

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5～7年度 総合研究報告書

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 呼吸器感作性試験法の開発については、ヒト気管支上皮細胞株 BEAS-2B とヒト単球細胞株 CD14-ML 由来未成熟樹状細胞 (DC) の scaffold を用いた 3 次元 DC 共培養系を構築し、皮膚感作性と呼吸器感作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、両者を識別可能な新たなバイオマーカー候補を見出した。なお、本試験法は OECD において *in vitro* 呼吸器感作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。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、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。

吸入曝露された NM の *in vitro* 免疫毒性評価法の開発については、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、バイオマーカー候補の探索を行い、*IL1A* 遺伝子および *MACRO* 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候補については 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、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。こうした *in vivo* 及び *in silico* 研究から得られた知見は、開発する *in vitro* 試験法の理論的妥当性の基盤情報となることが期待される。

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

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

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) 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

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 Sicastar-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 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 を用い、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 ウェルプレートの各ウェルへ各 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 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-1 β , 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。

B.3. *In vivo* 吸入曝露実験方法の開発

B.3.1. ナノシリカ吸入曝露 RSV 感染実験

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。

B.3.2. ナノシリカ吸入曝露実験

R 6 年度より継続して実施している NM202 の吸入曝露実験での肺組織の病理組織切片を作成した上で、HE 染色、Masson-Trichrome 染色による線維化の評価を実施した。さらに、NM202 吸入曝露マウスの肺のパラフィンプロック切片を用いて、マクロファージを検出するために F4/80 抗体にて免疫染色を実施した。一方で、*in vitro* での RAW264.7 マクロファージ細胞株を用いた検証では、昨年度に NM202 の添加曝露によって変化が観察された MARCO の mRNA などマクロファージ関連遺伝子および細胞表面タンパク発現を定量 RT-PCR および Flow cytometry 解析にて検討を加えた（石丸）。

先行研究で開発した全身ばく露吸入装置（Taquann 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。対照群は HEPA フィルターで濾過したクリーンエアーを吸入させた。エアロゾルの目標濃度は、低濃度群 10 mg/m³、高濃度群 30 mg/m³ とした。（高橋）。

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呼吸器感作性試験では、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/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。しかしながら、呼吸器感作陽性とされている TDI,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にて麻酔して、小動物用気管内挿管器（BRC バイオリサーチ）で開口固定した。内視鏡（テレパック+ TP101、KARL STORZ）に、HDIG スコープ（住田光学ガラス、φ0.6mm、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。なお NM および呼吸器感作性物質の *in vivo* 免疫毒性解析は 1 月以降に行う予定である。

B.4. 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 を被験試料として用いた。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. NM および呼吸器感作性物質の *in vivo* 免疫毒性解析

マウス骨髄由来マクロファージを用いて、Taquann 処理を施したナノシリカ（NM202 および NM204）に対する炎症反応を検討するとともに、多層化カーボンナノチューブ（MWCNT）による MMP-12 を介したマクロファージの活性化機構について検討した。また、*in vivo* での NM（NM202）の影響についての実験の準備を進めた。

雄マウス（C57BL/6、7 週齢）の大腿骨より骨髄細胞を採取し、リコンビナント M-CFS (100 ng/mL)添加培地にて 7 日間培養することで成熟マクロファージに分化させた。NM202、NM204 (250 ng/ml~1000 ng/ml)および T-CNT (MWCNT) (167 ng/ml)を培養系に用いた。また、MMP-12 特異的阻害剤 MMP408(12.5, 25, 50, 100 nM; Calbiochem)を T-CNT とともに用いた。培養したマクロファージから 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。

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

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（SiO₂NMs: 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、測定が終了したので追記予定である。

B.6-2. 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検物質 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・熱力学的物性値を取

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、比較的多くの被検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

本研究は動物実験の 3Rs に配慮して、動物実験委員会の承認のもとに基本指針を遵守して実施し、動物使用数や動物に与える苦痛は最小限に留めた。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。

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

C1.1 肺胞マクロファージ活性化機構の解析

EPITHELIX 社より購入したヒト肺胞マクロファージは線維芽細胞のコンタミが

認められた。線維芽細胞は通常の状態でも増殖するため、最初の株化誘導実験では線維芽細胞に埋もれてしまい、マクロファージの株化細胞（線維芽細胞に比べてはるかに増殖が遅い）を得ることはできなかった。そこで不死化したマウスに変異型 *RAS* の遺伝子を導入したが、増殖スピードの改善は認められなかった。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。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。

B1.2. In vitro 呼吸器感受性試験法の開発

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受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。

技術移転性については、施設 A に、プロトコルとその方法の説明を行い、全ての必要な材料や機器はその施設で独自に用意して貰って行い、代表的な化学物質を用いて、DCsens を独自に動かすことが可能であることがわかった。施設 B についても、同様に説明し、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

NM による THP-1 細胞活性化メカニズムの解析として、まず、SiO₂ NPs および ZnO NPs 曝露後の細胞内 ROS について、蛍光ブ

ローブ CM-H2DCFDA を用いて定量した。SiO₂ NPs 曝露では 1000 µg/mL の濃度においてわずかに蛍光強度の増大が見られ、細胞内 ROS の増加が示された。一方、ZnO NPs では、MZ-500 においてのみわずかに蛍光強度の増大が見られ、シリカ被覆 MZ-500HP では蛍光強度の増大は見られなかった。

酸化亜鉛ナノ粒子およびそれらの分散液の評価については、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。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。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ところ、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が、培地中においては溶出率に差はみられなかった。

硝酸亜鉛の抗原提示細胞活性化能の評価については、濃度に依存した顕著な CD54 発現の増加が見られた。

亜鉛の細胞内取り込みの定量については、MZ-500 と MZ-500HP との比較より、シリカにより被覆された MZ-500HP 曝露時の細胞内亜鉛取り込み量は顕著に少ないことが示された。

イオン吸着シリカナノ粒子の調製との THP-1 細胞活性化能の評価については、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。

被覆 ZnO NP による THP-1 細胞活性化能の評価については、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 発現を解析したところ、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。

NM による THP-1 細胞活性化能メカニズムの解析については、細胞内 ROS について、蛍光プローブ CM-H2DCFDA を用いて定量したところ、SiO₂ 暴露により細胞内 ROS の増加が示された。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 の効果を評価したところ、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ることが示された。MWCNT の細胞内取り込み挙動の解析については、特に高濃度での曝露条件において、曝露 4 時間後に THP-1 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。

遺伝子発現に基づく NM の抗原提示細胞活性化能の評価については、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 により解析したところ、CD86, CD54, MMP-12 に加え CCL3, CCL5, IL1A, IL1B 遺伝子の発現亢進が示された。

気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養系を用いた NM の THP-1 細胞活性化能の評価については、72 時間後において、Sicstar-red F 曝露により CD54 の発現が亢進する傾向がみられ、遺伝子発現解析において、モデル上部からの Sicstar-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。

ヒト iPS 細胞肺胞マクロファージを用いた in vitro 試験法の開発については、

HiTRAM細胞はDNFB処理により、mRNAレベルにおいてCD54, CD86, IL-1 β , CCL-3, CCL-5 および MMP-12 の発現を亢進した。THP-1 細胞においては CD86 を除く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-1 β , CCL-3, CCL-5 および MMP-12 の発現亢進が認められ、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。

C.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発

ナノシリカ NM-202 吸入曝露 RSV 感染実験については、RSV 感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカイン CCL5 の BALF 中のレベルは、NM-202 曝露により有意に上昇し、30 mg/m³ (高用量) 曝露群では感染対照群と比較して約 1.5 倍まで上昇していた。肺病理組織像では、NM-202 低用量 (10 mg/m³) 曝露/RSV 感染群では、感染対照より炎症が若干強まり、局所的なマクロファージの集簇やリンパ球浸潤が目立った。高用量曝露では、これらの特徴が顕著になり、一部で胸膜下へのリンパ球浸潤が見られた。

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については、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。

免疫染色法による NM_s の作用解析については、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。

ナノマテリアルのマウス全身ばく露吸入実験については、R5 年度の 3 回全身ばく露吸入において、NM202 の平均質量濃度は低濃度群 8.0 $\pm$ 1.1 mg/m³、高濃度群 28.3 $\pm$ 0.9 mg/m³ であり、MMAD はそれぞれ 507 nm および 667 nm であった。R6 年度の 5 回全身ばく露吸入では、平均質量濃度は低濃度群 6.9 $\pm$ 0.4 mg/m³、高濃度群 25.1 $\pm$ 6.4 mg/m³ であり、MMAD はそれぞれ 562 nm および 709 nm であった。いずれの条件でも MMAD は 3 μ m 以下であり、肺胞に到達し得るエアロゾル特性を有していた。

マウス気道感作モデル作製については、DI および TMA について油性溶媒を用いたミスト化の可能性を検討した。気管内投与用検体の調製法を検討し、アマニ油を用いてメノウ乳鉢で混練、超音波照射によって分散させることにより、TDIおよびTMAの良好な調製検体を得ることが可能となった。さらに片肺感作・対側肺チャレンジモデルの予備検討として、溶媒対照群、TMA 0.5%群および DNFB 0.5%群を設定し、左肺のみに投与した。その結果、溶媒対照群および DNFB 群では、投与側左肺および未投与側右肺のいずれにも肉眼的、組織学的異常は認められなかった。一方、TMA 群では一般状態の悪化が認められた。

C.4. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価

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。また RAW264.7 細胞からの TNF- α 産生量は、NM の全てで添加量に依存して上昇したが、NM_s 間での大きな差は認められなかった。

C.5. NM および呼吸器感作性物質の *in vivo* 免疫毒性解析

マウス骨髄由来マクロファージならびに RAW264.7 細胞を用いた *in vitro* の実験系と、Taqann 処理した二酸化ケイ素 (NM202) の全身吸入暴露による *in vivo* の実験系を応用することによって、ナノマテリアルの免疫毒性あるいはその制御機構を検討した。In *vitro* の実験では、ナノシリカ (NM202, NM204) とカーボンナノチューブ (MWCNT) に対するマクロファージの反応性は異なっており、NM の認識、貪食のプロセスに伴う NM 関連分子の発現パターンが NM の種類によって多様性がある可能性が示された。

一方、NM202 の全身吸入暴露による BALF 細胞中の肺胞マクロファージの動態をフローサイトメトリー解析、マクロファージ関連遺伝子の mRNA 発現の qRT-PCR による解析、病理学的解析を実施した。NM202 の吸入暴露では肺組織での炎症の起点は弱く、多層カーボンナノチューブなどに比較して免疫毒性は低いものの、線維化の要因となる可能性が考えられた。さらに、マクロファージの NM202 に対する反応性は MARCO 分子が関与している可能性が示された。

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

6 種の多層カーボンナノチューブ (MWCNTs: NM-400, 401, 402, 403, NT-7 (ND), NT-7 (D)) を対象とし、物理化学的性状と毒性発現の関連性を解析し、さらに 3 種の二酸化ケイ素ナノ粒子 (SiO₂ NMs: NM-201, 202, 204) に対象を広げ、分担研究者が実施した吸入暴露試験データを用いて、物性が *in vivo* 毒性に与える影響について検証を行った。

併せて、呼吸器感作性物質の評価体系を整理するため、呼吸器感作物質 (9 化合物)、皮膚感作物質 (13 化合物)、非感作性物質 (11 化合物) の計 33 化合物を対象として選定した。これら化学物質の物性収集項目の検討および整理を行い、*in vitro/in vivo* 試験結果との関連性解析を通じた毒性予測基盤の構築を推進した。

D. 考察

D.1. 化学物質の *in vitro* 呼吸器感作性試験法の開発

肺胞マクロファージを準備し、株化を進めたが、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ため、国内で開発された、iPS 細胞からヒト肺胞マクロファージを誘導する方式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。ライブイメージングを用いた解析により、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ったことから、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。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ったところ、不均一性が明確に示された。

In *vitro* 試験法開発については、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。また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 の開発も進めるべきと考える。

D.2. NM の in vitro 抗原提示細胞活性化試験法の開発

被覆 ZnO NPs のキャラクタリゼーションと THP-1 細胞活性化については、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。

NMs による THP-1 細胞活性化メカニズムについては、THP-1 細胞の活性化には、細胞外で溶出した亜鉛イオンだけでなく、粒子としての作用が関与していることが示唆された。また、ICP-AES を用いた細胞内に取り込まれた亜鉛の定量より、ZnO NPs の曝露により細胞内に取り込まれていること、その取り込み量は亜鉛イオンと比較して非常に多いことがわかった。

Ag NPs 曝露による 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一方、O₂ NPs 曝露による THP-1 細胞の活性化は 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。

SiO₂ NPs による THP-1 細胞活性化における表面吸着イオンの影響については、SiO₂ NPs 表面に主に静電相互作用により吸着した亜鉛イオンが SiO₂ NPs 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。

遺伝子発現に基づく NM の抗原提示細胞活性化能の評価については、新たに *CCL3*, *CCL5*, *IL1A*, *IL1B* 各遺伝子の発現が亢進することを見出した。中でも *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、新たな評価指標として使用できる可能性が示された。

気管支上皮モデルと THP-1 細胞の共培養系を用いた NM の THP-1 細胞活性化能の評価については、SiO₂ NPs 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ことから、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た。

D.3. In vivo 吸入曝露実験方法の開発

ナノシリカ NM-202 吸入曝露 RSV 感染実験については、NM-202 は正常時には炎症性の免疫刺激はなく、その後の RSV 感染により感染細胞に取り込まれて免疫応答を刺激することで炎症を惹起することが強く示唆された。NM-202 曝露/RSV 感染マウスでは、肺動脈や細気管支周囲でのリンパ球浸潤が亢進しており、マクロファージの集簇も認められたのに対し、そのような所見は NM-204 では認められず、物性の相違を反映して

いる可能性が高いと考えられた。

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については、NM-202 および-204 曝露/ RSV 感染マウスにおいて粘性多糖産生細胞が多いという現象は、気管支上皮での杯細胞の過形成を示唆しており、これらのナノマテリアルが気道リモデリング様病変を引き起こす可能性が高い。

ケモカインに対する ED₁₅₀ 値による評価については、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 法の結果と同様であることから、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た。

免疫染色法による NM_s の作用解析については、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とから、このケモカインが感染影響評価の良い指標となる可能性が示唆された。

呼吸器局所への曝露を基盤とする免疫毒性評価系の構築という観点から、ナノマテリアルの短期吸入曝露条件の整備と、気道感作モデルの開発を並行して進めた。ナノシリカ NM202 については、R5 年度および R6 年度のいずれにおいても、目標濃度に概ね対応した全身吸入曝露を実施でき、MMAD は一貫して 1 μm 未満の範囲にあり、肺胞到達性を有する高分散エアロゾルが得られた。これにより、免疫毒性評価に供し得る吸入曝露条件が整備されたと考えられる。一方で、NM202 は既に検討してきた他のナノシリカ検体よりも微細で機器への吸着が強く、エアロゾル化効率が著しく低いことが明らかとなった。こ

の点は、被験物質の物性が実験系の成立性そのものに影響することを示しており、今後の吸入曝露系の標準化において重要な知見である。一方、気道感作性の評価法については、従来法で問題となる刺激性・全身性毒性との交絡を回避するため、左肺感作・右肺惹起という新しい局所曝露モデルを設計した点に意義がある。R5 年度の検討により、TDI および TMA を吸入エアロゾルとして扱うことには化学的安定性と環境管理の両面で制約が大きいことが判明し、R6 年度には気管内投与法への転換とアamani油を用いた検体調製法の確立につながった。R7 年度の予備検討では、アamani油自体および DNCB 0.5% が肺に明らかな炎症を誘発しなかった一方、TMA 0.5% では投与側左肺に強い局所刺激性が認められた。右肺に異常が認められなかったことは、少なくとも本条件下では、投与局所の直接刺激と未処置肺の応答を切り分け得る可能性を示している。

D.4. NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価

NM の RSV 感染マクロファージ機能への影響評価については、RAW264.7 細胞、THP-1 細胞ともに *in vitro* 評価系として利用するには十分ではなかった。

D.5. NM および呼吸器感作性物質の *in vivo* 免疫毒性解析

ナノシリカ (NM202, NM204) とカーボンナノチューブに対するマクロファージの反応性は異なっており、カーボンナノチューブに対しては従来の報告通り MMP-12 を介した反応性が観察されたが、ナノシリカでは MMP-12 の発現に変動は見られなかった。ナノシリカに対しては *Il1b* の

mRNA 発現上昇が認められた。

一方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考える。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、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。MARCO 分子がナノマテリアルの暴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.6. 既存情報と in vitro/in vivo 研究データ

による in silico 解析

ナノマテリアルの in silico による特性解析については、SiO₂ NMs の毒性発現メカニズムとして、微細化による取り込み促進と、表面の純度による「活性シラノール基 (Si-OH)」の露出という二つの側面が極めて重要であることが見出された。微細で多分散指数 (PDI) が小さく、巨大凝集が少ない粒子特性は、マクロファージによる貪食を容易にし、細胞内小器官との接触面積を広げることで、ROS 産生や NF-κB 経路等の炎症シグナルを活性化させやすい。加えて、不純物やコーティング剤といった非 SiO₂ 成分による被覆 (マスキング) が少ない高純度な粒子ほど、露出した活性シラノール基が細胞膜成分と直接相互作用し、膜損傷や強い炎症惹起能を示すと推察された。これは、ナノマテリアルの毒性が単純な化学組成だけでなく、粒子の物理的形狀や表面の化学的狀態に密接に関連することを示す知見である。

さらに、in vitro 試験の結果が in vivo での肺炎指標 (BALF 中 CCL5 値) と整合したことから、これらの物性因子を記述子として用いることで、動物実験を代替し得る高精度な in silico 毒性予測プラットフォームの構築が可能であることが示唆された。

呼吸器感作性物質の in silico による特性解析については、微視的性質である RDKit や Mordred による構造記述子、および PySCF を用いた量子化学計算 (HOMO/LUMO、双極子モーメント等) が「感作性の有無」を捉える指標となり、巨視的性質である熱力学的物性 (融点、沸点、log P、水溶解度、蒸気圧等) は、呼吸器感作性と皮膚感作性を分離する「器官特異性」の指標となりうることを明らかとした。したがって、in silico モデルによる 3 群 (呼吸器感作性・皮膚感作性・非感作性) の完全な分離には、単一の解析手法ではなく、各指標の得意領域を組み合わせ、以下の段階的のアプロ

一チが考えられた。

- 第一段階（微視的評価）：量子化学的反応性に基づき、感作性を判別する。
- 第二段階（巨視的評価）：熱力学的物性に基づき、標的器官（呼吸器/皮膚）を判別する。

E. 結論

化学物質の呼吸器感作性を評価する試験法の開発を目的に、ヒト気管支上皮細胞株 BEAS-2B とヒト単球細胞株 CD14-ML 由来未成熟樹状細胞（DC）の scaffold を用いた 3 次元 DC 共培養系を構築し、開発された試験法は OECD において in vitro 呼吸器感作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。

また肺胞マクロファージの活性化を指標とした NM による免疫毒性評価法の開発に向け、ナノマテリアル曝露による免疫系の活性化メカニズムについて in vitro, in vivo および in silico における解析を行い、多くの知見を得た。さらに、新たなバイオマーカーの探索を行い、*IL1A* および *MARCO* 遺伝子が利用できる可能性を示した。最終年度において 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 細胞を用いた試験法開発に着手し、その可能性を示した。

F. 研究発表

F.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;422:1251.
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.
 11. 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.
 12. Ushio A, Ishimaru N. Molecular Pathogenesis via Sex Hormone in Sjögren's Syndrome. *J Stomatol Soc Jpn.* 92(1):1-6, 2025.
 13. 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>
 14. 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.
 15. 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;6: 1293147.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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, Otake A. Sulfoxide-Mediated Cys-Trp-Selective Bioconjugation that Enables Protein Labeling and Peptide Heterodimerization. *Chem Eur.* 2024;2(3-4); e202400014.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 大塚邦紘, 石丸直澄: Sjögren 症候群の病理, 皮膚病診, 2024;46(9):788-79.
 30. Tawara H, Tsunematsu T, Kitajima S, Nagao R, Matsuzawa S, Otsuka K, Ushio A, Ishimaru N. The non-canonical function of borealin, a component of chromosome passenger complex, promotes glycolysis via stabilization of survivin in squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 706:149741, 2024.
 31. Tanabe I, Yoshida K, Ishikawa S, Ishimori K, Hashizume T, Yoshimoto T, Ashikaga T:

