

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究

令和5年度 分担研究報告書

化学物質のin vitro呼吸器感作性試験法とNMのin vitro抗原提示細胞活性化試験法の開発
に関する研究

研究分担者 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

化学物質の吸入曝露による健康影響が懸念されている一方、現在の OECD ガイドラインである in vivo 吸入曝露試験は多大な費用と時間が課題とされており、毒性発現機構に基づいた効率的で精度の高い試験法の開発が強く望まれている。特に化学物質の呼吸器感作については、未だ行政が受け入れ可能な試験法が開発されておらず、また、ナノマテリアル(NM)については、従来の in vivo 吸入曝露試験のみでは毒性評価が十分に行えない状況にある。

本分担研究では、化学物質の in vitro 呼吸器感作性試験法に関しては皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質を識別可能な 3 次元共培養系の開発することを目的として、文献調査により皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質および非感作性物質の参照物質リストを確立した。NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法に関しては、h-CLAT 法を用いて、表面処理の異なる 2 種類の酸化亜鉛 NM の評価を行った結果、平均一次粒子径(25nm)の酸化亜鉛（基材、MZ-500）と亜鉛イオンの溶出量低減を図った表面処理品（MZ-500HP）では、細胞毒性及び抗原提示細胞活性化能に違いは認められなかった。

今後本分担研究では、作成した参照物質リストを用いて in vitro 呼吸器感作性試験法開発を進める予定である。また、酸化亜鉛 NM の h-CLAT 法による評価をさらに行い、物性と活性化能の関係性解析を行うことで、NM による抗原提示細胞活性化機構の解明を目指す。

A. 研究目的

化学物質の吸入曝露によりアレルギー性喘息を生じる呼吸器感作については、未だ行政が受け入れ可能な試験法が開発されておらず、昨年欧州各国より in vitro 試験法開発を目標とした作業計画が OECD に提案された。また、ナノマテリアル(NM)は吸入曝露後に異物処理に重要な役割を果たす肺胞マクロファージによって貪食されるが、化学物質とは異なり肺内に蓄積さ

れるため、従来の in vivo 吸入曝露試験のみでは毒性評価が十分に行えない状況にある。

そこで本研究班では、短期吸入曝露された NM を含む化学物質の免疫毒性評価手法の開発と、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。本分担研究では、先行研究で見出したバイオマーカー等を測定指標とすることで、NM の抗原提示細胞活性化能およ

び化学物質の呼吸器感作性のメカニズムの解明とそれに基づく試験法開発を行う。

B. 研究方法

1. 化学物質の in vitro 呼吸器感作性試験法の開発

呼吸器感作性標準物質のリスト化を行った。呼吸器感作性については標準化された試験法がそもそも存在せず、そのメカニズムも不明な点が多い。そこで現時点における AOP (Adverse Outcome Pathway, 有害性発現経路)の解析を行い、類似の毒性である皮膚感作との共通部分(タンパク結合性、抗原提示細胞活性化)と異なる部分(気管支上皮細胞の関与や、皮膚感作が遅延型の Th1 優位のアレルギーであるのに対し、呼吸器感作は IgE が関与する即時型の Th1 優位のアレルギーである点)を考慮し、呼吸器感作性物質、皮膚感作性物質および非感作性物質を見分けるための評価スキーム案を作成した。さらに、呼吸器感作性物質に関する文献を収集整理し、情報の信頼性の高い 9 品を標準物質として選択した。皮膚感作性物質および非感作性物質については、皮膚感作に関する OECD ガイドラインである 497 の習熟度確認物質リストからそれぞれ 9 品を選択した。それぞれの物質について、呼吸器感作性と関連すると思われる物性(分子量、沸点および LogKow)と in vivo, in vitro の皮膚感作性試験結果を収集しリスト化した。

2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発

平均一次粒子径(25nm)の酸化亜鉛(基材、MZ-500)と亜鉛イオンの溶出量低減を図った表面処理品(MZ-500HP)の 2 点の in vitro における抗原提示細胞活性化能を、human Cell Line Activation Test (h-CLAT) により評

価した。具体的方法は OECD TG442E に準拠した。いずれの被験物質についても、100 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、公比 $\sqrt{10}$ で希釈した計 8 用量を設定した本試験を各 3 回実施した。本試験では、被験物質を細胞に 24 時間ばく露し、細胞表面の CD86 及び CD54 の発現量をフローサイトメトリーによって測定した。

(倫理面への配慮)

全て文献調査と in vitro 試験であり、倫理上の問題はないと考える。

C. 研究結果

1. 化学物質の in vitro 呼吸器感作性試験法の開発

表 1 に 9 品の呼吸器感作性標準物質、9 品の皮膚感作性物質および 9 品の非感作性物質リストを示した。今後本研究ではこれらの参照物質を用い、in vitro 呼吸器感作性開発を進める。

