

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 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 室長

### 研究要旨

ナノマテリアル(NM)は社会実装が進む中、吸入曝露による健康リスクが強く懸念されるところであり、多様なNMの吸入曝露による毒性を効率的かつ高精度に評価できる試験法の開発および国際標準化が喫緊の課題である。そこで我々は、異物排除の根幹を担う抗原提示細胞に対するNMの影響に着目し、in vitro/in vivo 研究の連携体制による評価手法開発のための研究を行っている。具体的には、in vitro においてNMが抗原提示細胞株に与える影響の解析、NMの物性と毒性の関係性を解析するため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、さらに感染免疫に与える影響も含め in vivo 短期吸入曝露試験を実施した。代表的な皮膚感作性物質 DNCB とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露したところ、DNCB は NM-204 による THP-1 細胞の活性化を抑制した。また代表的発熱性物質である LPS とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露したところ相乗効果が認められた。さらにカーボンナノチューブ(T-MWCNT-7)を評価したところ、分散状態にかかわらず THP-1 細胞を活性化し、活性化能は分散型の方が強かった。銀ナノ粒子においては粒径により THP-1 細胞の活性化能に差が見られ、取り込みや溶出銀イオン濃度の違いによる影響が推測された。未分化および分化 THP-1 細胞の CD86, CD54, MMP-12 遺伝子の発現を指標とする新たな評価手法を確立し、その有効性を示すことができた。また、気管支上皮細胞と抗原提示細胞との共培養系を確立した。5種のナノシリカについて、約65項目の物性および in vitro / in vivo 有害性情報を収集・整理し、物性についての特性解析や in vitro/in vivo 有害性データとの関連性解析により、幾つかの物性項目の特徴を見出した。NM204の高分散乾燥検体を用いて、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； $10.3 \pm 1.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群； $25.6 \pm 2.5 \text{ mg/m}^3$ を達成した。MMADは低濃度群、高濃度群ともに $1.5 \mu\text{m}$ 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。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、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。針状の酸化チタン NM である TiDW 吸入曝露後4週において肺組織ならびに BALF 細胞の MMP12 mRNA 発現が上昇し、曝露後8週の肺組織で MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  mRNA 発現が上昇することを明らかとした。また日本化粧品工業連合会および日本化学工業協会と班員との間で意見交換会を実施し、本研究に対する産業界からの要望を伺った。

## 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  
毒性部 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

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

## A. 研究目的

ナノマテリアル(NM)は、従来の粒子に比べて単位重量当たりの比表面積が大きく、細胞内には食作用を介して直接取り込まれるという性質を有するため、健康リスクが強く懸念されており、特に生体において吸入曝露された NM が免疫系に深刻な影響を与えうることが示唆されている。そのため NM の適切なリスク評価が必要であるが、従来より行われている *in vivo* 吸入曝露試験は設備面や長期間の観察に多大なリソースを要するため、動物福祉の観点からも、*in vitro* 評価系の開発や国際標準化が喫緊の課題である。

我々のこれまでの研究により、抗原提示細胞の活性化を指標にした *in vitro* 皮膚感作性試験(h-CLAT 試験)の OECD テストガイドラインを行うとともに、NM が h-CLAT 試験において陽性と判定されることを見出している。また、我々は NM 安全性評価プ

ログラムの評価文書などの情報を用いて物性と有害性情報との関連性について多変量解析法を行い、毒性に関係する幾つかの物性項目を見出している。さらに、*in vivo* の先行研究 (H29-化学-一般-003) では、マウスの全身吸入曝露による肺胞マクロファージの機能解析を行った。

本研究班は、短期吸入曝露された各種 NM が免疫系に与える影響について *in vitro/in vivo* 試験の連携体制による毒性メカニズムの解明と評価系の開発を行い、得られた知見を基に各種 NM の短期吸入曝露による毒性発現の 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 *in vitro* 試験による抗原提示細胞活性化能の評価、物性の測定及び収集・整理を行い、その比較解析結果から毒性メカニズムを解明する。また、気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系を開発し、吸入曝露された各種 NM が免疫系に与える毒性評価法の基盤技術を確立する。*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各種 NM の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など、感染免疫を含め免疫機能への影響評価を行うことで、*in vitro* 試験法の改良や結果の生理学的意味に関する知見を得る。

## 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)

前年度評価対象物質とした二酸化ケイ素ナノマテリアル(以下、ナノシリカ)5種のうち、THP-1細胞におけるCD54の発現誘導能

が最も高かったNM-204を用いて、前年度結果の再現性およびNM-204と他の活性化物質との混合曝露について検討を行った。活性化物質として、代表的な皮膚感作性物質である2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)および代表的な発熱性物質であるLipopolysaccharide (LPS)を用いた。

更に、新たなNMとして分散性の異なるカーボンナノチューブ(分散型：T-MWCNT-7、非分散型：N-MWCNT-7)を用いて、抗原提示細胞活性化能の評価を行った。

抗原提示細胞活性化能の評価方法は、前年度同様 THP-1 細胞の活性化を指標とする *in vitro* 皮膚感作性試験法である h-CLAT (OECD TG442E)に準拠して実施し、陽性・陰性の判断だけでなく強度の指標として発現の濃度閾値(EC150 for CD86 と EC200 for CD54)を求めた。

h-CLAT試験は、被験物質適用のための懸濁液を調製し、以下のように行った。24ウェルプレートの各ウェルに $2.0 \times 10^6$  cells/ml THP-1細胞懸濁液500  $\mu$ lおよび各被験物質の分散液500  $\mu$ lを添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間静置した。被験物質の曝露濃度は予備試験の結果から最高濃度を1000  $\mu$ g/mlとし、公比 $\sqrt{10}$ で希釈して合計8濃度を設定した。陽性判定基準は、OECDテストガイドラインに従い、3回の試験のうち2回以上の試験で、1濃度でもCD86の発現量(RFI)が150%以上、またはCD54の発現量(RFI)が200%以上になった場合とした。

また研究代表者として、本研究に関する産業界の意見を伺い、今後の研究方針設定の参考にする目的で、2021年6月8日の班会議終了後に日本化粧品工業連合会技術委員会安全性部会ナノマテリアルWGおよび日本化学工業協会との意見交換会を実施した。

## 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)

B2.1. 本研究で実施する対象化合物：5種の二酸化ケイ素ナノ粒子

SiO<sub>2</sub> NPs (NM200-JRCNM02000: NM-200, NM201-JRCNM02001: NM-201, NM202-JRCNM02002: NM-202, NM203-JRCNM10404: NM-203, NM204-JRCNM02004: NM-204) were donated by European Commission, Joint Research Center (JRC), JRC Nanomaterials Repository (Ispra, Italy).

B.2.2. 物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目

OECDで公表されている Silicon dioxide (NM-200—NM-204) - Manufactured nanomaterial の Summary dossier と関連する個別 dossier、ANNEX 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、また本研究班の足利研究代表者が前年度実施した h-CLAT 毒性試験結果および飯島分担研究者が前年度実施した h-CLAT 毒性試験の溶媒中の物性評価 (Z-average(nm), Zeta potential: (mV), Pdi) を調査対象情報源とした。

B.2.3. 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

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。

#### B.2.4. 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。

①物性⇔②*in vitro* 毒性試験結果 (h-CLAT 試験) ⇔③*in vivo* 毒性試験結果 (鼻部吸入暴露試験) について、共通する物性変数について探索した。

#### 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. 各種ナノマテリアル分散液の調製

各種ナノマテリアルの分散液は以下の方法により調製した。

##### 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  $10.3 \pm 1.9$  nm, 濃度 0.99 mg/ml および一次粒径  $52 \pm 6$  nm, 濃度 1.04 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の銀イオン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) により測定した。

##### シリカナノ粒子

シリカナノ粒子は NM-200, NM-201, NM-202, NM-203, NM-204 (以上 The European Commission's Joint Research Centre (JRC)) および Sicastar-F (micromod 社) を用いた。分散液として購入した Sicastar-F 以外のシリカナノ粒子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。25 mg/ml の濃度になるようにシリカナノ粒子を培地に懸濁し、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%, 5 min の条件で 2 回処理した。これを 2 倍希釈することで stock 溶液とし、培地を用いて所定濃度に希釈した。

##### 二酸化チタンナノ粒子

二酸化チタンナノ粒子は MT-150A, MT-500B, AMT-100, TKP-102, AMT-600 (以上テイカ株式会社) および TiDW (石原産業株式会社) を用いた。二酸化チタンナノ粒子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ナノ粒子を培地に懸濁し、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 min 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. 表面マーカー発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

h-CLAT (OECD TG442E) に準拠して実施した。

##### B.3.3. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

THP-1 細胞のマクロファージ様細胞への分化は、24 ウェルプレートの各ウェルに  $2.0 \times 10^6$  cells の THP-1 細胞を播種し、400 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を含む培地で 3 日間、その後 PMA 不含培地で 5 日間培養することで行った。

24 ウェルプレートに播種・培養された未分化および分化 THP-1 細胞に対し、所定濃度の各被験物質の分散液を添加し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間静置した。培

養後の未分化および分化 THP-1 細胞は PBS で 2 回洗浄し、RNeasy mini を用いて添付のプロトコルに従い、total RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用いて添付のプロトコルに従い、cDNA を合成した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて、リアルタイム PCR により、*CD86*, *CD54*, *MMP-12*, *GAPDH* 遺伝子の発現を測定し、*GAPDH* を対照とする  $\Delta\Delta C_t$  法により遺伝子発現量を定量した。

#### B.3.4. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

プロトコルに従い、市販のヒト気管支上皮細胞の気-液界面培養を行い、気管支上皮モデルを作製した。気管支上皮モデルの作製は経上皮電気抵抗 (TEER) 測定および標本の形態観察により評価を行なった。ウェルプレートのウェルに未分化 THP-1 細胞の懸濁液を入れ、気管支上皮モデルを含むセルカルチャーインサートを設置し、上部もしくは下部よりシリカナノ粒子 (Sicstar-F) 分散液を加えた。24 時間培養後、B.2.の手法にて THP-1 細胞の *CD86*, *CD54* の発現および細胞生存率を測定した。この際、培地として THP-1 細胞の培養に用いる 10% ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地を用いた。

### 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)

#### B.4.1 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 ( $\text{SiO}_2\text{-NM204-JRCNM02004}$ ) を使用した。

#### B.4.2 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 ケージ当たり 5 匹のマウスを収容した。飼育条件は、温度;  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、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、シェファードシヤック (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  $10 \text{ mg/m}^3$  高濃度群  $30 \text{ mg/m}^3$  と設定した。各群当たり 48 匹のマウスを使用し、肺沈着量測定用に 9 匹、病理組織用に 6 匹、免疫機能実験用に 10 匹を割り当てた (表 1)。1 日 6 時間 (10:00~16:00)、5 日間の連続の全身ばく露吸入を行った。

#### 4. ダスト発生装置

検体のエアロゾル化は、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。

NM204の原末を35°Cに加温した tert-butyl alcohol (TBA) 加えて 2 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 Taquann システムで使用するカートリッジに充填した。低濃度群では 3.5 mL/cartridge、高濃度群では 10.5 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。ばく露チャンバーの総換気流量は 32.5 L/min (基礎換気流量; 29.5 L/min、エアロゾルモニター用サンプリング (CPC); 1.5 L/min、質量濃度測定; 1.5 L/min) と設定した。

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

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

#### 5. ばく露チャンバー

動物を収容し検体をばく露するばく露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものを、Ver3.0用に改変したものを使用した。

#### 6. ばく露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

ばく露チャンバー内のエアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度 (CPM; count per minutes) と質量濃度 (mg/m<sup>3</sup>) 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、φ 55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂バインダーガラス繊維フィルター (Model TX40HI20-WW、φ 55mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm): 99.9%、東京ダイレック) を装着し、サンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学) に接続して 1.5 L/min の流量でばく露時間の 2 時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 1.5 L/min × 120min = 180 L から 1 m<sup>3</sup> 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的中位径測定 Mass Median Aerodynamic Diameter

## (MMAD)

エアロゾルの空気動力的中位径測定は、Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI)を用いた。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。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的人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、喉頭部を絹糸で結紮して開胸時の肺の虚脱を防止した後、開胸し、右心室に翼状針(21G、SV-21CLK-2、テルモ株式会社)を刺入して生理食塩水(大塚生食注、大塚製薬工場)を約40cm水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入して血液を除去した後、回路を切り替えて4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(フジフィルム和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を同静水圧にて約3分灌流して固定後、同組成固定液に浸漬固定を行った。流量は点滴調節器により適宜調

節した。組織沈着量測定用の動物は、開胸して肺を取り出し、肺門部で気管を除去して湿重量測定後ホルマリン固定した。

免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針(サーフローフラッシュ18G、テルモ)を気管に挿入しPBSを1mL注入・吸引採取する操作を2回繰り返し、BALを採取した。

## 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)

R2年度に実施した実験で得られたサンプル解析の継続を実施した。Taquan 処理した針状酸化チタン(TiDW)の吸入暴露後、4週および8週での肺組織およびBALF細胞からRNAを抽出し、定量RT-PCR法にて各種関連遺伝子mRNA発現を検討した。加えて、加えて、次年度に計画しているナノシリカ(NM-204)の全身吸入による肺免疫反応の解析を準備しており、これまでのNM吸入暴露実験との比較検討を行う予定である。また、RAW264.7細胞を用いて、T-CNTおよびFLT-300(TiDW)を添加することによる細胞形態、増殖、MMP12 mRNA発現を検討した。

## B.6. ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響(渡辺)

### B.6.1. ナノシリカ吸入曝露試験

国立衛研においてTaquan 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30mg/m<sup>3</sup>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。

### B.6.2 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  $3 \times 10^5$  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  $-80^\circ\text{C}$  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。

### B.6.3. 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。 $-80^\circ\text{C}$  の凍結保管後、国立衛研毒性部へ冷凍輸送した。

### B.6.4. BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL5 (RANTES)、CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) 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。

### B.6.5. 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)

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)

ナノシリカ NM-204 単独の h-CLAT 試験を実施した結果、CD86 の発現誘導は認められず、CD54 については、10~100  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で濃度依存的に強い発現誘導が認められ、前年度の結果の再現性が得られた。

次に DNCB の適用濃度を固定 (4  $\mu\text{g/mL}$ ) し、NM-204 と混合曝露 (適用濃度: 0.00316~100  $\mu\text{g/mL}$ ) した。CD86 の RFI は、294.3~316.8 となり、DNCB 単独の RFI である  $318.4 \pm 30.1$  (n=3) と同程度であったことから、混合曝露により相加・相乗効果はないと判断された。CD54 においては、混合曝露の場合の RFI は 462.8~518.3 と DNCB 単独曝露の場合の RFI である  $475.9 \pm 176.3$  (n=3) と同程度の値を示し、10~100  $\mu\text{g/mL}$  の NM-204 単独曝露で認められた RFI の上昇は認められず、DNCB との混合曝露により抑制されていた。

発熱性物質 LPS (1 ng/mL) 単独処理における RFI は、CD86 では 102.3 (陰性)、CD54 では 1404.6 であり、CD54 のみ非常に強い発現亢進が認められた。適用濃度を固定した LPS (1 ng/mL) と適用濃度を振った NM-204 (0.00316~100  $\mu\text{g/mL}$ ) との混合曝露では、NM-204 の 31.6 および 100  $\mu\text{g/mL}$  で CD86 の RFI が 150 以上 (陽性) となった。NM-204 および LPS はいずれも単独曝露における CD86 の発現亢進はないため、混合曝露による相乗効果と考えられた。一方 CD54 については、NM-204 単独曝露で亢



進作用の認められる 10 µg/mL 以上の濃度範囲で LPS による亢進作用との加算を上回る発現亢進が見られたことから、相乗効果と考えられた。

カーボンナノチューブの評価に際し、まず試験に適用する媒体を検討した。ナノシリカで使用した超純水を用いて超音波処理による分散状態を確認したところ、均一な分散状態を得られなかった。そこで、吸入暴露試験で使用実績のある polysorbate 80 (HX2) で検討したところ、T-MWCNT-7 (分散型) では、ラボミキサーおよび超音波処理により、stock solution (0.1 mg/mL) および working solution (10.0 µg/mL) とともに良好な分散状態が得られた。N-MWCNT-7 (非分散型) についても、stock solution では粒子の凝集がみられたが、分散状態は良好であった。また、polysorbate 80 (HX2) の試験適用可能な添加量を検討した。その結果、0.1 v/v% 以下において、細胞生存率が 90% 以上となったことから、polysorbate 80 (HX2) の最終添加量を 0.1 v/v% とした。以上の検討よりカーボンナノチューブの最高適用濃度を 10.0 µg/mL とし、公比  $\sqrt{10}$  で希釈した 8 用量を設定して h-CLAT 試験を実施した。非分散型のカーボンナノチューブである N-MWCNT-7 について、CD86 では発現亢進作用が認められなかったが、CD54 では 3.16 µg/mL 以上で発現亢進が認められ、10 µg/mL において約 6 倍 (RFI=596.8) となり、陽性となる濃度閾値 (EC200 for CD54) は 3.20 µg/mL と算出された。分散型では、CD86 について弱い発現亢進作用が認められ陽性となった。CD54 については 3.16 µg/mL 以上で強い発現亢進が認められ、10 µg/mL において約 10 倍 (RFI=1001.3) となった。分散型の陽性となる濃度閾値 (EC150 for CD86, EC200 for CD54) はそれぞれ 8.46

µg/mL、1.35 µg/mL と出された。

また、産業界との意見交換会では、本研究の背景、目的および得られた研究成果について報告を行い、日本化粧品工業連合会、日本化学工業協会それぞれより規制に関する最新の情報を紹介いただくとともに、本研究に対する以下のような要望を伺った。

- ・日本だけでなく、グローバルの規制によって産業界は影響を受けることから、国際的に通用する研究であること
- ・ハザード評価でなく、リスク評価のための許容値設定に役立つ研究であること
- ・免疫毒性だけでなく、吸入毒性全体への進展も期待
- ・存在状態が影響することから、実際のヒトへの曝露状況を踏まえた安全性評価法であること
- ・動物実験を行うことがほぼ不可能である業界であるため、動物福祉に配慮した安全性評価法であること
- ・ナノ材料に特徴的な多様性を考慮し、効果 (科学的正確性) と共に効率性や動物福祉も意識した安全性評価試験の開発
- ・誤った利用、誤った結果解釈に繋がらないよう、試験法の特徴を十分に理解した開発と活用目的 (スクリーニングなど) の提案

## 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 65 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. 二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO<sub>2</sub> NPs) の階層的クラスタリング解析による類似度の評価

収集した 65 項目の物理化学的性状 (物性) データについての特性解析を実施した結果、類似度は 3 つのグループで示された。また、最初に大きくクラスター化した要因は PCA (主成分分析法) によりコーティングの有無であった。

C.2.3. 二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO<sub>2</sub> NPs) の物性データと抗原提示細胞活性化能の関連性解析

5 種の SiO<sub>2</sub> NPs について OECD の公開データからと分担研究の飯島先生からの DLS 測定データより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) との関連性について調べるため、多変量解析 (OPLS 法) を実施した。その結果、毒性と関連する変数 (物性項目) が Loadings Plot の横軸から探査可能であることが示唆された。さらに信頼度を加味した解析 (S-plot) を進めた結果、寄与度 0.2 以上、信頼性 0.6 以上の場合の毒性に寄与する変数 (物性項目) として、毒性が強い (NM201) のは、正の相関の高い変数 (物性項目 `_AggZaverage_Buffer`、`Total impurity:Total non-SiO2 content including coating and impurities (% w/w)`、`Impurity_Al`) として、また、毒性が極めて強い (NM204) のは、負の相関の高い変数 (物性項目 `_DustinessInhaSD`、`DustinessRespSD`、`Morphology of aggregates/agglomerates: Angular_low sphericity`、`Pdi:Ultra-pure water dispersion`、`Aspect ratio`) として示唆された。

C.2.4. 二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO<sub>2</sub> NPs) の物性データと *in vivo* 毒性試験データの関連性解析

OECD の公開データから収集した 5 種の SiO<sub>2</sub> NPs の物性データと *in vivo* 毒性試験データ (鼻部吸入暴露試験) との関連性について調べるため、多変量解析 (OPLS 法) を実施した。鼻部吸入暴露試験結果の毒性に寄与する重要な物性項目とした特徴変数を解析した結果、毒性が弱い (NM200、NM201、NM204) は、正の相関の高い変数 (物性項目 `_ParticleSize_1`、`CoatingYorN(Yes)`、`AggZaverage_1`、`Agg2Rg1`、`CrystalImpurity`、`Micropore_Vol`、`Sphericity`、`PourWaterContent`、`MicroporeVol`、`MMAD1`、`MMAD2`) として、また、毒性が強い (NM202、NM203) は、負の相関の高い変数 (物性項目 `_FeretMin(nm)`、`Impurity_Ca`、`Coating_N(No)`、`Agg`、`AggMorphology(nm)`、`AggIsoElecPointMean(pH)`、`AspectRatio`、`SAXS_SurfArea(m2/g)`) として挙げられた。

C.2.5 二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO<sub>2</sub> NPs) の物性データと *in vitro* / *in vivo* 毒性試験結果データ間の共通の物性項目の探索

*in vitro* / *in vivo* 毒性試験結果データ間の毒性に共通する物性の相関を Scatter plot にて探索した結果、相関係数 (R=0.4128) は、正の相関であった。相関はあまり高くはないが、元データを比較してみると信頼性若しくは寄与度は下がるものの散布図の直線上に近い幾つかの物性について共通物性項目 [`Impurity_Al`、`Feret Max (nm)`、`Micropore surface area (m2/g)`、`Pdi:Ultra-pure water dispersion (intra vial study)`] として挙げられた。今回、相関が低かった理由の一つに、NM204 の物性の欠損データの多さが影響したと考えられた。

### 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. 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の評価

直径約 10 nm および 50 nm いずれの銀ナノ粒子処理においても CD86 および CD54 の発現の増加が見られた。直径約 10 nm の銀ナノ粒子の 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 127.6 µg/ml, 118.4 µg/ml であり、直径約 50 nm の銀ナノ粒子は 159.5 µg/ml, 122.9 µg/ml であり、直径約 10 nm の銀ナノ粒子の方がわずかに低濃度であった。

#### C.3.2. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

各種シリカナノ粒子処理後の未分化および、分化 THP-1 細胞における *MMP-12*, *CD86*, *CD54* 遺伝子の発現については、ナノ粒子の種類により、異なる *MMP-12* および *CD54* の発現亢進が見られた。全体的な傾向として、未分化 THP-1 の方が遺伝子発現の上昇幅が大きい傾向が見られた。一方、ナノ粒子曝露による CD86 の発現変化はほとんど認めなかった。

二酸化チタンナノ粒子処理後の未分化および、分化 THP-1 細胞における *MMP-12*, *CD86*, *CD54* 遺伝子の発現については、ナノ粒子の種類により、異なる *MMP-12* および *CD54* の発現亢進が見られた。ナノシリカ粒子と同様にナノ粒子曝露による CD86 の発現変化はほとんど認めなかった。

#### C.3.3. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

気管支上皮細胞の気-液界面培養 14 日目において緻密な構造が見られるとともに

繊毛の運動が観察された。TEER 測定では 500-600 Ω cm<sup>2</sup> となり未分化状態での約 70 Ω cm<sup>2</sup> より上昇していた。

作製された気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養を行った。単培養と気管支上皮細胞との共培養の THP-1 細胞との間で CD54, CD86 の発現や細胞生存率に差は見られなかった。次に、気管支上皮細胞の上部または下部よりシリカナノ粒子 (Sicstar-F) を添加した。気管支上皮細胞の上部からの曝露においては、単培養 THP-1 への曝露よりも低いものの CD54 の発現の増加が見られた。気管支上皮細胞の下部からの曝露においては、単培養 THP-1 への曝露のおよそ 2 倍の CD54 の発現が見られた。

### 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 マウス全身ばく露吸入実験

NM204 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; 10.3 ± 1.1 mg/m<sup>3</sup>、高濃度群; 25.6 ± 2.5 mg/m<sup>3</sup> (平均値 ± SD) であった。3 回の測定を行った MMAD は低濃度群; 1,439 nm (og: 3.2~4.2)、高濃度群; 1,468 nm (og: 3.5~4.0) であった。

エアロゾルの累積分布から、粒子径 100 nm から急激に立ち上がる分布であった。6 時間の吸入ばく露実験において使用した総検体量は、低濃度群、高濃度群でそれぞれ 616 mg、1,848 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<sup>3</sup> 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 52.6 mg/m<sup>3</sup>、157.9 mg/m<sup>3</sup> 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 19.6%、16.2%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  $121.6 \pm 4.9 \text{mg}$ 、低濃度群  $130.8 \pm 3.4 \text{mg}$ 、高濃度群  $138.6 \pm 9.2 \text{mg}$  であり、高濃度群では対照群に比較して有意に増加した。

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.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)

TiDW の吸入暴露後、4 週および 8 週において肺組織における F4/80、iNOS、CCR2、CD206、Arg1、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TGF- $\beta$ 、TLR-4、CD54/ICAM-1、Tim4 の mRNA の発現は対照群と比較して変化はなかったが、TiDW 暴露後 8 週において、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  mRNA 発現が対照群に比較して有意に上昇していた。一方、BALF 細胞における F4/80、MCP-1、iNOS、CCR2、CD206、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 、TLR-4、CD54/ICAM-1 および Tim4 mRNA 発現は TiDW 暴露で変化は認められなかったが、暴露後 4 週での MMP-12 mRNA 発現は対照群に比較して有意に上昇していた。この結果は肺組織における MMP12 mRNA の発現上昇と一致する (令和 2 年度報告済み)。

RAW264.7 細胞への T-CNT および TiDW の添加による変化を観察すると、T-CNT の添加で細胞のサイズが対照細胞に比較して有意に大きくなっていったが、TiDW の添加では T-CNT 処理ほどは大きくなっていなかった。また、TiDW 暴露によって細胞数あるいは生存率に影響は観察されなかった。加えて、T-

CNT の添加で上昇していた MMP12 mRNA 発現は TiDW 刺激では上昇しなかった。

#### C.6. ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響 (渡辺)

##### C.6.1. 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、 $30 \text{mg/m}^3$  (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。

##### C.6.2. 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 ( $0 \text{mg/m}^3$  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<sup>3</sup>) 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

##### 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)

これまで本研究では、様々なナノマテリアルが抗原提示細胞株である THP-1 細胞を活性化することを見出したが、そのメカニズムを解明するために、同様に活性化能がある皮膚感作性物質と発熱性物質との混合曝露を検討した。その結果、代表的な皮膚感作性物質である DNCB は NM-204 による THP-1 の活性化をむしろ抑制し、代表的な発熱性物質である LPS は NM-204 による THP-1 の活性化を相乗的に亢進することが明らかとなった。以上のことから、ナノマテリアル NM-204 による THP-1 の活性化は、皮膚感作性物質や発熱性物質による活性化とは異なるメカニズムによる可能性が考えられた。今後はこれら活性化物質による THP-1 細胞のインフラマソームや NF- $\kappa$ B の活性化を解析することで、ナノマテリアルによる抗原提示細胞の活性化メカニズムを解明する予定である。

今回カーボンナノチューブが THP-1 細胞を活性化することを新たに見出した。分散型の活性化能が高かったのは、細胞への取り込みやすさと関連があると考えた。今後性質の異なるカーボンナノチューブについて h-CLAT 試験による評価を行い、物性と活性化の関連などの解析を行う。

研究分担者の渡辺は、本年度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 *in vivo* 吸入曝露試験による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響評価を実施した。その結果、RSV 感染マウスのマウスでは、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 $\alpha$ ) レベルは、NW-204 曝露により有意に上昇していた。一方、非感染マウスにおいて、NW-204 は全く影響が認められなかった。以上より、今回の NW-204 の吸入曝露は、正常マウスにおいて単独では炎症を惹起するような免疫刺激にならず、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。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。

一方我々の分担研究においては、グラム陰性菌由来の LPS とナノシリカ NM-204 と同時曝露による *in vitro* 抗原提示細胞活性化について相乗効果が認められた。先行研究においても、THP-1 細胞にナノシリカまたは LPS を暴露した THP-1 細胞の活性化が評価されており、ナノシリカそのものには NF- $\kappa$ B 活性化能はなかったが、LPS による NF- $\kappa$ B 活性化に対し、ナノシリカはプライミング効果を示したり<sup>1)</sup>。したがって、TRL (Toll-

like receptor)を介したLPSやウイルスRNAなどのPAMPs (pathogen-associated molecular patterns)による抗原提示細胞の活性化に対し、ナノシリカは異なるメカニズムにより相乗的に働く可能性が考えられ、本研究班の知見はそれを裏付けるものと考ええる。

1) M. G. Bianchi et al., Pyrogenic and Precipitated Amorphous Silica, Nanoparticles Differentially Affect Cell Responses to LPS in Human Macrophages, *Nanomaterials* 2020, 10, 1395; doi:10.3390/nano10071395

また、産業界との意見交換会において、科学的正確性があり、動物福祉にも配慮した、NMの国際的な安全性評価方法の開発が強く望まれていること、さらにNMのみならず化学物質の吸入毒性を評価する試験法や、生体レベルでのリスク評価を可能にする試験法開発への期待も大きいことが伺えた。難易度が高い課題も多いが、NMの社会実装を行っている産業界からの貴重な意見として、本研究班の今後の研究に活用していくべきと考える。

## 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)

物性データと抗原提示細胞活性化能 (h-CLAT 試験法結果)の関連性解析の結果から、毒性の極めて強いNM204の物性は、巻き上がり度が高いことが示唆された。一方で、毒性の強いNM201は、他の検体よりも二次粒子径としての凝集性が高く、また全体の不純物の含有率が多いが、不純物としてのアルミニウムが特徴的に挙がってきている。これは恐らくコーティング材由来のアルミニウムと推察された。従って、NM201の毒性の強さに由来する物性は、凝集のし易さ

とコーティング材の性質が影響しているものと考えられた。

*in vivo* 毒性試験データ(鼻部吸入暴露試験)との関連性解析の結果から、毒性の弱い(NM200、NM201、NM204)は、一次粒子径が大きく、コーティングされており、二次凝集性が高い、巻き上がりにくい物性の性質を有することが示唆された。一方で、毒性の強い(NM202、NM203)は、フェレット径は大きく、不純物のカルシウムの含有(NM200、NM201、NM203は欠損値)、コーティングが無く、高いアスペクト比と表面積が大きい物性の性質を有する事が示唆された。また、物性のみクラスタリングで最初に大きくクラスタ化した要因もコーティングの有無であったことから、クラスタ化の最初の類似度と *in vivo* の毒性結果との関連性について反映している可能性が示唆された。

*in vitro* / *in vivo* 毒性試験結果データ間の毒性に共通する物性項目の探索では、相関が低かった理由の一つに、NM204の物性の欠損データが多いことが影響したと考えられたことから、欠損データを作らないことや解析では補っていくことの検討が必要であると考ええる。

## D.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明 (飯島)

### D.3.1. 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の評価

EC150(CD86発現が150%を超える濃度)の比較において、直径約10nmの銀ナノ粒子の127.6 µg/mlに対し、直径約50nmの銀ナノ粒子は159.5 µg/mlであり、直径約10nmの銀ナノ粒子の方が、抗原提示細胞活性化能がわずかに高い可能性が示された。

この要因として、粒子径による取り込み挙動の変化と溶出銀イオン濃度の影響が考えられる。銀ナノ粒子からは銀イオンの溶出が見られ、溶出率は直径約 50 nm の銀ナノ粒子の 0.1% に対し、直径約 10 nm の銀ナノ粒子では 2.0% と高くなっていた。銀ナノ粒子としてだけでなく銀イオンとしても作用していることが示唆された。

#### D.3.2. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

シリカナノ粒子処理において、未分化および分化 THP-1 細胞いずれにおいても濃度依存的、粒子種依存的な *MMP-12* の発現亢進が見られ、ナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の新たな指標としての有効性が示された。未分化 THP-1 においては、沈降法により調製された粒子 (NM-204, NM200, NM201) と比較して、高熱法 (NM-203、NM-202) およびストーバー法 (Sicastar-F) により調製された粒子の方が *CD54*, *MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、粒子調製法による抗原提示細胞活性化能の違いが評価できることが示唆された。同一調製法においては、流体力学径が小さいものほど *CD54*, *MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、抗原提示細胞の活性化は粒子の細胞への取り込みに依存している可能性が示唆された。一方、分化 THP-1 においては、流体力学径の影響はほとんど見られず、分化による貪食能が高まったためと考えられた。高熱法により調製されたナノ粒子において *CD54* が発現亢進したのに対し、*MMP-12* の発現はほとんど変化せず、*CD54* と *MMP-12* の発現の乖離が見られた。今後、この原因や毒性評価における意義について検討を進める。

二酸化チタンナノ粒子処理においても、

未分化および分化 THP-1 細胞いずれにおいても濃度依存的、粒子種依存的な *MMP-12* の発現亢進が見られ、指標としての有効性が示された。未分化 THP-1 においては、ルチル型粒子 (MT-150A, MT-500B) と比較して、アナターゼ型粒子 (AMT-100, AMT-600, TKP-102) の方が *CD54*, *MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、結晶型による抗原提示細胞活性化能の違いが評価できることが示唆された。ルチル型での比較においては、流体力学径が小さいものほど *CD54*, *MMP-12* の発現上昇が大きい傾向が見られ、シリカナノ粒子と同様に細胞への取り込みの依存が考えられた。未分化・分化 THP-1 いずれにおいても、ルチル型の中で針状結晶の TiDW が *CD54* と *MMP-12* の高発現を誘導し、形状による抗原提示細胞活性化能の違いも示唆された。

#### D.3.3. 気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系の構築

気管支上皮細胞との共培養において気管支上皮細胞の上部からシリカナノ粒子を曝露した際にも THP-1 細胞の *CD54* の発現亢進がみられた。気管支上皮細胞を透過した Sicastar-F もしくは Sicastar-F を曝露された気管支上皮細胞からの分泌物により THP-1 細胞の *CD54* 発現量が増加したことが示唆された。気管支上皮細胞の下部から直接曝露した際の *CD54* の発現量は、THP-1 単培養時の 2 倍ほどであった。気管支上皮細胞からの分泌物が抗原提示細胞の活性化能 (*CD54* 発現量) に影響を及ぼすことが示唆され、気管支上皮細胞の分泌する液性因子の影響と考えられる。本共培養系が、気管支上皮細胞と抗原提示細胞との細胞間クロストークを含めた評価系となりうる可能性が示された。

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

本分担研究で用いたナノシリカ NM204 は、分散性が良好であり Taquann 法および Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 により容易にエアロゾル化することが可能であった。NM204 のエアロゾル特性として、MMAD は低濃度群、高濃度群ともに約 1,500 nm (1.5 $\mu$ m)であり肺胞領域まで到達可能とされる MMAD < 3 $\mu$ m を達成してい

る。エアロゾルの粒径分布の指標となる og は 3.2~4.2 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。エアロゾルの累積分布において明らかであるように、NM204 エアロゾルは、累積粒子径が 100 nm から急激に立ち上がる分布であるため、MMAD がこのような値を示すと考えられる。一方、エアロゾル化効率は 20%程度であり、先行研究にて使用した多層カーボンナノチューブの一つである MWNT-7 (三井) の約 60%から比較すると 1/3 程度の値である。CPC の濃度推移を比較すると、NM204 はカートリッジからエアロゾルが噴射された直後の CPC カウントの立ち上がりは MWNT-7 に比較して緩やかである。濃度低下は同様であることから、沈降速度は同じであるが、カートリッジから噴射された検体のうち、サブチャンバーでのトラップされる量が多いのかもしれない。

NM204 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。肺重量に関しては、ばく露終了直後である Day0 において、低濃度群において増加傾向、高濃度群では有意に増加していた。4 週間及び 8 週間では有意な変化は認められなかった。NM204 の肺負荷量は 5 日間の連続ばく露で次第に増加するため、その影響と考えられるが、ばく露終了後は比較的速やかに肺から排泄されるのかもしれない。

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、NM204 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)

TiDW 吸入暴露後 4 週にて肺組織ならびに BALF 細胞にて MMP12 mRNA 発現が上



昇し、暴露後 8 週の肺組織で MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  mRNA 発現が上昇したことから、TiDW が肺内で暴露されると、肺胞マクロファージの MMP12 を介したが活性化が誘導され、その後炎症性変化が肺組織に広がっていった可能性が考えられる。In vitro では TiDW のマクロファージへの直接の作用を確認すると、T-CNT で見られたような MMP12 発現上昇は確認されなかったことから、ナノマテリアルの形状や性状によってマクロファージの動態は大きく異なっていることが示唆された。

なお、本実験を通してマウスへの健康危機に関する症状、兆候などは観察されなかった。

#### D.6. ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響 (渡辺)

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 $\alpha$ ) 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か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**

### 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)

代表的な皮膚感作性物質 DNCB とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露し、活性化の指標である CD86 および CD54 の発現量を測定したところ、DNCB は NM-204 による THP-1 細胞の活性化を抑制した。また代表的発熱性物質である LPS とナノシリカ NM-204 を THP-1 細胞に混合曝露したところ、THP-1 細胞の活性化について相乗効果が認められた。以上より、ナノマテリアルによる活性化は皮膚感作性物質や発熱性物質による活性化とは異なる

メカニズムによるものと考えられた。今後こうしたナノマテリアルによる抗原提示細胞の活性化メカニズムを解明するために、飯島先生とインフラマソーム活性化を検討する予定である。

さらに新たなナノマテリアルとしてカーボンナノチューブ(T-MWCNT-7)を評価したところ、分散状態にかかわらず THP-1 細胞を活性化し、活性化能は分散型の方が強かった。今後カーボンナノチューブについて THP-1 細胞の活性化能を検討する予定である。

日本化粧品工業連合会および日本化学工業協会と意見交換会を行い、本研究について理解を深めていただくとともに、産業界からの様々な要望を伺った。本研究は NM の規制の観点から産業界と連携すべきと考えており、次年度も同様の意見交換会を実施する予定である。

## 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)

5 種の二酸化ケイ素ナノ粒子(SiO<sub>2</sub> NPs)について、公開された文献や本研究班の分担研究者の測定値などからの約 65 項目の物性および *in vitro*/*in vivo* 有害性情報を収集・整理した。*in vitro* 有害性情報は本研究班の足利代表者研究者が実施した h-CLAT 法による 5 種の SiO<sub>2</sub> NPs の THP-1 細胞を用いた細胞生存率、CD86 および CD54 発現に与える影響について、*in vitro* 有害性情報は、OECD の公開データより鼻部吸入暴露試験\_気管内投与試験結果について纏めた。これらの物性および *in vitro/in vivo* の有害性情報の収集データについては、解析用データに整理・データマイニング後、収集した物性についての特性解析や *in vitro/in vivo* 有害性

データとの関連性解析により幾つかの物性項目の特徴を見出した。今後は *in vitro/in vivo* 間の有害性データに共通な物性との相関解析の算出方法について改善し進めていく予定である。

## E.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明 (飯島)

銀ナノ粒子においては粒径により抗原提示細胞の活性化に差が見られ、取り込みや溶出銀イオン濃度の違いによる影響が推測された。現在、ウェスタンブロッティングを用いて、毒性発現における細胞内経路の解析も進めている。

従来の h-CLAT に倣った、フローサイトメーターを用いて測定される THP-1 細胞の CD86, CD54 発現を指標とする手法に加え、未分化および分化 THP-1 細胞の CD86, CD54, MMP-12 遺伝子の発現を指標とする新たな評価手法を確立し、その有効性を示すことができた。また、気管支上皮細胞と抗原提示細胞との共培養系を確立した。

## 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)

NM204 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； $10.3 \pm 1.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群； $25.6 \pm 2.5 \text{ mg/m}^3$ を達成した。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに  $1.5 \mu\text{m}$  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では、高濃度群で有意な増加がみられたが、4 及び 8 週間後では変化はみとめられなかった。

#### 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)

マクロファージのMMP12を起点と活性化機構がナノマテリアルの毒性評価法の確立に重要な位置を占めている可能性が考えられ、*in vitro* および *in vivo* の評価系を総合した毒性試験が必要であると考ええる。

#### E.6. ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響 (渡辺)

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. 健康危険情報**

該当なし

#### **G. 研究発表**

##### G.1. 論文発表

1. Ambe K, Suzuki M, Ashikaga T, Tohkin M: Development of quantitative model of a local lymph node assay for evaluating skin sensitization potency applying machine learning CatBoost, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2021;125, 105019.
2. Nishida H, Ohtake T, Ashikaga T, Hirota M, Onoue S, Seto Y, Tokura Y, Kouzuki H: In chemico sequential testing strategy for

assessing the photoallergic potential, *Toxicology in Vitro*, 2021; 77, 105245

3. Narita K, Okutomi H, Kawakami K, Sui H, Basketter D, Ashikaga T: Behavior of Chemical Respiratory Sensitizers in *in Vitro* Methods for Skin Sensitization, *AATEX*, 2021; 26(1), 9-18.
4. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M. Establishment of a Threshold of Toxicological Concern Concept for Skin Sensitization by *in Vitro/in Silico* Approaches. *日本化粧品学会誌*. 2021;45(4):331-5.
5. Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals, *Fundam Toxicol, Sci*. 2021,8(6),169-175, doi.:10.2131/fts.8.169
6. 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;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873.
7. 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- $\mu$ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass

- spectrometry imaging, *Int J Pharm.* 2021;595:120241.  
doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120241.
8. Chen S, Tamaki N, Kudo Y, Tsunematsu T, Miki K, Ishimaru N, Ito HO. Protective effects of resveratrol against 5-fluorouracil-induced oxidative stress and inflammatory responses in human keratinocytes. *J Clin Biochem Nutr.* 2021, 69(3):238-246.
  9. Shao W, Fujiwara N, Mouri Y, Kisoda S, Yoshida K, Yoshida K, Yumoto H, Ozaki K, Ishimaru N, Kudo Y. Conversion from epithelial to partial-EMT phenotype by *Fosobacterium nucleatum* infection promotes invasion of oral cancer cells. *Sci Rep.* 2021, 11(1): 14943.
  10. Yoshikawa Y, Izawa T, Hamada Y, Takenaga H, Wang Z, Ishimaru N, Kamioka H. Role of B[a]P and FICZ in subchondral bone metabolism and experimental temporomandibular joint osteoarthritis via AhR/Cyp 1a1 signaling axis. *Sci Rep.* 2021, 11(1): 14927
  11. Ohigashi I, Frantzeskakis M, Jacques A, Fujimori S, Ushio A, Yamashita F, Ishimaru N, Yin D, Cam M, Kelly MC, Awasthi P, Takada K, Takahama Y. The thymoproteasome hardwires the TCR repertoire of CD8<sup>+</sup> T cells in the cortex independent of negative selection. *J Exp Med.* 2021, 218(4):e20201904. doi:10.1084/jem.20201904.
  12. 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:v, 215-220.
  13. Taquahashi Y, Tsuruoka S, Morita K, Tsuji M, Suga K, Aisaki K and Kitajima S, A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation, *Fundam Toxicol, Sci.* 2022, 9(1),17-21, doi.org/10.2131/fts.9.17
  14. Sugiura D, Okazaki I, Maeda TK, Maruhashi T, Shimizu K, Arakaki R, Takemoto T, Ishimaru N, Okazaki T. PD-1 agonism by anti-CD80 inhibits T cell activation and alleviates autoimmunity. *Nat Immunol.* 2022;23(3);399-410. doi: 10.1038/s41590-021-01125-7.
  15. Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Kudo Y, Ishimaru N, Matsushita K. The priming potential of interferon lambda-1 for antiviral defense in the oral mucosa. *Inflammation.* 2022;45(3), 1348-1361. doi: 10.1007/s10753-022-01624-1
  16. Iwata K, Kawarabayashi K, Yoshizaki K, Yian T, Saito K, Sugimoto A, Kurogoushi R, Yamada A, Yamamoto A, Kudo Y, Ishimaru N, Fukumoto S, Iwamoto T. von Willebrand factor D and EGF domains regulate ameloblast differentiation and enamel formation. *J Cell Physiol.* 2022, 237(3):1964-1979. doi: 10.1002/jcp.30667
  17. Ohno Y, Okiyama A, Hirose K, Fukuhara. The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2022, 441, 115974
- G.2. 学会発表
1. 新垣理恵子, 清水朱里, 佐藤真美, 俵宏

- 彰, 常松貴明, 石丸直澄 唾液腺における常在型自然リンパ球の同定とシェーグレン症候群病態への関与 第110回日本病理学会学術集会 (2021.4.23, 東京)
2. 佐藤真美, 牛尾綾, 常松貴明, 新垣理恵子, 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 第 110 回日本病理学会学術集会 (2021.4.23, 東京)
  3. 高橋祐次: 粉体の吸入剤研究開発を推進する非臨床安全性評価手法の開発、ラウンドテーブルセッション、日本薬剤学会第 36 年会、招待講演 (2021.5.14, On line)
  4. 石丸直澄 口腔科学を牽引する基礎研究の展望 日本補綴歯科学会 第 130 回記念学術大会シンポジウム (2021.6.20, On line)
  5. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の解析, 第48回日本毒性学会学術年会(2021.7.7-9, 神戸)
  6. 石丸直澄, 新垣理恵子, 常松貴明, 高橋祐次, 菅野純 ナノマテリアルの吸入暴露による肺免疫応答と線維化の分子機構 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.9, 神戸)
  7. 山本 栄一、高橋祐次: 吸入剤に係る薬物動態の新規イメージング技術、第 48 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム (2021.7.9, 神戸)
  8. 田邊郁也, 石川晋吉, 石森かな江, 橋爪恒夫, 善本隆之, 足利太可雄: 呼吸器特異的な免疫応答を再現した in vitro 呼吸器感作性試験の開発, 第 48 回日本毒性学会学術年会(2021.7.7-9, 神戸)
  9. Ohno A, Watanabe M, Hirose A. : ナノマテリアルの物理化学的性状に基づく毒性評価手法への応用, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-9, 神戸)
  10. Ashikaga T: Skin Sensitization Testing Strategy for Japan, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11)(2021.8.24, On line)
  11. Ohno A, Okiyama Y, Hirose A, Fukuhara K: Docking study on the position of nitro groups affecting the mutagenicity of nitroarenes, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催) , Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA, On line)
  12. Fukuhara K, Ohno A : C-Methylated fisetins with strong antioxidative activities, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催) , Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA, On line)
  13. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M: Establishment of a risk assessment method and threshold of toxicological concern (TTC) concept for skin sensitization by non-animal approaches, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11) (2021.8.27&31, On line)
  14. 相場節也, 木村裕, 足利太可雄, 小島肇: Multi-ImmunoToxicity Assay とガイドンス化状況 , 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会(2021.9.7, On line)
  15. 足利太可雄: 皮膚感作性-IATA に基づく OECD ガイドライン-, 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会(2021.9.7, On Line)
  16. 佐藤真美, 牛尾綾, 福田一稀, 俵宏彰, 大塚邦紘, 常松貴明, 新垣理恵子, 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病態探索 第 29 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24, On line)

17. 田村海, 新垣理恵子, 太田康, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスを用いたドライノーズ病態の解析 第 29 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24, On line)
18. 俵宏彰, 新垣理恵子, 大塚邦紘, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスを用いた M3PAM を用いた治療効果とその作用機序 第 29 回日本シェーグレン症候群学会学術集会 (2021.9.24, On line)
19. Fukuhara K, Ohno A : Potent radical-scavenging activities of C-methyl fisetins, 第 80 回日本癌学会学術総会 (ハイブリッド開催) (2021.9.30-10.2, 横浜)
20. 石丸直澄 基礎歯学研究の進化と展望 第 63 回歯科基礎医学会先端歯学国際教育ネットワークシンポジウム (2022.10.9, On line)
21. Ohno A, Okiyama Y, Hirose A, , Fukuhara K : In silico analysis of mutagenicity of nitro polycyclic aromatic hydrocarbons, 日本環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会 (ハイブリッド開催) (2021.11.1-2, 横須賀)
22. Taquahashi Y, Yamamoto E, makiko Kuwagata M, Saito H and Kitajima S, Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler formulation for small experimental animal and visualizing the spatial localization of an inhalant in rat lungs by mass spectrometry imaging, The 37th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Invited (2021.11.2, On line)
23. 常松貴明, 新垣理恵子, 石丸直澄 HPV 陽性癌細胞の増殖に必須の脱ユビキチン化酵素の同定とその分子メカニズムの解明 第 57 回口腔組織培養学会学術大会 (2021.11.6, On line)
24. 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, David Basketter, Chantra Eskes, Sebastian Hoffmann, David M. Lehmann, 足利太可雄, 寒水孝司, 武吉正博, 鈴木 将, 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, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会(2021.11.11-13, 沖縄)
25. 足利太可雄: 非動物実験アプローチによる皮膚感作のリスク評価と TTC, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.13, 沖縄)
26. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: THP-1細胞を用いたナノマテリアルによる抗原提示細胞活性化能の評価, 日本動物実験代替法学会第34回大会 (2021.11.11-13, 沖縄)
27. 鈴尾美穂, 三浦結美, 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 未分化および分化THP-1細胞を用いたシリカナノ粒子による抗原提示細胞の活性化およびMMP-12遺伝子発現の解析, 日本動物実験代替法学会第34回大会(2021.11.11-13, 沖縄)
28. 足利太可雄: 動物実験代替法の国際動向と国内への影響 -OECD ガイドライン No.497 を中心に-, 日本安全性試験受託研究機関協議会 第 3 回定期総会及び講演会(2021.11.19)
29. Fukuhara K, Mori K, Okiyama Y, Ohno A, Misawa T, Mizuno M, Demizu Y, Shibamura M. Rationally designed peptide modulators of Aβ toxicity in Alzheimer's disease, AIMECS2021\_13thAFMC International Medicinal Chemistry Symposium

- (2021.11.29-12.2, On line)
30. Ashikaga T: In vitro method development for evaluating inhalation toxicity of nanomaterials, Second expert workshop for Applicability of Test Guideline 442D in vitro skin sensitization for nanomaterials (2021. 12. 3)
31. Arakaki R, Tsunematsu T, Ishimaru N. Pulmonary immune response and molecular mechanism of fibrosis by inhalation exposure to nanomaterials. 第 50 回日本免疫学会学術集会 (2021.12.9 奈良)
32. Otsuka K, Tsukumo S, Arakaki R, Yagita H, Ishimaru N, Yasutomo K. Single-cell RNA sequencing reveals accumulation of CD4 and CD8 T cells with unique phenotypes in salivary glands of Sjögren's syndrome model mice. 第 50 回日本免疫学会学術集会 (2021.12.9 奈良)
33. Ohno A, Watanabe M, Hirose A. Application to toxicity evaluation of silicone dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method, The international chemical congress of PACIFIC BASIN SOCIETIES 2021 (2021.12.16-21, On line)
34. Iijima K, Nishida A, Suzuo M, Miura Y, Ashikaga T, Ohno A: Analysis of Antigen-presenting Cell Activation by Nanomaterials Using Monocytic Cell Line, APA NANOFORUM-2022 (2022.2.24-26) (Invited talk)
35. 福原 潔、森 一憲、沖山佳生、三澤隆史、水野美麗、出水庸介、柴沼質子、大野彰子、アミロイドβの神経毒性を抑制する新規ペプチドの開発、日本農芸化学会 2022 年度大会 (2022.3.15-18, 京都)
36. 足利太可雄: THP-1 細胞の活性化を指標にしたナノマテリアルの免疫毒性評価の試み, 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.26, On line)
37. 大野彰子、ナノマテリアルの有害性評価と今後の課題 : in silico 手法によるナノマテリアル有害性評価へのアプローチ、日本薬学会第 142 年会シンポジウム (オンライン開催) (2022. 3. 26, On line)
38. 伊藤潤, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博: ヒト皮膚感作性データを用いた機械学習による in silico 予測モデルの開発, 日本薬学会第 142 年会(2022.3.27, On line)

#### 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