

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 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 安全性生物試験研究センター 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。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 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した。

呼吸器感作性評価法の開発については以下の検討を行った。*In vitro* 試験法開発を進めるために文献情報から標準物質を選定し、物性値など関連情報を収集した。気管支上皮細胞と抗原提示細胞の共培養系において代表的な皮膚および呼吸器感作性物質を用いて mRNA 発現を比較検討した結果、*OX40L* の発現増強が呼吸器感作性物質でのみ有意に高いことから、呼吸器感作のバイオマーカーとして非常に有望と考えられた。また細胞株樹立を目指し、ヒト肺胞マクロファージ細胞に SV40 large T 抗原とマウス GM-CSF の遺伝子導入を行った。さらに *in vivo* 実験系の構築のため、ミスト発生装置による TDI 及び TMA のエアロゾル化を検討した。また呼吸器感作性物質の *in silico* 予測モデル開発のために、指標となる物性項目を整理した。

NM の免疫毒性評価法の開発については以下の検討を行った。亜鉛イオンの溶出量が異なるとされる 2 種の酸化亜鉛ナノ粒子について h-CLAT 試験を実施するとともに、流体力学的直径と ζ-potential を測定した。ICP-AES による細胞内の亜鉛量の定量と亜鉛イオンによる THP-1 の活性化能の検討を行った結果も合わせ、酸化亜鉛ナノ粒子による THP-1 細胞の活性化には、細胞外で溶出した亜鉛イオンだけでなく、固体粒子としての作用が関与していることが示唆された。シリカナノ粒子を曝露した THP-1 細胞において、*CD54*、*CD86*、*IL-1β*、*MMP-12*、*CCL-3*、*CCL-5* の各遺伝子の発現亢進が見られた。さらにマウス骨髄由来マクロファージに各種 NM を処理したところ、カーボンナノチューブである T-CNT が *Mmp-12* mRNA 発現を亢進させていた。したがってこうした遺伝子発現は NM による抗原提示細胞活性化のバイオマーカーになりうると考えられた。*In vivo* 吸入曝露試験として、ナノシリカについて Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 にてエアロゾル化を検討し、曝露条件を決定した。今後 3 日間間歇曝露実験を実施し、肺胞マクロファージの機能解析を行う予定である。さらにナノシリカを吸入曝露させたマウスに RSV を感染させ、ウイルス感染下における BALF の機能解析を行った結果、感染影響下における NM の免疫毒性の指標としてケモカインである *CCL5* および *CCL3* が利用できる可能性が示された。

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
毒性部 動物管理室 室長

善本 隆之

東京医科大学 医学総合研究所
免疫制御研究部門

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

飯島 一智

横浜国立大学 工学研究院 准教授

黒田 悦史

兵庫医科大学 医学部免疫学 教授

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

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

A. 研究目的

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。

我々の先行研究 (20KD1004) では、*in vivo* 吸入曝露試験により、NM が肺胞マクロファージの MMP-12 発現を有意に増加さ

せること、RSV 感染マウスモデルにおいて肺炎を増悪させること、*in vitro* 試験において様々な NM が THP-1 細胞の CD54 発現を顕著に亢進させることなどを見出してきた。また気管支上皮細胞と THP-1 細胞の共培養系も確立した。また研究分担者の善本らは、3 次元共培養系を開発し、Th2 分化に重要な副刺激分子 OX40 リガンド (OX40L) の発現が呼吸器感作性物質特異的に亢進することを見出している。

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。

B. 研究方法

B.1. 化学物質の *in vitro* 呼吸器感作性試験法の開発 (足利、善本、黒田)

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。

まず、気道上皮細胞株 (BEAS-2B) と単球由来細胞株 (CD14-ML) から樹状細胞株 (CD14-MLDC) への分化を Alvetex scaffold 上で 3 次元培養を 2 日間それぞれ別々に行い、その後それぞれの scaffold を気道上皮細胞 (BEAS-2B) を上側、樹状細胞株 (CD14-MLD) を下側にして重ね合わせ気道上皮の構造を *in vitro* で模式的に構築し一晚培養した。3 日目にすべての培養上清を一度取り除き、上方から 10% DMSO in 10% FBS/MEM で溶解した感作性低分子化学物質を濃度 2 倍の範囲内で 4 段階の濃度でそれぞれ 25 μ L ずつ添加した。添加後 20 分静置し、2.5 mL の medium を加え、8 時間そのまま 37°C で培養する。8 時間培養後、樹状細胞株 (CD14-MLDC) の scaffold のみ回収し、樹状細胞株 (CD14-MLDC) から RNA を抽出し、定量 RT-PCR でマーカーの発現量を検出した。マウス肺胞マクロファージ細胞株作製時には SV40 large T 抗原とマウス GM-CSF を発現するレンチウイルスベクターを用いた。そこでヒトにおいても同様に、SV40 large T 抗原とヒト GM-CSF を発現するレンチウイルスベクターを作製した。またヒトの細胞はマウスよりも株化しにくい可能性があるため、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の発現ベクターおよび TP53 と RB1 に対する siRNA ベクターも作製した (連携研究者：産業医科大、和泉弘人博士)。ヒト肺胞マクロファージは

EPITHELIX 社より購入した (Batch Number : M Φ 0895, M Φ 0889FAC)。凍結保存された肺胞マクロファージを起こし、専用培地にて 2 日間培養した。その後細胞を回収し、FACS Aria にて CD45⁺CD11b⁺細胞をソーティングした。得られた細胞をさらに専用培地にて 2 日間培養したのちに、SV40 large T 抗原およびヒト GM-CSF 発現ベクターを感染させ、細胞の株化を誘導した。

B.2. NM の *in vitro* 抗原提示細胞活性化試験法の開発 (足利、飯島)

B2.1 酸化亜鉛ナノ粒子の h-CLAT 試験

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 μ 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。

B2.2 各種ナノマテリアル分散液の調製と評価

シリカナノ粒子は Sicastar-F (micromod 社) を用い、培養液を用いて所定濃度に希釈した。酸化亜鉛ナノ粒子は NM-110, NM-111 (以上 JRC) , S677450, S544906 (以上 Sigma-Aldrich) , MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP (以上テイカ) を用いた。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。さらに培養液を用いて所定濃度に希釈した。

MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP について、培養液中 (31.6 $\mu\text{g/mL}$) での流体力学的直径および ζ -potential を ELS-Z2 (大塚電子)、溶出イオン濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES, ICPE-9000, 島津製作所) によりそれぞれ測定した。

B.2.3. 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、 CO_2 インキュベーター (37°C, 5% CO_2) 内で 24 時間静置した。洗浄後、フローサイトメーター (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer) を用いて THP-1 細胞の CD54 および CD86 発現量を培養液処理群 (control) に対する相対蛍光強度 (RFI) として求め、EC200 (CD54 発現が 200%を超える濃度) を算出した。あわせて細胞生存率を求め、CV75 を算出した。

B.2.4. 遺伝子発現に基づく NM の抗原提示細胞活性化能の評価

THP-1 細胞に対しナノマテリアルを曝露し、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて、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、*CD54*, *CD86*, *IL-1b*, *MMP-12*, *CCL-3*, *CCL-5*, *GAPDH* の各遺伝子の発現を解析し、*GAPDH* を対照とする $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により遺伝子発現量を定量した。曝露濃度はシリカナノ粒子では 100 $\mu\text{g/mL}$ 、酸化亜鉛ナノ粒子では 31.6 $\mu\text{g/mL}$ とした。

B.2.5. 亜鉛の細胞内取り込みの定量

24 ウェルプレートの各ウェルに 2×10^6 cells/ml THP-1 細胞分散液 500 μl および同量の酸化亜鉛ナノ粒子分散液もしくは硝酸亜鉛溶液を添加し、 CO_2 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。硝酸にて 30 分間処理したのち、氷上で 1 分間冷却した。それを超純水で希釈し、ICP-AES 測定を行い、亜鉛濃度を定量した。曝露濃度は NM-110, NM-111S677450, S544906 および亜鉛イオンはそれぞれの CV75 である 79.3, 112, 243, 144, 133 $\mu\text{g/ml}$ 、MZ-500 および MZ-500HP は 31.6 $\mu\text{g/ml}$ とした。

B.2.6. NM 曝露により生じる細胞内活性酸素種 (ROS) の定量

2×10^6 cells/mL THP-1 細胞分散液に終濃度 10 μM CM-H2DCFDA を処理し、 CO_2 インキュベーター (37°C, 5% CO_2) 内で 1 時間静置した。遠心し、上清を培地に交換した後、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培地 500 μL を添加し、 CO_2 インキュベーター (37°C, 5% CO_2) 内で 24 時間静置した。洗浄後、フローサイトメーターを用いて平均蛍光強度を測定した。曝露濃度は Sicastar は 31.6, 100, 316, 1000 $\mu\text{g/mL}$ 、MZ-500 および MZ-500HP は 100 $\mu\text{g/mL}$ とした。

B.2.7. 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および経上皮電気抵抗 (TEER) 測定により評価した。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または下部より被検物質を添加し、24 時間培養後、B.2.の手法にて THP-1 細胞の CD86, CD54 の発現量を定量した。

B.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発 (高橋、石丸、渡辺)

B.3.1. ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験

国立衛研において Taquann 全身吸入曝露装置 (ver.3.0) を用い、NM-202 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、日本動物輸送株式会社に委託して九州保健福祉大学動物実験施設へ移送させた。

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、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 中の CCL5 など複数種類のケモカイン・サイトカインについて ELISA にて定量解析を行った。さらに、ホルマリン固定肺について、バイオ病理研究所株式会社に委

託して標本を作製し、病理組織学的な解析を実施した。また、NM-202 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-202 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、国立衛研へ冷凍輸送した。

B3.2. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を利用した。NM は、物性の異なるナノシリカ NM-201、202 および 204 について比較検討を行った。RAW264.7 細胞に、超音波破碎機で培地中に懸濁した NMs (0, 10 and 100 µg/mL) を添加して一晩培養した。続いて RSV A2 株を MOI (感染多価) 1.0 で感染させ、さらに一晩培養した。培養後の上清中の TNF-α、sCD54 および CCL5 量を ELISA にて定量した。

B.3.3. ナノシリカ吸入曝露実験

マウス 3 日間間歇曝露による感染性免疫への影響を調べる検体として、ナノシリカ NM202 を選択した。この検体を用いてエアロゾル化条件の検討を行った。ナノシリカは先行研究で開発した Taquann 法により高分散処理を行い Taquann システム Ver3.0 を使用して、濃度推移について検討した (J Toxicol Sci. 2013)。

B3.4. マウス全身ばく露吸入実験

B3.4.1 動物:

BALB/cCrSlc (日本エスエルシー株式会社) 雌性マウスを 3 週齢で購入し 1 週間の馴化期間を経たのち 4 週齢にて使用した。個体識別

は実験動物用マーカー(アニマルマーカー、日本エスエルシー株式会社)により行った。

B3.4.2. 飼育条件:

飼育ケージは、ポリカーボネイト製のアウターケージと PET 製インナーケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1 ケージ当たり 6 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ポーザブルパウチ (Hydropa) を用いて自由摂取させた。ケージ内の環境を改善する目的で、シェファードシャック (Shepherd Specialty Papers 社) をケージ内に設置した。

B3.4.3. 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/m^3 高濃度群 30 mg/m^3 と設定した。各群 21 匹のマウスを使用し、1 日 6 時間 (10:00~16:00) の吸入ばく露を隔日 3 回実施した。

B3.4.4. 全身ばく露吸入装置

(1) エアロゾル発生装置

動物へのばく露は既設の Taquann 直噴全身吸入装置 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、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。

NM202 の原末を 35°C に加温した tert-butyl alcohol (TBA) 加えて 3 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。この懸濁液をインナーカートリッジに分注した。低濃度群では 6.7 mL/cartridge 、高濃度群では 20 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 を昇華除去した。

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。

実験条件の詳細に関しては、表 1 に記載した。

(2) ばく露チャンバー

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した。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。

B3.4.5. 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) を設置して低濃度群では 5.09 倍、高濃度群では 6.54 倍希釈した。

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、 ϕ 55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂バインダーガラス繊維フィルター (Model TX40HI20-WW、 ϕ 55mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm) : 99.9%、東京ダイレック) を装着し、サンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学) に接続して 1.5 L/min の流量で 1 時間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 90L (1.5 L/min \times 60min) から 1 m^3 当りの質量濃度を算出した。のフィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用した。サンプリングは、10 時~11 時、12 時~13 時及び 14 時~15 時に実施し、3 回の平均値を代表値とした。

B3.4.6. エアロゾルの空気動学的中位径測定 Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD)

エアロゾルの空気動学的中位径測定は、

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 (μm) ; 10、5.6、3.2、1.8、1.0、0.56、0.32、0.10、0.18、0.056、0.032、0.018、0.01) 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。

B3.4.7. 解剖とサンプリング

3回のばく露終了直後に、NM202の肺負荷量測定に供することを目的として、肺をサンプリングした。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麻酔下で、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てから、開胸し肺をサンプリングした。

B.3.4.8. 気道感作物質の評価方法の検討

気道感作性物質とされている物質の評価方法を開発する検討を行った。研究方針としては、In vivo 試験により感作性を評価する動物として実績があるモルモットを用い、気道への影響を指標とした試験系を検討することとした。

吸入曝露方法は鼻部曝露とし、モルモットに適したホルダーを設計した。気道感作の陽性対照として 2,4-toluene diisocyanate (TDI, CAS No : 584-84-9) 及び Trimellitic

Anhydride (TMA, CAS No : 552-30-7)を選択し、皮膚感作物質として知られている 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB, CAS RN:97-00-7) を選択した。これらの陽性対照の吸入曝露方法について物性を考慮したエアロゾルの発生方法を検討した。

B.4. NM および呼吸器感作性物質の in vivo 免疫毒性解析 (石丸)

マウス骨髄由来マクロファージを用いて、Taquan 処理を施したナノシリカ (NM202 および NM204) に対する炎症反応を検討するとともに、多層化カーボンナノチューブ (MWCNT) による MMP-12 を介したマクロファージの活性化機構について検討した。

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。NM202、NM204 (250 ng/ml~1000 ng/ml) および T-CNT (MWCNT) (167 ng/ml)を培養系に用いた。また、MMP-12 特異的阻害剤 MMP408(12.5, 25, 50, 100 nM; Calbiochem)を T-CNT とともに用いた。培養したマクロファージから 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'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3', *Icam1*; (f) 5'-AACYGYGGCACCCTGCAGTC-3', (r) 5'-AGGGTGAGGTCCTTGCCTACTTG-3', *Tim4*; (f) 5'-GCTGCTTCCAACAACAGTCA-3', (r) 5'-GTGATTGGATGCAGGCAGAG-3', *Il1b*, (f) 5'-CCAGCTTCAAATCTCACAGCAG-3', (r) 5'-CCAGCTTCAAATCTCACAGCAG-3', *Tnfa*, (f) 5'-CACAGAAAGCATGATCCGCGACGT-3', (r) 5'-

CGGCAGAGAGGAGGTTGACTTTCT-3', *Ifng*, (f) 5'-TGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAG-3', (r) 5'-TGCAGGATTTTCATGTCCACCAT-3', *Sma*, (f) 5'-GTTGAGTGGTGCCTCTGTCA-3', (r) 5'-ACTGGGACGACATGGAAAAG-3', *Fnl*, (f) 5'-CGAGGTGACAGAGACCACAA-3', (r) 5'-CTGGAGTCAAGCCAGACAC-3', *β -actin*; (f) 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', (r) 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

B.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価 (渡辺)

ナノシリカ NM-201, 202 および 204 について比較検討を行った。RAW264.7 細胞に超音波破碎機で培地中に懸濁した NMs (0, 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加して一晚培養した。続いて RSV A2 株を MOI (感染多価) 1.0 で感染させ、さらに一晚培養した。培養後の上清中の TNF- α 、sCD54 および CCL5 量を ELISA にて定量した。

B.6. 既存情報と in vitro/in vivo 研究データによる in silico 解析 (大野)

B.6.1. データ収集・整理

今年度の本研究で実施する対象化合物はナノマテリアルに関しては、6 種のカーボンナノチューブ(MWCNTs: NM-400, NM-401, NM-402, NM-403, NT-7 (ND), NT-7 (D)) とした。これらの被験物質の情報収集源は、OECD のナノマテリアル安全性評価プログラムで作成した評価文書 (dossier)、ナノマテリアルの公開データベースに収載された物理化学的性状 (物性)、不純物や表面活性の追加試験等および当研究班で実施した *in vitro* 試験の h-CLAT 法による毒性評価結果により得られたデータについて収集・整理を行い、解析に資するデータの資料作成を実施した。

