

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 7 年度 分担研究報告書

感染影響評価

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

前年度に引き続き 3 種類のナノシリカ NM (NM-201, 202, 204) の吸入曝露による RSV 感染マウス病態への影響を免疫染色法で評価をするとともに、RSV 感染マクロファージでの *in vitro* 感染影響評価系の確立を目指した。マウス BALF 中の CCL5 の ED₁₅₀ 値を算出し、感染影響度の指標となることが判明した (NM-201<-202<-204)。肺組織での CCL3 および CCL5 に対する免疫染色では、BALF 中での量的差異を良く反映する結果が得られた。さらに NM-202 と-204 間では質的な差異も確認できた。一方、THP-1 と A549 細胞を用いた二重（共）培養系での評価では、*in vivo* 試験結果を反映する結果が得られなかった。

A. 研究目的

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。EU 共同研究センター（イタリア）より供試された 3 種類のナノシリカ NM (NM-201, 202, 204) 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

前年度までに測定したマウス BALF 中の CCL3 および CCL5 レベルについて、感染影響度の指標として活用するため、ED₁₅₀

値(mg/m³)を算出した。

ナノシリカの感染影響に対する質的な相違を明らかにするため、NM-201, 202 および 204 吸入曝露/RSV 感染マウス肺病理組織標本について、免疫染色を実施した。抗体はマウス抗 CCL3 および CCL5 モノクローナル抗体（何れも Santa Cruz Biotechnology 製）、抗 RSV モノクローナル抗体（抗 Fusion protein および抗 Glycoprotein, 何れも LS Bio 製）および抗 MUC5B モノクローナル抗体（Abcam 製）を用いた。それぞれの抗体に対するアイソタイプコントロールを対照にして、条件検討を実施（1:50～1:750）した。肺組織切片はパラフィン包埋ブロックより調製し、Vector Laboratories 製のキットを用いて常法により脱パラフィン等後に免疫染色を実施した。なお、DAB 基質を発色させて検出を行った。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価

THP-1 細胞と A549 細胞を利用した二重培養法での検討を実施した。NM-204 を被検試料として用いた。A549 細胞をあらかじめ 2 日間セルカルチャーインサート (Falcon) で培養し、無血清培地 (VP-SFM, GIBCO) 下で RSV A2 株を MOI 0.01 で感染させた。THP-1 細胞は 24 ウェルプレートで 1 日培養し、PMA (0, 100 nM) を添加してさらに 1 日培養後、NM-204 (1, 10 µg/mL) を添加した。THP-1 細胞に NM-204 を吸着させるため 4 時間培養後、無血清培地で洗浄し、A549 細胞培養セルカルチャーインサートを導入して共培養を開始した。培養 1, 2 日後の上清を回収して、CCL5 を ELISA で定量した。

(倫理面への配慮)
特になし

C. 研究結果

ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験

BALF 中の CCL5 レベルを指標として ED₁₅₀ 値を算出したところ、NM-201; 75.0, -202; 27.1, -204; 13.0 (mg/m³) であった。一方、CCL3 は用量依存性が取れない試験回があったため、指標化できなかった。

抗 RSV 抗体 (2 種類) や粘性多糖分泌を標的にした抗 MUC5B 抗体を用いた免疫染色実験では、対照との明確な差別化した結果が得られなかった。一方、CCL3 と CCL5 を標的にした免疫染色実験では評価が可能であった。CCL3 陽性細胞は、NM-202 曝露ではマクロファージおよびリンパ球に多く、NM-204 曝露ではこれらの細胞で多いがさらに肺胞上皮も多いとの相違が見

られた。また、CCL5 陽性細胞は、NM-204 曝露においてマクロファージ、リンパ球および肺胞上皮に非常に多かった。なお、NM-201 は両抗体に対する陽性細胞が少なかった。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価

二重培養系において、NM-204 の CCL5 産生誘導能は、感染 1 および 2 日後においても約 10% 程度であり、評価系としては利用できるレベルではなかった。追実験でも同様の結果であった。

D. 考察

ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験

ナノシリカの RSV 感染影響度は、BALF 中 CCL5 の ED₁₅₀ 値を用いて、差別化できた (NM-201 < -202 < -204)。この傾向は h-CLAT など班 *in vitro* 研究試験と同じ傾向であり、吸入曝露負荷量の相違というよりナノシリカの物性を反映していると考えられる。

免疫染色実験において、RSV 感染細胞とケモカインの分布相違などが検討できなかった。酸化チタンなどを用いた先行研究では検証できたが、その際は凍結組織切片を用いており、ホルマリン固定組織でのアプリケーションが示された抗体を用いたにも関わらず再現できなかった。そのような状況下、CCL5 陽性細胞は NM-204 曝露組織で多く、次いで -202 となり、BALF 中の量的差異を良く反映していた。このケモカインが感染影響評価の良い指標となることが再確認された。一方、CCL3 陽性細胞に関しては、肺胞上皮では NM-204 と -202 では応答が異なり、物性の差を反映している可能性が示唆された。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価

今まで RAW264.7, THP-1 および A549 細胞の単一細胞培養条件下での影響評価系を検討してきたが、十分な結果が得られず、今回二重培養（共培養）を検討した。しかし、*in vivo* での感染影響度を反映できるような試験結果は得られなかった。RSV 感染肺炎では、マクロファージとリンパ球そして上皮細胞間でのウイルス感染刺激によるサイトカイン・ケモカインのクロストークが複雑と考えられている。株化細胞での *in vitro* 試験による評価系構築には、さらなる技術的な工夫が必要である。

E. 結論

ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験

BALF 中の CCL5 の ED₁₅₀ 値を指標としてナノシリカの感染影響を差別化できた (NM-201 < -202 < -204)。

肺組織での CCL3 および CCL5 に対する免疫染色では、BALF 中での量的差異を良く反映する結果が得られた。さらに NM-202 と -204 間では CCL3 陽性細胞の質的な差異も確認できた。

NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価

THP-1 と A549 細胞を用いた二重（共）培養系での評価では、*in vivo* 試験結果を反映する結果が得られなかった。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

特になし

F.2 学会発表

1. 河野 圭将、明石 敏、宮内亜宜、横田理、高橋 祐次、吉田裕樹、黒川昌彦、

渡辺 渡 ナノシリカ曝露の RS ウイルス肺炎への影響 第 72 回日本ウイルス学会学術集会 (2025.10.28)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし