解析-----	67
----------------------------------	----

兵庫医科大学 医学部免疫学 黒田 悦史

7. 感染影響評価-----	70
----------------	----

九州医療科学大学生命医科学部生命医科学科 渡辺 渡

8. ナノマテリアルを含む化学物質の呼吸器感作の免疫毒性法に関するin silico解析 -----	73
---	----

国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部 大野 彰子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	80
--------------------------	----

IV. 倫理審査等報告書の写し-----	85
----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による
免疫毒性評価手法開発のための研究

令和 6 年度 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 安全性生物試験研究センター ゲノム安全科学部 室長

研究要旨

化学物質の吸入曝露による健康影響が懸念されている一方、現在の OECD ガイドラインである *in vivo* 吸入曝露試験は多大な費用と時間が課題とされている。特に化学物質の呼吸器感作については、未だ行政が受け入れ可能な試験法が開発されておらず、また、ナノマテリアル(NM)については、従来の *in vivo* 吸入曝露試験のみでは毒性評価が十分に行えない状況にある。そこで本研究班では、吸入曝露された NM を含む化学物質の免疫毒性評価手法の開発と、将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的とした。

皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質を識別可能な 3 次元共培養系の策定については、3 次元共培養系を用い、OX40L を指標とした予測モデルを最適化することにより両者をほぼ識別可能な試験系を確立した（予測率 89%）。さらに 5 種類の代表的非感作性化学物質を用いて検討したところ、期待する通り全て陰性であった。また他施設への技術移転性について検討したところ、再現性の高い結果が得られた。ヒト肺胞マクロファージ細胞株の樹立については、ヒト初代肺胞マクロファージに不死化に関する遺伝子導入を行なったが、増殖性が非常に悪く変異型 RAS 遺伝子をレンチウイルスベクターにて遺伝子導入を行ったものの改善が見られなかったことから、これ以上の検討は断念とした。次年度は分化誘導法が確立されている iPS 細胞由来の肺胞/間質マクロファージを用い研究を進める。

微粒子に応答する肺胞マクロファージの解析により、微粒子に応答し炎症性サイトカインである IL-1 α を放出する細胞は全体のごく一部であることが明らかとなり、このような肺胞マクロファージサブセットの性質を詳細に解析することが、微粒子による炎症反応の理解につながると考えられた。

シリカナノ粒子による THP-1 細胞の活性化において、シリカナノ粒子へ亜鉛イオンをあらかじめ吸着させた場合、処理した亜鉛イオン溶液の濃度依存的に活性化の指標である CD54 の発現が増加した。NM による免疫細胞活性化は、NM 自体の持つ活性化能に加え、吸着物質による影響を受けうる可能性が示唆された。気管支上皮モデルと THP-1 細胞との共培養系では、気管支モデル上部よりシリカナノ粒子曝露した 72 時間後において THP-1 細胞の CD54 の発現増加傾向がみられた。NM の物性および関連する免疫毒性に関する調査・情報収集については、NMs を含む呼吸器感作物質となる化学物質の被験物質の物理化学的性状（物性）の収集および *in vitro* / *in vivo* 免疫毒性試験結果に関連する比較検証データを取得し、物性と *in vitro* や *in vivo* 試験の結果に関する関連性解析の実施により、毒性に影響を与える物性についての検証を実施した。

ナノマテリアルの感染性免疫への影響を調べることを目的とした実験に供するため、全身ばく露吸入装置 (Taquaann システム Ver3.0) により、ナノシリカ (NM202、JRC) を高分散エアロゾルとして、C57BL/NcrSlc 雄性マウス 12 週齢に 6hr/day、連続 5 日間 (合計 30 時間) の全身ばく露吸入を行った。NM202 は、これまで吸ばく露実験を行ったナノシリカ検体に比較して微細で機器への吸着性が強く、エアロゾル化効率は約 5%程度と非常に低かった。NM202 を曝露したマウスはばく露後 8 週間までの観察期間中、体重推移に影響は見られなかった。肺重量に関して、5 日間のばく露終了直後およびばく露 4 週後の定期解剖において用量依存的に増加傾向にあり、高濃度群では統計学的に有意であったが、ばく露後 8 週間では影響は認められなかった。In vivo 吸入曝露された NM の免疫毒性機構解析については、ナノシリカ NM202 の全身吸入暴露による 4 週および 8 週での肺胞細胞の細胞数、および M1/M2 マーカーに関して対象群と変化はなかった。肺の病理組織学的変化として、NM202 暴露によって肺胞腔の軽度の狭窄および肺胞マクロファージの集簇像が確認された。また BALF 細胞における Marco mRNA の発現において暴露濃度に依存した上昇が観察された。In vitro において RAW264.7 細胞へ NM202 を添加すると MARCO の表面発現の有意な増加が認められたことから、マクロファージの NM202 に対する反応に MARCO 分子が関与している可能性が示された。

ナノマテリアル(NM)の短期全身吸入曝露による感染性免疫系への影響評価系を構築するため、ナノシリカ NM-201、-202 および-204 の複数回の Taquaann 法吸入曝露による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響について再評価を実施した。肺病理組織標本すべてに対して、PAS 染色陽性細胞の分布を顕微鏡下で探索した結果、NM-204 はスコアの中央値による比較から、RSV 感染マウスでは NM-201 より粘性多糖産生細胞の分布が広い傾向が認められた。これはケモカイン CCL5 産生誘導結果と一致しており、感染影響指標として CCL5 が有用であることが再認識された。

以上より、ヒト肺胞マクロファージ細胞株の樹立は断念し代替の細胞で研究を遂行することとしたものの、皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質を識別可能な、OX40L を指標とする 3 次元共培養系が確立できたことや、NM による THP-1 細胞の活性化には表面に吸着するイオンの関与の可能性を明らかにしたこと、さらに NM の in vivo 吸入曝露による免疫毒性の評価に MARCO 分子および CCL5 を介した反応性の解析が重要である可能性が示されたことなど、着実な成果が得られたと考える。

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
毒性部 動物管理室 室長

善本 隆之

東京医科大学 医学総合研究所
免疫制御研究部門

石丸 直澄

東京科学大学大学院 医歯学総合研究科
教授

飯島 一智

横浜国立大学大学院 工学研究院

准教授

黒田 悦史

兵庫医科大学 医学部免疫学 教授

渡辺 渡

九州医療科学大学

生命医科学部 生命医科学科 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

ゲノム安全科学部 主任研究官

A. 研究目的

化学物質の吸入曝露による健康影響が懸念されている一方、現在の OECD ガイドラインである *in vivo* 吸入曝露試験は多大な費用と時間が課題とされており、毒性発現機構に基づいた効率的で精度の高い試験法の開発が強く望まれている。特に化学物質の呼吸器感作については、未だ行政が受け入れ可能な試験法が開発されておらず、また、ナノマテリアル(NM)については、従来の *in vivo* 吸入曝露試験のみでは毒性評価が十分に行えない状況にある。

我々の先行研究 (20KD1004) では、*in vivo* 吸入曝露試験により、NM が肺胞マクロファージの MMP-12 発現を有意に増加させること、RSV 感染マウスモデルにおいて肺炎を増悪させること、*in vitro* 試験において様々な NM が THP-1 細胞の CD54 発現を顕著に亢進させることなどを見出してきた。また気管支上皮細胞と THP-1 細胞の共培養系も確立した。また研究分担者の善本らは、3 次元共培養系を開発し、Th2 分化に重要な副刺激分子 OX40 リガンド (OX40L) の発現が呼吸器感作性物質特異的に亢進することを見出している。

そこで本研究班では、短期吸入曝露された NM を含む化学物質の免疫毒性評価手法の開発と将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的とする。

B. 研究方法

B.1. 化学物質の *in vitro* 呼吸器感作性試験法の開発 (善本、黒田、足利)

B.1.1 *In vitro* 呼吸器感作性試験法の開発

ヒト末梢血単核球細胞株 CD14-ML を GM-CSF と IL-4 で刺激し未成熟樹状細胞 (DC) に分化した細胞とヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B を、それぞれ異なる Scaffold で培養後 2 つの Scaffold を重ねた DC 共培養系を構築し、その上から化学物質を滴下した。8 時間後に、DC の Scaffold から RNA を抽出し、RT-qPCR により CD80 と CD86、OX40L、TSLPR (TSLP-R)、IL-7R α (TSLP-R)、IL-17RB (IL-25R)、ST2 (IL-33R)、HPRT の mRNA 発現を定量した。化学物質として、昨年度の代表的な皮膚と呼吸器感作性化学物質、それぞれ 11 個と 9 個に、非感作性化学物質 5 個を加えて検討した。さらに、他施設での再現性の検討も開始し、代表的な皮膚と呼吸器感作性化学物質を、それぞれ 2 個と 4 個用いて検討した。

B.1.2 ヒト肺胞マクロファージ株の樹立と活性化メカニズムの解明

ヒトの肺胞マクロファージの細胞株化については、EPITHELIX 社より購入したヒト肺胞マクロファージ (Batch Number : M Φ 0889FAC) に、SV40 large T 抗原とヒト GM-CSF を発現するレンチウイルスベクター、およびヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の発現ベクター、TP53 と RB1 に対する siRNA ベクターの遺伝子導入を行なった (連携研究者: 産業医科大、和泉弘人博士)。

遺伝子導入後に株化の指標として、細胞の形態と増殖の程度を確認した。

細胞死と IL-1 α 放出のメカニズム解析については、細胞内に蓄積された IL-1 α の産生を可視化するために IL-1 α のプロモーター下に蛍光物質である mCherry を挿入した IL-1 α リポーターマウスを作製した。野生型マウスあるいはリポーターマウス由来の肺胞マクロファージを用いて、IL-1 α 産生のライブイメージング、細胞内 IL-1 α 染色の蛍光観察を行い、肺胞マクロファージの細胞内 IL-1 α の蓄積と放出のメカニズムの解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験については「カルタヘナ法」を遵守して研究を進めている。また動物を用いた実験については兵庫医科大学の動物実験規定を遵守し実験を進めている。

B.2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発 (足利、飯島)

B.2.1 酸化亜鉛ナノ粒子の h-CLAT 試験

基材そのものの亜鉛イオン溶出量を検出限界以下まで低減化した酸化亜鉛 (基材、MZN-B0) ナノマテリアルとその表面処理品 (MZN-B0HP) (いずれもテイカ株式会社より提供) の in vitro における抗原提示細胞活性化能を、human Cell Line Activation Test (h-CLAT) により評価した。具体的方法は OECD TG442E に準拠した。いずれの被験物質についても、100 μ g/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 時間ばく露し、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。

B.2.2 各種 NM 分散液の調製と評価

シリカナノ粒子は Sicastar-red F (micromod), NM-201, NM-202 (以上 JRC) を用いた。分散液として市販されている Sicastar-red F は培養液を用いて所定濃度に希釈した。NM-201, NM-202 は 5 mg/mL の濃度になるように培養液に懸濁し、プローブ型超音波装置を用いて氷中で 40 W, 5 分の条件で 1 回処理した。酸化亜鉛ナノ粒子は MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP、MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出が抑制された MZN-B0HP (以上テイカ) を用いた。25 mg/mL の濃度になるように酸化亜鉛ナノ粒子を超純水に懸濁し、プローブ型超音波装置を用いて氷中で 40 W, 5 分の条件で 2 回処理した。MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出を抑制した MZN-B0HP については超純水 (1000 μ g/mL) での流体力学的直径および ζ -potential を ELS-Z2 (大塚電子) により測定した。

B.2.2. イオン吸着シリカナノ粒子の調製との抗原提示細胞活性化能の評価

シリカナノ粒子 Sicastar-red F を所定濃度の硝酸亜鉛水溶液および塩化カルシウム水溶液にて 24 時間処理した後、超純水にて 3 回洗浄した。Sicastar-red F を再分散させ、B.2.3.の手法により THP-1 細胞の活性化能を評価した。Sicastar-red F への各イオンの吸着量は、処理後の溶液および洗液のイオン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES, ICPE-9000, 島津製作所) により測定し、算出した。

B.2.3. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系の構築と NM の抗原提示細胞活性化能の評価

市販ヒト初代気管支上皮細胞を市販の分化誘導培地を用いてセルカルチャーインサート内で気-液界面培養を行い、気管支上皮

モデルを構築した。気管支上皮モデルは、光学顕微鏡による繊毛運動の観察および経上皮電気抵抗 (TEER) 測定により評価した。THP-1 細胞懸濁液を分注した 24 ウェルプレートの各ウェルに、気管支上皮モデルを設置し、セルカルチャーインサート上部または下部より被検物質を添加し、所定時間培養した。培養後、THP-1 細胞については B.2.3 の手法にて CD86 および CD54 の発現量および細胞生存率を測定した。気管支上皮モデルについては RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて cDNA を合成し、THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて、リアルタイム PCR により、各遺伝子の発現を解析した。

B.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発 (高橋、石丸、渡辺)

B.3.1. ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験

これまでに Taquann 全身吸入曝露/RSV 感染実験において評価を実施した NM-201、-202 および -204 の肺病理組織標本すべてに対して、PAS 染色陽性細胞の分布を顕微鏡下で探索した。分布の程度は、0~3 の 4 段階でスコア化した (0:陽性細胞なし、1:複数個所にあり、2:複数個所に連続してあり、3:広がり大きいまたは杯細胞の増生があり)。なお、結果は右・左葉毎に集約した。

B.3.2. ナノシリカ吸入曝露実験

被験物質：被験物質として、JRC (Joint Research Centre in Ispra, Italy) から寄付されたナノシリカ (SiO₂-NM202) を使用した。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。個体識別は耳パンチにより行った。飼

育ケージは、ポリカーボネイト製のアウターケージと 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±1℃、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) を自由摂取させた。飲水は滅菌水ディスポーザブルパウチ (Hydropa) を用いて自由摂取させた。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。

NM202 の吸入曝露は先行研究において独自に開発した装置 (Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済) を使用した。対照群は 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)、NM204 ばく露群 (低濃度、高濃度) の 3 群構成とした。目標濃度は、低濃度群 10 mg/m³ 高濃度群 30 mg/m³ と設定した。各群当たり 25 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。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。

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。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 6 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 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。

エアロゾルの空気動力学的中位径測定 Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) は、MOUDI（Model 125 Nano MOUDI、KANOMAX Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors）を用いた。

肺、BALF、脾臓、顎下リンパ節のサンプリングのため、ばく露終了直後（Day0）、4週後及び8週後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。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1 mL 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。ボランティアおよびヒト組織は使用しなかった。これらのことから、倫理的問題は無いと考える。

（倫理面への配慮）

動物実験は九州保健福祉大学動物実験規定等に則り、動物倫理に配慮して安全に実施した（承認番号: 5-1-03）。

B.4. NM および呼吸器感作性物質の in vivo 免疫毒性解析（石丸）

Taquann 処理を施した NM202 曝露後4週および8週目で屠殺解析を実施した。BALF細胞、肺組織、頸部リンパ節、脾臓のサンプリングを行なった。

BALF細胞、頸部リンパ節細胞、脾細胞を用いて、各種表面抗原に対する抗体を用いてフローサイトメータ（Cytoflex, Coulter）による解析を行なった。用いた抗体は、FITC、PE、PE-Cy7、APC または APC-Cy7 標識 CD4、CD8、CD11b、CD11c、F4/80、CD192、CD206、抗体（BioLegend）である。

BALF細胞から mRNA を抽出し、cDNA 合成後定量 RT-PCR により遺伝子発現を評価した。以下に定量 RT-PCR で用いたプライマー配列を示す。*Mmp12*; forward (f) 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse (r) 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTAGT-3', *Marco*; (f) 5'-GAAGACTTCTTGGGCAGCAC-3', (r) 5'-CTTCTTGGGCACTGGATCAT-3' *Il1b*; (f) 5'-ATGGCAACTGTTCTGAACTCAACT-3', (r) 5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTT-3', *Mcp1*; (f) 5'-CTGGATCGGGAACCAAATGAG-3', (r) 5'-TGAGGTGGTTGTGGAAAAGG-3', *Actb*; (f)

5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', (r) 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。

マウス細胞株 RAW246.7 を用いて、無血清培地 (Gibco) による培養条件にて Taquann 処理を施したナノシリカ (NM202) に対する反応を検討した。マクロファージの活性化も目的に Lipopolysaccharide (LPS: Sigma, 5 ng/mL) を用いた。細胞数、細胞径は自動測定装置 (Luna-II™) を使用した。また、細胞表面マーカーとして、CD192, CD54, CD86, MARCO, CD206, CD36, CD163, MHC class II に対する標識抗体を用いて、フローサイトメータにて解析を実施した。

(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東京科学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。

B.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価 (渡辺)

THP-1 細胞を評価に利用した。NMs は、物性の異なるナノシリカ NM-201、-202 および-204 について比較検討を行った。NMs の影響評価の予備試験として、PMA で処置した THP-1 細胞に、RSVA2 株を MOI (感染多価) 1.0 で感染させ、0、8、24 および 48 時間後の培養上清中の cytokine/chemokine の誘導レベルをプロテインアレイ法 (Proteome profiler™, R&D systems) で網羅的に調査した。

NMs の評価は、PMA で処置した THP-1

細胞に超音波破砕機で培地中に懸濁したサンプル (0~10 µg/mL) を添加して一晚培養した。続いて前述のように RSV を感染させて 24 時間後の上清中の CCL2、CCL3 および CCL5 量を ELISA 法にて定量した。

前年度 In vivo 試験で評価を行った NM-202 について、A549 細胞を用いて THP-1 細胞と同様 (PMA 前処置なし) に CCL5 の誘導能を評価した。

h-CLAT 法による NM の評価では PMA による処置を行わないため、NM-204 を代表として PMA 未処置での評価を上記と同様に実施した。

前年度 In vivo 試験で評価を行った NM-202 について、A549 細胞を用いて THP-1 細胞と同様に CCL5 の誘導能を評価した。

B.6. 既存情報と in vitro/in vivo 研究データによる in silico 解析 (大野)

B.6-1. 二酸化ケイ素ナノマテリアル (SiO₂ NMs) の in silico による特性解析

今年度の本研究で実施するナノマテリアルの対象化合物は、3 種の二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NMs: NM-201, NM-202, NM-204) とした。これらの被験物質の一部の物理化学的性状 (物性) と情報収集源は、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムで作成した評価文書 (dossier) 等に加えて、新たな物性 (重金属不純物や表面活性) の追加試験結果や、当研究班内で実施した in vitro 試験の h-CLAT 法による毒性評価結果により得られたデータや、in vivo 吸入暴露試験については dossier と、当研究班内で実施した結果について収集・整理を行い、解析に資するデータの資料作成を実施することとした。

【物理化学的性状および有害性情報の調査対象情報源】

- OECD で公表されているナノマテリア

ル安全性評価プログラムで作成した評価文書 (dossier) Silicon dioxide. - Manufactured nanomaterial の Summary dossier

- ・ 関連する個別 dossier、ANNEX
- ・ the Joint Research Centre of the European Commission (JRC)の情報、及びこれらの研究成果として公表された原著論文
- ・ 本研究班で実施された *in vitro* h-CLAT 毒性試験結果

新しい物性項目として重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) と Specific surface area ratio (H₂O / N₂) は、現在測定中である。

B.6-2. 呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析

【調査対象情報源】

以下の 3 種類に分類し、各化合物について整理を行っており、正準 SMILES 記法による化学構造の線形表記法を作成した (data not shown)。

- ① 呼吸器感作物質として 9 化合物
- ② 皮膚感作物質として 13 化合物
- ③ 非感作性物質として 11 化合物

R5 年度に収集した呼吸器感作性被検物質 33 化合物の正準 SMILES 構造に基づき、情報化学ならびに計算化学の観点から、物性値ならびに構造的特徴量の収集を行なった。

具体的な手順として、最初に化合物が水和物やイオン対を構成するものについては、そのままでは評価が困難であるため、溶媒に該当する文字列を SMILES から削除した。その後、RDKit ライブラリを用い、各化合物の 1 次元 (1D; 化学組成や SMILES 表記の官能基に基づく)、2 次元 (2D; 化学構造式に基づく)、3 次元 (3D; 立体座標に基づく) 構造を構築した。3D 構造については汎用分子力場 (UFF) を用いた構造最適化を実施し

た。これらの各次元の構造情報に基づき RDKit および Mordred、量子化学計算ライブラリである PySCF を用いて特性データを取得した。以上の処理はすべて Python 言語を用いて実施した。

C. 研究結果

C.1. 化学物質の *in vitro* 呼吸器感作性試験法の開発 (足利、善本、黒田)

C.1.1 *In vitro* 呼吸器感作性試験法の開発

5 種類の非感作性物質を用いて、本共培養系で検討したところ、いずれも OX40L mRNA 発現増強値が、以前に算出したカットオフ値の 2.57 より低く、全て陰性であった。昨年度の結果の呼吸器感作性化学物質 9 種類とそれ以外の皮膚感作性化学物質 11 種類と今年度の非感作性化学物質 5 種類を合わせたグループで比較すると $P=0.0027$ となり、呼吸器と皮膚感作性化学物質の比較で得られた $P=0.0167$ に比べて、有意差が大きくなった。カットオフ値は、変わらず 2.57 であった。

ここまでの結果で論文作成を行い、投稿した。他施設での再現性の検討も、まず全ての細胞や培養機器、試薬を、全て独自に入手して貰い、プロトコルだけ教えて再現性を検討した。その結果、代表的な皮膚と呼吸器感作性化学物質を、それぞれ 2 個と 4 個用いて、我々の結果と同様に、OX40L (TNFSF4) 発現増強のカットオフ値 2.57 で両者を識別することが再現された。現在、さらに、現在、その感作性化学物質の数を増やして検討して貰っている。細かいプロトコルの修正も同時に行っている。

OX40L 以外で Th2 反応に関与するサイトカイン Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) や IL-25、IL-33 の受容体サブユニット分子 CRLF2 や IL-7R α 、IL-17RB、ST2

の発現を、同様に RT-qPCR で測定し比較したが、昨年度の結果と同様に皮膚と呼吸器感作性化学物質の間で大きな差は見られなかった

C.1.2 ヒト肺胞マクロファージ株の樹立と活性化メカニズムの解明

細胞死と IL-1 α 放出のメカニズム解析については、マウス肺胞マクロファージを *in vitro* にてアルミニウム塩（水酸化アルミニウム）の微粒子で刺激し、細胞死と IL-1 α 放出をライブセルイメージングにより解析したところ、細胞死に伴って IL-1 α を放出する細胞は全体の 10%以下であった。そこで、肺胞マクロファージ内に蓄積された IL-1 α を可視化する目的で IL-1 α のプロモーター下に蛍光物質である mCherry を挿入した IL-1 α リポーターマウスを作製した。このマウスから肺胞マクロファージを回収し、mCherry の蛍光を観察したところ、IL-1 α の放出と同様に約 10%のマクロファージが mCherry を強く発現していた。これらの細胞が微粒子に反応し、IL-1 α を放出する肺胞マクロファージサブセットであると考え、現在この mCherry 陽性細胞の解析を進めている。

C.2. NM の *in vitro* 抗原提示細胞活性化試験法の開発（足利、飯島）

C.2.1 酸化亜鉛ナノ粒子の h-CLAT 評価

用量設定試験の結果、CV75 は MZN-B0 で 36.6 μ g/mL、MZN-B0HP で 36.5 μ g/mL と算出された。そこでいずれも本試験において、100 μ g/mL を最高用量とし、公比で希釈した計 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 時間ばく露し、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。試験の結果、MZN-B0 に

ついては、3 回の本試験のいずれにおいても、CD86 ではすべての用量で RFI が 150 を下回ったが、CD54 では RFI が 200 以上となる用量がみられた。MZN-B0HP については、1 回目及び 3 回目の本試験においては、CD86 ではすべての用量で RFI が 150 を下回ったが、CD54 では RFI が 200 以上となる用量がみられた。また、2 回目の本試験においては、CD86 及び CD54 のいずれにおいても、RFI がそれぞれ 150 及び 200 以上となる用量がみられた。したがって、本試験条件下では、MZN-B0 及び MZN-B0HP のいずれも、*in vitro* で抗原提示細胞を活性化することが示された。THP-1 細胞活性化の指標である EC200（CD54 の発現亢進が 2 倍以上となる濃度。値が低いほど強い活性化能を有するとされている）は MZN-B0 が 9.37 μ g/mL であり、MZN-B0HP が 10.4 μ g/mL であった。これらの値はこれまでに評価した酸化亜鉛 NM とほぼ同程度であった。

C.2.2 各種 NM 分散液の評価

MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出を抑制した MZN-B0HP の超純水中での流体力学的直径および ζ -potential は、それぞれ 483.8 $\pm$ 26.68 nm、707.4 $\pm$ 49.14 nm、-26.52 $\pm$ 1.09 mV、-46.45 $\pm$ 3.80 mV であった。

C.2.2. イオン吸着シリカナノ粒子の調製との抗原提示細胞活性化能の評価

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

C.2.3. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の

共培養系を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

作製した気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系を用い、NM の抗原提示細胞活性化能を評価した。まず、シリカナノ粒子 Sicastar-red F を用いて、曝露時間の検討を行なった。気管支上皮モデル上部よりシリカナノ粒子 Sicastar-red F 分散液を曝露し、24, 48, 72 時間後に THP-1 細胞の活性化能を評価した。72 時間後において、Sicastar-red F 曝露により CD54 の発現が亢進する傾向がみられた。一方、72 時間曝露での粒子間の比較では、NM-201, NM202 の曝露は CD54 の発現を亢進しなかった。気管支モデルの遺伝子発現解析において、モデル上部からの Sicastar-red F 分散液曝露により CXCL-3, CCL-20 遺伝子の発現亢進傾向がみられた。下部からの曝露では、CXCL-3, CCL-20 に加えて CXCL-1, CXCL-2 遺伝子の発現亢進傾向もみられた。

また、酸化亜鉛ナノ粒子 MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP の評価を行なった。24 時間後において CD86 および CD54 の発現亢進はみられなかった。72 時間後では、MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP いずれにおいても細胞生存率の大幅な低下が見られ、CD86 および CD54 の発現量を定量することはできなかった。一方、MZ-500 および MZ-500HP の流体力学的直径より小さなポアを有するセルカルチャーインサートを用いた場合は、72 時間においても細胞生存率の大幅な低下は見られなかった。気管支モデルの遺伝子発現解析において、モデル上部からの MZ-500 および MZ-500HP 分散液の曝露により IL-6, CXCL-3, CXCL-12, CCL-22 など各遺伝子の発現亢進傾向がみられた。

C.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発（高橋、石丸、渡辺）

C.3.1. ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験

Taquann 全身吸入曝露/RSV 感染実験にて NM-201（令和 4 年度）、-202（令和 5 年度）および-204（令和 3 年度）を評価したマウス肺組織標本について、PAS 染色により粘性多糖産生細胞の分布を再評価した。陽性細胞は非感染・感染マウスそれぞれに散見された。標本によっては気管支の一部に欠損があるなどマウスごとにばらつきが大きかった。特に左葉は一葉のため、NM の影響が明確ではなかった。一方、右葉については四葉の評価スコアを合することで分布の違いが見られた。特に NM-204 はスコアの中央値による比較から、RSV 感染マウスでは NM-201 より粘性多糖産生細胞の分布が広い傾向が認められた。

C.3.2. ナノシリカ吸入曝露実験

NM202 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、低濃度群； $6.9 \pm 0.4 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群； $25.1 \pm 6.4 \text{ mg/m}^3$ （平均値 $\pm$ SD）であった。各濃度 2 回の測定を行った MMAD は低濃度群； 562 nm （ σ_g ：2.7～2.9）、高濃度群； 709 nm （ σ_g ：2.4～2.5）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、低濃度群、高濃度群でそれぞれ 1,769 mg、5,280 mg であった。6 時間の曝露チャンバーの総換気量は 11.7 m^3 であることから名目上の濃度は低濃度群、高濃度群それぞれ 151.2 mg/m^3 、 451.3 mg/m^3 と計算される。実際に測定した濃度の平均値から、エアロゾル化効率を計算すると低濃度群、高濃度群それぞれ 4.7%、5.4%であった。

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。ばく露終了直後（Day0）、4 および 8 週

後に定期解剖を行って試料を採取した。ばく露終了直後の肺重量は、対照群 118.8 ± 0.8 mg、低濃度群 129.0 ± 12.9 mg、高濃度群 139.1 ± 3.1 mg であり、高濃度群では対照群に比較して有意に増加した。ばく露終了後 4 週では、対照群 115.8 ± 3.5 mg、低濃度群 122.4 ± 4.1 mg、高濃度群 124.0 ± 1.8 mg、ばく露終了後 8 週では、対照群 123.7 ± 3.0 mg、低濃度群 128.2 ± 4.9 mg、高濃度群 127.2 ± 2.6 mg であり、対照群と NM202 ばく露群の間で有意差は認められなかった。

採取した組織（肺、BALF、リンパ節、脾臓）は、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。

C.4. NM および呼吸器感作性物質の in vivo 免疫毒性解析（石丸）

対照群、低濃度（ 15 mg/m^3 ）暴露群、高濃度（ 30 mg/m^3 ）暴露群の 4 週後の BALF の変化として、暴露によって BALF 中の肺胞マクロファージ（F4/80⁺CD11c⁺）の割合ならびに細胞数は減少しているものの有意な差は認められなかった。8 週後の肺胞マクロファージの変化でも、低濃度暴露群で割合、細胞数ともに増加していたが、有意な差ではなかった。NM202 暴露による肺胞マクロファージの M1/M2 への分化パターンの変化をフローサイトメータで検討すると、低濃度および高濃度暴露によって対照群と比較して有意な変化は観察されなかった。脾臓、頸部リンパ節における NM202 吸入暴露によるマクロファージ分画の変化は認められず、M1/M2 への分化についても NM202 暴露による影響は確認できなかった。一方で、脾臓、頸部リンパ節における T 細胞分画（CD4/CD8）については、NM202 暴露による割合、細胞数に有意な変化は認められなかった。さらに、脾臓、

頸部リンパ節における T 細胞の活性化状態（Effector/Naive）を CD44 ならびに CD62L を指標にすると（Effector: CD44^{high}CD62L⁻, Naive: CD44^{low}CD62L⁺）、脾臓において NM202 暴露後 6 週にて Naive CD4⁺T 細胞の割合が有意に増加していることが判明した。頸部リンパ節の CD4⁺T 細胞、脾臓および頸部リンパ節での CD8⁺T 細胞に関しては NM202 暴露によって変化は確認できなかった。

NM202 吸入暴露マウスの一部の肺組織の組織学的検討を行うと、暴露後 4 週において胸膜側の一部に肺胞構造が不明瞭な部分が認められ、肺胞マクロファージの軽度の集簇像が確認された。暴露後 8 週においても、さらに肺胞腔の不明瞭な領域が広がっており、腔内に肺胞マクロファージの集簇が確認された。

NM202 暴露後 8 週での BALF 細胞を用いて、*Il1b*、*Mcp1*、*Mmp12*、*Marco* mRNA 発現を qRT-PCR にて定量化すると、*Il1b* mRNA はいずれの群も検出限界以下であった。*Mcp1*、*Mmp12*、*Marco* mRNA とともに対照群に比較して有意な変化は見られなかったが、*Marco* mRNA に関しては濃度依存的に発現の上昇が認められた。

マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用いて、*in vitro* での NM202 に対する反応性を検討した。LPS（ 5 ng/mL ）の刺激の有無の条件で、NM202（ 250 ng/mL ）添加した時の 48 時間の培養後の形態的变化を確認すると、LPS 刺激下での NM202 添加によって、細胞の大きさが増大することが明らかになった。LPS 刺激によって M1 型のマクロファージに分化することが知られており、NM202 添加による各種マクロファージ表面マーカーの変化をフローサイトメータにて検討した。検討した

8種類のマクロファージマーカーのうち、MARCOに関して、LPS非添加ならびに添加状態の両方でNM202の暴露によってMARCOの表面発現が有意に上昇した。また、IL-13によってM2型マクロファージに分化することが知られていることから、recombinant IL-13 (50 ng/mL)を添加した上で、NM203を暴露によって、8種のマクロファージマーカーの表面発現に変動は認められなかった。さらに、NM202の濃度変化によるMARCOの表面発現の変動を確認すると、2,000 ng/mLまでMARCOの発現が上昇していた。加えて、LPS添加時においても2,000 ng/mLまでMARCOの発現が上昇していた。NM202の暴露によるMarco mRNA発現を含め、マクロファージ関連遺伝子 mRNA 発現 (*Il1b*, *Mcp1*, *Mmp12*, *Marco*) を q-RT-PCR にて検討すると、いずれの遺伝子も LPS 刺激で発現が上昇し、NM202 (500 ng/mL)の暴露でいずれの遺伝子発現も上昇傾向にあるが、*Marco* mRNA に関しては15倍以上の増加が見られた。

C.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価 (渡辺)

PMA 処置 THP-1 細胞/RSV 感染系においては、感染後経時的に CCL2、CCL3、CCL5 および IL-8 が上清中に産生されていることがプロテインアレイ法で確認された。そこで、ヒト-マウス間で共通の生物学的機能が確立されている CCL2、CCL3 および CCL5 の影響を検討した。CCL2 では産生影響があまり見られなかった。そして、*in vivo* 試験で誘導が確認されている CCL5 では、NM 添加により産生増強は認められたが、その効果が20%にも満たず、かつばらつきも大きいため物質間の相違が明確ではなかった。

PMA 未処置 THP-1 細胞/RSV 感染系では、

in vivo 試験において最も影響が強く見られた NM-204 を代表化合物として評価した。PMA による刺激が無くても THP-1 からの CCL3 および CCL5 の産生は NM-204 により濃度依存的 (0.3~30 µg/mL) に 50%程度の増強が確認された。しかし、RSV を感染させると感染量に比例して両ケモカイン共に産生が増強されるが、却って NM-204 の影響が認められなくなった。

気道上皮系細胞である A549 細胞に対する NM-202 の CCL5 産生増強作用は、あまり強くなかった。

C.6. 既存情報と *in vitro/in vivo* 研究データによる *in silico* 解析 (大野)

C.6-1. 二酸化ケイ素ナノマテリアル (SiO₂ NMs) の *in silico* による特性解析

予試験的に実施した SiO₂ NMs (NM-200~NM-204)の物性情報と *in vitro* 試験の h-CLAT 試験法毒性結果のデータとの関連性については、直交部分的最小二乗回帰分析

(OPLS : Orthogonal Partial Least Squares Regression) を用いて解析した。

解析結果では、毒性の高い化合物に寄与するいくつかの変数 (物性) の組み合わせが示唆された。

- ✓ コーティングなし
- ✓ 凝集体/凝集体の形態(nm) : 角張った球形度の低い形
- ✓ 等電点(平均) : pH(2-4)、
- ✓ アスペクト比
- ✓ 比表面積(m²/g)

また、新しい物性項目として重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) と Specific surface area ratio (H₂O / N₂) を実施した。

一方、*in vivo* 試験による吸入暴露試験の有害性情報に関しては、今後、HESS (ラットを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、規格化されたシートをひな形として用い、情報収集した SiO₂ NPs のデータコンテンツに特化した項目を追加することで、新たな規格データシートを作成した。

C.6-2. 呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析

本年度は量子化学に基づく、下記分子特性データを取得した。

- 3D (量子化学計算) : 反応性軌道エネルギー (HOMO/LUMO) およびエネルギーギャップ、双極子モーメント

ただし、今回は真空中での HF/6-31G*レベルのテスト計算の実施にとどまったことから、今後、電子相関や溶媒効果の考慮、量子化学的な構造最適化、基底関数の改良など、精密化を行う必要がある。また、吸着性に関わる分極率の見積もりのため励起状態計算を実施する予定である。

D. 考察

D.1. 化学物質の *in vitro* 呼吸器感作性試験法の開発 (足利、善本、黒田)

D.1.1 *In vitro* 呼吸器感作性試験法の開発

今回の他施設への技術移転性の検討は、BEAS-2 や CD14-ML を独自に入手して貰い、試薬や測定機器も独自にいつも使用している物を使用して貰った。qPCR も我々は、Takara Bio 社の SYBR Green の qPCR 試薬とプライマー、PCR 装置を用い、他施設では、Thermo Fisher Scientific 社の TaqMan プローブの試薬とプライマー、PCR 装置を用いて行った。つまり、qPCR のやり方や検出方法、プライマー配列も異なるにも関わ

らず、同様な結果が得られたのは、再現性が高いこと示している。ただ、他施設の結果の方が、全体的に値が大きくなっており、今後、カットオフ値が異なってくる可能性はある。現在、さらにもう 1 施設への技術移転も既に進めている。今後、化学物質の数を増やし、施設内および施設間の再現性の検討を行いながら、最適なプロトコルの作成とカットオフ値の設定などを行い、OECD のテストガイドライン化を目指していく。

D.1.2 ヒト肺胞マクロファージ株の樹立と活性化メカニズムの解明

種々の化学物質の *in vitro* 試験においては、データの試験間変動や施設内外再現性の問題から細胞株が用いられることが多い。さらにヒトへの外挿性を考えた場合、ヒトの細胞株を樹立することが重要であると考え、ヒト肺胞マクロファージの細胞株の作製を試みた。種々の遺伝子導入を行った結果、不死化までは可能であったが、十分な増殖スピードを持った細胞株を得ることができなかった。今後は、iPS 細胞からヒト肺胞マクロファージを誘導するプロジェクトの方に引き継ぐことになった。

細胞株のプロジェクトと並行して、微粒子による炎症誘導のメカニズムの解析を進めている。これまでの研究成果から、炎症を引き起こす微粒子を貪食した肺胞マクロファージは細胞死を引き起こすとともに、細胞内に蓄積した IL-1 α を放出し、炎症を誘導することを見出してきた。しかしながらライブイメージングを用いた解析により、細胞死によって IL-1 α を放出する肺胞マクロファージの割合は 10%以下であり、ほとんどの細胞が IL-1 α を放出しない細胞死であった。これらの結果は、微

粒子によって肺の炎症を引き起こしている肺胞マクロファージは全体のごく一部であり、それらの細胞を用いた微粒子の安全性の評価が必要であると考えられる。

D.2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発（足利、飯島）

D.2.1. 酸化亜鉛ナノ粒子の h-CLAT 評価
これまでの種々の酸化亜鉛 NM の h-CLAT 法による評価から、亜鉛イオンの溶出が酸化亜鉛ナノマテリアルによる THP-1 細胞活性化の原因ではないかと考察してきた。今回評価した 2 品の酸化亜鉛 NM は、イオン交換水において検出限界未満のイオン溶出しか認められなかったことから、THP-1 細胞活性化が見られなかった場合は本仮説を裏付けるものと考えられた。しかし結果は、従来の他の酸化亜鉛 NM とほぼ同様の濃度で同程度の CD54 の発現亢進が認められた。今後は今回検討した 2 品について、培地中における亜鉛イオンの溶出濃度を測定する予定である。それにより実際に THP-1 細胞に適用される条件におけるイオン溶出濃度が評価可能となると考えられる。さらに、固体としての酸化亜鉛 NM が THP-1 細胞に貪食されてライソソーム内に入り、酸性状態でイオンが放出される可能性があるため、酸性条件下(pH4.5)における亜鉛イオンの溶出濃度の測定を行う予定である。こうした追加実験により、酸化亜鉛 NM による抗原提示細胞活性化のメカニズムの解明につながるものと期待される。

D.2.2. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

亜鉛イオンを吸着させた Sicastar-red F において、CD54 の発現が増加した。我々はこれまでに亜鉛イオン曝露が THP-1 細胞の

CD54 発現を亢進することを見出しており、シリカナノ粒子表面に主に静電相互作用により吸着した亜鉛イオンがシリカナノ粒子とともに THP-1 細胞に取り込まれ、後期エンドソーム～リソソームにおける pH の低下により粒子表面より脱離し、THP-1 細胞を活性化したと考えられる。シリカナノ粒子による THP-1 細胞の活性化は、シリカナノ粒子自体の持つ活性化能に加え、その高い物質吸着性による吸着物質によっても引き起こされている可能性が示唆された。今後、細胞内の環境を模倣した溶液中でのシリカナノ粒子からのイオンの乖離挙動の評価を進める。

D.2.3. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

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

酸化亜鉛ナノ粒子においては、24 時間後において CD86 および CD54 の発現亢進はみられず、72 時間後では細胞生存率の大幅な低下がみられた。シリカナノ粒子で得ら

れた知見と同様に、共培養系への NM の曝露では 24 時間の曝露時間は不十分であることが示唆された。酸化亜鉛ナノ粒子の流体力学的直径より小さな 0.4 μm ポアを有するセルカルチャーインサートを用いた場合には細胞生存率の大幅な低下は見られなかったことから、72 時間後における細胞生存率の大幅な低下は亜鉛イオンによる作用ではなく、気管支上皮モデルを透過した酸化亜鉛粒子による作用であることが考えられた。単培養 THP-1 細胞を用いた評価においても、酸化亜鉛ナノ粒子は狭い濃度域において CD54 の発現亢進および細胞生存率の低下がみられており、共培養系を用いた THP-1 細胞活性化能の評価においても試験濃度をいかに設定するかが重要であることが示唆された。

D.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発（高橋、石丸、渡辺）

D.3.1. ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験 3 回の感染動物実験より得られた NM の粘性多糖産生細胞の分布に及ぼす影響は、RSV 感染マウスでは非感染より相違が見られた。とくに個体での比較では、NM-204 では NM-201 より影響が見られ、CCL5 産生誘導の結果と一致していた。しかし、局所レベルでの比較では、高いスコアの組織部位で炎症性病変が強いわけではなかった。粘性多糖産生細胞の分布とケモカイン誘導との関連性を精査するため、NM 曝露 RSV 感染マウス肺パラフィンブロックより、標本を新たに切り出し（バイオ病理研究所株式会社に委託）、CCL3、CCL5 および MUC5B タンパクを標的とした免疫組織染色による検討を開始している。

D.3.2. ナノシリカ吸入曝露実験

これまで、in vitro 実験において影響が異

なるナノシリカ三種類（NM201、NM202、NM204）について吸入曝露実験を実施した。目視観察において、NM202 は三種類のナノシリカの中で最も微細な粒子である。MMAD はこれを反映しており、NM201 と NM204 がそれぞれ 1,650~2,030nm、1,439~1,468nm であるが NM202 は 507~667nm であった。一方、エアロゾル化効率は、NM201、NM204 がそれぞれ 14.8~21.3%、16.2~19.6%であるのに対して NM202 は 4.7~5.4%と低値を示した。NM202 は機器への付着が認められており、微細な粒子であることからエアロゾル化後にトラップされる検体が多かったことが原因と推察される。

NM202 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が、肺重量に関しては、NM202 投与群において増加傾向が認められた。

3 回の感染動物実験より得られた NM の粘性多糖産生細胞の分布に及ぼす影響は、RSV 感染マウスでは非感染より相違が見られた。しかし、高いスコアの組織での炎症性病変の相違は認められず、ケモカイン誘導との関連は不明であった。一方、CCL3 および CCL5 の誘導に関しては、それぞれ NM-202> -204 >> -201 および NM-204> -202>>-201 という影響が確認された。そこで、NM の影響を質的に差別化する目的で、抗 CCL3、CCL5 および MUC5B 抗体を用いた免疫組織染色による検討を開始している。

D.4. NM および呼吸器感作性物質の in vivo 免疫毒性解析（石丸）

NM202 の全身吸入暴露後 4 週および 8 週での BALF 細胞中の肺胞マクロファージに関して、細胞数、表現型ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

頸部リンパ節、脾臓においてもマクロファージ分画に NM202 暴露による変化は観察されなかった。脾臓において、NM202 暴露によって、CD4⁺T 細胞の Naïve 型へシフトが観察されたが、ナノシリカの免疫系への影響は不明な点が多く、何らかの T 細胞活性化機構に影響を及ぼしていた可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

病理組織学的な変化に関しては、各群一部の組織の解析で NM202 暴露で肺泡マクロファージの軽度の集簇領域が確認され、フローサイトメータの結果と乖離が見られる。暴露後 4 週、8 週での採取可能な BALF 中での肺泡マクロファージの動態と実際の組織中での肺泡マクロファージの変化に乖離がある可能性が考えられた。

MWCNT の全身吸入暴露で見られた BALF 細胞数の変化、M1 型への肺泡マクロファージ分画の変化や組織学的な変化とは異なり、NM202 暴露による変化は軽度である可能性があり、ナノマテリアルの形状、性状によって肺泡マクロファージの反応は大きく異なっているものと考えられる。MWCNT の暴露では肺泡マクロファージから産生される MMP12 が重要な役割を果たしていたが、NM202 暴露での BALF 細胞の *Mmp12* mRNA 発現に変化は認められなかった。以前から、ナノシリカを含めナノマテリアルの取り込みに関係している Scavenger receptor の一つである MARCO (*Front Immunol* 9:103, 2018) の mRNA 発現が濃度依存的に増加していたことから、MARCO 分子を介したナノシリカに対するマクロファージの反応が存在しているものとする。

RAW264.7 細胞を用いた実験では、細胞の大きさの変化で判断すると、NM202 を添加しただけでは RAW264.7 細胞による食食

作用は明らかではなく、LPS の刺激によって食食作用が亢進したものと考えられる。今回の培養系では、出来るだけ直接の NM202 の反応を観察するために、無血清培地を用いた。既報では M2 型マクロファージがナノシリカの食食作用が亢進することが知られていたが (*Front Pharmacol* 6:55, 2015)、今回の実験系では LPS の刺激で M1 型に誘導した場合に、MARCO の発現に変化が認められ、IL-13 による M2 型誘導マクロファージでは NM202 暴露による各種マーカーの発現に変化は認められなかった。LPS は TLR4 シグナルの活性化に重要であることから、マクロファージのナノシリカに対する反応性には TLR と Scavenger receptor の相互作用が重要である可能性が示された。

RAW264.7 細胞の Marco mRNA 発現に関しては、LPS 刺激細胞に 500 ng/mL の NM202 を添加すると 35 倍程度の Marco mRNA 発現が上昇したが、2,000 ng/mL ではそれ以上の発現上昇はなかったことから、より低濃度の反応性を再検討する必要がある。また、培養時間、LPS 以外の mitogen 刺激に関しても今後の検討課題である。

D.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価 (渡辺)

PMA 処置 THP-1 細胞/RSV 感染系における NM のケモカイン産生増強効果は明確ではなかった。この細胞は、LPS および IFN- γ の処理により炎症性マクロファージ (M1 系) へ分化するとの報告があり、ケモカイン誘導が強くなる可能性がある。現在、この実験系での影響評価を開始している。また、THP-1/A549 細胞の共培養系の構築を視野に入れた予備試験も開始している。

D.6. 既存情報と in vitro/in vivo 研究データによる in silico 解析 (大野)

先行研究で実施された SiO₂ NMs (NM-201, NM-202, NM-204)を用いた *in vitro* h-CLAT 試験結果は、すべて陽性であり、陽性判定のランキングは、NM-201<NM-202<NM-204 であった。

NM-204 は EC200 の活性化能が高く、毒性が強かったことは、一次粒子径や二時粒子径が最も小さい値であることが影響していると考えられ、その他の物性項目についても候補として挙げた。昨年度に実施した 6 種の MWCNTs (NM-400~403, NT-7(ND), NT-7(N)) を用いた、物性データ結果と毒性試験結果 (EC200) との関連性の解析では、毒性が強い被験物質の物性項目として細胞への吸着能を示す Specific surface area ratio (H₂O/N₂) の影響が大きいことが示唆された。従って、今年度の SiO₂ NMs の研究で、新たな物性項目の一つとして加えることとした。さらに、重金属 (As, Cd, Pb, Hg) は、不純物として被験物質に含まれると、細胞や臓器へのダメージが強化され、急性毒性や慢性毒性、発がん性、環境への影響が生じる可能性がある。従って、化学物質における重金属の存在を評価し、適切に管理することが重要であることから、これらの純金属の不純物についても、新たな物性項目の一つとして加えることとした。

化学構造からの有害性予測においては、特定の化学構造が特定の生物活性や毒性を示す傾向があることが知られている。例えば、RDKit や PaDEL-descriptor といったツールは、化学構造の記述子 (descriptor) を計算するために用いられ、これらの記述子は機械学習モデルの入力として利用することができる。従って、これらのツール

を活用することにより、化学物質の毒性を予測する際に有用であると考えられる。

また、量子化学計算を利用した毒性予測においては、PySCF のような量子化学計算プログラムを使用することで、化学物質の電子状態に関する詳細な計算が可能となる。これにより、HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) および LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) のエネルギーや、分子の電荷分布などの情報が得られる。これらの情報は、化学物質の反応性や安定性を理解するための重要な手がかりとなり、さらにその情報が毒性予測においても有益であることが示唆される。

E. 健康危険情報

特になし

F. 結論

F.1. 化学物質の in vitro 呼吸器感作性試験法の開発 (足利、善本、黒田)

F.1.1 In vitro 呼吸器感作性試験法の開発

本 DC 共培養系 (DCsens) は、昨年度の皮膚と呼吸器感作性化学物質、合計 20 種類に加え、非感作性化学物質 5 種類を用いて、呼吸器感作性と非呼吸器感作性の識別がより精度良く可能であった。さらに、他施設への技術移転性と再現性も高いことが示された。今後、もう 1 施設への技術移転を行い、合計 3 施設での施設内および施設間の再現性の検討を行い、最適なプロトコルを確立してゆく。

F.1.2 ヒト肺胞マクロファージ株の樹立と活性化メカニズムの解明

ヒト肺胞マクロファージに対して不死化および増殖に関与する遺伝子を導入することで形質転換を行なったが、十分な増殖スピードを有する細胞は得られなかった。

また、微粒子に応答し肺の炎症を引き起こす IL-1 α を放出する肺胞マクロファージは全体のごく一部であり、このような細胞集団を用いた微粒子の安全性評価の開発が重要であると考えられた。

F.2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発（足利、飯島）

検出限界未満のイオン溶出しか認められなかった 2 種の酸化亜鉛 NM を用いて h-CLAT 法による評価を行ったところ、どちらも従来の亜鉛イオン溶出が認められる酸化亜鉛 NM と同様に THP-1 細胞を活性化しており、酸化亜鉛 NM による抗原提示細胞活性化メカニズムの解明には、細胞の生理的条件下での亜鉛イオン溶出の評価が重要と考えられた。

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

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

F.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発（高橋、石丸、渡辺）

NM202 の高分散乾燥検体を持ちいて、マウスに 1 日時 6 時間、5 日間連続全身ばく

露吸入を実施した。その結果、低濃度群； $6.9 \pm 0.4 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群； $25.1 \pm 6.4 \text{ mg/m}^3$ を達成した。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに $3 \mu\text{m}$ 以下であり十分に肺胞に到達するエアロゾル特性を有していた。肺重量に関して、5 日間ばく露終了直後の肺とばく露 4 週間後の高濃度群で有意な増加がみられたが、8 週間では変化はみとめられなかった。

なお、本分担研究では気道感作物質の in vivo 評価方法の開発も実施する計画である。R5 年度には、油性溶媒に溶解して、ミスト発生供給装置 NB-2N 型（二流体式アトマイザー）による方法を検討したが、ミスト化に使用する圧縮空気に含まれる水蒸気の影響を除くことが難しく、また、実験環境への汚染防止策も現状では十分な対策ができないため気管内投与法の検討を行った。R6 年度は、陽性対象物質となる TDI 及び TMA の気管内投与に使用する検体の調製方法について検討を行った。TDI 及び TMA は水を含むと容易に加水分解される。そのため、種々の油性溶媒を検討した結果、アミノオイルを用いメノウ乳鉢にて分散させることで良好な調整検体を得ることが可能となった。

RSV 感染マウスでは、NM-204 は NM-201 より粘性多糖産生細胞の分布が広い傾向が認められた。CCL5 などのケモカイン誘導能との関連性を明らかにするため、免疫組織染色による検討を開始している。

F.4. NM および呼吸器感作性物質の in vivo 免疫毒性解析（石丸）

In vivo および in vitro での NM202 を用いた実験から、ナノシリカの肺における免疫毒性の評価に MARCO 分子を介した反応性の解析が重要である可能性が示された。

形状および性状の異なるナノマテリアルの免疫毒性の評価にはマクロファージを中心とした免疫病理的な手法が有効であることが示された。

F.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価（渡辺）

THP-1 細胞/RSV 感染系における NM のケモカイン産生増強効果は、*in vitro* 評価系としての利用には十分ではなく、培養条件の変更検討や共培養系の構築の予備試験を開始している。

F.6. 既存情報と *in vitro/in vivo* 研究データによる *in silico* 解析（大野）

化学物質の安全性評価において、物性データと毒性データの関連性解析は重要な役割を果たす。これらのデータ間には相関関係が見られることが多く、統合的な解析によって新たな毒性予測手法の開発が期待される。具体的には、既存の物性データに加え、実験のおよび計算化学的に得られる物性項目を拡充し、毒性指標との相関性を検証することで、予測精度向上を目指す。さらに、オープンソースライブラリーや機械学習等の情報科学的手法を活用し、1D、2D、3D 構造記述子を含む多様な物性項目を用いた予測モデルを構築することで、より高度な毒性予測を実現する。

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Shikama Y, Otsuka K, Furukawa M, Ishimaru N, Matsushita K. Involvement of metformin and aging in salivary expression of ACE2 and TMPRSS2. *BioFactor* 2025 ;51(1):e2154. doi:10.1002/biof.2154.
2. Ushio A, Ishimaru N. Molecular Pathogenesis via Sex Hormone in Sjögren's Syndrome. *J Stomatol Soc Jpn.* 92(1):1-6, 2025. doi.org/10.5357/koubyou.92.1_1
3. Kasahara T, Yamamoto Y, Nakashima N, Imamura M, Mizumachi H, Suzuki S, Aiba S, Kimura Y, Ashikaga T, Kojima H, Ono A, Matsumoto K, Borderline Range Determined Using Data From Validation Study of Alternative Methods for Skin Sensitization: ADRA, IL-8 Luc Assay, and EpiSensA, *Journal of Applied Toxicology*, 2025; 45(3); 432-439. <https://doi.org/10.1002/jat.4712>
4. Ashikaga T, Hatano K, Iwasa H, Kinoshita K, Nakamura N, Ambe K, Tohkin M, Next Generation Risk Assessment Case Study: A Skin Sensitization Quantitative Risk Assessment for Bandrowski's Base Existing in Hair Color Formulations, *J. Cos. Sci. Soc*, 2024;48(2):1-5.
5. Tsunematsu T, Mouri Y, Shao W, Arakaki R, Ruppert JG, Murano K, Ishimaru N, Guardavaccaro D, Pagano M, Kudo Y. Sustained chromosomal passenger complex activity preserves the pluripotency of human embryonic carcinoma cells. *Sci Signal.* 2024; 18:eadg4626. doi: 10.1126/scisignal.adg4626.
6. Nishida A, Sawada Y, Arai R, Ishibashi N, Suzuo M, Ohno A, Ashikaga T, Iijima K, Evaluation of the immunotoxicity potential of nanomaterials using THP-1 cells, *Front. Toxicol.*, 2024;Jul 1:6: 1293147. <https://doi.org/10.3389/ftox.2024.1293147>.
7. Ashikaga T, Hatano K, Iwasa H Kinoshita K, Nakamura N, Ambe K, Tohkin M, Next

- Generation Risk Assessment Case Study: A Skin Sensitization Quantitative Risk Assessment for Bandrowski's Base Existing in Hair Color Formulations, *J. Cos. Sci. Soc.*, 2024;48(2):73-77.
8. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaïoun K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P, Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, *Arch Toxicol.* 2024;98:2299–2308. doi: 10.1007/s00204-024-03802-6.
 9. Taquahashi Y, Aisaki K (Co-first author), Morita K, Suga K, Kitajima S, Application of the Matrix Profile Algorithm for Detecting Abnormalities in Rat Electrocardiograms, *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024;11(6): 289-296.
 10. Kuwagata M, Doi Y, Saito H, Tsurumoto M, Igarashi T, Nishimura T, Taquahashi Y, Hirabayashi Y, Kitajima S: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(4): 169-181. doi.org/10.2131/fts.11.169
 11. 平林容子, 足利太可雄, 小島肇夫, 非臨床安全性評価に用いられる非ヒト霊長類の供給不足をめぐる動き, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2024;55(3);195-197.
<https://doi.org/10.51018/pmdrs.55.3> 195.
 12. 足利太可雄, 化粧品開発における動物を用いない皮膚感作性評価法開発の現状, *SSCI-Net News Letter*, 2024;6;3-6.
 13. 足利太可雄, 大野彰子, 小島肇夫, 平林容子: 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 令和4～6年報告書, *AATEX-JaCVAM*. 2024;12(1):35-41.
 14. Ushio A, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N. Therapeutic Strategy Based on the Pathogenesis for Sjögren's Syndrome. *J Oral Health Biosci.* 2024;37(1):1-5.
 15. Nakamura K, Tsukasaki M, Tsunematsu T, Yan M, Ando Y, Huynh NCN, Hashimoto K, Gou Q, Muro R, Itabashi A, Iguchi T, Okamoto K, Nakamura T, Nakano K, Okamura T, Ueno T, Ito K, Ishimaru N, Hoshi K, Takayanagi H. The periosteum provides a stromal defence against cancer invasion into the bone. *Nature* 2024;1634(8033):474-481.
 16. Kobayashi D, Denda M, Hayashi J, Hidaka K, Hohmura Y, Tsunematsu T, Nishino K, Yoshikawa H, Ohkawachi K, Nigorikawa K, Yoshimura T, Ishimaru N, Nomura W, Katagiri T, Kosako H, Otaka A. Sulfoxide-Mediated Cys-Trp-Selective Bioconjugation that Enables Protein Labeling and Peptide Heterodimerization. *Chem Eur.* 2024;2(3-4); e202400014.
 17. Yamada A, Watanabe A, Nara A, Ishimaru N, Maeda K, Ido Y, Kotake K, Asano M, Shinohara Y, Yamamoto T. Longitudinal Analysis of Mitochondrial Function in a Choline-Deficient L-Amino Acid-Defined High-Fat Diet-

- Induced Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis Mouse Model. *Int J Mol Sci.* 2024;25:6193.
18. Aota K, Kani K, Ono S, Naniwa K, Momota Y, Fukui M, Ishimaru N, Azuma M. Activation of Janus kinase 2 contributes to the autoimmune pathology in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Oral Sci Int.* 2024;21(3):415-424.
 19. Ushio A, Matsuda-Lennikov M, Kalle-Youngoue F, Shimizu A, Abdelmaksoud A, Kelly MC, Ishimaru N, Takahama Y. Functionally diverse thymic medullary epithelial cells interplay to direct central tolerance. *Cell Rep.* 2024;43:114072.
 20. 大塚邦紘, 石丸直澄: Sjögren 症候群の病理 皮膚病診療 2024;46(9):788-79.
- G.2. 学会発表
1. 黒田悦史: 微粒子の化学的特性と肺胞マクロファージの活性化～炎症を引き起こす微粒子と引き起こさない微粒子. 第 32 回日本臨床環境医学会学術集会 (2024.6.9)
 2. Ishida S, Matsushita T, Sato K, Ashikaga T, Hirabayashi Y, Yamazaki D: Japanese approach to the proposal of an OECD Test Guideline using Gut-Liver MPS for the first pass effect analysis as a Context of Use of toxicokinetic simulator in chemical risk assessment, MPS World Summit 2024 (2024.6.13)
 3. Ashikaga T, Tanabe I, Ishikawa S, Mizoguchi I, Yoshimoto T: Development of an in vitro respiratory sensitization test based on a concept of a co-culture system between human bronchial epithelial cells and antigen presenting cells, LIVE 2024 (2024.6.20)
 4. 黒田悦史: 微粒子の化学的特性と肺胞マクロファージの活性化～炎症を引き起こす微粒子と引き起こさない微粒子. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.3)
 5. 徳永朱莉, 木下啓, 安部賀央里, 山田隆志, 足利太可雄, 頭金正博: 機械学習を活用した皮膚感作性強度予測モデルの開発と解釈性向上に向けた検討, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.3)
 6. Taquahashi Y, Aisaki K, Morita K, Kousuke Suga K, Tsuji M, Kitajima S, Application of Matrix Profile Algorithm for Detecting Abnormalities in Waveform Data with Repetitive Patterns to Electrocardiograms, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.4)
 7. 足利太可雄, 大屋賢司, 加藤節史, 北川剛史, 小島肇, 寒水孝司, 林克彦, 立花滋博, 益森勝志, 三嶋隆, 楠木俊江, 清水淳, 伏原和久, 宮崎和雄: 機ヒト末梢血から樹立した不死化単球細胞株を用いた発熱性物質検出系のバリデーション研究, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
 8. 飯島一智, 山城真輝, 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄: 種々の酸化亜鉛ナノ粒子を対象とした抗原提示細胞活性化能の評価と活性化機序の解析, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
 9. 黒田悦史: 肺胞マクロファージ細胞株を用いた炎症性微粒子評価法の開発および微粒子の化学的特性の解析. 2024 年度日化協 LRI 研究報告会 (2024.8.23)
 10. Hinata Inoue, Takumi Adachi, Etsushi Kuroda: The novel evaluation approach

- for the immunotoxicity of environmental particulate matters using a newly developed macrophage line. 第31回日本免疫毒性学会学術年会 (2024.9.19)
11. 善本隆之、片平泰弘、長谷川英哲、溝口出：呼吸器感作性評価法の開発、特別講演、第31回日本免疫毒性学会学術年会 (2024.9.19)
 12. 溝口出、片平泰弘、長谷川英哲、善本隆之：呼吸器と皮膚感作性物質の識別を目指した2ステップDC/T細胞共培養系の開発、第31回日本免疫毒性学会学術年会 (2024.9.19)
 13. Inoue H, Adachi T, Kuroda E : The novel evaluation approach for the immunotoxicity of environmental particulate matters using a newly developed macrophage line. 第31回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.19)
 14. 足利太可雄：動物実験代替法の国際動向と国内行政受け入れの取り組み、皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第18回教育セミナー (2024.9.26)
 15. 大野彰子：食品分野に含まれるナノ粒子の健康影響、科学的根拠に基づく健康寿命を伸ばす会 第30回講演会 (2024.10.9)
 16. Reinke E, Ulrey A, Hoffmann S, Basketter D, Corsini E, Ashikaga T, Gerberick F: Peer Review for Validation Studies: Building Confidence and Transparency Into a New Validation Paradigm, ASCCT 13th Annual Meeting (2024.10.29)
 17. 前田洋祐, 佐藤亜紗子, 武吉正博, 立花滋博, 成田和人, 小林諒太, 島田真理子, Priyanka M, Rahul D, Abhay D, Namhee K, Miriam J, 福山朋季, 松本一彦, 赤堀有美, 足利太可雄, 大野彰子, 小島肇, 小野敦: 皮膚感作性試験代替法 α -Sens®の Validation 研究 (Phase I) , 日本動物実験代替法学会 第37回大会 (2024.11.30)
 18. 大野彰子, 沖山佳生, 山城真輝, 飯島一智, 足利太可雄：ナノマテリアルの免疫毒性評価系における *in vitro* h-CLAT 試験法の有用性, 日本動物実験代替法学会 第37回大会 (2024.11.30)
 19. 徳永朱莉, 木下啓, 岩佐帆乃夏, 波多野浩太, 中村伸昭, 足利太可雄, 安部賀央里：アミノ酸誘導体結合性試験ADRA等を使用した強感作性物質の皮膚感作性強度を予測する機械学習モデルの開発, 日本動物実験代替法学会 第37回大会 (2024.11.30)
 20. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智：気管支モデルとの共培養系を用いた各種シリカナノ粒子のTHP-1細胞活性化能の評価と活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第37回大会 (2024.11.30)
 21. 荒井りおん, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智：ナノマテリアル吸入毒性試験法の開発に向けた、各種シリカナノ粒子曝露によるTHP-1細胞活性化のメカニズム解析と新規評価指標候補遺伝子の発現解析, 日本動物実験代替法学会 第37回大会 (2024.11.30)
 22. 坂本玲奈, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智：気管支モデル／THP-1細胞共培養系を用いた酸化亜鉛ナノ粒子の免疫細胞活性化能の評価, 日本動物実験代替法学会 第37回大会 (2024.11.30)
 23. 溝口出, 片平泰弘, 長谷川英哲, 園田寿樹心, 山岸美宇, 堀尾恵里, 山口夏輝, 井上慎也, 宮川聡美, 曲寧, 善本隆之：3次元共培養系におけるヒト単球

- 由来細胞株 CD14-ML 由来未成熟 DC での TNFSF4 (OX40L)発現を指標にした in vitro 呼吸器感作性試験法の開発、第 37 回日本動物実験代替法学会 (2024.11.30)
24. 足利太可雄：皮膚感作性試験代替法の行政活用状況，日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.12.1)
25. Matsuzawa S, Ushio A, Nagao R, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N. A crucial role of autophagy in neonatal thymus in autoimmunity. 第 53 回日本免疫学会総会学集会 (2024.12.3)
26. Nagao R, Yamamoto A, Ushio A, Otsuka K, Matsuzawa S, Tsunematsu T, Ishimaru N. Analysis of regulatory mechanism for T cell activation via Trat1 in Sjögren's syndrome. 第 53 回日本免疫学会総会学集会 (2024.12.5)
27. Otsuka K, Kondo H, Tsukumo S, Ishimaru N, Yasutomo K. Salivary gland fibroblasts drive autoimmune pathology via the interaction with CD4⁺ T cells in Sjögren's syndrome. 第 53 回日本免疫学会総会学集会 (2024.12.5)
28. 石ヶ守里加子, 今井正彦, 大野彰子, 戸塚ゆ加里：マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの毒性評価，日本環境変異原ゲノム学会 第 53 回大会 (2024.12.7)
29. Yoshimoto T, Katahira Y, Hasegawa H, Qu N, Yamaguchi N, Horio E, Ashikaga S, Mizoguchi I. Prediction of the Respiratory Sensitizing Potential of Chemicals Using DC Coculture and DC/T Cell Coculture Systems. SOT 64th Annual Meeting (2025.3.16-21)
30. Ohno A, Okiyama Y, Yamashiro M, Iijima K, Hirose A, Ashikaga T: Usefulness of Evaluation System for Activation Potential of Various Nanoparticles Using Monocytic Cell Line THP-1 and Prediction of Toxicity、SOT 64th Annual Meeting (2025.3.18)
31. Aoshima H, Ishikawa S, Tanabe I, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Ashikaga T: Investigation of the Differential Biological Effects of Skin and Respiratory Sensitizing Chemicals Using a Co-Culture System of Bronchial Epithelium and Dendritic Cells (2025.3.19)

H. 知的所有権の取得状況

(予定を含む)

1. 特許取得

発明の名称：被験物質の呼吸器感作性検出方法、感作抑制物質のスクリーニング方法、および生体投与用組成物の製造方法

発明者：善本隆之、溝口 出

出願人：学校法人 東京医科大学

出願日：2025 年 3 月 6 日

出願番号：特願 2025-035075

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

令和 6 年度 分担研究報告書

化学物質のin vitro呼吸器感作性試験法とNMのin vitro抗原提示細胞活性化試験法
の開発に関する研究

研究分担者 足利太可雄

国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部 室長

研究要旨

化学物質の吸入曝露による健康影響が懸念されている一方、現在の OECD ガイドラインである in vivo 吸入曝露試験は多大な費用と時間が課題とされており、毒性発現機構に基づいた効率的で精度の高い試験法の開発が強く望まれている。特に化学物質の呼吸器感作については、未だ行政が受け入れ可能な試験法が開発されておらず、また、ナノマテリアル(NM)については、従来の in vivo 吸入曝露試験のみでは毒性評価が十分に行えない状況にある。

本分担研究では、生体の肺組織を模倣した 3 次元共培養系による免疫毒性評価試験法を開発することを目的として、国内で入手可能な肺胞マクロファージ細胞の調査を行い、ヒト肺の模倣性が高い気道・肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージとして、HiLung 株式会社が iPS 細胞より作成した細胞を見出した。NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法に関しては、h-CLAT 法を用いて、亜鉛イオン溶出量を検出限界以下まで低減化した表面処理の異なる 2 種類の酸化亜鉛 NM の評価を行った結果、いずれも CD54 の強い発現増強が認められ、イオン交換水への亜鉛イオンの溶出濃度と THP-1 細胞の活性化能に関連は認められなかったことから、酸化亜鉛 NM による THP-1 活性化能は固体としての貪食によるものと考えられた。

今後本分担研究では、肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージの共培養系による NM を含む免疫毒性試験法の開発と、酸化亜鉛 NM による抗原提示細胞活性化機構の解明を目指す。

A. 研究目的

化学物質の吸入曝露によりアレルギー性喘息を生じる呼吸器感作については、未だ行政が受け入れ可能な試験法が開発されておらず、昨年欧州各国より in vitro 試験法開発を目標とした作業計画が OECD に提案された。また、ナノマテリアル(NM)は吸入曝露後に異物処理に重要な役割を果たす肺胞マクロファージによって貪食さ

れるが、化学物質とは異なり肺内に蓄積されるため、従来の in vivo 吸入曝露試験のみでは毒性評価が十分に行えない状況にある。

そこで本研究班では、短期吸入曝露されたNMを含む化学物質の免疫毒性評価手法の開発と、将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的とする。本分担研究では、先行研究で見出

したバイオマーカー等を測定指標とすることで、NM の抗原提示細胞活性化能および化学物質の呼吸器感受性のメカニズムの解明とそれに基づく試験法開発を行う。

B. 研究方法

1. 国内で利用可能な可能な肺泡マクロファージ細胞の調査

MPS World Summit 2024 (2024 年 6 月、シアトル) および Lung for In Vitro Event 2024 (2024 年 6 月、ニース)に参加し、in vitro 肺モデルの調査を行った。

2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発

イオン交換水への亜鉛イオン溶出量が測定限界未満であるとされる酸化亜鉛 NM (MZN-B0) とその表面処理品 (MZN-B0HP) の 2 種の in vitro における抗原提示細胞活性化能を、human Cell Line Activation Test (h-CLAT) により評価した。具体的方法は OECD TG442E に準拠した。いずれの被験物質についても、100 $\mu\text{g/mL}$ 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 時間ばく露し、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。

(倫理面への配慮)

全て文献調査と 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

1. 国内で利用可能な可能な肺泡マクロファージ細胞の調査

京都大学医学部呼吸器内科発の企業である HiLung 株式会社は、世界的にも唯一の iPS 細胞より呼吸器細胞を作成するコア技術を有する研究開発型企业であり、本技術

を活用して極めてヒト肺の模倣性が高い気道・肺胞上皮細胞や肺泡マクロファージを安定的製造するとともに、オルガノイドなどの肺構造を再現した高度な組織培養・工学技術も有しており、これらを組み合わせた高機能ヒト肺モデルで医薬品の薬効評価、毒性評価評価を手掛けた豊富な実績を有することが明らかとなった。

2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発

用量設定試験の結果、CV75 (生存率が 75% に相当する被験物質濃度) は MZN-B0 で 36.6 $\mu\text{g/mL}$ 、MZN-B0HP で 36.5 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。いずれの被験物質についても、3 回の本試験のいずれにおいても、CD86 発現についてはすべての用量で陰性となったが、CD54 発現については 2 品とも複数濃度で相対発現量が 200%以上となり陽性と判断された。特に適用濃度 31.6 $\mu\text{g/mL}$ において CD54 の相対発現量は無処理と比較して約 30-50 倍と著しい亢進が認められた。抗原提示細胞活性化の指標である EC200 (CD54 が陽性となる濃度閾値) について、MZN-B0 と MZN-B0HP ではそれぞれ 9.37 $\mu\text{g/mL}$ 、10.1 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。図 1 と 2 に MZN-B0 と MZN-B0HP の h-CLAT 試験結果を示した。

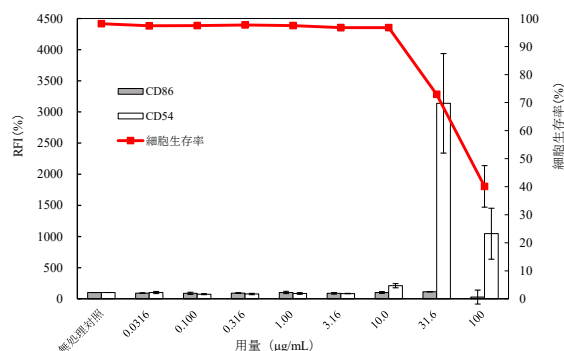


図 1 MZN-B0 処理 THP-1 細胞の CD86/54 発現量と生存率(N=3)

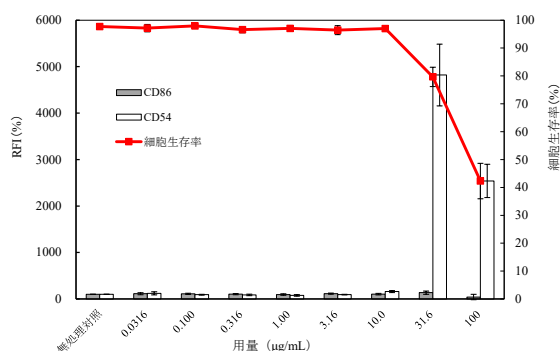


図 2 MZN-B0HP 処理 THP-1 細胞の CD86/54 発現量と生存率(n=3)

D. 考察

1. 国内で利用可能な可能な肺泡マクロファージ細胞の調査

次年度は HiLung 株式会社とともに以下のように研究を進める予定である。

A. iPS 細胞より段階的方法を用いて肺前駆細胞を分化誘導する。分化誘導された肺前駆細胞を特異的な表面マーカーによる細胞ソーティングによって単離し、肺線維芽細胞と共培養することで肺泡オルガノイドを形成する。

B. ヒト iPS 細胞由来肺泡マクロファージの作製

iPS 細胞より段階的方法を用いて組織在住マクロファージを分化誘導する。その後、成熟化培地を用いて、肺泡マクロファージを作製する。

C. 共培養による評価系

工程 A および B で作製した肺泡オルガノイドと肺泡マクロファージを、共培養専用培地において共培養系を作製する。そこに先行研究で THP-1 細胞の強い活性化能が認められた二酸化ケイ素 NM (NM204)を処理し、CD54, MMP-12 など活性化の指標となりうる遺伝子の発現量を測定し、本共養系の有用性を評価する。

2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発

今回、亜鉛イオンの溶出が酸化亜鉛 NM による抗原提示細胞活性化の原因ではないかとの仮説から、イオン交換水への亜鉛イオンの溶出が検出限界未満とされる 2 種の酸化亜鉛 NM（基材及び表面処理品）について h-CLAT 試験を行ったところ、いずれも CD54 の強い発現誘導が認められ、細胞毒性、抗原提示細胞活性化能とも従来の酸化亜鉛 NM とほぼ同程度であった。表 1 に、昨年度同様に評価した 2 種類の酸化亜鉛 NM の結果も加えて 4 種類の亜鉛イオン溶出量と h-CLAT 試験による THP-1 細胞の活性化能の関係を示した。

表 1 各種酸化亜鉛 NM の亜鉛イオン溶出量と h-CLAT 試験による THP-1 細胞活性化能

サンプル名	LotNo.	Znイオン溶出量※(ppm) 下段 2つは水質測定器/ICP	h-CLAT CD54 EC200 (ug/mL)
MZ-500	5111025	9.4	10.1
MZ-500HP	2.5	2.5	10.5
MZN-B0	N-5230702	≒0/0.03	9.37
MZN-B0HP	240726	≒0/7.5	10.1

表 1 に示すように、亜鉛イオンの溶出量にかかわらず THP-1 の活性化能（EC200: 値が低いほど活性化能が高いと考えられる）はほぼ同じであったことから、活性化には溶出した亜鉛イオンではなく、固体としての酸化亜鉛 NM の細胞内取り込みが関与している可能性が考えられた。今後培地中での亜鉛イオンの溶出量の測定や、THP-1 細胞の NM 食食阻害が認められた Amiloride を前処理することで、酸化亜鉛 NM による抗原提示細胞活性化のメカニズム解明を目指す。

E. 結論

1. 国内で利用可能な可能な肺胞マクロファージ細胞の調査

肺胞オルガノイドと肺胞マクロファージの作成技術を有する国内研究機関を見出した。今後これらの細胞を用いた共培養系による、NMを含む化学物質の吸入曝露による免疫毒性評価系を開発する。

2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発

h-CLAT 法を用いて、亜鉛イオン溶出量を検出限界以下まで低減化した表面処理の異なる 2 種類の酸化亜鉛 NM の評価を行った結果、いずれも CD54 の強い発現増強が認められ、イオン交換水への亜鉛イオンの溶出濃度と THP-1 細胞の活性化能に関連は認められなかったことから、酸化亜鉛 NM による THP-1 活性化能は固体としての食食によるものと考えられた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Nishida A, Sawada Y, Arai R, Ishibashi N, Suzuo M, Ohno A, Ashikaga T, Iijima K: Evaluation of the immunotoxicity potential of nanomaterials using THP-1 cells. *Front. Toxicol.*,2024;6:1293147. <https://doi.org/10.3389/ftox.2024.1293147>.
2. Ashikaga T, Hatano K, Iwasa H Kinoshita K, Nakamura N, Ambe K, Tohkin M: Next Generation Risk Assessment Case Study: A Skin Sensitization Quantitative Risk Assessment for Bandrowski's Base Existing in Hair Color Formulations, *J. Cos. Sci. Soc.* 2024;48(2):73-77.
3. Kasahara T, Yamamoto Y, Nakashima N, Imamura M, Mizumachi H, Suzuki S, Aiba

S, Kimura Y, Ashikaga T, Kojima H, Ono A, Matsumoto K: Borderline Range Determined Using Data From Validation Study of Alternative Methods for Skin Sensitization: ADRA, IL-8 Luc Assay, and EpiSensA, *Journal of Applied Toxicology*. 202445(3):432-439.

<https://doi.org/10.1002/jat.4712>

4. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaioun K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P. Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, *Arch Toxicol*, 2024;98:2299-2308. doi: [10.1007/s00204-024-03802-6](https://doi.org/10.1007/s00204-024-03802-6).
5. 平林容子, 足利太可雄, 小島肇夫: 非臨床安全性評価に用いられる非ヒト霊長類の供給不足をめぐる動き, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2024;55(3):195-197. https://doi.org/10.51018/pmdrs.55.3_195.
6. 足利太可雄: 化粧品開発における動物を用いない皮膚感作性評価法開発の現状, *SSCI-Net News Letter*. 2024;6:3-6.
7. 足利太可雄, 大野彰子, 小島肇夫, 平林容子: 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 令和 4~6 年報告書, *AATEX-JaCVAM*. 2024;12(1):35-41.

F.2 学会発表

1. Ishida S, Matsushita T, Sato K, Ashikaga

- T, Hirabayashi Y, Yamazaki D: Japanese approach to the proposal of an OECD Test Guideline using Gut-Liver MPS for the first pass effect analysis as a Context of Use of toxicokinetic simulator in chemical risk assessment, MPS World Summit 2024 (2024.6.13)
2. Ashikaga T, Tanabe I, Ishikawa S, Mizoguchi I, Yoshimoto T: Development of an in vitro respiratory sensitization test based on a concept of a co-culture system between human bronchial epithelial cells and antigen presenting cells, LIVE 2024 (2024.6.20)
 3. 徳永朱莉, 木下啓, 安部賀央里, 山田隆志, 足利太可雄, 頭金正博: 機械学習を活用した皮膚感作性強度予測モデルの開発と解釈性向上に向けた検討, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.3)
 4. 足利太可雄, 大屋賢司, 加藤節史, 北川剛史, 小島肇, 寒水孝司, 林克彦, 立花滋博, 益森勝志, 三嶋隆, 楠木俊江, 清水淳, 伏原和久, 宮崎和雄: ヒト末梢血から樹立した不死化単球細胞株を用いた発熱性物質検出系のバリデーション研究, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
 5. 飯島一智, 山城真輝, 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄: 種々の酸化亜鉛ナノ粒子を対象とした抗原提示細胞活性化能の評価と活性化機序の解析, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
 6. 足利太可雄: 動物実験代替法の国際動向と国内行政受け入れの取り組み, 皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第 18 回教育セミナー (2024.9.26)
 7. Reinke E, Ulrey A, Hoffmann S, Basketter D, Corsini E, Ashikaga T, Gerberick F: Peer Review for Validation Studies: Building Confidence and Transparency Into a New Validation Paradigm, ASCCT 13th Annual Meeting (2024.10.29)
 8. 前田洋祐, 佐藤亜紗子, 武吉正博, 立花滋博, 成田和人, 小林諒太, 島田真理子, Priyanka M, Rahul D, Abhay D, Namhee K, Miriam J, 福山朋季, 松本一彦, 赤堀有美, 足利太可雄, 大野彰子, 小島肇, 小野敦: 皮膚感作性試験代替法 α -Sens\$24C7\$ の Validation 研究 (Phase I), 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 9. 大野彰子, 沖山佳生, 山城真輝, 飯島一智, 足利太可雄: ナノマテリアルの免疫毒性評価系における *in vitro* h-CLAT 試験法の有用性, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 10. 徳永朱莉, 木下啓, 岩佐帆乃夏, 波多野浩太, 中村伸昭, 足利太可雄, 安部賀央里: アミノ酸誘導体結合性試験 ADRA 等を使用した強感作性物質の皮膚感作性強度を予測する機械学習モデルの開発, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 11. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支モデルとの共培養系を用いた各種シリカナノ粒子の THP-1 細胞活性化能の評価と活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 12. 荒井りおん, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: ナノマテリアル吸入毒性試験法の開発に向けた、各種シリカナノ粒子曝露による THP-1 細胞活性化のメカニズム解析と新規評価指標

候補遺伝子の発現解析，日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)

13. 坂本玲奈，山城真輝，大野彰子，足利太可雄，飯島一智：気管支モデル／THP-1 細胞共培養系を用いた酸化亜鉛ナノ粒子の免疫細胞活性化能の評価，日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)

14. 足利太可雄：皮膚感作性試験代替法の行政活用状況，日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.12.1)

15. Aoshima H, Ishikawa S, Tanabe I, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Ashikaga T: Investigation of the Differential Biological Effects of Skin and Respiratory Sensitizing Chemicals Using a Co-Culture System of Bronchial Epithelium and Dendritic Cells (2025.3.19)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のため研究(23KD0101)

令和 6 年度 分担研究報告書

分担研究課題 In vivo 吸入曝露実験方法の開発

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 室長

研究協力者: 森田紘一 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究協力者: 辻 昌貴 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究協力者: 菅 康佑 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究協力者: 相田麻子 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

本研究は、短期吸入曝露されたナノマテリアル(NM)を含む化学物質の *in vitro* による免疫毒性評価手法の開発と将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的とする。本分担研究では、動物を用いた吸入ばく露方法の開発を行い、開発目標である *in vitro* 試験法の理論的根拠となる知見を得るとともに、化学物質が呼吸器感作性を成立させるメカニズム解明を行うことを目的としている。R6 年度は、ナノマテリアルの感染性免疫への影響を調べることを目的とした実験に供するため、先行研究で開発した全身ばく露吸入装置(Taquann システム Ver3.0)により、ナノシリカ(NM202、JRC)を高分散エアロゾルとして、C57BL/NcrSlc 雄性マウス 12 週齢に 6hr/day、連続 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。

エアロゾルの目標濃度は、低濃度群 10 mg/m³、高濃度群 30 mg/m³とした。その結果、質量濃度の平均値は、低濃度群、高濃度群それぞれ 6.9 mg/m³、25.1 mg/m³、MMAD は低濃度群、高濃度群それぞれ 562 nm(σ :2.7~2.9)、709 nm(σ :2.4~2.5)であった。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに 3 μ m 以下であり十分に肺胞に到達するエアロゾル特性を有していた。しかしながら、NM202 は、これまで吸ばく露実験を行ったナノシリカ検体に比較して微細で機器への吸着性が強く、エアロゾル化効率は約 5%程度と非常に低かった。NM202 を曝露したマウスはばく露後 8 週間までの観察期間中、体重推移に影響は見られなかった。肺重量に関して、5 日間のばく露終了直後およびばく露 4 週後の定期解剖において用量依存的に増加傾向にあり、高濃度群では統計学的に有意であったが、ばく露後 8 週後では影響は認められなかった。

なお、本分担研究では気道感作物質の *in vivo* 評価方法の開発も実施するため、現在、気管内投与法による実験を計画中である。R6 年度は、陽性対象物質となる TDI 及び TMA の気管内投与に使用する検体の調製方法について検討を行った。TDI 及び TMA は水を含むと容易に加水分解される。そのため、油性溶媒を検討した結果、アミノオイルを用いメノウ乳鉢にて分散させることで良好な調整検体を得ることが可能となった。

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。今年度は被験物質として、ナノシリカを使用した。

B. 研究方法

B-1 被験物質

1. 被験物質:

被験物質として、EU 共同研究センター(JRC: Joint Research Centre in Ispra, Italy)から寄付されたナノシリカ(SiO₂-NM202-JRCNM02002)を使用した。

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。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±1℃、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)を自由摂取させた。飲水は滅菌水ディスポーザブルパウチ(Hydropa)を用いて自由摂取させた。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)、NM204 ばく露群(低濃度、高濃度)の 3 群構成とした。目標濃度は、低濃度群 10 mg/m³ 高濃度群 30 mg/m³と設定した。各群 21 匹のマウスを使用し、1 日 6 時間(10:00~16:00)の吸入ばく露を隔日 3 回実施した。

4. 全身ばく露吸入装置

(1) エアロゾル発生装置

動物へのばく露は既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 を使用した(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。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ト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ト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。

NM202 の原末を 35℃に加温した tert-butyl alcohol(TBA)加えて 3 mg/mL の懸濁液を調整した。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。この懸濁液をインナーカートリッジに分注した。低濃度群では 6.7

mL/cartridge、高濃度群では 20 mL/cartridge を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(MD4C NT+AK+EK, Vacuubrand)で TBA を昇華除去した。

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。

実験条件の詳細に関しては、表 1 に記載した。

(2) ばく露チャンバー

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した。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。

5. 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/m^3)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)を設置して低濃度群では 5.09 倍、高濃度群では 6.54 倍希釈した。

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 1 時間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 90L($1.5 \text{ L/min} \times 60\text{min}$)から 1 m^3 当りの質量濃度を算出した。のフィルターの秤量にはマイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用した。サンプリングは、10 時～11 時、12 時～13 時及び 14 時～15 時に実施し、3 回の平均値を代表値とした。

