

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

感染影響評価

～In vivo 吸入曝露実験方法の開発及びNMのRSV感染マクロファージ機能への
影響評価に関する研究～

研究分担者 渡辺 渡

九州保健福祉大学 生命医科学部 生命医科学科 教授

研究要旨

ナノマテリアルの短期全身吸入曝露による感染性免疫系への影響評価系を構築するため、ナノシリカ NM-202 の複数回の Taquann 法吸入曝露による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響評価を実施した。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 や CCL3 の BALF 中のレベルは、NM-202 曝露により有意に上昇したが、非感染マウスでは誘導されなかった。肺病理組織学的検討でもこれらサイトカイン・ケモカイン類の結果を反映して、RSV 感染マウスでは NM-202 曝露によりリンパ球の浸潤や肺泡マクロファージ類の集簇などが認められ、先行研究での結果と合わせて、感染影響指標としてケモカイン CCL5 および CCL3 が利用できる可能性が示された。さらに、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。一方、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 感染マウスでの評価結果を反映した影響評価が出来なかった。今後、THP-1 細胞での in vitro 評価系構築を目指す。

A. 研究目的

我々の先行研究（20KD1004）では、Taquann 全身吸入曝露試験により、NM が肺泡マクロファージに作用し、また RSV 感染マウスモデルにおいて肺炎を増悪化することを見出してきた。本研究では、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して、NM の吸入曝露による RSV 感染マウス病態への影響評価をするとともに、RSV 感染マクロファージへの作用を in vitro で解析する。

B. 研究方法

ナノシリカ NM-202 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 × 10⁵ 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。

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。

(倫理面への配慮)

動物実験は九州保健福祉大学動物実験規定等に則り、動物倫理に配慮して安全に実施した (承認番号: 5-1-03)。

C. 研究結果

(1) BALF 中のケモカイン・サイトカインレベルの評価結果

RSV 感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカイン CCL5 の BALF 中のレベルは、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。

(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。

(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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

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。

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。

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。

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. 研究発表

F.1. 論文発表

1. 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.

F.2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他