

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルの短期吸入曝露等による免疫毒性に関する
in vitro/in vivo 評価手法開発のための研究

令和 2 年度 総括研究報告書

研究代表者 足利太可雄

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官

研究要旨

ナノマテリアル(NM)は細胞内に直接取り込まれるという性質を有するため、吸入曝露による健康リスクが強く懸念される場所であり、多様な NM の吸入曝露による毒性を効率的かつ高精度に評価できる試験法の開発および国際標準化が喫緊の課題である。そこで我々は、異物排除の根幹を担う抗原提示細胞に対する NM の影響に着目し、in vitro/in vivo 研究の連携体制による評価手法開発のための研究を行っている。具体的には、in vitro において NM が抗原提示細胞株に与える影響の検討、NM の物理化学的性状データの取得と有害性データの情報収集、さらに in vivo 短期吸入曝露試験を実施した。銀ナノ粒子は銀イオン同様、THP-1 細胞の CD86 および CD54 発現を亢進したが、銀イオンの方がはるかに低濃度で活性が見られ、銀ナノ粒子は細胞培養条件下で銀イオンの溶出が認められたことから、銀ナノ粒子による THP-1 細胞の活性化は溶出した銀イオンによるものと考えられた。また、種々のナノシリカ粒子は THP-1 細胞の CD54 発現を非常に強く誘導し、一部の酸化チタン NM については CD54 発現の弱い誘導がみられた。さらに、RAW246.7 細胞にカーボンナノチューブである T-CNT を添加した結果、MMP12 や線維化に関与する遺伝子 mRNA 発現が上昇し、THP-1 細胞の LPS 刺激下で T-CNT を加えると、LPS 刺激のみの細胞に比較して有意に MMP-12 mRNA 発現が上昇した。物性と毒性の関係を解析するために、各種二酸化チタン NM について、公開された文献などから in vivo 有害性情報を取得するとともに、成分分析と細孔分布・比表面積測定を行い、データマイニングの結果、多変量解析手法の有用性を見出した。In vivo 研究としては、針状二酸化チタン NM が生体レベルで肺胞マクロファージに与える影響解析を目的として、先行研究で開発した Taquann 法を用いて短期吸入曝露試験を実施し、病理組織学的評価および免疫機能評価を行ったところ、曝露後 8 週において、CD54+AM の割合が対照群に比較して有意に増加していた。

研究分担者

高橋 祐次

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
動物管理室 室長

飯島 一智

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

大野 彰子

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター

安全性予測評価部 主任研究官

A. 研究目的

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

B. 研究方法

B.1. 様々な特徴を有するナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能等の評価によるデータベース作成 (足利)

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

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

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

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

【有害性情報の調査対象情報源】

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

【物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目】

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

【物理化学的性状の分析対象項目】

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

燃焼-赤外線吸収法による定量分析(対象元素:S、下限0.01%)

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

【情報整理及びデータベース(DB)搭載用のデータシートの作成】

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

【多変量解析法】

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

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

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

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

B.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明(飯島)

B.3.1. 各種 NM 分散液の調製と評価

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

銀ナノ粒子:

銀ナノ粒子は BioPure™ 銀ナノ粒子分散液(nanoComposix, 一次粒径 10.3 ± 1.9 nm, 濃度 0.99 mg/ml)を用いた。 40 mg/ml ウシ血清アルブミン(BSA)溶液 in 5% グルコース溶液を用いて希釈した後、培地を用い

て所定濃度まで希釈した。購入時の銀ナノ粒子分散液および培地分散時の銀イオン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES, ICPE-9000, 島津製作所) により測定した。

二酸化チタン NM :

二酸化チタン NM は粒子状の MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT-600 (以上テイカ株式会社) および針状の TiDW を用いた。二酸化チタン NM はあらかじめバイアル瓶に移し、アルミホイルで包んで電気炉で 220°C, 18 時間の条件で乾熱滅菌を行った。4 mg/ml の濃度になるように二酸化チタン NM を培地に懸濁し、プローブ型超音波装置 (VP-050N, タイテック株式会社) を用いて水中で PWM 80%, 1 分間の条件で処理した。培地を用いて所定濃度に希釈し、再度プローブ型超音波装置により同様の条件で処理した。