【有害性情報の調査対象情報源】

OECD で公表されている Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) - Manufactured nanomaterial の Summary dossier と関連する個別 dossier、ANNEX や the Joint Research Centre of the European Commission (JRC) の情報、及びこれらの研究成果として公表された原著論文、また本研究班で実施された h-CLAT 毒性試験結果を調査対象情報源とした。

B.6.2. 関連性解析

【多変量解析法】

収集したデータについて、解析に資するデータにデータマイニングを実施した。

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有害性 (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。

- 物理化学的情報に基づく主成分分析法 (PCA : Principal Component Analysis) からの階層的クラスタリング解析法 (HCA: Hierarchical Clustering Analysis) の実施により、サンプル間の距離が近いものからクラスターを形成し、類似度の高いクラス分類した
- 収集したデータに基づく物理化学的性状情報と *in vitro* 試験での h-CLAT 試験法毒試験結果のデータとの関連性について直交部分的最小二乗回帰分析 (OPLS : Orthogonal Partial Least Squares Regression) の実施した
- OPLS 法 : $Y = f(x) = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots$ の回帰式から、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)。今回の解析では物性値を X の説明変数とし、毒性値 (h-CLAT

試験法毒性試験結果)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予測する。

B.6.3. 呼吸器感作性物質に関する被検物質の物性データ項目の整理

【呼吸器感作性物質の調査対象情報源】

以下の 3 種類に分類し、各化合物について整理を行っており、正準 SMILES 記法による化学構造の線形表記法を作成した (data not shown)。

- ① 呼吸器感作物質として 9 化合物
- ② 皮膚感作物質として 13 化合物
- ③ 非感作物質として 11 化合物

(倫理面への配慮)

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し、国立医薬品食品衛生研究所は、国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定による「動物実験等の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版)」に則って実施した。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. 化学物質の *in vitro* 呼吸器感作性試験法の開発 (足利、善本、黒田)

呼吸器感作性標準物質を策定し、物性値など関連情報を収集した。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。(足利)

皮膚感作性物質 11 種類、呼吸器感作性物質 9 種類について、私たちが今回考案した 3 次元共培養系を用いて *in vitro* 感作性試験を行い、定量 PCR で樹状細胞株 (CD14-MLDC) での HPRT、CD80、CD86、TNFSF4 (OX40L)、CRLF2 (TSLPR)、

IL7R、IL17RB、ST2 の発現を検出した (表 1a, b)。それぞれの低分子化学物質を濃度 2 倍の範囲内で 4 段階の濃度で樹状細胞株 (CD14-MLDC) を刺激した時に、感作の判断基準を CD80 および CD86 の発現量が溶媒コントロールでの刺激に比べて相対比 1 以上になる濃度が存在することとした。CD80 または CD86 のどちらかの値が 1 以上ときに他の遺伝子 TNFSF4 (OX40L)、CRLF2 (TSLPR)、IL7R、IL17RB、ST2 の発現を比較した。その結果 TNFSF4 (OX40L) の発現において皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質と相対定量での閾値を 2.57 と設定すると、『皮膚感作性物質 < 2.57 < 呼吸感作性物質』として区別可能であり、感度 88.89%、特異度 90.09%、正確度 90%、バランス正確度 89.9% で皮膚、呼吸器感作性物質を高確率で識別可能である。また、TNFSF4 (OX40L) の値を CD80、CD86 の値で補正した場合も同様の結果が得られた。いずれの場合においても皮膚感作性と考えられている Isoeugenol が呼吸器感作性、呼吸器感作性と考えられている TDI が皮膚感作性と判定される結果となった。また、今回、皮膚感作性物質として構造異性体の関係である Eugenol (EU) と Isoeugenol (IEU) を用いたところ、TNFSF4 (OX40L) 発現量に差が見られた。

EPITHELIX 社より購入したヒト肺胞マクロファージは線維芽細胞のコンタミが認められた。線維芽細胞は通常の状態でも増殖するため、最初の株化誘導実験では線維芽細胞に埋もれてしまい、マクロファージの株化細胞 (線維芽細胞に比べてはるかに増殖が遅い) を得ることはできなかった。そこで、2 回目の実験では FACS にてマクロファージのマーカーであ

る CD45⁺CD11b⁺細胞をソーティングし、得られた細胞に対して SV40 large T 抗原とヒト GM-CSF の遺伝子導入を行った。1月4日時点で、形質転換され増殖した株化した細胞と思われるコロニーを4つほど認めている。

3月1日時点で上記の細胞については増殖は認められるものの細胞株としては増殖が遅い状態であった。そこで並行して3回目の実験も進めている。3回目の実験はソーティング後に細胞の密度を高くし、遺伝子導入効率をより高くした条件で行なった。こちらも4月1日時点で経過を観察している。

C.2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発 (足利、飯島)

C.2.1 酸化亜鉛ナノ粒子の h-CLAT 評価

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。

C.2.2. 酸化亜鉛ナノ粒子分散液の評価

酸化亜鉛ナノ粒子 MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP の培養液中での流体力学的直径と ζ -potential は、それぞれ 481.8 \pm 55.61 nm、598.4 \pm 17.12 nm、-19.89 \pm 2.76 mV、-12.96 \pm 1.37 mV であった。

C.2.3. 硝酸亜鉛の抗原提示細胞活性化能の評価

硝酸亜鉛水溶液曝露後の THP-1 細胞の CD54 および CD86 発現を示す。濃度に依存した顕著な CD54 発現の増加が見られ、EC200 は 19.2 $\mu\text{g/mL}$ (亜鉛イオン換算) と算定された。CV75 は 133 $\mu\text{g/mL}$ (亜鉛イオン換算) であった。

各種酸化亜鉛ナノ粒子およびシリカナノ粒子曝露による抗原提示細胞活性化に対するマクロピノサイトーシス阻害剤 Amiloride の影響について検討を行なった。Amiloride 処理により酸化亜鉛ナノ粒子やシリカナノ粒子による CD54 の発現亢進が抑制される傾向が見られたものの、試行間差が大きかった。引き続き、検討を続ける。

C.2.4. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

シリカナノ粒子曝露 THP-1 細胞において、未処理のものと比較して CD54、CD86、IL-1b、MMP-12、CCL-3 の各遺伝子の発現が亢進する傾向が見られた。酸化亜鉛ナノ粒子の暴露では、未被覆 MZ-500、被覆 MZ-500HP どちらも、CD54、IL-1b、CCL-3 の各遺伝子の発現亢進が見られたが、その発現パターンは被覆の有無によって異なっていた。

C.2.5. 亜鉛の細胞内取り込みの定量

酸化亜鉛ナノ粒子分散液および硝酸亜鉛水溶液に24時間曝露後の細胞内の亜鉛量を ICP-AES により定量した。各試料の CV75 の濃度で曝露した NM-110、NM-111S677450、S544906 および亜鉛イオンの比較より、酸化亜鉛ナノ粒子曝露による亜鉛の細胞内取り込み量は亜鉛イオンと比較して非常に多いことがわかった。一方、同一濃度で曝露

した MZ-500 と MZ-500HP との比較より、シリカにより被覆された MZ-500HP 曝露時の細胞内亜鉛取り込み量は顕著に少ないことが示された。

C.2.6. ナノ粒子曝露により生じる細胞内活性酸素種 (ROS) の定量

シリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子曝露後の細胞内 ROS について、蛍光プローブ CM-H2DCFDA を用いて定量した。シリカナノ粒子曝露では 1000 µg/mL の濃度において蛍光強度の増大が見られ、細胞内 ROS の増加が示された。一方、酸化亜鉛ナノ粒子では、MZ-500 においてのみ蛍光強度の増大が見られ、シリカ被覆 MZ-500HP では蛍光強度の増大は見られなかった。

C.2.7. 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

光学顕微鏡により繊毛運動が観察され、TEER 値の増大より、気管支上皮モデルの作製を確認した。THP-1 細胞懸濁液が入ったウェルに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、セルカルチャーインサート上部 (T) または下部 (B) より被検物質を添加し、24 時間培養後、THP-1 細胞の CD54 および CD86 タンパクの発現を定量した。気管支上皮モデルとの共培養のみによって THP-1 細胞の CD54 発現が亢進した。硫酸ニッケルでは気管支上皮モデル上部および下部いずれからの曝露においても CD54 の発現の亢進が見られた。シリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子では、気管支上皮モデルの下部から曝露した場合のみ CD54 の発現亢進が見られた。

C.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発 (高橋、石丸、渡辺)

C.3.1. ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験

先行研究で得た NM-201 および-204 の感染影響評価結果と NM-202 を比較検討が出来るような評価項目の実験を行う。なお実験自体は 1 月下旬より 2 月下旬にかけて実施するため、各種手続きやマウス感染用 RSV など実験材料を準備している。

C.3.2. ナノシリカ吸入曝露実験

ナノシリカ NM202 について、目標濃度を低濃度 : 10mg/m³、高濃度 : 30mg/m³ として Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 にてエアロゾル化検討を行った。検体はターシヤルブチルアルコール (TBA) に懸濁し、カートリッジに充填してから凍結乾燥を行い、乾燥検体とした。条件検討の結果、① NM202 の TBA 懸濁濃度 3mg/mL、② カートリッジ充填量 低濃度 : 20.1mg/カートリッジ、高濃度 60mg/カートリッジ、の条件により低濃度群 8.9mg/m³、高濃度群 30.4mg/m³ と、ほぼ目標濃度に近い曝露条件を見いだした。

この条件により、今後、3 日間間歇曝露実験を実施する。

C.3.3. 気道感作物質の評価方法の検討

モルモットに適したホルダーについては、設計を終了し、現在、制作に取りかかっている。

TDI 及び TMA のエアロゾルの発生方法について、物性情報から検討を行った。TDI 及び TMA は水を含むと容易に加水分解される。そのため油性溶媒に溶解して、ミスト発生供給装置 NB-2N 型 (二流体式アトマイザー) による方法を検討中である。二流体アトマイザーはエアロゾル化の流体とし

て空気を用いるが、室内空気では水蒸気を含む。そのため、ドライヤー機能を備えたコンプレッサーで作製した圧縮空気を用いることを計画してる。圧縮空気に含まれる水蒸気の理論値は $1.37\text{g}/\text{m}^3$ (露点から換算) であり、TDI と TMA の加水分解の影響は少ないと考えられる。

ミストとして発生させて場合、その曝露量を把握するためには、ミゼットインピンジャーにてミストを回収して回収したエアロゾルの気積と濃度測定により算出する必要がある。現在分析方法について検討中であるが、TDI、TMA については加水分解しないように誘導体化して高速液体クロマトグラフによる測定方法が考えられる。DNCB についてはガスクロマトグラフ質量分析計 (四重極 又は高分解能二重収束) を計画中である。

C.3.4. マウス全身ばく露吸入実験

NM202 の 3 回の全身ばく露吸入実験における平均質量濃度は、低濃度群; $8.0 \pm 1.1 \text{mg}/\text{m}^3$ 、高濃度群; $28.3 \pm 0.9 \text{mg}/\text{m}^3$ (平均値 \pm SD) であった。MMAD は低濃度群; 507nm (og: 3.1)、高濃度群; 667nm (og: 2.6) であった。

6 時間の吸入ばく露実験において使用した検体の総量は、低濃度群、高濃度群でそれぞれ $1,769 \text{mg}$ 、 $5,280 \text{mg}$ であった。6 時間の曝露チャンバーの総換気量は 11.7m^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 $151.2 \text{mg}/\text{m}^3$ 、 $451.3 \text{mg}/\text{m}^3$ 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 5.3% 、 6.2% であった。

ばく露開始 2 日前に実施した群分け時のマウスの体重は (各群 21 匹)、対照群、低濃度群、高濃度群それぞれ $14.1 \pm 1.1\text{g}$ 、 $13.9 \pm 1.6\text{g}$ 、 $14.0 \pm 1.4\text{g}$ であった。肺負荷量測定を目的と

した動物 (各群 3 匹) のばく露終了直後の体重は、対照群、低濃度群、高濃度群それぞれ、 $16.2 \pm 1.6\text{g}$ 、 $16.5 \pm 0.9\text{g}$ 、 $16.7 \pm 0.9\text{g}$ であった。ばく露終了直後の肺重量は、対照群、低濃度群、高濃度群それぞれ、 $111.0 \pm 11.0\text{mg}$ 、 $122.9 \pm 2.3 \text{mg}$ 、 $131.4 \pm 11.9\text{mg}$ であり、ばく露群において増加傾向にあった。

なお、ばく露終了直後の肺負荷量測定用の動物以外は、感染性免疫評価を実施する分担研究者 (九州保健福祉大学 渡辺 渡 教授) に提供した。

C.4. NM および呼吸器感作性物質の in vivo 免疫毒性解析 (石丸)

マウス骨髄由来マクロファージを用いて、NM202 (250, 500, 1000 ng/ml)、NM204 (250, 500, 1000 ng/ml) および T-CNT (167 ng/ml) を添加し、24 時間培養後における細胞の生存率を確認したところ、対照群と変化は認められなかった。また、*Mmp12* mRNA 発現に関しては、T-CNT 添加で対照に比較して 1.7 倍上昇していたが、NM202 および NM204 の添加では変化が認められなかった。また、*Icam1* ならびに *Tim4* mRNA 発現に関しては、T-CNT、NM202 および NM204 の添加で変化は観察されなかった。さらに、*Il1 β* 、*TNF α* 、*Ifng* mRNA 発現を検討すると、*Il1 β* mRNA 発現が NM202 あるいは NM204 の添加で上昇していたが、T-CNT 添加では変化が見られなかった。*TNF- α* ならびに *Ifn* mRNA 発現に関しては、いずれの NM 添加でも変動は観察されなかった。

NM に対するマクロファージの反応性における MMP-12 の役割を理解するために、MMP-12 阻害剤 (MMP408) を用いた検討を進めた。T-CNT に対する反応性を検討すると、T-CNT の反応によって上昇した

Mmp12 mRNA 発現は MMP408 の添加によって変動はなかった。また、*Icam1* mRNA、*Tim4* mRNA、*Il1b* mRNA、*Tnfa* mRNA、*Ifng* mRNA 発現ともに T-CNT による発現と変化は認められなかった。

ナノマテリアルがマクロファージの線維芽細胞様変化（マクロファージ-筋線維芽細胞移行：macrophage-to-myofibroblast transition: MMT）を起こす可能性を想定して T-CNT および NM202 の培養系で pro-fibrotic marker である Smooth muscle action (*Sma*)ならびに Fibronectin1 (*Fnl*) mRNA 発現を検討すると、*Sma* mRNA 発現に関しては、T-CNT で対照に比較して軽度上昇する一方で、NM202 の反応では、逆に低下する傾向が確認された。*Fnl* mRNA 発現に関しては T-CNT では上昇は見られず、NM202 では軽度上昇傾向が認められた。

C.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価（渡辺）

C5.1. 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、NM-202 曝露により有意に上昇し、30 mg/m³（高用量）曝露群では感染対照群と比較して約 1.5 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、NM-202 曝露で約 2.5 倍有意に上昇した。一方、これらのケモカインは非感染群では NM-202 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、NM-202 が RSV 感染肺炎の増悪因子であることが示唆された。また、sCD54 レベルについては、NM-202 曝露により上昇していたが、CCL3 と CCL5 ほど顕著では

なかった。

C5.2. 肺病理組織学的評価の結果

HE 染色、マッソントリクロム染色および PAS 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。HE 染色により、RSV 感染対照（0 mg/m³ 曝露）では、葉における偏りは若干あるが、全体として肺動脈と細気管支周囲にリンパ球の浸潤など軽度の炎症が認められた。なお、マクロファージは少なかった。NM-202 低用量（10 mg/m³）曝露/RSV 感染群では、感染対照より炎症が若干強まり、局所的なマクロファージの集簇やリンパ球浸潤が目立った。高用量曝露では、これらの特徴が顕著になり、一部で胸膜下へのリンパ球浸潤が見られた。一方、非感染マウスでは、NM-202 曝露によるリンパ球浸潤など炎症性の病変は認められなかったが、細気管支終末部に空胞をもったマクロファージが見られ、集簇も散見された。PAS 染色により粘性多糖産生細胞を観察し、感染対照で気管支上皮の一部に陽性細胞が認められた。NM-202 高用量曝露では、細気管支も含めて顕著に陽性細胞が多く見られた。なお、マッソントリクロム染色標本では、何れも繊維化など特徴的な変化は認められなかった。

C5.3. NM の感染マクロファージへの影響

RAW264.7 細胞からの TNF- α 産生量は、NM の全てで添加量に依存して上昇したが、NMs 間での大きな差は認められなかった。また、CCL5 については、先行研究の *in vivo* 感染試験での影響結果と異なり、NM-201 と -204 間で誘導能に差がなかった。さらに、sCD54 もサンプル間での明確な差は認められなかった。

C.6. 既存情報と *in vitro/in vivo* 研究データによる *in silico* 解析 (大野)

C.6.1. データ収集・整理

MWCNTs (NM-400, NM-401, NM-402, NM-403, NT-7)と *in vitro* h-CLAT 試験結果との関連性解析に向けたデータシートは、物理化学的性状および有害性情報の情報整理項目を作成した。物理化学的性状データは、不純物、結晶子サイズ、比表面積、その他のプロパティ等について収集整理した。情報が不足していた不純物は誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) によって測定され、表面活性の測定データを取得した。有害性情報データは、本研究班で実施された *in vitro* 試験結果 (h-CLAT 毒性試験) を収集整理した。

C.6.2. 多変量解析

➤ 物理化学的性状の類似性評価 (階層的クラスタリング解析: HCA)

収集・整理した 6 種の MWCNTs の物理化学的性状についてデータマイニングの実施後、PCA 法より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、特に、NM-402、NM-400、NM-403 のグループと NM-401、MWNT-7(ND)、MWNT-7(D)のグループに大きく二分され、類似性が示された。

➤ 物理化学的性状情報と *in vitro* h-CLAT 試験法毒試験結果のデータとの関連性解析評価 (直交部分的最小二乗回帰分析: OPLS)

OPLS 法により毒性に関連する x 変数(物性)は、正の相関が大きくなるに伴い、毒性の Positive (EC200) に関連する x 変数 (物性) が示唆され、毒性と関連する物性項目が探査可能である。Loadings plot から x 変

数 (物性) の棒グラフの表示により、毒性が Negative な方向に寄与する変数 (物性) は、不純物の Li (リチウム) として、また毒性が Positive な方向に寄与する x 変数 (物性) は、Specific surface area ratio (H₂O/N₂)、Mass median diameter (μm) が挙げられた。

C6.3. 呼吸器感作性物質に関する被検物質の物性データ項目整理

呼吸器感作性物質等は大きく 3 群 (①呼吸器感作性物質、②皮膚感作性物質、③非感作性物質) に分けられた (data not shown)。これらの被検物質の実験データ (MW、logKow、Boiling Point) 等に加えて、特に分子の吸着性を特徴づけるも化学情報学・計算化学的な物質の特性データを付加するための項目について検討している。

その結果、下記について候補となる項目として挙げられた。

- 1D: 水素結合ドナー/アクセプター数
- 2D: logP、極性表面積 (PSA)
- 3D: PSA、van der Waals 体積
- 3D (量子化学計算): 電荷分布、双極子モーメント、分極率、反応性軌道エネルギー (HOMO / LUMO)

これらは、オープンソースライブラリー (RDKit、PaDEL-descriptor、PySCF 等) を利用した科学情報学・計算化学的な方法で進めていく予定である。

D. 考察

D.1. 化学物質の *in vitro* 呼吸器感作性試験法の開発 (足利、善本、黒田)

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℃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。(足利)

呼吸器感作を引き起こす低分子化学物質は 1970 年代から 1980 年代にかけて、強度、弾性、耐久性などに優れているため断熱材や接着剤などポリウレタンの原料として使用されるイソシアネートを含む物質が喘息などの呼吸器系のアレルギーを引き起こす物質として臨床的な問題として数多く報告された。また同様に塗料や接着剤などのエポキシ樹脂の原料として使用される酸無水物も同様に呼吸器疾患を引き起こす物質として報告された。

これら呼吸器に影響を及ぼすと考えられる化学物質の感作性試験法が開発されてこなかった理由として、第一に呼吸器感作物質が水と激しく反応し、分解されやすいこと、さらに、皮膚と異なり呼吸器系への暴露を再現することが困難であることが考えられる。今回、私たちはこれまでに発表した論文において皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質を区別可能な *in vitro* 評価系を構築しており、その系を用いて代表的な皮膚感作性物質 11 種類と呼吸器感作性物質 9 種類を評価した。

まず、皮膚感作性および呼吸器感作性物質のいずれの物質においても CD80 または CD86 のどちらか一方が 1 以上であること、つまり感作性があることを前提として、かつ 5 種類のマーカー遺伝子の発現を調べたところ TNFSF4 (OX40L) において CD80、CD86 の発現で補正する前においては 10%DMSO/10%FBS/MEM コントロール

での発現量に対しては皮膚感作性物質 < 2.57 < 呼吸器感作性物質であり、また CD80、CD86 の発現で補正 TNFSF4 (OX40L) を CD80、CD86 の発現量で割る) した後においてはそれぞれ、皮膚感作性物質 < 1.92 < 呼吸器感作性物質、皮膚感作性物質 < 2.15 < 呼吸器感作性物質で区別され、感度 88.89%、特異度 90.09% の結果が得られた。

今回、化学物質の溶解に使用した溶媒は最初に DMSO で溶解したのちに、10%FBS/MEM で 10 分の 1 以下に希釈して 20 分反応させたが、特に呼吸器感作性物質に関しては 10%FBS/MEM で 10 分の 1 以下に希釈時に析出しやすいものや、加水分解されていると考えられるものなど、比較的高濃度で反応させないと感作性を示さないものなどが多かった。特にイソシアネート類は MDI においては 10% DMSO/10% FBS/MEM の希釈時に完全に不溶性になってしまい、TDI においては TNFSF4 (OX40L) の発現上昇が認められなかった。そこで溶媒を例えば脱水処理した DMSO や Acetone/Olive Oil (AOO) を用いるなど、さらなる工夫が必要あると考えられる。

また、皮膚感作性物質として知られている Eugenol の構造異性体である Isoeugenol も皮膚感作性物質として考えられているが、今回、この *in vitro* 試験法の結果から呼吸器感作性を有している可能性が示唆された。この結果から物質の化学構造からおおよその感作性を推測できる可能性があることも示唆している。

今後は、私たちが今回開発した技術を別のラボに技術移転し、今回得られた結果を再現できるようにしていく予定である。種々の化学物質の *in vitro* 試験においては、

データの試験間変動や施設内外再現性の問題から細胞株が用いられることが多い。例えばマクロファージを用いた試験法ではマウスでは RAW264 や J774、ヒトでは THP-1 や U937 などが頻繁に使用されている。一方でマクロファージは常在する組織ごとに異なる機能を有していることが報告されており、特に肺胞マクロファージについては分化や機能について他の組織マクロファージとは大きく異なると言われている。しかしながら肺胞マクロファージの細胞株は未だ作製されておらず（マウスの MH-S 細胞は肺胞マクロファージの細胞株とされているが、肺胞マクロファージの性質は失っている。）、より正確性が高い試験法の開発のためには肺胞マクロファージの細胞株を使用することが望ましいと考える。このような背景から、研究分担者の黒田はマウスの肺胞マクロファージの細胞株を樹立し、その細胞株を用いた微粒子の *in vitro* 試験法の開発を進めている。

一方、ヒトへの外挿性を考えた場合はヒトの肺胞マクロファージの細胞株が求められる。そこで本研究ではヒトの肺胞マクロファージ細胞株を樹立し、ヒト細胞株を用いた微粒子の *in vitro* 試験法の開発を目指すことを目的としている。現在はヒト肺胞マクロファージに不死化遺伝子を導入し、増殖した株化細胞と思われるコロニーを複数個ほど認めている。また並行して、新たな肺胞マクロファージを準備し、株化を進めている。細胞の増殖を待ち、良好に増殖する細胞が得られれば、表面抗原の発現を中心に細胞のキャラクタリゼーションを行う予定としている。

D.2. NM の *in vitro* 抗原提示細胞活性化試験法の開発（足利、飯島）

D.2.1. 酸化亜鉛ナノ粒子の h-CLAT 評価

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。

D.2.2. 酸化亜鉛ナノ粒子による抗原提示細胞活性化メカニズムについて

硝酸亜鉛を用いた亜鉛イオンによる抗原提示細胞活性化の評価において、亜鉛イオンの EC200 は 19.2 $\mu\text{g/ml}$ （亜鉛イオン換算）と算定された。CV75 は 133 mg/ml （亜鉛イオン換算）であった。以前の検討より、NM-110, NM-111, S677450, S544906 の各酸化亜鉛ナノ粒子を培地中に CV75 の濃度にて分散させた際の、24 時間後の溶出亜鉛イオン濃度はそれぞれ 0.977, 1.13, 1.45, 1.05

