

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 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

多様なナノマテリアル(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は喫緊の課題であり、我々は異物排除の根幹を担う肺胞マクロファージなどの抗原提示細胞に対する NM の影響評価に着目し、毒性メカニズムに基づいた in vitro 毒性試験法の確立を目指した研究を行っている。

抗原提示細胞活性化能を指標にした in vitro 皮膚感作性試験(OECD TG442E)である h-CLAT により、各種カーボンナノチューブ NM-400、NM-401、NM-402 及び NM-403 は、程度に違いはあるものの、CD54 の発現を亢進させたことから、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。さらに今回新たに二酸化セリウム、酸化亜鉛を対象としてデータを得た。また、NM と LPS の同時共曝露により活性化が顕著に亢進することが明らかとなり、NM と他物質との共曝露の評価も可能であることが示唆された。また、気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養系を用いた、吸入曝露を模した評価法を開発し、気管支モデル上部（体外側）より曝露された NM によりモデル下部（体内側）の抗原提示細胞が活性化することを示し、吸入曝露の in vitro モデルとしての可能性が示された。In silico 研究として h-CLAT 試験結果の指標としての有用性を検証した結果、h-CLAT 試験の指標となる「EC200」や「EC150」は、より本解析に適応した新しいパラメータとしてログスケール変換（ $pEC200 = -\log EC200$ ）することにより、 $pEC200$ が NM による抗原提示活性化の指標として有用であることが示唆された。

In vivo 吸入曝露試験において、ナノシリカ NM201 の高分散乾燥検体を用い、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； $7.8 \pm 1.8 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群； $33.6 \pm 2.4 \text{ mg/m}^3$ 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。BALF 細胞、頸部リンパ節細胞、脾細胞を用いて、フローサイトメータによる解析を行なったところ、NM201 の吸入曝露後 4 週での肺胞マクロファージの M2 タイプへの分化亢進が認められ、脾臓からの単球・マクロファージの遊走の可能性が示された。

吸入曝露処置を行ったマウスに RSV A2 株を経鼻感染させ、感染 5 日後に BALF を取得し解析したが、ナノシリカ NM-201 の Taqaan 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。一方 in vitro 試験系である RSV 感染 THP-1 細胞系において、ナノシリカ 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。

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

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・整理を引き続き行い（令和3年度）、その比較解析結果から毒性メカニズムを解明する（令和3-4年度）。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（令和4年度）。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（令和3-4年度）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）

今年度は様々な物性を有するカーボンナノチューブ（以下、CNT）4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-400, NM-401, NM-402 および NM-203 を欧州委員会 Joint Research Center より供給を受け抗原提示細胞活性化能を評価した。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 2.0×10^6 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予備試験の結果から最高濃度を1000 μ g/mlとし、公比 $\sqrt{10}$ で希釈して合計8濃度を設定した。暴露後の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チャンネルおよびFL2チャン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。独立した試験を3回行った。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。

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. 本研究の解析で実施された対象化合物

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)、5種の二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NPs) (NM200-JRCNM02000: NM-200, NM201-JRCNM02001: NM-201, NM202-JRCNM02002: NM-202, NM203-JRCNM10404: NM-203, NM204-JRCNM02004: NM-204)、3種の銀ナノ粒子 (BioPure10、BioPure50、AgNO₃) とした。本研究で用いた様々なNMsの一部の被検物質は国内の製造業者とJRC Nanomaterials Repository (Ispra, Italy) より供試された。

B.2.2. 物理化学的性状・有害性情報の情報整理項目

有害性情報データ (毒性評価) は、これまで本研究班で実施した皮膚感作性試験法のOECDテストガイドライン化されている *in vitro* 試験を用いたh-CLAT試験法による毒性試験結果を収集した。すべての被験物質の

物理化学的性状 (PCPs) の項目は、公開データの他、飯島分担研究者が実施した1次粒子径(nm)、h-CLAT毒性試験の溶媒中の物性評価 (Z-average(nm), Zeta potential: (mV), Pdi) についても調査対象情報源とした (銀ナノ粒子は一部の項目について適応外)。

B.2.3. 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。これらの解析を実施する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 (PCPs) について同定が可能となる。

- PCPsとh-CLAT試験結果を全ての変数として用いた主成分分析 (PCA) により全体の変数の変動パターンを検証した。
- PCAモデルに対する個別の回帰直線の相関係数を算出しh-CLAT試験結果の指標であるEC200やEC150のPCPsに対する相関を検証した (data not shown)。
- OPLS法: $Y = f(x) = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 \dots$ の回帰式より、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)。本解析では物性値をXの説明変数とし、h-CLAT試験法による毒性試験結果 (毒性値) 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た。
- データマイニング
 - 毒性値のEC200やEC150は、より本解析に適応した新しいパラメータとしてログスケール変換した値を用いて解析した。
 - $pEC200 = -\log EC200 = -\log (EC200(ug/ml) \times 10^{-6})$
 - $pEC150 = -\log EC150 = -$

$\log(\text{EC150}(\mu\text{g/ml}) \times 10^{-6})$

- Potential rankは、EC150とEC200の値を考慮した相対的な数値化をし定義した。（「1」強い>>「14」弱い）
- h-CLAT: EC150およびEC200の欠損データについては10000と定義した。

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 NM 分散液の調製と評価

シリカナノ粒子

シリカナノ粒子は NM-204 (JRC) および Sicastar-F (micromod 社) を用いた。NM-204 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超純水に懸濁し、プローブ型超音波装置 (VP-050N, タイテック株式会社) を用いて氷中で 40 W, 5 分の条件で 2 回処理した。これを培養液を用いて所定濃度に希釈した。

二酸化セリウムナノ粒子

二酸化セリウムナノ粒子は NM-211, NM-212 (以上 JRC) および S211575 (Sigma-Aldrich) を用いた。二酸化セリウムナノ粒子もシリカナノ粒子と同様に乾熱滅菌を行った。25 mg/ml の濃度になるように二酸化セリウム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。これを培養液を用いて所定濃度に希釈した。

酸化亜鉛ナノ粒子

酸化亜鉛ナノ粒子は NM-110, NM-111 (以上 JRC), S677450 および S544906 (以上 Sigma-Aldrich) を用いた。酸化亜鉛ナノ粒子もシリカナノ粒子と同様に乾熱滅菌を行った。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。NM-111 はあらかじめ少量の 99.5%エタノールを添加したのち超純水で 25 mg/ml に懸濁し、同様の超音波処理を行った。これを培養液を用いて所定濃度に希釈した。培養液で CV75 の濃度に希釈し 24 時間 37°C でインキュベーションした酸化亜鉛ナノ粒子分散液の亜鉛イオン濃度を ICP-AES により測定した。

B.3.2. NM の抗原提示細胞活性化能の評価

24 ウェルプレートの各ウェルに 2.0×10^6 cells/ml ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞懸濁液 500 μl および各被験物質の分散液または溶液 500 μl を添加し、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で 24 時間静置した。被験物質の曝露濃度は CV75 を基準とし、公比 2 で上下合計 8 濃度を設定した。曝露後の THP-1 細胞を 10% ウシ血清アルブミン (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 ウェルプレートの各ウェルに分注した細胞をそれぞれ FITC 修飾された抗 CD86 抗体、抗 CD54 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。フローサイトメーター (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer) 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、CD86 および CD54 の発現を培養液処理群 (control) に対する相対蛍光強度 (RFI) として求め、EC150 (CD86 発現が 150%を超える濃度), EC200 (CD54 発現が 200%を超える濃度) を算出した。FL-2 チャネルより細胞生存率を求め、CV75 を算出した。

B.3.3. ナノ粒子取り込み阻害剤の評価

ナノ粒子取り込み阻害剤として、Amiloride, Chlorpromazine, Colchicine, Cytochalasin D, Latrunculin A, および Nystatin を用いて評価した。各阻害剤を超純水、PBS または DMSO で溶解し、培養液で所定濃度に希釈した。THP-1 細胞を 2.5×10^6 cells/ml に調製し、24 well プレートに阻害剤溶液 100 μ l と細胞懸濁液を 400 μ l ずつ播種して 37°C CO₂ インキュベータ内で 1 時間前培養した。阻害剤で前処理した THP-1 細胞に、500 μ g/ml に調製した Sincastar 溶液を 500 μ l 添加し、CO₂ インキュベータ内で 24 時間培養した。細胞を 1.5 ml チューブに移し、FB 1 ml で 2 回洗浄した。上清除去後、FB 500 μ l で再懸濁した。フローサイトメーターを用いて Sincastar に由来する平均蛍光強度 (MFI) を測定した。

B.3.4. 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

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中で気-液界面培養を行い、気管支上皮モデルを作製した。作製した気管支上皮モデルは、光学顕微鏡による繊毛運動の確認、経上皮電気抵抗 (TEER) 測定、気管支上皮マーカー遺伝子発現、および標本の形態観察により評価した。ウェルプレートのウェルに THP-1 細胞懸濁液を入れ、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た。セルカルチャーインサート上部より被検物質を添加し、24 時間培養後、B.3.2.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。

気管支上皮細胞から分泌されるサイトカインについてはメンブレンアッセイキット (Ray Bio® C-Series Human Cytokine

Antibody Array C5) を用い、プロトコルに従い測定、解析を行った。

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) から寄附されたナノシリカ (SiO₂-NM201-JRCNM02001) 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; $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、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プレイザブルパウチ (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。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。（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。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。

NM201 の原末を 35℃に加熱した *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 15.75 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。

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。(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。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 OUTER チャンバーと PET 樹脂で作製した INNER 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 INNER 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おり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。

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^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 6 倍希釈し測定した。

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、 $\phi 55 \text{ mm}$ 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、 $\phi 55 \text{ mm}$ 、捕集効率 (DOP $0.3 \mu\text{m}$) : 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 $1.5 \text{ L/min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$ 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。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 ; No.1 ; $10 \mu\text{m}$ 、No.2 ; $5.6 \mu\text{m}$ 、No.3 ; $3.2 \mu\text{m}$ 、No.4 ; $1.8 \mu\text{m}$ 、No.5 ; $1.0 \mu\text{m}$ 、No.6 ; $0.56 \mu\text{m}$ 、No.7 ; $0.32 \mu\text{m}$ 、No.8 ; $0.1 \mu\text{m}$ 、No.9 ; $0.10 \mu\text{m}$ 、No.10 ; $0.056 \mu\text{m}$ 、No.11 ; $0.032 \mu\text{m}$ 、No.12 ; $0.018 \mu\text{m}$ 、No.13 ; $0.01 \mu\text{m}$) 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°C 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(フジフイルム和光純薬工業、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 回繰り返す、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)

Taquann 処理を施した NM201 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)。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による解析を行なった。用いた抗体は以下である。FITC、PE、PE-Cy7、APC または APC-Cy7 標識 CD4、CD8、CD11b、CD11c、F4/80、CD192、CD206、CD54、CD163 抗体(BioLegend、Tombo)を用いた。

BALF 細胞および肺組織より 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',
F4/80; (f) 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3', (r) 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3',
(r) 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3', Tim4; (f) 5'-GCTGCTTCCAACAACAGTCA-3', (r) 5'-GTGATTGGATGCAGGCAGAG-3', β-actin; (f) 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', (r) 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。

マウス骨髄由来マクロファージの作成に関しては、雄マウス(C57BL/6、7 週齢)の大腿骨より骨髄細胞を採取し、リコンビナント M-CFS (100 ng/mL)添加培地にて 7 日間培養することで成熟マクロファージに分化させた。

B.6.1 ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響(渡辺)

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、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。

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 3×10^5 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°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

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°C での凍結保管後、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-1α) 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。

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。

B.6.6. 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 µg/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)

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)

今回検討した CNT について、すべての被験物質について、1000 µg/ml においても細胞生存率が 75% 以上であったため、1000 µg/ml を最高用量と設定した。その結果、今回検討したカーボンナノチューブ 4 品すべてが CD54 発現を大きく亢進させ、in vitro で抗原提示細胞を活性化することが示された。

さらに各被験物質の EC150 (CD86 発現濃度閾値) と EC200 (CD54 発現濃度閾値)

を算出した。抗原提示活性化能は、CD54 の発現閾値である EC200 値が小さいほど強いことが知られている。今回検討した4品の EC200 値は、0.40-6.61 $\mu\text{g/mL}$ の範囲となり、最小の NM-402 の 0.40 $\mu\text{g/mL}$ と最大の NM-400 の 6.61 $\mu\text{g/mL}$ で約 16 倍の差があった。また順位としては、NM-400>NM-401>NM-403>NM-402 となった。

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. PCPs と h-CLAT 試験結果値を変数とした主成分分析 (PCA)

PCAの結果から、TiDWが95%信頼区間に入らずに逸脱していることが示唆された。また、PCAの3次元平面の変動パターンを担うような幾つかの測定変数等が示された。

PCAモデルに対する個別の回帰直線の相関係数を算出しh-CLAT試験結果の指標であるEC200やEC150のPCPsに対する相関を検証した結果、EC200 の変数がh-CLAT試験 (陽性・陰性) 結果と若干高い相関を示した (data not shown)。

C.2.2. pEC150・pEC200 を用いた変数データの再解析: PCA

PCAからのLoadings Plotの結果より、h-CLAT試験結果 (陽性) に着目すると、pEC200が近い距離に位置していることが示唆された。さらに、パラメータ値を算出した2つの変数のpEC150とpEC200に着目し、EC150、1/EC150、EC200、1/EC200について除外後再解析を実施した結果、pEC200がCLAT試験結果 (陽性) とほぼ重なった。

C.2.3. *in vitro* h-CLAT 試験結果のマクロファージエラスターゼ Matrix

Metalloproteinase 12 (MMP12) との関連性解析

3 種の銀ナノ粒子と 6 種の二酸化チタンナノ粒子、5 種の二酸化ケイ素ナノ粒子について MMP12 が新しいナノマテリアルの指標としての可能性について解析した結果、MMP12 の最大値の相対発現量% (MMP12Max) や MMP12 の最大値の相対発現量% (MMP12MaxConc) の各変数に対する相関は全て低かった (data not shown)。

C.2.4. EC200 と pEC200 の変数データの比較: OPLS

EC200とpEC200のデータの比較では、pEC200の方が綺麗に直線に載っていた。さらに、pEC150を除外してpEC200に関連する変数の解析を実施し、Loadings Plotを確認した結果、pEC200 の変数は、h-CLAT positive (正の相関) と反対側の h-CLAT Ranking (負の相関) が効いている (鍵となる) 事が示唆された。

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. 各種 NM の評価

一次径は、提供元から情報が提供されているものはその値を、提供されていないものは透過型電子顕微鏡または走査型電子顕微鏡を用いた観察により求めた値を示した。

C.3.2. 各種 NM の抗原提示細胞活性化能の評価

二酸化セリウムナノ粒子

S211575, NM-211, NM-212 いずれのナノ粒子においても CD86, CD54 の発現は基準値を上回らなかった。

酸化亜鉛ナノ粒子

S677450, S544906, NM-110, NM-111 いず

れの酸化亜鉛粒子においても CD54 発現は基準値を超え、EC200 には大きな差を認めなかった。NM-111 のみ CD86 発現が基準値を上回った。

C.3.3. NM 取り込み阻害剤の評価と取り込み阻害の抗原提示細胞活性化への影響

FCM を用いた THP-1 細胞の蛍光標識シリカナノ粒子 (Sicastar) の取り込み量の評価より、Amiloride, Colchicine, Cytochalasin D および Latrunculin A が THP-1 細胞のシリカナノ粒子取り込み阻害能を有することがわかった。しかし、Colchicine および Cytochalasin D は阻害剤のみで THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現を亢進することがわかった。シリカナノ粒子による THP-1 細胞活性化に対する Amiloride 処理の効果を解析した。Amiloride 処理により、シリカナノ粒子 (Sicastar) による CD54 の発現亢進は顕著に抑制された。

C3.4. リポ多糖とシリカナノ粒子の共曝露

リポ多糖 (LPS) とシリカナノ粒子をあらかじめ混合した上で THP-1 へ曝露する共曝露により、LPS およびシリカナノ粒子をそれぞれ単独で曝露した場合と比較して CD54 の発現が顕著に亢進した。一方、シリカナノ粒子を 24 時間曝露し洗浄後に LPS を曝露した場合、または、LPS を 24 時間曝露し洗浄後にシリカナノ粒子を曝露した場合ではそのような顕著な CD54 の発現亢進は見られなかった。

遺伝子発現解析では、同時共曝露において CD54 および CD86 遺伝子の発現亢進が確認された。その他、MMP-12, CCL-3 遺伝子の発現も同時共曝露において顕著に増加した。

C3.5. リポ多糖とシリカナノ粒子の共曝露

リポ多糖 (LPS) とシリカナノ粒子をあらかじめ混合した上で THP-1 へ曝露する共曝露により、LPS およびシリカナノ粒子をそれぞれ単独で曝露した場合と比較して CD54 の発現が顕著に亢進した。一方、シリカナノ粒子を 24 時間曝露し洗浄後に LPS を曝露した場合、または、LPS を 24 時間曝露し洗浄後にシリカナノ粒子を曝露した場合ではそのような顕著な CD54 の発現亢進は見られなかった。

遺伝子発現解析では、同時共曝露において CD54 および CD86 遺伝子の発現亢進が確認された。その他、MMP-12, CCL-3 遺伝子の発現も同時共曝露において顕著に増加した。

C.5.5. 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

気-液界面培養後、繊毛運動がみられ、経上皮電気抵抗 (TEER) の上昇、気管支上皮マーカー遺伝子の発現亢進より、気管支上皮モデルの作製が確認された。まず、気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養における培養液について検討した。単培養と気管支上皮モデルとの共培養いずれにおいても、THP-1 細胞用培養液である RPMI-1640 を用いた場合には CD86, CD54 の発現や細胞生存率に差は見られず、気管支上皮細胞用培養液を用いた場合には CD54 の発現が顕著に上昇した。よって、気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養においては RPMI-1640 を用いることとした。

次に、h-CLAT において陽性対照として用いられる硫酸ニッケル水溶液を気管支上皮モデルの上部より曝露し、24 時間後に下部の THP-1 細胞の CD86, CD54 発現を測定し

た。単培養と比較し、はるかに高い濃度において CD54 の発現亢進が見られた。

シリカナノ粒子分散液を気管支上皮モデルの上部および下部より曝露し、24 時間後に下部の THP-1 細胞の CD86, CD54 発現を測定した。気管支上皮モデルの上部からの曝露において、CD54 の発現亢進が見られた。気管支上皮モデルの下部からの曝露において、CD54 の発現亢進が見られ、単培養での発現よりも高かった。

メンブレンアッセイより、気管支上皮モデル培養後の培地に IL-8 が含まれること、シリカナノ粒子の曝露により培地中への GRO- $\alpha/\beta/\gamma$ および IL-6 の分泌が増加することがわかった。

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 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; $10.3 \pm 1.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群; $25.6 \pm 2.5 \text{ mg/m}^3$ (平均値 $\pm$ SD)であった。3 回の測定を行った MMAD は低濃度群; $1,439 \text{ nm}$ (σ :3.2~4.2)、高濃度群; $1,468 \text{ nm}$ (σ :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^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 52.6 mg/m^3 、 157.9 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 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)

1 日 6 時間で 3 群にそれぞれの濃度で NM201 を暴露後、4 週ならびに 8 週で解析を実施した。

BALF 細胞中の肺泡マクロファージの解析に関しては gating strategy にて実施した。BALF 細胞の細胞数、BALF 細胞中の CD45.2 陽性リンパ球分画の細胞数、BALF 細胞中の肺泡マクロファージの割合ならびにその細胞数に関してそれぞれの群、暴露後 4 週、8 週での変化を検討したが、それぞれの群間で有意な差は確認されなかった。

NM201 暴露後 4 週での肺泡マクロファージの M1 及び M2 への分化パターンを細胞表面抗原 (CD192: M1/CD206: M2) を用いてフローサイトメータにて検討したところ、NM201 暴露にて M1 への分化、M2 への分化ともに認められたが、特に、M2 タイプへの分化が対象群に比較して有意に亢進していた。暴露後 8 週では対象群と暴露群 (高濃度、低濃度) に分化パターンの差は認められなかった。

NM201 吸入暴露による脾臓でのマクロファージの動態を検討すると、暴露後 4 週及

び8週にて対象群に比較してマクロファージの割合は有意に減少していた。マクロファージの細胞数に大きな変化はなかった。頸部リンパ節での暴露によるマクロファージの割合、細胞数に変化は見られなかった。

脾臓ならびに頸部リンパ節でのマクロファージ分化について検討を加えたところ、脾臓において NM201 暴露によって M1 ならびに M2 への分化が抑制されていることが判明した。頸部リンパ節では暴露による M1/M2 分化に影響は認められなかった。

続いて BALF 中の肺胞マクロファージにおける CD54 および CD163 の発現に関して、検討したところ、暴露による影響は確認できなかった。加えて、脾臓および頸部リンパ節での CD54 ならびに CD163 の発現を検討したところ、NM201 暴露4週での CD54 ならびに CD163 の発現が対象群に比較して有意に低下していることが判明した。暴露8週では影響は確認できなかった。頸部リンパ節では、暴露4週での低濃度群で CD54 の発現低下、8週での高濃度群で CD163⁺マクロファージの割合が減少していた。

NM201 吸入暴露後4週および8週での脾臓、頸部リンパ節細胞における T 細胞分画についてフローサイトメータにて検討したところ、暴露後8週で対象群に比較して CD8 陽性 T 細胞数が有意に増加していたが、その他の検討項目での変化は認められなかった。さらに CD4 ならびに CD8 陽性 T 細胞における活性化を CD44^{high}CD62L⁻分画を指標に検討したところ、脾臓、頸部リンパ節ともに NM201 吸入暴露により変化は観察されなかった。

NM201 の吸入暴露による BALF 細胞ならびに肺組織における CD54、MMP12、TIM4、

F4/80 mRNA 発現を定量 RT-PCR にて検討すると、BALF 細胞では CD54 mRNA 発現の暴露による変化はなく、MMP12 mRNA 発現は暴露後4週で対象群に比較して有意に上昇していたが、8週では変化はなかった。TIM4 mRNA に関しては暴露後4週で発現上昇傾向にあるが対象群に比較して有意な差は認められなかった。肺組織では、暴露後8週での MMP12 mRNA 発現が上昇傾向にあるが有意な差ではなかった。CD54 ならびに F4/80 (Adgre1) mRNA 発現に関しては暴露による変化は観察されなかった。*In vitro* にてマクロファージにおけるナノマテリアルの影響を検討するために、マウス骨髄誘導性マクロファージを作成し、ナノシリカ (NM204) の添加培養による影響を検討したところ、カーボンナノチューブ (CNT) の添加で低下した生細胞の割合および細胞数は、NM204 添加では変化が認められなかった。さらに、NM204 添加による MMP12 および CD54(ICAM-1)mRNA 発現を定量 RT-PCR にて検討したところ対象群に比較して変化は認められなかった。

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、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。

C6.2. 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。

C6.3. 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

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）

今回検討した CNT 全てにおいて *in vitro* で抗原提示細胞を活性化することが示された。また、本研究ではこれまで酸化チタン、二酸化ケイ素および銀の NM の評価を行ってきたが、CNT の EC200 値は他の NM

のそれより低く、このことは少なくとも *in vitro* において CNT の抗原提示活性化能は高いと考えられた。したがってそのメカニズムの解明と共に、*in vivo* における CNT による炎症誘導能を評価すべきと考えられた。なお最近、ヒト抗原提示細胞における CNT の受容体が Tim4 や Siglec-14 であることが見いだされ、こうした受容体による CNT の細胞内取り込みにより NLRP3 インフラマソームが活性化することが報告された(Kato et al., Nature Nanotechnology, 2023, DOI:10.1038/s41565-023-01363-w)。今後 CNT のこうした受容体を介した抗原提示活性化と生体における炎症誘導能に関する詳細な研究が必要と考えられる。

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）

PCPs と h-CLAT 試験結果値を変数とした PCA の結果から、TiDW が 95%信頼区間に入らずに逸脱した要因は、Particle shape が異なり、Z-average (nm) の値が大きい事が影響したと考えられた。また、PCA の 3 次元平面の変動パターンを担うよう幾つかの測定変数等が示された中で、寄与率 (%) と交差検証 (Q2) の値が低かった h-CLAT_Ranking や、MMP12 の変数については、PCA による変数全体の変動パターンにあまり寄与していない事が考えられた。また、*in vitro* h-CLAT 試験結果の MMP12 との関連性解析では、pEC200 に対して MMP12Max は正の相関がありそうだったが、95%信頼区間が正負に跨っているため、MMP12Max は pEC200 の指標としては難しいことが分かった。従って現時点では代替の指標としては難しいことが示唆された。