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。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(μ

m) ; 10、5.6、3.2、1.8、1.0、0.56、0.32、0.10、0.18、0.056、0.032、0.018、0.01)に導いた。吸引時間は 40 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℃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(ゾエティス)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 1 mL 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(令和 3 年 5 月版)」に則って実施した。

C. 研究結果

C-1 マウス全身ばく露吸入実験

NM202 の 5 回の全身ばく露吸入実験における平均質量濃度は、低濃度群; $6.9 \pm 0.4 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群; $25.1 \pm 6.4 \text{ mg/m}^3$ (平均値 $\pm$ SD) であった。MMAD は 2 回測定を実施し、その平均値は低濃度群; 562 nm(og: 2.7~2.9)、高濃度群; 709 nm (og: 2.4~2.5) であった(表 1)。

6 時間の吸入ばく露実験において使用した検体の総量と 6 時間の曝露チャンバーの総換気量(11.7 m^3)から計算される名目上の濃度は低濃度群、高濃度群それぞれ 151.2 mg/m^3 、 451.3 mg/m^3 と計算される。実際に測定した濃度の平均値から、エアロゾル化効率を計算すると低濃度群、高濃度群それぞれ 4.7%、5.4% であった。

ばく露開始前に実施した群分け時のマウスの体重の平均値は、対照群、低濃度群、高濃度群それぞれ $24.8 \pm 1.1 \text{ g}$ 、 $24.8 \pm 1.3 \text{ g}$ 、 $24.7 \pm 1.2 \text{ g}$ であった。ばく露後 4 週では $28.4 \pm 1.3 \text{ g}$ 、 $28.7 \pm 1.8 \text{ g}$ 、 $28.0 \pm 1.6 \text{ g}$ 、ばく露後 8 週では $30.7 \pm 1.3 \text{ g}$ 、 $31.3 \pm 2.6 \text{ g}$ 、 $30.7 \pm 2.2 \text{ g}$ であり、ばく露の影響はみられなかった(図 1)。

ばく露終了直後の肺重量は、対照群、低濃度群、高濃度群それぞれ、 $118.8 \pm 0.8 \text{ mg}$ 、 $129.0 \pm 12.9 \text{ mg}$ 、 $139.1 \pm 3.1 \text{ mg}$ 、ばく露後 4 週では $115.8 \pm 3.5 \text{ mg}$ 、 $122.4 \pm 4.1 \text{ mg}$ 、 $124.0 \pm 1.8 \text{ mg}$ 、ばく露後 8 週では、 $123.7 \pm 3.0 \text{ mg}$ 、 $127.8 \pm 4.9 \text{ mg}$ 、 $127.2 \pm 2.6 \text{ mg}$ であり、ばく露終了直後から 4 週目までは用量依存的に肺重量が増加傾向にあり、高濃度群では統計学的に有意であったが、8 週後ではばく露の

影響は見られなかった(図 2)。

採取した組織(肺、BALF、リンパ節、脾臓)は、病理組織学的評価および免疫機能評価の分担研究者(東京科学大学、石丸直澄 教授)に提供した。

D. 考察

これまで、*in vitro* 実験において影響が異なるナノシリカ三種類(NM201、NM202、NM204)について吸入曝露実験を実施した。目視観察において、NM202 は三種類のナノシリカの中で最も微細な粒子である。MMAD はこれを反映しており、NM201 と NM204 がそれぞれ 1,650~2,030nm、1,439~1,468nm であるが NM202 は 507~667nm であった。一方、エアロゾル化効率は、NM201、NM204 がそれぞれ 14.8~21.3%、16.2~19.6%であるのに対して NM202 は 4.7~5.4%と低値を示した。NM202 は機器への付着が認められており、微細な粒子であることからエアロゾル化後にトラップされる検体が多かったことが原因と推察される。

NM202 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が、肺重量に関しては、NM202 投与群において増加傾向が認められた。

E. 結論

NM202 の高分散乾燥検体をもちいて、マウスに 1 日時 6 時間、5 日間連続全身ばく露吸入を実施した。その結果、低濃度群; 6.9 ± 0.4 mg/m³、高濃度群; 25.1 ± 6.4 mg/m³ を達成した。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに 3 μ m 以下であり十分に肺胞に到達するエアロゾル特性を有していた。肺重量に関して、5 日間ばく露終了直後の肺とばく露 4 週後の高濃度群で有意な増加がみられたが、8 週後では変化はみとめられなかった。

なお、本分担研究では気道感作物質の *in vivo* 評価方法の開発も実施する計画である。R5 年度には、油性溶媒に溶解して、ミスト発生供給装置 NB-2N 型(二流体式アトマイザー)による方法を検討したが、ミスト化に使用する圧縮空気に含まれる水蒸気の影響を除くことが難しく、また、実験環境への汚染防止

策も現状では十分な対策ができないため気管内投与法の検討を行った。R6 年度は、陽性対象物質となる TDI 及び TMA の気管内投与に使用する検体の調製方法について検討を行った。TDI 及び TMA は水を含むと容易に加水分解される。そのため、種々の油性溶媒を検討した結果、アミノオイルを用いメノウ乳鉢にて分散させることで良好な調整検体を得ることが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yuhji Taquahashi, Ken-ich Aisaki, Koichi Morita, Kousuke Suga, Satoshi Kitajima: Application of the matrix profile algorithm for detecting abnormalities in rat electrocardiograms. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(6): 289-296. [doi.org/10.2131/fts.11.289]

Makiko Kuwagata, Yuko Doi, Hirokatsu Saito, Mariko Tsurumoto, Toshime Igarashi, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(4): 169-181.[doi.org/10.2131/fts.11.169]

2. 学会発表

Taquahashi Y, Aisaki K, Morita K, Kousuke Suga K, Tsuji M, Kitajima S, Application of Matrix Profile Algorithm for Detecting Abnormalities in Waveform Data with Repetitive Patterns to Electrocardiograms, 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.4)福岡

北嶋 聡, 高橋 祐次, 相崎 健一, 菅野 純: フグ毒テトロドトキシンを単回経口投与した際のマウス肝及び海馬 Percellome トキシコゲノミクス. 第 51 回日本毒性学会学術年会(2024.7.3)福岡

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Kousuke Suga, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Ken-

ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Development of a telemetry unit for measuring rat biopotential: easy to attach, less invasive by using carbon nanotube yarn (CNT-Y) as a surface electrode, 64th Society of Toxicology Annual Meeting, , Abstract Number/Poster Board number 4246/P762, 2025.3.18,Orland

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

3. その他

なし

表 1 吸入ばく露実験条件のまとめ

NM202 (6hr/day for 5th consecutive day)		Mean	SD
Mass Concentration (mg/cubic meter)	Low Concentration	6.9	0.4
	High Concentration	25.1	6.4
Nominal Mass Concentration (mg/cubic meter)	Low Concentration	151.2	
	High Concentration	451.3	
Aerosolization efficiency (%)	Low Concentration	4.7	0.3
	High Concentration	5.4	1.5
MMAD (nm, Model125, KANOMAX, N=2)	Low Conc. Day 2nd	515	σ: 2.9
	Low Conc. Day 4th	609	σ: 2.7
	Low Conc. mean	562	
	High Conc. Day 2nd	709	σ: 2.4
	High Conc. Day 4th	709	σ: 2.5
	High Conc. mean	709	
Experimental condition			
Load of NM202 per cartridge	Low	20 mg	
	High	60 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	



図 1 マウス体重推移

ばく露後 8 週までの間、吸入ばく露による影響はみられなかった。

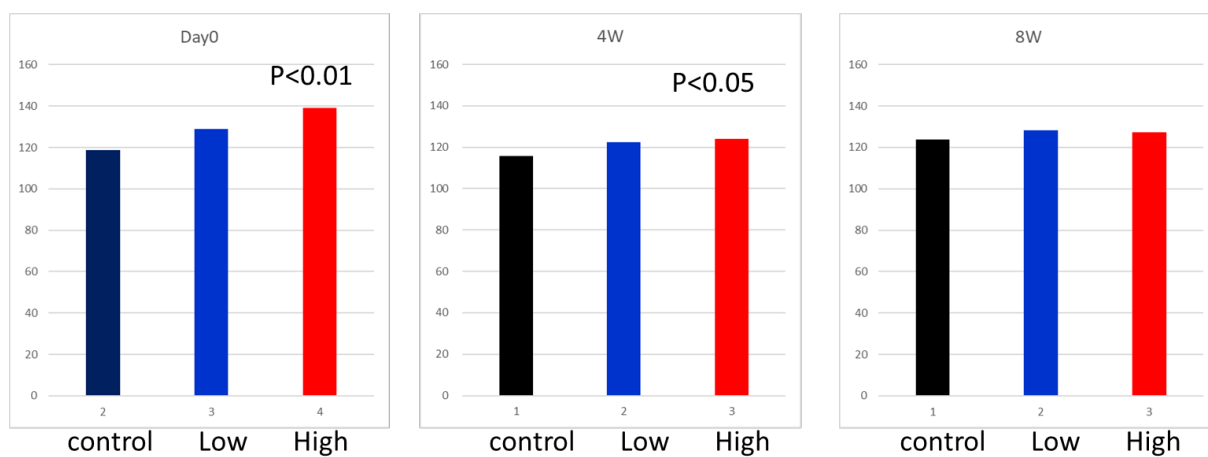


図 2 肺重量の変化

5 日間ばく露終了直後の肺とばく露 4 週後の高濃度群で有意な増加がみられたが、8 週後では変化はみとめられなかった。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究

令和 6 年度 分担研究報告書

化学物質の呼吸器感作性試験法の開発

研究分担者 善本 隆之

東京医科大学 医学総合研究所 免疫制御研究部門 教授

研究要旨

本研究では、ヒト気管支上皮細胞株 BEAS-2B とヒト単球細胞株 CD14-ML 由来未成熟樹状細胞（DC）の scaffold を用いた 3 次元 DC 共培養系（DCsens）を構築し、DC での Th2 分化に重要な副刺激分子 OX40 Ligand（OX40L、別名 TNFSF4）の mRNA 発現増強を指標に、呼吸器感作性を評価する試験法の開発を目指し検討を行っている。昨年度までに、20 種類の代表的感作性化学物質を用いて、約 90%の予測性で呼吸器感作性の識別が可能であることを見出した。今年度は、さらに 5 種類の代表的非感作性化学物質を用いて検討したところ、期待する通り全て陰性であった。次に、他施設への技術移転性について検討したところ、細胞や培養器具、試薬、測定機などを全て独自に揃えて貰って行っても、8 つの代表的感作性化学物質の中で、皮膚感作性化学物質 1 つだけが偽陽性となり、それ以外は全て正しく判定され、再現性の高い結果が得られた。

A. 研究目的

皮膚感作性試験法は、すでに複数の動物実験代替法が OECD のテストガイドライン化されているが、より重篤な副作用を誘発する呼吸器感作性を評価する試験法は、未だに確立されていない。我々は、昨年度までに、ヒト気管支上皮細胞株 BEAS-2B とヒト単球細胞株 CD14-ML 由来未成熟樹状細胞（DC）の多孔質のポリスチレン製 scaffold を用いた 3 次元 DC 共培養系（DCsens）を構築し、DC での Th2 分化に重要な副刺激分子 OX40 Ligand（OX40L、別名 TNFSF4）の mRNA 発現増強を指標に、呼吸器感作性を評価する in vitro 試験法の開発を目指し検討を行っている。昨年度までに、20 種類の代表的感作性化学物質を用いて、約 90%の予測性で呼吸器感作性の識別が可能であることを見出した。そこで、

今年度は、さらに 5 種類の代表的非感作性化学物質を用いた検討と、他の 1 施設への技術移転性と再現性について検討を行った。

B. 研究方法

まず、BEAS-2B と CD14-ML から IL-4 で分化誘導した未成熟 DC を用いて、別々の Alvetex® scaffold で 3 次元培養を 48 時間行い、その後、BEAS-2B の scaffold を上側に、未成熟 DC の scaffold を下側にして重ね、トランスウェルインサートの底に装着し、さらに培養した。24 時間後、培養上清を一度取り除き、上方から 10% DMSO+10% FBS/MEM で溶解した化学物質を 2 倍の範囲内で 4 段階希釈した濃度、または、0.8 倍希釈した 3 濃度を、それぞれ 5 μ L ずつ 5 箇所、合計 25 μ L を添加した。その後 20 分間

静置し、2.5 mL の medium を加えそのまま 37°C で培養した。6~8 時間培養後、DC の scaffold のみを回収し、RNA を抽出し、RT-qPCR でマーカー分子の mRNA 発現量を定量した。

他施設への技術移転性については、我々のプロトコルを渡し技術指導を行い、その他施設で独自に揃えた細胞や培養器具、試薬、測定機などを用いて、技術移転性と再現性について検討した。同時に、プロトコルの再検討や最適化も行った。

C. 研究結果

5 種類の非感作性物質 (図 1) を用いて、本共培養系で検討したところ、いずれも OX40L mRNA 発現増強値が、以前に算出したカットオフ値の 2.57 より低く、全て陰性であった (図 2A)。昨年度の結果の呼吸器感作性化学物質 9 種類とそれ以外の皮膚感作性化学物質 11 種類と今年度の非感作性化学物質 5 種類を合わせたグループで比較すると $P=0.0027$ となり、呼吸器と皮膚感作性化学物質の比較で得られた $P=0.0167$ に比べて、有意差が大きくなった (図 1B-E)。カットオフ値は、変わらず 2.57 であった。

皮膚感作性化学物質 3 種類と呼吸器感作性化学物質 5 種類 (図 1) を用いて、他の 1 施設への技術移転性と再現性の検証を行った。プロトコルとその方法の説明を行い、全ての必要な材料や機器はその施設で独自に用意して貰い行った。その結果、呼吸器感作性化学物質 5 種類は、いずれもカットオフ値 2.57 より大きく、陽性となり正しく判定された (図 3-8)。一方、皮膚感作性化学物質 3 種類については、DNCB が偽陽性となった (図 3, 7, 8) が、それ以外は、陰性と正しく判定された。OX40L 以外で Th2 反応に関与するサイトカイン Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) や IL-25、IL-

33 の受容体サブユニット分子 CRLF2 や IL-7R α 、IL-17RB、ST2 の発現を、同様に RT-qPCR で測定し比較したが、昨年度の結果と同様に皮膚と呼吸器感作性化学物質の間で大きな差は見られなかった (図 4-8)。現在さらに、化学物質の数を増やして検討中である。

D. 考察

今回の他施設への技術移転性の検討は、BEAS-2 や CD14-ML を独自に入手して貰い、試薬や測定機器も独自にいつも使用している物を使用して貰った。qPCR も我々は、Takara Bio 社の SYBR Green の qPCR 試薬とプライマー、PCR 装置を用い、他施設では、Thermo Fisher Scientific 社の TaqMan プローブの試薬とプライマー、PCR 装置を用いて行った。つまり、qPCR のやり方や検出方法、プライマー配列も異なるにも関わらず、同様な結果が得られたのは、再現性が高いこと示している。ただ、他施設の結果の方が、全体的に値が大きくなっており、今後、カットオフ値が異なってくる可能性はある。現在、さらにもう 1 施設への技術移転も既に進めている。今後、化学物質の数を増やし、施設内および施設間の再現性の検討を行いながら、最適なプロトコルの作成とカットオフ値の設定などを行い、OECD のテストガイドライン化を目指していく。

E. 結論

本 DC 共培養系 (DCsens) は、昨年度の皮膚と呼吸器感作性化学物質、合計 20 種類に加え、非感作性化学物質 5 種類を用いて、呼吸器感作性と非呼吸器感作性の識別がより精度良く可能であった。さらに、他施設への技術移転性と再現性も高いことが示された。今後、もう 1 施設への技術移転を行い、

合計 3 施設での施設内および施設間の再現性の検討を行い、最適なプロトコルを確立してゆく。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2 学会発表

1. Ashikaga T, Tanabe I, Yoshida K, Ishikawa S, Ishimori K, Mizoguchi I, Yoshimoto T. Development of an in vitro respiratory sensitization test based on a concept of a co-culture system between human bronchial epithelial cells and antigen presenting cells. LIVE (LUNG IN VITRO event) (2024.6.20-21)
2. 善本隆之、片平泰弘、長谷川英哲、溝口 出：呼吸器感作性評価法の開発、特別講演、第 31 回日本免疫毒性学会学術年会 (2024.9.19-20)
3. 溝口 出、片平泰弘、長谷川英哲、善本隆之：呼吸器と皮膚感作性物質の識別を目指した 2 ステップ DC/T 細胞共培養系の開発、第 31 回日本免疫毒性学会学術年会 (2024.9.19-20)
4. 溝口 出、片平泰弘、長谷川英哲、園田寿樹心、山岸美宇、堀尾江里、山口夏輝、井上慎也、宮川聡美、曲 寧、善本隆之：3 次元共培養系におけるヒト単球由来細胞株 CD14-ML 由来未成熟 DC での TNFSF4 (OX40L)発現を指標にした in vitro 呼吸器感作性試験法の開発、第 37 回日本動物実験代替法学会 (2024.11.29-12.1)
5. Aoshima H, Ishikawa S, Tanabe I, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Ashikaga T. Investigation of the Differential Biological Effects of Skin and Respiratory

Sensitizing Chemicals Using a Co-Culture System of Bronchial Epithelium and Dendritic Cells. 2025 SOT (The SOT 64th Annual Meeting) (2025.3.16-21)

6. Yoshimoto T, Katahira Y, Hasegawa H, Qu N, Yamaguchi N, Horio E, Ashikaga S, Mizoguchi I. Prediction of the Respiratory Sensitizing Potential of Chemicals Using DC Coculture and DC/T Cell Coculture Systems. 2025 SOT (The SOT 64th Annual Meeting) (2025.3.16-21)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許出願

発明の名称：被験物質の呼吸器感作性検出方法、感作抑制物質のスクリーニング方法、および生体投与用組成物の製造方法

発明者：善本隆之、溝口 出

出願人：学校法人 東京医科大学

出願日：2025 年 3 月 6 日

出願番号：特願 2025-035075

	非感作性化学物質	皮膚感作性化学物質	呼吸器感作性化学物質
1	4-Aminobenzoic acid (ABA)	1,4-Benzoquinone (BQ)	Chloramine T (ChT)
2	α -Isomethyl ionone (AIM)	4-Nitrobenzylbromide (NBB)	Trimellitic anhydride (TMA)
3	Benzyl benzoate (BB)	2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)	Hexahydro phthalic anhydride (HHPA)
4	n-Hexane (HX)	Oxazolone (OXA)	Hexamethylene diisocyanate (HDI)
5	Isopropanol (IP)	Formaldehyde (FA)	Ortho-phthalaldehyde (OPA)
6		2-Mercaptobenzothiazole (MBT)	Piperazine (Pip)
7		Isoeugenol (IEU)	Toluene diisocyanate (TDI)
8		Eugenol (EU)	Glutaraldehyde (GA)
9		Phenyl benzoate (PB)	Methyltetrahydrophthalic anhydride (MTHPA)
10		Ethylene glycol dimethacrylate (EGDM)	
11		Butyl glycidyl ether (BGE)	

図 1. 本研究で使用した代表的皮膚感作性化学物質 11 種類と呼吸器感作性化学物質 9 種類と非感作性化学物質 5 種類のリスト

青字の皮膚感作性化学物質 3 種類と赤字の呼吸器感作性化学物質 5 種類は、技術移転性の検討で使用。

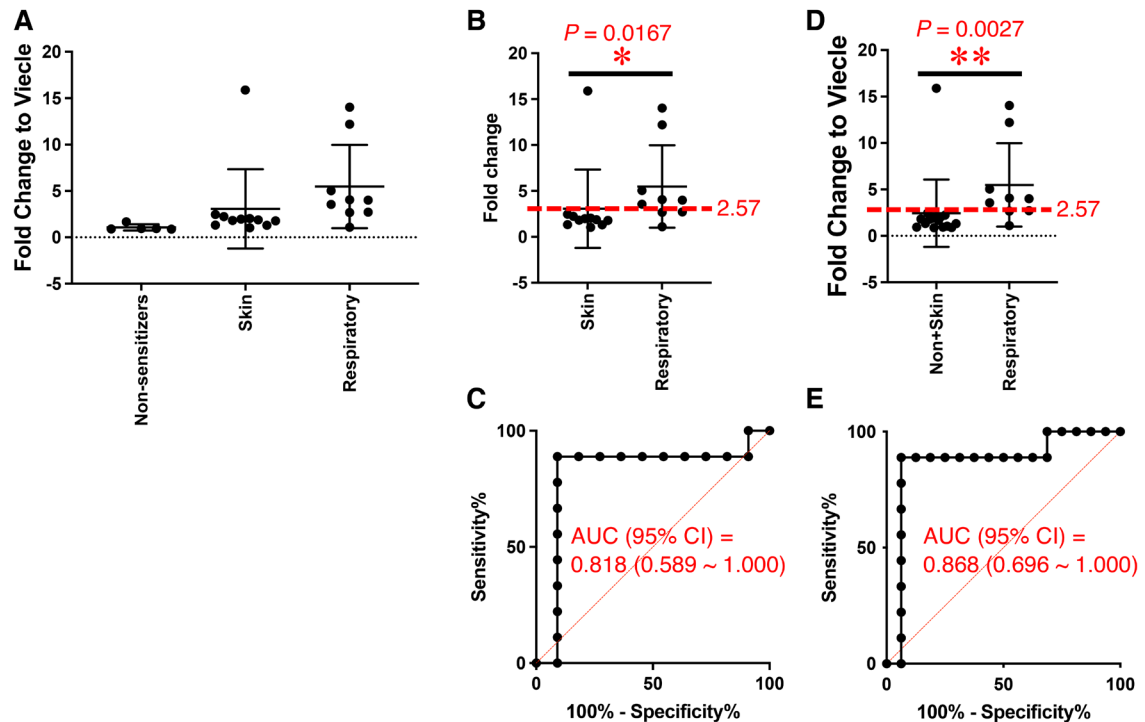


図 2. 代表的皮膚感作性化学物質 11 種類と呼吸器感作性化学物質 9 種類、非感作性化学物質 5 種類による OX40L 発現増強と ROC 曲線解析

3 者の OX40L mRNA 発現増強の比較 (A)、皮膚と呼吸器感作性 (B, C)、および、非呼吸器感作性 (非感作+皮膚) と呼吸器感作性 (D, E) の OX40L mRNA 発現増強の比較 (B, D) と ROC 曲線解析 C, E)。

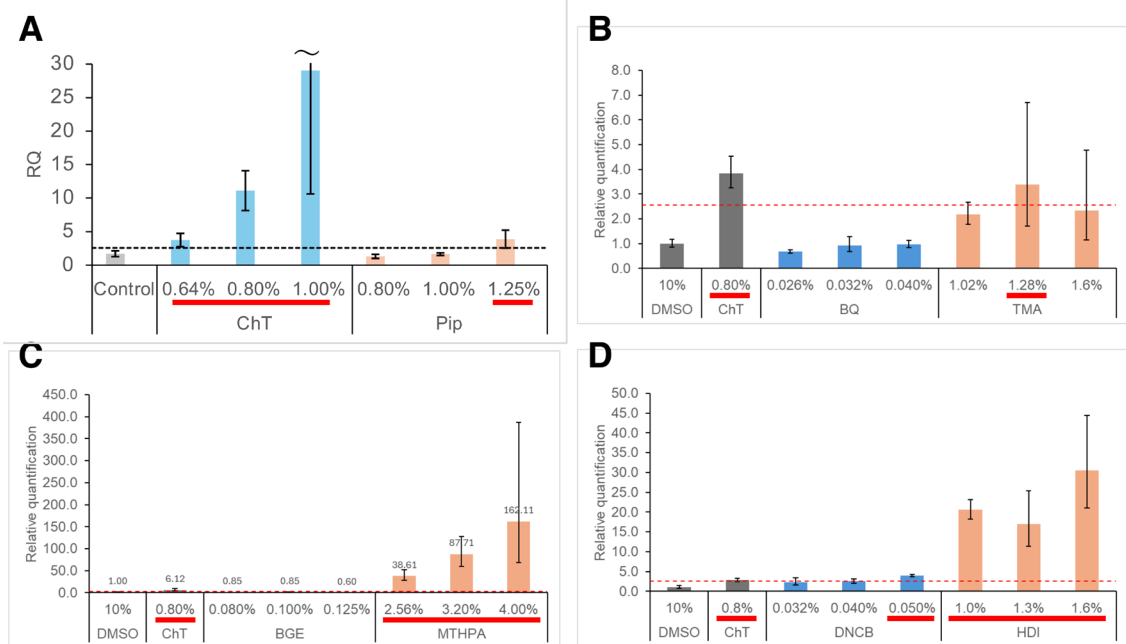


図 3. 代表的皮膚感作性化学物質 3 種類 (BQ, BGE, DNCB) と呼吸器感作性化学物質 5 種類 (ChT, Pip, TMA, MTHPA, HDI) による OX40L mRNA 発現増強
溶媒コントロール 10%DMSO を 1 にした相対的発現変動比。赤字下線は、OX40L 発現のカットオフ値 2.57 より大で、陽性判定。DNCB が、偽陽性と判定。

Results	Chemical dose(%)	CD80	Chemical dose(%)	CD86	Chemical dose(%)	TNFSF4 (OX40L)	TNFSF4 (Normalized by CD80)	TNFSF4 (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	CRLF2 (TSLPr)	CRLF2 (Normalized by CD80)	CRLF2 (Normalized by CD86)
ChT(max)	0.64	1.10	0.64	0.73	1.00	29.05	26.48	39.74	1.00	1.97	1.79	2.69
Pip(max)	0.80	1.37	0.80	1.02	1.25	3.88	2.83	3.80	1.25	1.54	1.13	1.51
ChT_0.64%	0.64	1.10	0.64	0.73	0.64	3.74	3.41	5.12	0.64	1.46	1.33	2.00
ChT_0.8%	0.80	0.86	0.80	0.60	0.80	11.12	12.91	18.63	0.80	1.47	1.71	2.47
ChT_1.0%	1.00	0.82	1.00	0.48	1.00	29.05	35.49	59.93	1.00	1.97	2.40	4.06
Pip_0.8%	0.80	1.37	0.80	1.02	0.80	1.30	0.95	1.28	0.80	1.48	1.08	1.44
Pip_1.0%	1.00	1.13	1.00	0.91	1.00	1.65	1.46	1.82	1.00	1.30	1.15	1.43
Pip_1.25%	1.25	1.20	1.25	0.91	1.25	3.88	3.23	4.28	1.25	1.54	1.29	1.70
						cut off :	2.57	1.92	2.15			
Results	Chemical dose(%)	IL7R	IL7R (Normalized by CD80)	IL7R (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	IL17RB	IL17RB (Normalized by CD80)	IL17RB (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	ST2 (IL1RL1)	ST2 (Normalized by CD80)	ST2 (Normalized by CD86)
ChT (max)	1.00	1.24	1.13	1.70	0.64	0.81	0.74	1.10	1.00	2.79	2.54	3.81
Pip (max)	1.25	1.57	1.15	1.54	0.80	1.00	0.73	0.97	1.00	6.14	4.48	6.01
ChT_0.64%	0.64	0.84	0.77	1.15	0.64	0.81	0.74	1.10	0.64	1.84	1.68	2.52
ChT_0.8%	0.80	0.99	1.15	1.66	0.80	0.74	0.86	1.24	0.80	2.27	2.64	3.81
ChT_1.0%	1.00	1.24	1.52	2.56	1.00	0.68	0.83	1.40	1.00	2.79	3.40	5.75
Pip_0.8%	0.80	1.48	1.08	1.45	0.80	1.00	0.73	0.97	0.80	3.34	2.44	3.27
Pip_1.0%	1.00	1.20	1.06	1.32	1.00	0.82	0.72	0.90	1.00	6.14	5.43	6.77
Pip_1.25%	1.25	1.57	1.31	1.73	1.25	0.88	0.73	0.97	1.25	5.71	4.75	6.29

図 4. 代表的呼吸器感作性化学物質 ChT と Pip による OX40L mRNA 発現増強
溶媒コントロール 10%DMSO を 1 にした相対的発現変動比。赤塗り枠は、OX40L 発現のカットオフ値 2.57 より大で、陽性判定。

