

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2～4年度 総合研究報告書

研究代表者 足利太可雄

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 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 NM（銀2種、二酸化チタン6種、二酸化ケイ素（シリカ）6種、カーボンナノチューブ6種、酸化亜鉛4種及び二酸化セリウム3種）を評価し、その多くは細胞毒性を示さない濃度において CD54 発現を亢進させることを明らかとした。さらにそれらの各種 NM の一次粒子径、流体力学的直径、多分散指数（PDI）および ζ -ポテンシャルを収集または測定し、h-CLAT 試験結果と合わせたデータセットから、抗原提示細胞活性化能と NM の物性との関係性を解析した。さらに OPLS 法による多変量解析を実施し、酸化チタンについては h-CLAT 陽性と結晶形態の Anatase 型に関連性があること、二酸化ケイ素については h-CLAT 陽性と不純物に相関性が認められることを見出した。これまで各種 NM の吸入曝露により、肺組織において MMP-12 の発現誘導が生じることを明らかにしてきたが、二酸化ケイ素は in vitro において THP-1 細胞の MMP-12 の発現も誘導することを明らかにした。NM による THP-1 細胞の活性化メカニズム解明のため、エンドサイトーシスを阻害する Amiloride 処理下で THP-1 細胞に二酸化ケイ素を処理したところ、取り込み阻害と共に CD54 の発現亢進は顕著に抑制された。さらにウェスタンブロット解析より、二酸化ケイ素による THP-1 細胞活性化は NLRP3 インフラマソーム活性化を介することが示された。また気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養系を構築し、NM を気管支上皮モデルの上部より曝露したところ、CD54 の発現亢進が見られた。以上の研究から、in vitro において抗原提示細胞は NM を取り込むことで活性化し、その活性化能は NM の物性に依存していることが示唆された。

In vivo 吸入曝露試験において、酸化チタン TiDW、二酸化ケイ素 NM-201 および NM-204 を被験物質とする高分散乾燥検体の調製方法を確立し、肺胞領域まで到達する空力学的特性を有するエアロゾルを発生させることを可能とした。NM-201 については吸入曝露後 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るとともに脾臓からの単球・マクロファージの遊走の可能性が示され、さらに BALF 細胞の MMP12 の発現亢進が確認されたことから、MMP12 を介したナノマテリアルによる肺胞マクロファージの活性化機構が吸入毒性の評価系の確立に重要であることが示唆された。感染性免疫系への影響評価について NM-204 曝露マウスに RSV を感染させたところ、肺炎の代表的なマーカーであるケモカイン CCL5 および CCL3 の BALF 中のレベルは曝露量に依存し有意に上昇しており、NM-204 自身は炎症を惹起するような免疫刺激にならないが、RSV 感染肺炎の増悪因子であることが示唆された。さらに、マウス肺全葉を検討したところ、NM-204 高用量曝露群のみにおいて、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。以上により in vivo において吸入曝露された NM は肺胞マクロファージを活性化し、炎症を惹起する要因になりうることが示された。

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
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）

被験物質は、以下に示す各種NMおよびTHP-1細胞活性化物質とした。二酸化ケイ素NM（以下、ナノシリカ）については、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。さらにNM-204を用いて、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。カーボンナノチューブについては、先行研究で確立されたTaquan法により分散させたNT-7、非分散型NT-7、および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及びNM-403を用いた。

方法は、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、陽性の場合、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。LPSのコンタミネーションによる影響を避けるため、試験には乾熱滅菌（220°C、18時

間）した被験物質を使用した。h-CLATでは被験物質が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（Digital Sonifier 250D、最大出力200W）を用い、様々な条件で分散させ、最終的に細胞培養液中での分散状態を確認した。

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）

B.2.1. 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（NM200-JRCNM02000: NM-200, NM201-JRCNM02001: NM-201, NM202-JRCNM02002: NM-202, NM203-JRCNM10404: NM-203, NM204-JRCNM02004: NM-204）、2種の銀ナノ粒子と銀イオン（BioPure10, BioPure50, AgNO₃）。令和2、3年度は、各々の被験物質（二酸化チタンナノ粒子、二酸化ケイ素ナノ粒子）について個別に毒性結果との解析を実施した。令和4年度は、これらの被験物質について統合データセットを作成し、MMP12がナノマテリアルによるTHP-1細胞活性化の新しい指標となる可能性について予試験的な解析を実施し検討した。

B.2.2. 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測定・収集・整理した（銀ナノ粒子は一部の項目について

