

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 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

ナノマテリアル(NM)を含む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。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 *in vitro* 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。

In vitro 呼吸器感受性試験法の開発については以下の知見を得た。ヒト肺胞マクロファージのシングルセル RNA シーケンス解析を行い、細胞群の不均一性とそれを定義づける種々の遺伝子群を明らかにすることができた。またこれまでに皮膚感受性と呼吸器感受性を識別するバイオマーカーとして TNFSF4 (OX40L) を見出してきたが、この遺伝子のみで両者を区別することが困難であることがわかったため、Th2 タイプ免疫応答に関わる細胞表面マーカー等の遺伝子を検討し、9 遺伝子を新たなバイオマーカー候補として見出した。なお本研究班の成果である開発中の試験法は、OECD において *in vitro* 呼吸器感受性試験法開発を目的として作成された Detailed Review Paper (DRP) に、テストガイドラインの有力候補として収載された。

NM の *in vitro* 免疫毒性評価法の開発については以下の知見を得た。THP-1 細胞を用い、細胞内取り込みや ROS の関与を中心にメカニズムの解明を進めるとともに、バイオマーカーの探索を行い、*IL1A* 遺伝子が利用できる可能性を示した。さらに、THP-1 細胞と比べよりヒト肺胞マクロファージに近い iPS 細胞由来の HiTRAM 細胞において NM による活性化が検出でき、一部のバイオマーカーについては THP-1 細胞より反応性が高かったことから、今後本細胞を用いた *in vitro* 試験法開発が可能になったと考える。

In vivo 吸入曝露研究では、ナノシリカによる肺胞マクロファージの集簇の増加と軽度の線維化が誘導される可能性が示されたが、多層化カーボンナノチューブの吸入曝露に比較して、肺胞マクロファージの変化、線維化の程度は弱いものと考えられた。また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 の mRNA 発現が濃度依存的に増加していたことから、今後 *in vitro* 試験法開発におけるバイオマーカー候補になりうると考えられた。また、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)。この順位は THP-1 細胞活性化能と一致したことから、抗原提示細胞の活性化を指標とする *in vitro* 試験法開発の根拠になりうると考えられた。さらに、*in silico* 解析により、BALF 中の CCL5 発現を亢進するナノシリカほど粒子径が小さく、不純物による表面被覆が少なく、かつ多孔質ではないソリッドな構造を持つことが示唆された。

以上より、生物学的妥当性に裏付けられた、吸入曝露による NM を含む化学物質の *in vitro* 免疫毒性評価手法の開発および国際標準化に向け、着実な進展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 教授

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 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 (足利、善本、黒田)

B1.1 肺胞マクロファージ活性化機構の解析

吸入曝露された微粒子は主に肺胞マクロファージにより貪食されると考えられている。本年度は、微粒子感作に関与する遺伝子の探索とその欠損マウスを用い、微粒子によるアレルギー性炎症のメカニズム解析を進めた。またヒト肺胞マクロファージのシングルセル RNA シーケンス解析を行い、ヒト肺胞マクロファージに発現するシグネチャー遺伝子についての検討を行った。

EPITHELIX 社より購入したヒト肺胞マクロファージ (Batch Number: MΦ0889 および 0940) を *in vitro* にて 2 日間培養した。その後細胞を回収し、大阪大学微生物病研究所ゲノム解析室にシングルセル RNA シーケンス解析を依頼した。得られた解析データは Python を用い、Scanpy パッケージにて解析した。検出遺伝子数や転写産物の数な

どの指標を元に低品質の細胞を除外し、遺伝子発現の正規化と対数変換を行うことで、細胞間の発現比較が可能となるデータを作成した。遺伝子発現データの特徴については主成分分析(PCA)による次元削減を行ない、その情報をもとに遺伝子発現パターンの類似性に基づいて細胞集団を分類した。クラスタリングは t-SNE により可視化した。本研究ではさらにヒト肺胞マクロファージに発現するシグネチャー遺伝子について、dot plot を用いて各クラスターにおける発現量および発現細胞割合を比較解析し、クラスター間の特徴の違いを評価した。マウス肺胞マクロファージの微粒子応答については、研究分担者らが見出した微粒子応答に関連する遺伝子 X および遺伝子 Y の遺伝子欠損マウスを作製した。それらのマウスの気道に抗原（卵白アルブミン：OVA、10 ug/マウス）とアルミニウム塩（アラム、50 ug/マウス）を投与し、さらに2週間後に OVA を3回暴露することで誘導される OVA 特異的 IgE 量を測定した。誘導された IgE 量から微粒子のアレルギー性炎症感作性における両遺伝子の関与について評価した。また、マウスの肺胞マクロファージから樹立した細胞株 ALV3.7 を用いて、遺伝子 X および遺伝子 Y の活性化で誘導される因子に対するリポーター遺伝子を導入し、細胞株が微粒子によって活性化した際にルシフェラーゼを発現するシステムの構築を試みた。

B1.2. In vitro 呼吸器感作性試験法の開発

まず、BEAS-2B と CD14-ML から IL-4 で分化誘導した未成熟 DC を用いて、別々の Alvetex® scaffold で3次元培養を48時間行い、その後、BEAS-2B の scaffold を上側に、未成熟 DC の scaffold を下側にして重ね、

トランスウェルインサートの底に装着し、さらに培養した。24時間後、培養上清を一度取り除き、上方から 10% DMSO+10% FBS/MEM で溶解した化学物質を2倍の範囲内で4段階希釈した濃度、または、0.8倍希釈した3濃度を、それぞれ 5 μ L ずつ5箇所、合計 25 μ L を添加した。その後20分間静置し、2.5 mL の medium を加えそのまま 37°C で培養した。6時間培養後、DC の scaffold のみを回収し、RNA を抽出し、RT-qPCR で指標分子の mRNA 発現量を定量した。HPRT mRNA 発現が、10% DMSO の溶媒のみに対して 1/10 以上のサンプルを使用した。指標分子としては、TNFSF4 の他に、上皮細胞由来サイトカイン TSLP や IL-25、IL-33 の受容体サブユニットや Th2 細胞の分化誘導に関与する Conventional DC2 (cDC2) への分化誘導に関わる分子や cDC2 のマーカー分子など、約20種類の分子について、代表的な10個の皮膚感作性化学物質と8個の呼吸器感作性物質、5個の非感作性物質を用いて検討した。細胞生存率は、WST-8 アッセイを用いても検討した。

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、黒田）

B2.1 各種 NM 分散液の調製と評価

本研究では、シリカナノ粒子 (SiO₂ NPs) として Sicstar-red F (micromod), NM-201, NM-202 (以上 JRC)、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) として T-MWCNT-7 (分散型)、酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO NPs) として MZ-500 および MZN-B0、それらのそのシリカ被覆体である MZ-500HP および MZN-B0HP (以上テイカ)、銀ナノ粒子 (Ag NPs) として BioPure™ AGCB10 (nanoComposix) をそれぞれ用いた。SiO₂ NPs のうち、分散

液として市販されている Sicstar-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水中で 40 W, 5 分の条件で 1 回処理した。MWCNT は分散剤として Polysorbate 80 を使い、プローブ型超音波装置を用いて分散液を調製した。ZnO NPs は 1 mg/mL の濃度になるように水に懸濁し、ボルテックスミキサーで 2 分間処理した。Ag NPs は 40 mg/ml ウシ血清アルブミン溶液 in 5% グルコース溶液を用いて希釈した後、培養液を用いて所定濃度に希釈した。

ZnO NPs の形態および元素分布は、透過型電子顕微鏡 (TEM) およびエネルギー分散型 X 線分光器 (EDS) (日本電子, JEM-2100F) を用いて解析した。ZnO NPs からの亜鉛イオンの溶出は、水または培養液を用いて 31.6 mg/mL の分散液を調製し、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で 24 時間静置し、遠心分離後の上清中の亜鉛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.2.2. MWCNT の細胞内取り込み挙動の解析

ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞に各濃度の MWCNT 分散液を曝露し、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で所定時間培養後に光学顕微鏡 (ライカマイクロシステムズ DMI3000 B) により観察した。

B.2.3. NMs の THP-1 細胞活性化能の評価

2.0×10⁶ cells/mL THP-1 細胞懸濁液 500 μL を分注した 24 ウェルプレートに各ウェルへ各 NM 分散液または対照物質の溶液 500 μL を添加し、CO₂ インキュベーター (37°C,

5% CO₂) 内で 24 時間培養した。細胞を洗浄後、フローサイトメーター (BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer) を用いて THP-1 細胞の CD86 および CD54 発現量を培養液処理群 (control) に対する相対蛍光強度 (RFI) として定量するとともに、ヨウ化プロピジウム (PI) 染色より細胞生存率を求めた。

B.2.4. 遺伝子発現に基づく NM の THP-1 細胞活性化能の評価

B.2.3 の手法にて NM 分散液を曝露した THP-1 細胞より RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いてトータル 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 *CD86*, *CD54*, *CCL3*, *CCL5*, *MMP-12*, *IL1A*, *IL1B*, *GAPDH* 各遺伝子の発現を解析した。

B.2.5. NMs による THP-1 細胞活性化能メカニズムの解析

細胞内活性酸素種 (ROS) の阻害は、NM 曝露前に THP-1 細胞を 5 mM または 10 mM の ROS 阻害剤 *N*-Acetyl cysteine (NAC) で 1 時間処理することで行った。NM の細胞内取込の阻害は、NM 曝露前に THP-1 細胞を 250 μM のマクロピノサイトーシス阻害剤 Amiloride で 2 時間処理することで行った。