Results	Chemical dose(%)	CD80	Chemical dose(%)	CD86	Chemical dose(%)	TNFSF4 (OX40L)	TNFSF4 (Normalized by CD80)	TNFSF4 (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	CRLF2 (TSLPr)	CRLF2 (Normalized by CD80)	CRLF2 (Normalized by CD86)
BQ(max)	0.026	1.30	0.026	1.03	0.04	0.97	0.75	0.95	0.026	1.51	1.17	1.48
TMA(max)	1.3	1.07	1.3	0.85	1.30	3.39	3.16	3.99	1.0	0.92	0.86	1.08
BQ_0.026%	0.026	1.30	0.026	1.03	0.026	0.68	0.52	0.66	0.026	1.51	1.17	1.48
BQ_0.032%	0.032	0.94	0.032	0.76	0.032	0.93	0.99	1.22	0.032	0.74	0.78	0.97
BQ_0.04%	0.040	1.01	0.040	0.81	0.040	0.97	0.97	1.20	0.040	1.01	1.01	1.25
TMA_1.0%	1.0	0.92	1.0	0.80	1.0	2.17	2.37	2.71	1.0	0.92	1.00	1.14
TMA_1.3%	1.3	1.07	1.3	0.85	1.3	3.39	3.16	3.99	1.3	0.65	0.61	0.77
TMA_1.6%	1.6	0.95	1.6	0.76	1.6	2.34	2.46	3.08	1.6	0.90	0.95	1.19
						cut off :	2.57	1.92	2.15			
Results	Chemical dose(%)	IL7R	IL7R (Normalized by CD80)	IL7R (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	IL17RB	IL17RB (Normalized by CD80)	IL17RB (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	ST2 (IL1RL1)	ST2 (Normalized by CD80)	ST2 (Normalized by CD86)
BQ(max)	0.026	0.69	0.53	0.68	0.026	1.33	1.02	1.29	0.04	1.41	1.08	1.37
TMA(max)	1.3	0.74	0.70	0.88	1.3	1.26	1.18	1.49	1.00	2.56	2.39	3.02
BQ_0.026%	0.026	0.69	0.53	0.68	0.026	1.33	1.02	1.29	0.026	1.33	1.03	1.30
BQ_0.032%	0.032	0.48	0.51	0.63	0.032	1.03	1.09	1.36	0.032	1.23	1.31	1.62
BQ_0.04%	0.040	0.41	0.41	0.50	0.040	1.09	1.08	1.34	0.040	1.41	1.39	1.73
TMA_1.0%	1.0	0.61	0.66	0.76	1.0	1.07	1.17	1.34	1.0	2.56	2.79	3.19
TMA_1.3%	1.3	0.74	0.70	0.88	1.3	1.26	1.18	1.49	1.3	1.35	1.26	1.60
TMA_1.6%	1.6	0.68	0.71	0.89	1.6	0.94	0.99	1.24	1.6	2.18	2.30	2.87

図 5. 代表的皮膚感作性化学物質 BQ と呼吸器感作性化学物質 TMA による OX40L mRNA 発現増強

溶媒コントロール 10%DMSO を 1 にした相対的発現変動比。赤塗り枠は、OX40L 発現のカットオフ値 2.57 より大で、陽性判定。

Results	Chemical dose(%)	CD80	Chemical dose(%)	CD86	Chemical dose(%)	TNFSF4 (OX40L)	TNFSF4 (Normalized by CD80)	TNFSF4 (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	CRLF2 (TSLPr)	CRLF2 (Normalized by CD80)	CRLF2 (Normalized by CD86)
BGE(max)	0.125	1.28	0.125	1.13	0.08	0.85	0.67	0.75	0.125	1.49	1.17	1.32
MTHPA(max)	3.2	1.19	3.2	0.89	4.00	162.11	136.56	182.45	ND	ND	ND	ND
BGE_0.08%	0.080	0.68	0.080	0.71	0.080	0.85	1.24	1.21	0.080	ND	ND	ND
BGE_0.10%	0.100	0.54	0.100	0.64	0.100	0.85	1.57	1.32	0.100	ND	ND	ND
BGE_0.125%	0.125	1.28	0.125	1.13	0.125	0.60	0.47	0.53	0.125	1.49	1.17	1.32
MTHPA_2.56%	2.56	0.33	2.56	0.22	2.56	38.61	116.97	174.81	2.56	ND	ND	ND
MTHPA_3.20%	3.20	1.19	3.20	0.89	3.20	87.71	73.89	98.72	3.20	ND	ND	ND
MTHPA_4.0%	4.00	0.16	4.00	0.10	4.00	162.11	1031.77	1564.03	4.00	ND	ND	ND
						cut off :	2.57	1.92	2.15			
Results	Chemical dose(%)	IL7Rα	IL7R (Normalized by CD80)	IL7R (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	IL17RB	IL17RB (Normalized by CD80)	IL17RB (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	ST2 (IL1RL1)	ST2 (Normalized by CD80)	ST2 (Normalized by CD86)
BGE(max)	0.080	0.95	0.74	0.84	0.125	1.04	0.82	0.92	0.10	1.08	0.85	0.95
MTHPA(max)	2.6	0.82	0.69	0.92	3.2	1.46	1.23	1.64	2.56	1.42	1.20	1.60
BGE_0.08%	0.080	0.95	1.39	1.35	0.080	0.94	1.37	1.33	0.080	0.60	0.88	0.85
BGE_0.10%	0.100	0.88	1.63	1.37	0.100	0.78	1.45	1.22	0.100	1.08	2.01	1.69
BGE_0.125%	0.125	0.92	0.72	0.81	0.125	1.04	0.82	0.92	0.125	1.04	0.81	0.92
MTHPA_2.56%	2.56	0.82	2.49	3.72	2.56	0.78	2.37	3.54	2.56	1.42	4.32	6.45
MTHPA_3.20%	3.20	0.43	0.36	0.49	3.20	1.46	1.23	1.64	3.20	0.47	0.39	0.52
MTHPA_4.0%	4.00	0.54	3.44	5.22	4.00	0.37	2.37	3.59	4.00	0.60	3.83	5.81

図 6. 代表的皮膚感作性化学物質 BGE と呼吸器感作性化学物質 MTHPA による OX40L mRNA 発現増強

溶媒コントロール 10%DMSO を 1 にした相対的発現変動比。赤塗り枠は、OX40L 発現のカットオフ値 2.57 より大で、陽性判定。

Results	Chemical dose(%)	CD80	Chemical dose(%)	CD86	Chemical dose(%)	TNFSF4 (OX40L)	TNFSF4 (Normalized by CD80)	TNFSF4 (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	CRLF2 (TSLPr)	CRLF2 (Normalized by CD80)	CRLF2 (Normalized by CD86)
DNCB(max)	0.032	1.21	0.032	0.69	0.050	3.98	3.30	5.76	0.032	3.23	2.67	4.67
HDI(max)	1.6	1.96	1.3	1.11	1.6	30.56	15.61	27.46	1.6	3.30	1.68	2.96
DNCB_0.032%	0.032	1.21	0.032	0.69	0.032	2.34	1.94	3.39	0.032	3.23	2.67	4.67
DNCB_0.04%	0.040	1.01	0.040	0.67	0.040	2.57	2.55	3.86	0.040	2.47	2.45	3.70
DNCB_0.05%	0.050	1.08	0.050	0.68	0.050	3.98	3.67	5.85	0.050	2.66	2.46	3.92
HDI_1.0%	1.0	1.01	1.0	0.62	1.0	20.59	20.32	33.02	1.0	0.92	0.91	1.48
HDI_1.3%	1.3	1.51	1.3	1.11	1.3	17.02	11.26	15.30	1.3	2.28	1.51	2.05
HDI_1.6%	1.6	1.96	1.6	1.02	1.6	30.56	15.61	29.95	1.6	3.30	1.68	3.23
cut off :						2.57	1.92	2.15				
Results	Chemical dose(%)	IL7Rα	IL7R (Normalized by CD80)	IL7R (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	IL17RB	IL17RB (Normalized by CD80)	IL17RB (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	ST2 (IL1RL1)	ST2 (Normalized by CD80)	ST2 (Normalized by CD86)
DNCB(max)	0.032	1.16	0.96	1.68	0.040	0.95	0.79	1.37	0.050	15.23	12.62	22.04
HDI(max)	1.6	1.47	0.75	1.32	1.6	1.73	0.88	1.55	1.0	1.00	0.51	0.90
DNCB_0.032%	0.032	1.16	0.96	1.68	0.032	0.93	0.77	1.35	0.032	3.79	3.14	5.49
DNCB_0.04%	0.040	1.10	1.09	1.66	0.040	0.95	0.94	1.42	0.040	10.59	10.50	15.91
DNCB_0.05%	0.050	1.07	0.99	1.58	0.050	0.90	0.83	1.33	0.050	15.23	14.05	22.39
HDI_1.0%	1.0	0.96	0.95	1.54	1.0	0.84	0.82	1.34	1.0	1.00	0.99	1.61
HDI_1.3%	1.3	0.85	0.56	0.76	1.3	1.13	0.74	1.01	1.3	0.53	0.35	0.48
HDI_1.6%	1.6	1.47	0.75	1.44	1.6	1.73	0.88	1.69	1.6	0.58	0.29	0.57

図 7. 代表的皮膚感作性化学物質 DNCB と呼吸器感作性化学物質 HDI による OX40L mRNA 発現増強

溶媒コントロール 10%DMSO を 1 にした相対的発現変動比。赤塗り枠は、OX40L 発現のカットオフ値 2.57 より大で、陽性判定。DNCB が、偽陽性と判定。

Results	Chemical dose(%)	CD80	Chemical dose(%)	CD86	Chemical dose(%)	TNFSF4 (OX40L)	TNFSF4 (Normalized by CD80)	TNFSF4 (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	CRLF2 (TSLPr)	CRLF2 (Normalized by CD80)	CRLF2 (Normalized by CD86)
ChT	0.64	1.10	0.64	0.73	1.00	29.05	26.48	39.74	1.00	1.97	1.79	2.69
Pip	0.80	1.37	0.80	1.02	1.25	3.88	2.83	3.80	1.25	1.54	1.13	1.51
TMA	1.3	1.07	1.3	0.85	1.30	3.39	3.16	3.99	1.0	0.92	0.86	1.08
MTHPA	3.2	1.19	3.2	0.89	4.00	162.11	136.56	182.45	ND	ND	ND	ND
HDI	1.6	1.96	1.3	1.11	1.6	30.56	15.61	27.46	1.6	3.30	1.68	2.96
BQ	0.026	1.30	0.026	1.03	0.04	0.97	0.75	0.95	0.026	1.51	1.17	1.48
BGE	0.125	1.28	0.125	1.13	0.08	0.85	0.67	0.75	0.125	1.49	1.17	1.32
DNCB	0.032	1.21	0.032	0.69	0.050	3.98	3.30	5.76	0.032	3.23	2.67	4.67
cut off :						2.57	1.92	2.15				
Results	Chemical dose(%)	IL7R	IL7R (Normalized by CD80)	IL7R (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	IL17RB	IL17RB (Normalized by CD80)	IL17RB (Normalized by CD86)	Chemical dose(%)	ST2 (IL1RL1)	ST2 (Normalized by CD80)	ST2 (Normalized by CD86)
ChT	1.00	1.24	1.13	1.70	0.64	0.81	0.74	1.10	1.00	2.79	2.54	3.81
Pip	1.25	1.57	1.15	1.54	0.80	1.00	0.73	0.97	1.00	6.14	4.48	6.01
TMA	1.3	0.74	0.70	0.88	1.3	1.26	1.18	1.49	1.00	2.56	2.39	3.02
MTHPA	2.6	0.82	0.69	0.92	3.2	1.46	1.23	1.64	2.56	1.42	1.20	1.60
HDI	1.6	1.47	0.75	1.32	1.6	1.73	0.88	1.55	1.0	1.00	0.51	0.90
BQ	0.026	0.69	0.53	0.68	0.026	1.33	1.02	1.29	0.04	1.41	1.08	1.37
BGE	0.080	0.95	0.74	0.84	0.125	1.04	0.82	0.92	0.10	1.08	0.85	0.95
DNCB	0.032	1.16	0.96	1.68	0.040	0.95	0.79	1.37	0.050	15.23	12.62	22.04

図 8. 代表的皮膚感作性化学物質 3 種類 (BQ, BGE, DNCB) と呼吸器感作性化学物質 5 種類 (ChT, Pip, TMA, MTHPA, HDI) による OX40L mRNA 発現増強

溶媒コントロール 10%DMSO を 1 にした相対的発現変動比。赤塗り枠は、OX40L 発現のカットオフ値 2.57 より大で、陽性判定。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究

令和6年度 分担研究報告書

肺胞マクロファージ細胞株を用いた微粒子応答の解析

研究分担者	石丸 直澄	東京科学大学大学院医歯学総合研究科・教授
研究協力者	牛尾 綾	東京科学大学大学院医歯学総合研究科
	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
	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6年度の本分担研究では、Taquann 処理した二酸化ケイ素（NM202）の全身吸入曝露による BALF 細胞中の肺胞マクロファージの動態をフローサイトメトリー解析、マクロファージ関連遺伝子の mRNA 発現の qRT-PCR による解析、病理学的解析を実施した。加えて、RAW264.7 細胞への NM202 添加による *in vitro* での解析を実施した。NM202 の全身吸入曝露後 4 週および 8 週での肺胞細胞の細胞数、M1/M2 マーカーに関して対象群と変化はなかった。肺の病理組織学的変化として、NM202 曝露によって肺胞腔の軽度の狭窄および肺胞マクロファージの集簇像が確認された。BALF 細胞における Marco mRNA の発現が曝露濃度に依存した上昇が観察された。一方、RAW264.7 細胞への LPS 刺激存在下、非刺激下の両方で NM202 を添加すると MARCO の表面発現の有意な増加が認められた。以上の結果から、NM202 の吸入曝露では肺組織での炎症の起点は弱く、多層カーボンナノチューブなどに比較して免疫毒性は低いものと考えられる。マクロファージの NM202 に対する反応性は MARCO 分子が関与している可能性が示された。

A. 研究目的

R6 年度の本研究では、二酸化ケイ素（NM202）の全身吸入曝露による肺免疫への影響について、BALF 細胞を用いて各種の解析を実施した。さらに、RAW264.7 細胞を用いて、NM202 に対する詳細な免疫学的解析を加えた。NM202 を用いた *in vivo* および

in vitro の実験により、ナノシリカの免疫毒性の検証と新たなバイオマーカーの探索を目指した。

B. 研究方法

Taquann 処理を施した NM202 を 0、15、30 mg/m³ の濃度で 1 日 6 時間 5 日間の暴

露を全身暴露装置を用いて実施した。本実験では雄 C57BL/6NCrSlc マウスを用いた（8週齢、各群 N=5）（図 1）。暴露後 4 週および 8 週目で屠殺解析を実施した。BALF 細胞、肺組織、頸部リンパ節、脾臓のサンプリングを行なった。

BALF 細胞、頸部リンパ節細胞、脾細胞を用いて、各種表面抗原に対する抗体を用いてフローサイトメータ (Cytotflex, Coulter) による解析を行なった。用いた抗体は、FITC、PE、PE-Cy7、APC または APC-Cy7 標識 CD4、CD8、CD11b、CD11c、F4/80、CD192、CD206、抗体 (BioLegend) である。

BALF 細胞から mRNA を抽出し、cDNA 合成後定量 RT-PCR により遺伝子発現を評価した。以下に定量 RT-PCR で用いたプライマー配列を示す。*Mmp12*; forward (f) 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse (r) 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3', *Marco*; (f) 5'-GAAGACTTCTTGCGGCAGCAC-3', (r) 5'-CTTCTTGCGCACTGGATCAT-3' *Il1b*; (f) 5'-ATGGCAACTGTTCTGAACTCAACT-3', (r) 5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTT-3', *Mcp1*; (f) 5'-CTGGATCGGGAACCAAATGAG-3', (r) 5'-TGAGGTGGTTGTGGAAAAGG-3', *Actb*; (f) 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', (r) 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。

マウス細胞株 RAW246.7 を用いて、無血清培地 (Gibco) による培養条件にて Taquann 処理を施したナノシリカ (NM202) に対する反応を検討した (図 1)。マクロファージの活性化も目的に Lipopolysaccharide (LPS; Sigma, 5 ng/mL) を用いた。細胞数、細胞径は自動測定装置 (Luna-II™) を使用した。また、細胞表面マーカーとして、CD192, CD54, CD86, MARCO, CD206, CD36, CD163, MHC class II に対する標識抗体を用いて、フロー

サイトメータにて解析を実施した。

(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東京科学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

NM202 の全身吸入暴露実験

対照群、低濃度 (15 mg/m³) 暴露群、高濃度 (30 mg/m³) 暴露群の 4 週後の BALF の変化として、暴露によって BALF 中の肺泡マクロファージ (F4/80⁺CD11c⁺) の割合ならびに細胞数は減少しているものの有意な差は認められなかった (図 2)。8 週後の肺泡マクロファージの変化でも、低濃度暴露群で割合、細胞数ともに増加していたが、有意な差ではなかった (図 2)。NM202 暴露による肺泡マクロファージの M1/M2 への分化パターンの変化をフローサイトメータで検討すると、低濃度および高濃度暴露によって対照群と比較して有意な変化は観察されなかった (図 3)。脾臓、頸部リンパ節における NM202 吸入暴露によるマクロファージ分画の変化は認められず (図 4、5)、M1/M2 への分化についても NM202 暴露による影響は確認できなかった (図 6、7)。一方で、脾臓、頸部リンパ節における T 細胞分画 (CD4/CD8) については、NM202 暴露による割合、細胞数に有意な変化は認められなかった (図 8、9)。さらに、脾臓、頸部リンパ節における T 細胞の活性化状態

(Effector/Naiive) を CD44 ならびに CD62L を指標にすると (Effector: CD44^{high}CD62L⁻, Naiive: CD44^{low}CD62L⁺)、脾臓において NM202 暴露後 6 週にて Naiive CD4⁺T 細胞の割合が有意に増加していることが判明した (図 10)。頸部リンパ節の CD4⁺T 細胞、脾臓および頸部リンパ節での CD8⁺T 細胞に関しては NM202 暴露によって変化は確認できなかった (図 11、12、13)。

NM202 吸入暴露マウスの一部の肺組織の組織学的検討を行うと、暴露後 4 週において胸膜側の一部に肺泡構造が不明瞭な部分が認められ、肺泡マクロファージの軽度の集簇像が確認された (図 14)。暴露後 8 週においても、さらに肺泡腔の不明瞭な領域が広がっており、腔内に肺泡マクロファージの集簇が確認された (図 15)。

NM202 暴露後 8 週での BALF 細胞を用いて、*Il1b*、*Mcp1*、*Mmp12*、*Marco* mRNA 発現を qRT-PCR にて定量化すると、*Il1b* mRNA はいずれの群も検出限界以下であった (図 16)。*Mcp1*、*Mmp12*、*Marco* mRNA ともに対照群に比較して有意な変化は見られなかったが、*Marco* mRNA に関しては濃度依存的に発現の上昇が認められた (図 16)。

RAW264.7 細胞への NM202 の暴露実験

マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用いて、*in vitro* での NM202 に対する反応性を検討した。LPS (5 ng/mL) の刺激の有無の条件で、NM202 (250 ng/mL) 添加した時の 48 時間の培養後の形態的变化を確認すると、LPS 刺激下での NM202 添加によって、細胞の大きさが増大することが明らかになった (図 17)。LPS 刺激によって M1 型のマクロファージに分化することが知られており、NM202 添加による各種マクロファージ表面マーカーの変

化をフローサイトメータにて検討した。検討した 8 種類のマクロファージマーカーのうち、MARCO に関して、LPS 非添加ならびに添加状態の両方で NM202 の暴露によって MARCO の表面発現が有意に上昇した (図 18)。また、IL-13 によって M2 型マクロファージに分化することが知られていることから、recombinant IL-13 (50 ng/mL) を添加した上で、NM202 を暴露によって、8 種のマクロファージマーカーの表面発現に変動は認められなかった (図 19)。

さらに、NM202 の濃度変化による MARCO の表面発現の変動を確認すると、2,000 ng/mL まで MARCO の発現が上昇していた (図 20)。加えて、LPS 添加時においても 2,000 ng/mL まで MARCO の発現が上昇していた (図 20)。

NM202 の暴露による Marco mRNA 発現を含め、マクロファージ関連遺伝子 mRNA 発現 (*Il1b*、*Mcp1*、*Mmp12*、*Marco*) を q-RT-PCR にて検討すると、いずれの遺伝子も LPS 刺激で発現が上昇し、NM202 (500 ng/mL) の暴露でいずれの遺伝子発現も上昇傾向にあるが、*Marco* mRNA に関しては 15 倍以上の増加が見られた (図 21)。

D. 考察

NM202 の全身吸入暴露後 4 週および 8 週での BALF 細胞中の肺泡マクロファージに関して、細胞数、表現型ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。頸部リンパ節、脾臓においてもマクロファージ分画に NM202 暴露による変化は観察されなかった。脾臓において、NM202 暴露によって、CD4⁺T 細胞の Naiive 型へシフトが観察されたが、ナノシリカの免疫系への影響は不明な点が多く、何らかの T 細胞活性化機構に影響を及ぼしていた可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

病理組織学的な変化に関しては、各群一部の組織の解析で NM202 暴露で肺胞マクロファージの軽度の集簇領域が確認され、フローサイトメータの結果と乖離が見られる。暴露後 4 週、8 週での採取可能な BALF 中での肺胞マクロファージの動態と実際の組織中での肺胞マクロファージの変化に乖離がある可能性が考えられた。

MWCNT の全身吸入暴露で見られた BALF 細胞数の変化、M1 型への肺胞マクロファージ分画の変化や組織学的な変化とは異なり、NM202 暴露による変化は軽度である可能性があり、ナノマテリアルの形状、性状によって肺胞マクロファージの反応は大きく異なっているものと考えられる。MWCNT の暴露では肺胞マクロファージから産生される MMP12 が重要な役割を果たしていたが、NM202 暴露での BALF 細胞の *Mmp12* mRNA 発現に変化は認められなかった。以前から、ナノシリカを含めナノマテリアルの取り込みに関係している Scavenger receptor の一つである MARCO (*Front Immunol* 9:103, 2018) の mRNA 発現が濃度依存的に増加していたことから、MARCO 分子を介したナノシリカに対するマクロファージの反応が存在しているものと考えられる。

RAW264.7 細胞を用いた実験では、細胞の大きさの変化で判断すると、NM202 を添加しただけでは RAW264.7 細胞による貪食作用は明らかではなく、LPS の刺激によって貪食作用が亢進したものと考えられる。今回の培養系では、出来るだけ直接の NM202 の反応を観察するために、無血清培地を用いた。既報では M2 型マクロファージがナノシリカの貪食作用が亢進することが知られていたが (*Front Pharmacol* 6:55, 2015)、今回の実験系では LPS の刺激で M1 型に誘導した場合に、MARCO の発現に変

化が認められ、IL-13 による M2 型誘導マクロファージでは NM202 暴露による各種マーカーの発現に変化は認められなかった。LPS は TLR4 シグナルの活性化に重要であることから、マクロファージのナノシリカに対する反応性には TLR と Scavenger receptor の相互作用が重要である可能性が示された。

RAW264.7 細胞の Marco mRNA 発現に関しては、LPS 刺激細胞に 500 ng/mL の NM202 を添加すると 35 倍程度の Marco mRNA 発現が上昇したが、2,000 ng/mL ではそれ以上の発現上昇はなかったことから、より低濃度の反応性を再検討する必要がある。また、培養時間、LPS 以外の mitogen 刺激に関しても今後の検討課題である。

E. 結論

In vivo および *in vitro* での NM202 を用いた実験から、ナノシリカの肺における免疫毒性の評価に MARCO 分子を介した反応性の解析が重要である可能性が示された。

形状および性状の異なるナノマテリアルの免疫毒性の評価にはマクロファージを中心とした免疫病理的な手法が有効であることが示された。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Tsunematsu T, Mouri Y, Shao W, Arakaki R, Ruppert JG, Murano K, Ishimaru N, Guardavaccaro D, Pagano M, Kudo Y. Sustained chromosomal passenger complex activity preserves the pluripotency of human embryonic carcinoma cells. *Sci Signal*. 2024; 18:eadg4626. doi: 10.1126/scisignal.adg4626.

2. Ushio A, Ishimaru N. Molecular Pathogenesis via Sex Hormone in Sjögren's Syndrome. *J Stomatol Soc Jpn.* 92(1):1-6, 2025 doi.org/10.5357/koubyou.92.1_1
 3. Shikama Y, Otsuka K, Furukawa M, Ishimaru N, Matsushita K. Involvement of metformin and aging in salivary expression of ACE2 and TMPRSS2. *BioFactor* 51:e2154, 2024 doi:10.1002/biof.2154.
 4. Ushio A, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N. Therapeutic Strategy Based on the Pathogenesis for Sjögren's Syndrome. *J Oral Health Biosci.* 37(1):1-5, 2024 doi.org/10.20738/johb.37.1_1
 5. Nakamura K, Tsukasaki M, Tsunematsu T, Yan M, Ando Y, Huynh NCN, Hashimoto K, Gou Q, Muro R, Itabashi A, Iguchi T, Okamoto K, Nakamura T, Nakano K, Okamura T, Ueno T, Ito K, Ishimaru N, Hoshi K, Takayanagi H. The periosteum provides a stromal defence against cancer invasion into the bone. *Nature* 1634(8033):474-481, 2024. doi: 10.1038/s41586-024-07822-1.
 6. Kobayashi D, Denda M, Hayashi J, Hidaka K, Hohmura Y, Tsunematsu T, Nishino K, Yoshikawa H, Ohkawachi K, Nigorikawa K, Yoshimura T, Ishimaru N, Nomura W, Katagiri T, Kosako H, Otaka A. Sulfoxide-Mediated Cys-Trp-Selective Bioconjugation that Enables Protein Labeling and Peptide Heterodimerization. *Chem Eur.* e202400014, 2024 doi.org/10.1002/ceur.202400014
 7. Yamada A, Watanabe A, Nara A, Ishimaru N, Maeda K, Ido Y, Kotake K, Asano M, Shinohara Y, Yamamoto T. Longitudinal Analysis of Mitochondrial Function in a Choline-Deficient L-Amino Acid-Defined High-Fat Diet-Induced Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis Mouse Model. *Int J Mol Sci.* 25:6193, 2024 doi: 10.3390/ijms25116193.
 8. Aota K, Kani K, Ono S, Naniwa K, Momota Y, Fukui M, Ishimaru N, Azuma M. Activation of Janus kinase 2 contributes to the autoimmune pathology in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Oral Sci Int.* 21:415-424, 2024 doi.org/10.1002/osi2.1241
 9. Ushio A, Matsuda-Lennikov M, Kalle-Youngoue F, Shimizu A, Abdelmaksoud A, Kelly MC, Ishimaru N, Takahama Y. Functionally diverse thymic medullary epithelial cells interplay to direct central tolerance. *Cell Rep.* 43:114072, 2024 doi: 10.1016/j.celrep.2024.114072.
 10. 大塚邦紘, 石丸直澄 : Sjögren 症候群の病理 皮膚病診療 46(9):788-79, 2024 doi.org/10.24733/pd.0000003905
- F.2 学会発表
1. Matsuzawa S, Ushio A, Nagao R, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N. A crucial role of autophagy in neonatal thymus in autoimmunity. 第 53 回日本免疫学会総会学集会 (2024.12.3)
 2. Nagao R, Yamamoto A, Ushio A, Otsuka K, Matsuzawa S, Tsunematsu T, Ishimaru N. Analysis of regulatory mechanism for T cell activation via Trat1 in Sjögren's syndrome.

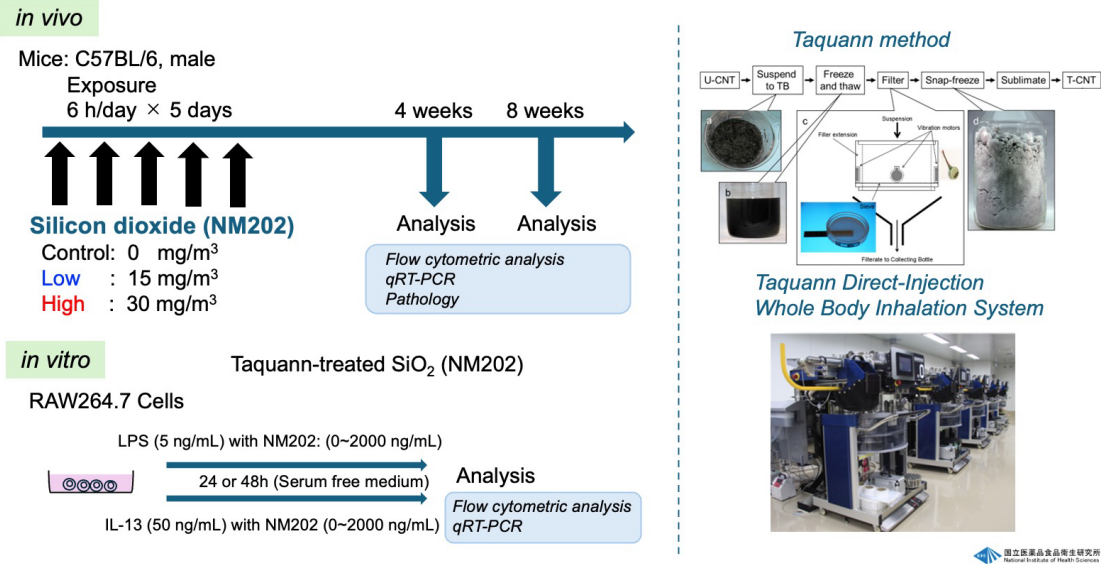
第 53 回日本免疫学会総会学集会
(2024.12.5)

3. Otsuka K, Kondo H, Tsukumo S, Ishimaru N,
Yasutomo K. Salivary gland fibroblasts drive
autoimmune pathology via the interaction
with CD4⁺ T cells in Sjögren's syndrome. 第
53 回日本免疫学会総会学集会 (2024.12.5)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

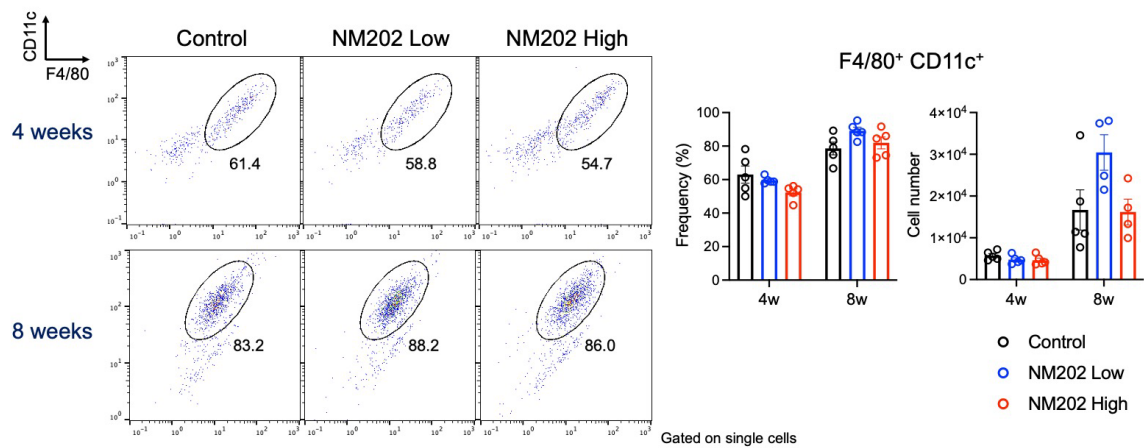
1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

☒ 1 Influence of exposure to silica nanoparticles on pulmonary immune response



☒ 2

Effect of inhalation exposure to NM202 on alveolar macrophages



Number of alveolar macrophages was not altered during 4 to 8 weeks after exposure to NM202.