適応外)。

有害性情報データは、6種の二酸化チタンナノ粒子において本研究班で実施した*in vitro*試験でのh-CLAT試験法による毒性試験結果の他、厚生労働科学研究成果データベースMHLW GRANTS SYSTEMで公表された二酸化チタンナノ粒子の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の公表分 (*in vitro*試験結果:細胞毒性試験、遺伝毒性試験等のEC50値等、*in vivo*試験結果:吸入ばく露試験、気管内投与試験、腹腔内投与・経口投与試験による急性毒性、免疫毒性、アジュバント効果等)を調査対象情報源として収集・整理した。また、5種の二酸化ケイ素ナノ粒子においては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、本研究班の足利研究代表者が実施したh-CLAT毒性試験結果を収集した。すべての被験物質の物性項目においては、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。

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。

B.3. 細胞レベルでの毒性発現メカニズムの解明 (飯島)

B3.1 各種ナノマテリアル分散液の調製と評価

銀ナノ粒子

銀ナノ粒子はBioPure™ 銀ナノ粒子分散液 (nanoComposix, AGCB10 (一次粒径 10.3±1.9 nm, 濃度 0.99 mg/ml) および AGCB50 (一次粒径 52±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、培養液を用いて所定濃度まで希釈した。購入時および培養液で CV75 の濃度に希釈し 24 時間 37°Cインキュベーションした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 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養液に懸濁し、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 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、培養液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。シリカナノ粒子と同様に乾熱滅菌を行った。4 mg/ml の濃度になるように二酸化チタンナノ粒子を培養液

に懸濁し、プローブ型超音波装置を用いて水中で PWM 80%, 1 min の条件で処理した。培養液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。

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。4 mg/ml の濃度になるように二酸化セリウムナノ粒子を培養液に懸濁し、プローブ型超音波装置を用いて水中で PWM 80%, 1 min の条件で処理した。培養液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。

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。4 mg/ml の濃度になるように酸化亜鉛ナノ粒子を培養液に懸濁し、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。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培養液で 4 mg/ml に懸濁した。培養液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。培養液で CV75 の濃度に希釈し 24 時間 37°C 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. ナノマテリアルの抗原提示細胞活

性化能の評価

24 ウェルプレート各ウェルに 2.0×10^6 cells/ml ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞懸濁液 500 ml および各被験物質の分散液または溶液 500 ml 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。被験物質の暴露濃度は THP-1 細胞の生存率が 75%となる濃度 (CV75) を基準とし、公比 2 で上下合計 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算出した。

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 ウェルプレート各ウェルに 2.0×10^6 cells の THP-1 細胞を播種し、400 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を含む培養液で 3 日間、その後 PMA 不含培養液で 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、CO₂ 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 DDCt 法により遺伝子発現量を定量した

B.3.4. 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、培養液に再懸濁した。24 プレートの各ウェルに 2.0×10⁶ cells/ml THP-1 細胞懸濁液 500 ml および銀ナノ粒子分散液または硝酸銀溶液を 500 ml 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.3.5. 細胞内に取り込まれた銀の定量

24 ウェルプレートの各ウェルに 2×10⁶ cells/ml THP-1 細胞分散液 500 ml および同量の銀ナノ粒子分散液もしくは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 ml 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。

B3.6. 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 を用いた。各阻害剤を RPMI で所定濃度に希釈した。THP-1 細胞を 2.5×10⁶ cells/ml に調製し、24 well プレートに阻害剤溶液 100 ml と細胞懸濁液を 400 ml ずつ播種して 37°C CO₂ インキュベーター内で 1 時間前培養した。阻害剤で前処理した THP-1 細胞に、500 mg/ml に調製した Siacastar 溶液を 500 ml 添加し、CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。細胞を 1.5 ml チューブに移し、FACS buffer 1 ml で 2 回洗浄した。上清除去後、FACS buffer 500 ml で再懸濁した。フローサイトメーター (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer) を用いて Siacastar に由来する平均蛍光強度 (MFI) を測定した。

B3.7. ウェスタンブロッティング

ナノマテリアル曝露後の細胞懸濁液を全量回収し、Tris-buffered saline (TBS) で 2 回洗浄した。TBS を除去後、Protease Inhibitor, Phosphatase Inhibitor 含有 RIPA Lysis Buffer を 200 ml 添加し、再懸濁して 30 min, 4°C で静置した。30 分後、ソニケーション (50%, 15 秒×3 回) してから遠心分離 (15000 rpm, 30 min, 4°C) した後、上清を回収した。プロテインアッセイにより各サンプルの濃度を求めた。電気泳動後、メンブレンに転写し、抗 IL-1b 抗体, 抗 ASC/TSC 抗体, 抗 NLRP3 抗体, 抗 Caspase-1 抗体, 抗 b-Actin 抗体により検出を行った。