一方、PCAを用いたpEC150・pEC200を用

いた変数データの再解析では、PCAからの Loadings Plotの結果より、h-CLAT試験結果（陽性）に着目すると、pEC200が近い距離に位置していた。そこで、-Logとしてパラメータ値を求めた2つの変数（pEC150とpEC200）に再度着目し、再解析を実施した結果、h-CLAT試験結果（陽性）と、pEC200がほぼ重なり合っており、さらに距離が近くなった。この結果は、二つの変数（pEC200とh-CLAT試験結果（陽性））が同じ傾向を示すことを示唆し、pEC200がh-CLAT試験結果（陽性）に指標としての可能性が考えられた。

上述の結果を踏まえ、pEC200の指標としての有用性について更に検証を進めるため、OPLSによるEC200とpEC200の変数データの比較検証を実施した。その結果、変数として対数（-Log）を算出することで、より良い回帰直線が得られた。また、pEC150を除外した場合においても、綺麗な相関が見出せたことで、EC200の変数として対数（-Log）を算出したpEC200は、ナノマテリアルの抗原提示活性化の指標として有用であると考えられた。

D.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明（飯島）

D.3.1. 各種 NM の抗原提示細胞活性化能の評価

二酸化セリウムナノ粒子

二酸化セリウムナノ粒子はいずれも CD86, CD54 の発現を亢進しなかった。この二酸化セリウムはROS スカベンジャーとしての作用が報告されている。二酸化セリウムナノ粒子の結果は、その ROS スカベンジャー作用と対応している可能性が考えられた。

酸化亜鉛ナノ粒子

酸化亜鉛ナノ粒子はいずれも CD54 発現を亢進し、流体力学径による EC200 の大きな差異は見られなかった。また、7-15%が亜鉛イオンとして溶出していた。酸化亜鉛粒子は取り込まれず、溶出する亜鉛イオンにより活性化が引き起こされている可能性が考えられる。

D.3.2. シリカナノ粒子による抗原提示細胞活性化の機序について

Amiloride によりシリカナノ粒子の取り込みと CD54 の発現亢進が抑制されたことから、シリカナノ粒子が主にマクロピノサイトーシスにより THP-1 に取り込まれること、細胞内に取り込まれることが抗原提示細胞の活性化に重要であることが示唆された。

D.3.3. リポ多糖とシリカナノ粒子の共曝露

LPS とシリカナノ粒子をあらかじめ混合した上で THP-1 へ曝露する共曝露により、CD54 の発現が顕著に亢進し、時差共曝露ではそのような作用は見られなかった。シリカナノ粒子表面へ LPS が吸着し、細胞膜受容体 TLR4 に多価効果を示す可能性、または、それぞれの経路で細胞に作用し、細胞内でシグナル伝達が増強される可能性、が考えられる。また、抗原提示細胞活性化能を指標とする本手法は、NM 単体だけでなく、他の化合物との共曝露にも適用できることがわかり、有用性が示された。

D.3.4. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系を用いた抗原提示細胞活性化能の評価

気管支上皮モデルの上部よりシリカナノ粒子分散液を適用すると、下部の THP-1 細胞の CD54 発現の発現が上昇した。これは、シリカナノ粒子が気管支上皮モデルを透過

し作用した、もしくは、シリカナノ粒子に曝された気管支上皮モデルが分泌したサイトカインにより THP-1 細胞が活性化した、と考えられる。後者の気管支上皮モデルから THP-1 細胞へのシグナル伝達を担うサイトカインの候補として、メンブレンアッセイの結果より IL-8、GRO-a/b/g、IL-6 が同定された。

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）

本分担研究で用いたナノシリカ NM201 は、昨年度の実験で使用した NM204 に比較し、目視観察において粒度が荒く嵩高い性状を示す。粒子が砂に近い性質であるため、エアロゾル化に際して沈降速度が速く濃度の維持が難しいことが想定される。しかしながら、Taquann 法による高分散処理と Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 を組み合わせることにより NM204 と同様の曝露が可能であった。する分散性が良好であ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 は低濃度群では約 1.7 μm 、高濃度群では約 2.0 μm 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 3.4~4.6 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、NM201 も NM204 と同様に、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。エアロゾル化効率は、低濃度群では約 15%、高濃度群では約 21%であり、原因は不明であるが、高濃度群の方が効率よくエア

ロゾル化することが可能であった。

NM201 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 週後及び 8 週後では有意な変化は認められなかった。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、NM201 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）

本年度は本研究分担の 3 年目の研究であり、R2 (2020)年度では針状酸化チタン (TiDW)、R3 (2021)年度でのナノシリカ (NM204) に続いてのナノシリカ (NM201) の吸入暴露による肺免疫への影響評価を検討した。

NM201 の吸入暴露実験において、BALF 細胞数、肺胞マクロファージの割合および細胞数に関して、暴露による有意な変化は観察されなかった。また、肺胞マクロファージの M1/M2 への分化に関しては、NM201 暴露による M1/M2 の偏りはなく両者への分化が促進していた。特に、暴露後 4 週において対象群で M2 タイプにシフトしていたマクロファージが暴露によってさらに M2 タイプに分化が促進していた。8 週後での暴露による変化は認められなかったことから、暴露後初期段階での変化が大きいものと推測される。

NM201 吸入暴露による脾臓、頸部リンパ節を含む全身リンパ組織への影響に関しては、脾臓において暴露によってマクロファージの割合が減少していたことから、脾臓から肺組織に動員された可能性が考えられた。このことは以前に実施したカーボ

ンナノチューブの吸入暴露実験においても同様の所見があったことから、ナノマテリアルの吸入暴露による脾臓と肺との臓器間のクロストークが存在することが示唆された。

NM201 吸入暴露による肺胞マクロファージの活性化を CD54 および CD163（スカベンジャー受容体）の発現を指標に検討すると、暴露による影響は確認できなかった。暴露 4 週以前に活性化した可能性が考えられるとともに、カーボンナノチューブなどのナノマテリアルとの形状や性質の違いがあるものと推測する。

ナノマテリアルの吸入暴露の指標としてこれまでに MMP12 や CD54 などの分子が挙げられてきた。NM201 の暴露後 4 週において BALF 細胞における MMP12 mRNA 発現が上昇していたものの、8 週では上昇は確認できなかった。CD54 の発現に関しては、NM201 の吸入暴露で変化は見られなかった。また、カーボンナノチューブの受容体の可能性が指摘されている Tim4 mRNA 発現は暴露 4 週で上昇傾向にあった。暴露後さらに初期段階でこれらの分子の動態に影響が観察される可能性が考えられる。

