

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 6 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 ゲノム安全科学部 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、生体の肺組織を模倣した 3 次元共培養系による免疫毒性評価試験法を開発することを目的として、国内で入手可能な肺胞マクロファージ細胞の調査を行い、ヒト肺の模倣性が高い気道・肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージとして、HiLung 株式会社が iPS 細胞より作成した細胞を見出した。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、亜鉛イオン溶出量を検出限界以下まで低減化した表面処理の異なる 2 種類の酸化亜鉛 NM の評価を行った結果、いずれも CD54 の強い発現増強が認められ、イオン交換水への亜鉛イオンの溶出濃度と THP-1 細胞の活性化能に関連は認められなかったことから、酸化亜鉛 NM による THP-1 活性化能は固体としての食食によるものと考えられた。

今後本分担研究では、肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージの共培養系による NM を含む免疫毒性試験法の開発と、酸化亜鉛 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食食さ

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受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. 国内で利用可能な可能な肺泡マクロファージ細胞の調査

MPS World Summit 2024 (2024 年 6 月、シアトル) および Lung for In Vitro Event 2024 (2024 年 6 月、ニース)に参加し、in vitro 肺モデルの調査を行った。

2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発

イオン交換水への亜鉛イオン溶出量が測定限界未満であるとされる酸化亜鉛 NM (MZN-B0) とその表面処理品 (MZN-B0HP) の 2 種の 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. 国内で利用可能な可能な肺泡マクロファージ細胞の調査

京都大学医学部呼吸器内科発の企業である HiLung 株式会社は、世界的にも唯一の iPS 細胞より呼吸器細胞を作成するコア技術を有する研究開発型企业であり、本技術

を活用して極めてヒト肺の模倣性が高い気道・肺胞上皮細胞や肺泡マクロファージを安定的製造するとともに、オルガノイドなどの肺構造を再現した高度な組織培養・工学技術も有しており、これらを組み合わせた高機能ヒト肺モデルで医薬品の薬効評価、毒性評価評価を手掛けた豊富な実績を有することが明らかとなった。

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 MZN-B0 で 36.6 $\mu\text{g/mL}$ 、MZN-B0HP で 36.5 $\mu\text{g/mL}$ 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。特に適用濃度 31.6 $\mu\text{g/mL}$ において CD54 の相対発現量は無処理と比較して約 30-50 倍と著しい亢進が認められた。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、MZN-B0 と MZN-B0HP ではそれぞれ 9.37 $\mu\text{g/mL}$ 、10.1 $\mu\text{g/mL}$ と算出された。図 1 と 2 に MZN-B0 と MZN-B0HP の h-CLAT 試験結果を示した。

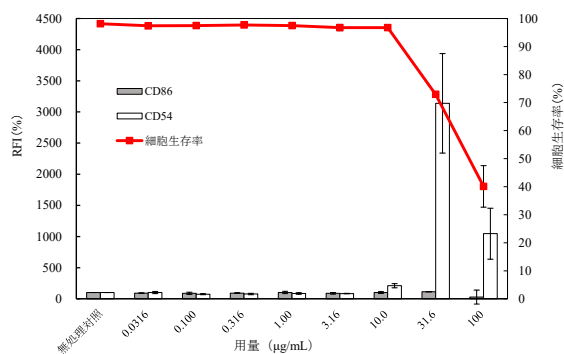


図 1 MZN-B0 処理 THP-1 細胞の CD86/54 発現量と生存率(N=3)

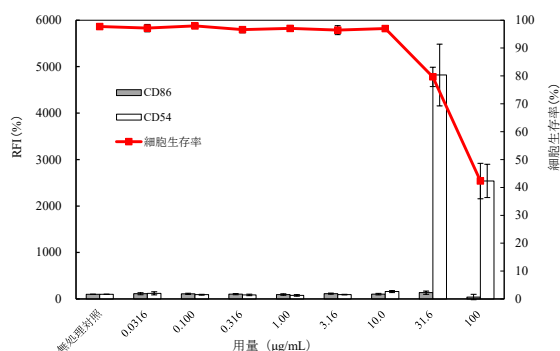


図 2 MZN-B0HP 処理 THP-1 細胞の CD86/54 発現量と生存率(n=3)

D. 考察

1. 国内で利用可能な可能な肺泡マクロファージ細胞の調査

次年度は HiLung 株式会社とともに以下のように研究を進める予定である。

A. iPS 細胞より段階的方法を用いて肺前駆細胞を分化誘導する。分化誘導された肺前駆細胞を特異的な表面マーカーによる細胞ソーティングによって単離し、肺線維芽細胞と共培養することで肺泡オルガノイドを形成する。

B. ヒト iPS 細胞由来肺泡マクロファージの作製

iPS 細胞より段階的方法を用いて組織在来マクロファージを分化誘導する。その後、成熟化培地を用いて、肺泡マクロファージを作製する。

C. 共培養による評価系

工程 A および B で作製した肺泡オルガノイドと肺泡マクロファージを、共培養専用培地において共培養系を作製する。そこに先行研究で THP-1 細胞の強い活性化能が認められた二酸化ケイ素 NM (NM204) を処理し、CD54, MMP-12 など活性化の指標となりうる遺伝子の発現量を測定し、本共養系の有用性を評価する。

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、イオン交換水への亜鉛イオンの溶出が検出限界未満とされる 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従来の酸化亜鉛 NM とほぼ同程度であった。表 1 に、昨年度同様に評価した 2 種類の酸化亜鉛 NM の結果も加えて 4 種類の亜鉛イオン溶出量と h-CLAT 試験による THP-1 細胞の活性化能の関係を示した。

表 1 各種酸化亜鉛 NM の亜鉛イオン溶出量と h-CLAT 試験による THP-1 細胞活性化能

サンプル名	LotNo.	Znイオン溶出量※(ppm) 下段 2つは水質測定器/ICP	h-CLAT CD54 EC200 (ug/mL)
MZ-500	5111025	9.4	10.1
MZ-500HP	2.5	2.5	10.5
MZN-B0	N-5230702	≒0/0.03	9.37
MZN-B0HP	240726	≒0/7.5	10.1

表 1 に示すように、亜鉛イオンの溶出量にかかわらず THP-1 の活性化能 (EC200: 値が低いほど活性化能が高いと考えられる) はほぼ同じであったことから、活性化には溶出した亜鉛イオンではなく、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。今後培地中での亜鉛イオンの溶出量の測定や、THP-1 細胞の NM 食食阻害が認められた Amiloride を前処理することで、酸化亜鉛 NM 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. 国内で利用可能な可能な肺胞マクロファージ細胞の調査

肺胞オルガノイドと肺胞マクロファージの作成技術を有する国内研究機関を見出した。今後これらの細胞を用いた共培養系による、NMを含む化学物質の吸入曝露による免疫毒性評価系を開発する。

2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発

h-CLAT 法を用いて、亜鉛イオン溶出量を検出限界以下まで低減化した表面処理の異なる 2 種類の酸化亜鉛 NM の評価を行った結果、いずれも CD54 の強い発現増強が認められ、イオン交換水への亜鉛イオンの溶出濃度と THP-1 細胞の活性化能に関連は認められなかったことから、酸化亜鉛 NM による THP-1 活性化能は固体としての食食によるものと考えられた。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Nishida A, Sawada Y, Arai R, Ishibashi N, Suzuo M, Ohno A, Ashikaga T, Iijima K: Evaluation of the immunotoxicity potential of nanomaterials using THP-1 cells. *Front. Toxicol.*,2024;6:1293147. <https://doi.org/10.3389/ftox.2024.1293147>.
2. Ashikaga T, Hatano K, Iwasa H Kinoshita K, Nakamura N, Ambe K, Tohkin M: Next Generation Risk Assessment Case Study: A Skin Sensitization Quantitative Risk Assessment for Bandrowski's Base Existing in Hair Color Formulations, *J. Cos. Sci .Soc.* 2024;48(2):73-77.
3. Kasahara T, Yamamoto Y, Nakashima N, Imamura M, Mizumachi H, Suzuki S, Aiba

S, Kimura Y, Ashikaga T, Kojima H, Ono A, Matsumoto K: Borderline Range Determined Using Data From Validation Study of Alternative Methods for Skin Sensitization: ADRA, IL-8 Luc Assay, and EpiSensA, *Journal of Applied Toxicology.* 202445(3):432-439.

<https://doi.org/10.1002/jat.4712>

4. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaioun K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P. Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, *Arch Toxicol.* 2024;98:2299-2308. doi: [10.1007/s00204-024-03802-6](https://doi.org/10.1007/s00204-024-03802-6).
5. 平林容子, 足利太可雄, 小島肇夫: 非臨床安全性評価に用いられる非ヒト霊長類の供給不足をめぐる動き, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2024;55(3):195-197. https://doi.org/10.51018/pmdrs.55.3_195.
6. 足利太可雄: 化粧品開発における動物を用いない皮膚感作性評価法開発の現状, *SSCI-Net News Letter.* 2024;6;3-6.
7. 足利太可雄, 大野彰子, 小島肇夫, 平林容子: 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 令和 4~6 年報告書, *AATEX-JaCVAM.* 2024;12(1):35-41.

F.2 学会発表

1. Ishida S, Matsushita T, Sato K, Ashikaga

- T, Hirabayashi Y, Yamazaki D: Japanese approach to the proposal of an OECD Test Guideline using Gut-Liver MPS for the first pass effect analysis as a Context of Use of toxicokinetic simulator in chemical risk assessment, MPS World Summit 2024 (2024.6.13)
2. Ashikaga T, Tanabe I, Ishikawa S, Mizoguchi I, Yoshimoto T: Development of an in vitro respiratory sensitization test based on a concept of a co-culture system between human bronchial epithelial cells and antigen presenting cells, LIVE 2024 (2024.6.20)
 3. 徳永朱莉, 木下啓, 安部賀央里, 山田隆志, 足利太可雄, 頭金正博: 機械学習を活用した皮膚感作性強度予測モデルの開発と解釈性向上に向けた検討, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.3)
 4. 足利太可雄, 大屋賢司, 加藤節史, 北川剛史, 小島肇, 寒水孝司, 林克彦, 立花滋博, 益森勝志, 三嶋隆, 楠木俊江, 清水淳, 伏原和久, 宮崎和雄: ヒト末梢血から樹立した不死化単球細胞株を用いた発熱性物質検出系のバリデーション研究, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
 5. 飯島一智, 山城真輝, 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄: 種々の酸化亜鉛ナノ粒子を対象とした抗原提示細胞活性化能の評価と活性化機序の解析, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
 6. 足利太可雄: 動物実験代替法の国際動向と国内行政受け入れの取り組み, 皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第 18 回教育セミナー (2024.9.26)
 7. Reinke E, Ulrey A, Hoffmann S, Basketter D, Corsini E, Ashikaga T, Gerberick F: Peer Review for Validation Studies: Building Confidence and Transparency Into a New Validation Paradigm, ASCCT 13th Annual Meeting (2024.10.29)
 8. 前田洋祐, 佐藤亜紗子, 武吉正博, 立花滋博, 成田和人, 小林諒太, 島田真理子, Priyanka M, Rahul D, Abhay D, Namhee K, Miriam J, 福山朋季, 松本一彦, 赤堀有美, 足利太可雄, 大野彰子, 小島肇, 小野敦: 皮膚感作性試験代替法 α -Sens\$24C7\$ の Validation 研究 (Phase I), 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 9. 大野彰子, 沖山佳生, 山城真輝, 飯島一智, 足利太可雄: ナノマテリアルの免疫毒性評価系における *in vitro* h-CLAT 試験法の有用性, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 10. 徳永朱莉, 木下啓, 岩佐帆乃夏, 波多野浩太, 中村伸昭, 足利太可雄, 安部賀央里: アミノ酸誘導体結合性試験 ADRA 等を使用した強感作性物質の皮膚感作性強度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 37 回大会 (2024.11.30)
 11. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支モデルとの共培養系を用いた各種シリカナノ粒子の THP-1 細胞活性化能の評価と活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 12. 荒井りおん, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: ナノマテリアル吸入毒性試験法の開発に向けた、各種シリカナノ粒子曝露による THP-1 細胞活性化のメカニズム解析と新規評価指標

候補遺伝子の発現解析，日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)

13. 坂本玲奈，山城真輝，大野彰子，足利太可雄，飯島一智：気管支モデル／THP-1 細胞共培養系を用いた酸化亜鉛ナノ粒子の免疫細胞活性化能の評価，日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)

14. 足利太可雄：皮膚感作性試験代替法の行政活用状況，日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.12.1)

15. Aoshima H, Ishikawa S, Tanabe I, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Ashikaga T: Investigation of the Differential Biological Effects of Skin and Respiratory Sensitizing Chemicals Using a Co-Culture System of Bronchial Epithelium and Dendritic Cells (2025.3.19)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし