

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4年度 分担研究報告書

ナノマテリアルの感染性免疫系への影響の評価・解析

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 NM-201 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評価を実施した。NM-201 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、前年度に評価した NM-204 と異なり、明確な上昇は認められなかった。CCL3 と sCD54 でも同様にウイルス感染の有無に関わらず、NM-201 曝露による影響がほとんど認められなかった。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 肺炎の増悪化が確認できなかった。一方、RSV 感染 THP-1 細胞培養系において、NM-204 は CCL5 の産生抑制傾向が見られ、昨年度の *in vivo* での結果とは一致しなかった。

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 Taquaann 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 NM-201 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 Taquaann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) を用い、NM-201 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 µg/g, xylazine 6 µg/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℃ 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

NM-201 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 NM-201 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℃での凍結保管後、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。

RSV 感染 THP-1 細胞実験

THP-1 細胞に PMA 刺激有無および NM-204 (0, 10, 100 μ g/mL) 添加有無の 4 条件で 1 晩培養後、RSV を感染してさらに 1 晩培養した。培養上清中のヒト CCL5 レベルを R&D Systems 社製の Quantikine human ELISA キットを用いて定量した。

(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 4-1-03)。

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、前年度に評価した NM-204 と異なり、明確な上昇は認められなかった。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、若干上昇傾向が見られたが有意な差ではなかった。同様にこれらのケモカインは非感染群では NM-201 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。さらに sCD54 量についても、RSV 感染の有無にかかわらず NM-201 曝露による影響は認められなかった。

(2) 肺の病理組織学評価結果

HE 染色、PAS 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。NM-201 曝露群では、用量に関わらず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など肺炎を増悪化したような影響は一切認められなかった。さらに非感染マウスでも病変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、NM-201 曝露は RSV 感染病態への明確な影響を示さなかった。

(3) RSV 感染 THP-1 細胞培養評価

THP-1 細胞では、RSV 感染および PMA 刺激により上清中の CCL5 量が 10 倍程度上昇していた。しかし、NM-204 添加では、濃度

に依存してそのレベルが低下しており、マウス感染実験の結果とは異なった影響が認められた。

D. 考察

昨年度報告した NM-204 の Taquann 全身曝露吸入装置での評価結果では、細胞に取り込まれていた NM-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ていた。しかし、本年度実施した NM-201 曝露実験では、BALF 中のケモカイン・サイトカインレベルや肺病理組織学的な検討から、RSV 感染免疫への明確な影響が認められなかった。NM-201 は、hCLAT など *in vitro* 試験での CD54 発現誘導作用も NM-204 より弱いことが他の班研究者より報告されており、これらの結果と比較をするために敢えて評価した経緯がある。ナノシリカは、今のところ RSV 感染免疫系での作用も、hCLAT での評価結果と同じ傾向が認められている。

THP-1 細胞を用いた *In vitro* での RSV 感染影響評価については、今年度実施した NM-204 では、*in vivo* の結果と異なる CCL5 産生抑制傾向を示していた。しかし、本試験用量が 10 µg/mL 以上での評価であったため、より低用量での評価が *in vivo* との比較には必要と考えられ、今後検討していく。さらに、NM-204 と-201 の直接的な比較評価も予定している。なお、RSV 肺炎においては、このウイルスが気道上皮とマクロファージ共に感染することが知られている。*In vitro* 評価においても、マクロファージ系細胞だけでなく、気道上皮細胞への影響やマクロファージ-上皮細胞共培養系での評価系構築等を進めていきたい。

E. 結論

1. RSV 感染マウスモデルにおいて、ナノシリカ NM-201 の Taquann 法での吸入曝露では、RSV 肺炎に関わるマーカーの明確な上昇は認められなかった。
2. マウス肺組織の病理学的な検討において、NM-201 は RSV 感染の有無に関わらず明確な影響を示さなかった。
3. RSV 感染 THP-1 細胞系において、NM-204 は *in vivo* での結果と異なり CCL5 産生抑制傾向が見られた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

該当なし

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