B.3.8. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系の構築とナノマテリアル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。ウェルプレート上のウェルに未分化 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、B3.2.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。

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、石丸)

C57BL/6NCrSlc 雄マウスを用い、Taquann 処理を施したナノシリカ (NM201) を全身吸入暴露装置にて暴露後 (0、15、30 mg/m³ 6h/day × 5 days)、4 週間ならびに 8 週間経過した時点で屠殺、解析を行った。肺胞洗浄液 (BALF)、肺組織、頸部リンパ節、脾臓よりリンパ球を調整し、フローサイトメーターによる細胞表面ならびに細胞内分子の発現を解析した。また、定量 RT-PCR 法により核遺伝子 mRNA 発現を検討した (高橋、石丸)。

(1) 検体

針状酸化チタン TiDW (R2 年度)、ナノシリカ NM204 (R3 年度) 並びにナノシリカ NM201 (R4 年度) を使用した。全ての検体

は、先行研究で開発した Taquann 法 (J Toxicol Sci. 2013) により高分散処理を行なった。

(2) 動物

マウスは 2 系統を使用した。マクロファージの機能評価については、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。RS ウイルスを用いた感染性免疫の評価に際しては、BALB/cCrSlc を 3 週齢で購入し 4 週齢から使用した。

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±1°C、湿度; 55±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。

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)、検体曝露群は低用量及び高用量群の 2 群構成とした (TiDW は 1 用量のみ)。

マクロファージの機能評価については、各群 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日間の連続の全身曝露吸入を行った。

RS ウイルスを用いた感染性免疫の評価に際しては、各群 24 匹のマウスを使用し、肺沈着量測定用に 9 匹、RS ウイルス感染用に 9 匹、RS ウイルス非感染用に 9 匹を割り当てた。1 日 6 時間 (10：00～16：00)、隔日 3 日間の全身曝露吸入を行った。

(3) エアロゾル発生装置及び曝露チャンバー

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 Taquann システム Ver3.0 を使用した。(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。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、噴射した検体を気相に分散させるサブチャンバー (気積 43 L)、及び動物を収容する曝露チャンバー (気積 179 L、マウスは 25 匹収容可能) 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。

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。曝露時間中は水分補給用の寒天 (日本 SLC) をメインチャンバー内に配置して動物に与えた。

(4) 曝露チャンバー内のエアロゾルモニタリング

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/m³) 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) を設置した。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155 特注品、φ55 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、φ55mm、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 L/min ×

120min=180 L から 1 m³ 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。

6 時間の吸入曝露時間を通して使用した総検体量と 6 時間の総換気流量から得られる名目上の質量濃度と実際にえら得た質量濃度からエアロゾル化効率を計算した。

(5) エアロゾルの空気力学的中位径測定 Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD)

エアロゾルの肺内への到達に重要な特性である空気力学的中位径測定は、Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI) を用いた。

10 L/min の流量で曝露チャンバー内のエアロゾルを吸引して MOUDI (Model 125 Nano MOUDI、KANOMAX) に導いた。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、MWCNT 回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

(6) 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。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。

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。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。

B.5 感染性免疫系免疫系への影響評価 (高橋、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-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。NM-201 についても同様に実施する予定である。

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。NM-201 についても同様に実施する予定である。

BALF 中の 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。

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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 レベルを上述のように定量した。

倫理面への配慮

本研究は動物実験の 3Rs に配慮して、動物実験委員会の承認のもとに基本指針を遵守して実施し、動物使用数や動物に与える苦痛は最小限に留めた。ボランティアおよびヒト組織は使用しなかった。これらのことから、倫理的問題は無いと考える。

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)

ナノシリカについて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 mg/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 mg/ml を最高用量と設定したが、いずれのナノシリカも 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。EC200 (CD54 発現濃度閾値) の値は、最小の NM-204 と最大の NM-201 で約 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 倍程度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 と最小の NM-201 で約 11.1 倍の差が見られた。