图 3

M1/M2 macrophage polarization in BALF cells by inhalation exposure to NM202

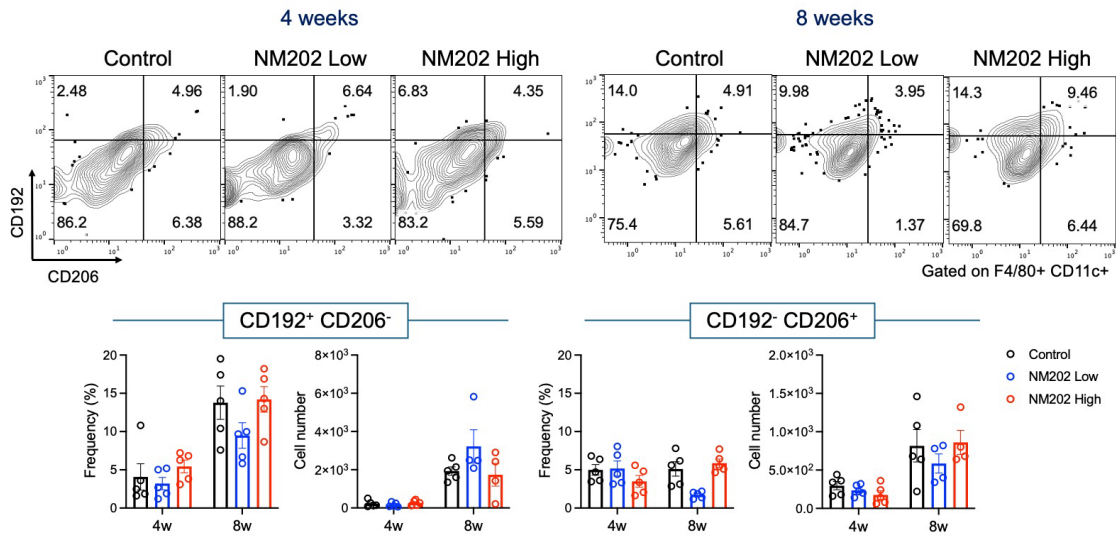


图 4

Effect of NM202 exposure for macrophages in the spleen

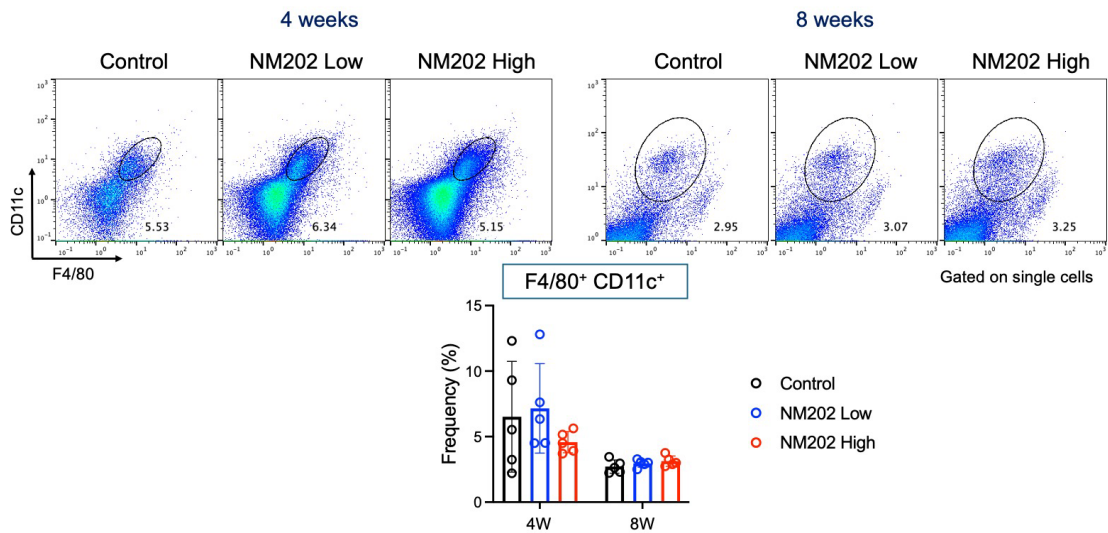


图 5

Effect of NM202 inhalation for macrophages in cLN

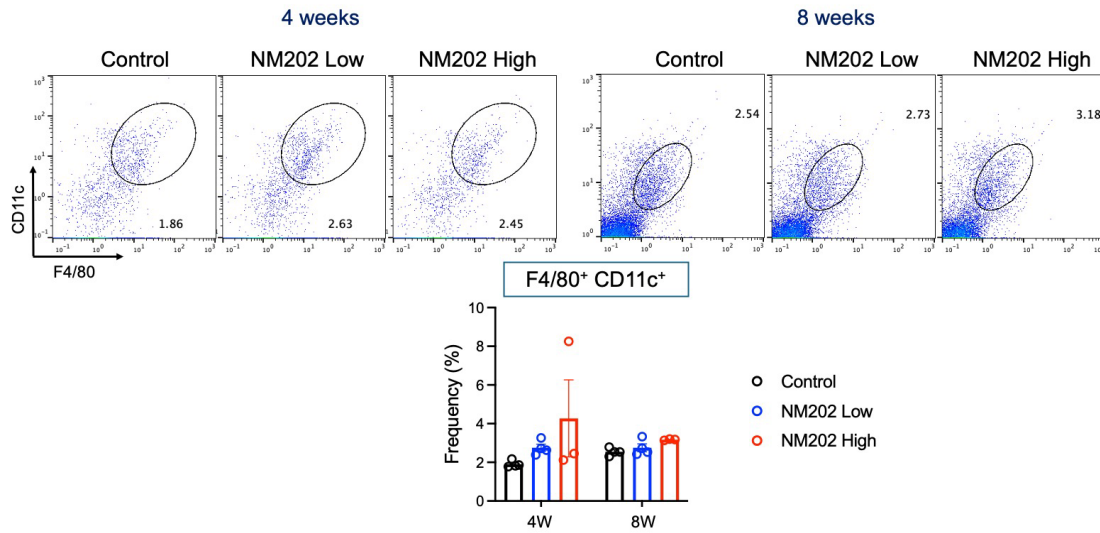
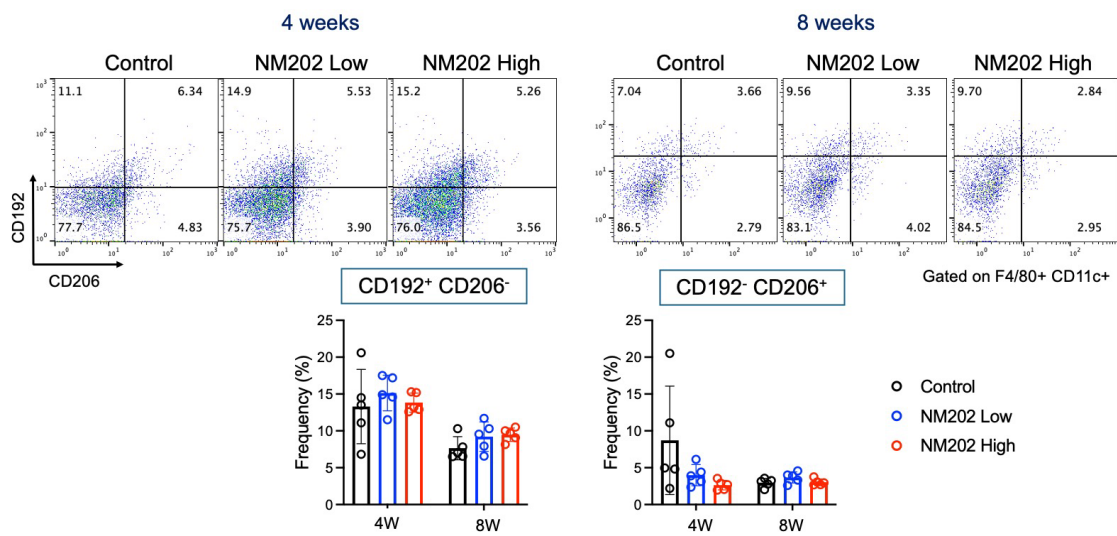


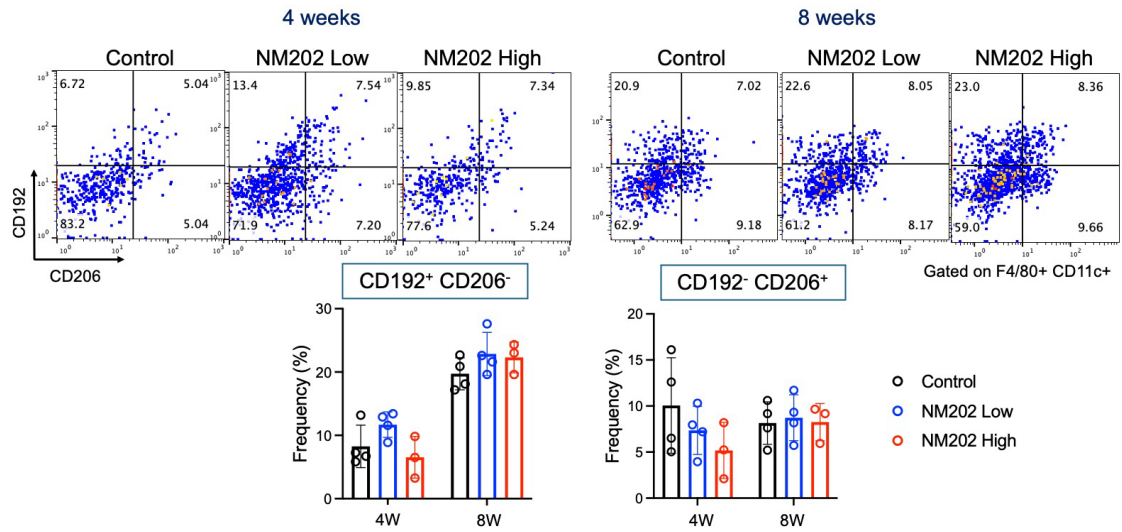
图 6

M1/M2 macrophage polarization by NM202 exposure in the spleen



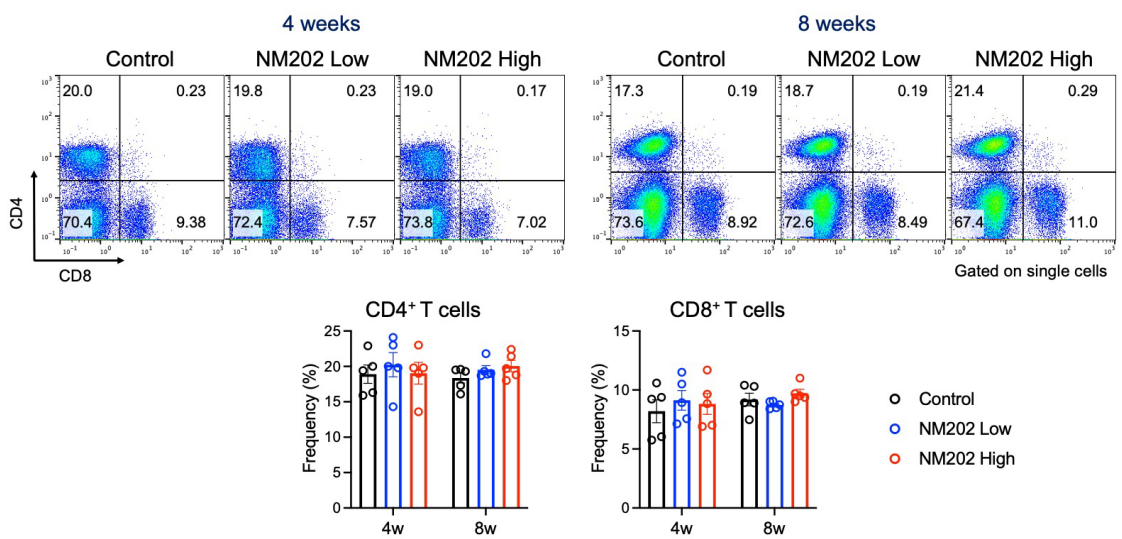
7

M1/M2 macrophage polarization by NM202 exposure in cLN



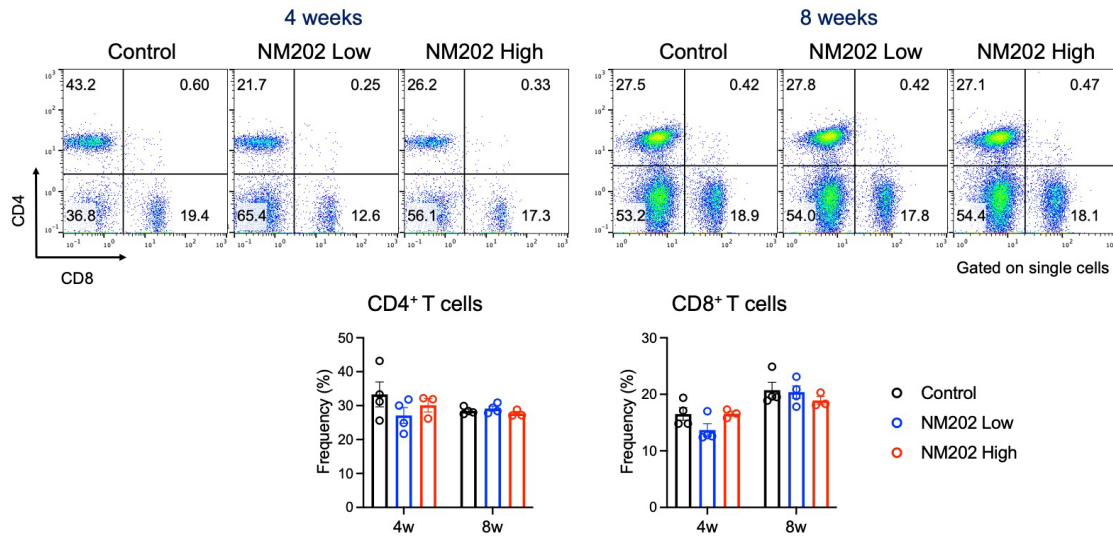
8

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the spleen



9

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the cLN



10

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the spleen

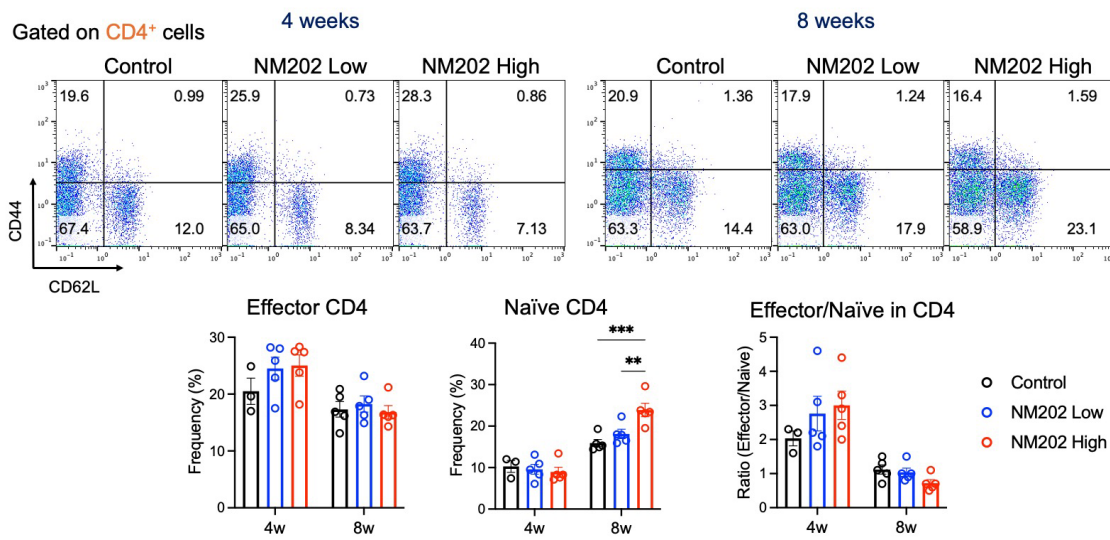


Figure 11

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the cLN

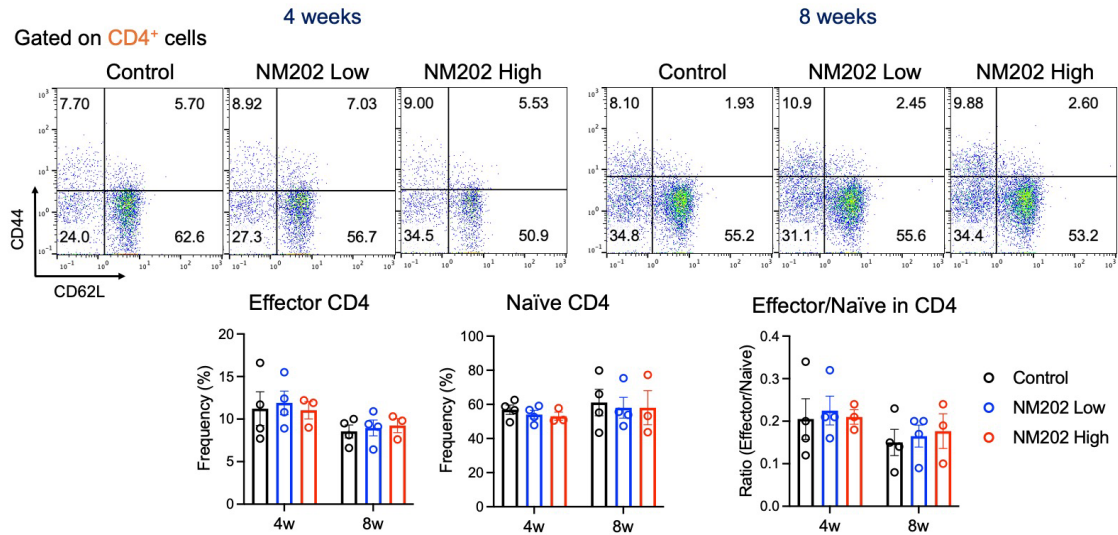
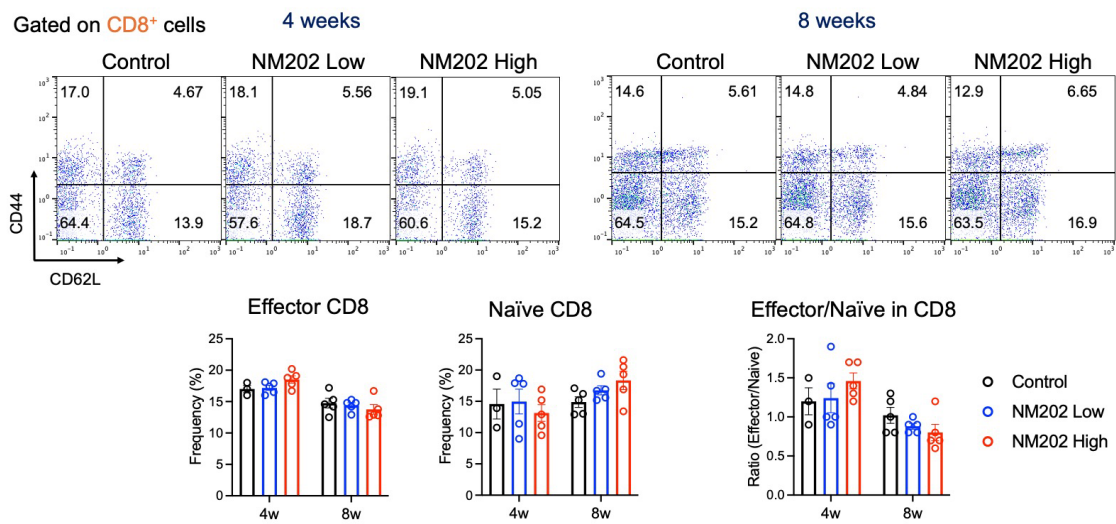


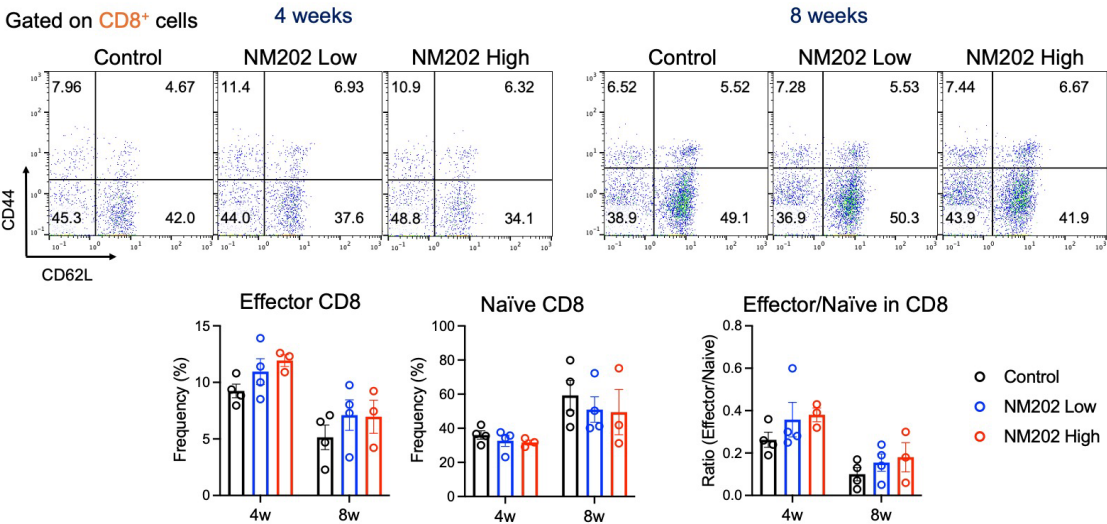
Figure 12

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the spleen



13

Effect of NM202 exposure on T cell subsets in the cLN



14

Pathological change of the lung tissues by inhalation exposure to NM202

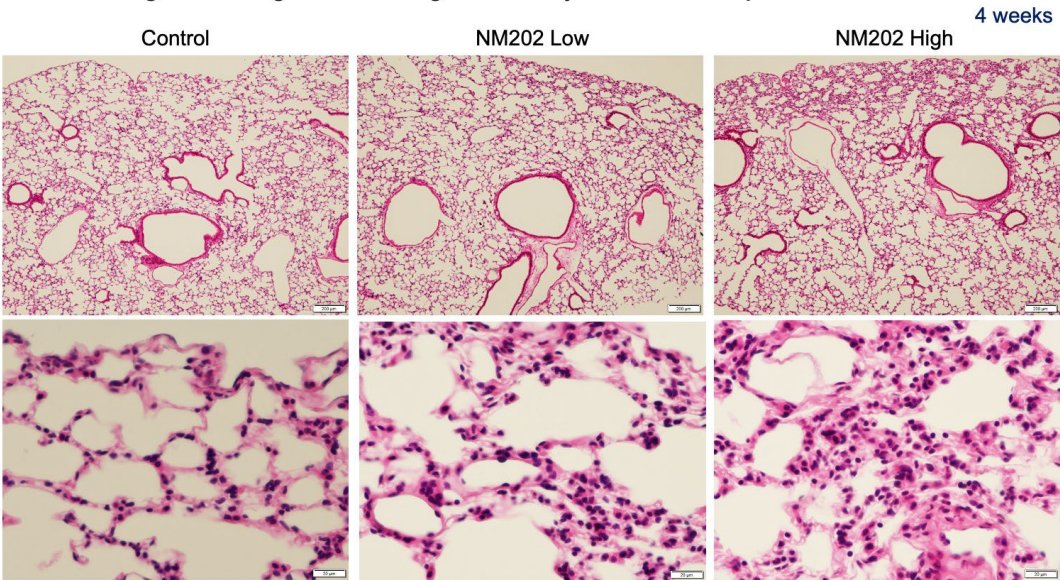


Figure 15 Pathological change of the lung tissues by inhalation exposure to NM202

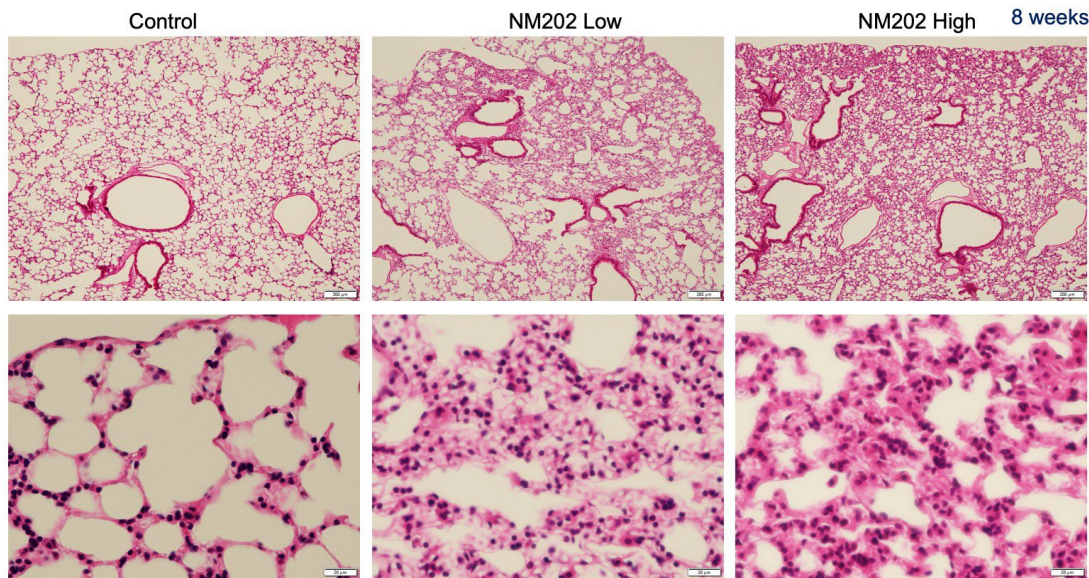
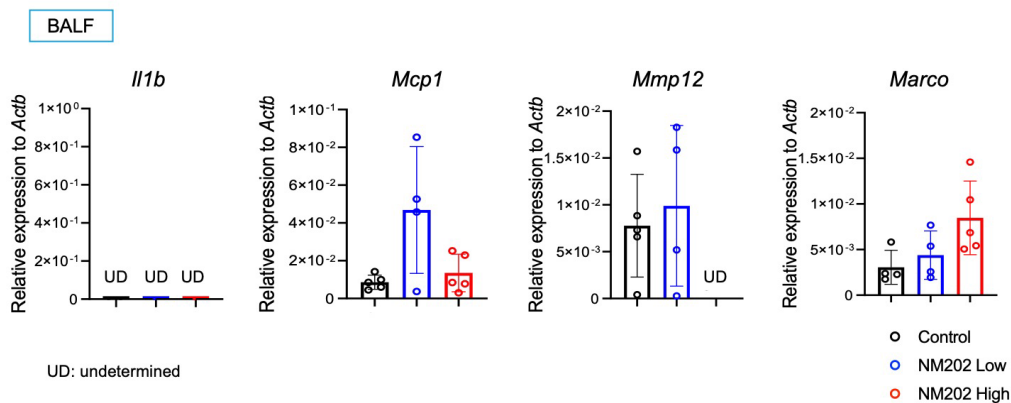
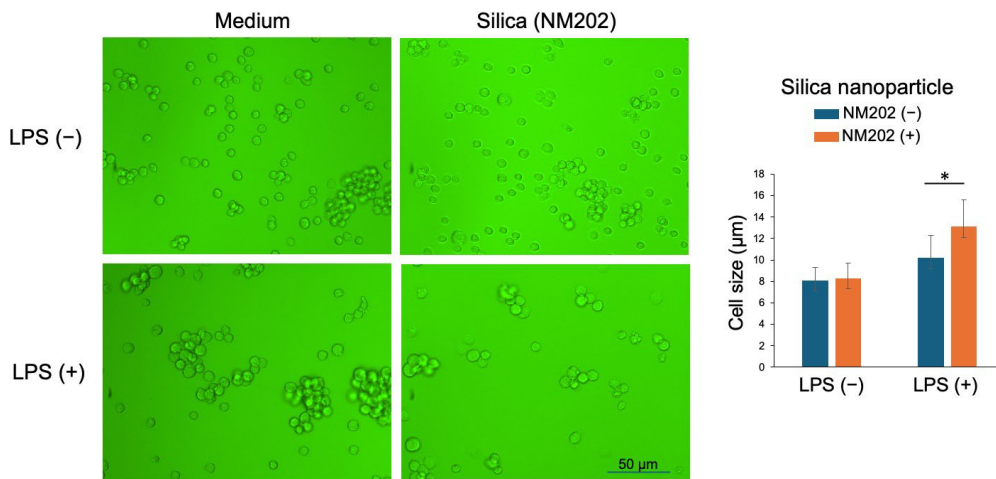


Figure 16 *Marco* mRNA expression of the BALF cells from the NM202-exposed mice



Macro mRNA expression was dose-dependently increased at 8 weeks after the exposure to NM202.

17 Morphological change of RAW-264.7 cells exposed to silica (NM202)



Size of LPS-stimulated RAW-264.7 cells was increased by exposure to NM202.

18 Effect of exposure to NM202 on Surface Molecules of M1 Type-polarized macrophages

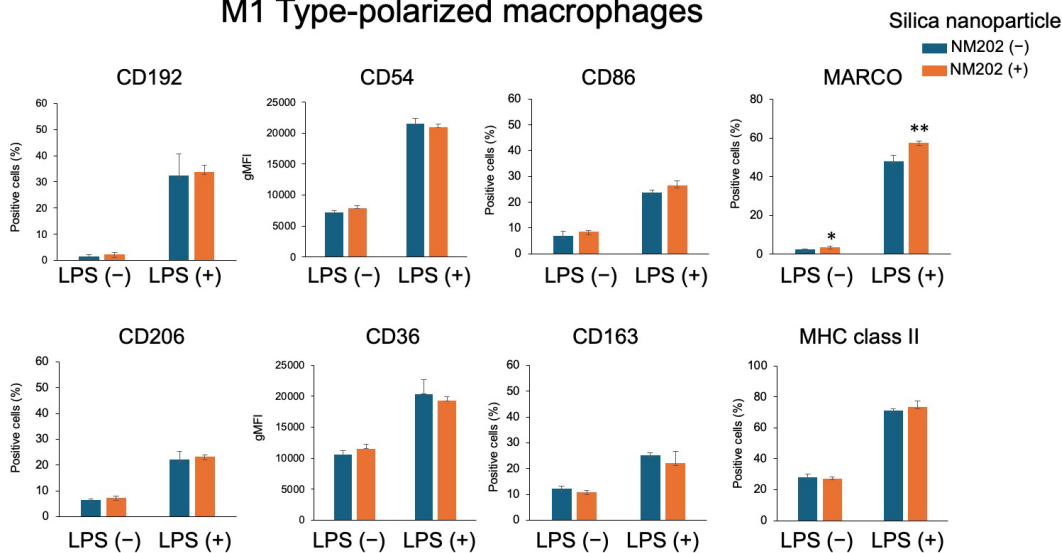


Figure 19 Effect of exposure to NM202 on surface molecules of M2 Type-polarized macrophages

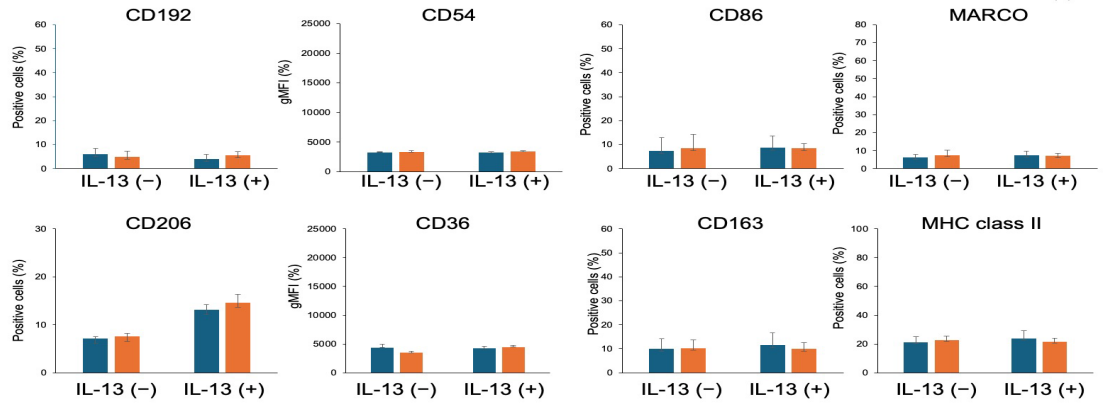


Figure 20 MARCO Expression on RAW-264.7 Cells by Exposure to Silica Nanoparticles

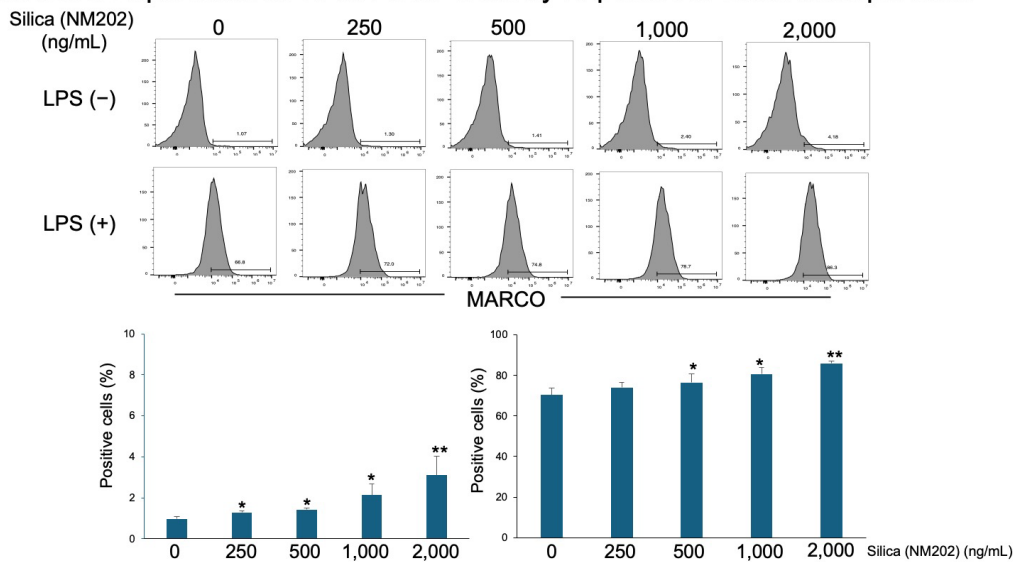
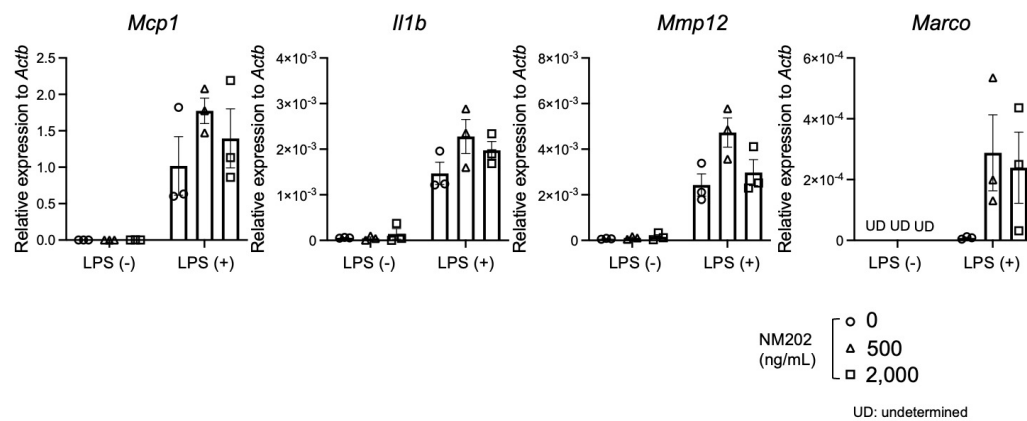


图21

Macrophage-related mRNA expression change by NM202 exposure in LPS-stimulated RAW264.7 cells



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究

令和6年度 分担研究報告書

In vitro評価系に関する研究
—ナノマテリアルのin vitro抗原提示細胞活性化試験法の開発に関する研究—
研究分担者 飯島一智
横浜国立大学大学院工学研究院

研究要旨

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

A. 研究目的

ナノマテリアル（NM）の吸入曝露による健康影響に対する懸念が高まっている。従来の in vivo 吸入曝露試験のみでは NM の毒性評価は十分ではなく、さらに NM は粒子径や結晶多形、表面状態などバリエーションが豊かであり、特性も大きく異なることが知られている。このような背景より、NM の毒性発現機序に基づいたハイスループットな in vitro 試験法の開発が強く求められている。

我々はこれまでに種々の NM が THP-1 細胞の主に CD54 発現を顕著に亢進し、その

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

本研究では、THP-1 細胞の活性化を指標とした NM の免疫毒性評価について、シリカナノ粒子と酸化亜鉛ナノ粒子を用いて、THP-細胞と気管支上皮モデルとの共培養系における条件最適化と機序解析を行い、短期吸入曝露された NM の免疫毒性評価手

法の開発と将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的データの収集を進めた。

B. 研究方法

B.1. 各種 NM 分散液の調製と評価

シリカナノ粒子は Sicastar-red F (micromod), NM-201, NM-202 (以上 JRC) を用いた。分散液として市販されている Sicastar-red F は培養液を用いて所定濃度に希釈した。NM-201, NM-202 は 5 mg/mL の濃度になるように培養液に懸濁し、プローブ型超音波装置を用いて水中で 40 W, 5 分の条件で 1 回処理した。酸化亜鉛ナノ粒子は MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP、MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出が抑制された MZN-B0HP (以上テイカ) を用いた。1 mg/mL の濃度になるように酸化亜鉛ナノ粒子を超純水に懸濁し、プローブ型超音波装置を用いて水中で 40 W, 5 分の条件で 2 回処理した。MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出を抑制した MZN-B0HP については超純水 (1000 µg/mL) での流体力学的直径およびζ-potential を ELS-Z2 (大塚電子) により測定した。

B.2. NM の抗原提示細胞活性化能の評価

2.0×10^6 cells/mL ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞懸濁液 500 µL を分注した 24 ウェルプレート各ウェルへ各 NM 分散液または対照物質の溶液 500 µL を添加し、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で 24 時間培養した。細胞を洗浄後、フローサイトメーター (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer) を用いて THP-1 細胞の CD86 および CD54 発現量を培養液処理群 (control) に対する相対蛍光強度 (RFI) として定量するとともに、ヨウ化プロピジウム PI 染色より細胞生存率を求めた。

B.3. イオン吸着シリカナノ粒子の調製と

の抗原提示細胞活性化能の評価

シリカナノ粒子 Sicastar-red F を所定濃度の硝酸亜鉛水溶液および塩化カルシウム水溶液にて 24 時間処理した後、超純水にて 3 回洗浄した。処理済み Sicastar-red F を再分散させ、B.2. の手法により THP-1 細胞の活性化能を評価した。Sicastar-red F への各イオンの吸着量は、処理後の溶液および洗液のイオン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES, ICPE-9000, 島津製作所) により測定し、算出した。

B.4. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系の構築と NM の抗原提示細胞活性化能の評価

市販ヒト初代気管支上皮細胞を市販の分化誘導培地を用いてセルカルチャーインサート内で気-液界面培養を行い、気管支上皮モデルを構築した。気管支上皮モデルは、光学顕微鏡による繊毛運動の観察および経上皮電気抵抗 (TEER) 測定により評価した。THP-1 細胞懸濁液を分注した 24 ウェルプレートの各ウェルに、気管支上皮モデルを設置し、セルカルチャーインサート上部または下部より被検物質を添加し、所定時間培養した。

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

C. 研究結果

C.1. 各種 NM 分散液の評価

MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出を抑

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

C.2. イオン吸着シリカナノ粒子の調製と抗原提示細胞活性化能の評価

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

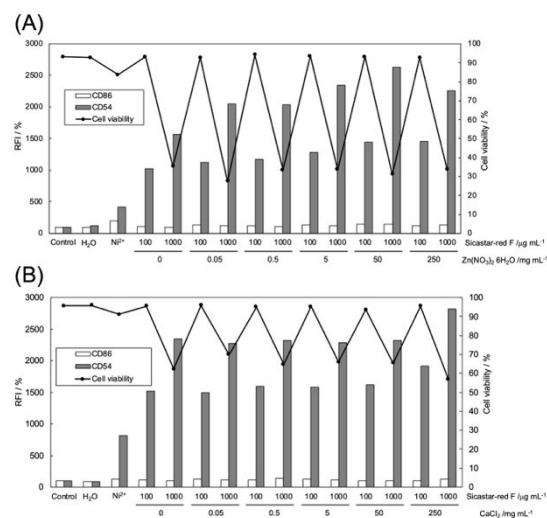


図 C.1. イオン吸着シリカナノ粒子による THP-1 細胞の活性化. (A) 亜鉛イオン, (B) カルシウムイオン

C.3. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

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

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

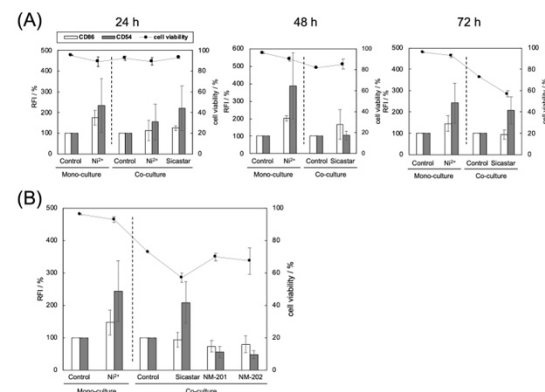


図 C.2. 気管支上皮モデル-THP-1 細胞共培養系を用いたシリカナノ粒子の評価. (A) 曝露時間の検討, (B) シリカナノ粒子間の比較.

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

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

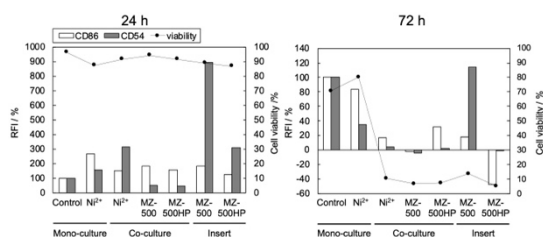


図 C.3. 気管支上皮モデル-THP-1 細胞共培養系を用いた酸化亜鉛ナノ粒子の評価。

D. 考察

D.2.2. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

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

ンの乖離挙動の評価を進める。

D.2.3. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

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

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

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

E. 結論

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

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

F. 研究発表

F.1. 論文発表

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

F.2 学会発表

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

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

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

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究

令和6年度 分担研究報告書

肺胞マクロファージ細胞株を用いた微粒子応答の解析

研究分担者 黒田悦史

兵庫医科大学 医学部 免疫学講座 主任教授

研究要旨

吸入性微粒子に応答する肺胞マクロファージに注目し、微粒子応答のメカニズム解析とヒトの肺胞マクロファージ細胞株作製を試みた。細胞株作製についてはヒト肺胞マクロファージへの不死化遺伝子の導入により不死化には成功したが良好な増殖スピードを有した細胞株は得られなかった。また微粒子に応答する肺胞マクロファージの解析により、微粒子に応答し炎症性サイトカインである IL-1 α を放出する細胞は全体のごく一部であることが明らかとなり、このような肺胞マクロファージサブセットの性質を詳細に解析することが、微粒子による炎症反応の理解につながると考えられた。

A. 研究目的

吸入曝露された微粒子は主に肺胞マクロファージにより貪食されると考えられており、微粒子に対する肺胞マクロファージの応答を解析することは微粒子による肺の炎症を予測する上で重要であると考えられる。前回までの研究において、研究分担者の黒田らはマウスの肺胞マクロファージの株化細胞を樹立し、細胞株を用いた微粒子応答の評価を行った。さらに同様の手法を用いて、ヒトの肺胞マクロファージの株化を試みた。

また、マウス肺胞マクロファージを用いた微粒子の評価では、微粒子を貪食した肺胞マクロファージの細胞死と、それに伴い放出される IL-1 α が指標になることを認めている。この現象は肺胞マクロファージに特有な現象であり、炎症を引き起こさない微粒子では細胞死も IL-1 α の放出も認められない。そのため微粒子による細胞死と IL-1 α 放出のメカニズムを明らかにすることは炎症を引き起こす微粒子の性質を理解

する上で重要であると考えられる。

そこで本研究では微粒子による肺胞マクロファージの細胞死と IL-1 α を放出のメカニズム解析を進めるとともに、ヒトの肺胞マクロファージを株化する。これにより、微粒子による炎症誘導機構を明らかにするとともにヒトへの外挿性が高い微粒子の *in vitro* 評価法を開発することを目的としている。

B. 研究方法

＜ヒト肺胞マクロファージの株化＞

ヒト肺胞マクロファージは EPITHELIX 社より購入した (Batch Number: MΦ0889FAC)。株化のためのベクターとして、SV40 large T 抗原とヒト GM-CSF を発現するレンチウイルスベクターを作製した。さらにヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の発現ベクターおよび TP53 と RB1 に対する siRNA ベクターも作製した。また変異型 RAS のベクターも作製した (連携研究者: 産業医科大、和泉弘人博士)。ヒト肺胞マクロファージを専

用培地にて2日間培養した。その後細胞を回収し、FACS AriaにてCD45⁺CD11b⁺細胞をソーティングした。得られた細胞にSV40 large T 抗原、ヒト GM-CSF 発現ベクター、TERT 発現ベクターおよび TP53 と RB1 に対する siRNA ベクターを感染させ、細胞の株化を試みた。

<細胞死と IL-1 α 放出のメカニズム解析>

細胞内に蓄積された IL-1 α の産生を可視化するために IL-1 α のプロモーター下に蛍光物質である mCherry を挿入した IL-1 α リポーターマウスを作製した。野生型マウスあるいはリポーターマウス由来の肺胞マクロファージを用いて、IL-1 α 産生のライブイメージング、細胞内 IL-1 α 染色の蛍光観察を行い、肺胞マクロファージの細胞内 IL-1 α の蓄積と放出のメカニズムの解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験については「カルタヘナ法」を遵守して研究を進めている。また動物を用いた実験については兵庫医科大学の動物実験規定を遵守し実験を進めている。

C. 研究結果

<ヒト肺胞マクロファージの株化>

昨年度に引き続き、遺伝子導入を行なったが細胞は不死化しているものの、十分な増殖スピードは得られなかった。そこで不死化したマウスに変異型 RAS の遺伝子を導

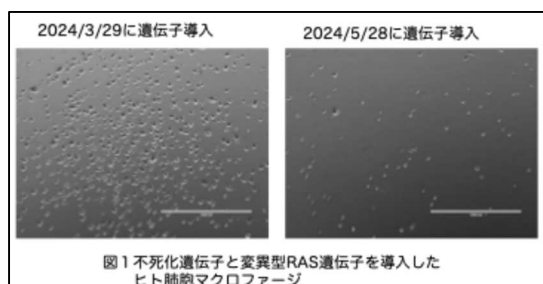
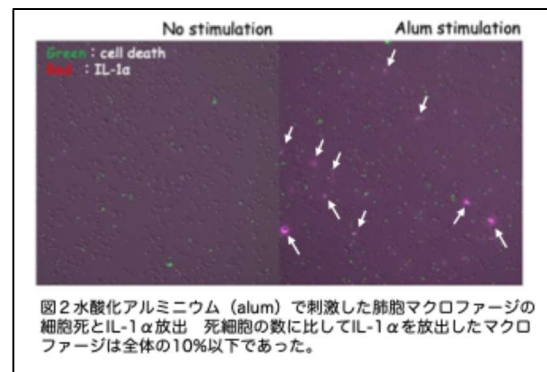


図1 不死化遺伝子と変異型RAS遺伝子を導入したヒト肺胞マクロファージ

入したが、増殖スピードの改善は認められなかった(図1)。以上の結果より、マウスの細胞と比較してヒト由来の細胞では細胞株化は困難であると考えられた。

<細胞死と IL-1 α 放出のメカニズム解析>

マウス肺胞マクロファージを *in vitro* にてアルミニウム塩(水酸化アルミニウム)の微粒子で刺激し、細胞死と IL-1 α 放出をライブセルイメージングにより解析したところ、細胞死に伴って IL-1 α を放出する細胞は全体の10%以下であった(図2)。



そこで、肺胞マクロファージ内に蓄積された IL-1 α を可視化する目的で IL-1 α のプロモーター下に蛍光物質である mCherry を挿入した IL-1 α リポーターマウスを作製した。このマウスから肺胞マクロファージを回収し、mCherry の蛍光を観察したところ、IL-1 α の放出と同様に約10%のマクロファージが mCherry を強く発現していた。これらの細胞が微粒子に反応し、IL-1 α を放出する肺胞マクロファージサブセットであると考え、現在この mCherry 陽性細胞の解析を進めている。

D. 考察

種々の化学物質の *in vitro* 試験においては、データの試験間変動や施設内外再現性の問題から細胞株が用いられることが多い。さらにヒトへの外挿性を考えた場合、

ヒトの細胞株を樹立することが重要であると考え、ヒト肺胞マクロファージの細胞株の作製を試みた。種々の遺伝子導入を行った結果、不死化までは可能であったが、十分な増殖スピードを持った細胞株を得ることができなかった。今後は、iPS 細胞からヒト肺胞マクロファージを誘導するプロジェクトの方に引き継ぐことになった。

細胞株のプロジェクトと並行して、微粒子による炎症誘導のメカニズムの解析を進めている。これまでの研究成果から、炎症を引き起こす微粒子を貪食した肺胞マクロファージは細胞死を引き起こすとともに、細胞内に蓄積した IL-1 α を放出し、炎症を誘導することを見出してきた。しかしながらライブイメージングを用いた解析により、細胞死によって IL-1 α を放出する肺胞マクロファージの割合は 10%以下であり、ほとんどの細胞が IL-1 α を放出しない細胞死であった。これらの結果は、微粒子によって肺の炎症を引き起こしている肺胞マクロファージは全体のごく一部であり、それらの細胞を用いた微粒子の安全性の評価が必要であると考えられる。

E. 結論

ヒト肺胞マクロファージに対して不死化および増殖に関与する遺伝子を導入することで形質転換を行なったが、十分な増殖スピードを有する細胞は得られなかった。

また、微粒子に応答し肺の炎症を引き起こす IL-1 α を放出する肺胞マクロファージは全体のごく一部であり、このような細胞集団を用いた微粒子の安全性評価の開発が重要であると考えられた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

F.2. 学会発表

1. 黒田悦史: 微粒子の化学的特性と肺胞マクロファージの活性化～炎症を引き起こす微粒子と引き起こさない微粒子. 第 32 回日本臨床環境医学会学術集会 (2024.6.9)
2. 黒田悦史: 微粒子の化学的特性と肺胞マクロファージの活性化～炎症を引き起こす微粒子と引き起こさない微粒子. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.3)
3. 黒田悦史: 肺胞マクロファージ細胞株を用いた炎症性微粒子評価法の開発および微粒子の化学的特性の解析. 2024 年度日化協 LRI 研究報告会 (2024.8.23)
4. Hinata Inoue, Takumi Adachi, Etsushi Kuroda: The novel evaluation approach for the immunotoxicity of environmental particulate matters using a newly developed macrophage line. 第 31 回日本免疫毒性学会学術年会 (2024.9.19)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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）
ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究

令和6年度 分担研究報告書

感染影響評価

～In vivo吸入曝露実験方法の開発及びNMのRSV感染マクロファージ機能への
影響評価に関する研究～

研究分担者 渡辺 渡

九州医療科学大学生命医科学部生命医科学科 教授

研究要旨

ナノマテリアル(NM)の短期全身吸入曝露による感染性免疫系への影響評価系を構築するため、ナノシリカ NM-201、-202 および-204 の複数回の Taquann 法吸入曝露による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響について再評価を実施した。肺病理組織標本すべてに対して、PAS 染色陽性細胞の分布を顕微鏡下で探索した結果、NM-204 はスコアの中央値による比較から、RSV 感染マウスでは NM-201 より粘性多糖産生細胞の分布が広い傾向が認められた。これはケモカイン CCL5 産生誘導結果と一致しており、感染影響指標として CCL5 が有用であることが再認識された。NM の粘性多糖誘導とケモカイン誘導能との関連性を明らかにするため、免疫組織染色による検討を開始している。一方、PMA 処置および未処置 THP-1 細胞/RSV 感染系における NM のケモカイン（CCL2、CCL3 および CCL5）産生増強効果は、最大で 50%程度であり in vitro 評価系として利用するには十分ではなかった。THP-1 細胞の培養条件の変更検討や共培養系の構築の予備試験を開始している。

A. 研究目的

我々の先行研究（20KD1004）では、Taquann 全身吸入曝露試験により、NM が肺泡マクロファージに作用し、また RSV 感染マウスモデルにおいて肺炎を増悪化することを見出してきた。本研究では、短期吸入曝露された NM を含む化学物質の免疫毒性評価手法の開発と将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見の収集を目的としている。NM の吸入曝露による RSV 感染マウス病態への影響評価をするとともに、RSV 感染マクロファージへの作用を in vitro で解析して、in vitro での感染影響評価系の確立を目指す。

B. 研究方法

ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験

これまでに Taquann 全身吸入曝露/RSV 感染実験において評価を実施した NM-201、-202 および-204 の肺病理組織標本すべてに対して、PAS 染色陽性細胞の分布を顕微鏡下で探索した。分布の程度は、0～3 の 4 段階でスコア化した（0:陽性細胞なし、1:複数個所にあり、2:複数個所に連続してあり、3:広がり大きいまたは杯細胞の増生があり）。なお、結果は右・左葉毎に集約した。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価

THP-1 細胞を評価に利用した。NM は、物性の異なるナノシリカ NM-201、-202 および-204 について比較検討を行った。NM の影響評価の予備試験として、PMA で処置した THP-1 細胞に、RSVA2 株を MOI（感染多価）1.0 で感染させ、0、8、24 および 48 時間後の培養上清中の cytokine/chemokine の誘導レベルをプロテインアレイ法（Proteome profiler™, R&D systems）で網羅的に調査した。

NM の評価は、PMA で処置した THP-1 細胞に超音波破碎機で培地中に懸濁したサンプル（0~10 µg/mL）を添加して一晚培養した。続いて前述のように RSV を感染させて 24 時間後の上清中の CCL2、CCL3 および CCL5 量を ELISA 法にて定量した。

h-CLAT 法による NM の評価では PMA による処置を行わないため、NM-204 を代表として PMA 未処置での評価を上記と同様に実施した。

前年度 In vivo 試験で評価を行った NM-202 について、A549 細胞を用いて THP-1 細胞と同様に CCL5 の誘導能を評価した。

（倫理面への配慮）

動物実験は九州保健福祉大学動物実験規定等に則り、動物倫理に配慮して安全に実施した（承認番号: 5-1-03）。

C. 研究結果

PAS 陽性細胞の分布を指標とした RSV 感染マウスでの影響評価

Taquann 全身吸入曝露/RSV 感染実験にて NM-201（令和 4 年度）、-202（令和 5 年度）および-204（令和 3 年度）を評価したマウス肺組織標本について、PAS 染色により粘性多糖産生細胞の分布を再評価した。陽性細胞は非感染・感染マウスそれぞれに散見された。標本によっては気管支の一部に欠損

があるなどマウスごとにばらつきが大きかった。特に左葉は一葉のため、NM の影響が明確ではなかった。一方、右葉については四葉の評価スコアを合することで分布の違いが見られた。特に NM-204 はスコアの中央値による比較から、RSV 感染マウスでは NM-201 より粘性多糖産生細胞の分布が広い傾向が認められた。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への in vitro 影響評価

