

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 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 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、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た。

皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質を識別可能な 3 次元共培養系の策定については、3 次元共培養系を用い、OX40L を指標とした予測モデルを最適化することにより両者をほぼ識別可能な試験系を確立した（予測率 89%）。さらに 5 種類の代表的非感作性化学物質を用いて検討したところ、期待する通り全て陰性であった。また他施設への技術移転性について検討したところ、再現性の高い結果が得られた。ヒト肺胞マクロファージ細胞株の樹立については、ヒト初代肺胞マクロファージに不死化に関する遺伝子導入を行なったが、増殖性が非常に悪く変異型 RAS 遺伝子をレンチウイルスベクターにて遺伝子導入を行ったものの改善が見られなかったことから、これ以上の検討は断念とした。次年度は分化誘導法が確立されている iPS 細胞由来の肺胞/間質マクロファージを用い研究を進める。

微粒子に応答する肺胞マクロファージの解析により、微粒子に応答し炎症性サイトカインである IL-1 α を放出する細胞は全体のごく一部であることが明らかとなり、このような肺胞マクロファージサブセットの性質を詳細に解析することが、微粒子による炎症反応の理解につながると考えられた。

シリカナノ粒子による THP-1 細胞の活性化において、シリカナノ粒子へ亜鉛イオンをあらかじめ吸着させた場合、処理した亜鉛イオン溶液の濃度依存的に活性化の指標である CD54 の発現が増加した。NM による免疫細胞活性化は、NM 自体の持つ活性化能に加え、吸着物質による影響を受けうる可能性が示唆された。気管支上皮モデルと THP-1 細胞との共培養系では、気管支モデル上部よりシリカナノ粒子曝露した 72 時間後において THP-1 細胞の CD54 の発現増加傾向がみられた。NM の物性および関連する免疫毒性に関する調査・情報収集については、NMs を含む呼吸器感作物質となる化学物質の被験物質の物理化学的性状（物性）の収集および *in vitro* / *in vivo* 免疫毒性試験結果に関連する比較検証データを取得し、物性と *in vitro* や *in vivo* 試験の結果に関する関連性解析の実施により、毒性に影響を与える物性についての検証を実施した。

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、全身ばく露吸入装置 (Taquaann システム Ver3.0) により、ナノシリカ (NM202、JRC) を高分散エアロゾルとして、C57BL/NcrSlc 雄性マウス 12 週齢に 6hr/day、連続 5 日間 (合計 30 時間) の全身ばく露吸入を行った。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、エアロゾル化効率は約 5%程度と非常に低かった。NM202 を曝露したマウスはばく露後 8 週間までの観察期間中、体重推移に影響は見られなかった。肺重量に関して、5 日間のばく露終了直後およびばく露 4 週後の定期解剖において用量依存的に増加傾向にあり、高濃度群では統計学的に有意であったが、ばく露後 8 週間では影響は認められなかった。In vivo 吸入曝露された NM の免疫毒性機構解析については、ナノシリカ NM202 の全身吸入曝露による 4 週および 8 週での肺胞細胞の細胞数、および M1/M2 マーカーに関して対象群と変化はなかった。肺の病理組織学的変化として、NM202 曝露によって肺胞腔の軽度の狭窄および肺胞マクロファージの集簇像が確認された。また BALF 細胞における Marco mRNA の発現において曝露濃度に依存した上昇が観察された。In vitro において RAW264.7 細胞へ NM202 を添加すると MARCO の表面発現の有意な増加が認められたことから、マクロファージの NM202 に対する反応に MARCO 分子が関与している可能性が示された。

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 Taquaann 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。

以上より、ヒト肺胞マクロファージ細胞株の樹立は断念し代替の細胞で研究を遂行することとしたものの、皮膚感作性物質と呼吸器感作性物質を識別可能な、OX40L を指標とする 3 次元共培養系が確立できたことや、NM による THP-1 細胞の活性化には表面に吸着するイオンの関与の可能性を明らかにしたこと、さらに NM の in vivo 吸入曝露による免疫毒性の評価に MARCO 分子および CCL5 を介した反応性の解析が重要である可能性が示されたことなど、着実な成果が得られたと考える。

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

東京科学大学大学院 医歯学総合研究科
教授

飯島 一智

横浜国立大学大学院 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

九州医療科学大学

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

ゲノム安全科学部 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 (善本、黒田、足利)

B.1.1 *In vitro* 呼吸器感作性試験法の開発

ヒト末梢血単核球細胞株 CD14-ML を GM-CSF と IL-4 で刺激し未成熟樹状細胞 (DC) に分化した細胞とヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B を、それぞれ異なる Scaffold で培養後 2 つの Scaffold を重ねた DC 共培養系を構築し、その上から化学物質を滴下した。8 時間後に、DC の Scaffold から RNA を抽出し、RT-qPCR により CD80 と CD86、OX40L、TSLPR (TSLP-R)、IL-7R α (TSLP-R)、IL-17RB (IL-25R)、ST2 (IL-33R)、HPRT の mRNA 発現を定量した。化学物質として、昨年度の代表的な皮膚と呼吸器感作性化学物質、それぞれ 11 個と 9 個に、非感作性化学物質 5 個を加えて検討した。さらに、他施設での再現性の検討も開始し、代表的な皮膚と呼吸器感作性化学物質を、それぞれ 2 個と 4 個用いて検討した。

B.1.2 ヒト肺胞マクロファージ株の樹立と活性化メカニズムの解明

ヒトの肺胞マクロファージの細胞株化については、EPITHELIX 社より購入したヒト肺胞マクロファージ (Batch Number : M Φ 0889FAC) 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、およびヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の発現ベクター、TP53 と RB1 に対する siRNA ベクターの遺伝子導入を行なった (連携研究者: 産業医科大、和泉弘人博士)。

遺伝子導入後に株化の指標として、細胞の形態と増殖の程度を確認した。

細胞死と IL-1 α 放出のメカニズム解析については、細胞内に蓄積された IL-1 α の産生を可視化するために IL-1 α のプロモーター下に蛍光物質である mCherry を挿入した IL-1 α リポーターマウスを作製した。野生型マウスあるいはリポーターマウス由来の肺胞マクロファージを用いて、IL-1 α 産生のライブイメージング、細胞内 IL-1 α 染色の蛍光観察を行い、肺胞マクロファージの細胞内 IL-1 α の蓄積と放出のメカニズムの解析を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験については「カルタヘナ法」を遵守して研究を進めている。また動物を用いた実験については兵庫医科大学の動物実験規定を遵守し実験を進めている。

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)

