

201033049A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

トキシコキネティクス/トキシコプロテオミクス解析による  
食品ナノマテリアルの免疫毒性リスク予測・回避法の開発

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉岡 靖雄

平成 23 (2011) 年 4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

トキシコキネティクス/トキシコプロテオミクス解析による食品ナノマテリアルの免疫毒性 リスク予測・回避法の開発-----	1
吉岡 靖雄	

### II. 分担研究報告

ナノマテリアルのトキシコプロテオミクス解析-----	12
吉川 友章	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	17
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	18
----------------------	----

## トキシコキネティクス/トキシコプロテオミクス解析による 食品ナノマテリアルの免疫毒性リスク予測・回避法の開発

研究代表者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師 (常勤)

### 研究要旨

本研究は、食品ナノマテリアルの有用性を最大限に確保し、OECD 主導で実施されているナノマテリアル安全性ガイドラインの策定に必須の安全性情報の提供を目的に、ナノマテリアル特有の物理化学的性状に起因する免疫毒性情報の収集・把握を試みるものである。熱・電気伝導性や組織浸透性等についてこれまでの素材にはない機能を持つナノマテリアルは、食品産業においても革命を起こす新素材として期待され、機能性食品・栄養成分送達システム・着色剤・香料として利用されつつある。一方で、近年、微粒子状異物排除の根幹を担う生体免疫系がナノマテリアルを異物として認識した際に機能不全を起こす可能性が報告されるなど、ナノマテリアルの革新的機能が人体に対して未知の免疫攪乱作用を呈する危険性が指摘されている。そこで本研究では、食品添加物として認可されているシリカ粒子を用いて、ナノマテリアルの物性（粒子径・表面被覆など）一免疫毒性の連関解析とプロテオミクスによる安全性予測バイオマーカーの探索を試みた。平成 22 年度には当初の予定通り、①ナノシリカが食物アレルギーや炎症性腸疾患の発症・悪化に関与する可能性を検証するとともに、②安全性予測バイオマーカーの同定・妥当性評価、を推進した。本研究で得られた成果は、OECD 主導で実施されている科学的根拠に基づくナノマテリアルの規制作り等の厚生労働行政に必須の知見を提供可能であると期待される。

### 分担研究者

吉川 友章・大阪大学大学院薬学研究科・毒理学  
分野・助教

### A. 研究目的

熱・電気伝導性や組織浸透性等についてこれまでの素材にはない機能を持つナノマテリアルは、食品産業においても革命を起こす新素材として期待され、機能性食品・栄養成分送達システム・着色剤・香料として利用されつつある。一方でナノマテリアルの未知機能は裏を返せば人体に対して未知の有害性を発揮する危険性を孕んでいる。

事実、カーボンナノチューブの免疫攪乱を主要因とした中皮腫誘発毒性が報告され、我々も代表的な食品ナノマテリアルであるシリカの免疫攪乱性を認めている。こういった有害性の発症は、元来、微粒子状異物排除の根幹を担う生体免疫系がこれまでに遭遇したことのないような革新的機能に由来するものと考えている。このように従来までに無い革新的機能に起因した有用性と有害性の二面性を併せ持つナノマテリアルの有用性を最大限に享受するためのリスクマネジメントが国際的に進められており、OECD 主導の下で今後数年以内に規制の策定に必要な安全性情報の

収集を完了すべく、スポンサーシッププログラムが展開されている。本邦は、本プログラムにおいて国内産業で主要な位置を占めるナノマテリアルについて可能な限り多くの安全性情報を提示しなければならないにも関わらず、食品ナノマテリアルの有害性研究には全く手を付けていないため、このままでは無闇な規制によっていずれナノ食品産業を中心とした日本の産業競争力を喪失してしまいかねない。本観点からナノマテリアルの健康影響評価に関する情報収集やそれを基盤としたリスク予測・回避手法を開発して適切な行政規制を実施することが、わが国のナノ産業競争力強化とそれを活用した豊かな食社会の構築に向けた喫緊の国際的最重要課題である。本観点から本研究では、食品添加物として認可されている二酸化ケイ素（シリカ）を素材とするナノマテリアルの物性-免疫毒性の連関解析とプロテオミクスによる安全性予測バイオマーカー探索を実施した。

## B. 研究方法

### ナノシリカ

本研究では、Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany) より購入した表面未修飾ナノシリカ (直径 30、70、300、1000 nm; それぞれ nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000) を使用した。

### 食物アレルギー誘導

蒸留水に懸濁した非晶質シリカ (25 mg/ml) と OVA (10 mg/ml) を 4 : 1 の割合で混合し、シリカと OVA の混合溶液を調製した。この混合溶液を経口ゾンデにて 500  $\mu$ l/mouse で BALB/c マウス (雌性、6 週齢) に 0、7、14、21 日目の計 4 回投与した。さらに 22 ならびに 23 日目に OVA 溶液を 50 mg/500  $\mu$ l/mouse で再投与 (再チャレンジ) した。OVA の最終投与から 20 分後に心臓採血により全血を回収すると共に脾臓を回収し、以降の実験に供した。

### OVA 特異的抗体価の測定

心臓採血により回収した血液を 15000 rpm で 15 分遠心分離し、上清を血清として回収した。この血清中に含まれる OVA 特異的 IgG や IgE の抗体力価は ELISA 法により測定した。

脾細胞を用いた OVA 特異的 IFN- $\gamma$  産生能の評価  
シリカと OVA を共投与したマウスから脾細胞 ( $5 \times 10^6$  cells/ml) を調製し、1 mg/ml の OVA を含む培養液で 5 日間培養した。培養上清中の IFN- $\gamma$  量を ELISA 法により測定した。

### デキストラン硫酸ナトリウム塩 (DSS) 誘発大腸炎モデルマウスの作製

DSS (MW=40,000) を 2.5% (wt/vol) になるように蒸留水に溶解した。8 週齢 C57BL/6J マウスを使用し、2.5% (wt/vol) DSS 溶液を 7 日間経口自由摂取させることにより、DSS 誘発大腸炎モデルマウスを作製した。nSP30 および mSP1000 の影響を評価するため、DSS を経口自由摂取させるとともに、10 mg/マウス/日で nSP30 および mSP1000 を強制経口投与し、経日的に体重測定を実施した。体重変動率は DSS 投与開始日を Day0 とし、Day0 の値からの体重変化をパーセントで示した。

### 安全性バイオマーカーとしての急性期蛋白質

BALB/c マウスに、非晶質ナノシリカ分散液 (nSP30、nSP70) をそれぞれ 200  $\mu$ l ずつ (5 mg/mouse) ゾンデで強制投与し、24 時間後に心臓採血により血液を回収した。いずれのサンプルも 12000 rpm、15 分間遠心操作を行うことにより血漿を回収した。血漿中の haptoglobin、C Reactive Protein (CRP)、Serum Amyloid A (SAA) 量は、市販の ELISA kit (Life Diagnostics, Inc.; West Chester, PA, USA) を用い測定した。なお、操作は添付のプロトコールに準じて行った。

## C. 研究結果および D. 考察

### 食物アレルギーの発症・悪化に及ぼす影響

近年、本邦において、食物アレルギーや炎症性

腸疾患の罹患率が増加している。食生活の変化や人工的に作り出した化学物質への曝露が食物アレルギー症状を発症あるいは悪化させる要因ではないかと危惧されている。これまでに我々は、非晶質ナノシリカをマクロファージ細胞株 (RAW264.7) 等に曝露することによって、TNF- $\alpha$ をはじめとする炎症性サイトカインの産生を誘導することを明らかとしている。これらの結果を考え合わせると、非晶質ナノシリカが食物アレルギーの発症・悪化に関与する可能性を否定することはできない。そこで、食物アレルギーの中でも最も患者数の多い卵アレルギーのアレルゲンとして知られる鶏卵白アルブミン (OVA) と共に、粒子サイズの異なる非晶質シリカを強制経口投与したマウスを用いて、食物アレルギーの主要原因とされている抗原特異的な IgE 産生量を評価した (Fig. 1)。その結果、OVA を単独で投与したマウスでは OVA 特異的 IgG や IgE は誘導されなかった。それに対して、nSP300 や mSP1000 を OVA と共投与することで、OVA 特異的 IgG や IgE の産生上昇が観察された。特に、nSP30 投与群では、ポジティブコントロールとして用いた、現存する最強の免疫誘導物質であるコレラトキシンに匹敵するほどの強い OVA 特異的 IgG、IgE 誘導が認められた。また、興味深い事に nSP70 投与群では抗原特異的な IgG や IgE の産生が全く認められなかった。さらに、マウスから回収した脾細胞を回収し、サイトカイン産生を評価した結果、nSP30 投与群においてのみ、免疫活性化サイトカインであるインターフェロン- $\gamma$ の産生が認められた (Fig. 2)。以上の結果は、直径が 30 nm 程度の微小なシリカを利用するに当たっては、食物アレルギーの誘導等をはじめとした免疫学的な安全性評価が必須となる可能性を示唆している。現在、抗原特異的 IgG ならびに IgE 産生誘導に対する nSP30 の作用メカニズムや nSP70 によってこれらの応答が回避されるメカニズムの解析を進めている。

#### 炎症性腸疾患の発症・悪化に及ぼす影響

近年、炎症性腸疾患の患者数は増加傾向にあり、既に患者数が十万人以上にもおよぶと言われている。とりわけ潰瘍性大腸炎やクローン病は、再燃と緩解を繰り返す難治性炎症性腸疾患であり、厚生労働省により特定疾患に指定されている。炎症性腸疾患は、リンパ球の浸潤に伴う大腸組織の破綻を特徴とし、その形成には、免疫学的生体防御機構の破綻、遺伝的素因、食生活の変化などが考えられているが、未だ特定の原因は不明である。上述したように、ナノマテリアルは、強い免疫活性化能を有していることから、炎症性腸疾患の発症・悪化に何らかの影響を及ぼす可能性も否定できない。そこで次に、炎症性腸疾患モデルマウスとして汎用される DSS 誘発大腸炎モデルを用い、非晶質ナノシリカが炎症性腸疾患の病態発症・悪化に関与するかを検討した。本モデルマウスでは、DSS 投与開始数日後に血便・下痢を伴う症状を示し、およそ 7-10 日目に多くの個体が死亡することが知られている。本検討では、nSP70 と mSP1000 を用い、DSS を自由飲水させはじめた日から、nSP70 もしくは mSP1000 を 1 日 1 回強制経口投与した。その結果、DSS により大腸炎を誘導したコントロール群において、血便・下痢を伴う激しい衰弱と共に著しい体重減少を示した (Fig. 3)。mSP1000 を投与した群では、コントロール群と比較して、体重推移に大きな変化は認められなかった (Fig. 3)。一方で、nSP70 投与群においては、コントロール群や mSP1000 投与群と比較して、有意な差は認められないものの、体重減少が亢進している傾向が観察された (Fig. 3)。また、nSP70 投与群では、コントロール群や mSP1000 投与群と比較して、大腸の長さも短い傾向にあった (Fig. 4)。以上の結果から、今後、群数を増やすなど詳細な検討が必要であるものの、nSP70 の経口投与が、炎症性腸疾患の発症・悪化に関与している可能性が示された。

#### 安全性バイオマーカーの探索・同定

上記のように、非晶質ナノシリカは起炎性を有し、経口投与によっても種々炎症性免疫疾患の発

症・悪化原因となり得ることが明らかとなりつつある。従って、安全なナノマテリアルを開発していくためには、ナノマテリアルの開発段階から簡便に安全性を予測し得る方法論の開発が必須となってくる。そのためには、ナノマテリアルの経口投与により、血中で発現変動する蛋白質を同定し、その蛋白質変動を指標とした安全性評価が有用と考えられている。我々はこれまでに、非晶質ナノシリカなどのナノマテリアルをマウスに静脈内投与した場合、haptoglobin、CRP、SAAなどの急性期蛋白質の血清中濃度が上昇し、これら急性期蛋白質がナノマテリアル曝露の安全性バイオマーカーになり得る可能性を明らかとしている。そこで、これら急性期蛋白質が、非晶質ナノシリカの経口曝露による安全性バイオマーカーになり得るかに関して検討した。BALB/cマウスに nSP30、nSP70 をそれぞれ 5 mg/mouse で経口投与し、投与後 24 時間における血中 haptoglobin (Fig. 5A)、CRP (Fig. 5B)、SAA (Fig. 5C) 量を ELISA により測定した。その結果、haptoglobin、CRP に関しては nSP30、nSP70 いずれの群も saline 投与群と比較し有意な差は認められなかった。一方で SAA に関しては、nSP30 投与群において saline 投与群と比較し増加傾向にあることが明らかとなった。これらの結果から、急性期蛋白質が非晶質ナノシリカの経口曝露により誘発される生体影響をも予測し得ることが示唆された。

## E. 結論

本研究では、食品中ナノマテリアルの一つである非晶質ナノシリカを用い、食物アレルギーや炎症性腸疾患の発症・悪化に及ぼす影響を評価した。さらに、安全な食品中ナノマテリアルの開発に向けて、安全性バイオマーカーの探索を試みた。

当該申請課題で得られた研究成果は、厚生労働行政として主導すべき食品ナノマテリアルの安全点検実施や科学的根拠に基づく規制作りには必須の科学的知見を提供するものであり、将来的には食品ナノマテリアルの社会受容や恩恵享受を

促進して、新技術を活用した安全・安心で豊かな食社会の構築や我が国の食品業界における世界的産業競争力強化に貢献すると期待している。

## F. 健康危険情報

該当事項無し

## G. 研究発表

### ①論文発表

1. Morishige T, **Yoshioka Y**, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Titanium dioxide induces different levels of IL-1 $\beta$  production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;392(2):160-5.
2. Morishige T, **Yoshioka Y**, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Narimatsu S, Monobe Y, Imazawa T, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1 $\beta$  production, ROS production and endosomal rupture. *Biomaterials.* 2010;31(26):6833-6842.
3. Morishige T, **Yoshioka Y**, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties. *Pharmazie.* 2010;65(8):596-9.
4. **Yoshioka Y**, **Yoshikawa T**, Tsutsumi Y. Nano-safety science for assuring the safety of nanomaterials. *Nippon Eiseigaku Zasshi.* 2010;65(4):487-92.
5. Higashisaka K, **Yoshioka Y**, Yamashita K, Morishita Y, Fujimura M, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, **Yoshikawa T**, Itoh N, Tsutsumi Y. Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and

toxicity of nanomaterials. *Biomaterials*. 2011;32(1):3-9.

6. Nabeshi H, **Yoshikawa T**, Arimori A, Yoshida T, Tochigi S, Kondoh S, Hirai T, Akase T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, **Yoshioka Y**, Tsutsumi Y. Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Res Lett*. in press.

## ②学会発表

### 国外

**Yoshioka Y**, Morishige T, Tsunoda S, Mukai Y, Okada N, Tsutsumi Y, Nakagawa N. Safety assessment of nanomaterials: inflammatory responses of nanosilica with different sizes and surface properties. The XII International Congress of Toxicology. Barcelona (Spain), 19-23 July, 2010.

### 国内

1. **吉川友章**, **吉岡靖雄**, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: ナノ含有食品の安全性確保および安全なナノ含有食品の開発に向けて-1: ナノマテリアルの粒子サイズと血液凝固系への影響. 日本食品衛生学会第99回学術講演会, 東京(東京), 2010年5月.
2. **吉岡靖雄**, **吉川友章**, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: ナノ含有食品の安全性確保および安全なナノ含有食品の開発に向けて-2: ナノマテリアルの表面電荷と免疫系への影響. 日本食品衛生学会第99回学術講演会, 東京(東京), 2010年5月.
3. **吉岡靖雄**, 森重智弘, 角田慎一, 向洋平, 岡田直貴, 堤康央, 中川晋作: 非晶質ナノシリカの粒子特性と自然免疫応答の連関評価とそのメカニズム解析. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇(沖縄), 2010年6月.
4. **吉川友章**, 鍋師裕美, 赤瀬貴憲, 栃木彩恵子,

平井敏郎, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 近藤小百合, 長野一也, 阿部康弘, **吉岡靖雄**, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 非晶質ナノシリカの細胞内局在と安全性の連関に関する基礎情報の集積. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇(沖縄), 2010年6月.

5. **吉岡靖雄**, 森重智弘, 吉川友章, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 堤康央: ナノ含有食品の安全性確保および安全なナノ含有食品の開発に向けて: ナノ酸化チタンの形状と免疫系への影響. 第100回日本食品衛生学会学術講演会, 熊本(熊本), 2010年9月.
6. 吉田徳幸, **吉川友章**, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 堤康央: 非晶質ナノシリカの経口曝露における免疫攪乱作用の解析. 第9回次世代を担う若手フェーマ・フォーラム2010, 京都(京都), 2010年10月.
7. 吉田徳幸, **吉川友章**, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, **吉岡靖雄**, 堤康央: 非晶質ナノシリカの経口曝露に関する基礎情報の収集. 第60回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪(大阪), 2010年10月.
8. 吉田徳幸, **吉川友章**, 鍋師裕美, 堤康央: 非晶質ナノシリカの経口曝露における安全性評価. 日本薬学会第131年会, 静岡(静岡), 2011年3月.
9. 宇治美由紀, **吉川友章**, 吉田徳幸, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 市橋宏一, 赤瀬貴憲, 鍋師裕美, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, **吉岡靖雄**, 伊藤徳夫, 堤康央: 非晶質ナノシリカの消化管吸収性と生体影響との基礎的解析. 日本薬学会第131年会, 静岡(静岡), 2011年3月.
10. **吉岡靖雄**, 東阪和馬, 山下浩平, 森下裕貴, 藤村真穂, 潘慧燕, 小椋健正, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 鍋師裕美, **吉川友章**, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: ナノマテリアルの安全性評価に資するバイオマーカーの探索. 日本薬学会第131年会, 静岡(静岡), 2011年3月.

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

**①特許取得**

該当事項無し

**②実用新案登録**

該当事項無し

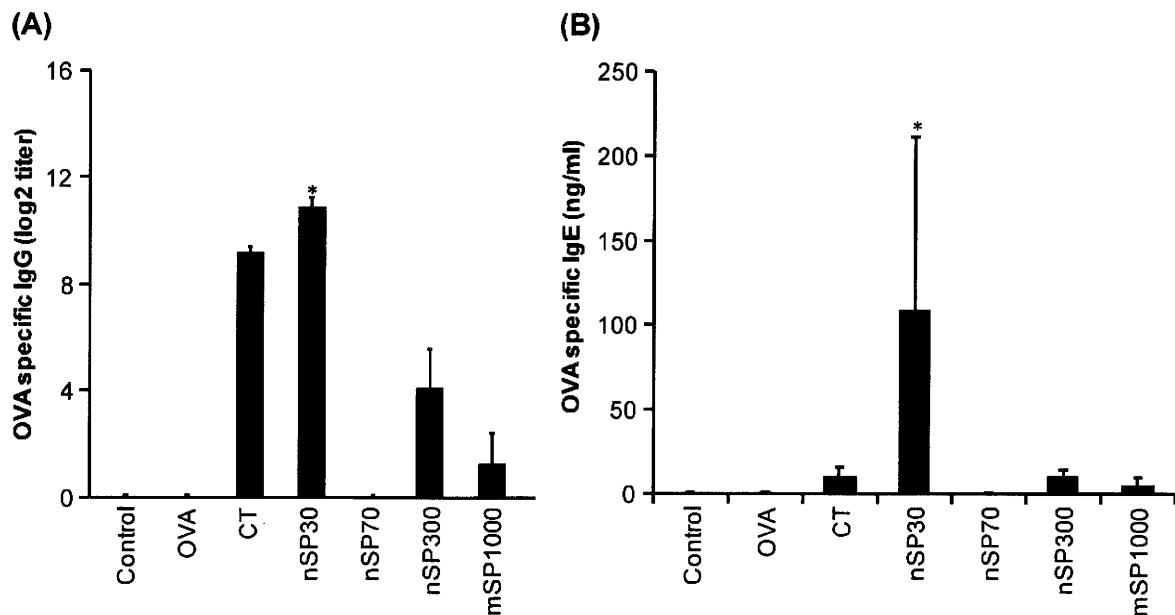
**③その他**

該当事項無し

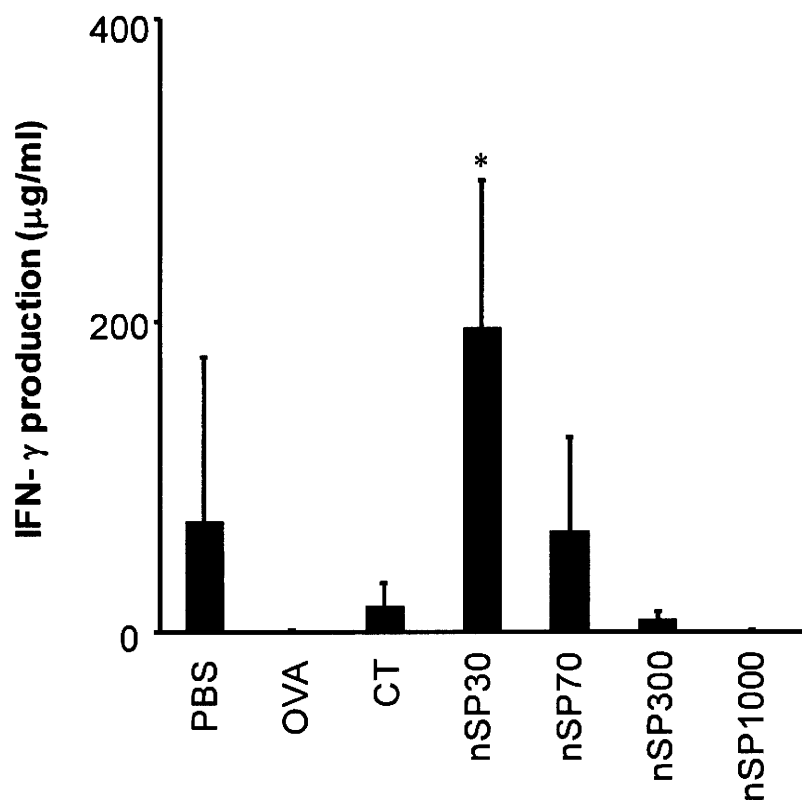
**I. 研究協力者**

該当事項無し

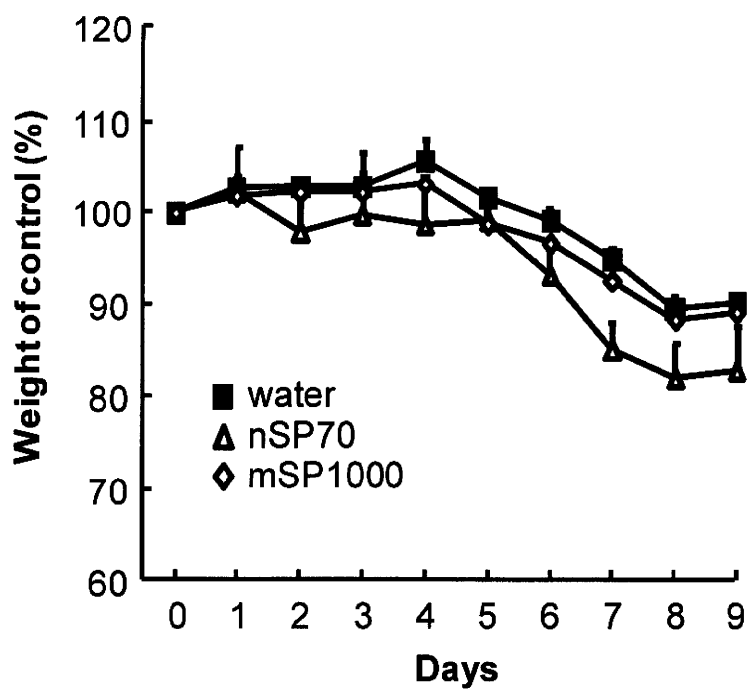




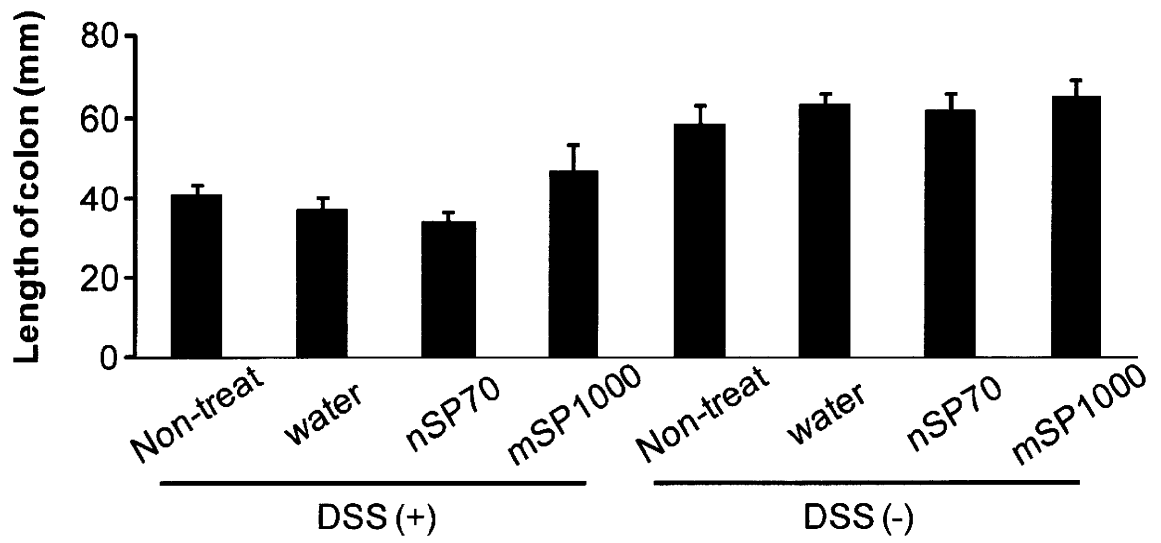
**Figure 1. OVA-specific IgG and IgE antibody responses after oral exposure to OVA plus silica particles.** BALB/c mice were orally exposed to PBS (vehicle control), OVA alone or OVA plus silica particles (1 mg OVA and 10 mg particles / 500  $\mu$ l / mouse) on days 0, 7, 14, and 21. In addition, these mouse were re-challenged with 1 mg OVA on day 22 and 23. Twenty minutes after final OVA-administration, plasma was collected and analyzed by ELISA to detect the level of (A) OVA-specific IgG and (B) OVA-specific IgE antibody responses. Data represent mean absorbance at a wavelength of 450 nm (reference wavelength, 655 nm). Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 5 to 8); \* $P$  < 0.01 vs OVA alone.



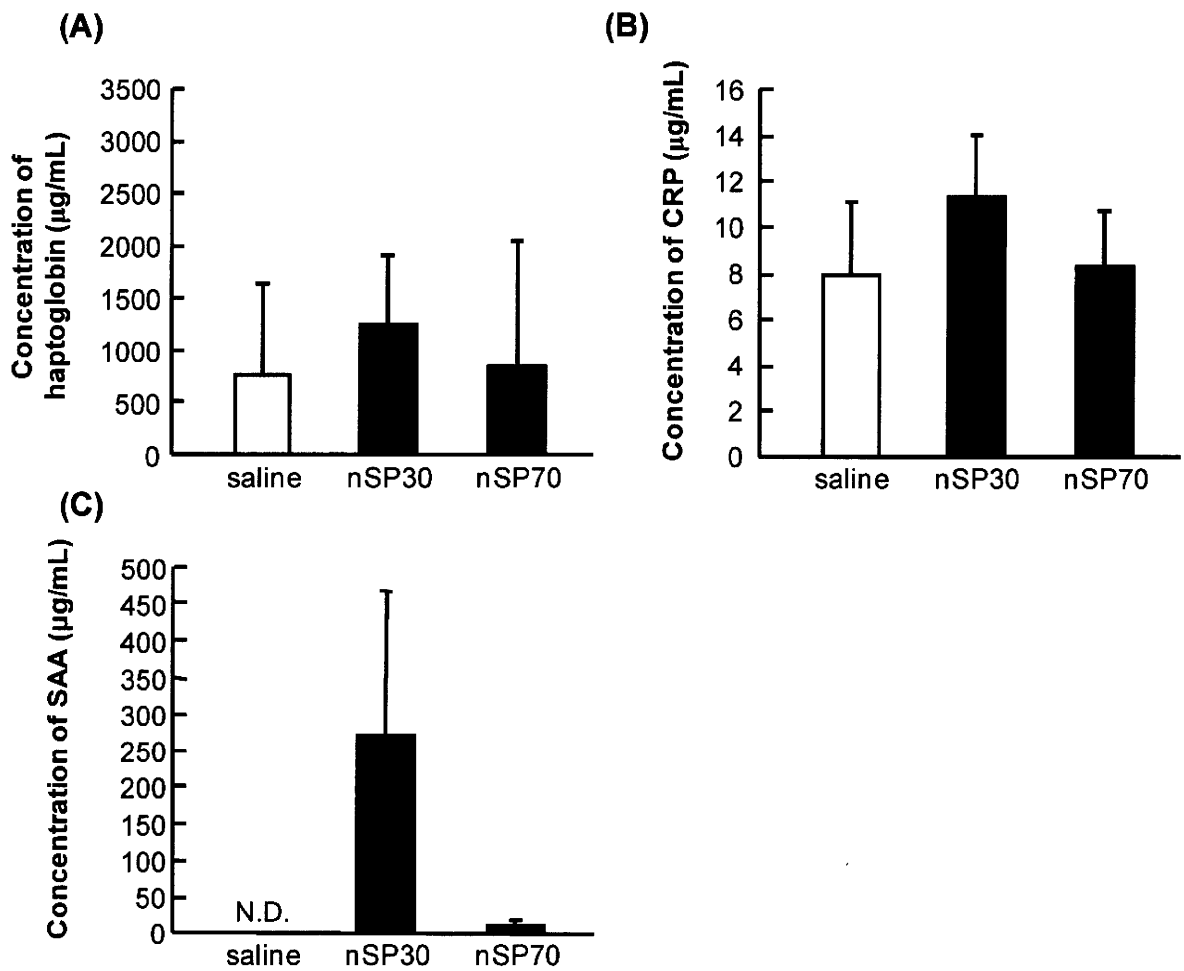
**Figure 2. Cytokine responses induced after oral exposure to OVA plus silica particles.** BALB/c mice were orally exposed to PBS (vehicle control), OVA alone or OVA plus silica particles (1 mg OVA and 10 mg particles / 500  $\mu$ l /mouse) on days 0, 7, 14, and 21. In addition, these mouse were re-challenged with 1 mg OVA on day 22 and 23. On day 23, splenocytes from each group were prepared and cultured with 1 mg/mL OVA. Culture supernatants were harvested after 5 days of incubation, and the level of OVA-induced IFN- $\gamma$  produced and released into the culture supernatant was analyzed by ELISA. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 3; \* $P$  < 0.01 vs OVA alone).



**Figure 3. Weight change in mice treated with nSP70.** Percent of initial body weight was monitored for 9 days after initiation of DSS administration. Data are presented as means  $\pm$  SEM.



**Figure 4. Length of colon in mice treated with nSP70.** Length of colon was monitored for 9 days after initiation of DSS administration. Data are presented as means  $\pm$  SEM.



**Figure 5. Application of acute phase proteins to assess exposure of nanomaterials through oral routes.** BALB/c mice were treated with nSP30, nSP70, or saline orally at 5 mg/mouse. Blood samples were collected at 24 h after treatment. The level of (A) haptoglobin, (B) CRP, and (C) SAA in the plasma of each mouse was examined by ELISA. N.D., not detected. Data are presented as mean  $\pm$  SD (n = 5-6).

## ナノマテリアルのトキシコプロテオミクス解析

研究分担者 吉川友章 大阪大学大学院薬学研究科・毒性学分野・助教

### 研究要旨

本邦のナノマテリアル研究は開発・実用化の点で世界をリードしており、ナノシリカや酸化チタンが食品添加物や着色剤として上市されている。一方で、ナノマテリアルのヒト健康への影響など予測できない負の側面（NanoTox）が懸念され始めている。即ちナノマテリアルに曝露された後の生体内挙動や蓄積性といった動態特性に基づいた毒性発現は殆ど理解されていないにも関わらず、実用化ばかり先行している現状が危惧され始めている。このような情勢を受けて我が国の NanoTox 研究には、一層の推進が求められているものの、未だ十分とは言い難いのが現状である。このままでは、不十分な安全性情報に基づいた闇雲なナノマテリアル規制が施行されてしまい、将来的にナノテクノロジーに立脚した我が国の産業競争力を喪失させかねない。従って、ナノマテリアルの社会受容の促進や国民の健康確保の観点からも、食品ナノマテリアルのヒト健康への影響を評価・予測できる新たな試験法の開発に加えて、数多くの実サンプルに関して安全性情報を可能な限り集積することが喫緊の最重要課題である。そこで本研究では、特に実用化が進んでいるナノシリカを標準ナノマテリアルとして用いて、物性と動態や毒性との連関評価を通してナノマテリアルの体内動態と免疫毒性の解析を進めている。本年度は、食物アレルギーの中でも最も患者数の多い卵アレルギーのアレルゲンとして知られる鶏卵白アルブミン（OVA）と、非晶質シリカをマウスに経口投与し、食物アレルギー誘発能を評価した。その結果、OVA 単独投与群ではほとんど OVA 特異的 IgG や IgE は誘導されなかったのに対して、非晶質シリカと OVA を共投与することで、OVA 特異的 IgG や IgE の有意な産生上昇が観察された。特に、nSP30 投与群では、ポジティブコントロールとして用いた、現存する最強の免疫誘導物質であるコレラトキシンに匹敵するほどの強い OVA 特異的 IgG、IgE 誘導が認められた。以上の結果は、今後、続々と開発されるであろう様々なナノマテリアルの有害性予測/回避法を確立して安全性を確保するにあたって、ナノマテリアルの食物アレルギー誘発に与える影響の評価が極めて重要であることを示している。

### A. 研究目的

本邦のナノマテリアル研究は、開発・実用化の点で世界をリードしており、ナノシリカや酸化チタンが食品添加物や着色剤として上市されている。しかし、欧米各国ではナノマテリアルの革新的機能を反映した毒性（NanoTox）が懸念され、ナノ製品の使用が規制されようとしている。

OECD 等でも、ナノマテリアルのヒトにおける動態解析や毒性、安全性評価、社会的・倫理的な管理策の確立など、NanoTox のリスクマネジメントに向けた国際基準づくりを開始した。

経口摂取されたナノマテリアルの安全性を考えてみた場合、“250 nm 以上のマテリアル”は消化管の細胞間を通過できないため、従来までのマ

テリアルは基本的に、消化管の表面で無害に留まっていた。しかし昨今、ナノマテリアル化することで、消化管上皮細胞の細胞間をすり抜け、細胞内にまで浸透させることが可能となったため、ナノマテリアルの機能を活用した様々な有用素材の開発が進展し、製品化されるに至っている。この反面、ナノマテリアルは免疫細胞に効率よく取り込まれる、あるいは免疫細胞機能に影響を与えることが示唆され始めている。これら消化管局所や全身組織に分布したナノマテリアルは、米国 NTP program の研究から、ナノマテリアルの発する遠赤外線や放電、光反応性・熱反応性による遺伝子・蛋白質変性などにより、アレルギーなどの未知毒性が誘発され得ることが指摘されている。従って、厚生労働行政においては、ナノマテリアルの社会受容の促進や国民の健康と福祉の向上の観点から、経口曝露されたナノマテリアルの健康への影響を評価出来る新たな試験法の開発やその有害性発現メカニズムの解明が緊急課題となっている。

このような状況をふまえ、本研究では、食品ナノマテリアルのリスク解析手法の開発を目的に、食塩やベーキングパウダー、プロセスチーズなどの食品添加物や化粧品基材等に既に実用化されているシリカを対象に、食物アレルギーの中でも最も患者数の多い卵アレルギーのアレルゲンとして知られる鶏卵白アルブミン (OVA) と、非晶質シリカをマウスに経口投与し、食物アレルギー誘発能を評価した。

## B. 研究方法

### ナノシリカ

本研究では、Micromod Partikeltechnologie 社 (Germany) より購入した表面未修飾ナノシリカ (直径 30、70、300、1000 nm; それぞれ nSP30、nSP70、nSP300、mSP1000) を使用した。

### マウスへの経口投与

蒸留水に懸濁した非晶質シリカ (25 mg/ml) と OVA (10 mg/ml) を 4 : 1 の割合で混合し、シリ

カと OVA の混合溶液を調製した。この混合溶液を経口ゾンデにて 500  $\mu$ l/mouse で BALB/c マウス (雌性、6 週齢) に 0、7、14、21 日目の計 4 回投与した。さらに 22 ならびに 23 日目に OVA 溶液を 50 mg/500  $\mu$ l/mouse で再投与 (再チャレンジ) した。OVA の最終投与から 20 分後に心臓採血により全血を回収すると共に脾臓を回収し、以降の実験に供した。

### OVA 特異的抗体価の測定

心臓採血により回収した血液を 15000 rpm で 15 分遠心分離し、上清を血清として回収した。この血清中に含まれる OVA 特異的 IgG や IgE の抗体力価は ELISA 法により測定した。

### 脾細胞を用いた OVA 特異的 IFN- $\gamma$ 産生能の評価

シリカと OVA を共投与したマウスから脾細胞 ( $5 \times 10^6$  cells/ml) を調製し、1 mg/ml の OVA を含む培養液で 5 日間培養した。培養上清中の IFN- $\gamma$  量を ELISA 法により測定した。

## C. 研究結果および D. 考察

近年、本邦において、食物アレルギーや炎症性腸疾患の罹患率が増加している。食生活の変化や人工的に作り出した化学物質への曝露が食物アレルギー症状を発症あるいは悪化させる要因ではないかと危惧されている。これまでに我々は、非晶質ナノシリカをマクロファージ細胞株 (RAW264.7) 等に曝露することによって、TNF- $\alpha$  をはじめとする炎症性サイトカインの産生を誘導することを明らかとしている。これらの結果を考え合わせると、非晶質ナノシリカが食物アレルギーの発症・悪化に関与する可能性を否定することはできない。そこで、食物アレルギーの中でも最も患者数の多い卵アレルギーのアレルゲンとして知られる鶏卵白アルブミン (OVA) と共に、粒子サイズの異なる非晶質シリカを強制経口投与したマウスを用いて、食物アレルギーの主原因とされている抗原特異的な IgE 産生量を評価した (Figure 1)。その結果、OVA を単独で投与した

マウスでは OVA 特異的 IgG や IgE は誘導されなかった。それに対して、nSP300 や mSP1000 を OVA と共投与することで、OVA 特異的 IgG や IgE の産生上昇が観察された。特に、nSP30 投与群では、ポジティブコントロールとして用いた、現存する最強の免疫誘導物質であるコレラトキシンに匹敵するほどの強い OVA 特異的 IgG、IgE 誘導が認められた。また、興味深い事に nSP70 投与群では抗原特異的な IgG や IgE の産生が全く認められなかった。さらに、マウスから回収した脾細胞を回収し、サイトカイン産生を評価した結果、nSP30 投与群においてのみ、免疫活性化サイトカインであるインターフェロン- $\gamma$  の産生が認められた (Figure 2)。以上の結果は、直径が 30 nm 程度の微小なシリカを利用するに当たっては、食物アレルギーの誘導等をはじめとした免疫学的な安全性評価が必須となる可能性を示唆している。現在、抗原特異的 IgG ならびに IgE 産生誘導に対する nSP30 の作用メカニズムや nSP70 によってこれらの応答が回避されるメカニズムの解析を進めている。

## E. 結論

本年度は種々サイズのシリカの抗原特異的 IgE 産生能を指標にした食物アレルギー誘導能を評価した。我々の検討によると、粒子サイズに関わらず若干の抗原特異的 IgE 産生が誘導されること、並びに直径 30 nm 程度のナノシリカを投与した群において最も強い効果が認められることを明らかとした。現在、これらの情報・手法を基盤として、ナノシリカの起炎性と食物アレルギー誘導との関係を精査している。

## G. 研究発表

### ①論文発表

1. Higashisaka K, Yoshioka Y, Yamashita K, Morishita Y, Fujimura M, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, **Yoshikawa T**, Itoh N, Tsutsumi Y. Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and

toxicity of nanomaterials. *Biomaterials*. 2011;32(1):3-9.

2. Yoshioka Y, **Yoshikawa T**, Tsutsumi Y. Nano-safety science for assuring the safety of nanomaterials. *Nippon Eiseigaku Zasshi*. 2010;65(4):487-92.
3. Nabeshi H, **Yoshikawa T**, Arimori A, Yoshida T, Tochigi S, Kondoh S, Hirai T, Akase T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, Yoshioka Y, Tsutsumi Y. Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages. *Nanoscale Res Lett*. in press.

### ②学会発表

#### 国内

1. **吉川友章**, 吉岡靖雄, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: ナノ含有食品の安全性確保および安全なナノ含有食品の開発に向けて-1: ナノマテリアルの粒子サイズと血液凝固系への影響. 日本食品衛生学会第 99 回学術講演会, 東京(東京), 2010 年 5 月.
2. 吉岡靖雄, **吉川友章**, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: ナノ含有食品の安全性確保および安全なナノ含有食品の開発に向けて-2: ナノマテリアルの表面電荷と免疫系への影響. 日本食品衛生学会第 99 回学術講演会, 東京(東京), 2010 年 5 月.
3. **吉川友章**, 鍋師裕美, 赤瀬貴憲, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 仲里泰太郎, 松山恵吾, 近藤小百合, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 非晶質ナノシリカの細胞内局在と安全性の連関に関する基礎情報の集積. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 那覇(沖縄), 2010 年 6 月.
4. 吉田徳幸, **吉川友章**, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 堤康央: 非晶質ナノシリカの経口曝露における免疫攪



乱作用の解析. 第 9 回次世代を担う若手フォーラム・フォーラム 2010, 京都 (京都), 2010 年 10 月.

5. 吉田徳幸, 吉川友章, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 宇治美由紀, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 吉岡靖雄, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経口影響に関する基礎情報の収集. 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪 (大阪), 2010 年 10 月.
6. 吉田徳幸, 吉川友章, 鍋師裕美, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経口曝露における安全性評価. 日本薬学会 第 131 年会, 静岡 (静岡), 2011 年 3 月.
7. 宇治美由紀, 吉川友章, 吉田徳幸, 栃木彩恵子, 平井敏郎, 市橋宏一, 赤瀬貴憲, 鍋師裕美, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの消化管吸収性と生体影響との基礎的解析. 日本薬学会 第 131 年会, 静岡 (静岡), 2011 年 3 月.
8. 吉岡靖雄, 東阪和馬, 山下浩平, 森下裕貴, 藤村真穂, 潘 慧燕, 小椋健正, 長野一也, 阿部康弘,

鎌田春彦, 鍋師裕美, 吉川友章, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性評価に資するバイオマーカーの探索. 日本薬学会 第 131 年会, 静岡 (静岡), 2011 年 3 月.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### ①特許取得

該当事項無し

### ②実用新案登録

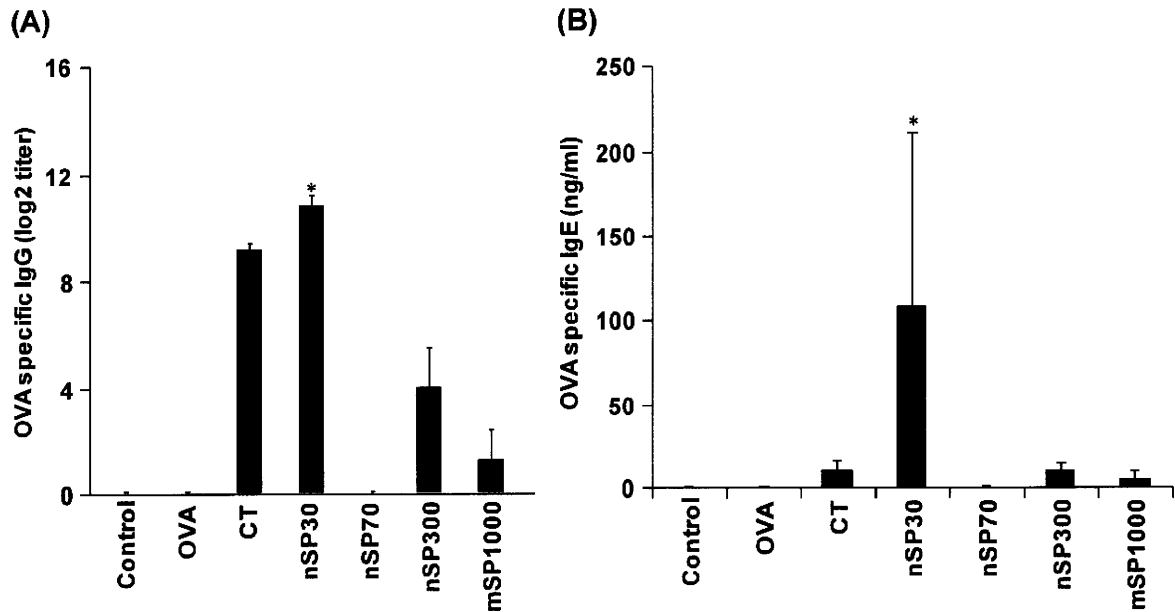
該当事項無し

### ③その他

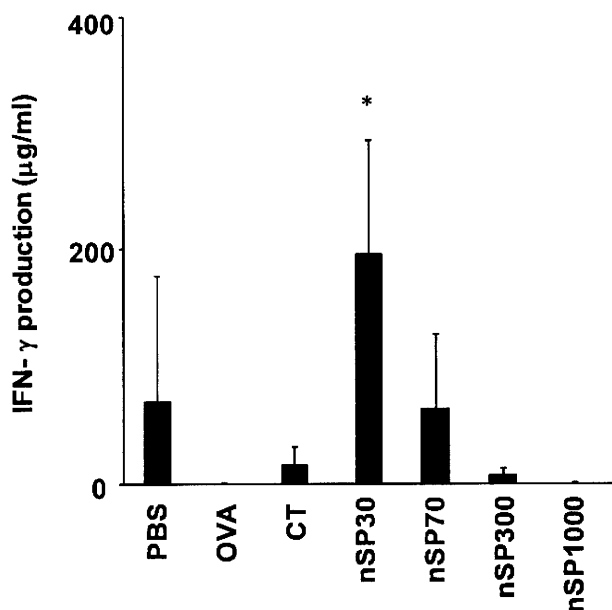
該当事項無し

## I. 研究協力者

該当無し



**Figure 1. OVA-specific IgG and IgE Ab response after oral exposure to OVA plus silica particles.** BALB/c mice were orally exposed to PBS (vehicle control), OVA alone or OVA plus silica particles (1 mg OVA and 10 mg particles / 500  $\mu$ l / mouse) on days 0, 7, 14, and 21. In addition, these mouse were re-challenged with 1 mg OVA on day 22 and 23. 20 minutes after final OVA-administration, plasma was collected and analyzed by ELISA to detect the level of (A) OVA-specific IgG and (B) OVA-specific IgE Ab responses. Data represent mean absorbance at a wavelength of 450 nm (reference wavelength, 655 nm). N.D., not detected. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 5 to 8); \* $P$  < 0.01 vs OVA alone.



**Figure 2. Cytokine responses induced after oral exposure to OVA plus silica particles.** BALB/c mice were orally exposed to PBS (vehicle control), OVA alone or OVA plus silica particles (1 mg OVA and 10 mg particles / 500  $\mu$ l /mouse) on days 0, 7, 14, and 21. In addition, these mouse were re-challenged with 1 mg OVA on day 22 and 23. On day 23, splenocytes from each group were prepared and cultured with 1 mg/mL OVA. Culture supernatants were harvested after 5 days of incubation, and the level of OVA-induced IFN- $\gamma$  produced and released into the culture supernatant was analyzed by ELISA. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 3; \* $P$  < 0.01 vs OVA alone).

研究成果の刊行に関する一覧表

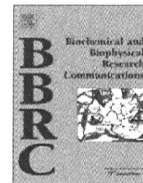
雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morishige T, Yoshioka Y, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S.	Titanium dioxide induces different levels of IL-1 $\beta$ production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B	Biochem Biophys Res Commun	392(2)	160-5	2010
Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Narimatsu S, Monobe Y, Imazawa T, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S.	The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1b production, ROS production and endosomal rupture	Biomaterials	31(26)	6833-6842	2010
Yoshioka Y, Yoshikawa T, Tsutsumi Y.	Nano-safety science for assuring the safety of nanomaterials	Nippon Eiseigaku Zasshi	65(4)	487-92	2010
Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S.	Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties	Pharmazie	65(8)	596-9	2010
Higashisaka K, Yoshioka Y, Yamashita K, Morishita Y, Fujimura M, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Yoshikawa T, Itoh N, Tsutsumi Y.	Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials	Biomaterials	32(1)	3-9	2011
Nabeshi H, Yoshikawa T, Arimori A, Yoshida T, Tochigi S, Kondoh S, Hirai T, Akase T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Itoh N, Yoshioka Y, Tsutsumi Y.	Effect of surface properties of silica nanoparticles on their cytotoxicity and cellular distribution in murine macrophages	Nanoscale Res Lett			In press



Contents lists available at ScienceDirect

# Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Titanium dioxide induces different levels of IL-1 $\beta$ production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B

Tomohiro Morishige<sup>a,1</sup>, Yasuo Yoshioka<sup>a,b,\*</sup>, Aya Tanabe<sup>a,1</sup>, Xinglei Yao<sup>a</sup>, Shin-ichi Tsunoda<sup>b,c</sup>, Yasuo Tsutsumi<sup>b,c,d</sup>, Yohei Mukai<sup>a</sup>, Naoki Okada<sup>a</sup>, Shinsaku Nakagawa<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Biotechnology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>b</sup> The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

<sup>c</sup> Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 567-0085, Japan

<sup>d</sup> Laboratory of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 December 2009

Available online 7 January 2010

#### Keywords:

Cytokine  
Inflammation  
Macrophage  
NALP3  
Nanomaterial

### ABSTRACT

Although titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) is widely used, its inhalation can induce inflammatory diseases accompanied by interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production. The particle characteristics of TiO<sub>2</sub> are important factors in its biological effects. It is urgently necessary to investigate the relationship between the particle characteristics and biological responses for the development of safe forms of TiO<sub>2</sub>. Here, we systematically compared the production of IL-1 $\beta$  in response to various forms of TiO<sub>2</sub> by macrophage-like human THP-1 cells using various sizes (nano to micro), crystal structures (anatase or rutile), and shapes (spherical or spicular) of TiO<sub>2</sub>. The production of IL-1 $\beta$  depended dramatically on the characteristics of the TiO<sub>2</sub>. Notably, smaller anatase and larger rutile particles provoked higher IL-1 $\beta$  production. In addition, IL-1 $\beta$  production depended on active cathepsin B and reactive oxygen species production independent of the characteristics of TiO<sub>2</sub>. Our results provide basic information for the creation of safe and effective novel forms of TiO<sub>2</sub>.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Introduction

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) is a natural mineral that occurs in three different crystallographic structures: rutile, anatase, and brookite. Because of its physicochemical properties of good fatigue strength, machinability, biocompatibility, and whitening and photocatalytic effects, TiO<sub>2</sub> is widely used in paints, wastewater treatment, sterilization, cosmetics, foods, biomedical ceramics, and implanted biomaterials. Rutile is used in pigments and sunscreens. Anatase is used as an efficient photocatalyst and in printing ink. TiO<sub>2</sub> is commercially manufactured in large quantities around the world because it is considered to be of low toxicity [1,2]. However, the increasing use of TiO<sub>2</sub> has raised public concern about the potential risks to human health. For instance, TiO<sub>2</sub> can induce lung inflammation and brain damage [3–9]. It has become evident that particle

characteristics, including particle size, surface properties, crystal structure, and physical attributes, are important factors in cellular responses. Therefore, it is necessary to evaluate the association between the particle characteristics of TiO<sub>2</sub> and its biological effects.

Inflammation has been suggested as a key factor in the development of fibrosis and cancers [10]. Studies have shown that TiO<sub>2</sub> induces substantial, albeit transient, inflammation accompanied by significant interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production [6,8]. Macrophages and the IL-1 $\beta$  produced by them have been suggested to play a crucial role during the early inflammatory response after exposure to TiO<sub>2</sub> [6,8]. The pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  is involved in the initiation of inflammatory processes and thus contributes to inflammatory diseases [11]. In fact, the IL-1 $\beta$  receptor antagonist anakinra has been successfully used to treat patients suffering from inflammatory diseases, indicating underlying increased IL-1 $\beta$  production [12,13]. Therefore, for the development of safe novel forms of TiO<sub>2</sub>, systematic analysis of the association between particle characteristics of TiO<sub>2</sub> and IL-1 $\beta$  production levels and the elucidation of the mechanisms of TiO<sub>2</sub>-induced IL-1 $\beta$  production are urgently needed.

Mature IL-1 $\beta$  is produced through the cleavage of inactive pro-IL-1 $\beta$  precursor by caspase-1, which is activated within a large

\* Corresponding authors. Addresses: The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Fax: +81 6 6879 8177 (Y. Yoshioka); Laboratory of Biotechnology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Fax: +81 6 6879 8179 (S. Nakagawa).

E-mail addresses: [yasuo@phs.osaka-u.ac.jp](mailto:yasu@phs.osaka-u.ac.jp) (Y. Yoshioka), [nakagawa@phs.osaka-u.ac.jp](mailto:nakagawa@phs.osaka-u.ac.jp) (S. Nakagawa).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.