

In vivo 吸入曝露実験方法の開発

研究分担者: 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究協力者: 横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究協力者: 森田紘一 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究協力者: 辻 昌貴 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究協力者: 菅 康佑 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

化学物質の生体影響のひとつに感作性がある。このうち、皮膚感作性については *in vivo*, *in vitro* の評価系が構築されているが、気道感作に関して評価系が構築されていない。その理由として、皮膚感作性では優れた *in vivo* の評価系が構築され、その研究成果を基盤として *in vitro* の評価系が構築されたことに対して、気道感作においては *in vivo* の評価系が構築されていない事が挙げられる。本研究は、化学物質による生体影響のうち、いまだ確立した評価系が乏しい気道感作性について、*in vivo* 評価法の構築を目的として実施した。刺激性や全身性毒性との交絡を避け、真に抗原特異的な感作応答を評価できる動物モデルとして、BALB/cJ 雌性マウスを用い、左肺のみに感作曝露を行い、一定期間後に未処置の右肺へ同一物質を惹起投与する片肺感作・対側肺チャレンジモデルを計画した。被験物質として、呼吸器感作陽性対照 4 物質 (TDI、TMA、PA、APS) および皮膚感作陽性・気道感作陰性 3 物質 (Isoeugenol、Eugenol、DNCB) を選定した。このうち TDI および TMA は水中で速やかに加水分解されるため、水以外の溶媒の検討を行い、微量投与に適した低粘度媒体としてアマニ油を採用した。投与は三種混合麻酔下で気管内内視鏡を用いて左肺に 20 μ L ずつ Day 1、3、5 に感作し、Day 15 に右肺へ惹起する計画とした。溶媒対照群、TMA 0.5% 投与群および DNCB 0.5% 投与群を設定して左肺のみに投与した。DNCB 群および溶媒対照群では、3 回の感作後も投与側左肺、未投与側右肺のいずれにも肉眼的・組織学的異常を認めなかった。一方、TMA 群では一般状態の悪化がみられ、投与 3 日後に安楽死処置を行った。TMA 投与側左肺では浮腫性腫大が認められ、組織学的には肺胞内に漿液性滲出液の貯留が観察されたが、右肺には明らかな異常を認めなかった。なお、惹起時に必須である内視鏡の破損により、Day 15 以降のチャレンジ試験は継続できなかった。以上より、本研究条件下では、アマニ油自体は肺に残存せず、DNCB 0.5% も肺炎症を誘発しないことが示された。一方、TMA 0.5% は局所刺激性が強く、より低濃度での検討が必要と考えられた。未処置右肺に異常がみられなかったことは、本モデルが感作局所の直接刺激と対側肺の応答を切り分け得る可能性を示した。

A. 研究目的

化学物質の生体影響のひとつに感作性がある。このうち、皮膚感作性については *in vivo*, *in vitro* の

評価系が構築されているが、気道感作に関して評価系が構築されていない。その理由として、皮膚感作性では優れた *in vivo* の評価系が構築され、その研究成果を基盤として *in vitro* の評価系が構築された

ことに対して、気道感作においては *in vivo* の評価系が構築されていない事が挙げられる。本実験は、BALB/c マウスを用いて、一側肺のみに低負荷で化学物質を曝露し、刺激性を最小化しつつ気道感作を誘導する実験を行い、同側肺への惹起後に気道過敏性、BALF 細胞分画、サイトカイン等を評価し、気道感作物質の検出と機序解明を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

従来の動物を用いた気道感作性試験では、吸入または全身曝露により感作を誘導してきたが、刺激性・全身性毒性との交絡により、真に抗原特異的な感作応答を識別することが困難であった。そのため、本研究では、BALB/cJ マウスを用い、左側肺のみを感作曝露、右側肺を無処置として保持し、一定期間後に右側肺のみへ被験物質をチャレンジすることにより、刺激性や全身影響を最小化した状態で、全身免疫記憶の成立と局所応答の関係を明確に評価する方法を計画した。被験物質として、以下の物質を選出した。

(1) 気道感作陽性対照 (RS 陽性 4 物質) : 2,4-toluene diisocyanate (TDI, 95%)、Trimellitic anhydride (TMA, 97%)、Phthalic anhydride (PA, 99.5-100.3%)、Ammonium persulfate (APS, 99.0%)。 (2) 皮膚感作陽性/気道感作陰性 (R 陰性 3 物質) : Isoeugenol (IGNL, 95%)、Eugenol (EGNL, 95%)、2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB, 99%)。

しかしながら、呼吸器感作陽性とされている TDI および TMA は水によって速やかに加水分解されることから、水以外の溶媒を選択する必要がある。このため溶媒検討と検体の溶媒へ分散性の検討を行った。

動物は BALB/cJ (ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン) 雌性マウスを 7 週齢で購入し 1 週間以上の馴化期間を経たのち 8~10 週齢にて使用した。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; $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、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。

動物への投与手技は以下のように実施した。マウスを三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン:ミダゾラム:ブトルファノール = 0.3:4.0:5.0 mg/kg) を 0.1 mL/10g 体重の用量/容量で 27G の注射針で腹腔内に投与した。小動物用気管内挿管器 (BRC バイオリサーチ) で開口固定し、内視鏡 (テレパック + TP101、KARL STORZ) に、HDIG スコープ (住田光学ガラス、 ϕ 0.6mm、特注品) を組み合わせ、HDIG スコープに留置針の外筒 (20G) を被せて、マウスの左肺の気管支分岐部まで留置針外筒を挿入した。その後、HDIG スコープを留置針外筒から抜き、ハミルトンシリンジを留置針外筒に装着して検体を噴霧した。投与量は $20 \mu\text{L}$ /回とした。濃度は被験物質の濃度は文献情報を参考にして感作は低用量群 0.05~0.3%、高用量群 0.2~1.0%、惹起は低用量群 0.2~0.5%、高用量群 0.5~1.0% と計画した。感作は Day 1, 3, 5 に左肺へ $20 \mu\text{L}$ /回噴霧し、Day 15 に右肺へ単回または 2 回投与して惹起を行うこととした。

(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 (令和 3 年 5 月版)」に則って実施した。

C. 研究結果

TDI と TMA に関しては、油を溶媒として選択した。一般的にはオリーブオイルが選択されるが、粘性が高いため微量投与するためには低粘度である必要

がある。そのため、本研究ではアミノ油を選択した。TDI は液体であるため容易に混合し、TMA 及び DNCD もメノウ乳鉢で混練し超音波照射することによって 1%濃度までの懸濁液が得られた。

アミノ油を溶媒として BALB/c10 週齢マウスの左側肺のみに感作曝露を実施した。TMA0.5%(RS 陽性)、DNCB0.5%(RS 陰性・皮膚感作陽性)を 20 μ L を動物投与した。その結果、TMA 投与動物は一般状態が悪化したため、投与 3 日後に安楽死処置をおこなった。溶媒対照と DNCB 群は実験を継続して 3 回の感作を行ったが、惹起を行う Day15 に気管内投与に必須の HDIG スコープが壊れたため、実験が継続できなかった。そのため、TMA、DNCB 投与群は途中解剖を実施した。

各マウスの肺の肉眼観察像と顕微鏡像を図 1 に示した。溶媒対照群(図 1A)と DNCB 投与群(図 1B)では、投与した左肺にも投与を行わなかった右肺にも肉眼所見、ミクロ所見ともに認められなかった。一方、安楽死処置を行った TMA 投与群では、投与した左肺は浮腫を呈し腫大していた(図 1C)。ミクロ所見では、出血はみられないものの漿液性とみられる滲出液が肺胞内に貯留している様子が観察された。TMA を投与しなかった右肺には、マクロ所見もミクロ所見も見られなかった。

D. 考察

従来の気道感作性試験では、吸入または全身曝露により感作を誘導してきたが、刺激性・全身性毒性との交絡により、真に抗原特異的な感作応答を識別することが困難であった。本研究では、BALB/c マウスを用い、左側肺のみを感作曝露、右側肺を無処置として保持し、一定期間後に右側肺のみへ被験物質をチャレンジする設計を採用した。この方法により、刺激性や全身影響を最小化した状態で、全身免疫記憶の成立と局所応答の関係を明確に評価することを目指した。化学物質に対する全身性免疫記憶が成立していれば、未処置であった右肺に同一抗原をチャレンジした際、局所的に好酸球浸潤や Th2 サイトカイン産生が誘導されることが想定される。しかしながら、実験の途中で片肺投与に必須の内視鏡が壊

れたため実験の継続ができなかった。

アミノオイルのみを投与した群と DNCB 投与群は 3 回の感作後においても、肺に全く影響がみられなかった。少なくとも、本実験条件では油を媒体としても肺内で速やかに処理されること、DNCB0.5%は肺に炎症を誘発しないことが明らかとなった。TMA0.5%は炎症が強いことが明らかになったことから、0.5%よりも低濃度で実施することが必要と考えられたが、無処置の右肺には影響がみられなかったことから、本手法は全身免疫記憶の成立と局所応答を切り分け、従来法では解決困難であった刺激性との交絡を排除できる可能性がある。

E. 結論

本研究の片肺感作・対側肺チャレンジモデルは、全身免疫記憶の成立と局所応答を切り分け、従来法では解決困難であった刺激性との交絡を排除できる可能性がある。感作側で形成された免疫記憶が未処置肺のチャレンジで再現される場合、それは抗原特異的感作の明確な証拠であり、気道感作性の *in vivo* 評価系として妥当性を示すことができると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

高橋祐次: CNT の医療への応用—非臨床試験における生体電位測定—, Nanofiber, 16 (1,2,3,4), p41-45, 2025

2. 学会発表

Taquahashi Y., Weight of Evidence (WoE) in Nonclinical Studies for Pediatric Drug Development: Insights from ICH-S11 Discussions, The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology (2025.7.2)

Nishimura T, Hirabayashi Y, Ogawa K, Tsunoda S, Suzuki M, Sato G, Toyoda T, Taquahashi, Updates to the 'Dokuseishiken Yougosyuu and Development of a Usable Terminology Database, The 52nd Annual Meeting of the Japanese

Society of Toxicology (2025.7.4)

Taquahashi Y, Morita K, Suga K, Tsuji M, Aisaki K
EEG Measurement and Its Potential for Toxicity Studies in Rats Using Carbon Nanotube Yarn Surface Electrodes, ICT2025, Beijing, CHINA(2025.10.15)

西村拓也、高橋祐次、豊田武士、角田聡、鈴木睦、佐藤玄、小川久美子、山田隆志、平林容子、毒性試験用語の標準化に向けた用語集改訂と継続的な更新が可能なデータベース化への取り組み、日本毒学会医薬品毒性機序研究会(2025. 12.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

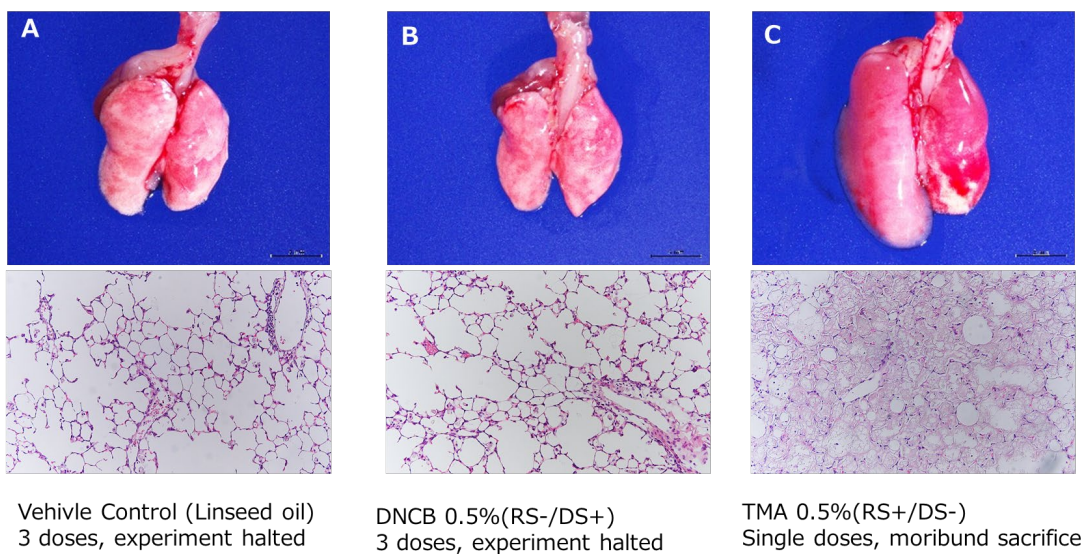


図 1 マウス肺の肉眼及び顕微鏡像

溶媒対照群(図 1A)と DNCB 投与群(図 1B)では、投与した左肺にも投与を行わなかった右肺にも肉眼所見、ミクロ所見ともに認められなかった。一方、一般状態が悪化し安楽死処置を行った TMA 投与群では、投与した左肺は浮腫を呈し腫大していた(図 1C)。ミクロ所見では、出血はみられないものの漿液性とみられる滲出液が肺胞内に貯留している様子が観察された。TMA を投与しなかった右肺には、マクロ所見もミクロ所見も見られなかった。