B.2.1 酸化亜鉛ナノ粒子の h-CLAT 試験

基材そのものの亜鉛イオン溶出量を検出限界以下まで低減化した酸化亜鉛 (基材、MZN-B0) ナノマテリアルとその表面処理品 (MZN-B0HP) (いずれもテイカ株式会社より提供) 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。

B.2.2 各種 NM 分散液の調製と評価

シリカナノ粒子は Sicastar-red F (micromod), NM-201, NM-202 (以上 JRC) を用いた。分散液として市販されている Sicastar-red F は培養液を用いて所定濃度に希釈した。NM-201, NM-202 は 5 mg/mL の濃度になるように培養液に懸濁し、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 1 回処理した。酸化亜鉛ナノ粒子は MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP、MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出が抑制された MZN-B0HP (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。MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出を抑制した MZN-B0HP については超純水 (1000 μ g/mL) での流体力学的直径および ζ -potential を ELS-Z2 (大塚電子) により測定した。

B.2.2. イオン吸着シリカナノ粒子の調製との抗原提示細胞活性化能の評価

シリカナノ粒子 Sicastar-red F を所定濃度の硝酸亜鉛水溶液および塩化カルシウム水溶液にて 24 時間処理した後、超純水にて 3 回洗浄した。Sicastar-red F を再分散させ、B.2.3.の手法により THP-1 細胞の活性化能を評価した。Sicastar-red F への各イオンの吸着量は、処理後の溶液および洗液の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) により測定し、算出した。

B.2.3. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系の構築と NM の抗原提示細胞活性化能の評価

市販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内で気-液界面培養を行い、気管支上皮

モデルを構築した。気管支上皮モデルは、光学顕微鏡による繊毛運動の観察および経上皮電気抵抗 (TEER) 測定により評価した。THP-1 細胞懸濁液を分注した 24 ウェルプレートの各ウェルに、気管支上皮モデルを設置し、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、所定時間培養した。培養後、THP-1 細胞については B.2.3 の手法にて CD86 および CD54 の発現量および細胞生存率を測定した。気管支上皮モデルについては RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて cDNA を合成し、THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて、リアルタイム PCR により、各遺伝子の発現を解析した。

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

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。

B.3.2. ナノシリカ吸入曝露実験

被験物質：被験物質として、JRC (Joint Research Centre in Ispra, Italy) から寄付されたナノシリカ (SiO₂-NM202) を使用した。動物：C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウスを 10 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 12 週齢にて使用した。個体識別は耳パンチにより行った。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 ケージ当り 5 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±1℃、湿度 ; 55±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。

NM202 の吸入曝露は先行研究において独自に開発した装置 (Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済) を使用した。対照群は 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/m³ 高濃度群 30 mg/m³ と設定した。各群当たり 25 匹のマウスを使用し、肺沈着量測定用に 9 匹、病理組織用に 6 匹、免疫機能実験用に 10 匹を割り当てた。1 日 6 時間 (10 : 00~16 : 00)、5 日間の連続の全身ばく露吸入を行った。

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/m³) 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。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 6 倍希釈し測定した。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー（080050-155、φ55 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、φ55mm、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の流量でばく露時間の2時間を通して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 1.5 L/min × 120min=180 L から1 m³ 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤（XP26V、METTLER TOLEDO）を使用した。

エアロゾルの空気動力学的中位径測定 Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) は、MOUDI（Model 125 Nano MOUDI、KANOMAX Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors）を用いた。

肺、BALF、脾臓、顎下リンパ節のサンプリングのため、ばく露終了直後（Day0）、4週後及び8週後に定期解剖を行った。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、眼窩より採血を行い、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た。病理標本用の動物は、気道内に吸引された検体の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針（サーフローラッシュ 18G、テルモ）を気管に挿入しPBSを1 mL 注入・吸引採取する操作を2回繰り返し、BALを採取した。

（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。

（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）。

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）

Taquann 処理を施した NM202 曝露後4週および8週目で屠殺解析を実施した。BALF細胞、肺組織、頸部リンパ節、脾臓のサンプリングを行なった。

BALF細胞、頸部リンパ節細胞、脾細胞を用いて、各種表面抗原に対する抗体を用いてフローサイトメータ（Cytoflex, Coulter）による解析を行なった。用いた抗体は、FITC、PE、PE-Cy7、APC または APC-Cy7 標識 CD4、CD8、CD11b、CD11c、F4/80、CD192、CD206、抗体（BioLegend）である。

BALF細胞から 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'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTAGT-3', Marco; (f) 5'-GAAGACTTCTTGGGCAGCAC-3', (r) 5'-CTTCTTGGGCACTGGATCAT-3' Il1b; (f) 5'-ATGGCAACTGTTCTGAACTCAACT-3', (r) 5'-CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTT-3', Mcp1; (f) 5'-CTGGATCGGGAACCAAATGAG-3', (r) 5'-TGAGGTGGTTGTGGAAAAGG-3', Actb; (f)

5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', (r) 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'。

マウス細胞株 RAW246.7 を用いて、無血清培地 (Gibco) による培養条件にて Taquann 処理を施したナノシリカ (NM202) に対する反応を検討した。マクロファージの活性化も目的に Lipopolysaccharide (LPS: Sigma, 5 ng/mL) を用いた。細胞数、細胞径は自動測定装置 (Luna-II™) を使用した。また、細胞表面マーカーとして、CD192, CD54, CD86, MARCO, CD206, CD36, CD163, MHC class II に対する標識抗体を用いて、フローサイトメータにて解析を実施した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として国立医薬品食品衛生研究所および東京科学大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

B.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価 (渡辺)

THP-1 細胞を評価に利用した。NMs 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。NMs の影響評価の予備試験として、PMA で処置した THP-1 細胞に、RSVA2 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。

NMs の評価は、PMA で処置した THP-1

細胞に超音波破砕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。

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 (PMA 前処置なし) に CCL5 の誘導能を評価した。

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。

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. 二酸化ケイ素ナノマテリアル (SiO₂ NMs) の in silico による特性解析

今年度の本研究で実施するナノマテリアルの対象化合物は、3 種の二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NMs: NM-201, NM-202, NM-204) とした。これらの被験物質の一部の物理化学的性状 (物性) と情報収集源は、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) 等に加えて、新たな物性 (重金属不純物や表面活性) の追加試験結果や、当研究班内で実施した 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や、in vivo 吸入暴露試験については dossier と、当研究班内で実施した結果について収集・整理を行い、解析に資するデータの資料作成を実施することとした。

【物理化学的性状および有害性情報の調査対象情報源】

- OECD で公表されているナノマテリア

ル安全性評価プログラムで作成した評価文書 (dossier) Silicon dioxide. - Manufactured nanomaterial の Summary dossier

- ・ 関連する個別 dossier、ANNEX
- ・ 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
- ・ 本研究班で実施された *in vitro* h-CLAT 毒性試験結果

新しい物性項目として重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) と Specific surface area ratio (H₂O / N₂) は、現在測定中である。

B.6-2. 呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析

【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 非感作性物質として 11 化合物

R5 年度に収集した呼吸器感作性被検物質 33 化合物の正準 SMILES 構造に基づき、情報化学ならびに計算化学の観点から、物性値ならびに構造的特徴量の収集を行なった。

具体的な手順として、最初に化合物が水和物やイオン対を構成するものについては、そのままでは評価が困難であるため、溶媒に該当する文字列を SMILES から削除した。その後、RDKit ライブラリを用い、各化合物の 1 次元 (1D; 化学組成や SMILES 表記の官能基に基づく)、2 次元 (2D; 化学構造式に基づく)、3 次元 (3D; 立体座標に基づく) 構造を構築した。3D 構造については汎用分子力場 (UFF) を用いた構造最適化を実施し

た。これらの各次元の構造情報に基づき RDKit および Mordred、量子化学計算ライブラリである PySCF を用いて特性データを取得した。以上の処理はすべて Python 言語を用いて実施した。

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)

C.1.1 *In vitro* 呼吸器感作性試験法の開発

5 種類の非感作性物質を用いて、本共培養系で検討したところ、いずれも OX40L mRNA 発現増強値が、以前に算出したカットオフ値の 2.57 より低く、全て陰性であった。昨年度の結果の呼吸器感作性化学物質 9 種類とそれ以外の皮膚感作性化学物質 11 種類と今年度の非感作性化学物質 5 種類を合わせたグループで比較すると $P=0.0027$ となり、呼吸器と皮膚感作性化学物質の比較で得られた $P=0.0167$ に比べて、有意差が大きくなった。カットオフ値は、変わらず 2.57 であった。

ここまでの結果で論文作成を行い、投稿した。他施設での再現性の検討も、まず全ての細胞や培養機器、試薬を、全て独自に入手して貰い、プロトコルだけ教えて再現性を検討した。その結果、代表的な皮膚と呼吸器感作性化学物質を、それぞれ 2 個と 4 個用いて、我々の結果と同様に、OX40L (TNFSF4) 発現増強のカットオフ値 2.57 で両者を識別することが再現された。現在、さらに、現在、その感作性化学物質の数を増やして検討して貰っている。細かいプロトコルの修正も同時に行っている。

OX40L 以外で Th2 反応に関与するサイトカイン Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) や IL-25、IL-33 の受容体サブユニット分子 CRLF2 や IL-7R α 、IL-17RB、ST2

の発現を、同様に RT-qPCR で測定し比較したが、昨年度の結果と同様に皮膚と呼吸器感作性化学物質の間で大きな差は見られなかった

C.1.2 ヒト肺胞マクロファージ株の樹立と活性化メカニズムの解明

細胞死と IL-1 α 放出のメカニズム解析については、マウス肺胞マクロファージを *in vitro* にてアルミニウム塩（水酸化アルミニウム）の微粒子で刺激し、細胞死と IL-1 α 放出をライブセルイメージングにより解析したところ、細胞死に伴って IL-1 α を放出する細胞は全体の 10%以下であった。そこで、肺胞マクロファージ内に蓄積された IL-1 α を可視化する目的で IL-1 α のプロモーター下に蛍光物質である mCherry を挿入した IL-1 α リポーターマウスを作製した。このマウスから肺胞マクロファージを回収し、mCherry の蛍光を観察したところ、IL-1 α の放出と同様に約 10%のマクロファージが mCherry を強く発現していた。これらの細胞が微粒子に反応し、IL-1 α を放出する肺胞マクロファージサブセットであると考え、現在この mCherry 陽性細胞の解析を進めている。

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 は MZN-B0 で 36.6 μ g/mL、MZN-B0HP で 36.5 μ g/mL と算出された。そこでいずれも本試験において、100 μ g/mL を最高用量とし、公比で希釈した計 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。試験の結果、MZN-B0 に

ついては、3 回の本試験のいずれにおいても、CD86 ではすべての用量で RFI が 150 を下回ったが、CD54 では RFI が 200 以上となる用量がみられた。MZN-B0HP については、1 回目及び 3 回目の本試験においては、CD86 ではすべての用量で RFI が 150 を下回ったが、CD54 では RFI が 200 以上となる用量がみられた。また、2 回目の本試験においては、CD86 及び CD54 のいずれにおいても、RFI がそれぞれ 150 及び 200 以上となる用量がみられた。したがって、本試験条件下では、MZN-B0 及び MZN-B0HP のいずれも、*in vitro* で抗原提示細胞を活性化することが示された。THP-1 細胞活性化の指標である EC200（CD54 の発現亢進が 2 倍以上となる濃度。値が低いほど強い活性化能を有するとされている）は MZN-B0 が 9.37 μ g/mL であり、MZN-B0HP が 10.4 μ g/mL であった。これらの値はこれまでに評価した酸化亜鉛 NM とほぼ同程度であった。

C.2.2 各種 NM 分散液の評価

MZN-B0 およびその亜鉛イオン溶出を抑制した MZN-B0HP の超純水中での流体力学的直径および ζ -potential は、それぞれ 483.8 $\pm$ 26.68 nm、707.4 $\pm$ 49.14 nm、-26.52 $\pm$ 1.09 mV、-46.45 $\pm$ 3.80 mV であった。

C.2.2. イオン吸着シリカナノ粒子の調製との抗原提示細胞活性化能の評価

あらかじめ亜鉛イオンおよびカルシウムイオンを吸着させた Sicastar-red F を調製し、THP-1 細胞の活性化能の評価を行なった。亜鉛イオンをあらかじめ吸着させた場合、処理した亜鉛イオン溶液の濃度依存的に CD54 の発現が増加した。カルシウムイオンをあらかじめ吸着させた場合は、今回設定した条件で最も高濃度の 250 mg/ml においてのみ CD54 発現の増加がみられた。

C.2.3. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の

共培養系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

作製した気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系を用い、NM の抗原提示細胞活性化能を評価した。まず、シリカナノ粒子 Sicastar-red F を用いて、曝露時間の検討を行なった。気管支上皮モデル上部よりシリカナノ粒子 Sicastar-red F 分散液を曝露し、24, 48, 72 時間後に THP-1 細胞の活性化能を評価した。72 時間後において、Sicastar-red F 曝露により CD54 の発現が亢進する傾向がみられた。一方、72 時間曝露での粒子間の比較では、NM-201, NM202 の曝露は CD54 の発現を亢進しなかった。気管支モデルの遺伝子発現解析において、モデル上部からの Sicastar-red F 分散液曝露により CXCL-3, CCL-20 遺伝子の発現亢進傾向がみられた。下部からの曝露では、CXCL-3, CCL-20 に加えて CXCL-1, CXCL-2 遺伝子の発現亢進傾向もみられた。