B.2.6. ヒト iPS 細胞肺胞マクロファージを用いた in vitro 試験法の開発

iPS 細胞から組織常在性肺胞マクロファージ (HiTRAM) を作成する手法が開発された。本細胞は肺胞マクロファージのマーカー

一とされる CD169 や PPAR γ を高効率に発現していることが明らかとなっている。本研究では、肺胞マクロファージに可能な限り近い HiTRAM およびその前駆段階細胞 (precursor of HiTRAM, prec-HiTRAM) を用い、これまで *in vivo* 吸入曝露試験や THP-1 細胞などを用いた *in vitro* 試験により得られた NM による抗原提示細胞活性化が本細胞においても確認されるかどうか検討した。具体的には、まず代表的な皮膚感作性物質である DNCB を用いて HiTRAM の CD54, CD86, IL-1b, CCL-3, CCL-5 および MMP-12 が亢進するかどうかを検討した。その後、先行研究により、ナノシリカである NM-204 を適用した THP-1 細胞において発現が亢進したこれらバイオマーカーの発現が更新するかどうかを検討した。さらに、共培養系の構築を目的として、HiTRAM および prec-HiTRAM が播種されている 24 well plate の上に iPS 細胞由来肺胞オルガノイドインサートごと移して、共培養用培地を用いて共培養系を作成した。

B.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発と免疫毒性解析 (高橋、石丸、渡辺)

B.3.1. 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 Biotechnonology 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。

B.3.2. ナノシリカ吸入曝露実験

Taquann 処理を施した NM202 を 0, 15, 30 mg/m³ の濃度で 1 日 6 時間 5 日間の曝露を全身曝露装置を用いて実施した。本実験では雄 C57BL/6NCrSlc マウスを用いた (8 週齢、各群 N=5)。曝露後 4 週および 8 週目で屠殺解析を実施した。

屠殺時に肺組織は 10% 中性緩衝ホルマリンにて注入固定を行った後、標本作成まで同液に浸漬した状態で常温にて保存した。パラフィン包埋、薄切により標本を作成した。キシレン、エタノールにて脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジンあるいはマッソン・トリクロームにて染色、封入を行った。また、パラフィン標本を用いて、免疫染色を実施した。脱パラフィン、ブロッキング溶液による処理後 1 次抗体として、抗マウス F4/80 抗体 (70076, Cell Signaling Technology)、抗マウス MARCO 抗体 (ab239369, abcam) を用いた。2 次抗体として HRP 標識抗体 (VECTASTAIN Elite ABC Kit, #PK-610, funakoshi) を使用し、DAB (049-22831, FUJIFILM Wako Chemical) にて発色を行った。ヘマトキシリンによる核染色後、封入処理を行った。

B.3.3. 呼吸器感作性物質の評価方法の検討

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、以下の物質を選択した。

(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 (塩酸メデトミジン : ミダゾラム : ブトルファノール = 0.3 : 4.0 : 5.0mg/kg) を 0.1mL/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、 $\phi 0.6\text{mm}$ 、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。

B.4. 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 ug/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。

B.5. 既存情報と in vitro/in vivo 研究データによる in silico 解析 (大野)

B.5.1. 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

今年度の本研究における対象物質は、昨年に引き続き、3 種の二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NMs: NM-201, NM-202, NM-204) とした。解析用資料の作成にあたり、これら被験物質の物理化学的性状 (物性) および毒性評価結果について、既存の評価文書 (Dossier) に加え、新規試験データや当研究班の実測データを収集・整理した。具体的には、*in vitro* 試験 (h-CLAT 法) の結果や、*in vivo* 吸入曝露試験に関する知見 (Dossier および当研究班の実施結果) を統合している。

【物理化学的性状および有害性情報の調査対象・情報源】

- ・ OECD ナノマテリアル安全性評価プログラム公表文書: "Silicon dioxide - Manufactured nanomaterial" Summary Dossier
- ・ 関連する個別 Dossier および ANNEX

- ・ 欧州委員会共同研究センター (JRC) による情報、および関連する原著論文
- ・ 本研究班で実施した *in vitro* h-CLAT 毒性試験結果

なお、新たな物性項目である重金属不純物 (As, Cd, Pb, Hg) および比表面積比 (Specific surface area ratio: H₂O / N₂) については、追加測定した。

B.5.2. 呼吸器感作性物質の in silico による特性解析

これまでに収集した呼吸器ならびに皮膚感作性被験物質 33 化合物

- 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

について、昨年度には情報化学ならびに量子化学の観点から、物性値ならびに構造的特徴量の収集を行ない、併せて多変量解析による感作性判別を試行してきた。

R7 年度は、昨年度までの微視的特徴量との対比として、巨視的・熱力学的物性値を収集し、感作性判別能に関する調査を行うこととした。

熱力学的量の取得は、OECD の眼刺激性に関するディファインド・アプローチとしても用いられている OPERA プログラムを用いて、R6 年度に作成した被験物質の正準 SMILES に基づく QSAR 予測値を取得した。各被験物質に対して取得した具体的な物性値は、融点、沸点、オクタノール水分配係数 (LogP および LogD)、水溶解度、蒸気圧、ヘンリーの法則、および pKa である。

これらの物性値を元に PLS-DA 解析による感作性の分類を実施した。この時、物性値に対する PCA 解析において LogP とほぼ差がなかった LogD と、比較的多くの被験物質で定義されなかった pKa については、

今回はプレリミナリーな解析として除外した。

各種データ処理は Python 言語を、多変量解析は R および ropls ライブラリを用いた。

(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。

兵庫医科大学においては兵庫医科大学動物実験規程、兵庫医科大学研究倫理規程に従い、動物実験計画書を作成し、動物実験委員会の承認を受けて、研究を行っている。承認番号 25-020AG 「微粒子アジュバント投与による肺の炎症モデルマウスの作製とその免疫学的解析」

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）

C1.1 肺胞マクロファージ活性化機構の解析

シングルセル RNA シーケンス解析についてはドナーが異なる 2 種の細胞について解析した。クラスター 0、1、2 は大きなクラスターを形成しており、Dot plot の解析から、肺胞マクロファージのシグネチャー遺伝子である ITGAM (CD11b)、ITGAX (CD11c)、PPARG (PPAR γ) の強い発現が認められた。このクラスターの細胞では、本研究で注目している ICAM1 (ICAM-1) の強い発現も認められた。クラスター 6 は I 型コラーゲン

分子である COL1A1 (collagen type I α 1 鎖) および COL1A2 (collagen type I α 2 鎖) を発現していることから線維芽細胞と考えられた。クラスター 3 ~ 5、7 について進めている。

Sample 0889 とは大きく異なり、クラスター 0、1、2、3、7 で大きなクラスターを形成していた。Dot plot の解析から、クラスター 1、2、3 において、ITGAM (CD11b)、ITGAX (CD11c)、PPARG (PPAR γ) の発現が認められたが、発現分布のバラツキが大きかった。また、クラスター 2 において、ICAM1 (ICAM-1) の発現が認められた。

本研究ではマウス肺胞マクロファージの微粒子応答の検討も進めている。最近、微粒子応答に関連する遺伝子 X および遺伝子 Y を見出し、その遺伝子欠損マウスを作製した。そこでこれらのマウスを用いて微粒子の気道感作によるアレルギー性炎症誘導について検討した。抗原とアルミニウム塩を気道に投与した後に抗原を曝露することでアレルギー状態を誘導した。血清中の抗原特異的 IgE を測定したところ、遺伝子 X および遺伝子 Y の欠損マウスで IgE 値の低下が認められた。

これらの遺伝子群を用いた微粒子の感作性試験への応用として、我々が樹立した肺胞マクロファージ細胞株 ALV3.7 に、遺伝子 X および遺伝子 Y の活性化で誘導される因子に対するリポーター遺伝子を導入し、細胞株が微粒子によって活性化した際にルシフェラーゼを発現する細胞を作製した。このリポーター細胞の評価法における有用性について検討を行っている。

C1.2. *In vitro* 呼吸器感作性試験法の開発

まず、プロトコルの精密化や最適化のため測定条件の再検討を行った。当初の方法

では、細胞生存率を RT-qPCR で得たハウスキーピング遺伝子 HPRT の発現量で評価し、10%DMSO の溶媒のみに対して、その HPRT の発現量が 1/10 以下に下がるサンプルは除外するとしていた。細胞生存率は、通常、WST-8 アッセイなどの細胞内の脱水素酵素の還元能を測定する生細胞数測定キットで測定する場合が多く、通常、75% の細胞生存率を示すサンプルの濃度 CV75% を基準にする場合が多い。HPRT の発現量が 1/10 以下になるサンプル濃度で WST-8 アッセイを行うと、細胞生存率がかなり下がることがわかった。そこで、HPRT の発現量が 1/4 以下に下がるサンプルは除外すると基準を変えると、WST-8 アッセイでの細胞生存率が上昇したが、TNFSF4 だけを指標にすると呼吸器と皮膚感作性化学物質の識別が難しくなった。

そこで、次に、TNFSF4 の他に指標となる良いマーカーがないかと Th2 分化誘導に関わる分子や cDC2 への分化誘導や cDC2 のマーカー分子などについて、RT-qPCR 解析を行った。その結果、単独の指標だけで呼吸器と皮膚を識別可能な分子は見つからなかった。そこで、複数の分子を指標に用いて両者を識別できないかと検討すると、TNFSF4 と CRLP2 (TSLP 受容体のサブユニットの 1 つ)、IL-7R α (TSLP 受容体のサブユニットのもう 1 つ)、ST2 (IL-33 受容体サブユニットの 1 つ)、TIM-1 (Th2 反応の誘導に関与)、CD1A (ランゲルハンス細胞で発現)、FCER1A (IgE 受容体のサブユニットの 1 つ)、CLEC10A (Th2 分化に関与する C 型レクチン受容体)、NOTCH2 (cDC2 細胞への分化誘導に関与) の 9 種類の分子が候補分子となった。例えば、その内、TNFSF4 と ST2、CD1A、NOTCH2 の 4 種類の複数分子を指標とすると、感度、

特異性、正確性ともに 80% 以上となり、両者の識別が可能である可能性が示された。

技術移転性に関しては、施設 A には、ほぼ技術移転が完了し、さらに、もう 1 施設 B への技術移転を行っている。

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、黒田)

C.2.1. ZnO NPs のキャラクタリゼーション

MZ-500 および MZN-B0、それらのそのシリカ被覆体である MZ-500HP および MZN-B0HP の TEM 観察および TEM-EDX による元素マッピングを行った。TEM 形態観察において、MZ-500HP では表面に透過性の異なる被覆層が観察されたが、MZN-B0HP では見られなかった。一方、元素マッピングにおいては、いずれのシリカ被覆 ZnO NPs についても表面にケイ素原子に由来するシグナルが観察され、同様に酸素に由来するシグナルもほぼ同様の分布でみられたことから、MZ-500HP および MZN-B0HP はその表面がシリカにより被覆されていることが確認された。

ボルテックスを用いて調製した MZ-500 および MZN-B0、それらのそのシリカ被覆体である MZ-500 および MZN-B0HP の流体力学的直径および ζ -potential は、 $2736.9 \pm 824.6 \mu\text{m}$, $1081.6 \pm 92.1 \mu\text{m}$, $3479.0 \pm 748.0 \mu\text{m}$, $2036.8 \pm 231.1 \mu\text{m}$, $-12.4 \pm 2.42 \text{ mV}$, $-14.3 \pm 0.42 \text{ mV}$, $-9.45 \pm 1.69 \text{ mV}$, $-7.65 \pm 1.74 \text{ mV}$ であった。次に、ICP-AES を用いてボルテックスを用いて調製した ZnO NPs 分散液における ZnO NP からの亜鉛イオン溶出率を求めた。シリカ被覆体である MZ-500HP および MZN-B0HP からの亜鉛イオン溶出率は、水中においては未被覆のものと比較して抑制されていることが示された。一方、培地中においては溶出率に差はみられなかった。

C.2.2 被覆 ZnO NP による THP-1 細胞活性化能の評価

未処理 ZnO NPs である MZN-B0 およびそのシリカ被覆体 MZN-B0HP 曝露後の THP-1 細胞における CD86 および CD54 発現を解析した。細胞生存率が 50%以上である 31.6 $\mu\text{g/mL}$ において、MZN-B0HP 曝露 THP-1 細胞における CD54 発現は MZN-B0 を曝露したものよりも高かった。

C.2.3. MWCNT の細胞内取り込み挙動の解析

THP-1 細胞における MWCNT の取り込み挙動を光学顕微鏡にて観察した。特に高濃度での曝露条件において、曝露 4 時間後に細胞表面への吸着、8 時間後において細胞表面への吸着と細胞内への部分的な取り込み、曝露 24 時間後において細胞への取り込みがそれぞれ観察された。細胞とほぼ同サイズの MWCNT を取り込んだ細胞も観察された。

C.2.4. NM による THP-1 細胞活性化能メカニズムの解析

NM による THP-1 細胞活性化能メカニズムの解析として、まず、 SiO_2 NP 曝露 THP-1 細胞における CD86 および CD54 発現に対する ROS 阻害の影響を評価した。感作性物質である 2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCB) および硫酸ニッケル、Ag NPs の曝露による CD86 および CD54 の発現亢進は、ROS 阻害剤 NAC での処理により抑制された。一方、 SiO_2 NPs による CD54 の発現亢進は NAC により抑制されなかった。

次に、ZnO NP 曝露 THP-1 細胞における CD86 および CD54 発現に対するマクロピノサイトーシス阻害剤 Amiloride の効果を評価した。ZnO NP 曝露により増加した

CD54 発現が Amiloride 処理により部分的に抑制された。

C.2.5. 遺伝子発現に基づく NM の抗原提示細胞活性化能の評価

ZnO NPs (MZ-500 および MZ-500HP) 曝露後の THP-1 細胞における遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した。これまでに NM 曝露により THP-1 細胞において発現が亢進することを確認済みの *CD86*, *CD54*, *MMP-12*, *CCL3*, *CCL5*, *IL1B* に加えて、*IL1A* 遺伝子の発現亢進が示された。

C.2.6. ヒト iPS 細胞肺胞マクロファージを用いた in vitro 試験法の開発

HiTRAM 細胞は代表的な皮膚感作性物質である DNCB 処理により、mRNA レベルにおいて CD54, CD86, IL-1b, CCL-3, CCL-5 および MMP-12 の発現を亢進した。HiTRAM 細胞および prec-HiTRAM 細胞に、THP-1 細胞において CD86 を除く各種バイオマーカーの発現亢進を誘導したナノシリカ NM-204 を処理したところ、CD54, IL-1b, CCL-3, CCL-5 および MMP-12 の発現亢進が認められた。一方 CD86 の発現亢進は THP-1 細胞同様認められなかった。また HiTRAM と THP-1 それぞれの細胞で同様の変化を示すものが多かったが、CCL3, CCL5, MMP12 などでは、条件によって THP-1 より強い変化が見られた。これらの結果を巻末に図で示した。また HiTRAM と肺胞オルガノイドの共培養を行うことができた。

C.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発と免疫毒性解析 (高橋、石丸、渡辺)

C.3.1. 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。

C.3.2. ナノシリカ吸入曝露実験

NM202 の全身吸入曝露による肺組織の病理組織学的評価

NM202 曝露後 4 週では、大きな変化は認められないが、高濃度曝露群の一部の肺組織に肺胞構造の乱れが観察された。肺の胸膜側に肺胞の狭窄する領域が認められ、強拡大での観察では、軽度の肺胞壁の肥厚、肺胞腔内に肺胞マクロファージの集簇像が確認された。曝露後 8 週では、肺胞構造の不明瞭な領域は高濃度曝露群で広がり、強拡大でも肺胞壁の肥厚、肺胞腔内での肺胞マクロファージの集簇像が目立つ部分が増加していた。

NM202 の全身吸入曝露による肺組織の線維化の評価

NM202 曝露によって肺組織の HE 染色において肺胞壁の肥厚は確認される部分があるものの、間質における線維化は確認できなかったため、マッソン・トリクロム

染色にて膠原線維増生の有無を検討した。曝露後 4 週の標本では膠原線維の増生は観察されなかったが、曝露後 8 週での高濃度曝露群にて脈管周囲の間質の一部に膠原線維の増生像が確認された。低濃度曝露群での膠原線維の増生は目立たなかった。

NM202 の全身吸入曝露による肺組織の肺胞マクロファージの変化

NM202 の吸入曝露によって、肺胞マクロファージの変化を F4/80 の発現を用いた免疫染色法による評価を行うと、F4/80 陽性肺胞マクロファージ数は高濃度曝露群で対象群に比較して増加していたが、対象群と曝露群では有意な差は認められなかった (。また、MARCO 分子の発現に関して免疫染色法にて検討すると、MARCO 陽性肺胞マクロファージが曝露群で対象群に比較して有意に増加していた。

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、本研究ではアマニ油を選択した。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。

アマニ油を溶媒として 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 20μL 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と顕微鏡を行った。溶媒対照群とDNCB投与群では、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。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。

C.4. NMのRSV感染マクロファージ機能への影響評価（渡辺）

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。

C.5. 既存情報とin vitro/in vivo研究データによるin silico解析（大野）

C.5.1. 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

令和7年度は、予備試験として実施したSiO₂ NMs (NM-200～NM-204)の物性データおよび既往のin vitro h-CLAT試験による毒性評価結果に加え、新たにin vivo 吸入曝露試験結果（指標：BALF中CCL5値）との関連性について検討した。

解析手法には、直交部分的最小二乗回帰分析（OPLS：Orthogonal Partial Least Squares Regression）を用いた。本解析では、説明変数（X）を物性項目、目的変数（Y）を毒性値（h-CLAT試験結果等）と設定し、物性から毒性を予測するモデルの構築を試みた。

【解析結果】

予備的な解析の結果、毒性の強さに寄与する複数の物性項目の組み合わせが特定

された。in vivo 吸入曝露試験結果との関連性解析において、毒性と強い関連（特に、値が小さいほど毒性が高まる傾向）が認められた共通の物性項目は以下の通りである。

- TEM測定による粒子径（nm）
- DLS（h-CLAT試験用凝集バッファ中）測定によるキュムラント法Z平均粒子径（nm）および多分散指数（PDI）
- EDS測定によるコーティング剤や不純物を含む非SiO₂成分の総量（% w/w）
- BET法測定による全細孔体積（mL/g）

【データベースへの対応】

一方、in vivo 吸入曝露試験の有害性情報に関しては、将来的に「HESS（化学物質の有害性評価支援システム統合プラットフォーム）」へ搭載することを目指し、データ整備を行った。具体的には、既存の規格化シートをひな形とし、収集したSiO₂ NMs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.5.2. 呼吸器感作性物質のin silicoによる特性解析

最終年度は、取得した微視的特徴量ならびに巨視的特徴量を記述子としてPLS-DA解析を実施した。

まず、微視的特徴量を用いた感作性判別を実施したところ、第1成分（t1）軸において感作性グループと非感作性グループを分離されることを見出した。特に、LUMOエネルギー、分子量、分子表面積、分子体積との関連性が見られた。また、各感作性を特徴付ける主要な物性値として以下の関連性を見出した。

- 呼吸器感作性：水素結合のアクセプター数、トポロジカル極性表面積
- 皮膚感作性：（正味電荷）

- ・ 非感作性物質：分子体積、分子量

一方、熱力学量を記述子とした感作性に関する PLS-DA 解析を実施した結果、t1 軸に関して呼吸器感作性グループと皮膚感作性および非感作性グループが分離されることを見出した。また、各感作性を特徴付ける物性値として、

- ・ 呼吸器感作性：融点、水溶解度
- ・ 皮膚感作性：蒸気圧、ヘンリーの法則
- ・ 非感作性物質：LogP、沸点

という関連性を見出すことができた。

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）

D1.1 肺胞マクロファージ活性化機構の解析

化学物質の免疫系への影響評価として *in vitro* ではマクロファージを用いた評価が行われる。現在、本研究課題においては、様々なヒト方法マクロファージ様細胞を用いた評価法の研究が進められている。しかしながらヒトの肺胞マクロファージにどの程度の不均一性が存在するのか、またそれがどのような遺伝子発現に違いとして分布しているのかについては、いまだ十分に明らかにされていない。そこで本研究では EPITHELIX 社より購入した2種のヒト肺胞マクロファージを用いてシングル RNA シーケンス解析を行うことで、その疑問の解決を試みた。

実験結果として sample0889 の解析結果は非常に安定しており、t-SNE プロットにより不均一性もはっきりと示された。また既知の肺胞マクロファージのシグネチャー遺伝子の分布も特定クラスターに集中していた。いくつかのクラスターは分化途中のマクロ

ファージであると考えており、現在 RNA velocity 解析により分化の方向性の解析を試みている。一方で、sample0940 では t-SNE プロットにおいて一つのクラスター用の構造を示したが、シグネチャー遺伝子の発現分布にバラツキが認められた。この要因は sample0889 と sample0940 のサンプルの違いに起因していると考えられ、データシートの情報から sample0889 は 20 代、sample0940 は 60 代のサンプルであった。一般に肺胞マクロファージは加齢に伴って本来の肺胞マクロファージの性質とは異なるマクロファージが増えてくると考えられていることから、若いサンプルである sample0889 の方が安定したクラスターを形成しているのではないかと考えられた。

また、マウスを使用した実験においては、最近研究分担者らが見出した微粒子応答に関連する遺伝子 X および遺伝子 Y について、それらの遺伝子欠損マウスを作製した。実際に微粒子と抗原の気道感作により誘導される抗原特異的 IgE 値を評価したところ、どちらの遺伝子欠損マウスにおいても IgE 値の低下が認められた。これらの遺伝子群を用いた微粒子の感作性試験への応用として、遺伝子 X および遺伝子 Y の活性化で誘導される因子に対するリポーター遺伝子を導入した肺胞マクロファージ細胞株を作製した。理論的には細胞株が微粒子によって活性化した際にルシフェラーゼを発現すると考えられ、現在、検討を行っている。

D1.2. *In vitro* 呼吸器感作性試験法の開発

今年度は、プロトコルの精密化や最適化のための測定条件を再検討すると、TNFSF4 発現増強の指標だけでは呼吸器と皮膚感作性の識別ができなくなった。そこで、さらに約 20 種類のマーカーを用いて検討す

ると、単独マーカーでの識別は不可であったが、9種類の候補分子の内、例えば4種類の複数分子を指標にすると、両者の識別が可能となった。この内、NOTCH2は、Th2分化に関与するcCD2細胞への分化誘導に関与し、約半分近い呼吸器感作性化学物質で陽性と判定された。一方、DECTIN2(C型レクチン受容体でTh17分化誘導に関与)は、皮膚感作性化学物質で高い傾向で、呼吸器と非感作性化学物質では、殆ど上昇が見られず、指標の一つになる可能性もあると考えられる。

HDIが偽陰性なのは、TDIと同様にジイソシアネートで、水と急速に反応し分解されるためと考えられる。EUとIEUが、CD80の他、CRLP2やIL-7R α 、TIM-1の発現で偽陽性であった。今回の23個の化学物質の内、これら2個の化学物質のみがプロハプテンで、そのためか、気管支上皮細胞を用いると、特に強い反応が誘導されているようにも見えるが、その理由は不明である。これらのプロハプテンを除くと、使えるマーカーも増えてくるので、今後の評価系の最適化の検討課題の一つと考えている。

呼吸器感作性発症の機序は複雑であるため、その評価法も簡単ではなく、現在、複数の方法を組み合わせて総合的に評価するIATAの開発も進められている。今回、イソプロパノール(IP)が、擬陽性になってしまったが、IATAを用いて、まずh-CLATなどで皮膚感作性の有無で判定すれば、このような問題も減り予測性が高くなることが期待される。

理想的には、陽性と陰性サンプルのいわゆるS/N比が高く、それぞれのマーカーで陽性になる化学物質も複数あり、それらがオーバーラップしていた方が、より確から

しいと考えられる。今後、WST-8アッセイでの細胞生存率CV%を基に評価法を改善し最適化し、再現性と予測性の高い評価法の開発を目指して、さらに、検討を進めていく予定である。

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、黒田)

D.2.1. ZnO NPsのキャラクタリゼーション

ZnO NPsについて、TEM形態観察およびTEM-EDXによる元素マッピングを行い、MZ-500HPおよびMZN-B0HPがシリカにより被覆されていることが確認された。これまでのプローブ型超音波装置により分散させたZnO NPs分散液を用いた検討では、被覆の有無によりZnO NPs分散液からの亜鉛イオンの溶出およびTHP-1細胞曝露後のCD54発現の差異はみられなかった。プローブ型超音波装置による分散過程で被覆層が剥離している可能性を考え、ボルテックスにより懸濁液を調製した。結果、水中においては被覆による亜鉛イオンの溶出の抑制がみられた。

D.2.2. 被覆ZnO NPによるTHP-1細胞活性化能の評価

D.2.1.の通り、超音波処理による分散がZnO NPsの被覆にダメージを与えている可能性が示されたため、改めてボルテックスにより分散させたMZN-B0およびMZN-B0HP分散液を用い、被覆がZnO NPsによるTHP-1細胞活性化能に与える影響を評価したところ、MZN-B0HP曝露THP-1細胞におけるCD54はMZN-B0曝露のものより高発現であった。亜鉛イオンの溶出抑制によるCD54発現抑制を予想していたが、それと反する結果であった。SiO₂ NPsもTHP-1細胞におけるCD54発現を亢進することか

ら、被覆されたシリカによっても活性化が誘起された可能性が考えられる。

D.2.3. MWCNT の細胞内取り込み挙動の解析

これまでに MWCNT T-MWCNT-7 (分散型) への曝露が THP-1 細胞において CD54 の発現を亢進することが示されている。光学顕微鏡観察より、THP-1 による T-MWCNT-7 の取り込みが示され、取り込みにより THP-1 細胞が活性化している可能性が示唆された。

D.2.4. NM による THP-1 細胞活性化能メカニズムの解析

低分子および金属イオンの感作性物質および Ag NPs 曝露による CD86 および CD54 の発現亢進は ROS 阻害剤 NAC による処理により抑制され、それらの物質による THP-1 細胞の活性化は ROS を介する経路により引き起こされていることが示された。一方、SiO₂ NPs による CD54 の発現亢進は NAC により抑制されなかったことから、ROS に依存しない経路により活性化されている可能性が示唆された。

また、ZnO NP 曝露により増加した CD54 発現は Amiloride 処理により部分的に抑制され、ZnO NPs 曝露による THP-1 細胞の活性化には少なくとも粒子として取り込まれた ZnO NPs が寄与していることが示された。一方、Amiloride による抑制効果は、過去に評価したイオン化しない SiO NPs に対する効果よりも低く、亜鉛イオンによる活性化の可能性も考えられた。

D.2.5. 遺伝子発現に基づく NM の抗原提示細胞活性化能の評価

NM 曝露による遺伝子変化の解析は、活

性化メカニズムの解明および新たな評価指標の探索につながる。今回、ZnO NPs のうち MZ-500 および MZ-500HP 曝露により THP-1 細胞において発現が亢進することを確認済みの遺伝子に加え、*IL1A* 遺伝子の発現が亢進することを見出した。*IL1A* 遺伝子がコードする IL-1 α は研究分担者黒田教授のグループにおいて微粒子に応答してマクロファージより放出される因子として同定されており、THP-1 細胞においても NM に応答して *IL1A* 遺伝子が発現亢進されること、新たな評価指標として使用できる可能性が示された。

D.2.6. ヒト iPS 細胞肺胞マクロファージを用いた in vitro 試験法の開発

代表的な抗原提示細胞活性化物質である DNCB に対する反応性試験結果から、HiTRAM と THP-1 とでは至適培養条件や応答性の違いがあったことから、HiTRAM の最適化条件において、NM 存在下におけるバイオマーカーの検出を行った。まず、両細胞でバイオマーカーのベースの発現量が大きく異なっていた。続いてナノシリカ NM204 に曝露したところ、HiTRAM と THP-1 で同様の変化を示すものが多かったが、CCL3, CCL5, MMP12 などでは、条件によって THP-1 より強い変化が見られたことから、NM による活性化検出能の観点から HiTRAM は優れている可能性があると考えられた。ただし活性化させる NM-204 の濃度について両細胞に大きな違いはなかった。いずれにしてもヒト末梢血単核球である THP-1 細胞よりヒト肺胞マクロファージに近い HiTRAM において NM による活性化が検出できたことは、今後本細胞を用いた吸入曝露による NM の免疫毒性評価 in vitro 試験法開発の重要な一歩になると考えられた。HiTRA

M と肺胞オルガノイドとの共培養系については、今後バイオマーカー候補の発現量に関してHiTRAM単独の場合と比較検討する必要があると考えられた。

D.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発と免疫毒性解析（高橋、石丸、渡辺）

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 中で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。

本年度は昨年度からの継続研究として、NM202 の全身吸入曝露による肺組織の病理学的解析に焦点を当てた解析を進めた。前年度までに MARCO 分子の重要性が *in vitro* および *in vivo* の実験から示されていたことから、本年度の解析結果を踏まえ、シリカナノマテリアルの曝露による肺胞マクロファージの活性化における MARCO 分子が重要なマーカーになることが確認

された。前年度における *in vivo* 実験の BALF 細胞の Marco mRNA 発現、*in vitro* における RAW264.7 細胞を用いた実験の結果とも矛盾しない結果であることから、MARCO 分子がナノマテリアルの曝露によって発現が大きく変動することが明らかになった。

MARCO 分子はスカベンジャー受容体であり、Pattern recognition receptor の一つと考えられている。多陰性分子や低密度リポタンパク質 (LDL) と呼ばれるコレステロールの修飾型タンパクに結合することが知られている。また、シリカなどのナノマテリアルに対しての反応性も報告されていることから、本研究の結果もこれまでの報告と矛盾するものではない。一方で、MARCO 分子を介したシグナル伝達の詳細な分子機構やナノマテリアルの認識機構やその分子制御機構に関しては不明な点が多い。今後、シリカを含めたナノマテリアルによる MARCO 分子を介したマクロファージの反応性が従来報告されてきた微生物との反応性の詳細な相違に関して明らかにすることによって、ナノマテリアルに対する詳細な免疫反応ならびに免疫毒性が解明される可能性がある。

D.4. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価（渡辺）

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。

D.5. 既存情報と *in vitro*/*in vivo* 研究データによる *in silico* 解析 (大野)

D.5.1. 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

二酸化ケイ素ナノマテリアル (SiO₂ NMs) の特性解析に関する *in vivo* 吸入曝露試験 (指標: BALF 中 CCL5 値) の結果は、先行研究である *in vitro* h-CLAT 試験の結果と整合し、対象とした SiO₂ NMs (NM-201, NM-202, NM-204) すべてにおいて陽性反応が認められた。毒性の強さは「NM-201 < NM-202 < NM-204」の順であり、NM-204 において最も高い CCL5 値が観測された。

本解析の結果、粒子径が小さく、不純物による表面被覆が少ない高純度な粒子、かつ多孔質ではないソリッドな構造を持つ SiO₂ NMs において、BALF 中 CCL5 の上昇が顕著であることが示唆された。そのメカニズムとして、第一に「微細化によるマクロファージへの取り込み効率の促進」が挙げられる。マクロファージは数百 nm 以下の微細な粒子を貪食しやすい傾向があり、PDI が小さく巨大凝集が少ない粒子特性がこれを助長したと考えられる。加えて、微細化による総表面積の増大が細胞内小器官との接触面積を広げ、ROS 産生や炎症シグナル (NF-κB 経路等) を活性化させたものと推察される。第二に「不純物の欠如による活性シラノール基の露出」が考えられる。非 SiO₂ 成分が少ない粒子は表面のマスクング効果が乏しく、露出した活性シラノール基 (Si-OH) が細胞膜成分と直接相互作用することで、より強い攻撃性 (膜損傷・炎症惹起能) を示したと考えられる。

D.5.2. 呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析

呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析に関して、今回実施した熱力学量を記述子とした分類解析では、呼吸器感作性グループと皮膚感作性および非感作性グループの分離に成功した。これは、昨年度の微視的量を用いた解析での、呼吸器感作性および皮膚感作性グループと非感作性グループの分離と異なる結果であった。どちらも単独では三つの感作性を完全に分離するものではなかった一方で、微視的量による分類は感作性そのものの有無を分離し、熱力学量は (非感作性物質を除けば) 感作対象組織を分離することを表している。これは、各器官の表面への付着と化学的な細胞への影響 (反応性) を微視的 (情報化学・量子化学的) 性質が反映し、各器官への影響の違いを巨視的 (熱力学的) 性質が反映している可能性を示唆するものである。

この仮説が正しければ、微視的性質による分類と巨視的性質による分類を段階的に組み合わせることで、三つの感作性を分離できる可能性がある。今後、量子化学計算レベルの高精度化や今回除外された熱力学量等を加味した記述子を元に分類の高精度化が期待されるところである。

E. 結論

E.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)

E1.1 肺胞マクロファージ活性化機構の解析

ヒト肺胞マクロファージのシングルセル RNA シーケンス解析を行い、ヒト肺胞マクロファージの不均一性とそれを定義づける種々の遺伝子群を明らかにすることができ

た。また本研究において評価法として注目している遺伝子が発現していることも確認した。

またマウスを用いた実験において、微粒子の気道感作性に関与する遺伝子を見出し、その欠損マウスでは微粒子の気道感作によって誘導される IgE 産生の低下が認められた。

E1.2. In vitro 呼吸器感作性試験法の開発

今年度は、DCsens のプロトコルの精密化や最適化のため測定条件の再検討を行い、プロトコルの改善を試みた。その結果、合計 23 個の化学物質を用いて検討した結果、TNFSF4 などの単独のマーカー分子では呼吸器と皮膚感作性が識別できなくなったが、TNFSF4 の他に、ST2、CD1A、NOTCH2 などの複数の分子と組み合わせると、両者の識別が可能である可能性が示された。

E.2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発（足利、飯島、黒田）

THP-1 細胞の活性化を指標とした評価法の開発に向け、ナノマテリアル曝露による THP-1 細胞の活性化メカニズムについて、特に、細胞内取り込みおよび ROS の関与を中心に解析を進めた。ZnO NPs による THP-1 細胞活性化においては、ナノ粒子取り込みが活性化に関与している可能性が示され、SiO₂ NPs については ROS に依存しない経路による活性化が示唆された。評価マーカーの探索を行い、IL1A 遺伝子が利用できる可能性を示した。

THP-1 細胞よりヒト肺胞マクロファージに近い HiTRAM において NM による活性化が検出でき、一部のバイオマーカーについては HiTRAM 細胞の方が反応性が高かったことから、今後本細胞を用いた吸入曝

露による NM の免疫毒性評価 in vitro 試験法開発が可能になったと考える。

E.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発と免疫毒性評価（高橋、石丸、渡辺）

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。

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。

ナノシリカの曝露による肺胞マクロファージの活性化には MARCO 分子が重要な役割を果たしていることが明らかになり、MARCO 分子がナノマテリアルの重要なバイオマーカーの一つになる可能性が示された。

E.4. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価（渡辺）

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。

E.5. 既存情報と in vitro/in vivo 研究データによる in silico 解析（大野）

E.5.1. 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

化学物質の安全性評価において、物理化学的性状 (物性) と毒性データの関連性を解明することは不可欠である。本研究を通じて、ナノマテリアルから低分子化学物質に至るまで、物性と毒性データの間に有意な相関関係が存在することが確認され、統合的な解析が新たな毒性予測手法の開発に資することが示された。今後は、多面的な物性情報と毒性指標との相関性を詳細に検証することで、より信頼性の高い安全性評価システムの構築に貢献することを目指す。

また、呼吸器感作性物質の *in silico* による特性解析では、微視的分類と巨視的分類を段階的に組み合わせることで、呼吸器感作性、皮膚感作性、および非感作性の高精度な分類体系を確立する。そのために、量子化学計算レベルの高精度化や、熱力学量等を加味した新たな記述子の拡充を行い、*in silico* による特性解析および感作性判別の高度化を推進していく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Nishida M, Otsuka K, Nagao R, Matsuzawa S, Ushio A, Tsunematsu T, Aota K, Ishimaru N. Tissue-Specific Expansion of Age-Associated B Cells via IFN- γ and IL-21 Within Salivary Glands in Sjögren Disease. *J Immunol Res*. 2026;4221251.
2. Matsuzawa S, Ushio A, Otsuka K, Nagao R, Tsunematsu T, Moriyama M, Ishimaru N. Neonatal Thymic Dynamics Influence Autoimmune Pathology by Shaping the Suppressive Potential of Regulatory T Cells. *Am J Pathol*. 2026;196:920-933
3. Ishigamori R, Ohno A, Fukuhara K, Hasegawa S, Totsuka Y, Genotoxicity assessment of mesoporous silica and graphene oxide in GDL1 cells. *Genes Environ*. 2026;48:2.
4. Atobe T, Chawapun S, Hatakeyama Y, Oeda S, Ohtake T, Ashikaga T, Kouzuki H, Hirota M, Tamura A. Optimisation of Photo-KeratinoSens™ for *in vitro* photoallergenicity assessment, *J Toxicol. Sci.*, 2025;50(8):399-412.
5. Nagao R, Otsuka K, Matsuzawa S, Ushio A, Tsunematsu T, Ishimaru N. Differential chemokine profiles between lacrimal and salivary glands in a murine model of primary Sjögren disease. *Cytokine*, 196:157023, 2025.
6. Otsuka K, Ushio A, Nagao R, Matsuzawa S, Arakaki R, Fukuta K, Mouri Y, Tsunematsu T, Ishimaru N. Regulatory Role of FGL-1 in Inter-Organ Communication by Controlling T Cell Homeostasis during the Onset of Sjögren Disease. *Arthritis Rheumatol*. 2025;77(11):1573-1584.
7. Kobayashi H, Fukuhara K, Ohno A, Hirao Y, Katoh H, Mori Y, Kawanishi S, Murata M, Oikawa S. The Chinese herb component salvianolic acid B induces copper-mediated reactive oxygen species generation and oxidative DNA damage, *Genes Environ*. 2025;47(1):20.
8. 足利太可雄: 動物実験代替法の標準化と JaCVAM の役割, *Drug Delivery System*, 2025; 40(4):297-303.

9. 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*, 2025;16(1,2,3,4):41-45.
 10. Fukuhara K, Obama T, Ohinata H, Takaki T, Kato M, Ishigamori R, Totsuka Y, Itabe H, Ohno A, Evaluation of graphene oxide-mediated NET formation using HL-60-derived neutrophil-like cells. *Preprint at bioRxiv*. 2025.
- G.2. 学会発表
1. 山本安希子, 石丸直澄, 浅野正岳, MASH モデルマウスの肝ミトコンドリアに対する病理及び生化学的解析 第 114 回日本病理学会総会 (2025.4.17)
 2. 永尾瑠佳, 山本安希子, 牛尾綾, 大塚邦紘, 松澤鎮史, 常松貴明, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける *Trat1* を介した T 細胞活性化抑制機構の解析 第 114 回日本病理学会総会 (2025.4.17)
 3. 大塚邦紘, 近藤博之, 常松貴明, 石丸直澄, 安友康二 T 細胞と線維芽細胞の相互作用によるシェーグレン症候群の増悪機構 第 114 回日本病理学会総会 (2025.4.17)
 4. 布川裕規, 清水六花, 黒嶋雄志, 石丸直澄 下顎骨に発生した硬化性歯原性癌 4 例の臨床病理学的検討 第 114 回日本病理学会総会 (2025.4.17)
 5. 牛尾綾, 布川裕規, 大塚邦紘, 常松貴明, 高橋祐次, 石丸直澄 二酸化ケイ素暴露が肺胞マクロファージを介して免疫毒性へ与える影響 第 114 回日本病理学会総会 (2025.4.18)
 6. 松澤鎮史, 牛尾綾, 永尾瑠佳, 大塚邦紘, 常松貴明, 石丸直澄 新生仔胸腺におけるオートファジーを介した自己免疫疾患に関わる T 細胞分化 第 114 回日本病理学会総会 (2025.4.18)
 7. 俵宏彰, 常松貴明, 永尾瑠佳, 松澤鎮史, 大塚邦紘, 牛尾綾, 石丸直澄 頭頸部扁平上皮癌の分化を決定づける転写因子ネットワークの解明 第 114 回日本病理学会総会 (2025.4.18)
 8. 常松貴明, 俵宏彰, 永尾瑠佳, 松澤鎮史, 大塚邦紘, 牛尾綾, 石丸直澄 HPV 陽性癌における新規脱ユビキチン化酵素複合体の機能解析 第 114 回日本病理学会総会 (2025.4.19)
 9. Ashikaga T: NAMs development in Japan: Past, Present and Future, International Workshop on the Standardization and Validation of Advanced Alternative Testing Methods (2025.4.29)
 10. 小林果, 平生祐一郎, 福原潔, 大野彰子, 森有利絵, 川西正祐, 村田真理子, 及川伸二: 天然ポリフェノール *Salvianolic acid B* による活性酸素生成および DNA 損傷, 第 78 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2025.5.23)
 11. 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)
 12. 佐竹里野, 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: 皮膚感作性強度予測のための機械学習モデルの開発～アミノ酸誘導体結合性試験 ADRA の活用～, 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.2)
 13. 森華奈子, 足利太可雄, 小野美都穂, 江畑知憲, 杉本航, 田中利男, 平田普三, 小島肇: ゼブラフィッシュを用いた発

- 生毒性試験代替法の現状および動向, 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.3)
14. Nishimura T, Hirabayashi Y, Ogawa K, Tsunoda S, Suzuki M, Sato G, Toyoda T, Taquahashi Y, 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)
 15. 大野彰子, 赤木純一, 爲廣紀正, 広瀬明彦, 小川久美子: 食品等に含まれるナノマテリアルに関する国際的な安全性評価への取り組み, 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.4)
 16. 石井麻美, 牛尾綾, 布川裕規, 木下祐理, 石丸直澄, 自己免疫疾患モデルマウスにおける視床下部 IL-6 発現を介した神経免疫関連と抑うつ行動 第 42 回分子病理学研究会 八景島シンポジウム (2025.7.11)
 17. 茂木祐人, 布川裕規, 牛尾綾, 石丸直澄 マウス頭頸部扁平上皮癌細胞による腫瘍関連マクロファージの分化誘導とい腫瘍機能への影響 第 42 回分子病理学研究会 八景島シンポジウム (2025.7.11)
 18. Ashikaga T: Development of IATA for respiratory sensitization based on the AOP and the status of DRP development in OECD, RIFM Respiratory Research Workshop (2025.7.15)
 19. Yoshimoto T. Predictive potential of chemical respiratory sensitization using DC coculture (DCsens) and two-step DC/T cell coculture (DC/Tsens) systems. RIFM Respiratory Research Workshop: Future Forward (2025.7.15-16)
 20. Ohno A, Okiyama Y, Iijima K, Ashikaga T: Relationship analysis between the effects of MWCNTs on THP-1 cells and their physical properties, American Chemical Society (ACS) Fall 2025 (2025.8.19)
 21. Fukuhara K, Ohno A: Investigation of Graphene Oxide Induced NET Formation Using HL-60-Derived Neutrophils as a Model for Immunotoxicity Evaluation, American Chemical Society (ACS) Fall 2025 (2025.8.19)
 22. 足利太可雄: 国内外の動物実験代替法開発に関する最新動向, 2025 年度日本動物実験代替法学会企画委員会主催講習会 (2025.8.28)
 23. 足利太可雄: JaCVAM における動物実験代替法の公定化と行政活用への取り組み, 2025 年日化協 L R I 研究報告会 (2025.8.29)
 24. Ashikaga T: Development and regulatory acceptance of NAMs in Japan: Current status and future, 13th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC13) (2025.9.3)
 25. 小池英子, 足利太可雄: In vitro 呼吸器感作性試験の行政活用における国際動向と JaCVAM の取り組み, 第 32 回日本免疫毒性学会学術年会 (2025.9.5)
 26. 青島萌乃歌, 松村一史, 田邊郁也, 石川晋吉, 溝口出, 善本隆之, 足利太可雄: 化学物質の in vitro 呼吸器感作性評価における再構成ヒト気管支上皮の活用, 第 32 回日本免疫毒性学会学術年会 (2025.9.5)
 27. 溝口出, 戸田翔太, 山口夏輝, 堀尾恵里, 片平泰弘, 五十嵐美樹, 宮川聡美, 曲寧, 足利太可雄, 善本隆之: 呼吸器感作性化学物質の予測評価を可能にする 3

- 次元共培養系の開発, 第 32 回日本免疫毒性学会学術年会 (2025.9.5)
28. 戸田翔太, 溝口出, 片平泰弘, 宮川聡美, 山口夏輝, 堀尾恵里, 五十嵐美樹, 曲寧, 足利太可雄, 善本隆之: Development of a coculture system of Fcγreceptor+ cell and antibody-targeted cell lines to predict cytokine release syndrome caused by antibody drugs, 第 32 回日本免疫毒性学会学術年会 (2025.9.5)
 29. 山崎大樹, 木村啓志, 足利太可雄, 堀武志, 佐藤薫, 最上由香里, 石田誠一: 生体模倣システム (MPS) の行政的利用の推進戦略と評価法構築での考慮事項, 第 15 回 レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2025.9.6)
 30. 牛尾綾, 木下裕理, 石井麻未, 布川裕規, 石丸直澄: シェーグレン症候群モデルマウスの骨髄環境における B 細胞分化機構の解明 第 67 回歯科基礎医学会学術大会 (2025.9.6)
 31. 四釜洋介, 吉田佳世, 大塚邦紘, 石丸直澄 加齢および自己免疫疾患に起因する唾液腺の線維化・リンパ球集積に対する上皮間葉転換 (EMT) の関与 第 67 回歯科基礎医学会学術大会 (2025.9.7)
 32. 善本隆之, 戸田翔太, 片平泰弘, 山口夏輝, 堀尾江里, 宮川聡美, 五十嵐美樹, 曲寧, 溝口出: ヒト免疫細胞株の培養系を用いた免疫毒性評価法のための動物実験代替法の開発, BioJAPAN (2025.9.8-10)
 33. 石丸直澄 臓器間ネットワークを介したシェーグレン病の発症機序の解明 第 33 回シェーグレン症候群学会学術集会 (2025.9.20 東京都大田区)
 34. 石井麻未, 牛尾綾, 布川裕規, 木下裕理, 石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける視床下部 IL-6 と抑うつ様行動の関連性 第 33 回シェーグレン症候群学会学術集会 (2025.9.20)
 35. Taquahashi Y, Morita K, Suga K, Tsuji M, Aisaki KEEG Measurement and Its Potential for Toxicity Studies in Rats Using Carbon Nanotube Yarn Surface Electrodes, ICT2025, Beijing, CHINA (2025.10.15)
 36. Kuroda E. Molecular mechanisms of particulate-induced inflammation and allergy in lung immunity. IUTOX 17th International Congress of Toxicology (2025.10.17)
 37. 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)
 38. 戸田翔太, 溝口出, 山口夏輝, 堀尾江里, 宮川聡美, 片平泰弘, 五十嵐美樹, 曲寧, 黒田悦史, 足利太可雄, 善本隆之: ナノ粒子の免疫毒性評価に応用可能なヒト肺胞マクロファージ様細胞株の開発, 第 38 回日本動物実験代替法学会 (2025.11.1-3)
 39. 茂木祐人, 布川裕規, 牛尾綾, 原田浩之, 石丸直澄 マウス頭頸部扁平上皮癌細胞による腫瘍関連マクロファージの分化誘導と腫瘍機能への影響 第 61 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2025.11.22)
 40. 永尾瑠佳, 牛尾綾, 常松貴明, 石丸直澄 シェーグレン症候群マウスモデルにおける自己反応性 T 細胞調節機

- 構の解明 第 61 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2025.11.22)
41. 中村勇亮, 布川裕規, 牛尾綾, 石丸直澄 破骨細胞由来因子のマウス頭頸部扁平上皮癌細胞への影響 第 61 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2025.11.22)
 42. Ashikaga T, Mizoguchi I, Yoshimoto T. Development of integrated approaches to testing and assessment for respiratory sensitization based on the AOP. International Conference on Stem Cell and Organoid Biology (ICSCOB-25), (2025.11.25-2)
 43. 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: イオン溶出および細胞内取り込みに着目した酸化亜鉛ナノ粒子による THP-1 細胞活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1)
 44. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: シリカナノ粒子による THP-1 細胞活性化における酸化ストレスと吸着イオンの影響, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.2)
 45. 佐竹里野, 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: Next Generation Risk Assessment 事例研究: 酸化染料を用いた定量的皮膚感作性リスク評価, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1)
 46. 浦本七海, 足利太可雄, 尾形信一: h-CLAT を用いた発熱性物質に応答する CD54 の発現経路の解析, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1)
 47. 戸田翔太, 溝口出, 山口夏輝, 堀尾江里, 宮川聡美, 片平泰弘, 五十嵐美樹, 曲寧, 黒田悦史, 足利太可雄, 善本隆之: ナノ粒子の免疫毒性評価に応用可能なヒト肺胞マクロファージ様細胞株の開発, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.1)
 48. 岩佐帆乃夏, 波多野浩太, 佐竹里野, 徳永朱莉, 木下啓, 中村伸昭, 足利太可雄, 安部賀央里: 皮膚感作性強度予測モデルを使用した混合物の感作性強度評価, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.2)
 49. 足利太可雄: 化粧品・医薬部外品の安全性評価における代替法の開発動向 — 局所毒性を中心に —, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.3)
 50. 足利太可雄: 化粧品における NAMs 技術の受け入れ状況とこれから — 全身毒性を中心に —, 日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.3)
 51. 石ケ守 里加子, 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包括的毒性評価, 日本環境変異原ゲノム学会大 54 回大会 (2025.11.22)
 52. Ashikaga T, Mizoguchi I, Yoshimoto T: Development of Integrated Approaches to Testing and Assessment for respiratory sensitization based on the AOP, International Conference on Stem Cell and Organoid Biology (ICSCOB-25) (2025.11.25-26)
 53. 大野彰子, アドバンスドマテリアルを利用した医薬品・医療機器等の安全性評価に資する研究, 第 10 回日本医療研究開発機構レギュラトリーサイエンス公開シンポジウム (2025.12.3)
 54. Iijima K, Ishibashi N, Sakamoto R, Nishida A, Arai R, Ohno A, Ashikaga T. Activation

- of Human Monocytic Cell Line THP-1 Cells after Exposure to Nanomaterials in Monoculture and Co-culture with Bronchial Models, Materials Research Meeting 2025 (MRM2025), Oral Presentation (2025.12.8-13)
55. Matsuzawa S, Ushio A, Nagao R, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N. The regulatory role of neonatal thymic microenvironment in the onset of autoimmunity. 第 54 回日本免疫学会学術集会 (2025.12.10)
56. 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, 日本毒性学会医薬品毒性機序研究会 (2025. 12.11)
57. Ishii A, Ushio A, Fukawa Y, Kinoshita Y, Ishimaru N. Immunological effect on neuropsychiatric symptoms in Sjögren's syndrome models. 第 54 回日本免疫学会学術集会 (2025.12.12)
58. Kinoshita Y, Ushio A, Fukawa Y, Ishii A, Matsumoto Y, Ono T, Ishimaru N. B cell dynamics in the bone marrow of Sjögren's syndrome model mice. 第 54 回日本免疫学会学術集会 (2025.12.12)
59. Nagao R, Yamamoto A, Ushio A, Otsuka K, Matsuzawa S, Tsunematsu T, Ishimaru N. Analysis of suppressive mechanism for T cell activation via Tratl in Sjögren's syndrome model mice. 第 54 回日本免疫学会学術集会 (2025.12.12)
60. Toda S, Mizoguchi I, Katahira Y, Yamaguchi N, Horio E, Miyakawa S, Qu N, Kuroda E, Ashikaga T, Yoshimoto T. Development of human alveolar macrophage model cell lines for the assessment of immunotoxicity of nanoparticles. 2026SOT (The SOT 65th Annual Meeting) (2026.3.22-25)
61. 福原 潔, 大野彰子, 医療機器におけるナノマテリアル NETs 誘導を介した遺伝毒性への新たな視点, 日本薬学会第 146 年会 (2026.3.27)

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：ナノ粒子の免疫毒性の評価方法、免疫毒性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、戸田翔太
出願人：学校法人 東京医科大学

出願日：2025 年 7 月 28 日

出願番号：特願 2025-125310

2. 実用新案登録

なし

3. その他

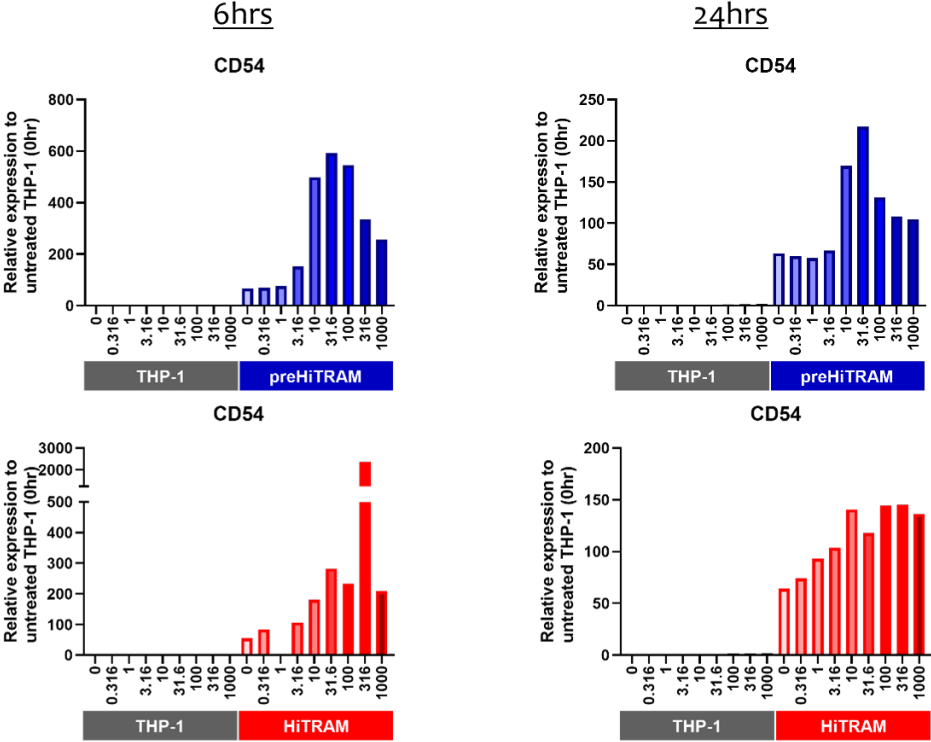
なし

【謝辞】

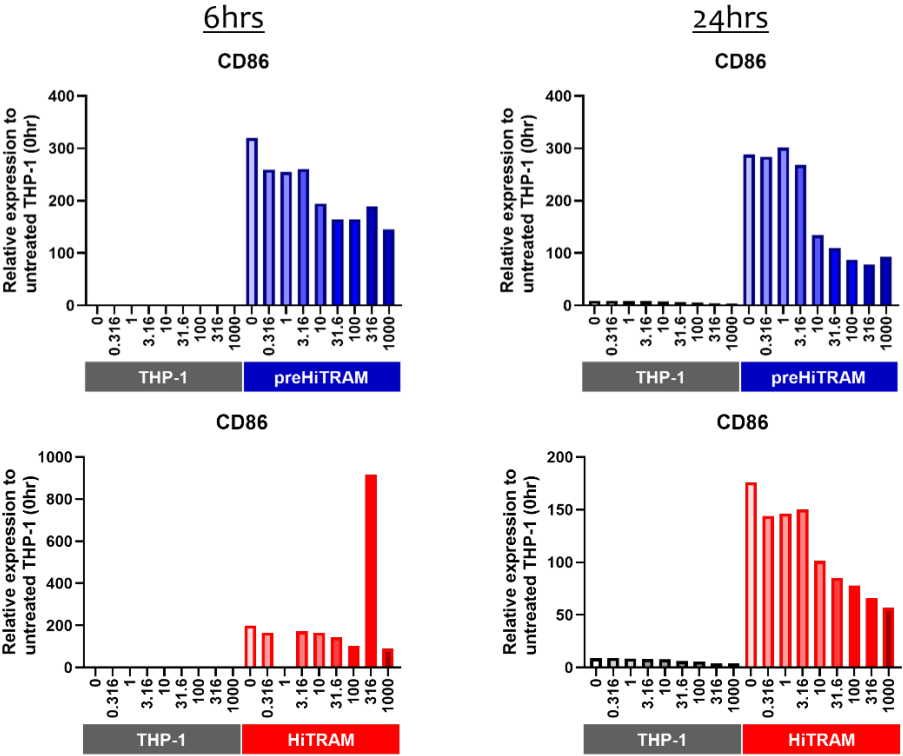
The test materials used in this study were three types of SiO₂ NMs (NM-201, NM-202, and NM-204) provided by the JRC Nanomaterials Repository (Ispra). We would like to express our sincere gratitude to the JRC Nanomaterials Repository for their generous contribution of these materials.

図 HiTRAM に対する NM-204 曝露の効果

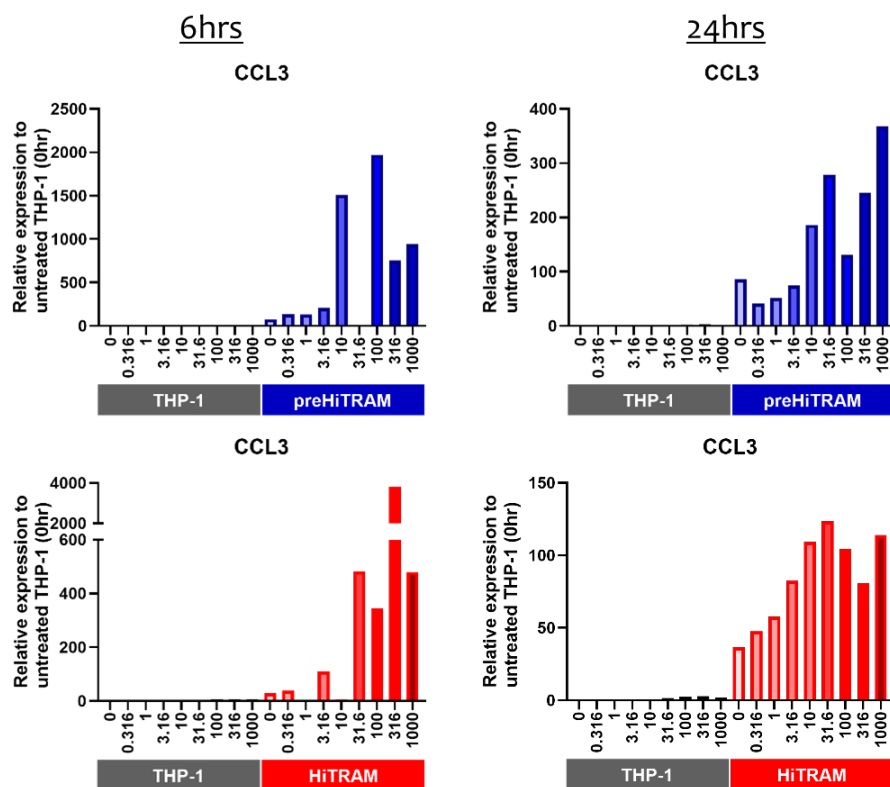
CD54



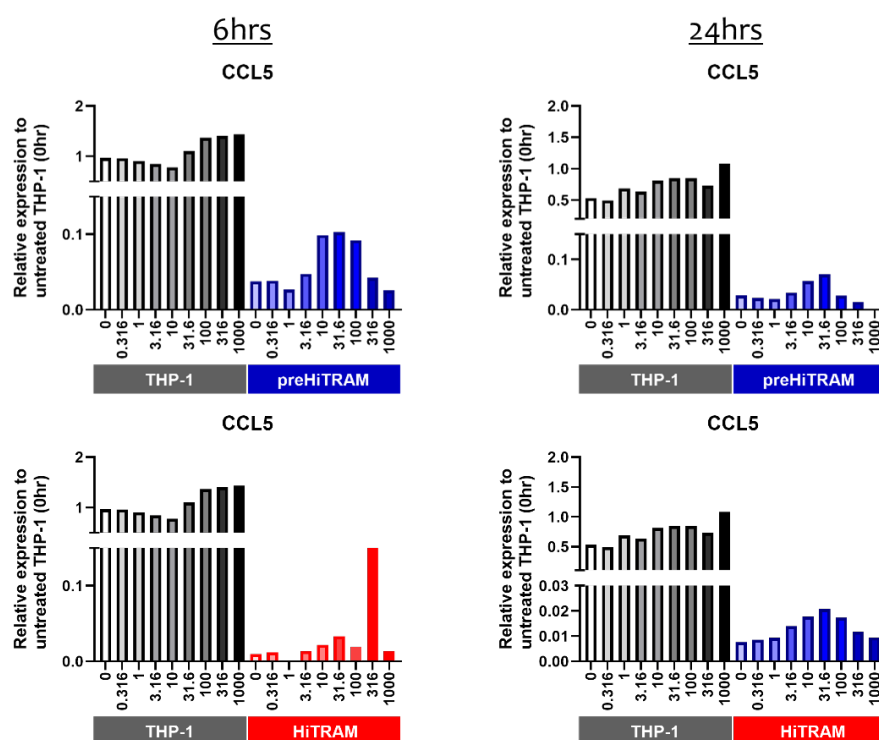
CD86



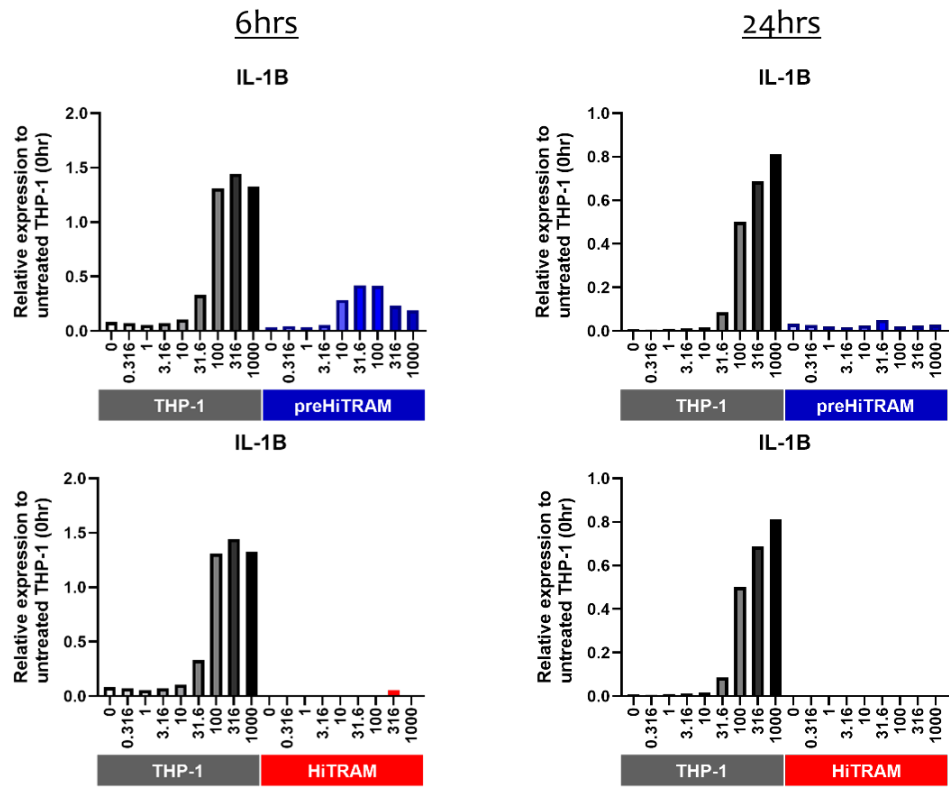
CCL3



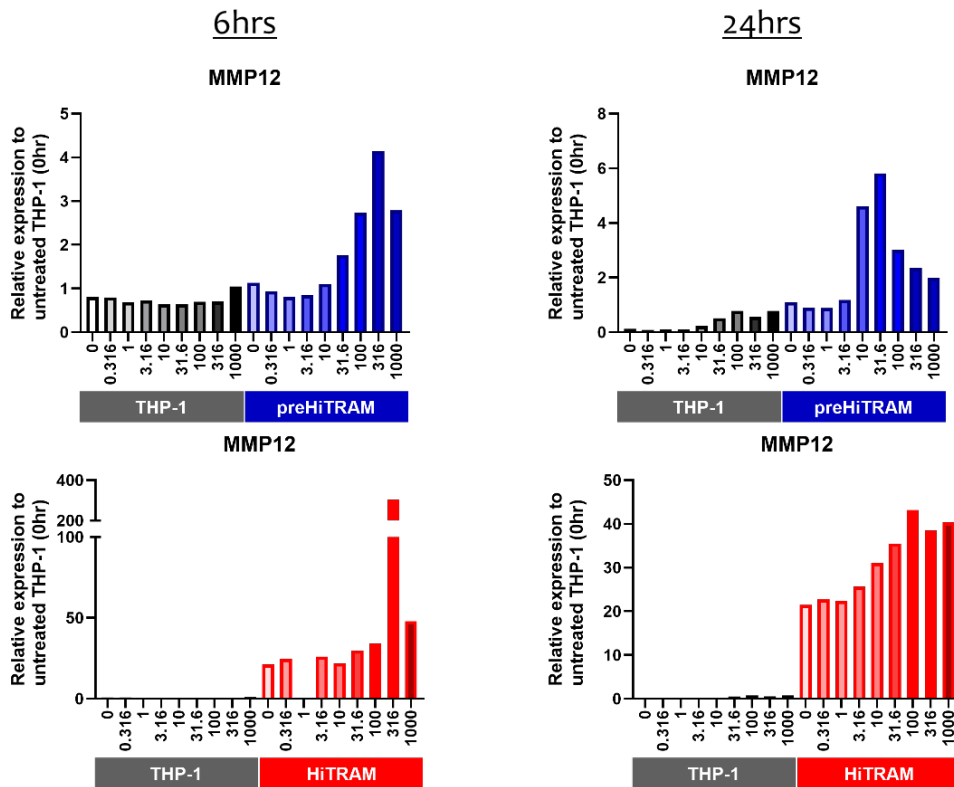
CCL5



IL1B



MMP12



IL1A

