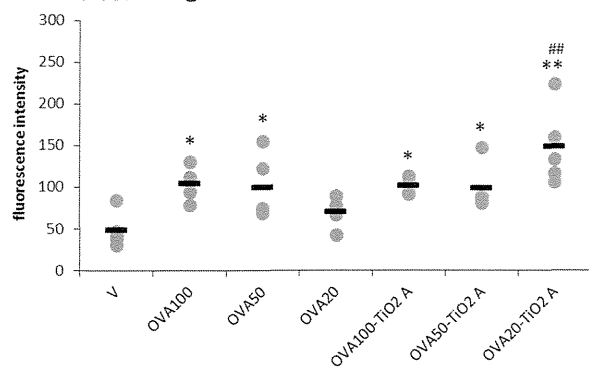
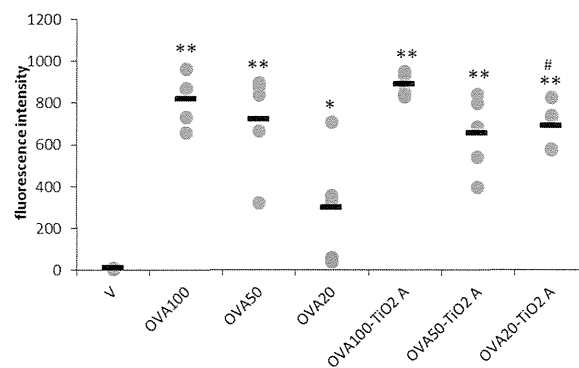


A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1



C. 抗原特異的IgG2a

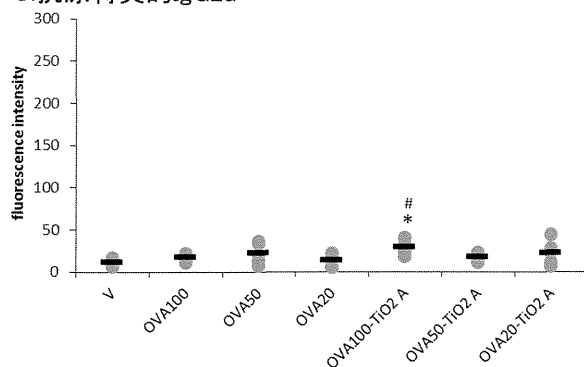
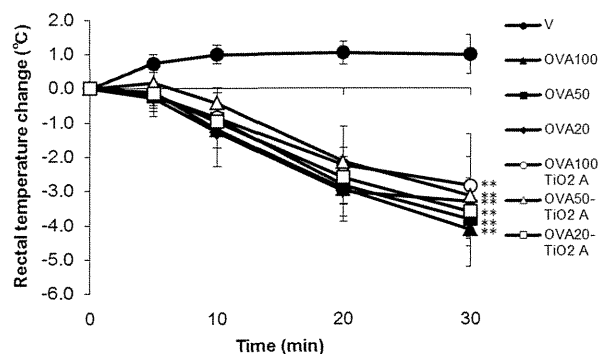


Figure 3 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生

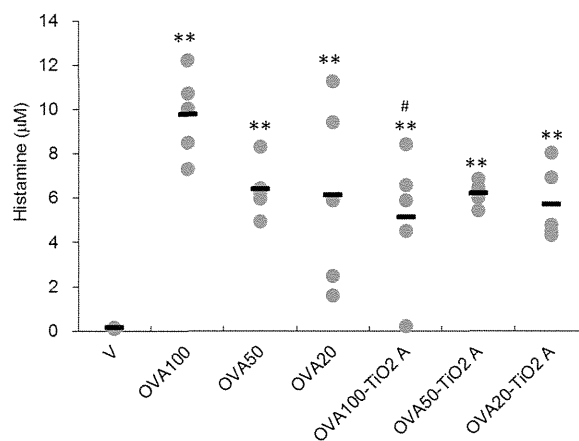
各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. V group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ by Student's t test vs. groups without TiO2A.

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

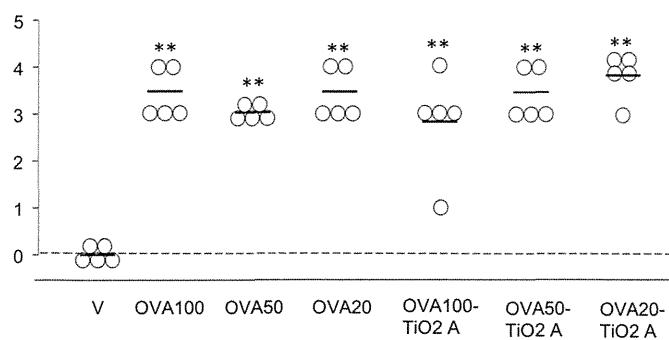


Figure 4 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起

A: 各群のデータをMean±S.D.で示す。B, C: 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。

** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. V group. # $p < 0.05$ by Student's t test vs. OVA100 group.

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 vitro評価手法の開発研究

酒井 信夫

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 vitro 評価手法の開発研究

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
研究協力者 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、化粧品、医薬品等に幅広く利用されているナノマテリアルについては、それら特有の物性から従来の原材料にはない優れた性質を有する新素材が得られる可能性が高いことから、国際的に積極的な研究開発が進められている。他方、ナノマテリアルの生体影響についても指摘されているが、ヒトの健康への影響を予測するための必要十分なデータが得られているとは言い難い。本研究では、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、*in vitro* における安全性評価手法の確立を目的とし、単球系細胞株を用いた抗原 (アレルゲン)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検討を試みた。

誘導剤によりヒト急性単球性白血病細胞株 THP-1 細胞を樹状細胞様(THP-1-DC)細胞に分化させた後、卵白アルブミン及び酸化チタンを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についてフローサイトメトリーを用いて解析した。抗原提示細胞が活性化することによる表面マーカーの発現量の変動を指標に解析した結果、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。他方、抗原未添加の THP-1-DC 培養系に酸化チタンを添加した群の一部において、細胞表面マーカーの発現上昇が認められたことから、ナノマテリアル単体の THP-1-DC 細胞へのベーサルな影響に関しても考慮しなければならないことが示唆された。

A. 研究目的

近年、化粧品、医薬品等に幅広く利用されているナノマテリアルについては、それら特有の物性から従来の原材料にはない優れた性質を有する新素材が得られる可能性が高いことから、国際的に積極的な研究開発が進められている。他方、ナノマテリアルの生体影響についても指摘されているが、ヒトの健康への影響を予測するための必要十分なデータが得られているとは言い難い。

本研究では、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、*in vitro* に

における安全性評価手法の確立を目的とし、単球系細胞株を用いた抗原(アレルゲン)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検討を試みた。

B. 研究方法

試料及び試薬

本研究に供するナノマテリアルとして微粒子酸化チタン (TiO₂)を選定し、平均一次粒子径の異なる 3 種類を入手した(Table 1)。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。抗原には卵白アルブミン (OVA; Sigma A5503)を用いた。その他の試薬はすべて細胞培養グレード・試薬特級グレードを用いた。

細胞培養及び分化誘導 (Figure 1)

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。THP-1 細胞は、10% FBS, 50 U/mL ペニシリン及び 50 µg/mL ストレプトマイシン(GIBCO 社)を含む RPMI 1640 培地(Complete 培地)を用いて、37°C, 5% CO₂ の条件下で培養し、モルフォロジー及び増殖能を確認した。THP-1 細胞は、6-well 培養プレートに 5 x 10⁵ 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 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。6-well 培養プレートに接着した THP-1-DC 細胞は、Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Life Technologies 社) で 2 回洗浄した後、OVA (0 及び 1 mg/mL) 及び TiO₂ (0, 0.1, 1 及び 10 µg/mL)を含む Complete 培地を加えることで抗原提示を行った (Figure 1)。TiO₂ は、Complete 培地中 10 分間超音波処理した後、25G 注射針を用いて均一なサスペンションを無菌的に調製して分散させた。

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、後述する 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。6-well 培養プレートに接着した THP-1-DC 細胞の回収には、セルスクレイパー、温度応答性細胞培養器材 UpCell® (セルシード社) 及び 0.25% トリプシン-EDTA (Life Technologies 社)の 3 種類を検討した。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。

FITC 標識 CD11c (clone 3.9)、PE 標識 CD209 (clone 9E9A8 及び DCN46)、PE 標識 HLA-DR (clone L243 及び G46-6)、PE 標識 CD86 (clone IT2.2)、FITC 標識マウス IgG1 κ isotype (clone MOPC-21)、PE 標識マウス IgG2a κ isotype (clone MOPC-173 及び G155-178)、PE 標識マウス IgG2b κ isotype (clone MOPC-173 及び 27-35)

統計解析

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。なお、Figure には **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 で有意差の程度を示した。

C. 研究結果

THP-1 細胞の分化誘導

THP-1 細胞の分化誘導を行った際の、経時的なモルフォロジーの変化を Figure 2 に示す。終濃度 20 ng/mL PMA 及び 20 ng/mL IL-4 存在下、THP-1 細胞は樹状突起を有した細胞に形態変化しながら培養器材に対する強い接着性を呈した。他方、PMA 及び IL-4 非存在下においては、THP-1 細胞は浮遊性を保ちながら倍加時間 48 時間で増殖した。

続いて、樹状細胞様細胞の分化マーカーとして CD11c 及び CD209 (DC-SIGN)の発現量をフローサイトメトリーで解析した。まず、接着細胞を培養器材から回収する手法として、①セルスクレイパー、②温度応答性細胞培養器材 UpCell®, ③トリプシン/EDTA の 3 種類を検討した(Figure 3)。その結果、CD11c の発現量は UpCell®による回収が最も高く、CD209 の発現量はセルスクレイパーに

よる回収が最も高かった。トリプシン/EDTA では CD11c のクリベージが示唆された。CD11c 及び CD209 の解析結果と、多検体処理における操作性とを勘考し、THP-1-DC 細胞の回収にはセルスクレイパーが最適と判断した。

THP-1-DC 細胞の抗原提示におけるナノマテリアルの影響

抗原添加濃度の検討

THP-1-DC 細胞に OVA を 0, 0.01, 0.1, 1, 10 及び 100 mg/mL の濃度で添加し、72 時間後の抗原提示細胞活性化マーカー[HLA-DR (MHC クラス II 分子)及び CD86]の発現量をフローサイトメトリーで解析した (Figure 4)。HLA-DR の発現量は、OVA 添加濃度が高くなるに伴って上昇し、1 mg/mL において最も高く、それ以上の濃度において発現量は低下した。他方、CD86 の発現量は OVA 添加濃度の最も低い 0.01 mg/mL が最高値を示し、添加濃度が高くなるに伴って減少する傾向が認められた。抗原提示細胞活性化マーカーの発現量を統計学的に解析し、HLA-DR、CD86 とともに有意 ($p < 0.001$)となる OVA 1 mg/mL を至適抗原添加濃度とした。

抗原添加時間の検討

OVA 添加濃度を 1 mg/mL とした際の抗原添加時間を最適化するため、24, 48, 及び 72 時間後の抗原提示細胞活性化マーカー[HLA-DR (MHC クラス II 分子)及び CD86]の発現量をフローサイトメトリーで解析した (Figure 5)。HLA-DR、CD86 の発現量はともに経時的に増加する傾向を示し、培養時間 72 時間において最も高く、HLA-DR の発現量は 48 時間では 24 時間の 3.1 倍、72 時間では 24 時間の 4.3 倍にまで上昇した。

ナノマテリアル共存濃度の検討

上記初期検討から、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、TiO₂(試料 A)を終濃度 0, 0.1, 1, 10, 100, 1,000 µg/mL で

Complete 培地中に添加した。その結果、Figure 6 (A)に示すように、100 及び 1,000 µg/mL 添加群では THP-1-DC 細胞培養プレートの表面を TiO₂ が覆い細胞の生存率が著しく低下したために検討外とし、0~10 µg/mL の範囲において検討した。更に、TiO₂ 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 µg/mL TiO₂ を添加する対照群を設けた[Figure 6 (B)]。Figure 7 には、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の解析結果を示す。OVA (1 mg/mL) 添加により発現量が増加した HLA-DR 及び CD86 は、TiO₂ 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、TiO₂ 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。

THP-1 細胞株間の検討

これまでの検討は、すべて JCRB 細胞バンクから分譲された THP-1 細胞株を用いたが、細胞株ロット間に差異が認められるかどうかを確認する目的で、ATCC より分譲した THP-1 細胞株を用いた THP-1-DC 細胞の解析を試みた。Figure 8 には ATCC より分譲された THP-1 細胞から分化させた THP-1-DC 細胞の抗原提示細胞活性化マーカーの解析結果を示す。Figure 7 に示した JCRB 細胞バンクから分譲された THP-1 細胞株の解析結果と同様に、OVA (1 mg/mL)添加により発現量が増加した HLA-DR 及び CD86 は、TiO₂ 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する傾向が認められた。また、TiO₂ 単独添加群においても、JCRB 細胞バンクから分譲された THP-1 細胞株の結果と同様に、抗原提示細胞活性化マーカーの発現量の増加が認められた。

ナノマテリアル試料間の検討

Table 1 に示す A, B, 及び C の 3 種類の TiO₂ 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 (MHC クラス II 分子)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 (Figure 9, 10, 及び 11)。CD86

はOVA (1 mg/mL)添加によりその発現量が増加し、TiO₂ 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、TiO₂ 無添加群での発現量が総じて低かった。また、TiO₂ 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。

D. 考察

THP-1 細胞の分化誘導

THP-1 細胞の分化誘導条件は、既報(参考文献1)の条件に準じ、Complete 培地に終濃度 20 ng/mL PMA 及び 20 ng/mL IL-4 の存在下、96 時間の培養を試みた。THP-1-DC 細胞への分化は、顕微鏡下のモルフォロジーと培養器材への接着性について培養 24 時間毎に経時的に確認し、THP-1 細胞が効率よく THP-1-DC 細胞に分化していることが示唆された。次に、THP-1-DC 細胞の分化マーカーとして CD11c 及び CD209 (DC-SIGN)の発現量をフローサイトメトリーで解析した。接着性の THP-1-DC 細胞を培養器材から回収する手法として、①セルスクレイパー、②温度応答性細胞培養器材 UpCell[®]、③トリプシン/EDTA の 3 種類を比較検討した結果、トリプシン/EDTA では CD11c のクリベージが示唆されたことから、THP-1-DC 細胞の回収には不適と判断した(Figure 3)。セルスクレイパーと UpCell[®]との比較においては、CD11c の発現量は UpCell[®]による回収が最も高く、CD209 の発現量はセルスクレイパーによる回収が最も高かったことから何れの方法が最適であるか判断が難しかったが、多検体処理における操作性を勘考し、最終的に THP-1-DC 細胞の回収にはセルスクレイパーが最適と判断した。

THP-1-DC 細胞の抗原提示におけるナノマテリアルの影響

抗原添加濃度の検討

初めに、THP-1-DC 細胞に添加する OVA 濃度の検討を試みた。0, 0.01, 0.1, 1, 10 及び 100 mg/mL

の OVA を THP-1-DC 細胞に添加し、培養 72 時間後の HLA-DR (MHC クラス II 分子)及び CD86 (共刺激分子)の発現量をフローサイトメトリーで解析した。HLA-DR の発現量は、OVA 添加濃度が高くなるに伴って上昇し、1 mg/mL において最も高く、それ以上の濃度において発現量は低下した(Figure 4)。他方、CD86 の発現量は OVA 添加濃度の最も低い 0.01 mg/mL が最高値を示し、添加濃度が高くなるに伴って減少する傾向が認められた。抗原提示細胞がナイーブ T 細胞を活性化させるためには、抗原提示細胞上の MHC クラス II 分子及び共刺激分子(CD86/CD80)と、ナイーブ T 細胞上の T 細胞受容体と補助受容体(CD28)との細胞間相互作用が必要になる (Figure 12)。本研究における抗原添加濃度の検討では、Figure 4 に示すように HLA-DR と CD86 の 2 種の異なる抗原提示細胞活性化マーカーの発現パターンが、OVA 添加濃度によって異なるため、両者の発現量を統計的に解析し、HLA-DR と CD86 とが共に有意 ($p<0.001$)となる OVA 1 mg/mL を至適抗原添加濃度とした。

抗原添加時間の検討

上記抗原添加濃度の初期検討から、THP-1-DC 細胞の抗原提示能を評価する際の至適 OVA 添加濃度を 1 mg/mL とし、培養時間 24, 48, 及び 72 時間後の抗原提示細胞活性化マーカーの発現量の経時変化をフローサイトメトリーで解析した(Figure 5)。その結果、HLA-DR、CD86 の発現量は共に経時的に増加する傾向を示し、培養時間 72 時間において最も高く、HLA-DR の発現量は 48 時間では 24 時間の 3.1 倍、72 時間では 24 時間の 4.3 倍にまで上昇した。他方、72 時間より長い培養時間についても検討を試みたが、回収した THP-1-DC 細胞の死細胞の割合が増加したため、至適抗原添加時間を培養 72 時間とした。