2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発

用量設定試験の結果、CV75(生存率が 75%に相当する被験物質濃度)は MZ-500 で 41.6 $\mu\text{g/mL}$ 、MZ-500HP で 29.7 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。いずれの被験物質についても、3 回の本試験のいずれにおいても、CD86 発現についてはすべての用量で陰性となったが、CD54 発現については 2 品とも複数濃度で相対発現量が 200%以上となり陽性と判断された。抗原提示細胞活性化の指標である EC200(CD54 が陽性となる濃度閾値)について、MZ-500 と MZ-500HP ではそれぞれ 10.1 $\mu\text{g/mL}$ 、10.5 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。図 1 と 2 に MZ-500 と MZ-500HP の h-CLAT 試験結果を示した。

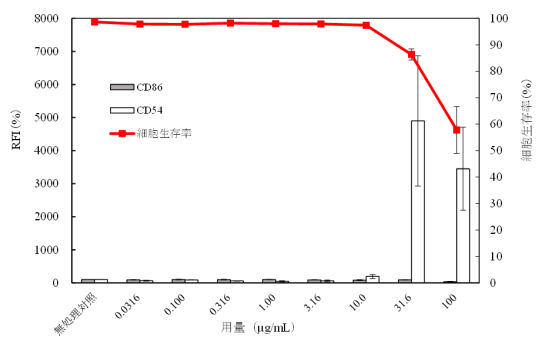


図1 MZ-500のRFI及び細胞生存率(n=3)

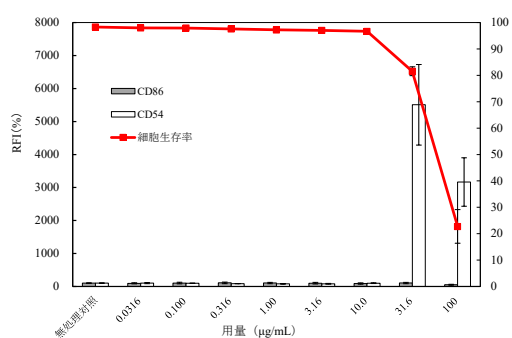


図2 MZ-500HPのRFI及び細胞生存率(n=3)

D. 考察

1. 化学物質の in vitro 呼吸器感作性試験法の開発

選択された呼吸器感作性標準物質について、揮発性有機化合物 (VOC) の定義である「沸点が 260°C以下」に該当しない化合物や in vitro 皮膚感作試験で陰性となった化合物も散見された。皮膚感作性標準物質については、全ての化合物が in vivo (マウス) および in vitro (OECD TG497 データセット) で皮膚感作性陽性であった。非感作性標準物質については in vivo (マウス LLNA 法) 試験陽性が複数存在しており、偽陽性物質と判断された。

2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発

今回、亜鉛イオンの溶出が酸化亜鉛 NM による抗原提示細胞活性化の原因ではないかとの仮説から、2種の酸化亜鉛 NM (基材及び表面処理品) について h-CLAT 試験を行ったところ、いずれも CD54 の強い発現誘導が認められ、細胞毒性、抗原提示細胞活性化能ともほぼ同程度であった。表面処理によりイオン交換水への亜鉛イオンの溶出を約 1/3 に低減化したとされる (サンプル提供メーカーからの非開示情報) MZ-500HP と基材の MZ-500 の抗原提示細胞活性化能に違いが認められなかったことから、活性化には溶出した亜鉛イオンだけでなく、固体としての酸化亜鉛 NM の細胞内取り込みが関与している可能性が考えられた。今後酸化亜鉛 NM の数を増やして h-CLAT による評価を行うとともに、ナノシリカの細胞内取り込み阻害が認められた Amiloride の THP-1 細胞への前処理による活性化能への影響や、細胞内亜鉛イオン濃度の測定により、酸化亜鉛による抗原提示細胞活性化のメカニズム解明を目指す。

E. 結論

1. 化学物質の in vitro 呼吸器感作性試験法の開発

既存の文献調査により、呼吸器感作性物質を皮膚感作性物質および非感作性物質から見分ける試験系開発を目的に、それぞれの標準物質のリスト化を行った。今後本研究ではこれらの呼吸器感作性物質を用い、in vitro 試験法開発を進める予定である。

2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発

平均一次粒子径 (25nm) の酸化亜鉛 NM (基材、MZ-500) と亜鉛イオンの溶出量

低減を図った表面処理品酸化亜鉛 NM (MZ-500HP) の 2 点の in vitro における抗原提示細胞活性化能を、human Cell Line Activation Test (h-CLAT) により評価したところ、細胞毒性及び抗原提示細胞活性化能に違いは認められず、抗原提示細胞活性化は亜鉛イオン濃度だけでなく、固体としての酸化亜鉛ナノマテリアルの取り込みが関与していることが考えられた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Tanabe I, Yoshida K, Ishikawa S, Ishimori K, Hashizume T, Yoshimoto T, Ashikaga T: Development of an In Vitro Sensitisation Test Using a Coculture System of Human Bronchial Epithelium and Immune Cells, *Altern Lab Anim*. 2023: 2611929231204823. doi: [10.1177/02611929231204823](https://doi.org/10.1177/02611929231204823).

F.2 学会発表

1. 荒井りおん, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: THP-1 細胞を用いたシリカナノ粒子とりポ多糖共暴露による抗原提示細胞活性化能の評価, 第 50 回日本毒性学会学術年 (2023.6.21, 横浜)
2. 飯島一智, 西田明日香, 高橋遥, 中浜美月, 荒井りおん, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄: 気管支モデル/単球系細胞株共培養系を用いたナノマテリアル吸入毒性評価と細胞間相互作用の解析, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21, 横浜)
3. 大野彰子, 西田明日香, 沖山佳生, 飯島一智, 足利太可雄: Verification of usefulness as evaluation index for

nanomaterials using the h-CLAT test method, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21, 横浜)

4. Ohno A, Nishida A, Okiyama Y, Iijima K, Ashikaga T, Verification of the effectiveness of EC 200 and EC 150 indicators of THP-1 cell activation on various nanomaterials, 266th ACS National Meeting & Exposition, (2023. 8.13-17, San Francisco).
5. 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 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の評価法の開発とその活性化メカニズムの解析, 第 30 回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11, 川崎)
6. 荒井りおん, 西田明日香, 高橋遥, 中浜美月, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支上皮モデルと THP-1 細胞を組み合わせたナノマテリアルの吸入毒性評価法の開発に向けた気管支上皮分泌サイトカインの解析, 第 30 回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11, 川崎)
7. Ashikaga T, Ohno A, Arai R, Iijima K: Activation of THP-1 cells by mixed exposure to silicon dioxide nanomaterial and skin sensitizer or febrile substance, SOT 63nd Annual Meeting (2024.3.12, Salt Lake City, USA)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

表 1

Respiratory sensitizers	Physico-chemical property				In vivo skin sens.	In vitro skin sens.			
	Name	Cas No.	M.W.	LogKow		B.P.	LLNA sub cat	DPRA Cys	DPRA Lys
Chloramine T	127-65-1	205.7	-2.1	292	1	0	1	1	1
Diphenylmethane diisocyanate	101-68-8	250.3	4.5	> 300	1	1	1	NA	1
Hexahydro phthalic anhydride	85-42-7	154.2	1.0	252	1A	1	1	0	0
Hexamethylene diisocyanate	822-06-0	168.2	3.2	255	1	1	1	NA	1
Piperazine	110-85-0	86.1	-1.5	146	1	0	0	NA	1
Toluene diisocyanate	26471-62-5	174.2	3.7	251	1A	1	1	NA	1
Trimellitic anhydride	552-30-7	192.1	-0.6	390	1B	0	1	0	1
Glutaraldehyde	111-30-8	100.1	-0.1	129	1A	1	1	1	1
Methyltetrahydrophthalic anhydride	11070-44-3	166.2	NA	290	1	NA	NA	NA	NA

Skin sensitizers	Physico-chemical property				In vivo skin sens.	In vitro skin sens.			
	Name	Cas No.	M.W.	LogKow		B.P.	LLNA sub cat	DPRA Cys	DPRA Lys
1,4-Benzoquinone	106-51-4	108.1	0.2	188.7	1A	1	1	1	1
4-Nitrobenzylbromide	100-11-8	216	2.82	267.9	1A	1	1	1	1
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	202.55	2.17	315	1A	1	1	1	1
para-phenylenediamine	106-50-3	108.14	-0.3	267	1A	1	1	1	1
4-Methylaminophenol sulphate	55-55-0	123.15	0.63	276.7	1A	1	1	1	1
Methyldibromo glutaronitrile	35691-65-7	265.9	1.89	256.7	1A	1	1	1	1
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	167.25	2.42	289.4	1A	1	0	1	1
Isoeugenol	97-54-1	164.2	3.04	266	1A	1	1	1	0
Citral	5392-40-5	152.2	2.99	228	1A	1	1	1	1

Non sensitizers	Physico-chemical property				In vivo skin sens.	In vitro skin sens.			
	Name	Cas No.	M.W.	LogKow		B.P.	LLNA sub cat	DPRA Cys	DPRA Lys
Benzyl benzoate	120-51-4	212.2	4.0	323.5	1B	0	0	1	0
Citronellol	106-22-9	156.3	3.9	224.3	1B	1	0	0	1
DMSO	67-68-5	78.1	-1.4	189.0	1B	0	0	0	1
n-Hexane	110-54-3	86.2	3.9	68.7	NC	0	0	0	0
Hexyl salicylate	6259-76-3	222.3	5.5	271.8	NA	0	0	0	1
Hydrocortisone	50-23-7	362.2	1.6	389.3	NA	1	1	1	0
alpha-Isomethylionone	127-51-5	206.3	4.4	271.2	1B	0	0	0	1
OTNE	54464-57-2	234.4	5.0	287.6	1B	0	NA	0	1
Propylene glycol	57-55-6	76.1	-0.9	187.6	NC	0	0	0	0

0=Negative, 1=Positive

NA=Not Available