また、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 の評価を行なった。24 時間後において CD86 および CD54 の発現亢進はみられなかった。72 時間後では、MZ-500 およびそのシリカ被覆体である MZ-500HP いずれにおいても細胞生存率の大幅な低下が見られ、CD86 および CD54 の発現量を定量することはできなかった。一方、MZ-500 および MZ-500HP の流体力学的直径より小さなポアを有するセルカルチャーインサートを用いた場合は、72 時間においても細胞生存率の大幅な低下は見られなかった。気管支モデルの遺伝子発現解析において、モデル上部からの MZ-500 および MZ-500HP 分散液の曝露により IL-6, CXCL-3, CXCL-12, CCL-22 など各遺伝子の発現亢進傾向がみられた。

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

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。

C.3.2. ナノシリカ吸入曝露実験

NM202 の 5 日間反復全身ばく露吸入実験における平均質量濃度は、低濃度群； $6.9 \pm 0.4 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群； $25.1 \pm 6.4 \text{ mg/m}^3$ （平均値 $\pm$ SD）であった。各濃度 2 回の測定を行った MMAD は低濃度群； 562 nm （ σ_g ：2.7～2.9）、高濃度群； 709 nm （ σ_g ：2.4～2.5）であった。

6 時間の吸入ばく露実験において使用した総検体量は、低濃度群、高濃度群でそれぞれ 1,769 mg、5,280 mg であった。6 時間の曝露チャンバーの総換気量は 11.7 m^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 mg/m^3 、 451.3 mg/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 4.7%、5.4%であった。

実験に供したマウスは定期解剖までの間、いずれも体重推移に異常は認められなかった。ばく露終了直後（Day0）、4 および 8 週

後に定期解剖を行って試料を採取した。ばく露終了直後の肺重量は、対照群 118.8 ± 0.8 mg、低濃度群 129.0 ± 12.9 mg、高濃度群 139.1 ± 3.1 mg であり、高濃度群では対照群に比較して有意に増加した。ばく露終了後 4 週では、対照群 115.8 ± 3.5 mg、低濃度群 122.4 ± 4.1 mg、高濃度群 124.0 ± 1.8 mg、ばく露終了後 8 週では、対照群 123.7 ± 3.0 mg、低濃度群 128.2 ± 4.9 mg、高濃度群 127.2 ± 2.6 mg であり、対照群と NM202 ばく露群の間で有意差は認められなかった。

採取した組織（肺、BALF、リンパ節、脾臓）は、病理組織学的評価および免疫機能評価の分担研究者に提供した。

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）

対照群、低濃度（ 15 mg/m^3 ）暴露群、高濃度（ 30 mg/m^3 ）暴露群の 4 週後の BALF の変化として、暴露によって BALF 中の肺胞マクロファージ（F4/80⁺CD11c⁺）の割合ならびに細胞数は減少しているものの有意な差は認められなかった。8 週後の肺胞マクロファージの変化でも、低濃度暴露群で割合、細胞数ともに増加していたが、有意な差ではなかった。NM202 暴露による肺胞マクロファージの M1/M2 への分化パターンの変化をフローサイトメータで検討すると、低濃度および高濃度暴露によって対照群と比較して有意な変化は観察されなかった。脾臓、頸部リンパ節における NM202 吸入暴露によるマクロファージ分画の変化は認められず、M1/M2 への分化についても NM202 暴露による影響は確認できなかった。一方で、脾臓、頸部リンパ節における T 細胞分画（CD4/CD8）については、NM202 暴露による割合、細胞数に有意な変化は認められなかった。さらに、脾臓、

頸部リンパ節における T 細胞の活性化状態（Effector/Naive）を CD44 ならびに CD62L を指標にすると（Effector: CD44^{high}CD62L⁻, Naive: CD44^{low}CD62L⁺）、脾臓において NM202 暴露後 6 週にて Naive CD4⁺T 細胞の割合が有意に増加していることが判明した。頸部リンパ節の CD4⁺T 細胞、脾臓および頸部リンパ節での CD8⁺T 細胞に関しては NM202 暴露によって変化は確認できなかった。

NM202 吸入暴露マウスの一部の肺組織の組織学的検討を行うと、暴露後 4 週において胸膜側の一部に肺胞構造が不明瞭な部分が認められ、肺胞マクロファージの軽度の集簇像が確認された。暴露後 8 週においても、さらに肺胞腔の不明瞭な領域が広がっており、腔内に肺胞マクロファージの集簇が確認された。

NM202 暴露後 8 週での BALF 細胞を用いて、*Il1b*、*Mcp1*、*Mmp12*、*Marco* mRNA 発現を qRT-PCR にて定量化すると、*Il1b* mRNA はいずれの群も検出限界以下であった。*Mcp1*、*Mmp12*、*Marco* mRNA ともに対照群に比較して有意な変化は見られなかったが、*Marco* mRNA に関しては濃度依存的に発現の上昇が認められた。

マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用いて、*in vitro* での NM202 に対する反応性を検討した。LPS (5 ng/mL) の刺激の有無の条件で、NM202 (250 ng/mL) の添加した時の 48 時間の培養後の形態的变化を確認すると、LPS 刺激下での NM202 添加によって、細胞の大きさが増大することが明らかになった。LPS 刺激によって M1 型のマクロファージに分化することが知られており、NM202 添加による各種マクロファージ表面マーカーの変化をフローサイトメータにて検討した。検討した

8 種類のマクロファージマーカーのうち、MARCO に関して、LPS 非添加ならびに添加状態の両方で NM202 の暴露によって MARCO の表面発現が有意に上昇した。また、IL-13 によって M2 型マクロファージに分化することが知られていることから、recombinant IL-13 (50 ng/mL) を添加した上で、NM203 を暴露によって、8 種のマクロファージマーカーの表面発現に変動は認められなかった。さらに、NM202 の濃度変化による MARCO の表面発現の変動を確認すると、2,000 ng/mL まで MARCO の発現が上昇していた。加えて、LPS 添加時においても 2,000 ng/mL まで MARCO の発現が上昇していた。NM202 の暴露による Marco mRNA 発現を含め、マクロファージ関連遺伝子 mRNA 発現 (*Il1b*, *Mcp1*, *Mmp12*, *Marco*) を q-RT-PCR にて検討すると、いずれの遺伝子も LPS 刺激で発現が上昇し、NM202 (500 ng/mL) の暴露でいずれの遺伝子発現も上昇傾向にあるが、*Marco* mRNA に関しては 15 倍以上の増加が見られた。

C.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価 (渡辺)

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。

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. 二酸化ケイ素ナノマテリアル (SiO₂ NMs) の *in silico* による特性解析

予試験的に実施した SiO₂ NMs (NM-200~NM-204) の物性情報と *in vitro* 試験の h-CLAT 試験法毒性結果のデータとの関連性については、直交部分的最小二乗回帰分析

(OPLS : Orthogonal Partial Least Squares Regression) を用いて解析した。

解析結果では、毒性の高い化合物に寄与するいくつかの変数 (物性) の組み合わせが示唆された。

- ✓ コーティングなし
- ✓ 凝集体/凝集体の形態(nm) : 角張った球形度の低い形
- ✓ 等電点(平均) : pH(2-4)、
- ✓ アスペクト比
- ✓ 比表面積(m²/g)

また、新しい物性項目として重金属の不純物 (As, Cd, Pb, Hg) と Specific surface area ratio (H₂O / N₂) を実施した。

一方、*in vivo* 試験による吸入暴露試験の有害性情報に関しては、今後、HESS (ラットを対象とした化学物質の反復投与毒性試

験データ及び毒性にかかわる作用機序情報などを集積した毒性知識情報データベース)に搭載できるように、規格化されたシートをひな形として用い、情報収集した SiO₂ NPs のデータコンテンツに特化した項目を追加することで、新たな規格データシートを作成した。

C.6-2. 呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析

本年度は量子化学に基づく、下記分子特性データを取得した。

- 3D (量子化学計算) : 反応性軌道エネルギー (HOMO/LUMO) およびエネルギーギャップ、双極子モーメント

ただし、今回は真空中での HF/6-31G*レベルのテスト計算の実施にとどまったことから、今後、電子相関や溶媒効果の考慮、量子化学的な構造最適化、基底関数の改良など、精密化を行う必要がある。また、吸着性に関わる分極率の見積もりのため励起状態計算を実施する予定である。

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)

D.1.1 *In vitro* 呼吸器感作性試験法の開発

今回の他施設への技術移転性の検討は、BEAS-2 や CD14-ML を独自に入手して貰い、試薬や測定機器も独自にいつも使用している物を使用して貰った。qPCR も我々は、Takara Bio 社の SYBR Green の qPCR 試薬とプライマー、PCR 装置を用い、他施設では、Thermo Fisher Scientific 社の TaqMan プローブの試薬とプライマー、PCR 装置を用いて行った。つまり、qPCR のやり方や検出方法、プライマー配列も異なるにも関わ

らず、同様な結果が得られたのは、再現性が高いこと示している。ただ、他施設の結果の方が、全体的に値が大きくなっており、今後、カットオフ値が異なってくる可能性はある。現在、さらにもう 1 施設への技術移転も既に進めている。今後、化学物質の数を増やし、施設内および施設間の再現性の検討を行いながら、最適なプロトコルの作成とカットオフ値の設定などを行い、OECD のテストガイドライン化を目指していく。

D.1.2 ヒト肺胞マクロファージ株の樹立と活性化メカニズムの解明

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。さらにヒトへの外挿性を考えた場合、ヒトの細胞株を樹立することが重要であると考え、ヒト肺胞マクロファージの細胞株の作製を試みた。種々の遺伝子導入を行った結果、不死化までは可能であったが、十分な増殖スピードを持った細胞株を得ることができなかった。今後は、iPS 細胞からヒト肺胞マクロファージを誘導するプロジェクトの方に引き継ぐことになった。

細胞株のプロジェクトと並行して、微粒子による炎症誘導のメカニズムの解析を進めている。これまでの研究成果から、炎症を引き起こす微粒子を貪食した肺胞マクロファージは細胞死を引き起こすとともに、細胞内に蓄積した IL-1 α を放出し、炎症を誘導することを見出してきた。しかしながらライブイメージングを用いた解析により、細胞死によって IL-1 α を放出する肺胞マクロファージの割合は 10%以下であり、ほとんどの細胞が IL-1 α を放出しない細胞死であった。これらの結果は、微

粒子によって肺の炎症を引き起こしている肺胞マクロファージは全体のごく一部であり、それらの細胞を用いた微粒子の安全性の評価が必要であると考えられる。

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
これまでの種々の酸化亜鉛 NM の h-CLAT 法による評価から、亜鉛イオンの溶出が酸化亜鉛ナノマテリアルによる THP-1 細胞活性化の原因ではないかと考察してきた。今回評価した 2 品の酸化亜鉛 NM は、イオン交換水において検出限界未満のイオン溶出しか認められなかったことから、THP-1 細胞活性化が見られなかった場合は本仮説を裏付けるものと考えられた。しかし結果は、従来の他の酸化亜鉛 NM とほぼ同様の濃度で同程度の CD54 の発現亢進が認められた。今後は今回検討した 2 品について、培地中における亜鉛イオンの溶出濃度を測定する予定である。それにより実際に THP-1 細胞に適用される条件におけるイオン溶出濃度が評価可能となると考えられる。さらに、固体としての酸化亜鉛 NM が THP-1 細胞に貪食されてライソソーム内に入り、酸性状態でイオンが放出される可能性があるため、酸性条件下(pH4.5)における亜鉛イオンの溶出濃度の測定を行う予定である。こうした追加実験により、酸化亜鉛 NM による抗原提示細胞活性化のメカニズムの解明につながるものと期待される。

D.2.2. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系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

亜鉛イオンを吸着させた Sicastar-red F において、CD54 の発現が増加した。我々はこれまでに亜鉛イオン曝露が THP-1 細胞の

CD54 発現を亢進することを見出しており、シリカナノ粒子表面に主に静電相互作用により吸着した亜鉛イオンがシリカナノ粒子とともに THP-1 細胞に取り込まれ、後期エンドソーム～リソソームにおける pH の低下により粒子表面より脱離し、THP-1 細胞を活性化したと考えられる。シリカナノ粒子による THP-1 細胞の活性化は、シリカナノ粒子自体の持つ活性化能に加え、その高い物質吸着性による吸着物質によっても引き起こされている可能性が示唆された。今後、細胞内の環境を模倣した溶液中でのシリカナノ粒子からのイオンの乖離挙動の評価を進める。

D.2.3. 気管支上皮モデルと抗原提示細胞の共培養系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

シリカナノ粒子 Sicastar-red F を用いた曝露時間の検討により、72 時間が適している可能性が示された。これまで、気管支モデル-THP-1 細胞共培養系における曝露時間は THP-1 細胞に直接 NM を作用させる際と同じ 24 時間としていたが、NM の気管支上皮モデルへの取り込み、透過を考慮すると、より長い曝露時間が必要であったと考えられる。興味深いことに、シリカナノ粒子の種類により気管支上皮モデル下部の THP-1 細胞の活性化が異なっていた。気管支モデルの透過挙動や曝露された気管支モデルの分泌するサイトカインの種類や量が異なっている可能性が考えられる。気管支モデルの遺伝子発現解析やサイトカインアッセイにより共培養系での THP-1 細胞の活性化メカニズムの解析を引き続き行う。

酸化亜鉛ナノ粒子においては、24 時間後において CD86 および CD54 の発現亢進はみられず、72 時間後では細胞生存率の大幅な低下がみられた。シリカナノ粒子で得ら

れた知見と同様に、共培養系への NM の曝露では 24 時間の曝露時間は不十分であることが示唆された。酸化亜鉛ナノ粒子の流体力学的直径より小さな 0.4 μm ポアを有するセルカルチャーインサートを用いた場合には細胞生存率の大幅な低下は見られなかったことから、72 時間後における細胞生存率の大幅な低下は亜鉛イオンによる作用ではなく、気管支上皮モデルを透過した酸化亜鉛粒子による作用であることが考えられた。単培養 THP-1 細胞を用いた評価においても、酸化亜鉛ナノ粒子は狭い濃度域において CD54 の発現亢進および細胞生存率の低下がみられており、共培養系を用いた THP-1 細胞活性化能の評価においても試験濃度をいかに設定するかが重要であることが示唆された。

D.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発（高橋、石丸、渡辺）

D.3.1. ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験 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。

D.3.2. ナノシリカ吸入曝露実験

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、エアロゾル化効率は、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 4.7~5.4%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。

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。しかし、高いスコアの組織での炎症性病変の相違は認められず、ケモカイン誘導との関連は不明であった。一方、CCL3 および CCL5 の誘導に関しては、それぞれ NM-202> -204 >> -201 および NM-204> -202>>-201 という影響が確認された。そこで、NM の影響を質的に差別化する目的で、抗 CCL3、CCL5 および MUC5B 抗体を用いた免疫組織染色による検討を開始している。

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）

NM202 の全身吸入暴露後 4 週および 8 週での BALF 細胞中の肺胞マクロファージに関して、細胞数、表現型ともに対照群と比較して有意な変化は認められなかった。

頸部リンパ節、脾臓においてもマクロファージ分画に NM202 暴露による変化は観察されなかった。脾臓において、NM202 暴露によって、CD4⁺T 細胞の Naïve 型へシフトが観察されたが、ナノシリカの免疫系への影響は不明な点が多く、何らかの T 細胞活性化機構に影響を及ぼしていた可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

病理組織学的な変化に関しては、各群一部の組織の解析で NM202 暴露で肺泡マクロファージの軽度の集簇領域が確認され、フローサイトメータの結果と乖離が見られる。暴露後 4 週、8 週での採取可能な BALF 中での肺泡マクロファージの動態と実際の組織中での肺泡マクロファージの変化に乖離がある可能性が考えられた。

MWCNT の全身吸入暴露で見られた BALF 細胞数の変化、M1 型への肺泡マクロファージ分画の変化や組織学的な変化とは異なり、NM202 暴露による変化は軽度である可能性があり、ナノマテリアルの形状、性状によって肺泡マクロファージの反応は大きく異なっているものと考えられる。MWCNT の暴露では肺泡マクロファージから産生される MMP12 が重要な役割を果たしていたが、NM202 暴露での BALF 細胞の *Mmp12* mRNA 発現に変化は認められなかった。以前から、ナノシリカを含めナノマテリアルの取り込みに関係している Scavenger receptor の一つである MARCO (*Front Immunol* 9:103, 2018) の mRNA 発現が濃度依存的に増加していたことから、MARCO 分子を介したナノシリカに対するマクロファージの反応が存在しているものとする。

RAW264.7 細胞を用いた実験では、細胞の大きさの変化で判断すると、NM202 を添加しただけでは RAW264.7 細胞による食

作用は明らかではなく、LPS の刺激によって食食作用が亢進したものと考えられる。今回の培養系では、出来るだけ直接の NM202 の反応を観察するために、無血清培地を用いた。既報では M2 型マクロファージがナノシリカの食食作用が亢進することが知られていたが (*Front Pharmacol* 6:55, 2015)、今回の実験系では LPS の刺激で M1 型に誘導した場合に、MARCO の発現に変化が認められ、IL-13 による M2 型誘導マクロファージでは NM202 暴露による各種マーカーの発現に変化は認められなかった。LPS は TLR4 シグナルの活性化に重要であることから、マクロファージのナノシリカに対する反応性には TLR と Scavenger receptor の相互作用が重要である可能性が示された。

RAW264.7 細胞の Marco mRNA 発現に関しては、LPS 刺激細胞に 500 ng/mL の NM202 を添加すると 35 倍程度の Marco mRNA 発現が上昇したが、2,000 ng/mL ではそれ以上の発現上昇はなかったことから、より低濃度の反応性を再検討する必要がある。また、培養時間、LPS 以外の mitogen 刺激に関しても今後の検討課題である。

D.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価 (渡辺)

PMA 処置 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明確ではなかった。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。

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)

先行研究で実施された SiO₂ NMs (NM-201, NM-202, NM-204)を用いた *in vitro* h-CLAT 試験結果は、すべて陽性であり、陽性判定のランキングは、NM-201<NM-202<NM-204 であった。

NM-204 は EC200 の活性化能が高く、毒性が強かったことは、一次粒子径や二時粒子径が最も小さい値であることが影響していると考えられ、その他の物性項目についても候補として挙げた。昨年度に実施した 6 種の MWCNTs (NM-400~403, NT-7(ND), NT-7(N)) を用いた、物性データ結果と毒性試験結果 (EC200) との関連性の解析では、毒性が強い被験物質の物性項目として細胞への吸着能を示す Specific surface area ratio (H₂O/N₂) の影響が大きいことが示唆された。従って、今年度の SiO₂ NMs の研究で、新たな物性項目の一つとして加えることとした。さらに、重金属 (As, Cd, Pb, Hg) は、不純物として被験物質に含まれると、細胞や臓器へのダメージが強化され、急性毒性や慢性毒性、発がん性、環境への影響が生じる可能性がある。従って、化学物質における重金属の存在を評価し、適切に管理することが重要であることから、これらの純金属の不純物についても、新たな物性項目の一つとして加えることとした。

化学構造からの有害性予測においては、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ことが知られている。例えば、RDKit や PaDEL-descriptor といったツールは、化学構造の記述子 (descriptor) を計算するために用いられ、これらの記述子は機械学習モデルの入力として利用することができる。従って、これらのツール

を活用することにより、化学物質の毒性を予測する際に有用であると考えられる。

また、量子化学計算を利用した毒性予測においては、PySCF のような量子化学計算プログラムを使用することで、化学物質の電子状態に関する詳細な計算が可能となる。これにより、HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) および LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) のエネルギーや、分子の電荷分布などの情報が得られる。これらの情報は、化学物質の反応性や安定性を理解するための重要な手がかりとなり、さらにその情報が毒性予測においても有益であることが示唆される。

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)

F.1.1 In vitro 呼吸器感作性試験法の開発

本 DC 共培養系 (DCsens) は、昨年度の皮膚と呼吸器感作性化学物質、合計 20 種類に加え、非感作性化学物質 5 種類を用いて、呼吸器感作性と非呼吸器感作性の識別がより精度良く可能であった。さらに、他施設への技術移転性と再現性も高いことが示された。今後、もう 1 施設への技術移転を行い、合計 3 施設での施設内および施設間の再現性の検討を行い、最適なプロトコルを確立してゆく。

F.1.2 ヒト肺胞マクロファージ株の樹立と活性化メカニズムの解明

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が、十分な増殖スピードを有する細胞は得られなかった。

また、微粒子に応答し肺の炎症を引き起こす IL-1 α を放出する肺胞マクロファージは全体のごく一部であり、このような細胞集団を用いた微粒子の安全性評価の開発が重要であると考えられた。

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）

検出限界未満のイオン溶出しか認められなかった 2 種の酸化亜鉛 NM を用いて h-CLAT 法による評価を行ったところ、どちらも従来の亜鉛イオン溶出が認められる酸化亜鉛 NM と同様に THP-1 細胞を活性化しており、酸化亜鉛 NM による抗原提示細胞活性化メカニズムの解明には、細胞の生理的条件下での亜鉛イオン溶出の評価が重要と考えられた。

シリカナノ粒子による THP-1 細胞の活性化はシリカナノ粒子自体に加え、表面に吸着するイオンも関与している可能性が示唆された。NM による抗原提示細胞活性化の評価法の確立、その活性化メカニズムの解明のいずれにおいても表面吸着分子を考慮することが重要である。

気管支モデル-THP-1 細胞共培養系を用いた評価においては、曝露時間の検討を行い、その他のシリカナノ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子を対象とした評価を行った。曝露する NM により下部の THP-1 細胞の活性化挙動や気管支上皮モデルにおいて変化するサイトカイン遺伝子が異なっており、NM による抗原提示細胞活性化能を評価できる可能性が示された。

F.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発（高橋、石丸、渡辺）

NM202 の高分散乾燥検体を持ちいて、マウスに 1 日時 6 時間、5 日間連続全身ばく

露吸入を実施した。その結果、低濃度群； $6.9 \pm 0.4 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群； $25.1 \pm 6.4 \text{ mg/m}^3$ を達成した。MMAD は低濃度群、高濃度群ともに $3 \mu\text{m}$ 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。肺重量に関して、5 日間ばく露終了直後の肺とばく露 4 週間後の高濃度群で有意な増加がみられたが、8 週間では変化はみとめられなかった。

なお、本分担研究では気道感作物質の in vivo 評価方法の開発も実施する計画である。R5 年度には、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が、ミスト化に使用する圧縮空気に含まれる水蒸気の影響を除くことが難しく、また、実験環境への汚染防止策も現状では十分な対策ができないため気管内投与法の検討を行った。R6 年度は、陽性対象物質となる TDI 及び TMA の気管内投与に使用する検体の調製方法について検討を行った。TDI 及び TMA は水を含むと容易に加水分解される。そのため、種々の油性溶媒を検討した結果、アミノオイルを用いメノウ乳鉢にて分散させることで良好な調整検体を得ることが可能となった。

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。

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）

In vivo および in vitro での NM202 を用いた実験から、ナノシリカの肺における免疫毒性の評価に MARCO 分子を介した反応性の解析が重要である可能性が示された。

形状および性状の異なるナノマテリアルの免疫毒性の評価にはマクロファージを中心とした免疫病理的な手法が有効であることが示された。

F.5. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価（渡辺）

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

化学物質の安全性評価において、物性データと毒性データの関連性解析は重要な役割を果たす。これらのデータ間には相関関係が見られることが多く、統合的な解析によって新たな毒性予測手法の開発が期待される。具体的には、既存の物性データに加え、実験的および計算化学的に得られる物性項目を拡充し、毒性指標との相関性を検証することで、予測精度向上を目指す。さらに、オープンソースライブラリーや機械学習等の情報科学的手法を活用し、1D、2D、3D 構造記述子を含む多様な物性項目を用いた予測モデルを構築することで、より高度な毒性予測を実現する。

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Shikama Y, Otsuka K, Furukawa M, Ishimaru N, Matsushita K. Involvement of metformin and aging in salivary expression of ACE2 and TMPRSS2. *BioFactor* 2025 ;51(1):e2154. doi:10.1002/biof.2154.
2. Ushio A, Ishimaru N. Molecular Pathogenesis via Sex Hormone in Sjögren's Syndrome. *J Stomatol Soc Jpn.* 92(1):1-6, 2025. doi.org/10.5357/koubyou.92.1_1
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*, 2025; 45(3); 432-439. <https://doi.org/10.1002/jat.4712>
4. 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):1-5.
5. Tsunematsu T, Mouri Y, Shao W, Arakaki R, Ruppert JG, Murano K, Ishimaru N, Guardavaccaro D, Pagano M, Kudo Y. Sustained chromosomal passenger complex activity preserves the pluripotency of human embryonic carcinoma cells. *Sci Signal.* 2024; 18:eadg4626. doi: 10.1126/scisignal.adg4626.
6. 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;Jul 1:6: 1293147. <https://doi.org/10.3389/ftox.2024.1293147>.
7. 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.
8. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaïoun 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.
 9. Taquahashi Y, Aisaki K (Co-first author), Morita K, Suga K, Kitajima S, Application of the Matrix Profile Algorithm for Detecting Abnormalities in Rat Electrocardiograms, *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024;11(6): 289-296.
 10. Kuwagata M, Doi Y, Saito H, Tsurumoto M, Igarashi T, Nishimura T, Taquahashi Y, Hirabayashi Y, Kitajima S: A 90-day repeated oral dose toxicity study of p-cymene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(4): 169-181. doi.org/10.2131/fts.11.169
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Ushio A, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N. Therapeutic Strategy Based on the Pathogenesis for Sjögren's Syndrome. *J Oral Health Biosci.* 2024;37(1):1-5.
 15. Nakamura K, Tsukasaki M, Tsunematsu T, Yan M, Ando Y, Huynh NCN, Hashimoto K, Gou Q, Muro R, Itabashi A, Iguchi T, Okamoto K, Nakamura T, Nakano K, Okamura T, Ueno T, Ito K, Ishimaru N, Hoshi K, Takayanagi H. The periosteum provides a stromal defence against cancer invasion into the bone. *Nature* 2024;1634(8033):474-481.
 16. Kobayashi D, Denda M, Hayashi J, Hidaka K, Hohmura Y, Tsunematsu T, Nishino K, Yoshikawa H, Ohkawachi K, Nigorikawa K, Yoshimura T, Ishimaru N, Nomura W, Katagiri T, Kosako H, Otaka A. Sulfoxide-Mediated Cys-Trp-Selective Bioconjugation that Enables Protein Labeling and Peptide Heterodimerization. *Chem Eur.* 2024;2(3-4); e202400014.
 17. Yamada A, Watanabe A, Nara A, Ishimaru N, Maeda K, Ido Y, Kotake K, Asano M, Shinohara Y, Yamamoto T. Longitudinal Analysis of Mitochondrial Function in a Choline-Deficient L-Amino Acid-Defined High-Fat Diet-

- Induced Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis Mouse Model. *Int J Mol Sci.* 2024;25:6193.
18. Aota K, Kani K, Ono S, Naniwa K, Momota Y, Fukui M, Ishimaru N, Azuma M. Activation of Janus kinase 2 contributes to the autoimmune pathology in the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Oral Sci Int.* 2024;21(3):415-424.
 19. Ushio A, Matsuda-Lennikov M, Kalle-Youngoue F, Shimizu A, Abdelmaksoud A, Kelly MC, Ishimaru N, Takahama Y. Functionally diverse thymic medullary epithelial cells interplay to direct central tolerance. *Cell Rep.* 2024;43:114072.
 20. 大塚邦紘, 石丸直澄: Sjögren 症候群の病理 皮膚病診療 2024;46(9):788-79.
- G.2. 学会発表
1. 黒田悦史: 微粒子の化学的特性と肺胞マクロファージの活性化～炎症を引き起こす微粒子と引き起こさない微粒子. 第 32 回日本臨床環境医学会学術集会 (2024.6.9)
 2. 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)
 3. 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)
 4. 黒田悦史: 微粒子の化学的特性と肺胞マクロファージの活性化～炎症を引き起こす微粒子と引き起こさない微粒子. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.3)
 5. 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)
 6. Taquahashi Y, Aisaki K, Morita K, Kousuke Suga K, Tsuji M, Kitajima S, Application of Matrix Profile Algorithm for Detecting Abnormalities in Waveform Data with Repetitive Patterns to Electrocardiograms, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.4)
 7. 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: 機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)
 8. 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)
 9. 黒田悦史: 肺胞マクロファージ細胞株を用いた炎症性微粒子評価法の開発および微粒子の化学的特性の解析. 2024 年度日化協 LRI 研究報告会 (2024.8.23)
 10. Hinata Inoue, Takumi Adachi, Etsushi Kuroda: The novel evaluation approach

- for the immunotoxicity of environmental particulate matters using a newly developed macrophage line. 第31回日本免疫毒性学会学術年会 (2024.9.19)
11. 善本隆之、片平泰弘、長谷川英哲、溝口出：呼吸器感作性評価法の開発、特別講演、第31回日本免疫毒性学会学術年会 (2024.9.19)
 12. 溝口出、片平泰弘、長谷川英哲、善本隆之：呼吸器と皮膚感作性物質の識別を目指した2ステップDC/T細胞共培養系の開発、第31回日本免疫毒性学会学術年会 (2024.9.19)
 13. Inoue H, Adachi T, Kuroda E : The novel evaluation approach for the immunotoxicity of environmental particulate matters using a newly developed macrophage line. 第31回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.19)
 14. 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)
 15. 大野彰子：食品分野に含まれるナノ粒子の健康影響、科学的根拠に基づく健康寿命を伸ばす会 第30回講演会 (2024.10.9)
 16. 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)
 17. 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® 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)
 18. 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)
 19. 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)
 20. 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)
 21. 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)
 22. 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)
 23. 溝口出, 片平泰弘, 長谷川英哲, 園田寿樹心, 山岸美宇, 堀尾恵里, 山口夏輝, 井上慎也, 宮川聡美, 曲寧, 善本隆之: 3次元共培養系におけるヒト単球

- 由来細胞株 CD14-ML 由来未成熟 DC での TNFSF4 (OX40L)発現を指標にした in vitro 呼吸器感作性試験法の開発、第 37 回日本動物実験代替法学会 (2024.11.30)
24. 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)
25. Matsuzawa S, Ushio A, Nagao R, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N. A crucial role of autophagy in neonatal thymus in autoimmunity. 第 53 回日本免疫学会総会学集会 (2024.12.3)
26. Nagao R, Yamamoto A, Ushio A, Otsuka K, Matsuzawa S, Tsunematsu T, Ishimaru N. Analysis of regulatory mechanism for T cell activation via Trat1 in Sjögren's syndrome. 第 53 回日本免疫学会総会学集会 (2024.12.5)
27. Otsuka K, Kondo H, Tsukumo S, Ishimaru N, Yasutomo K. Salivary gland fibroblasts drive autoimmune pathology via the interaction with CD4⁺ T cells in Sjögren's syndrome. 第 53 回日本免疫学会総会学集会 (2024.12.5)
28. 石ヶ守里加子, 今井正彦, 大野彰子, 戸塚ゆ加里：マウス肝臓オルガノイドを用いたアドバンスドマテリアルの毒性評価，日本環境変異原ゲノム学会 第 53 回大会 (2024.12.7)
29. Yoshimoto T, Katahira Y, Hasegawa H, Qu N, Yamaguchi N, Horio E, Ashikaga S, Mizoguchi I. Prediction of the Respiratory Sensitizing Potential of Chemicals Using DC Coculture and DC/T Cell Coculture Systems. SOT 64th Annual Meeting (2025.3.16-21)
30. Ohno A, Okiyama Y, Yamashiro M, Iijima K, Hirose A, Ashikaga T: Usefulness of Evaluation System for Activation Potential of Various Nanoparticles Using Monocytic Cell Line THP-1 and Prediction of Toxicity、SOT 64th Annual Meeting (2025.3.18)
31. 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)

H. 知的所有権の取得状況

(予定を含む)

1. 特許取得

発明の名称：被験物質の呼吸器感作性検出方法、感作抑制物質のスクリーニング方法、および生体投与用組成物の製造方法

発明者：善本隆之、溝口 出

出願人：学校法人 東京医科大学

出願日：2025 年 3 月 6 日

出願番号：特願 2025-035075

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし