

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3年度 分担研究報告書

ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響評価に関する研究

研究分担者 渡辺 渡

九州保健福祉大学生命医科学部生命医科学科 教授

研究要旨

ナノマテリアルの短期全身曝露による感染性免疫系への影響を評価するため、ナノシリカ NW-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評価を実施した。NW-204 はウイルス感染前 7、5 および 3 日に吸入曝露し、その後 RSV をマウスに経鼻感染させて 5 日後の感染最盛期に評価した。RSV 感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカイン CCL5 の BALF 中のレベルは、曝露量に依存し有意に上昇した。一方、非感染マウスでは上昇しなかった。CCL3 と sCD54 でも同様の結果が得られた。肺病理組織学的検討でもこれらサイトカイン・ケモカイン類の結果を反映して、RSV 感染マウスでは NW-204 の曝露量に依存してリンパ球の浸潤や肺泡マクロファージ類の集束などが認められ、RSV 肺炎の増悪化が確認された。特にマクロファージ類の集束は、胸膜下にも局在していた。今後、感染後の期間を延長して病態の変化をより詳細に解析する必要があると考える。

A. 研究目的

ナノマテリアルのマウスへの短期全身曝露吸入を実施して感染免疫を含め免疫機能への影響評価を行い、得られた知見を毒性発現の AOP（毒性発現経路）および *in vitro* 試験法の確立と、将来的な OECD ガイドライン化を目指すための基盤的知見に応用することを目的としている。

今年度は、国立衛研毒性部・高橋祐次先生の研究グループでの Taquann 法によるナノシリカ吸入曝露システムを利用して、respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いた複数回（感染前 7,5 および 3 日）の NW-204 吸入曝露による RSV 感染

5 日後（感染最盛期）への影響評価を実施した。

B. 研究方法

ナノシリカ吸入曝露試験

国立衛研において Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) を用い、NW-204 を質量濃度 10 および 30 mg/m³ になるように調整して、BALB/c 雌、4 週齢のマウスに 6 時間吸入させた。この実験を 1 日おきに 3 回実施した。最終曝露の 1 日後に曝露マウスは、先行研究と同様に SLC（実験動物ブリーダー）に委託して九州保健福祉大学動物実験施設へ移送した。

RSV マウス感染実験

吸入曝露処置を行ったマウスに RSV A2 株 3×10^5 PFU を麻酔下 (ketamine 40 $\mu\text{g/g}$, xylazine 6 $\mu\text{g/g}$ 、筋注) で経鼻感染させた。RSV 感染 5 日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで -80°C に保管した。肺は中性ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。

肺重量の計測

NW-204 の肺負荷量を測定するために、免疫・病理実験とは別にマウスを確保した。体外に残存している NW-204 のコンタミネーションを避けるため、マウス表皮を除去した上で肺を摘出して、ろ紙にて余分な水分を除去後に電子天秤で計量した。 -80°C の凍結保管後、国立衛研毒性部へ冷凍輸送した。

BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL5 (RANTES)、CCL3 (MIP-1 α) および sCD54 (sICAM-1) の定量は R&D Systems 社製の Quantikine mouse ELISA キットを用いた。なお添付のプロトコールに準じて実験を実施した。

肺組織の病理組織学的解析

肺の標本作成は (株) バイオ病理研究所に委託した。評価は HE、マッソントリクロムおよび PAS 染色下で検鏡観察により実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した (承認番号 3-1-03)。

C. 研究結果

(1) BALF 中のケモカイン・サイトカインレベルの評価結果

RSV 感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカイン CCL5 の BALF 中のレベルは、曝露量に依存し有意に上昇し、30 mg/m^3 (高用量) 曝露群では感染対照群と比較して約 2 倍まで上昇していた。また、多様な炎症の場において誘導される CCL3 も RSV 感染マウスでは、同様に NW-204 曝露で上昇していた。一方、これらのケモカインは非感染群では NW-204 曝露の有無にかかわらず、何れのマウスでも検出限界以下であった。これらの結果より、NW-204 が RSV 感染肺炎の増悪因子であることが示唆された。