マウス骨髄由来マクロファージを用いた *in vitro* の実験はマクロファージとナノマテリアルとの直接的な関係を明らかにできる有用な実験系である。本年度の研究ではナノシリカ（NM204）に対する反応性を確認したところ、カーボンナノチューブで見られた細胞死や MMP12 の発現上昇は確認できなかったことから、ナノマテリアルの大きさ、形状、性質によってマクロファージの活性化、増殖、食食機能などが大きく変化することが考えられた。なお、*in vivo* での実験で用いられた NM201 に関

して、今後 *in vitro* で検討を加える予定である。

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）

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、h-CLAT 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、h-CLAT 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

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 法を用いて各種 CNT の抗原提示活性化能を評価したところ、NM-400、NM-401、NM-402 及び NM-403 は、程度に違いはあるものの、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。今後物性と抗原提示活性化能の関連を解析するとともに、細胞レベルでの活性化メカニズムの解明や *in vivo* 吸入曝露試験における評価を行う予定である。

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）

in vitro 研究として NMs の抗原提示細胞活性化能評価のデータベースを作成し *in silico* 研究としてナノマテリアルの *in vitro* h-CLAT 試験結果の指標としての有用性を検証した結果、h-CLAT 毒性試験の CD86 および CD54 発現に与える影響について指標となる「EC200」や「EC150」は、より本解析に適応した新しいパラメータとしてログスケール変換 ($pEC200 = -\log EC200$) することにより、 $pEC200$ が NMs による抗原提示活性化の指標として有用であることが示唆された。一方、今回の解析では、*MMP12* がナノマテリアルの *in vitro* h-CLAT 試験結果の新しい指標としては見出だせなかったが、引き続き試験結果のデータの集積や、*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、検証を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）

前年度までに進めてきた単球系細胞株 THP-1 細胞の CD54, CD86 を指標とした抗原提示細胞活性化能の評価法による NM の解析について、新たに二酸化セリウム、酸化亜鉛を対象としてデータを得た。また、NM と LPS の同時共曝露により活性化が顕著に亢進することが明らかとなり、NM と他物質との共曝露の評価も可能であることが示唆された。気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養系を用いた、吸入曝露を模した評価法を開発し、気管支モデル上部（体外側）より曝露された NM によりモデル下部（体内側）の抗原提示細胞が活性化することを示し、吸入曝露の *in vitro* モデルとしての可能性が示された。

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）

NM201 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； $7.8 \pm 1.8 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群； $33.6 \pm 2.4 \text{ mg/m}^3$ 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では、高濃度群で有意な増加がみられたが、4 及び 8 週間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）

NM201 の吸入曝露後 4 週での肺胞マクロファージの M2 タイプへの分化亢進が認められ、脾臓からの単球・マクロファージの遊走の可能性が示された。また、NM201 の吸

入暴露によって、BALF 細胞での CD54 および CD163 の発現に変動は認められなかった。さらに、吸入暴露後 4 週での BALF 細胞の MMP12 の発現亢進が確認された。したがって、ナノマテリアルの形状および性状によって、肺胞マクロファージの分化パターンが異なっている可能性が考えられた。

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 NM-201 の Taqaan 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。

【謝辞】

This research was carried out with the support of a chemical substance risk research in the Health and Labor Sciences Research Grants (JPMH20KD1004). The test materials used in this study were five kinds of TiO₂ NPs provided by two domestic manufacturers (one company is TAYCA CORPORATION) and five kinds of SiO₂ NPs provided by JRC Nanomaterials Repository (Ispra, Italy).

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Narwidina A, Miyazaki A, Iwata K,

Kurogoushi R, Sugimoto A, Kudo Y, Kawarabayashi K, Yamakawa Y, Akazawa Y, Kitamura T, Nakagawa H, Yamaguchi-Ueda K, Hasegawa T, Yoshizaki K, Fukumoto S, Yamamoto A, Ishimaru N, Iwasaki T, Iwamoto T: Iroquois homeobox 3 regulates odontoblast proliferation and differentiation mediated by Wnt5a expression *Biochem Biophys Res Commun.*, 2023;650:47-54.

2. Shao W, Tsunematsu T, Umeda M, Tawara H, Fujiwara N, Mouri Y, Arakaki R, Ishimaru N, Kudo Y: Cancer cell-derived novel periostin isoform promotes invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 2023;12(7):8510-8525.
3. Fukuhara K, Nakanishi I, Imai K, Mizuno M, Matsumoto K, Ohno A: DTPA-Bound Planar Catechin with Potent Antioxidant Activity Triggered by Fe³⁺ Coordination., *Antioxidants (Basel)* 2023;12(2):225.
4. Sato M, Arakaki R, Tawara H, Nagao R, Tanaka H, Tamura K, Kawahito Y, Ostuka K, Ushio A, Tsunematsu T, Ishimaru N: Disturbed natural killer cell homeostasis in the salivary gland enhances autoimmune pathology via IFN- γ in a mouse model of primary Sjogren's syndrome. *Front Med.* 2022;9:1036787.
5. Nagatomo R, Kaneko H, Kamatsuki S, Ichimura-Shimaizu M, Ishimaru N, Tsuneyama K, Inoue K: Short-chain fatty acid profiling in biological samples from a mouse model of Sjögren's syndrome based on derivatized LC-MS/MS assay. *J Chromat B Analyt Technol Biomed Life Sci* . 2022;1210:123432.
6. Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Saito

- M, Otsuka K, Furukawa Y, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N: Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis. *Am J Pathol.* 2022;192(11):1559-1572.
7. Otsuka K, Sato M, Tsunematsu T, Ishimaru N: Virus Infections Play Crucial Roles in the Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Viruses.* 2022;14:1474.
 8. Horii Y, Iniwa T, Onitsuka M, Tsukimoto J, Tanaka Y, Ike H, Fukushi Y, Ando H, Takeuchi Y, Nishioka SI, Tsuji D, Ikuo M, Yamazaki N, Takiguchi Y, Ishimaru N, Ito K: Reversal neuroinflammation in novel GS model mice by single i.c.v. administration of CHO-derived rhCTSA precursor protein. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2022;25:297-310.
 9. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, Shimizu K, Maeda TK, Ikubo J, Yoshikawa H, Maenaka K, Ishimaru N, Kosako H, Takemoto T, Okazaki T: Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity. *Immunity.* 2022;55:912-924.
 10. 大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄: シェーグレン症候群の病理診断 診断病理, 2022;39(4):255-261.
 11. 大塚邦紘、常松貴明、牛尾綾、佐藤真美、石丸直澄: カラー図説: シェーグレン症候群の病理 日本臨床, 2022;80(10):1538-1543.
 12. Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S: In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes Environ.* 2022;44(1):24.
 13. 鶴岡秀志、高橋祐次、カーボンナノチューブのヘルスケア応用, *Nanofiber*, 2022;13;(1,2) 19-24.
 14. 高橋祐次、齊藤洋克、栗形麻樹子、北嶋聡、加圧式定量噴霧式吸入器 (pMDI) 製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発, *Jpn. J. Clin.Toxicol.* 2022;35(3) 255-259.
- G.2. 学会発表
1. Ishimaru N, Fukuda K, Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Otsuka K: Exposure to carbon nanotubes sustains chronic inflammation by macrophage activation via MMP-12. 第 111 回日本病理学会総会 (2022.4.14-16, 神戸)
 2. 佐藤真美、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疾患モデルにおける肺病変発症への CCL6 の役割 第 111 回日本病理学会総会 (2022.4.14, 神戸)
 3. 大塚邦紘、九十九伸一、近藤博之、新垣理恵子、佐藤真美、福田一稀、俵宏彰、常松貴明、石丸直澄、安友康二: シングルセル RNA-seq で紐解くシェーグレン症候群モデルに特徴的に出現する T 細胞集団の解析 第 111 回日本病理学会総会 (2022.4.15, 神戸)
 4. 常松貴明、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄: 口腔扁平上皮癌における Borealin の高発現がもたらす Survivin 安定化機構の解明 第 111 回日本病理学会総会 (2022.4.16, 神戸)
 5. 田村海、新垣理恵子、石丸直澄: シェーグレン症候群モデルマウス鼻腔組織の病

- 態解析 第 111 回日本病理学会総会 (2022.4.16, 神戸)
6. 安部賀央里, 成田和人, 小林睦, 立花滋博, 村崎亘, 鈴木政晴, 頭金正博, 足利太可雄: 機械学習アプローチを用いた *in silico* モデルによるヘアカラー原料の皮膚感作性強度予測, 第 47 回日本香粧品学会 (2022.6.10, On line)
 7. 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: Extraglandular lesions in Sjogren's syndrome model mice 第 20 回四国免疫フォーラム (2022.6.11, On line)
 8. 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(NM)の *in vitro* 免疫毒性試験法の開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.6.30, 札幌)
 9. 村崎亘, 安部賀央里, 頭金正博, 山田隆志, 足利太可雄: 機械学習アプローチによる皮膚感作性強度を予測する回帰モデルの開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.6.30, 札幌)
 10. Taquahashi Y, Yokota S, Hirose A, Kanno J Streamline of chronic inhalation exposure study protocol for nanomaterial, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム (2022.6.30, 札幌)
 11. Taquahashi Y, Tsuruoka S, Aisaki K, Okubo Y Kitajima S, An approach to prediction of mortality in acute toxicity studies by integrated assessment of vital signs, 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム (2022.6.30, 札幌)
 12. 飯島一智, 鈴木美穂, 三浦結美, 西田明日香, 大野彰子, 足利太可雄: 未分化および分化 THP-1 細胞を用いたナノマテリアルの免疫毒性評価, 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.1, 札幌)
 13. Taquahashi Y, Non-clinical Safety Issue in Pediatric Drug Development: What issues are to be considered from now on? 第 49 回日本毒性学会学術年会 シンポジウム (2022.7.2, 札幌)
 14. 大野彰子, 沖山佳生, 広瀬明彦, 福原潔^{*1}: ニトロ多環芳香族炭化水素の変異原性:ニトロ基の付加位置に関する *in silico* 解析. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
 15. 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智, 広瀬明彦, 足利太可雄: THP-1 細胞への活性化に及ぼす二酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性因子, 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.2, 札幌)
 16. 山本直樹, 平松範子, 加藤由布, 西川千恵子, 横井友香, 足利太可雄, 小島肇: 医薬品の生殖毒性試験代替法に有用なヒト由来 iPS 細胞レポーター細胞株の作製と評価に関する研究, 日本組織培養学会 第 94 回大会(2022.7.7, 豊中, 大阪)
 17. 常松貴明, 石丸直澄: 頭頸部扁平上皮癌における染色体パッセンジャー複合体構成因子 Borealin の新たな機能 第 39 回分子病理研究会 内灘かほくシンポジウム (2022.7.8~9, 石川県河北郡)
 18. Ohno A, Nishida A, Iijima K, Hirose A, Ashikaga T: *in silico* elucidation of physicochemical properties factor on activation of THP-1 cells of TiO₂ NP, 264th ACS National Meeting & Exposition (2022.8.22, Chicago)
 19. 木下啓, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博: 皮膚感作性の *in vitro* 試験法である KeratinoSens™ の結果を予測する機械学習モデルの構築, 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2022.8.26, 東京)

20. 足利太可雄, 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智: 皮膚感作性物質あるいは発熱性物質とナノシリカの混合曝露による THP-1 細胞の活性化に関する研究, 第 29 回日本免疫毒性学会学術年会 (2022.9.12, 札幌)
21. 佐藤真美、牛尾綾、大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄: シェーグレン症候群モデルマウス肺病変におけるケモカインの機能分析 第 64 回歯科基礎医学会学術大会 (2022.9.17~18, 徳島)
9. 大塚邦紘、九十九伸一、近藤博之、佐藤真美、俵宏彰、常松貴明、石丸直澄、安友康二: シングルセル RNA-seq で紐解くシェーグレン症候群モデルに特徴的に出現する T 細胞集団の解析 第 64 回歯科基礎医学会学術大会 (2022.9.17~18, 徳島)
10. 田村海、川人祐樹、佐藤真美、大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄: シェーグレン症候群モデルマウスにおける鼻腔組織の病態解析 第 64 回歯科基礎医学会学術大会 (2022.9.17~18, 徳島)
11. 川人祐樹、田村海、佐藤真美、大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄: シェーグレン症候群モデルマウスである NFS/sld マウスの変異遺伝子 *Mucin19* の発現解析と病態との関連性 第 64 回歯科基礎医学会学術大会 (2022.9.17~18, 徳島)
12. 石丸直澄: 唾液腺免疫難病研究の最前線 第 33 回日本臨床口腔病理学会学術大会シンポジウム (2022.9.23, 札幌)
22. 大塚邦紘、近藤博之、九十九伸一、新垣理恵子、佐藤真美、常松貴明、石丸直澄、安友康二: シングルセル RNA-seq とマルチプレックス Spatial 解析を基盤としたシェーグレン症候群の標的臓器微小環境変化の解明 第 33 回日本臨床口腔病理学会学術大会 (2022.9.23, 札幌)
23. 三好瑞希, 月本準, 堀井雄登, 竹内美絵, 加守虹穂, 福池凜, 木野倫子, 石丸直澄, 伊藤孝司: 先天代謝異常症ガラクトシアリドーシスに対するより効果的な遺伝子治療薬開発, 第 95 回日本生化学会大会 (2022.11, 千葉)
24. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: ヒト気管支上皮細胞 /THP-1 細胞共培養系によるナノマテリアルの吸入毒性評価法の開発, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
25. 伊藤潤, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博: 化学構造情報からヒトの皮膚感作性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 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
26. 荒井りおん, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: h-CLAT を用いたナノマテリアルのアジュバント効果の評価とメカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
27. 飯島一智, 鈴尾美穂, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄: THP-1 細胞を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能評価における 新規指標の探索, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
28. 木下啓, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博: 皮膚感作性評価における *in vitro* 試験法の効率化を目指した機械学習モデルの開発, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
29. 山城真輝, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: THP-1 細胞を用いた二酸化セリウムおよび酸化亜鉛ナノ粒子の免疫毒性