- Development of an In Vitro Sensitisation Test Using a Coculture System of Human Bronchial Epithelium and Immune Cells, *Altern Lab Anim.* 2023: 51(6):387-400. doi: 10.1177/02611929231204823.
32. Mizoguchi I, Katahira Y, Inoue S, Sakamoto E, Watanabe A, Furusaka Y, Irie A, Senju S, Nishimura Y, Mizukami S, Hirayama K, Nakamura S, Eto K, Hasegawa H, Yoshimoto T. A novel coculture system for assessing respiratory sensitizing potential by IL-4 in T cells. *ALTEx*. 2023 40(2):204-216. doi: 10.14573/altex.2111181.
 33. Sakamoto E, Katahira Y, Watanabe A, Furusaka Y, Sekine A, Yamagishi M, Sonoda J, Miyakawa S, Inoue S, Hasegawa H, Yo K, Yamaji F, Toyoda T, Mizoguchi I, Yoshimoto T. Chemical- and Drug-Induced Allergic, Inflammatory, and Autoimmune Diseases via Haptenation. *Biology (Basel)*. 2023 12(1):123. doi: 10.3390/biology12010123.
 34. 関根碧水、溝口 出、片平泰弘、長谷川英哲、渡邊有麻、善本隆之：ヒト免疫反応を in vitro で再現する細胞培養系の開発、動物実験代替法と New Approach Methods の開発・利用動向（監修：小島肇）、シーエムシー出版、2023 226-238.
 35. Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D. Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. *J Toxicol Sci.* 12:617-639, 2023.
 36. Jin S, Tsunematsu T, Horiguchi T, Mouri Y, Shao W, Miyoshi K, Mizusawa N, Hagita H, Sarubo M, Yoshida K, Yoshida K, Fujiwara N, Kitajima S, Ozaki K, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y. Involvement of the PTUB1-YAP1 axis in driving malignant behaviors in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 12(24):22156-22169. doi.org/10.1002/cam4.6735, 2023.
 37. Sugimoto A, Iwata K, Kurogoshi R, Tanaka M, Nakashima Y, Yamakawa Y, Oishi A, Yoshizaki K, Fukumoto S, Yamamoto A, Ishimaru N, Iwamoto T. C-terminus of PIRZO1 governs Ca²⁺ influx and intracellular ERK1/2 signaling pathway in mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 682:39-45, 2023.
 38. Ishimaru N, Otsuka K, Tsunematsu T, Taquahashi Y, Kanno J. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. *Annals of Work Exposures and Health* 67(Supplement 1) i74, 2023.
 39. Sato-Fukuba M, Arakaki R, Ushio A, Otsuka K, Nagao R, Matsuzawa S, Tawara H, Tsunematsu T, Ishimaru N*. CD4⁺ T-cell-dependent differentiation of CD23⁺ follicular B cells contributes to the pulmonary pathology in a primary Sjögren's syndrome mouse model. *Front Immunol.* 14:1217492, 2023.
 40. Narwidina A, Miyazaki A, Iwata K, Kurogoshi R, Sugimoto A, Kudo Y, Kawarabayashi K, Yamakawa Y, Akazawa Y, Kitamura T, Nakagawa H, Yamaguchi-Ueda K, Hasegawa T, Yoshizaki K, Fukumoto S, Yamamoto A, Ishimaru N, Iwasaki T, Iwamoto T. Iroquois homeobox 3 regulates

- odontoblast proliferation and differentiation mediated by Wnt5a expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 650:47-54, 2023.
41. Shao W, Tsunematsu T, Umeda M, Tawara H, Fujiwara N, Mouri Y, Arakaki R, Ishimaru N, Kudo Y. Cancer cell-derived novel periostin isoform promotes invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Med.* 12:8510-8525, 2023.
 42. 石丸直澄：シェーグレン症候群疾患モデルからのトランスレーショナル研究 炎症と免疫 31(3):35-39, 2023.
 43. 石丸直澄：臓器間ネットワークと自己免疫疾患 臨床免疫・アレルギー科 80(3):311-316, 2023.
 44. Miyauchi, A., Akashi, T., Yokota, S., Taquahashi, Y., Hirose, A., Hojo, M., Yoshida, H., Kurokawa, M., Watanabe, W. Effects of inhalation of multi-walled carbon nanotube (MWCNT) on respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice. *J. Toxicol. Sci.* (2023) 48, 411-420.
 45. Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y, Taquahashi Y, Hirose A, Suzuki J, Akiko Inomata A, Dai Nakae D, Time-Course of Transcriptomic Change in the Lungs of F344 Rats Repeatedly Exposed to a Multiwalled Carbon Nanotube in a 2-Year Test, *Nanomaterials (Basel)*. 2023;13(14): 2105.
 46. Shimizu M, Hojo M, Ikushima K, Yamamoto Y, Maeno A, Sakamoto Y, Ishimaru N, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D, Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7, *J Toxicol Sci* 2023;48(12): 617-639. doi: 10.2131/jts.48.617.
 47. Yokota S, Miyaso H, Hirai T, Suga K, Wakayama T, Taquahashi Y, Kitajima S., Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system., *J Toxicol Sci.* 2023;48(2):57-64.
 48. Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 69-82.
 49. Kuwagata M, Tsuboi M, Igarashi T, Tsurumoto M, Nishimura T, Taquahashi Y, Kitajima S.: A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 59-68.
 50. 大野彰子：ナノマテリアルの概要, *ファルマシア*, 2023;59(7):629-633.
- G.2. 学会発表
1. Ishimaru N. Chronic Immunotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Macrophages via MMP-12. Inhaled Particles/NanOEh conference 2023 Invitation Lecture (2023.5.15)
 2. 高橋祐次、森田紘一、辻昌貴、菅康佑、相崎健一、北嶋聡、平林容子、先端素材カーボンナノチューブヤーンを使用した実験用小動物における低侵襲な生体電位測定法の開発、第70回日本実験動物学会総会 (2023.5.24)

3. Inoue H, Adachi T, Izumi H, Kuroda E : Establishment of a functional alveolar macrophages cell line (Implication of establishment of an animal-free model for assessment of lung inflammation), JSICR/MMCB 2023 (2023.5.25)
4. 荒井りおん, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: THP-1 細胞を用いたシリカナノ粒子とリポ多糖共暴露による抗原提示細胞活性化能の評価, 第 50 回日本毒性学会学術年 (2023.6.21)
5. 飯島一智, 西田明日香, 高橋遥, 中浜美月, 荒井りおん, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄: 気管支モデル/単球系細胞株共培養系を用いたナノマテリアル吸入毒性評価と細胞間相互作用の解析, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21)
6. 大野彰子, 西田明日香, 沖山佳生, 飯島一智, 足利太可雄: Verification of usefulness as evaluation index for nanomaterials using the h-CLAT test method, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21)
7. Taquahashi Y, Morita K, Tsuji M, Suga K, Okubo Y, Aisaki K & Kitajima S. Improved acute toxicity study incorporating vital signs; a less invasive method for measuring biopotential in laboratory animal using CNT yarn, 10th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX-X, 2023.7.18)
8. Ohno A, Nishida A, Okiyama Y, Iijima K, Ashikaga T, Verification of the effectiveness of EC 200 and EC 150 indicators of THP-1 cell activation on various nanomaterials, 266th ACS National Meeting & Exposition, (2023. 8.13-17)
9. 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: THP-1 細胞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法の開発とその活性化メカニズムの解析, 第 30 回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11)
10. 荒井りおん, 西田明日香, 高橋遥, 中浜美月, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支上皮モデルと THP-1 細胞を組み合わせたナノマテリアルの吸入毒性評価法の開発に向けた気管支上皮分泌サイトカインの解析, 第 30 回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11)
11. Adachi T, Inoue H, Izumi H, Kuroda E :Establishment of a functional alveolar macrophages cell line (Implication of establishment of an animal-free model for assessment of lung inflammation), 第 30 回日本免疫毒性学会学術年会 (2023.9.11)
12. 溝口 出、片平泰弘、長谷川英哲、渡邊有麻、関根碧水、園田寿樹心、山岸美宇、善本隆之:呼吸器と皮膚感作性物質の識別を可能にする Th2 細胞株を応用した改良版 2 ステップ DC/T 共培養系の開発、第 36 回日本動物実験代替法学会 (2023.11.27-29)
13. 大野彰子:ナノマテリアルの安全性評価における国際動向, 第 36 回日本酸化ストレス学会関東支部会 (2023.12.3)
14. Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Kousuke Suga, Masaki Tsuji, Yusuke Okubo, Ken-ich Aisaki, Satoshi Kitajima, New approach for assessment of acute oral toxicity by multiple parameters of vital signs: development of a less invasive method for measuring biopotential in small laboratory animal using carbon-nanotube yarn as surface electrodes, 63rd Society of Toxicology Annual Meeting,

