

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

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

九州医療科学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(NM)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-201、-202 および-204 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について再評価を実施した。肺病理組織標本すべてに対して、PAS 染色陽性細胞の分布を顕微鏡下で探索した結果、NM-204 はスコアの中央値による比較から、RSV 感染マウスでは NM-201 より粘性多糖産生細胞の分布が広い傾向が認められた。これはケモカイン CCL5 産生誘導結果と一致しており、感染影響指標として CCL5 が有用であることが再認識された。NM の粘性多糖誘導とケモカイン誘導能との関連性を明らかにするため、免疫組織染色による検討を開始している。一方、PMA 処置および未処置 THP-1 細胞/RSV 感染系における NM のケモカイン（CCL2、CCL3 および CCL5）産生増強効果は、最大で 50%程度であり in vitro 評価系として利用するには十分ではなかった。THP-1 細胞の培養条件の変更検討や共培養系の構築の予備試験を開始している。

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いる。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 で解析して、in vitro での感染影響評価系の確立を目指す。

B. 研究方法

ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験

これまでに Taquann 全身吸入曝露/RSV 感染実験において評価を実施した NM-201、-202 および-204 の肺病理組織標本すべてに対して、PAS 染色陽性細胞の分布を顕微鏡下で探索した。分布の程度は、0～3 の 4 段階でスコア化した（0:陽性細胞なし、1:複数個所にあり、2:複数個所に連続してあり、3:広がり大きいまたは杯細胞の増生があり）。なお、結果は右・左葉毎に集約した。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価

THP-1 細胞を評価に利用した。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。NM の影響評価の予備試験として、PMA で処置した THP-1 細胞に、RSV A2 株を MOI（感染多価）1.0 で感染させ、0、8、24 および 48 時間後の培養上清中の cytokine/chemokine の誘導レベルをプロテインアレイ法（Proteome profiler™, R&D systems）で網羅的に調査した。

NM の評価は、PMA で処置した THP-1 細胞に超音波破碎機で培地中に懸濁したサンプル（0~10 µg/mL）を添加して一晚培養した。続いて前述のように RSV を感染させて 24 時間後の上清中の CCL2、CCL3 および CCL5 量を ELISA 法にて定量した。

h-CLAT 法による NM の評価では PMA による処置を行わないため、NM-204 を代表として PMA 未処置での評価を上記と同様に実施した。

前年度 In vivo 試験で評価を行った NM-202 について、A549 細胞を用いて THP-1 細胞と同様に CCL5 の誘導能を評価した。

（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

PAS 陽性細胞の分布を指標とした RSV 感染マウスでの影響評価

Taquann 全身吸入曝露/RSV 感染実験にて NM-201（令和 4 年度）、-202（令和 5 年度）および-204（令和 3 年度）を評価したマウス肺組織標本について、PAS 染色により粘性多糖産生細胞の分布を再評価した。陽性細胞は非感染・感染マウスそれぞれに散見された。標本によっては気管支の一部に欠損

があるなどマウスごとにばらつきが大きかった。特に左葉は一葉のため、NM の影響が明確ではなかった。一方、右葉については四葉の評価スコアを合することで分布の違いが見られた。特に NM-204 はスコアの中央値による比較から、RSV 感染マウスでは NM-201 より粘性多糖産生細胞の分布が広い傾向が認められた。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への in vitro 影響評価

PMA 処置 THP-1 細胞/RSV 感染系においては、感染後経時的に CCL2、CCL3、CCL5 および IL-8 が上清中に産生されていることがプロテインアレイ法で確認された。そこで、ヒト-マウス間で共通の生物学的機能が確立されている CCL2、CCL3 および CCL5 の影響を検討した。CCL2 では産生影響があまり見られなかった。そして、in vivo 試験で誘導が確認されている CCL5 では、NM 添加により産生増強は認められたが、その効果が 20%にも満たず、かつばらつきも大きいため物質間の相違が明確ではなかった。

PMA 未処置 THP-1 細胞/RSV 感染系では、in vivo 試験において最も影響が強く見られた NM-204 を代表化合物として評価した。PMA による刺激が無くても THP-1 からの CCL3 および CCL5 の産生は NM-204 により濃度依存的（0.3~30 µg/mL）に 50%程度の増強が確認された。しかし、RSV を感染させると感染量に比例して両ケモカイン共に産生が増強されるが、却って NM-204 の影響が認められなくなった。

気道上皮系細胞である A549 細胞に対する NM-202 の CCL5 産生増強作用は、あまり強くなかった。

D. 考察

PAS 陽性細胞の分布を指標とした RSV 感染

マウスでの影響評価

3 回の感染動物実験より得られた NM の粘性多糖産生細胞の分布に及ぼす影響は、RSV 感染マウスでは非感染より相違が見られた。とくに個体での比較では、NM-204 では NM-201 より影響が見られ、CCL5 産生誘導の結果と一致していた。しかし、局所レベルでの比較では、高いスコアの組織部位で炎症性病変が強いわけではなかった。粘性多糖産生細胞の分布とケモカイン誘導との関連性を精査するため、NM 曝露 RSV 感染マウス肺パラフィンブロックより、標本を新たに切り出し（バイオ病理研究所株式会社に委託）、CCL3、CCL5 および MUC5B タンパクを標的とした免疫組織染色による検討を開始している。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への in vitro 影響評価

PMA 処置および未処置 THP-1 細胞/RSV 感染系における NM のケモカイン（CCL2、CCL3 および CCL5）産生増強効果は、最大で 50%程度であり in vitro 評価系として利用するには十分ではなかった。この細胞は、LPS および IFN- γ の処理により炎症性マクロファージ（M1 系）へ分化するとの報告があり、ケモカイン誘導が強くなる可能性がある。現在、この実験系での影響評価を開始している。また、THP-1/A549 細胞の共培養系の構築を視野に入れた予備試験も開始している。

E. 結論

PAS 陽性細胞の分布を指標とした RSV 感染マウスでの影響評価

RSV 感染マウスでは、NM-204 は NM-201 より粘性多糖産生細胞の分布が広い傾向が認められた。CCL5 などのケモカイン誘導能との関連性を明らかにするため、免疫組織

染色による検討を開始している。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への in vitro 影響評価

THP-1 細胞/RSV 感染系における NM のケモカイン産生増強効果は、in vitro 評価系としての利用には十分ではなく、培養条件の変更検討や共培養系の構築の予備試験を開始している。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2. 学会発表

なし

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