THP-1 活性化物質とナノシリカとの混合培養については、DNCB の適用濃度を固定 (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) し、NM-204 と混合曝露 (適用濃度: 0.00316~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) したところ、混合曝露により相加・相乗効果はないと判断された。次に適用濃度を固定した発熱性物質 LPS (1 ng/mL) と適用濃度を振った NM-204 (0.00316~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) との混合曝露では、CD86, CD54 とも相乗効果が認められた。

カーボンナノチューブについても、すべての被験物質について、1000 mg/ml においても細胞生存率が 75% 以上であり、1000 mg/ml を最高用量と設定した。今回検討したカーボンナノチューブ 6 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。EC200 (CD54 発現濃度閾値) の値は、最小の NM-402 と最大の NT-7 (非分散型) で約 10.3 倍の差が見られ、このことは THP-1 の CD54 発現を亢進させるのに必要な濃度がカーボンナノチューブ間でも 10 倍程度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 NT-7 (分散型) と最小の NM-401 で約 2.0 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、二酸化チタンナノ粒子は約 30 項目、二酸化ケイ素ナノ粒子は約 65 項目、銀ナノ粒子は 5 項目の二次粒子径についてデータを収集した。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)

二酸化チタンナノ粒子は、下記の物性項目について測定を実施した。定性分析は日本電子(株)製エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 JSX-3100RIIを用いて蛍光 X 線分析(EDX)により実施され、定量分析は ICP 発光分光分析装置 島津製作所 ICPS8100、原子吸光装置 Varian AA240、炭素・硫黄分析装置 CS-844 を用いての ICP 発光分光分析法、原子吸光分析法、燃焼-赤外線吸収法によって実施した。その結果、セリウム(Ce) <0.01 、ニオブ(Nb) <0.4 が検出された。細孔分布・比表面積測定(粒子解析)は、マイクロメリティクス製 細孔分布測定装置 ASAP-2020 を用いて真空中、 $300^{\circ}\text{C}\times 3\text{Hr}$ 前処理を行い、窒素吸着 BET 多点法によって実施した。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。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(粒子浸透速度測定および粒子接触角測定)によって実施した。粒子浸透速度測定は、協和界面科学製 高機能

表面張力測定装置 DY-500 (温度: $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 湿度: $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ 液体:蒸留水、粉体カラム半径: 5mm)によって実施し、試料をカラムに充填し、カラムを液体表面に鉛直に接液させた。その後、毛管現象により液体が粉体粒子の空壁(毛管)を上昇(浸透)したことによるカラムの重量変化を測定することにより浸透速度を求めた。粒子接触角測定は、協和界面科学製 高機能表面張力測定装置 DY-500 (温度: $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 湿度: $40\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、毛管半径測定用液体:イソプロパノール(IPA) 粉体カラム半径: 5mm)を用いて、浸透速度法によって分析した。

C.2.3. 階層的クラスタリング解析による類似度の評価

収集・整理した 6 種の二酸化チタンナノ粒子および 5 種の二酸化ケイ素ナノ粒子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、各々の被験物質についてクラスター化され、その類似性が示された。最初に大きくクラスター化した要因は、PCA(主成分分析法)の結果より二酸化チタンナノ粒子では、結晶構造の違いや不純物のニオブ(Nb)、リン(P)等で、二酸化ケイ素ナノ粒子ではよりコーティングの有無であった。

C.2.4. 物性データと抗原提示細胞活性化能の関連性解析

物性データと *in vitro* 毒性試験結果データとの関連性解析は、直交部分的最小二乗回帰分析(OPLS: Orthogonal Partial Least Squares Regression)により実施された。信頼度を加味した解析(S-plot)を進めた結果、6 種の二酸化チタンナノ粒子は、毒性が

Negative である MT-150A MT-500B に寄与 (寄与度 0.2 以上、信頼性 0.8 以上) する変数 (物性項目) は、Crystal Phase(Rutile)、Pore volume(cm³/g)、Ca が挙げられた。また、毒性が Positive な TKP-102 AMT-600 に寄与 (寄与度 0.2 以上、信頼性 0.8 以上) する変数 (物性項目) は、Crystal Phase(Anatase)、P が挙げられた。一方、寄与度 0.2 以上、信頼性が 0.5-0.6 付近でのインパクトが大きく、ばらつきも大きいような、毒性が Negative に影響している変数 (物性項目) は、Na や Porediameter(nm)が挙げられ、毒性の Positive に影響している変数 (物性項目) はジルコニウム(Zr)、ニオブ(Nb)、Zeta potential(mV)が挙げられた。

5 種の二酸化ケイ素ナノ粒子について OECD の公開データ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多変量解析 (OPLS 法) を実施した。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.2.5. 物性データと *in vivo* 毒性試験デー

タの関連性解析

本研究で用いた二酸化チタンナノ粒子の *in vivo* 毒性試験データは解析に資する試験検体数は揃っていなかったが、**MHLW GRANTS SYSTEM** から反復投与毒性試験 (吸入暴露および気管内投与試験) の有害性情報を収集した。MT-500B、AMT-600 が実施されており、その情報によると、肺泡マクロファージの影響による増加はみられたが、全身吸入暴露による顕著な病変への影響は認められなかったと述べられていた。

5 種の二酸化ケイ素ナノ粒子の OECD の公開データから収集した物性データと *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)、AggD、AggMorphology(nm)、AggIsoElecPointMean(pH)、AspectRatio、SAXS_SurfArea(m²/g)) として挙げられた。

C.2.6. *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

二酸化ケイ素ナノ粒子の物性データと *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。

C.2.7. THP-1 細胞の 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による抗原提示細胞活性化の指標としての可能性を解析した結果、MMP12Max (MMP12の最大値の相対発現量%) やMMP12MaxConc (MMP12の最大値の相対発現量%) の各変数に対する相関は、全て低かった。

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 各種ナノマテリアルの評価

培養液中での各種ナノマテリアルの一次径、流体力学的直径、多分散指数 (PDI) およびz-ポテンシャルを収集または測定した。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採用した。銀ナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子について、培養液にCV75の濃度にて懸濁後24時間の溶出イオン濃度および溶出率を測定した。

C.3.2 各種ナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

各種ナノマテリアル曝露後のTHP-1細胞のEC150 (CD86発現が150%を超える濃度)、EC200 (CD54発現が200%を超える濃度) およびCV75を算出した。銀ナノ粒子

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 およびEC200は直径約50 nmの銀ナノ粒子よりわずかに低濃度であった。銀イオンのEC150 およびEC200は両銀ナノ粒子の値と比較してはるかに低かった。

二酸化チタンナノ粒子

アナターゼ型ナノ粒子 (AMT-100、AMYT-600、TKP-102) においてCD54の発現が基準値を上回り、ルチル型ナノ粒子 (MT-150A, MT-500B) およびルチル型針状結晶 (TiDW) では基準値を上回らなかった。一方、ルチル型TiO₂では、MT-500B およびTiDWにおいてCD86の発現量が基準値を上回った。アナターゼ型TiO₂のうち、TKP-102のEC200は、AMT-100 およびAMT-600よりも低濃度であった。

二酸化セリウム粒子

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. 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遺伝子の発現量を測定した。ナノ粒子の種類により、異なるMMP-12お

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* 遺伝子の発現を測定した。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.3.4. 銀ナノ粒子、銀イオン処理後の細胞内銀濃度および細胞内活性酸素種 (ROS) 産生の定量

直径約 10 nm 銀ナノ粒子 (AGCB10) と銀イオン処理後の銀ナノ粒子、銀イオン処理後の細胞内銀濃度および細胞内活性酸素種 (ROS) 産生の定量を行った。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。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. ナノ粒子取り込み阻害剤の評価

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 は取り込み阻害剤のみの処

理においても THP-1 細胞 *CD54* および *CD86* 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 の効果を評価した。Amiloride 処理により、シリカナノ粒子による *CD54* の発現亢進は顕著に抑制された。

C.3.6. シリカナノ粒子処理後の細胞内シグナル伝達

シリカナノ粒子 (Sicastar) 処理 THP-1 細胞後の細胞抽出サンプルのウェスタンブロットリングを図 7 に示す。シリカナノ粒子 (Sicastar) の濃度依存的に IL-1b, cleaved caspase-1 の増加が示された。また、スメアであるが、NLRP3 と思われるバンドも確認された。

C.3.7. 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。

C.3.8. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系の構築とナノマテリアル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が見られ、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、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なかった一方、気管支上皮細胞用培養液を用いた場合には THP-1 細胞の CD54 の発現上昇が見られた。よって、気管支上皮モデルと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 NiSO₄ 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。その結果単培養と比較し、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。

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、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た。また NM201 の吸入曝露によって、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。さらに、NM201 の吸入曝露によって、BALF 細胞での CD54 および CD163 の発現に変動は認

められず、脾細胞での CD54 および CD163 の発現低下が示された。一方で、NM201 の吸入曝露後 4 週での BALF 細胞の MMP12 の発現亢進が確認された (石丸)。

TiDW については、質量濃度 25.0±3.2 mg/m³、MMAD は 2,251nm (σg:3.2~4.9) であった。エアロゾル化効率は 33.1%であった。

ナノシリカ NM204 については、低濃度群：質量濃度 10.3±1.1 mg/m³、MMAD 1439 nm (σg:3.2~4.2)、高濃度群：質量濃度 25.6±2.5 mg/m³、MMAD 1468 nm (σg:3.5~4.0)、であった。エアロゾル化効率は低濃度群 19.6%、高濃度群 16.2%であった。

ナノシリカ NM201 については、低濃度群：質量濃度 7.8±1.8 mg/m³、MMAD 1658 nm (σg:3.4~4.1)、高濃度群：質量濃度 33.6±2.4 mg/m³、MMAD 2030 nm (σg:3.4~4.6) であった。エアロゾル化効率は低濃度群 14.8%、高濃度群 21.3%であった。(高橋)

C.5. 感染性免疫系免疫系への影響評価 (高橋、渡辺)

RSV マウス感染実験

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/m³ (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 NM-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 NM-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、NM-204 曝露による影響は 10~20%程度の上乗せ効果に留まった。

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/m³ 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。NM-204 低用量 (10 mg/m³) 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、NM-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。

NM-201 についても、同様の評価を実施する (R5.1~2 月)。

RSV 感染 THP-1 細胞実験

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)

本研究では、OECD in vitro 皮膚感作性テストガイドラインである h-CLAT を用い、NM の抗原提示細胞活性化能についてデータベース作成を行った。その結果、多くの NM 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。このことは、NM がマクロファージの SR-B1 や Tim4 などのスカベンジャーレセプターを介して取り込まれて活性化するという従来の知見を裏付けるものであると考えられる。さらに、今回検討したすべてのナノシリカとカーボンナノチューブは 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。今回得られた様々な NM の EC200 と、既知の物性や毒性情報との比較を行うことで、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とともに、OECD において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ていきたい。
無機化合物の固体である NM 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、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。

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セリウム(Ce)の検出は、定量分析結果から偏析の可能性として、また、ニオブ(Nb)は、製造元より酸化チタン製造に用いる原料に 0.1-0.2% 程度含まれているとの情報より、本試験結果と一致し二酸化チタンナノ粒子そのものには含有していたものではないことがわかった。また、TiDW に細孔が検出されなかった理由として、針状の形状によるものと考えられた。TiDW は、他の検体に比べて、ばらつきが大きく、その要因として、検体調整で一様の状態の作成が難しかった事や、針状結晶のため圧縮成形のばらつきが発生していることが示唆された。令和

4 年度の全体の PCA による解析では TiDW が 95%信頼区間に入らなかったことから、他の被験物質との性質が逸脱していると考えられた。

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、その結果と *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が、物性データと有害性データとの関連性について 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) が横軸から探査可能であることが示唆された。さらに解析を進めた結果、毒性が Positive および Negative に寄与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の中で結晶形態の Anatase 型が得られた。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、不純物の量や、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。別の解析手法として、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 MOCA 法を予試験的に解析したところ、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い、この手法では解析ができなかった。この理由として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ことや、*in vivo* 毒性試験結果から全体的にばらつきが大きいことが考えられた。従って、OPLS 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本手法の有用性を証明するものであった。

二酸化ケイ素ナノ粒子の物性データと全ての被験物質において positive な結果となった抗原提示細胞活性化能 (h-CLAT 試験法結果) の関連性解析では、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、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く、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。アルミニウムは恐らくコーティング材由来と推察され、NM204 に比べて NM201 の毒性試験結果が若干弱かったのは、凝集のし易さやコーティング材 (有) としての物性の性質が影響しているものと考えられた。一方、*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られた。

in vitro h-CLAT 試験結果の MMP12 との関連性解析では、pEC200[EC200 の変数として対数 (−Log) を取った値] に対して MMP12Max は正の相関がありそうだが、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。

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. 各種ナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

銀ナノ粒子

EC150 (CD86 発現が 150%を超える濃度) の比較において、直径約 10 nm の銀ナノ粒子が 127.6 mg/ml に対し、直径約 50 nm の銀ナノ粒子は 159.5 mg/ml であり、直径約 10 nm 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% と高くなっている。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。

二酸化チタンナノ粒子

アナターゼ型ナノ粒子はルチル型ナノ粒子よりも活性酸素種 (ROS) の生成と DNA 損傷による毒性が高いこと、IL-1 β 、IL-10、INF- β などのサイトカインの産生が高いことが報告されている。今回の結果は、これらの以前の報告と一致しており、THP-1 細胞の CD86、CD54 発現を指標とした本手法が結晶型に基づく免疫毒性の可能性の違いを正しく評価できたことを示唆している。また、ルチル型ナノ粒子間での比較において、MT-500B は MT-150A より一次粒子径は大きいものの流体力学径は小さく、EC150 はより低濃度であった。ナノ粒子の細胞への取り込みは二次粒子径に依存することが報告されており、それと対応する結果であった。

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。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。後述のシリカナノ粒子における ROS を介した活性化メカニズムを踏まえると、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

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。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、現在亜鉛イオンの THP-1 細胞の活性化能の評価を進めている。

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

未分化および分化 THP-1 細胞いずれにおいても、ナノ粒子処理により濃度依存的、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) およびストーパー法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、合成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、取り込みの依存性が考えられた。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、MM-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。

D.3.3 銀ナノ粒子による抗原提示細胞活性化作用の機序について

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、銀ナノ粒子の暴露において、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考えられる。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示唆している。

一方、同程度の細胞生存率を示す濃度 (CV75) で暴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く、ROS 産生も高いことがわかった。THP-1 細胞への銀の取り込み量、ROS 産生と CD86 および CD54 発現亢進に乖離が見られ、銀ナノ粒子と銀イオンとで異なる活性化経路が存在する可能性も考えられた。

D.3.4 シリカナノ粒子による抗原提示細胞活性化作用の機序について

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シスにより THP-1 に取り込まれること、細胞内において作用することが示唆された。ウェスタンブロッティングの結果

より、シリカナノ粒子による抗原提示細胞活性化は NLRP3 インフラマソーム活性化を介することが示された。

D.3.5. 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、高原提示細胞活性化能を指標とする本手法は、ナノマテリアル単体だけでなく、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.3.6. 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、シリカナノ粒子にさら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。今後、共培養系に適用されたシリカナノ粒子の分布を調査し、そのメカニズムの解析をすすめる。

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、石丸)

ナノシリカの全身吸入実験において、肺胞マクロファージの分化パターンはカーボンナノチューブの吸入実験とは異なっている可能性が示された。一方で、肺胞マクロファージにおける MMP12 の発現は NM201 の曝露においても上昇することが判明し、ナノマテリアルに共通の評価系となる可能性が考えられた(石丸)。

粒子状物質の吸入において、粒径は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 を指標としており、肺胞領域まで到達可能とされる MMAD は 3 μ m 以下である。本研究では、物理化学的性質が異なる 3 種類のナノマテリアル検体について、高分散乾燥検体の調製方法と肺胞領域まで到達する空力学的特性を有するエアロゾルを発生させることを可能とした。一方、曝露濃度モニタリング上の課題として、希釈装置を利用しても目標濃度 (30mg/m³) 周辺では測定上限を超過する。質量濃度については、安定しているため曝露方法に問題はないと考えられるが、高濃度での曝露では CPC 以外のリアルタイムモニタリング方法を考慮する必要がある。現在のところ、光学的に検出ができない 0.3 μ m 以下の粒子に対してリアルタイムで測定が可能で、30 万個/cm³ 超の粒子数を測定できる装置は市販されていないことから、全く異なる方法による測定を考える必要がある。(高橋)

D.5. 感染性免疫系免疫系への影響評価 (高橋、渡辺)

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、NM-204 曝露により先行研究での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、NM-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 NM-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 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た。

肺の病理組織学的な検討では、NM-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 NM-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 NM-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。

In vitro の影響評価については、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を構築して評価を実施したい。現在、NM-201 の実験を準備しており、h-

CLAT など *in vitro* での結果と併せて NM-204 との比較評価を実施する。

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)

様々な NM が、抗原提示細胞の活性化を指標とする OECD テストガイドラインである h-CLAT で陽性となり、また CD54 の発現閾値である EC200 が被験物質間で大きく異なっていることから、今後物性や *in vivo* における毒性との関係性解析の指標としてだけでなく、*in vitro* における NM の毒性評価試験の指標になりうると考えられた。

さらに、NM による抗原提示細胞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ものと考えられ、今後細胞内シグナル伝達系の解析により活性化のメカニズムを明らかにすることで、*in vivo* における実際の毒性発現メカニズム解明につながることを期待できる。

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)

本研究では、被験物質として 3 種の銀ナノ粒子、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検討した。物性および *in vitro* / *in vitro* 有害性情報は、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 法による各被験物質の

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、また、*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。本解析では、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見だせなかったが、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)

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を確立した。銀ナノ粒子や酸化亜鉛ナノ粒子では溶出イオン、シリカナノ粒子では細胞への粒子の取り込みと NLRP3 インフラマソームの活性化を介することがわかった。また、ナノマテリアルと 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った。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) より曝露されたナノマテリアルによりモデル下部 (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、石丸)

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るとともに、MMP12 を介したナノマテリアルによる肺胞マクロファージの活性化機構が吸入毒性の評価系の確立に重要であることが示唆された (石丸)。

物理化学的性質が異なる 3 種類のナノマテリアル検体について、高分散乾燥検体の調製方法と肺胞領域まで到達する空力学的特性を有するエアロゾルを発生させて、1 日 6 時間、5 日間連続全身曝露吸入を実施することを可能とした (高橋)。

E.5. 感染性免疫系免疫系への影響評価 (高橋、渡辺)

1. RSV 感染マウスモデルにおいて、ナノシリカ NM-204 の Taqaan 法での吸入曝露により、RSV 肺炎は増悪化した。
2. 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。
3. NM-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。
4. NM-201 の評価を実施し、*in vitro* での結果と併せて NM-204 との比較評価を総合的に実施する。

F. 研究発表

F.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.
2. 高橋 祐次, ナノサイズプラスチックの評価, *BioIndustry*, 2020;37(9), p59-67.
3. 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.
4. 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.
5. 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;595:120241.
6. 高橋 祐次. ナノサイズプラスチックの評価、*BioIndustry*, 37(9)、p59-67, 2020.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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;26(6):1149-1156.
12. 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, 2020;71(5) : 476-747.
13. 石丸直澄 (分担) . わかりやすい病理学 改訂第7版,2021:45-70, 317-322.
14. 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.
15. 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
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
26. 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.
 27. Ohno Y, Okiyama Y, Hirose A, Fukuhara K. The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2022;441:115974
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 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.
 34. Otsuka K, Sato M, Tsunematsu T, Ishimaru N. Virus Infections Play Crucial Roles in the Pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Viruses*. 2022;14:1474.
 35. 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.
 36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
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

F.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)

- 標的臓器における IL-33 の役割 第 109 回日本病理学会総会 (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 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部会主催, 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所ウェブ講演会 (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)
 29. 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)
 30. 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)
 31. 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)
 32. 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)
 33. 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)
 34. 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)
 35. 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)
36. 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)
 37. 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)
 38. 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)
 39. 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)
 40. 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)
 41. 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)
 42. 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)
 43. 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)
 44. 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)
 45. 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)
 46. 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)
 47. 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)
 48. 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)
 49. 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)
 50. 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)
51. 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)
 52. 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)
 53. 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)
 54. 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)
 55. 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)
 56. 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)
 57. 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)
 58. 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)
 59. 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)
 60. 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)
 61. 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)

62. 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)
63. 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)
64. 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)
65. 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)
66. 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)
67. 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)
68. 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)
69. 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)
70. 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)
71. 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)
72. 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 回日本化粧品学会 (2022.6.10, On line)
73. 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)
74. 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)
75. 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)
76. 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)
77. 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)
78. 飯島一智, 鈴尾美穂, 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)
79. 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)
80. 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)
81. 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)
82. 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)
83. 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)
84. 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)
85. 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)
86. 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)
87. 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)
 88. 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)
 89. 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)
 90. 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)
 91. 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)
 92. 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)
 93. 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)
 94. 木下啓, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博. 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)
 95. 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)
 96. 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)
 97. 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)
 98. 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)
 99. Tsunematsu T, Ishimaru N. 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)
 100. 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 の高発現を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)
101. 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)
102. 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)
103. 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)
104. Kawamoto Y, Tamura K, Sato 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)
105. Tamura K, Kawamoto Y, Sato 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)
106. Otsuka K, Tsukumo S, Arakaki R, Sato 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)
107. Sato 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)
108. 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ージ複合体構成因子 Borealin の高発現を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)
109. 常松貴明, 俵宏彰, 石丸直澄. HPV 陽性癌における新規脱ユビ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)
110. 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)
111. 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)
112. 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)

113. 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)

G. 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