μg/ml であった。これより、酸化亜鉛ナノ粒子による THP-1 細胞の活性化には、細胞外で溶出した亜鉛イオンだけでなく、粒子としての作用が関与していることが示唆された。また、ICP-AES を用いた細胞内に取り込まれた亜鉛の定量より、酸化亜鉛ナノ粒子の曝露により細胞内に取り込まれていること、その取り込み量は亜鉛イオンと比較して非常に多いことがわかった。今後、取り込み阻害剤を用いた実験とともに、検討を進める。

また、酸化亜鉛ナノ粒子はシリカによる被覆により、培地中における流体力学的直径はわずかに増加し、 ζ -potential は中性に近づいた。培地中に同一濃度 (31.6 μg/ml) にて分散させた際の、24 時間後の溶出亜鉛イオン濃度はそれぞれ 1.02, 0.875 μg/ml であり、シリカ被覆により亜鉛イオンの溶出は抑制されていた。細胞内取り込み量はシリカにより被覆された MZ-500HP において顕著に低かった。シリカ被覆による細胞内取り込みの減少のほか、シリカ被覆による硝酸での溶解が阻害された可能性もあるため、抽出条件の検討を今後行い、確認する。

D.2.3. 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

すでにナノマテリアル曝露により発現が亢進することを示した *CD54*, *CD86*, *MMP-12* に加え、*IL-1b*, *CCL-3* の各遺伝子もシリカナノ粒子曝露によりその発現が亢進し、新たな評価指標としての可能性が示された。酸化亜鉛ナノ粒子 MZ-500 とシリカ被覆酸化亜鉛ナノ粒子 MZ-500HP とで発現パターンは異なっており、複数遺伝子の発現に基づく分類の可能性なども考えられる。今後、多種の NM 曝露による遺伝子発現を解析し、比較を行う。

D.2.4. 遺伝子発現に基づくナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

シリカナノ粒子および未被覆酸化亜鉛ナノ粒子曝露による THP-1 細胞活性化において細胞内 ROS が増加していることが示された。細胞内 ROS の増加は NLRP3 インフラマソームを活性化することが知られており、NM による THP-1 細胞は NLRP3 インフラマソームを介する可能性が示唆された。

D.2.5. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系の構築とナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能の評価

共培養系でのシリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子いずれにおいても、気管支上皮モデル上部からの曝露では THP-1 細胞の *CD54* の発現亢進は見られなかった。イオン化する硫酸ニッケルでは気管支上皮モデル上部からの曝露においても *CD54* の発現が増加しており、イオンとナノ粒子の気管支上皮モデルの透過能が異なることが示唆された。今後、曝露条件 (曝露経路、曝露濃度、曝露時間、測定指標など) について、検討を進める。

一方、シリカナノ粒子の気管支モデル下部からの曝露では、単培養 THP-1 への曝露と比べてより高い *CD54* 発現が見られ、シリカナノ粒子による直接的な THP-1 細胞の活性化に加えて、気管支モデルを介した THP-1 細胞の刺激が示唆された。シリカナノ粒子が気管支モデルの下部側の基底細胞などに作用し、産生されたサイトカインが THP-1 の *CD54* の発現を増加させている可能性が考えられる。

D.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発 (高橋、石丸、渡辺)

吸入曝露 RSV 感染実験については、肺炎

マーカーCCL5 レベルの定量や肺病理組織学的検討により、NM-202 の RSV 感染増悪化作用における NM-201 および-204 との相違が明確にできると思われる。

TDI 及び TMA は加水分解されるため、吸入曝露実験は非常に困難であり、これまで、信頼性のある曝露方法は報告されていない。本研究においては、既存の実験装置を組み合わせることでミストによる曝露を計画している。課題は、検体を溶解する溶媒である。動物への影響が少ない溶媒としてオリーブオイルが考えられるが、実験終了後に実験装置の洗浄に時間を要するため、実験は煩雑となり、検体を換える際には大きな課題となることが考えられる。そのため、粉体エアロゾルとして曝露する方法も検討しているが、新たにエアロゾル発生装置を開発する必要がある。

これまで、*in vitro* 実験において影響が異なるナノシリカ三種類（NM201、NM202、NM204）について吸入曝露実験を実施した。目視観察において、NM202 は三種類のナノシリカの中で最も微細な粒子である。MMAD はこれを反映しており、NM201 と NM204 がそれぞれ 1,650～2,030nm、1,439～1,468nm であるが NM202 は 507～667nm であった。一方、エアロゾル化効率、NM201、NM204 がそれぞれ 14.8～21.3%、16.2～19.6%であるのに対して NM202 は 5.3～6.2%と低値を示した。NM202 は機器への付着が認められており、微細な粒子であることからエアロゾル化後にトラップされる検体が多かったことが原因と推察される。

NM202 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が、肺重量に関しては、NM202 投与群において増加傾向が認められた。

D.4. NM および呼吸器感作性物質の *in vivo* 免疫毒性解析（石丸）

ナノシリカ（NM202, NM204）とカーボンナノチューブに対するマクロファージの反応性は異なっており、カーボンナノチューブに対しては従来の報告通り MMP-12 を介した反応性が観察されたが、ナノシリカでは MMP-12 の発現に変動は見られなかった。ナノシリカに対しては *Il1b* の mRNA 発現上昇が認められた。

MMP-12 の阻害剤である MMP408 を用いた実験では *Mmp12* mRNA の発現には変動はなく、遺伝子レベルでの発現に影響を及ぼさないものと考えられた。今後、MMP-12 活性に基づいたタンパクレベルでの種々の変化を検討する必要がある。また、*Tim4* ならびに *Il1b* mRNA が MMP408 の添加で変動していたが、有意な変化ではなかった。

MMT に関しては、網膜下の線維化において組織常在型マクロファージが MMP12 の作用により筋線維芽細胞様の細胞に移行することが報告されており (*J Neuroinflammation* 2022)、その詳細な分子機序は不明のままである。T-CNT の吸入曝露により、肺胞マクロファージが MMP12 を強く産生し、肺の間質での線維化に関与していることが明らかになっていることから (*PLoS One* 2018)、ナノマテリアルに対するマクロファージの反応性が MMT を介している可能性が考えられる。T-CNT の添加によって *Sma* mRNA の発現が上昇していたので、T-CNT に対する反応性は MMT に関連している可能性は否定できない。一方で、NM202 での反応性は MMT とは結びつかない可能性も考えられる。

D.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価（研究分担者：渡辺）

先行研究では、Taquan 全身曝露システムを用い、物性の異なるナノシリカ NM-201 および-204 の 3 回の吸入曝露による RSV 感染最盛期での影響評価を実施した。そして、NM-204 は感染マウスでの肺炎病態を増悪化するが、非感染マウスでは影響がほぼ無いこと、および NM-201 は RSV 感染の有無に関わらず影響を示さないことを報告してきた。今年度は、他の評価システム (h-CLAT 等) における作用が NM-201 と NM-204 の中庸にあたる NM-202 を RSV 感染マウスモデルにより評価した。

NM-202 の RSV 肺炎の代表的なマーカーである CCL5 (RANTES)、炎症性ケモカイン CCL3 (MIP-1 α) および sCD54 レベルへの影響は、NM-204 と程度の差はあるものの同様の傾向を示した。そして非感染マウスへの作用も NM-204 と同様にほぼ無く、NM-202 は正常時には炎症性の免疫刺激はなく、その後の RSV 感染により感染細胞に取り込まれて免疫応答を刺激することで炎症を惹起することが強く示唆された。

HE 染色標本での病理組織学的検討では、NM-202 曝露/RSV 感染マウスでは、肺動脈や細気管支周囲でのリンパ球浸潤が亢進しており、マクロファージの集簇も認められ、NM-204 と同様に肺炎が増悪化していた。そして、NM-202 曝露のみでも NM-204 と同様にリンパ球浸潤などの炎症像はほぼ認められず、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。しかし、NM-202 曝露により非感染マウスでも細気管支終末部において空胞を伴ったマクロファージが散見され、その数は RSV 感染により増加していた。このような所見は NM-204 では認められず、物性の異なるナノシリカ粒子の肺胞マクロファージによる貪食が RSV 感染

で亢進したと考えられる。また、NM-204 曝露で観察された胸膜下でのマクロファージ集簇は、NM-202 曝露では認められず、これも物性の相違を反映している可能性が高い。PAS 染色により粘性多糖が赤色に染色されるが、その産生細胞の多くは杯細胞である。NM-202 曝露/RSV 感染マウスにおいて陽性細胞が多いという現象は、気管支上皮での杯細胞の過形成を示唆しており、NM-202 が気道リモデリング様病変を引き起こす可能性が高い。これらの結果は、ナノマテリアルのリスク評価法としての本評価システムの有用性を示すものであり、詳細な解析をさらに進めていく。

In vitro 評価法として、本年度はマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を用いた。この細胞は RSV 感染マウスモデルで用いている BALB/c マウス由来の細胞であること、RSV 感染許容であることから評価に用いた。しかしながら、NM-201、-202 および-204 の RSV 感染マウス病態へ対する作用と本細胞での結果が大きく異なった。さらに RSV 感染により本細胞からウイルス産生が確認できず、ウイルス感染許容細胞としても in vivo での評価結果と比較するうえで不十分であることが判明した。今後は先行研究で用いた THP-1 細胞を標的として新たな評価を実施していく。

D.6. 既存情報と in vitro/in vivo 研究データによる in silico 解析 (大野)

先行研究による h-CLAT 試験では、MWCNTs が THP-1 細胞を活性化することを新たに見出している。なかでも NM402 は EC200 の活性化能が高く、比較的毒性が強かったことは、他の被験物質の不純物測定と比較すると、不純物が多く特に

鉄が影響している可能性が示唆された。本研究では 6 種の MWCNTs (NM-400~403, NT-7 (ND), NT-7 (N)) で、物性データ結果と毒性試験結果 (EC200) との関連性の解析で、毒性が Negative な方向に寄与する変数 (物性) で不純物の Li (リチウム) が挙げられた理由としては、含有量の低さが反映されていた。また、毒性が Positive な方向に寄与する変数 (物性) は、2 項目挙げられた。一つ目の項目の Specific surface area ratio (H₂O/N₂) は、この比率より、物質の表面に対する水蒸気と窒素ガスの相対的な吸着能力を評価することができる。これは、物質の表面が水蒸気と窒素ガスに対してどの程度反応しやすいか、または物質の細孔 (微細な穴) の分布や大きさについての情報を提供することから、細胞への吸着能にも影響すると考えられる。

毒性の強さに関しては、比表面積の大きさに関連していると考えられるが、本結果解析より、疎水性が高いことが更なる毒性の強さへの要因になるものと思われた。二つ目の項目として、Mass median diameter (μm) が挙げられた。これは MWCNTs の長径に対応する長さであり、なかでも毒性の強い NM402 は 1.488μm と他の被検物質に比べて比較的短かったことが毒性に影響したものと考えられた。これらの結果は、EC200 と相関が比較的に見えやすい物性であると考えられる。一方、インパクトが大きく、ばらつきも大きい (エラーバーが大きいのはその値の 95% 信頼区間から大きく外れている) その他の変数 (物性) に関しては、毒性への影響に関する変数 (物性) として挙げられるものの、本解析結果から確度は低いものと考えられた。

化学構造からの有害性予測では、特定の化学構造が特定の生物活性や毒性を示す傾向がある。現在、正準 SMILES 記法による化学構造の線形表記法を作成がなされ、今後、RDKit や PaDEL-descriptor は化学構造の記述子を計算予定である。今後、これらの記述子は、機械学習モデルの入力として使用できることから、毒性の予測に役立つと考える。また、量子化学計算と毒性予測においては、PySCF のような量子化学計算を使用すると、電子状態計算が実施可能となる。これらの計算から得られる情報 (HOMO/LUMO エネルギー、電荷分布など) は、化学物質の反応性や安定性を理解するのに役立ち、これらの情報は毒性予測にも寄与する可能性を示唆する項目と考える。

E. 健康危険情報

特になし

F. 結論

F.1. 化学物質の *in vitro* 呼吸器感作性試験法の開発 (足利、善本、黒田)

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。

今回私たちが開発した新規 *in vitro* 代替法によって、これまでに皆無であった呼吸器感作性を検出できる実験系が構築できた。さらに、感度、特異度から皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質を高確率で識別可能であることが示唆された。また、これまで、皮膚感作性物質と考えられていた物質に、新

たに呼吸器感作の誘導能を検出できる可能性も示唆された。

ヒト肺胞マクロファージに対して不死化および増殖に関与する遺伝子を導入することで形質転換を行なった。これらの細胞が十分な増殖を示せば、細胞のキャラクターゼーションに進みたいと考えている。

F.2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発 (足利、飯島)

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。

シリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子を用い、NM による THP-1 細胞の活性化のメカニズムを部分的に明らかにした。また、以前に NM 曝露により発現が亢進することを示した *CD54*, *CD86*, *MMP-12* に加え、*IL-1b*, *CCL-3* の各遺伝子もシリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子曝露により発現が亢進していることを見出し、新たな評価指標としての可能性が示された。気管支上皮モデルとの共培養では、特にモデル下部から曝露した際に単培養よりも強い *CD54* 発現亢進が見られ、共培養系を用いることの有用性が部分的に示された。THP-1 細胞の活性化を指標とした手法、さらにそれを気管支上皮モデルと組み合わせた共培養系は NM の短期吸入曝露による免疫毒性評価手

法として期待される。

F.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発 (高橋、石丸、渡辺)

吸入曝露 RSV 感染実験については、1 月下旬より 2 月下旬にかけて NM-202 の評価実験を実施するため、各種手続きや実験材料の準備を行っている。

In vivo 吸入曝露実験については、今年度は、ナノシリカ NM202 については、低濃度：10mg/m³、高濃度：30mg/m³ としてマウスに 3 日間間歇曝露実験を行い、感染性免疫に及ぼす影響を調べる実験に供する。気道感作物質を検出する in vivo 実験系の構築のため、TDI 及び TMA のエアロゾル化検討を実施する計画である。

ナノマテリアルの感染性免疫への影響を調べることを目的とした実験に供するため、NM202 の高分散乾燥検体を持ちいて、マウスに 1 日時 6 時間、3 日間の間歇全身ばく露吸入を実施した。目標濃度は、低濃度群 10mg/m³、高濃度群 30mg/m³ とした。その結果、低濃度群 8.0±1.1 mg/m³、高濃度群 28.3±0.9 mg/m³、MMAD は低濃度群 507 nm (σ_g : 3.1)、高濃度群 667 nm (σ_g : 2.6) であった。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに 3 μm 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。NM202 は、これまで吸ばく露実験を行ったナノシリカ検体に比較して微細で機器への吸着性が強く、エアロゾル化効率 6% 程度と非常に低かった。NM202 を曝露したマウスの肺重量に関して、3 日間のばく露終了直後において増加傾向にあった。

なお、気道感作物質の評価方法の検討については、モルモットを対象とした実験を計画中である。R5 年度は、モルモットに適した鼻部吸入ばく露用の固定装置の設計

並びに作製を行った。また、陽性対象物質となる TDI 及び TMA のエアロゾルの発生方法について、物性情報から検討を行った。TDI 及び TMA は水を含むと容易に加水分解される。そのため油性溶媒に溶解して、ミスト発生供給装置 NB-2N 型（二流体式アトマイザー）による方法を検討した。二流体アトマイザーはエアロゾル化の流体として空気を用いるが、室内空気では水蒸気を含むため、ドライヤー機能を備えたコンプレッサーで発生させた圧縮空気を用いることを計画している。圧縮空気に含まれる水蒸気の理論値は $1.37\text{g}/\text{m}^3$ （露点から換算）であり、TDI と TMA の加水分解の影響は少ないと考えられる。

F.4. NM および呼吸器感作性物質の in vivo 免疫毒性解析（石丸）

ナノマテリアルの形状・性状によってマクロファージの反応性は異なっており、ナノマテリアルの認識、貪食のプロセスに伴うナノマテリアル関連分子の発現パターンがナノマテリアルの種類によって多様性がある可能性がある。

F.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価（渡辺）

F.5.1. RSV 感染マウスモデルにおいて、ナノシリカ NM-202 の Taqaan 法での吸入曝露により、RSV 肺炎は増悪化した。

F.5.2. NM-202 曝露のみでは肺での炎症はほぼ認められず、先行研究での NM-204 の結果と同じ傾向を示した。

F.5.3. 先行研究での結果と合わせて、NM-202 の感染影響指標としてケモカイン CCL3 および CCL5 が利用できる可能性が示され

た。

F.5.4. NM-202 曝露/RSV 感染により、気管支上皮での杯細胞の過形成と思われる病変が観察された。

F.5.5. RAW264.7 細胞を用いた in vitro 評価系では、ナノシリカ NM-201, 202 および 204 の RSV 感染マウスでの結果を反映した影響評価が出来なかった。

F.6. 既存情報と in vitro/in vivo 研究データによる in silico 解析（大野）

物性データと毒性データの関連性の解析では、各データ間にはしばしば相関関係が存在することから、これらのデータを組み合わせて解析することで、新たな毒性を予測することが可能となりうる。今後、物性項目の収集と毒性を指標とした検証や、オープンソースライブラリーを利用した 1D、2D、3D の科学情報学・計算化学的な物性項目についてのプログラムの作成によって、毒性予測を実施する。

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Tawara H, Tsunematsu T, Kitajima S, Nagao R, Matsuzawa S, Otsuka K, Ushio A, Ishimaru N. The non-canonical function of borealin, a component of chromosome passenger complex, promotes glycolysis via stabilization of survivin in squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 706:149741, 2024.
2. 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; 51(6):387-400. doi: 10.1177/02611929231204823.
3. Mizoguchi I, Katahira Y, Inoue S, Sakamoto E, Watanabe A, Furusaka Y, Irie A, Senju S, Nishimura Y, Mizukami S, Hirayama K, Nakamura S, Eto K, Hasegawa H, Yoshimoto T. A novel coculture system for assessing respiratory sensitizing potential by IL-4 in T cells. *ALTEX.* 2023 40(2):204-216. doi: 10.14573/altex.2111181.
 4. Sakamoto E, Katahira Y, Watanabe A, Furusaka Y, Sekine A, Yamagishi M, Sonoda J, Miyakawa S, Inoue S, Hasegawa H, Yo K, Yamaji F, Toyoda T, Mizoguchi I, Yoshimoto T. Chemical- and Drug-Induced Allergic, Inflammatory, and Autoimmune Diseases via Haptenation. *Biology (Basel).* 2023 12(1):123. doi: 10.3390/biology12010123.
 5. 関根碧水、溝口 出、片平泰弘、長谷川 英哲、渡邊有麻、善本隆之：ヒト免疫反応を in vitro で再現する細胞培養系の開発、動物実験代替法と New Approach Methods の開発・利用動向（監修：小島 肇）、シーエムシー出版、2023 226-238.
 6. Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D. Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. *J Toxicol Sci.* 12:617-639, 2023.
 7. Jin S, Tsunematsu T, Horiguchi T, Mouri Y, Shao W, Miyoshi K, Mizusawa N, Hagita H, Sarubo M, Yoshida K, Yoshida K, Fujiwara N, Kitajima S, Ozaki K, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y. Involvement of the PTUB1-YAP1 axis in driving malignant behaviors in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 12(24):22156-22169. doi.org/10.1002/cam4.6735, 2023.
 8. Sugimoto A, Iwata K, Kurogoshi R, Tanaka M, Nakashima Y, Yamakawa Y, Oishi A, Yoshizaki K, Fukumoto S, Yamamoto A, Ishimaru N, Iwamoto T. C-terminus of PIRZO1 governs Ca²⁺ influx and intracellular ERK1/2 signaling pathway in mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 682:39-45, 2023.
 9. Ishimaru N, Otsuka K, Tsunematsu T, Taquahashi Y, Kanno J. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. *Annals of Work Exposures and Health* 67(Supplement 1) i74, 2023.
 10. Sato-Fukuba M, Arakaki R, Ushio A, Otsuka K, Nagao R, Matsuzawa S, Tawara H, Tsunematsu T, Ishimaru N*. CD4⁺ T-cell-dependent differentiation of CD23⁺ follicular B cells contributes to the pulmonary pathology in a primary Sjögren's syndrome mouse model. *Front Immunol.* 14:1217492, 2023.
 11. Narwidina A, Miyazaki A, Iwata K, Kurogoshi 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.* 650:47-54, 2023.
12. 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.* 12:8510-8525, 2023.
 13. 石丸直澄 : シェーグレン症候群疾患モデルからのトランスレーショナル研究 炎症と免疫 31(3):35-39, 2023.
 14. 石丸直澄 : 臓器間ネットワークと自己免疫疾患 臨床免疫・アレルギー科 80(3):311-316, 2023.
 15. Miyauchi, A., Akashi, T., Yokota, S., Taquahashi, Y., Hirose, A., Hojo, M., Yoshida, H., Kurokawa, M., Watanabe, W. Effects of inhalation of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *J. Toxicol. Sci.* (2023) 48, 411-420.
 16. Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y, Taquahashi Y, Hirose A, Suzuki J, Akiko Inomata A, Dai Nakae D, Time-Course of Transcriptomic Change in the Lungs of F344 Rats Repeatedly Exposed to a Multiwalled Carbon Nanotube in a 2-Year Test, *Nanomaterials (Basel).* 2023;13(14): 2105. doi: 10.3390/nano13142105.
 17. Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D, Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7, *J Toxicol Sci* 2023;48(12): 617-639. doi: 10.2131/jts.48.617.
 18. Yokota S, Miyaso H, Hirai T, Suga K, Wakayama T, Taquahashi Y, Kitajima S., Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system., *J Toxicol Sci.* 2023;48(2):57-64. doi: 10.2131/jts.48.57.
 19. Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 69-82.
 20. Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S.: A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 59-68.
 21. 大野彰子 : ナノマテリアルの概要, *ファルマシア*, 2023;59(7):629-633. doi:10.14894/faruawpsj.59.7_629
- G.2. 学会発表
1. Ishimaru N. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. Inhaled Particles/NanOEH conference 2023 Invitation Lecture (2023.5.15, Manchester,

- UK)
2. 高橋祐次、森田紘一、辻昌貴、菅康佑、相崎健一、北嶋聡、平林容子、先端素材カーボンナノチューブヤーンを使用した実験用小動物における低侵襲な生体電位測定法の開発、第70回日本実験動物学会総会、つくば (2023.5.24)
 3. Inoue H, Adachi T, Izumi H, Kuroda E: Establishment of a functional alveolar macrophages cell line (Implication of establishment of an animal-free model for assessment of lung inflammation), JSICR/MMCB 2023 (2023.5.25, Wakayama)
 4. Inoue H, Adachi T, Izumi H, Kuroda E: Establishment of a functional alveolar macrophages cell line (Implication of establishment of an animal-free model for assessment of lung inflammation), JSICR/MMCB 2023 (2023.5.25, Wakayama)
 5. 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)
 6. 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)
 7. 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)
 8. Taquahashi Y, Morita K, Tsuji M, Suga K, Okubo Y, Aisaki K & Kitajima S. Improved acute toxicity study incorporating vital signs; a less invasive method for measuring biopotential in laboratory animal using CNT yarn, 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX-X, 2023.7.18, Taipei)
 9. 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).
 10. 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)
 11. 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)
 12. Adachi T, Inoue H, Izumi H, Kuroda E: Establishment of a functional alveolar macrophages cell line (Implication of establishment of an animal-free model for assessment of lung inflammation), 第30回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11, 神奈川)
 13. 溝口 出、片平泰弘、長谷川英哲、渡邊有麻、関根碧水、園田寿樹心、山岸美宇、善本隆之: 呼吸器と皮膚感作性物質の識別を可能にする Th2 細胞株を応用した改良版 2 ステップ DC/T 共培養

系の開発、第36回日本動物実験代替法学会（2023.11.27-29, 千葉）

3. その他
特になし

14. 大野彰子: ナノマテリアルの安全性評価における国際動向, 第36回日本酸化ストレス学会関東支部会（2023.12.3, 川崎）
15. Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Kousuke Suga, Masaki Tsuji, Yusuke Okubo, Ken-ich Aisaki, Satoshi Kitajima, New approach for assessment of acute oral toxicity by multiple parameters of vital signs: development of a less invasive method for measuring biopotential in small laboratory animal using carbon-nanotube yarn as surface electrodes, 63rd Society of Toxicology Annual Meeting, (Accepted), Abstract Number/Poster Board number 3077/P180, 2024.3.11
16. 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 63rd Annual Meeting (2024.3.12, Salt Lake City, USA).
17. Ushio A, Otsuka K, Tsunematsu T, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N. The influence of multi-walled carbon nanotube for immune systems. 第113回日本病理学会総会（2024.3.28、名古屋）
18. 大野彰子, 動物実験代替法としての生体模倣システム(MPS)と国際動向, 日本薬学会第144年会シンポジウム講演, (2024.3.30, 横浜).

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