B.3.2. NM の抗原提示細胞活性化能の評価

24 ウェルプレート内の各ウェルに 2.0×10^6 cells/ml THP-1 細胞懸濁液 500 μ l および各被験物質の分散液または溶液 500 μ l を添加し、CO₂ インキュベーター内で 24 時間静置した。被験物質の曝露濃度は THP-1 細胞の生存率が 75% となる濃度 (CV75) を基準とし、公比 1.2 で上下合計 8 濃度を設定した。曝露後の THP-1 細胞を 10% BSA 含有リン酸緩衝液 (PBS) (FB) で洗浄後、0.01% グロブリン, 10% BSA 含有 PBS にて 15 分間ブロッキングした。96 ウェルプレート内の各ウェルに分注した細胞をそれぞれ FITC 修飾された抗 CD54 抗体、抗 CD86 抗体および IgG で 30 分間処理した後、FB で細胞を洗浄、ヨウ化プロピジウムを添加した。フローサイトメトリーを用いて FL-1 チャネルおよび FL2 チャネルの強度を測定し、

CD54, CD86 の発現を培地処理群 (control) に対する相対蛍光強度 (RFI) として求めるとともに、細胞生存率を算出した。

B.3.3. 細胞内活性酸素種 (ROS) の定量

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

B.3.4. 細胞内に取り込まれた銀の定量

24 ウェルプレート内の各ウェルに 2×10^6 cells/ml THP-1 細胞分散液 500 μ l および同量の 402.50 μ g/ml 銀ナノ粒子分散液もしくは 7.47 μ g/ml 硝酸銀溶液を添加し、CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。上清を捨て、PBS で 3 回洗浄した。HNO₃ 500 μ l を加えて 70°C のウォーターバスで 30 分間処理したのち、氷上で 1 分間冷却した。それを 3 ml の超純水で希釈し、ICP-AES 測定を行い、銀濃度を定量した。

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

B4.1. 検体の高分散化処理の条件検討

1. 被験物質 :

被験物質として、針状酸化チタン TiDW を使用した。

2. 検体処理の条件検討 :

TiDW の原末 500 mg をビーカーに入れ、

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

3. TiDW の形態観察：

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

B4.2. マウス全身曝露吸入実験

1. 動物：

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

2. 飼育条件：

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

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

3. 群構成：

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

4. ダスト発生装置

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

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

5. 曝露チャンバー

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

6. 曝露チャンバー内のエアロゾル濃度測定
曝露チャンバー内のエアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度 (CPM; count per minutes) と質量濃度 (mg/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10倍希釈し測定した。質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、 $\phi 55$ 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、 $\phi 55$ mm、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の流量で曝露時間の2時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後の

フィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 $1.5 \text{ L}/\text{min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$ から 1 m^3 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用した。

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

8. 解剖とサンプリング

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

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

B.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究(石丸)

・マウスへの吸入曝露

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

・フローサイトメトリー解析

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

関しても、染色後固定した(未解析)。

・In vitro 実験系

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

・定量化RT-PCR法

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

C.1. 様々な特徴を有するナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能等の評価によるデータベース作成(足利)

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

積・濃度調製することで、均一な分散状態で細胞に適用することがわかった。

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

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

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

C.2.1 データマイニング

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

C.2.2 成分分析 (化学分析)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C.2.10 HESS DB 搭載のための情報整理およびデータシートの作成

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

C.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明 (飯島)

C.3.1. 銀ナノ粒子の評価

培地中での銀ナノ粒子のζ-ポテンシャルは -12.07±0.73 mV、流体力学的直径は 37.5±11.0 nm であった。銀ナノ粒子は購入時のクエン酸溶液中で 5.0%、培地中 24 時間分散後で 25.9%がそれぞれ銀イオンとして溶出していることがわかった。

C.3.2. 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の評価

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

C.3.3. 銀ナノ粒子、銀イオン処理後の細胞内銀濃度の定量

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

C.3.4. 銀ナノ粒子、銀イオン処理後の細胞内活性酸素種 (ROS) 産生の定量

同程度の生存率を示す濃度 (CV75) での曝露において、銀ナノ粒子と銀イオンどちらも細胞内 ROS 量を増加させたが、銀ナノ粒子の方が ROS 産生量は多かった。

C.3.5. 二酸化チタン NM の評価

培地中での二酸化チタン NM MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT-600, TiDW のζ-ポテンシャルはそれぞれ -20.5±3.33 mV, -23.9±4.0 mV, -22.4±0.8 mV, -23.8±1.3 mV, -16.7±3.9 mV, -14.9±2.6 mV、流体力学的直径はそれぞれ 222.2±20.8 nm, 82.16±3.32 nm, 234.7±60.1 nm, 61.27±13.2 nm, 260.5±23.9 nm, 781.7±45.4 nm であった。走査型電子顕微鏡観察により、針状二酸化チタン TiDW はプローブ型超音波装置を用いた分散処理によって形態は変化しないことが確認された。

C.3.6. 二酸化チタン NM の抗原提示細胞活性化能の評価

各種二酸化チタン NM 処理後の THP-1 細胞の CD86 および CD54 発現については、陽性と判断されるものもあったが、いずれも陽性判定基準 (CD86 発現が 150%, CD54 発現が 200%) をわずかに超える程度であった。

C.4. 異物除去に重要な役割を果たすマクロ

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

C.4.1 検体の高分散化処理の条件検討

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

C.4.2 マウス全身曝露吸入実験

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

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

C.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究 (石丸)

C.5.1 TiDW の吸入曝露実験

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

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

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

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

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

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

C.5.2 In Vitroの実験

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

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

D. 考察

D.1. 様々な特徴を有するナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能等の評価によるデータベース作成 (足利)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

D.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明 (飯島)

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

銀ナノ粒子の曝露において、銀ナノ粒子

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TiDW のエアロゾル特性のうち、

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

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

D.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究 (石丸)

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

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

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

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

E. 結論

E.1. 様々な特徴を有するナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能等の評価によるデータベース作成（足利）

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

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

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

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

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

E.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明（飯島）

銀ナノ粒子は銀イオン同様、THP-1細胞のCD86およびCD54発現を亢進したが、銀イオンの方がはるかに低濃度で活性が見られ、銀ナノ粒子は細胞培養条件下で銀イオンの溶出が認められたことから、銀ナノ粒子によるTHP-1細胞の活性化は溶出した銀イオンによるものと考えられた。一方、二酸化チタンナノ粒子については、一部においてTHP-1細胞のCD86およびCD54発現増加傾向は見られたものの、明確な陽性とは言えなかった。

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

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

E.5. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究（石丸）

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

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

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

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

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

19. 赤木隆美, 村上将登, 宮崎裕美, 田口浩之, 池田英史, 加藤雅一, 山田知美, Mura S, Couvreur P, 足利太可雄, 小島肇, 明石 満: 三次元培養皮膚モデル LbL-3D Skin を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション研究, 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
20. 水町秀之, 渡辺美香, 生悦住茉友, 梶原三智香, 安田美智代, 水野 誠, 今井教安, 佐久間めぐみ, 芝田桃子, 渡辺真一, 上野順子, Basketter D, Eskes C, Hoffmann S, Lehmann D, 足利太可雄, 寒水孝司, 武吉正博, 宮澤正明, 小島 肇: 皮膚感作性試験代替法 Epidermal Sensitization Assay (EpiSensA) の Validation 研究(施設内再現性 Phase I), 日本動物実験代替法学会 第 33 回大会 (2020.11.12, web 開催)
21. Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J, Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice, 9th Nano Conference (2020.11.12, Virtual meeting)
22. 浅野哲秀, 笠松俊夫, 北本幸子, 山本美佳, 足利太可雄, 小島 肇, Bhas42 細胞形質転換試験法 (Bhas 42 CTA) の評価, 日本環境変異原学会第 49 回大会 (2020.11.27, 沼津, 静岡および web 開催)
23. 高橋祐次, 森田絃一, 辻 昌貴, 菅 康佑, 相崎健一, 大久保佑亮, 種村健太郎, 北嶋 聡, シンポジウム 4 『医薬品以外の毒性から学ぶ』, 急性毒性試験の近代化による毒性機序研究, 日本毒性学会 医薬品毒性機序研究会主催, 第 3 回医薬品毒性機序研究会 (2021.1.15, web 開催)
24. 石丸直澄 自己免疫疾患モデルを用いた発症機序の解明と治療戦略 東京工業大学化学生命科学研究so ウェブ講演会 (2021.1.28, web 開催)
25. Taquahashi Y, Yokota S, Morita K, Tsuji M, Kuwagata M, Hojyo M, Hirose A, Kanno J: Interim report of the 4-week-interval intermittent whole body inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice, SOT 2021 Annual Meeting Virtual (2021.3.17, Virtual meeting)
26. 福原 潔, 中西郁夫, 大久保敬, 今井耕平, 水野美麗, 松本謙一郎, 大野彰子: C-メチルフィセチンのラジカル消去作用, 日本農芸化学会 2021 年度大会 (2021. 3.18-3.21, web 開催)
27. Iijima K, Nishida A, Ohno A, Hirose A, Ashikaga T: Comparison of Sensitization Potentials between Silver Nanoparticles and Silver Ions using Monocytic Cell Line THP-1, 2021 SOT Virtual Annual Meeting (2021.3.22, USA, Virtual meeting)
28. 大野 彰子, 沖山 佳生, 広瀬 明彦, 福原 潔: ニトロ多環芳香族炭化水素の構造と変異原性に関するドッキングスタディ, 日本薬学会第 141 年会 (2021. 3.26-3.29, web 開催)

H. 知的所有権の取得状況

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