PMA 処置 THP-1 細胞/RSV 感染系においては、感染後経時的に CCL2、CCL3、CCL5 および IL-8 が上清中に産生されていることがプロテインアレイ法で確認された。そこで、ヒト-マウス間で共通の生物学的機能が確立されている CCL2、CCL3 および CCL5 の影響を検討した。CCL2 では産生影響があまり見られなかった。そして、in vivo 試験で誘導が確認されている CCL5 では、NM 添加により産生増強は認められたが、その効果が 20%にも満たず、かつばらつきも大きいため物質間の相違が明確ではなかった。

PMA 未処置 THP-1 細胞/RSV 感染系では、in vivo 試験において最も影響が強く見られた NM-204 を代表化合物として評価した。PMA による刺激が無くても THP-1 からの CCL3 および CCL5 の産生は NM-204 により濃度依存的（0.3~30 µg/mL）に 50%程度の増強が確認された。しかし、RSV を感染させると感染量に比例して両ケモカイン共に産生が増強されるが、却って NM-204 の影響が認められなくなった。

気道上皮系細胞である A549 細胞に対する NM-202 の CCL5 産生増強作用は、あまり強くなかった。

D. 考察

PAS 陽性細胞の分布を指標とした RSV 感染

マウスでの影響評価

3 回の感染動物実験より得られた NM の粘性多糖産生細胞の分布に及ぼす影響は、RSV 感染マウスでは非感染より相違が見られた。とくに個体での比較では、NM-204 では NM-201 より影響が見られ、CCL5 産生誘導の結果と一致していた。しかし、局所レベルでの比較では、高いスコアの組織部位で炎症性病変が強いわけではなかった。粘性多糖産生細胞の分布とケモカイン誘導との関連性を精査するため、NM 曝露 RSV 感染マウス肺パラフィンブロックより、標本を新たに切り出し（バイオ病理研究所株式会社に委託）、CCL3、CCL5 および MUC5B タンパクを標的とした免疫組織染色による検討を開始している。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への in vitro 影響評価

PMA 処置および未処置 THP-1 細胞/RSV 感染系における NM のケモカイン（CCL2、CCL3 および CCL5）産生増強効果は、最大で 50%程度であり in vitro 評価系として利用するには十分ではなかった。この細胞は、LPS および IFN- γ の処理により炎症性マクロファージ（M1 系）へ分化するとの報告があり、ケモカイン誘導が強くなる可能性がある。現在、この実験系での影響評価を開始している。また、THP-1/A549 細胞の共培養系の構築を視野に入れた予備試験も開始している。

E. 結論

PAS 陽性細胞の分布を指標とした RSV 感染マウスでの影響評価

RSV 感染マウスでは、NM-204 は NM-201 より粘性多糖産生細胞の分布が広い傾向が認められた。CCL5 などのケモカイン誘導能との関連性を明らかにするため、免疫組織

染色による検討を開始している。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への in vitro 影響評価

THP-1 細胞/RSV 感染系における NM のケモカイン産生増強効果は、in vitro 評価系としての利用には十分ではなく、培養条件の変更検討や共培養系の構築の予備試験を開始している。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

令和6年度 分担研究報告書

ナノマテリアルを含む化学物質の呼吸器感作の免疫毒性法に関する
*in silico*解析

研究分担者 大野 彰子

国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部 主任研究官

研究協力者 沖山 佳生

神戸大学大学院システム情報研究科

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や得られた知見を基に各種 NMs の短期吸入曝露による毒性発現の毒性発現経路、*in vitro* 試験法の確立および将来的な 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6年度は、NMs を含む呼吸器感作物質となる化学物質の被験物質の物理化学的性状（物性）の収集および *in vitro* / *in vivo* 免疫毒性試験結果に関連する比較検証データを取得し、物性と *in vitro* や *in vivo* 試験の結果に関する関連性解析の実施により、毒性に影響を与える物性についての検証を実施することとした。NM の対象となる被験物質は、3 種の二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO_2 NMs: NM-201, NM-202, NM-204)とした。また、呼吸器系感作物質として化学物質の物質評価を整理するための対象となる被検物質は、①呼吸器感作物質として9化合物、②皮膚感作物質として13化合物、③非感作性物質として11化合物とし、今年度はこれらの物性の収集する項目について検討することとした。

A. 研究目的

ナノマテリアル（NM）の特徴とした同一化合物でも物性の僅かな違いや、化学物質の構造に由来する反応性から、呼吸器系に対して特有の影響を及ぼす可能性が考えられる。さらに、これらの物質が呼吸器感作を引き起こすと、免疫系は異常反応を示し、アレルギー反応や喘息などの症状を引き起こす可能性がある。このような NM を含む化学物質の生物学的影響について適切に評価し、理解することは、安全なナノ

テクノロジーと化学物質の使用にとって重要である。

二酸化ケイ素ナノ粒子（ SiO_2 NMs）は、微細な粒子径と大きな表面積から多方面での応用が期待される一方で、生体内への影響、特に呼吸器系への安全性が懸念されている。吸入されたナノシリカ粒子は肺に沈着し、マクロファージに取り込まれた場合、粒子の特性によってはマクロファージの炎症反応を引き起こし、持続的な炎症は肺組織の損傷や線維化につながる可能性

が示唆されている。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や得られた知見を基に各種 NMs の短期吸入曝露による毒性発現の毒性発現経路、*in vitro* 試験法の確立および将来的な 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。

B. 研究方法

B.1-1. 二酸化ケイ素ナノマテリアル (SiO₂ NMs) の *in silico* による特性解析

今年度の本研究で実施するナノマテリアルの対象化合物は、3 種の二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NMs: NM-201, NM-202, NM-204) とした。これらの被験物質の一部の物理化学的性状 (物性) と情報収集源は、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムで作成した評価文書 (dossier) 等に加えて、新たな物性 (重金属不純物や表面活性) の追加試験結果や、当研究班内で実施した *in vitro* 試験の h-CLAT 法による毒性評価結果により得られたデータや、*in vivo* 吸入暴露試験については dossier と、当研究班内で実施した結果について収集・整理を行い、解析に資するデータの資料作成を実施することとした。

【物理化学的性状および有害性情報の調査対象情報源】

- OECD で公表されているナノマテリアル安全性評価プログラムで作成した評価文書 (dossier) Silicon dioxide. - Manufactured nanomaterial の Summary dossier
- 関連する個別 dossier、ANNEX
- the Joint Research Centre of the European Commission (JRC) の情報、及びこれらの研究成果として公表された原著論文

- 本研究班で実施された *in vitro* h-CLAT 毒性試験結果

新しい物性項目として重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) と Specific surface area ratio (H₂O / N₂) は、以下の条件で測定した。

【重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) 測定】

- ICP 質量分析装置 : Agilent 7700x (アジレント・テクノロジー)
- マイクロウェーブ試料分解装置 : ETHOS-UP (マイルストーンゼネラル)

方法 : 試料 0.1g 程度を PTFE 容器に量りとり、フッ化水素酸、硝酸を加えて密閉し、マイクロウェーブ分解を行った。放冷後、超純水で定容した。

【Specific surface area ratio (H₂O / N₂) の測定】

- マイクロメリティックス社製 3Flex (比表面積・細孔分布測定装置)
- マイクロメリティックス社製 Smart VacPrep (前処理装置)

方法 : 試料約 0.3g をセルに採取し、上記前処理装置を用いて 100℃、約 12 時間の減圧乾燥を行った後、水蒸気吸着法 / N₂ ガス吸着法により測定を実施した。

尚、水蒸気吸着法は、占有断面積は 0.125nm で設定し、測定は 25℃ の温度下で実施された。

B.1-2. 呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析

【調査対象情報源】

以下の 3 種類に分類し、各化合物について整理を行っており、正準 SMILES 記法による化学構造の線形表記法を作成した (data not shown)。

- ① 呼吸器感作物質として 9 化合物
- ② 皮膚感作物質として 13 化合物
- ③ 非感作性物質として 11 化合物

R5 年度に収集した呼吸器感作性被検物質 33 化合物の正準 SMILES 構造に基づき、情報化学ならびに計算化学の観点から、物性値ならびに構造的特徴量の収集を行なった。

具体的な手順として、最初に化合物が水和物やイオン対を構成するものについては、そのままでは評価が困難であるため、溶媒に該当する文字列を SMILES から削除した。その後、RDKit ライブラリを用い、各化合物の 1 次元 (1D; 化学組成や SMILES 表記の官能基に基づく)、2 次元 (2D; 化学構造式に基づく)、3 次元 (3D; 立体座標に基づく) 構造を構築した。3D 構造については汎用分子力場 (UFF) を用いた構造最適化を実施した。これらの各次元の構造情報に基づき RDKit および Mordred、量子化学計算ライブラリである PySCF を用いて特性データを取得した。以上の処理はすべて Python 言語を用いて実施した。

C. 研究結果

C.1-1. 二酸化ケイ素ナノマテリアル (SiO₂ NMs) の *in silico* による特性解析

予試験的に実施した SiO₂ NMs (NM-200～NM-204) の物性情報と *in vitro* 試験の h-CLAT 試験法毒性結果のデータとの関連性については、直交部分的最小二乗回帰分析 (OPLS : Orthogonal Partial Least Squares Regression) を用いて解析した。

【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項目を X の説明変数とし、毒性値 (h-CLAT 試験法による毒性試験結果) 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。

解析結果では、毒性の高い化合物に寄与するいくつかの変数 (物性) の組み合わせが示唆された (data not shown)。

- ✓ コーティングなし
- ✓ 凝集体/凝集体の形態 (nm) : 角張った球形度の低い形
- ✓ 等電点 (平均) : pH (2-4)、
- ✓ アスペクト比
- ✓ 比表面積 (m²/g)

また、新しい物性項目として重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) と Specific surface area ratio (H₂O / N₂) を実施した。

【重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) 測定結果】

・ NM-201 について、As の含有量は 0.5mg/kg 未満、Cd の含有量は 0.2mg/kg 未満、Hg 及び Pb の含有量は 0.5mg/kg 未満であった。

・ NM-202 について、As の含有量は 0.5mg/kg 未満、Cd の含有量は 0.2mg/kg 未満、Hg 及び Pb の含有量は 0.1mg/kg 未満であった。

・ NM-204 について、As の含有量は 0.5mg/kg 未満、Cd の含有量は 0.2mg/kg 未満、Hg の含有量は 0.5mg/kg 未満、及び Pb の含有量は 1.2mg/kg であった。

【Specific surface area ratio (H₂O / N₂) の測定結果】 (表 2)

水蒸気吸着量は、相対圧力 (P/P₀) 0.9 における試料 1g あたりの吸着量を示し、NM-202 < NM-204 < NM-201 の順で吸着量は増加した。

BET 法による比表面積は、試料 1g に対する表面積値を示しており、N₂ ガスなど他のガスで得られる値とは異なるが、NM-202 < NM-204 < NM-201 の順で増加した。

比表面積値比は、水蒸気吸着法と N₂ ガス

吸着法で得られた比表面積値の比で、試料間の親水性比較のための指標となり、NM-202<<NM-204≈NM-201の順であった。

一方、*in vivo* 試験による吸入暴露試験の有害性情報に関しては、今後、HESS (ラットを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、規格化されたシートをひな形として用い、情報収集した SiO₂ NPs のデータコンテンツに特化した項目を追加することで、新たな規格データシートを作成した。

C.2-2. 呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析

昨年度は情報化学に基づく、下記分子特性データを取得した。

- 1D: 水素結合ドナー／アクセプター数、正味電荷
- 2D: logP、分子 FingerPrint 等
- 3D: 極性表面積 (PSA)、van der Waals 体積

令和 6 年度は量子化学に基づく、下記分子特性データを取得した (表 3)。

- 3D (量子化学計算): 反応性軌道エネルギー (HOMO/LUMO) およびエネルギーギャップ、双極子モーメント

ただし、今回は真空中での HF/6-31G*レベルのテスト計算の実施にとどまったことから、今後、電子相関や溶媒効果の考慮、量子化学的な構造最適化、基底関数の改良など、精密化を行う必要がある。また、吸着性に関わる分極率の見積もりのため励起状態計算を実施する予定である。

D. 考察

先行研究で実施された SiO₂ NMs (NM-

201, NM-202, NM-204)を用いた *in vitro* h-CLAT 試験結果は、すべて陽性であり、陽性判定のランキングは、NM-201<NM-202<NM-204 であった。

NM-204 は EC200 の活性化能が高く、毒性が強かったことは、一次粒子径や二時粒子径が最も小さい値であることが影響していると考えられ、その他の物性項目についても候補として挙げた。昨年度に実施した 6 種の MWCNTs (NM-400~403, NT-7(ND), NT-7(N)) を用いた、物性データ結果と毒性試験結果 (EC200) との関連性の解析では、毒性が強い被験物質の物性項目として細胞への吸着能を示す Specific surface area ratio (H₂O/N₂) の影響が大きいことが示唆された。従って、今年度の SiO₂ NMs の研究で、新たな物性項目の一つとして加えることとした。さらに、重金属 (As, Cd, Pb, Hg) は、不純物として被験物質に含まれると、細胞や臓器へのダメージが強化され、急性毒性や慢性毒性、発がん性、環境への影響が生じる可能性がある。陽性判定の一番強い NM-204 に含まれる重金属の鉛が可溶性の化学形でナノシリカに比較的容易に溶出する場合: 1.2 mg/kg という含有量と、ナノシリカの暴露濃度によっては、THP-1 細胞に影響を与える可能性はあり、特に、12 時間という暴露時間は、細胞応答を観察するのに十分な長さであると考えられる。仮に、鉛が不溶性の化学形でナノシリカに強く結合している場合: 鉛の溶出がごく微量であれば、THP-1 細胞への影響は小さいかもしれないが、ナノシリカ粒子自体が細胞に取り込まれ、細胞内で徐々に鉛が放出される可能性も否定できない。従って、h-CLAT アッセイの指標への影響: 直接的な細胞死が見られなくても、亜致死的な濃度の鉛が細胞の活性化状態や表面マーカーの発現に影響を与える可能性を示

唆する。

従って、化学物質における重金属の存在を評価し、適切に管理することが重要であることから、これらの純金属の不純物についても、新たな物性項目の一つとして加えることとした。

また、比表面積値比は、水蒸気吸着法と N₂ ガス吸着法で得られた比表面積値の比であり、試料間の親水性比較のための指標となる。NM-201、NM-202、NM-204 は相対圧約 0.8 以上で吸着量が増加する傾向は同じだが、NM-202 は他の 2 試料と比較して、水蒸気吸着量、比表面積値（水蒸気）が低く、比表面積値比（水蒸気/N₂ ガス）も小さいことから親水性は低いと考えられた。

化学構造からの有害性予測においては、特定の化学構造が特定の生物活性や毒性を示す傾向があることが知られている。例えば、RDKit や PaDEL-descriptor といったツールは、化学構造の記述子（descriptor）を計算するために用いられ、これらの記述子は機械学習モデルの入力として利用することができる。従って、これらのツールを活用することにより、化学物質の毒性を予測する際に有用であると考えられる。

また、量子化学計算を利用した毒性予測においては、PySCF のような量子化学計算プログラムを使用することで、化学物質の電子状態に関する詳細な計算が可能となる。これにより、HOMO（Highest Occupied Molecular Orbital）および LUMO（Lowest Unoccupied Molecular Orbital）のエネルギーや、分子の電荷分布などの情報が得られる。これらの情報は、化学物質の反応性や安定性を理解するための重要な手がかりとなり、さらにその情報が毒性予測においても有益であることが示唆される。

E. 結論

化学物質の安全性評価において、物性データと毒性データの関連性解析は重要な役割を果たす。これらのデータ間には相関関係が見られることが多く、統合的な解析によって新たな毒性予測手法の開発が期待される。具体的には、既存の物性データに加え、実験的および計算化学的に得られる物性項目を拡充し、毒性指標との相関性を検証することで、予測精度向上を目指す。さらに、オープンソースライブラリーや機械学習等の情報科学的手法を活用し、1D、2D、3D 構造記述子を含む多様な物性項目を用いた予測モデルを構築することで、より高度な毒性予測を実現する。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Nishida A, Sawada Y, Arai R, Ishibashi N, Suzuo M, Ohno A, Ashikaga T, Iijima K, Evaluation of the immunotoxicity potential of nanomaterials using THP-1 cells, Front. Toxicol., 01 July 2024.
<https://doi.org/10.3389/ftox.2024.1293147>.

F.2 学会発表

1. 飯島一智, 山城真輝, 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄: 種々の酸化亜鉛ナノ粒子を対象とした抗原提示細胞活性化能の評価と活性化機序の解析, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
2. 大野彰子: 食品分野に含まれるナノ粒子の健康影響, 科学的根拠に基づく健康寿命を伸ばす会 第 30 回講演会 (2024.10.9)
3. 前田洋祐, 佐藤亜紗子, 武吉正博, 立花滋博, 成田和人, 小林諒太, 島田真理子, Priyanka M, Rahul D, Abhay D, Namhee K, Miriam J, 福山朋季, 松本一

- 彦, 赤堀有美, 足利太可雄, 大野彰子, 小島肇, 小野敦: 皮膚感作性試験代替法 α -Sens® の Validation 研究 (Phase I), 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
4. 大野彰子, 沖山佳生, 山城真輝, 飯島一智, 足利太可雄: ナノマテリアルの免疫毒性評価系における in vitro h-CLAT 試験法の有用性, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 5. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支モデルとの共培養系を用いた各種シリカナノ粒子の THP-1 細胞活性化能の評価と活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 6. 荒井りおん, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: ナノマテリアル吸入毒性試験法の開発に向けた、各種シリカナノ粒子曝露による THP-1 細胞活性化のメカニズム解析と新規評価指標候補遺伝子の発現解析, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 7. 坂本玲奈, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支モデル/THP-1 細胞共培養系を用いた酸化亜鉛ナノ粒子の免疫細胞活性化能の評価, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 8. 石ヶ守里加子, 今井正彦, 大野彰子, 戸塚ゆ加里: マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの毒性評価, 日本環境変異原ゲノム学会 第 53 回大会 (2024.12.7)
 9. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Maki Yamashiro, Kazutoshi Iijima, Akihiko Hirose, Takao Ashikaga, Usefulness of Evaluation System for Activation Potential of Various Nanoparticles Using Monocytic Cell Line THP-1 and Prediction of Toxicity, SOT 64th Annual Meeting (2025.3.18)
 10. 大野彰子, 動物実験代替法に向けた化学物質の安全性評価手法の開発と国際動向, 日本薬学会第 145 年会 (2025.3.28)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 2. その他
特になし

表1 3種のナノシリカの代表的な物性値と h - CLAT 試験結果（その他の詳細な物性値は data not shown）

SiO ₂ NPs					
	Measurement method		NM-201	NM-202	NM-204
Physical properties	TEM	Particle size / nm	17	15	10
	TEM	Particle shape	spherical	spherical	spherical
	DLS(buffer of aggregates in h-CLAT test)	Z-average / nm	526	420	273
	DLS(buffer of aggregates in h-CLAT test)	Z-potential / mV	-18	-16	-17
	DLS(buffer of aggregates in h-CLAT test)	PDI	0.38	0.36	0.35
h-CLAT test (THP-1active)		Potential	Positive	Positive	Positive
		Potntial Rank	3	2	1
		EC200 / ug ml-1	30.3	19.5	3.5
		EC150 / ug ml-1	-	-	-

表2 3種のナノシリカの水蒸気吸着測定結果

	NM-201	NM-202	NM-204
測定温度(°C)	25(恒温槽)	25(恒温槽)	25(恒温槽)
P/Po=0.9吸着量(mmol/g)	24.7	6.4	17.8
比表面積値 多点BET法 窒素吸着(m ² /g)	215	42.4	199.7
比表面積値(水蒸気/N ₂ ガス)	1.55	0.22	1.54
試料重量(処理後)(g)	0.314	0.298	0.313

表3 呼吸器感作性物質等の（3D 量子化学計算）

Index	Smallest	GAS	Chemical	Formula	FormalO	E HOMO	E LUMO	Gap	Dipole	Index	Smallest	GAS	Chemical	Formula	FormalO	E HOMO	E LUMO	Gap	Dipole			
0	Respiratory	7030-70-4	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH7O3N2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355	17	Skin	101-88-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-0.33	0.073	0.355	3.803	
1	Respiratory	101-88-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH7O3N2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355	18	Skin	97-53-9	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-0.33	0.073	0.355	1.05	
2	Respiratory	97-53-9	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355	19	Skin	93-89-2	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-0.33	0.073	0.355	2.773	
3	Respiratory	93-89-2	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355	20	Skin	97-89-5	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O4	---	0	-0.33	0.084	0.471	3.247
4	Respiratory	97-89-5	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
5	Respiratory	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
6	Respiratory	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
7	Respiratory	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
8	Respiratory	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
9	Skin	101-88-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
10	Skin	97-53-9	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
11	Skin	93-89-2	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
12	Skin	97-89-5	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
13	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
14	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
15	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
16	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
17	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
18	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
19	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
20	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
21	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
22	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
23	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
24	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
25	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
26	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
27	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
28	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
29	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
30	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
31	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
32	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
33	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
34	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
35	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
36	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
37	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
38	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
39	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
40	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
41	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
42	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
43	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
44	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
45	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
46	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
47	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
48	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
49	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
50	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
51	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
52	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
53	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
54	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
55	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
56	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
57	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
58	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
59	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
60	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
61	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
62	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
63	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
64	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
65	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
66	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
67	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
68	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
69	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
70	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
71	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
72	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
73	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												
74	Skin	110-93-0	PubChem	O=C1C(=O)C(=O)C1	CH2H2O2	---	-6.183	0.223	0.33	1.8355												

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

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
Shikama Y, Otsuka K, Furukawa M, <u>Ishimaru N</u> , Matsushita K	Involvement of metformin and aging in salivary expression of ACE2 and TMPRSS2	<i>BioFactor</i>	51(1)	e2154	2025
Ushio A, <u>Ishimaru N</u>	Molecular Pathogenesis via Sex Hormone in Sjögren's Syndrome	<i>J Stomatol Soc Jpn.</i>	92(1)	1-6	2025
Kasahara T, Yamamoto Y, Nakashima N, Imamura M, Mizumachi H, Suzuki S, Aiba S, Kimura Y, <u>Ashikaga T</u> , Kojima H, Ono A, Matsumoto K	Borderline Range Determined Using Data From Validation Study of Alternative Methods for Skin Sensitization: ADRA, IL-8 Luc Assay, and EpiSensA	<i>Journal of Applied Toxicology</i>	45(3)	432-439	2025
<u>Ashikaga T</u> , Hatano K, Iwasa H, Kinoshita K, Nakamura N, Ambe K, Tohkin M	Next Generation Risk Assessment Case Study: A Skin Sensitization Quantitative Risk Assessment for Bandrowski's Base Existing in Hair Color Formulations	<i>J. Cos. Sci. Soc</i>	48(2)	1-5	2024

Tsunematsu T, Mouri Y, Shao W, Arakaki R, Ruppert JG, Murano K, <u>Ishimaru N</u> , Guardavaccaro D, Pagano M, Kudo Y	Sustained chromosomal passenger complex activity preserves the pluripotency of human embryonic carcinoma cells.	<i>Sci Signal</i>	18	eadg4626	2024
Nishida A, Sawada Y, Arai R, Ishibashi N, Suzuo M, <u>Ohno A</u> , <u>Ashikaga T</u> , <u>Iijima K</u>	Evaluation of the immunotoxicity potential of nanomaterials using THP-1 cells	<i>Front. Toxicol.</i>		1:6	2024
<u>Ashikaga T</u> , Hatano K, Iwasa H, Kinoshita K, Nakamura N, Ambe K, Tohkin M	Next Generation Risk Assessment Case Study: A Skin Sensitization Quantitative Risk Assessment for Bandrowski's Base Existing in Hair Color Formulations	<i>J. Cos. Sci. Soc</i>	48(2)	73-77	2024

Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaoun K, <u>Ashikaga T</u> , Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P	Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology	<i>Arch Toxicol</i>	98	2299–2308	2024
<u>Taquahashi Y</u> , Aisaki K (Co-first author), Morita K, Suga K, Kitajima S	Application of the Matrix Profile Algorithm for Detecting Abnormalities in Rat Electrocardiograms	<i>Fundam. Toxicol. Sci.</i>	11(6)	289-296	2024
Kuwagata M, Doi Y, Saito H, Tsurumoto M, Igarashi T, Nishimura T, <u>Taquahashi Y</u> , Hirabayashi Y, Kitajima S	A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats	<i>Fundam. Toxicol. Sci.</i>	11(4)	169-181	2024
平林容子, <u>足利太可雄</u> , 小島肇夫	非臨床安全性評価に用いられる非ヒト霊長類の供給不足をめぐる動き	<i>医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス</i>	55(3)	195-197	2024
<u>足利太可雄</u>	化粧品開発における動物を用いない皮膚感作性評価法開発の現状	<i>SSCI-Net News Letter</i>	6	3-6	2024

足利太可雄, 大野彰子, 小島肇夫, 平林容子	日本動物実験代替法 評価センター (JaCVAM) 令和4~6 年報告書	<i>AATEX- JaCVAM</i>	12(1)	35-41	2024
Ushio A, Otsuka K, Tsunematsu T, <u>Ishimaru N.</u>	Therapeutic Strategy Based on the Pathogenesis for Sjögren's Syndrome	<i>J Oral Health Biosci</i>	37(1)	1-5	2024
Nakamura K, Tsukasaki M, Tsunematsu T, Yan M, Ando Y, Huynh NCN, Hashimoto K, Gou Q, Muro R, Itabashi A, Iguchi T, Okamoto K, Nakamura T, Nakano K, Okamura T, Ueno T, Ito K, <u>Ishimaru N.</u> Hoshi K, Takayanagi H	The periosteum provides a stromal defence against cancer invasion into the bone	<i>Nature</i>	1634 (8033)	474-481	2024
Kobayashi D, Denda M, Hayashi J, Hidaka K, Hohmura Y, Tsunematsu T, Nishino K, Yoshikawa H, Ohkawachi K, Nigorikawa K, Yoshimura T, <u>Ishimaru N.</u> Nomura W, Katagiri T, Kosako H, Otaka A	Sulfoxide-Mediated Cys-Trp-Selective Bioconjugation that Enables Protein Labeling and Peptide Heterodimerization	<i>Chem Eur</i>	2(3-4)	e202400 014	2024

Yamada A, Watanabe A, Nara A, <u>Ishimaru N</u> , Maeda K, Ido Y, Kotake K, Asano M, Shinohara Y, Yamamoto T	Longitudinal Analysis of Mitochondrial Function in a Choline-Deficient L-Amino Acid- Defined High-Fat Diet-Induced Metabolic Dysfunction- Associated Steatohepatitis Mouse Model	<i>Int J Mol Sci</i>	25	6193.	2024
Aota K, Kani K, Ono S, Naniwa K, Momota Y, Fukui M, <u>Ishimaru N</u> , Azuma M	Activation of Janus kinase 2 contributes to the autoimmune pathology in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome	<i>Oral Sci Int.</i>	21(3)	415-424	2024
Ushio A, Matsuda- Lennikov M, Kalle- Youngoue F, Shimizu A, Abdelmaksoud A, Kelly MC, <u>Ishimaru N</u> , Takahama Y.	Functionally diverse thymic medullary epithelial cells interplay to direct central tolerance	<i>Cell Rep</i>	43	114072	2024
大塚邦紘, 石丸直澄	Sjögren症候群の病 理	皮膚病診 療	788-79	46(9)	2024

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 本間 正充

次の職員の令和6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 ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター ゲノム安全科学部第四室・室長
(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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

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 本間 正充

次の職員の令和6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 ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究
3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☒	☐	☒	国立医薬品食品衛生研究所	☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

国立医薬品食品衛生研究所長

機関名 東京医科大学
所属研究機関長 職 名 学長
氏 名 宮澤 啓介

次の職員の令和6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 ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のため研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学総合研究所・教授
(氏名・フリガナ) 善本 隆之 (ヨシモト タカユキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

国立医薬品食品衛生研究所長殿

機関名 国立大学法人東京科学大学
所属研究機関長 職 名 理事長
氏 名 大竹 尚登

次の職員の令和6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 ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院医歯学総合研究科・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 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
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	☒ 有 ☐ 無	☒	国立食品医薬品研究所	☐
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:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

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6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 ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究 (23KD1001)
3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 兵庫医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 鈴木 敬一郎

次の職員の令和6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 ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究 (23KD1001)
- 研究者名 (所属部署・職名) 医学部免疫学・教授
(氏名・フリガナ) 黒田 悦史・クロダ エツシ

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☒	☐	☒	兵庫医科大学	☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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 7 年 4 月 7 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 九州医療科学大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 池ノ上 克

次の職員の令和6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 ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究 (23KD1001)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 生命医科学部・教授
(氏名・フリガナ) 渡辺 渡

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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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:)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。

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 本間 正充

次の職員の令和6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 ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター ゲノム安全科学部・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)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
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	☐	☒	☐		☐
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：)	☐	☒	☐		☐

(※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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☒ 無 ☐ (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 ☐ 無 ☒ (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。