

201428014A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

抗原性物質への免疫応答に対する
ナノマテリアル経皮曝露の影響に関する
評価手法の開発研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

(H26－化学－一般－004)

研究代表者 安達 玲子

平成27年3月

目 次

I. 総括研究報告

抗原性物質への免疫応答に対するナノマテリアル経皮曝露の影響に
関する評価手法の開発研究

安達 玲子 1

II. 分担研究報告

1. ナノマテリアル経皮曝露が抗原性物質への免疫応答に及ぼす影響に
関するin vivo評価手法の開発研究

安達 玲子 9

2. ナノマテリアル経皮曝露が抗原性物質への免疫応答に及ぼす影響に
関するin vitro評価手法の開発研究

酒井 信夫 18

3. ナノマテリアルのアジュバント活性に関する貪食細胞を用いた
in vitro評価手法の開発研究

最上 知子 35

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 41

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

抗原性物質への免疫応答に対するナノマテリアル経皮曝露の影響に
関する評価手法の開発研究

安達 玲子

抗原性物質への免疫応答に対するナノマテリアル経皮曝露の影響に関する 評価手法の開発研究

研究代表者：安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長

研究要旨

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては物理化学的特性による健康影響の可能性が指摘されており、OECD ではわが国も参加してフラーレン、カーボンナノチューブ、酸化チタン、酸化亜鉛等 13 品目の安全性評価が重点的に進められている。酸化チタンや酸化亜鉛は多くの日焼け止め製品に配合されており、ヒト皮膚と接触する頻度が非常に高い。本研究では、酸化チタンナノマテリアルの経皮曝露が抗原タンパク質の経皮感作に及ぼす影響に関する *in vivo* 評価系及び *in vitro* 評価系を開発し検討することを目的として、[I] 動物モデルを用いる *in vivo* 評価手法に関する検討、[II] 抗原提示細胞への抗原タンパク質の取込み及び細胞応答を指標とする *in vitro* 評価手法に関する検討、及び、[III] 貪食細胞を用いた *in vitro* アジュバント活性評価法の検討を行った。酸化チタンナノマテリアルとしては、粒子径が 35 nm、15 nm、6 nm の 3 種を用いた。

[I] 抗原の腹腔内投与による感作実験系では、用いた 3 種の酸化チタンとも、陽性対照アジュバントである Alum と同様に、モデル抗原である OVA による感作を増強する、すなわち、アジュバント作用を有することが示された。また、OVA をマウス皮膚に繰り返し貼付することにより経皮感作を成立させるモデル実験系を確立し、酸化チタンの共存により経皮感作による抗原特異的抗体産生が増強されることが示された。

[II] 単球系細胞株を用いた抗原タンパク質の取込み及び細胞応答に関する *in vitro* 評価手法の開発については、OVA 及び酸化チタンを抗原提示細胞様に分化させた培養細胞に同時に添加して影響を解析した結果、酸化チタンが添加濃度依存的に抗原提示細胞の活性化を減弱させる傾向が認められた。

[III] アジュバント活性の *in vitro* 評価手法として、マクロファージ系培養細胞を用いた NLRP3 インフラマソーム活性化のアッセイ系を確立し、酸化チタンのアジュバント活性について検討したところ、酸化チタン粒子が濃度依存的な活性を有することが判明し、粒子径が小さい場合は貪食によらない直接の活性化が示唆された。

今後、それぞれの項目における用量依存性やナノマテリアルの種類による違い、またナノマテリアルの効果のメカニズム等の詳細について検討を進める。

研究分担者

酒井信夫 国立医薬品食品衛生研究所

生化学部 主任研究官

最上知子 国立医薬品食品衛生研究所

生化学部 部長

A. 研究目的

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては物理化学的特性による健康影響の可能性が指摘されている。OECD では、わが国も参加

して、フラーレン、カーボンナノチューブ、酸化チタン、酸化亜鉛等、13品目の安全性評価が重点的に進められている。酸化チタンや酸化亜鉛は多くの日焼け止め製品に配合されており、ヒト皮膚と接触する頻度が非常に高い。その経皮曝露の影響に関しては、これまでに皮膚透過性試験や皮膚感作性試験等が行われているが、いずれも明らかな作用は認められていない。

一方で、最近、加水分解コムギタンパク質を含む洗顔石鹸の事例のように、タンパク質が皮膚を透過して取り込まれ抗原となる経皮感作経路がアレルギー発症の重要な要因として注目されている。しかし、酸化チタン等ナノマテリアルがタンパク質経皮感作に及ぼす影響については未だ検討されていない。

また、抗原免疫時のアジュバント作用においては、貪食細胞による貪食・インフラマソームの活性化・炎症性サイトカイン産生が重要であることが明らかにされている。とりわけ、成熟型 IL-1 β の産生をもたらす NLRP3 インフラマソーム・caspase-1 の活性化が決定的な役割を持っており、NLRP3 や caspase-1 ノックアウトマウスにおいては、水酸化アルミニウム (Alum) のアジュバント活性が失われることが報告されている。Alum はヒトや動物に使用するワクチンに広く使用されているアジュバントである。我々はこれまでにマクロファージが多層カーボンナノチューブ MWCNT を貪食し、NLRP3 活性化を介して IL-1 β を産生することを報告しており、酸化チタン等のナノマテリアルについても同様のアジュバント様作用により抗原感作を促進する可能性が懸念される。

本研究班では、酸化チタン、酸化亜鉛等のナノマテリアルが抗原タンパク質の経皮感作に及ぼす影響について、*in vivo* 評価系及び *in vitro* 評価系を開発し検討することを目的として、**[I]** 酸化チタン等のナノマテリアルの経皮曝露が抗原タンパク質の経皮感作に及ぼす影響に関する、動物モデルを用いる *in vivo* 評価手法に関する検討、**[II]** 抗原提示における免疫応答にナノマテリア

ルが及ぼす影響に着目した、抗原提示細胞を用いた抗原タンパク質の取込み及び細胞応答に関する *in vitro* 評価手法に関する検討、**[III]** 貪食細胞を用いた酸化チタン等ナノマテリアルの *in vitro* アジュバント活性評価法の検討を行う。

B. 研究方法

試料及び試薬

被検物質としては、下記の3種類の酸化チタンナノマテリアル (表面未処理) を用いた。

酸化チタン A (粒子径: 15 nm)

酸化チタン B (粒子径: 35 nm)

酸化チタン C (粒子径: 6 nm)

陽性対照とした多層カーボンナノチューブは、MWCNT-SD1 (長さ 8 μ m, 径 150 nm) である。IL-1 β 測定はミリポア社の MILLIPLEX™ MAP アッセイキットを用いて行った。水酸化アルミニウムゲル Alum (免疫グレードアジュバント用) はコスモバイオ株式会社より購入した。Stealth™ Select RNAi (NLRP3) および Stealth RNAi negative control は Invitrogen 社から購入した。抗原タンパク質としては、卵白アルブミン (OVA; Sigma A5503) を用いた。フォルボール 12-ミリステート 13-アセテート (PMA; Sigma P1585) 及びリコンビナントヒトインターロイキン 4 (IL-4; PeproTech 200) は試薬標準品を購入した。

ナノマテリアルの懸濁液調製

3種の酸化チタンは、それぞれ 50 mg/mL の濃度で PBS または細胞培養用培地に懸濁し、10分間の超音波処理の間にはボルテックスミキサーによる攪拌を3-4回繰り返し、最後に25G注射針付きのシリンジを用いて攪拌し均一化した。MWCNT-SD1は0.5% Tween 20を含むPBSに5 mg/mL の濃度で懸濁し、1~5分間の超音波処理、ピペッティング、25G注射針付きシリンジ通過により分散した。

抗原の腹腔内投与による感作に及ぼす酸化チタ

ンの影響に関する検討

動物は、6週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー（株）より購入した。1群の匹数は5匹とした。7週齢時に、上記3種の酸化チタンそれぞれについて、OVA 20 μ g 及び酸化チタン（2 mg あるいは 10 mg）を生理食塩水 300 μ L に懸濁し、腹腔内投与した（Day 0、1次免疫）。陽性対照アジュバントとしては Alum（2 mg）を用いた。14日後（Day 14）に再度投与し（2次免疫）、翌日（Day 15）に血液を採取して、血清中の OVA 特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。

抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタンの影響に関する検討

動物は、7週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー（株）より購入した。1群の匹数は5匹とした。8週齢時に背面片側を剃毛し（Day 0）、翌日より3日間、OVA 溶液、あるいは OVA 及び酸化チタンの混合懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った（Day 1-3）。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」（鳥居薬品株式会社）を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原液を浸潤させて貼付した。3日間貼付後にパッチを外し（Day 4）、その後4日間休ませるという操作を1クールとし、4クールの感作後、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。アナフィラキシー反応の惹起は、Day 25 に感作抗原 1 mg/100 μ L を腹腔内投与（i.p.）して行った。i.p.後30分間、マウスの直腸内体温を測定した。また、アナフィラキシー症状を観察し、スコアリングを行った。惹起30分後に麻酔下で採血し、血清中ヒスタミンの濃度を Histamine EIA Kit（SPI-BIO）にて測定した。

抗原提示細胞としての細胞培養及び分化誘導

ヒト急性単球性白血病細胞株として樹立される THP-1 細胞は、独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク（JCRB0112.1）及び ATCC（American Type Culture Collection）より分譲さ

れた。6-well 培養プレートに 5×10^5 cells / 2 mL / well の密度で播種し、20 ng/mL PMA 及び 20 ng/mL IL-4 を含む Complete RPMI 1640 培地中に 96 時間培養することで樹状細胞様細胞（THP-1-DC 細胞）に分化させた。OVA（0 及び 1 mg/mL）及び酸化チタン（0, 0.1, 1 及び 10 μ g/mL）を含む Complete 培地を加えることで抗原提示を行った。

フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原の解析

細胞表面抗原の解析には、BD Accuri™ C6 フローサイトメーター（BD Biosciences 社）を用い、BD Biosciences 社及び BioLegend 社製の蛍光標識抗ヒトモノクローナル抗体及び蛍光標識アイソタイプコントロール抗体を用いて細胞染色を行った。解析は前方散乱光 / 側方散乱光の2パラメータヒストグラムにおいてデブリス等を排除したゲーティングにより単球系ポピュレーションについて、10,000 細胞の平均蛍光強度（MFI; mean fluorescence intensity）を定量した。

マクロファージ系細胞からのサイトカイン放出の測定

ヒト単球由来 THP-1 細胞は 24well プレートに播種し、0.3 μ M PMA と 10%FCS を含む RPMI 培地中で 72 時間培養してマクロファージ様に分化した。さらに PMA を除いた培地中で 24 時間培養したのちに、各種阻害剤あるいは溶剤で 30 分前処理し、酸化チタン、Alum、分散 MWCNT あるいは対照となる溶剤を培地に添加し各種阻害剤の存在下・非存在下で 6 時間培養した。培養上清を回収し、MILLIPLEX™ MAP アッセイを用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

siRNA を用いた NLRP3 のノックダウン

THP-1 細胞を 72 時間 PMA でマクロファージ様に分化したのち、Stealth™ Select RNAi（NLRP3, sense2 および antisense2）あるいは Stealth RNAi negative control を lipofectamine

RNAi MAX 試薬(Invitrogen) を用いて細胞に導入し、24 時間後に酸化チタンならびに Alum に 6 時間曝露した。培養上清を回収し、サイトカイン濃度の測定を行った。

RNA 抽出および定量的リアルタイム RT-PCR

NLRP3 ノックダウンは mRNA を定量して評価した。細胞から RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出し DNase 処理を行った。QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) を用い ABI Prism 7300 において定量的リアルタイム RT-PCR により測定した。発現量データは 18S rRNA の量で補正した。

統計解析

動物試験のデータは Microsoft Excel により集計し、V 群を基準とした Dunnett の検定、あるいは、2 群間での Student の t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。フローサイトメトリーの取得データは FlowJo (トミーデジタルバイオロジー社)により集計し、Microsoft Excel ソフトウェアを用いて、対象群の MFI を基準とした Student の t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

(倫理面への配慮)

マウスへの検体の投与、採血等においては、動物の苦痛を最小限に留めるように努め、動物飼育・管理に当たっては研究所の利用規定に従った。本研究は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理審査委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

[I] ナノマテリアル経皮曝露が抗原性物質への免疫応答に及ぼす影響に関する in vivo 評価手法の開発研究

抗原の腹腔内投与による感作に及ぼす酸化チタンの影響に関する検討

酸化チタンナノマテリアルが免疫応答に及ぼ

す影響を検討するため、まず、マウスを用いる動物実験における最も基本的な感作方法として、OVA の腹腔内投与による感作を実施した。その際に酸化チタンを共存させることにより、そのアジュバント効果について検討した。陽性対照アジュバントとして Alum を使用した群(OVA-ALUM 群)では、抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体産生については、OVA のみを投与したアジュバント不使用者群 (OVA 群) に対して有意な増大が見られた。OVA 腹腔感作時に酸化チタンを共存させた場合、IgE、IgG1 について、OVA 群に対して有意な抗体産生の増大が見られた。これらの結果から、今回実験に用いた 3 種の酸化チタンナノマテリアルは全て、陽性対照アジュバントとして用いた Alum と同様に、抗原の腹腔内投与において Th2 細胞優位な免疫応答を誘導し、OVA 特異的な IgE 及び IgG1 抗体の産生を用量依存的に増強することが示された。

抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタンの影響に関する検討

OVA をモデル抗原として、マウスの皮膚に抗原溶液を 3 日間貼付し 4 日間休止するというサイクルを 4 回繰り返すという実験系を構築し、経皮感作性のアッセイ系としての有用性を検討した。OVA の用量は 1 回の貼付につき 100 μ g/匹、50 μ g/匹、20 μ g/匹とした。その結果、IgE、IgG1 ともに、V 群に対して有意な抗体産生が見られた。続いて、抗原の経皮感作により産生された抗体の量がアレルギー反応を誘発するレベルかどうか検討するため、抗原の腹腔内投与によるアナフィラキシー (能動的全身性アナフィラキシー) 反応の惹起を行った。惹起 30 分後、全ての群で体温が大きく低下し (平均 3.7°C)、V 群と比較して有意差が認められた。また、惹起 30 分後、全ての群で、血清中ヒスタミン濃度が V 群と比較して有意に上昇していた。アナフィラキシー症状のスコアについては、全ての群で高いスコアであった (平均 3.3)。これらの結果から、OVA をモデル抗原として用い、抗原経皮感作に及ぼすナノマテ

リアルの影響を評価するための *in vivo* 実験系を確立できたと言える。

次に、この実験系に酸化チタンナノマテリアルを適用した結果を示す。検体としては、腹腔内投与による感作において抗体産生の増強効果が最も強く見られた酸化チタン A を用いた。OVA と酸化チタンを混合した懸濁液を予め調製し、パッチにアプライしてマウス皮膚に貼付した。用量は、酸化チタンは 1.25 mg/匹、OVA は 100 μ g/匹、50 μ g/匹、20 μ g/匹、とした。また、4 週間の経皮感作後には、OVA のみ（酸化チタンは含まない）を腹腔内投与し、誘発されるアナフィラキシーについて評価した。IgE、IgG1 については、全ての群で V 群に対して有意な抗体産生が見られた。OVA の用量が 20 μ g の場合、酸化チタンの共存により抗体産生が増強された。また、OVA の腹腔内投与による惹起 30 分後、全ての群で体温が大きく低下し(平均 3.2°C)、V 群と比較して有意差が認められた。また、全ての群で血清中ヒスタミン濃度が V 群と比較して有意に上昇していた。惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングについても、全ての各群で、高いスコア(平均 3.3)であった。しかし、どの場合も、酸化チタンの有無による差は見られなかった。

III] ナノマテリアル経皮曝露が抗原性物質への免疫応答に及ぼす影響に関する *in vitro* 評価手法の開発研究

ナノマテリアル共存濃度の検討

初期検討から、THP-1-DC 細胞の抗原提示能(活性化)を評価する際の至適 OVA 添加濃度を 1 mg/mL、至適培養時間を 72 時間と設定し、酸化チタン(試料 A)を終濃度 0, 0.1, 1, 10 μ g/mL で Complete 培地中に添加した。更に、酸化チタン単独の THP-1-DC 細胞への影響を解析するため、抗原無添加の培地中に 10 μ g/mL 酸化チタンを添加する対照群を設けた。ナノマテリアル共存下における THP-1-DC 細胞の抗原提示細胞活性化マーカーについて解析した結果、OVA (1 mg/mL)

添加により発現量が増加した HLA-DR (MHC クラス II 分子)及び CD86 は、酸化チタンを共存させることによりそれらの発現量が濃度依存的に低下した。他方、酸化チタン単独添加群においても、抗原提示細胞活性化マーカーの発現量が有意に増加した。

ナノマテリアル試料間の検討

A, B, 及び C の 3 種類の酸化チタン試料を用いて、ナノマテリアル試料間の抗原提示細胞活性化マーカー (HLA-DR 及び CD86) の発現量の違いについてフローサイトメトリーで解析した。CD86 は OVA (1 mg/mL) 添加によりその発現量が増加し、酸化チタンを共存させることにより発現量が濃度依存的に低下するという傾向は、3 種全てのナノマテリアル試料間で共通であった。他方、HLA-DR に関しては、OVA (1 mg/mL) 添加、酸化チタン無添加群での発現量が総じて低かった。また、酸化チタン単独添加群においても、HLA-DR の発現量の増加は認められなかった。

III] ナノマテリアルのアジュバント活性に関する食食細胞を用いた *in vitro* 評価手法の開発研究

酸化チタンナノマテリアルは Alum と同様にマクロファージ系細胞からの IL-1 β 産生を促進する

PMA 分化 THP-1 細胞を用い、汎用されているアジュバント Alum を用いて検討したところ、濃度 (50~250 μ g/mL) に依存し、IL-1 β 産生を促進することを確認した。同様に、三種類の酸化チタンナノマテリアル (A~C) がいずれも濃度依存的 (50~250 μ g/mL) に IL-1 β 産生を促進することを見いだした。

酸化チタンナノマテリアルは NLRP3- caspase-1 を介して IL-1 β 産生を促進する

酸化チタンナノマテリアル (A~C) ならびに Alum による IL-1 β 産生の促進は、caspase-1 阻害剤である z-YVAD-fmk によりほぼ完全に抑制

された。また、細胞の NLRP3 を特異的 siRNA で処理し、NLRP3 の mRNA レベルを約 15%までノックダウンした場合においても、Alum による IL-1 β 産生促進は約 90%、酸化チタンナノマテリアルによる IL-1 β 産生も約 90~100%抑制された。

酸化チタンナノマテリアルによる IL-1 β 産生促進に対する食害阻害剤の影響は粒子により異なる

IL-1 β 産生促進作用に対する食害阻害剤 cytochalacin D (Cyt D) の影響はナノマテリアルによって異なっていた。細胞を 0.2 μ M の Cyt D で処理すると、多層カーボンナノチューブ MWCNT-SD1 による IL-1 β 産生は、ほぼ完全に抑制されたのに対し、酸化チタンナノマテリアル (A~C) による IL-1 β 産生は逆に 30~50%促進された。Alum による促進は約 50%抑制された。Cyt D 濃度を 1 μ M に上昇させた場合には、酸化チタン A および B は 60~50%抑制されたが、酸化チタン C の抑制はわずかであり、食害阻害剤の効果は粒子により異なった。Alum による IL-1 β 産生誘導は、高濃度ではほぼ完全に抑制された。

D. 考察

本研究班では、酸化チタン等のナノマテリアルが抗原タンパク質の経皮感作に及ぼす影響について、*in vivo* 評価系及び *in vitro* 評価系を開発し検討することを目的として、[I] 動物モデルを用いる *in vivo* 評価手法に関する検討、[II] 抗原提示細胞への抗原タンパク質の取込み及び細胞応答を指標とする *in vitro* 評価手法に関する検討、及び、[III] 食害細胞を用いた *in vitro* アジュバント活性評価法の検討を行った。

[I]に関しては、まず、マウスを用いる動物実験における最も基本的な感作方法である、抗原の腹腔内投与による感作を行い、3種の酸化チタンナノマテリアルが、Alum と同様に、Th2 細胞優位な免疫応答を誘導するアジュバント作用を有することを示した。次に、モデル抗原である OVA

をマウス皮膚に繰り返し貼付することによる経皮感作実験系を確立し、酸化チタンの共存効果について検討した。酸化チタン A を適用し、その効果を検討した。その結果、OVA (20 μ g) と酸化チタン A (1.25 mg) を共存させることにより、抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体の産生が増強されること、すなわち経皮感作が増強されることが示された。近年のアレルギーに関する研究、また、最近のわが国における加水分解コムギタンパク質を含有する洗顔石鹸の事例等から示されるように、タンパク質が皮膚を透過して体内に取り込まれ抗原となる経皮感作経路が、現在、アレルギー発症の重要な要因として注目されている。本研究の結果は、この抗原タンパク質の経皮感作によるアレルギー発症において、酸化チタンナノマテリアルが共存することにより感作が増強される可能性を示したものである。来年度以降は、用量依存性やナノマテリアルの種類による違い等の詳細について検討を進める予定である。

[II]に関しては、ヒト急性単球性白血病細胞株である THP-1 細胞を PMA 及び IL-4 により抗原提示細胞様に分化させ、モデル抗原として OVA を添加した際の細胞の活性化を、細胞表面の HLA-DR 及び CD86 の発現量を指標として評価する系について検討した。OVA (1 mg/mL) を添加し、酸化チタンの添加濃度を 0.1, 1, 10 μ g/mL と増加させたところ、HLA-DR 及び CD86 の発現量は濃度依存的に低下したことから、酸化チタンが抗原提示細胞の活性化を阻害することが示された。この結果については、THP-1-DC 細胞の抗原の取込みそのものが阻害されているのか、もしくは抗原の取込みは行われているがシグナル伝達の阻害によって抗原提示細胞の活性化が抑制されているのか等について、詳細に検討を重ねる必要があると考えられる。

[III]に関しては、ナノマテリアルのアジュバント活性の *in vitro* 評価手法として、抗原免疫時のアジュバント作用において重要であることが明らかとなっている NLRP3 インフラマソーム活性化、及びそれに続く炎症性サイトカイン IL-1 β 産

生という経路に着目し、マクロファージ系培養細胞を用いて評価する方法を検討した。NLRP3 はインフラマソームと呼ばれるタンパク複合体を形成し、内外の危険分子シグナルを受容して caspase-1 を活性化し、caspase-1 は IL-1 β を前駆体から切断して活性化する役割を持つことが知られている。そこで PMA 分化 THP-1 細胞において NLRP3 の siRNA ノックダウンならびに caspase-1 阻害剤を利用し、アジュバントとして汎用される Alum が貪食され、NLRP3 および caspase-1 依存的に IL-1 β を産生する応答を測定できる系を確立した。この系を用い、3 種類の酸化チタンナノマテリアル A~C はいずれも、濃度に応じ NLRP3 依存的に IL-1 β 産生を促進することを明らかにした。しかし、貪食阻害剤の影響は粒子によって異なり、サイズが小さい酸化チタン C は貪食されずに細胞膜を透過し NLRP3 インフラマソームを活性化することが示唆された。小さな粒子は経皮暴露において表皮細胞のインフラマソームを直接活性化する可能性が考えられることから、今後検討を進める予定である。

E. 結論

酸化チタンナノマテリアルの経皮曝露が抗原タンパク質の経皮感作に及ぼす影響に関する in vivo 評価系及び in vitro 評価系を開発し検討することを目的として、[I] 動物モデルを用いる in vivo 評価手法に関する検討、[II] 抗原提示細胞への抗原タンパク質の取込み及び細胞応答を指標とする in vitro 評価手法に関する検討、及び、[III] 貪食細胞を用いた in vitro アジュバント活性評価法の検討を行った。

抗原の腹腔内投与による感作実験系では、用いた 3 種の酸化チタンとも、Alum と同様に、モデル抗原である OVA による感作を増強する、すなわち、アジュバント作用を有することが示された。また、OVA をマウス皮膚に繰り返し貼付することにより経皮感作を成立させるモデル実験系を確立し、酸化チタンの共存効果を検討したところ、経皮感作による抗原特異的抗体産生が増大した

ことから、酸化チタンナノマテリアルが抗原経皮感作を増強する可能性が示された。

単球系細胞株を用いた抗原タンパク質の取込み及び細胞応答に関する in vitro 評価手法の開発については、OVA 及び酸化チタンを THP-1-DC 細胞の培養液中に同時に共存させ、抗原提示におけるナノマテリアルの影響を解析した結果、酸化チタンは添加濃度依存的に抗原提示細胞の活性化を減弱させる傾向が認められた。

アジュバント活性の in vitro 評価手法として、マクロファージ系培養細胞を用いた NLRP3 インフラマソーム活性化のアッセイ系を確立し、酸化チタンのアジュバント活性について検討したところ、酸化チタン粒子が濃度依存的な活性を有することが判明し、粒子径が小さい場合は貪食によらない直接の活性化が示唆された。

今後、それぞれの検討項目において、用量依存性やナノマテリアルの種類による違い、またナノマテリアルの効果のメカニズム等の詳細について検討を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Cui H, Wu W, Okuhira K, Miyazawa K, Hattori T, Sai K, Naito M, Suzuki K, Nishimura T, Sakamoto Y, Ogata A, Maeno T, Inomata A, Nakae D, Hirose A, Nishimaki-Mogami T. High-temperature calcined fullerene nanowhiskers as well as long needle-like multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce NLRP3-mediated IL-1 β secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 452 : 593-599. (2014)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告

ナノマテリアル経皮曝露が抗原性物質への免疫応答に及ぼす影響に
関するin vivo評価手法の開発研究

安達 玲子

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
「抗原性物質への免疫応答に対するナノマテリアル経皮曝露の影響に関する
評価手法の開発研究」
分担研究報告書（平成 26 年度）

ナノマテリアル経皮曝露が抗原性物質への免疫応答に及ぼす影響に関する
in vivo 評価手法の開発研究

研究分担者：安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長
研究協力者：酒井 信夫 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官

研究要旨

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては物理化学的特性による健康影響の可能性が指摘されており、OECD ではわが国も参加してフラーレン、カーボンナノチューブ、酸化チタン、酸化亜鉛等 13 品目の安全性評価が重点的に進められている。酸化チタンや酸化亜鉛は多くの日焼け止め製品に配合されており、ヒト皮膚と接触する頻度が非常に高い。本研究では、酸化チタン、酸化亜鉛等の経皮曝露が抗原タンパク質の経皮感作に及ぼす影響について、*in vivo* 評価系を開発し検討を行う。26 年度は、(1) 抗原の腹腔内投与による感作に対する影響、及び、(2) 抗原の経皮感作に関するモデル実験系の確立と酸化チタンの影響について検討した。(1) に関しては、用いた 3 種の酸化チタンとも、Alum と同様に、モデル抗原である OVA による感作を増強する、すなわち、アジュバント作用を有することが示された。また (2) に関しては、OVA をマウス皮膚に繰り返し貼付することにより経皮感作を成立させるモデル実験系を確立し、この実験系に酸化チタンを適用して、抗原経皮感作における共存効果を検討した。その結果、OVA の経皮感作時に酸化チタンを共存させることにより、抗原特異的抗体の産生が増大したことから、酸化チタンナノマテリアルが抗原タンパク質による経皮感作を増強する可能性が示された。今後、実験条件を最適化し、用量依存性やナノマテリアルの種類による違い等の詳細について検討を進める。

A. 研究目的

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては物理化学的特性による健康影響の可能性が指摘されている。OECD では、わが国も参加して、フラーレン、カーボンナノチューブ、酸化チタン、酸化亜鉛等、13 品目の安全性評価が重点的に進められている。酸化チタンや酸化亜鉛は多くの日焼け止め製品に配合されており、ヒト皮膚と接触する頻度が非常に高い。その経皮曝露の影響に関しては、これまでに皮膚透過性試験や皮膚感作性試験等が行われているが、いずれも明らか

な作用は認められていない。

一方で、最近、加水分解コムギタンパク質を含有する洗顔石鹸の事例のように、タンパク質が皮膚を透過して取り込まれ抗原となる経皮感作経路がアレルギー発症の重要な要因として注目されている。しかし、酸化チタン等ナノマテリアルがタンパク質経皮感作に及ぼす影響については未だ検討されていない。

本研究班では、酸化チタン、酸化亜鉛等のナノマテリアルが抗原タンパク質の経皮感作に及ぼす影響について、*in vivo* 評価系及び *in vitro* 評価

系を開発し検討することを目的としている。本分担研究では、酸化チタン等のナノマテリアルの経皮曝露が抗原タンパク質の経皮感作に及ぼす影響について、動物モデルを用いる in vivo 評価系に関する検討を行う。

B. 研究方法

試料及び試薬

被検物質としては、下記の3種類の酸化チタンナノマテリアル（表面未処理）を用いた。

酸化チタン A（粒子径：15 nm）

酸化チタン B（粒子径：35 nm）

酸化チタン C（粒子径：6 nm）

抗原タンパク質としては、卵白アルブミン（OVA; Sigma A5503）を用いた。その他の試薬は特級グレードのものを用いた。

酸化チタンナノマテリアルの懸濁液調製

3種の酸化チタンは、それぞれ 50 mg/mL の濃度で PBS に懸濁し、2.5 分間の超音波処理の後にボルテックスミキサーにより攪拌するというサイクルを 4 回繰り返す、最後に 25G 注射針付きのシリンジを用いて攪拌し均一化した。

【実験 1】抗原の腹腔内投与による感作に及ぼす酸化チタンの影響に関する検討

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー（株）より購入し、MF 飼料（オリエンタル酵母工業（株））を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。各群の共存物質等の実験条件を Table 1 に示す。7 週齢時に、上記 3 種の酸化チタンそれぞれについて、OVA 20 μ g 及び酸化チタン（2 mg あるいは 10 mg）を生理食塩水 300 μ L に懸濁し、腹腔内投与した（Day 0、1 次免疫）。陽性対照アジュバントとしては Alum（水酸化アルミニウムゲル（コスモ・バイオ（株））、2 mg）を用いた。14 日後（Day 14）に再度投与し（2 次免疫）、翌日（Day 15）に血液を採取して、血清中の OVA 特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。

【実験 2】抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタンの影響に関する検討

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー（株）より購入し、MF 飼料（オリエンタル酵母工業（株））を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。また、各群の共存物質等の実験条件を Table 1 に示す。8 週齢時に背面片側を剃毛し（Day 0）、翌日より 3 日間、OVA 溶液、あるいは OVA 及び酸化チタンの混合懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った（Day 1-3）。抗原液の貼付には、パッチテスター「トリイ」（鳥居薬品株式会社）を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50 μ L の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上からサージカルテープを巻いてパッチを保護し、さらにマウスの首にエリザベスカラーを装着してパッチの剥脱を防いだ。3 日間貼付後にパッチを外し（Day 4）、その後 4 日間休ませるという操作を 1 クールとし、4 クールの感作後、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。アナフィラキシー反応の惹起は、Day 25 に感作抗原 1 mg/100 μ L を腹腔内投与（i. p.）して行った。i. p. 後 30 分間、マウスの直腸内体温を測定した。また、アナフィラキシー症状を観察し、Table 2 の基準に従ってスコアリングを行った。惹起 30 分後に麻酔下で採血し、血清中ヒスタミンの濃度を Histamine EIA Kit（SPI-BIO）にて測定した。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、V 群を基準とした Dunnett の検定、あるいは、2 群間での Student の t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。なお、図中には、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ （Dunnett の検定）、あるいは、[#] $p < 0.05$ 、^{##} $p < 0.01$ （Student の t 検定）で有意差の程度を示した。

（倫理面への配慮）

マウスへの検体の投与、採血等においては、動

物の苦痛を最小限に留めるように努め、動物飼育・管理に当たっては研究所の利用規定に従った。本研究は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理審査委員会の承認を得て行った。

C.研究結果

【実験 1】 抗原の腹腔内投与による感作に及ぼす酸化チタンの影響に関する検討

酸化チタンナノマテリアルが免疫応答に及ぼす影響を検討するため、まず、マウスを用いる動物実験における最も基本的な感作方法として、OVA の腹腔内投与による感作を実施し、その際に酸化チタンを共存させることにより、そのアジュバント効果について検討した。(アジュバントとは、抗原と一緒に投与され、その抗原性を増強するために用いられる物質である。) 2 次免疫翌日 (Day 15) の血清中の抗原特異的 IgE, IgG1 及び IgG2a 抗体産生を Fig. 2 に示す。IgE 及び IgG1 は Th2 細胞優位な免疫応答 (アレルギーを含む) の際に産生される抗体であり、一方、IgG2a は Th1 細胞優位な免疫応答の際に産生される抗体である。OVA 腹腔感作時に陽性対照アジュバントとして Alum を使用した群(OVA-ALUM 群)では、抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体産生については、OVA のみを投与したアジュバント不使用群(OVA 群) に対して有意な増大が見られたことから、Alum の Th2 細胞優位な免疫応答を誘導するアジュバントとしての効果が確認された。OVA 腹腔感作時に酸化チタンを共存させた場合、IgE については、酸化チタン A の高用量群 (OVA-TiO₂A_H 群) 及び低用量群 (OVA-TiO₂A_L 群)、酸化チタン B の高用量群 (OVA-TiO₂B_H 群)、酸化チタン C の高用量群 (OVA-TiO₂C_H 群) において、OVA 群に対して有意な抗体産生の増大が見られた。IgG1 については、全ての酸化チタン投与群で、OVA 群に対して有意な抗体産生の増大が見られた。一方 IgG2a については、OVA-ALUM 群及び酸化チタン投与群全てにおいて有意な抗体産生は見られなかった。これらの結果から、今回実験に用いた 3 種の酸化チタンナノマテリアルは全て、

陽性対照アジュバントとして用いた Alum と同様に、抗原の腹腔内投与において Th2 細胞優位な免疫応答を誘導し、OVA 特異的な IgE 及び IgG1 抗体の産生を用量依存的に増強することが示された。

【実験 2】 抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタンの影響に関する検討

近年、加水分解コムギタンパク質を含有する洗顔石鹸の使用によるコムギアレルギー発症事例のように、タンパク質が皮膚を透過して抗原となる経皮感作経路がアレルギー発症の重要な要因として注目されている。そこで抗原の経皮的な感作時に酸化チタンを共存させた場合の影響について検討した。

OVA をモデル抗原として、マウスの皮膚に抗原溶液を 3 日間貼付し 4 日間休止するというサイクルを 4 回繰り返すという実験系を構築し、経皮感作性のアッセイ系としての有用性を検討した。OVA の用量は 1 回の貼付につき 100 μ g/匹、50 μ g/匹、20 μ g/匹とした (Table1、それぞれ OVA100 群、OVA50 群、OVA20 群)。

Fig. 3 に血清中の抗原特異的 IgE, IgG1, IgG2a の測定結果を示す。IgE については、OVA100 群、及び OVA50 群において、V 群に対して有意な抗体産生が見られた。IgG1 については、OVA100 群、OVA50 群、OVA20 群ともに、V 群に対して有意な抗体産生が見られた。また、IgE, IgG1 とも、その産生量について抗原用量に対する依存性が見られた。一方 IgG2a については、3 群ともに抗体産生は見られなかった。

続いて、抗原の経皮感作により産生された抗体の量がアレルギー反応を誘発するレベルかどうか検討するため、抗原の腹腔内投与によるアナフィラキシー (能動的全身性アナフィラキシー) 反応の惹起を行った。惹起後 30 分間、直腸内体温の測定、及びアナフィラキシー症状のスコアリングを行った。また、惹起 30 分後の血清中のヒスタミン濃度を測定した。結果を Fig. 4 に示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示してい

る。30 分後、OVA100 群、OVA50 群、OVA20 群の全ての群で体温が大きく低下し(それぞれ $-4.1 \pm 1.1^{\circ}\text{C}$ 、 $-3.8 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ 、 $-3.3 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$)、V 群と比較して有意差が認められた。B には惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。OVA100 群、OVA50 群、OVA20 群の全ての群で、血清中ヒスタミン濃度が V 群と比較して有意に上昇していた。C には惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果を示す。OVA100 群、OVA50 群、OVA20 群の各群で、それぞれ平均 3.4、3.0、3.4 と高いスコアであった。これらの結果から、OVA をモデル抗原として用い、4 週間経皮感作を行うことにより抗原特異的 IgE 及び IgG1 の産生が誘導されること、及び、その後の抗原腹腔内投与によりアナフィラキシー症状を惹起することが可能であることが示された。このことから、抗原経皮感作に及ぼすナノマテリアルの影響を評価するための *in vivo* 実験系を確立できたと言える。

次に、この実験系に酸化チタンナノマテリアルを適用した結果を示す。検体としては、【実験 1】において抗体産生の増強効果が最も強く見られた酸化チタン A を用いた。OVA と酸化チタンを混合した懸濁液を予め調製し、パッチにアプライしてマウス皮膚に貼付した。用量は Table 1 に示すとおり、酸化チタンは 1.25 mg/匹、OVA は 100 μg /匹、50 μg /匹、20 μg /匹、とした(それぞれ OVA100-TiO₂A 群、OVA50-TiO₂A 群、OVA20-TiO₂A 群)。また、4 週間の経皮感作後には、OVA のみ(酸化チタンは含まない)を腹腔内投与し、誘発されるアナフィラキシーについて評価した。

Fig. 3 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、IgG2a の測定結果を示す。IgE、IgG1 については、OVA100-TiO₂A 群、OVA50-TiO₂A 群、OVA20-TiO₂A 群の 3 群とも、V 群に対して有意な抗体産生が見られた。IgG2a については、OVA100-TiO₂A 群でのみ V 群との間に有意差が見られたものの、産生レベルは非常に低かった。IgE、IgG1 について、酸化チタンの有無に関する

比較を行ったところ、OVA-TiO₂A 群では、OVA20 群に対して有意な抗体産生の増大が見られたことから、OVA の用量が 20 μg の場合、酸化チタンの共存により抗体産生が増強されたことが示された。OVA の用量が 100 μg 、50 μg の場合は、酸化チタンの有無による差は見られなかった。

Fig. 4 には、惹起後 30 分間の直腸内体温の変化、アナフィラキシー症状のスコア、及び惹起 30 分後の血清中のヒスタミン濃度を示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、OVA100-TiO₂A 群、OVA50-TiO₂A 群、OVA20-TiO₂A 群の全ての群で体温が大きく低下し(それぞれ $-2.8 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 、 $-3.1 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、 $-3.6 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$)、V 群と比較して有意差が認められた。しかし酸化チタンの有無による差は見られなかった。B には惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。OVA100-TiO₂A 群、OVA50-TiO₂A 群、OVA20-TiO₂A 群の全ての群で、血清中ヒスタミン濃度が V 群と比較して有意に上昇していた。酸化チタンの有無について比較を行ったところ、OVA100-TiO₂A 群では OVA100 群と比較してヒスタミン濃度の有意な低下が見られたが、OVA の用量が 50 μg 、20 μg の場合は、酸化チタンの有無による差は見られなかった。C には惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果を示す。OVA100-TiO₂A 群、OVA50-TiO₂A 群、OVA20-TiO₂A 群の各群で、それぞれ平均 2.8、3.4、3.8 と高いスコアであった。しかし酸化チタンの有無による差は見られなかった。

D. 考察

本研究班では、酸化チタン等のナノマテリアルが抗原タンパク質の経皮感作に及ぼす影響について、*in vivo* 評価系及び *in vitro* 評価系を開発し検討することを目的としている。本分担研究では、動物モデルを用いる *in vivo* 評価系に関する検討を行った。モデル抗原としては、卵白に含有されるアレルゲンタンパク質であり、様々な研究においてモデル抗原として利用されている卵白アルブミン(OVA)を用いることとした。

【実験 1】では、抗原の経皮感作に対する影響に関する評価の前段階として、マウスを用いる動物実験における最も基本的な感作方法である、抗原の腹腔内投与による感作を実施し、その際の酸化チタンの影響を検討した。陽性対照としては、アジュバントとして広く利用されている水酸化アルミニウムゲル (Alum) を用いた。OVA を酸化チタンあるいは Alum と懸濁させ、2 回腹腔内投与した後に、血清中の抗原特異的抗体について検討したところ、酸化チタン A、B、C ともに、Alum と同様に、抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体の産生を増強することが示され、これらの酸化チタンナノ材料が Th2 細胞優位な免疫応答を誘導するアジュバント作用を有することが明らかとなった。

【実験 2】では、まず、モデル抗原として OVA を用い、マウス皮膚への貼付を繰り返すことにより経皮感作が成立する実験系を確立した。OVA を 100 μ g/匹、50 μ g/匹、20 μ g/匹で 4 回繰り返し貼付することにより、抗原特異的 IgE 及び IgG1 の産生が見られたこと、IgG2a 抗体はほとんど産生されないことから、Th2 細胞優位な免疫応答が起きていることが示された。また、感作後の抗原腹腔内投与によりアナフィラキシーが惹起されたことから、抗原の経皮感作によりアレルギー症状の誘発に十分な免疫応答が起きていることが示された。

この経皮感作実験系に、【実験 1】において抗体産生促進効果が最も高かった酸化チタン A を適用し、その効果を検討した。OVA 20 μ g と酸化チタン A を混合した懸濁液をマウス皮膚に貼付して感作を行ったところ、抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体の産生が増強されることが示された。しかし、4 週間経皮感作後の抗原の腹腔内投与によるアナフィラキシー惹起においては、直腸温低下、血清中ヒスタミン濃度、アナフィラキシー症状のスコアともに、酸化チタンの有無による違いはほとんど見られなかった。また、OVA 50 μ g、OVA 100 μ g の場合は、酸化チタン A による抗体産生増強作用は見られなかった。

アナフィラキシーに関しては、今回の実験条件で最も低用量であった OVA 20 群においても、OVA100 群や OVA50 群と同程度の直腸温低下、ヒスタミン濃度増大、アナフィラキシー症状スコアが得られていることから、OVA20 群で産生された IgE、IgG1 は、本実験系における最も強いレベルのアナフィラキシーを誘発するのに十分な量であり、そのために酸化チタンによる抗体産生増強の影響を正確に検討することができなかったものと考えられる。また、OVA 50 μ g、OVA 100 μ g の場合、これらの用量で産生される抗原特異的抗体は本実験系における最も高いレベルであったため、酸化チタンによる増強作用を確認することができなかったものと考えられる。

近年のアレルギーに関する研究、また、最近のわが国における加水分解コムギタンパク質を含有する洗顔石鹸の事例等から示されるように、タンパク質が皮膚を透過して体内に取り込まれ抗原となる経皮感作経路が、現在、アレルギー発症の重要な要因として注目されている。本研究の結果は、この抗原タンパク質の経皮感作によるアレルギー発症において、酸化チタンナノ材料が共存することにより感作が増強される可能性を示したものである。来年度以降は、今年度得られた結果を受け、抗原の用量等、実験系の条件の詳細を検討して、ナノ材料の影響を検討するためのよりよいマウスモデル実験系を確立し、酸化チタン B 及び C の抗原経皮感作時における影響や、用量依存性やナノ材料の種類による違い等の詳細について検討を進める予定である。

E. 結論

酸化チタンナノ材料の経皮曝露が抗原タンパク質の経皮感作に及ぼす影響について、動物モデルを用いる *in vivo* 評価系に関する検討を行った。抗原の腹腔内投与による感作実験系では、用いた 3 種の酸化チタンとも、Alum と同様に、モデル抗原である OVA による感作を増強する、すなわち、アジュバント作用を有することが示さ

れた。また、OVA をマウス皮膚に繰り返し貼付することにより経皮感作を成立させるモデル実験系を確立した。この実験系に酸化チタンを適用し、抗原経皮感作における共存効果を検討したところ、経皮感作による抗原特異的抗体産生が増大したことから、酸化チタンナノマテリアルが抗原経皮感作を増強する可能性が示された。今後、実験条件を最適化し、用量依存性やナノマテリアルの種類による違い等の詳細について検討を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1 各実験群の感作検体及び共存物質

実験1 抗原の腹腔内投与による感作に及ぼす酸化チタンの影響(1群5匹 x 9群)

群名	感作検体	共存物質
V	PBS	—
OVA	OVA (20 µg)	—
OVA-ALUM	OVA (20 µg)	Alum (2 mg)
OVA-TiO2A_L	OVA (20 µg)	酸化チタンA (2 mg)
OVA-TiO2A_H	OVA (20 µg)	酸化チタンA (10 mg)
OVA-TiO2B_L	OVA (20 µg)	酸化チタンB (2 mg)
OVA-TiO2B_H	OVA (20 µg)	酸化チタンB (10 mg)
OVA-TiO2C_L	OVA (20 µg)	酸化チタンC (2 mg)
OVA-TiO2C_H	OVA (20 µg)	酸化チタンC (10 mg)

実験2 抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタンの影響(1群5匹 x 7群)

群名	感作検体	共存物質
V	PBS	—
OVA100	OVA (100 µg)	—
OVA50	OVA (50 µg)	—
OVA20	OVA (20 µg)	—
OVA100-TiO2A	OVA (100 µg)	酸化チタンA (1.25 mg)
OVA50-TiO2A	OVA (50 µg)	酸化チタンA (1.25 mg)
OVA20-TiO2A	OVA (20 µg)	酸化チタンA (1.25 mg)

Table 2 アナフィラキシー症状のスコアリング

Score 0	症状なし
1	口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ足で耳の穴を掻く
2	活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛
3	1分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣
4	ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣
5	死亡

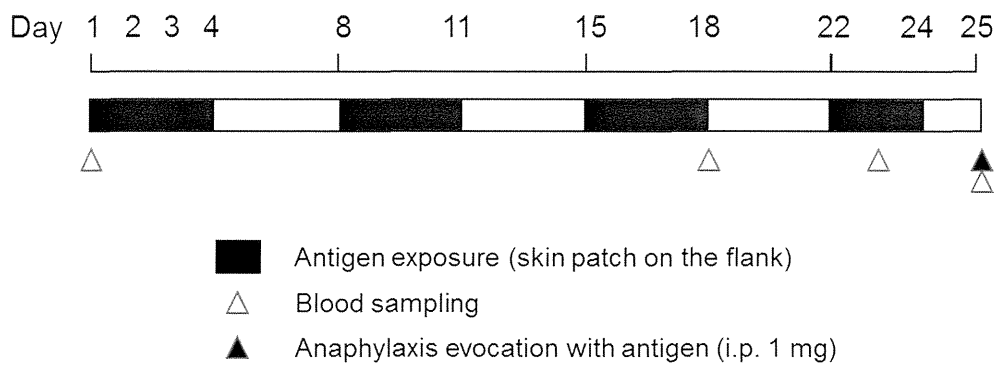
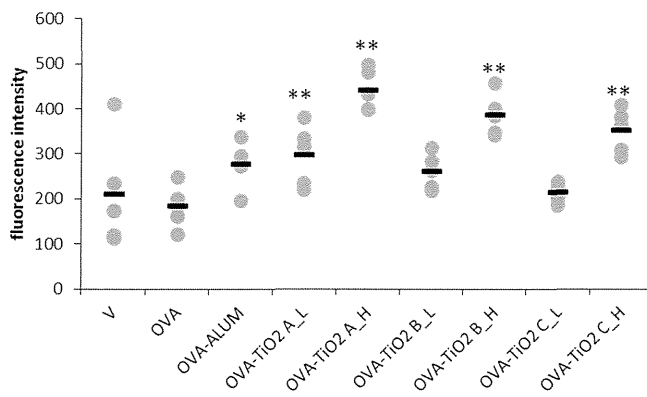
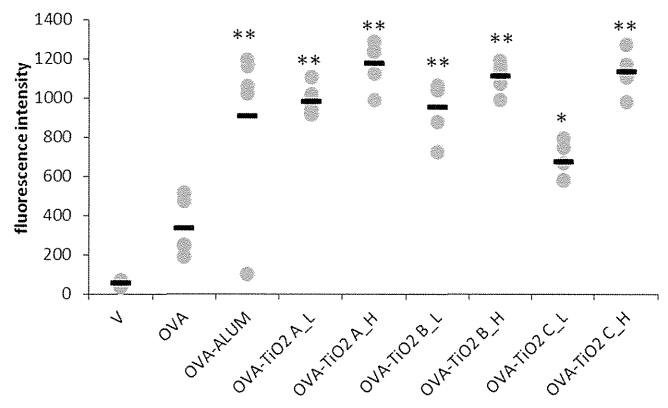


Figure 1 経皮感作試験スケジュール

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1



C. 抗原特異的IgG2a

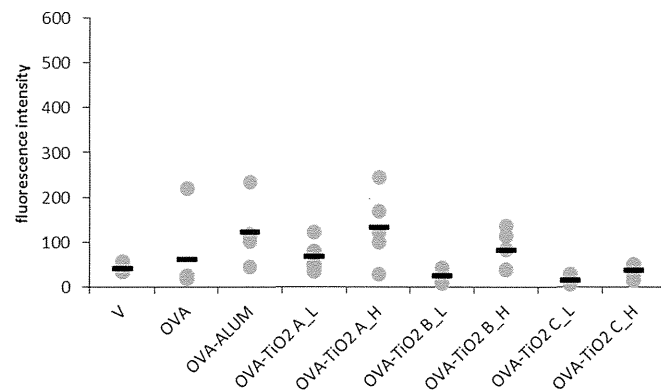


Figure 2 抗原の腹腔内投与による感作における抗原特異的抗体産生

各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. OVA group.