- (Accepted), Abstract Number/Poster Board number 3077/P180, 2024.3.11
15. Ashikaga T, Ohno A, Arai R, Iijima K: Activation of THP-1 cells by mixed exposure to silicon dioxide nanomaterial and skin sensitizer or febrile substance, SOT 63rd Annual Meeting (2024.3.12)
 16. Ushio A, Otsuka K, Tsunematsu T, Taquahashi Y, Kanno J, Ishimaru N. The influence of multi-walled carbon nanotube for immune systems. 第 113 回日本病理学会総会 (2024.3.28)
 17. 大野彰子, 動物実験代替法としての生体模倣システム (MPS) と国際動向, 日本薬学会第 144 年会 シンポジウム講演, (2024. 3. 30)
 18. 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)
 19. 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)
 20. 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)
 21. 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)
 22. 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)
 23. 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)
 24. 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)
 25. 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)
 26. 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)
 27. 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)
28. 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)
 29. 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)
 30. 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)
 31. 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)
 32. 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)
 33. 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)
 34. 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)
 35. 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)
 36. 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)
 37. 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)
 38. 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)
 39. 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)
 40. 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)
41. 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)
 42. 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)
 43. Nagao R, Yamamoto A, Ushio A, Otsuka K, Matsuzawa S, Tsunematsu T, Ishimaru N. Analysis of regulatory mechanism for T cell activation via Tratl in Sjögren's syndrome. 第 53 回日本免疫学会総会学集会 (2024.12.5)
 44. 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)
 45. 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ト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)
 46. 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)
 47. 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)
 48. 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, SOT 64th Annual Meeting (2025.3.19)
 49. 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)
 50. 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 Tratl 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)
 51. 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)
 52. 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)
 53. 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)
 54. 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)
55. 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)
 56. 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)
 57. 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)
 58. 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)
 59. 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)
 60. 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)
 61. 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)
 62. 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)
 63. 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)
 64. 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)
 65. 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)
 66. 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)
 67. 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)

68. 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)
69. 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)
70. 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)
71. 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 LR I 研究報告会 (2025.8.29)
72. 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)
73. 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)
74. 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)
75. 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)
76. 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)
77. 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)
78. 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)
79. 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)
80. 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)
81. 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)

82. 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)
83. 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)
84. Kuroda E. Molecular mechanisms of particulate-induced inflammation and allergy in lung immunity. IUTOX 17th International Congress of Toxicology (2025.10.17)
85. 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)
86. 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)
87. 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)
88. 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)
89. 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)
90. 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)
91. 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)
92. 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)
93. 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)
94. 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)
95. 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)
96. 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)
97. 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)
98. 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)
99. 石ヶ守里加子, 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)
100. 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)
101. 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)
102. 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)
103. 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)
104. 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)
105. 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)
106. 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)
107. Nagao R, Yamamoto A, Ushio A, Otsuka K, Matsuzawa S, Tsunematsu T, Ishimaru N. Analysis of suppressive mechanism for T cell activation via Tratl1 in Sjögren's syndrome model mice. 第 54 回日本免疫学会学術集会 (2025.12.12)
108. 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)

Repository (Ispra). We would like to express our sincere gratitude to the JRC Nanomaterials Repository for their generous contribution of these materials.

109. 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：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

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