- の評価, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
30. 高橋祐次: 動物を用いない新たなリスク評価アプローチ法の開発: In vivo 毒性試験の経験に基づく NGRA による安全性評価手法に関する考察、日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.20, 静岡)
 31. 高橋祐次: DPI 製品化の課題: 粉体の吸入剤研究開発における有効性・薬物動態・安全性の評価を推進する非臨床評価手法の開発、第 13 回 粉末吸入剤研究会シンポジウム (2022.11.24, 富山)
 32. Taquahashi Y, Tsuruoka S, Okubo Y, Tanemura K, Aisaki K, Kitajima S: Modernization of acute toxicity testing with integrated assessment of multiple vital signs as endpoints, 第 96 回日本薬理学会学術年会シンポジウム (2022.12.2, 横浜)
 33. Takaaki Tsunematsu and Naozumi Ishimaru: Cell Cycle machinery unravels the molecular mechanism of Cancer cell cannibalism, 第 45 回日本分子生物学学会年会 (2022.12.1, 千葉)
 34. 俵宏彰, 常松貴明, 永尾瑠佳, 佐藤真美, 大塚邦紘, 石丸直澄: がんにおける染色体パッセンジャー複合体構成因子 Borealin の高発現がもたらす新たな機能, 第 45 回日本分子生物学学会年会 (2022.12.2, 千葉)
 35. 三好瑞希, 月本準, 堀井雄登, 竹内美絵, 加守虹穂, 福池凜, 木野倫子, 石丸直澄, 伊藤孝司: 効率的治療を目的としたリソソーム性ノイラミニダーゼ 1 欠損症に対する AAV5 遺伝子治療, 第 45 回日本分子生物学学会年会 (2022.12.2, 千葉)
 36. 福池凜, 月本準, 堀井雄登, 竹内美絵, 加守虹穂, 三好瑞希, 木野倫子, 石丸直澄, 伊藤孝司: AAVPHP.eB ベクターの脳室内単回投与による NEU1 欠損症に対する遺伝子治療, 第 45 回日本分子生物学学会年会 (2022.12.3, 千葉)
 37. Tsunematsu T, Arakaki R, Sato M, Otsuka K, Ishimaru N: Exposure to Multi-Wall Carbon Nanotubes Promotes Fibrous Proliferation by Production of Matrix Metalloproteinase-12 via NF- κ B Activation in Chronic Peritonitis, 第 51 回日本免疫学会学術集会 (2022.12.7-9, 熊本)
 38. Kawamoto Y, Tamura K, Satoh M, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N: Role of Mucin 19 in Pathogenesis of a Mouse Model for Sjögren's Syndrome, 第 51 回日本免疫学会学術集会 (2022.12.7-9, 熊本)
 39. Tamura K, Kawamoto Y, Satoh M, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N: Pathological analysis of nasal tissue in a murine model of Sjögren's syndrome, 第 51 回日本免疫学会学術集会 (2022.12.7-9, 熊本)
 40. Otsuka K, Tsukumo S, Arakaki R, Satoh M, Yagita H, Ishimaru N, Yasutomo K: CD153+ CD4+ T cells exacerbate the autoimmune pathology via the interaction with CD30+ cells in salivary glands in Sjögren's syndrome, 第 51 回日本免疫学会学術集会 (2022.12.7-9, 熊本)
 41. Satoh M, Ushio A, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N: Th2 response enhances the differentiation into follicular B cells to progress the pulmonary autoimmune lesions in a mouse model of Sjögren's syndrome, 第 51 回日本免疫学会学術集会 (2022.12.7-9, 熊本)
 42. 俵宏彰, 常松貴明, 永尾瑠佳, 福田一稀, 佐藤真美, 大塚邦紘, 牛尾綾, 石丸直澄: 頭頸部扁平上皮癌における染色体パッセ

ンジャー複合体構成因子 Borealin の高発現がもたらす新たな役割, 第 58 回日本口腔組織培養学会学術大会・総会 (2022.12, 鹿児島)

3. その他
特になし

43. 常松貴明, 俵宏彰, 石丸直澄: HPV 陽性癌における新規脱コピキチン化酵素複合体の分子機構の解明, 第 58 回日本口腔組織培養学会学術大会・総会 (2022.12, 鹿児島)
44. Reinke EN, Corsini E, Ono A, Fukuyama T, Ashikaga T, Gerberick GF: Peer Review Report of the EpiSensA Skin Sensitization Assay, SOT 62nd Annual Meeting (2023.3.21, Nashville, USA)
45. Ashikaga T, Ohno A, Nishida A, Iijima K: Development of toxicity evaluation method for nanomaterials using activation of THP-1 cell as an index, SOT 62nd Annual Meeting (2023.3.22, Nashville, USA)
46. Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojyo M, Hirose A, Kanno J, Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice, SOT 62nd Annual Meeting (2023.3.22, Nashville, USA)
47. 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智, 足利太可雄: 様々なナノマテリアルを用いた THP-1 細胞の活性化に伴う指標の有効性評価, 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.27, 札幌)

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