前年度までの班研究において、CD54 (ICAM-1) がナノシリカ曝露による影響指標の一つであることが示されてきている。細胞表面に発現した CD54 分子は、その発現量に比例して可溶性 CD54 (sCD54) が産生されることが知られているため、ELISA 法で BALF 中の定量を行った。sCD54 量は、RSV 感染により約 3 倍増加したが、NW-204 曝露による影響は 10~20% 程度の上乗せ効果に留まった。

(2) 肺の病理組織学評価結果

HE 染色およびマッソントリクロム染色プレパラートの検鏡により、マウス肺全葉を検討した。RSV 感染のみ (0 mg/m^3 曝露) では、葉における偏りは少なく、動脈と細気管支周囲にリンパ球の浸潤など軽度の間質性の肺炎が認められた。NW-204 低用量 (10 mg/m^3) 曝露/RSV 感染群では、これらの特徴に加えて局所的なマクロファージの集束が散見され、さらに胸膜下への浸潤も見られた。高用量曝露ではさらに炎症が強まり、肺胞壁の肥厚や胸膜下へのリン

パ球とマクロファージの浸潤が認められた。一方、非感染マウスでは、高用量曝露で部分的に細気管支周囲のリンパ球浸潤はあったが、マクロファージの集束などは全く認められなかった。このように、BALF中のケモカイン・サイトカインレベルの評価結果を反映して、NW-204 曝露は RSV 感染肺炎を増悪化することが明らかとなった。

D. 考察

先行研究では、Taquann 全身曝露吸入装置での MWNT-7 複数回の吸入曝露により、カーボンナノチューブが RSV 感染最盛期での肺炎を増悪化することを示してきた。そこで、本研究ではナノシリカ NM-204 について、同様に RSV 感染 5 日後の最盛期における病態への影響を評価した。RSV 感染マウスの BALF では、RSV 肺炎の代表的なマーカーである CCL5 (RANTES)と炎症性ケモカイン CCL3 (MIP-1 α)レベルは、NW-204 曝露によりカーボンナノチューブと同様に有意に上昇していた。一方、非感染マウスにおいて、カーボンナノチューブ曝露では CCL3 の上昇が見られていたのに対して、NW-204 は全く影響が認められなかった。同様の結果は、sCD54 の曝露でも得られた。これらの結果より、今回の NW-204 の吸入曝露は、正常マウスにおいて炎症を惹起するような免疫刺激にならず、その後の RSV 感染により、細胞に取り込まれていた NW-204 が感染免疫応答を刺激して炎症を誘導したことが強く示唆された。

肺の病理組織学的な検討では、NW-204 曝露のみではリンパ球浸潤などの炎症像はあまり認められず、サイトカイン・ケモカインレベルの結果を良く反映するものであった。そして NW-204 曝露/ RSV 感染群では、ナノシリカ粒子こそ確認されな

ったがマクロファージの集束が亢進しており、これはナノシリカ粒子にプライミングを受けた肺胞マクロファージ類が RSV 感染の刺激により遊走と貪食を進めていった結果と考えられる。特に胸膜下への細胞浸潤は RSV 感染のみ、あるいは NW-204 曝露のみではほとんど観察されなかった。仮にナノシリカ粒子を貪食した細胞が RSV 感染により浸潤しているのであれば、胸膜へのナノシリカの集積に繋がり、中皮腫のようなより重篤な疾患へのリスクを高める可能性も否定的できない。今後は RSV 感染後の期間を延長するなどの検証が必要と思われる。

E. 結論

1. RSV 感染マウスモデルにおいて、ナノシリカ NW-204 の Taquann 法での吸入曝露により、RSV 肺炎は増悪化した。
2. NW-204 曝露のみでは、肺での炎症はあまり認められなかった。
3. 肺炎増悪化の指標に、ケモカイン CCL3、CCL5 および sCD54 が利用できる可能性が示された。
4. NW-204 曝露/RSV 感染により、集束化した肺胞マクロファージ類が胸膜下まで局在化していることが判明した。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Hashiguchi, S., Miyauchi, A., Komemoto, K., Ueda, T., Tokuda, K., Hirose, A., Yoshida, H., Akashi, T., Kurokawa, M., Watanabe, W. Effects of intranasal administration of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) suspension on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* (2021) 8, 215-220.

F.2 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

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