ナノマテリアル共存濃度の検討

上記初期検討から、THP-1-DC 細胞の抗原提示能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, 100, 1,000 $\mu\text{g/mL}$ で Complete 培地中に添加した。Figure 6 (A) に示すように、100 及び 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 添加では THP-1-DC 細胞培養プレートの表面を TiO_2 が覆い細胞の生存率が著しく低下したために検討外とし、0~10 $\mu\text{g/mL}$ の範囲において検討した。OVA (1 mg/mL) を添加し、 TiO_2 を添加しなかった (0 $\mu\text{g/mL}$) 群では、抗原・酸化チタン共に無添加の対照群と比較して HLA-DR 及び CD86 の発現量が有意に増加した (HLA-DR、CD86 共に $p < 0.001$)。OVA (1 mg/mL) を添加し、 TiO_2 の添加濃度を 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ 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。ナノマテリアルが抗原提示細胞の活性化を阻害する結果については、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について詳細に検討を重ねる必要があると考えられた。他方、 TiO_2 単独添加による THP-1-DC 細胞へのバックグラウンドの影響を解析するため、抗原無添加の培地中に 10 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 を添加する対照群を設定した。その結果、培養 72 時間後の TiO_2 単独添加群において、抗原提示細胞活性化マーカーの発現量が抗原・酸化チタン共に無添加の対照群と比較して有意に増加した。これまでのナノマテリアルの安全性評価研究において、マクロファージがナノマテリアルを貪食し、炎症性サイトカイン等を産生することが報告されているが、「抗原とナノマテリアルの同時共存」における抗原提示細胞の免疫応答の詳細に関しては明らかにされていない。後述するが、 TiO_2 単独添加が抗原提示細胞活性化マーカーの発現量に影響を及ぼさなかった結果も得ていることから、次年度に追試を行い、詳細を検証する必要があると考えられた。

THP-1 細胞株間の検討

これまでの検討は、すべて JCRB 細胞バンクから分譲された THP-1 細胞株から増殖させた細胞

を用いたが、THP-1 細胞株のロット間に差異が認められるかどうかを確認する目的で、ATCC より分譲した THP-1 細胞を用いた THP-1-DC 細胞の解析を試みた。ATCC より分譲した THP-1 細胞の THP-1-DC 細胞への分化は、顕微鏡下のモルフォロジーと培養器材への接着性とを経時的に確認し、細胞のサイズ、接着性及び分化マーカー [CD11c 及び CD209 (DC-SIGN)] の発現量に、JCRB 細胞バンク由来の THP-1 細胞との明確な差異は認められなかった (データ示さず)。初期の条件検討で最適化した培養条件で、抗原及び酸化チタンを添加し、THP-1-DC 細胞の抗原提示細胞活性化マーカーを解析したところ、JCRB 細胞バンクから分譲された THP-1 細胞株の解析結果 (Figure 7) と同様に、OVA (1 mg/mL) 添加により発現量が増加した HLA-DR 及び CD86 は、 TiO_2 の濃度依存的に低下する傾向が認められた (Figure 8)。また、 TiO_2 単独添加群においても、JCRB 細胞バンクから分譲された THP-1 細胞株の結果と同様に、抗原提示細胞活性化マーカーの発現量の増加が認められた。これらの結果より、THP-1 細胞株のロット間に顕著な差異がなく、安定的に供給 (入手) 可能な THP-1 細胞株が、抗原提示細胞の免疫応答に関する *in vitro* 評価に利用できることが示唆された。

ナノマテリアル試料間の検討

酸化チタンはナノ微粒化することで、紫外線遮蔽効果を発揮するため特に化粧品分野では日焼け止め商品を中心に広く使用されている。また、光触媒機能 (太陽光のみでセルフクリーニング、空気清浄、水質浄化、抗菌・防かびの機能を持つ) により、各種塗料への需要拡大が期待されている。そこで、平均一次粒子径の異なる 3 種の酸化チタン試料を用いて、試料間の抗原提示細胞活性化マーカー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。Figure 9, 10, 及び 11 に結果を示すように、3 種いずれの酸化チタン試料の添加においても、OVA (1 mg/mL) 添加により共刺激分子 CD86 の発現量が増加し、 TiO_2 を共存させることによりその発現量が濃度依存的に低下する傾

向が認められた。これらの結果は、これまでの条件検討を良く再現している。他方、HLA-DR に関しては、OVA (1 mg/mL) 添加及び TiO₂ 無添加群における発現量が総じて低かった。また、TiO₂ 単独添加群においても、HLA-DR の発現量が増加せず、これまでの条件検討との再現性が認められなかったことから、次年度に追試を行い、詳細を検証する必要があると考えられた。

酸化チタン添加が HLA-DR (MHC クラス II 分子) と CD86 の発現を抑制するという結果は、ナノマテリアルが抗原提示細胞 (THP-1-DC 細胞) とナイーブ T 細胞との細胞間相互作用を阻害し、抗原提示における免疫応答のトリガーとなる T 細胞の活性化を抑制している可能性が考えられる (Figure 12)。上記仮説の検証には、抗原とナノマテリアルの同時共存における THP-1-DC 細胞の抗原取込みの定量的な評価が必要であり、抗原提示細胞活性化マーカーの発現抑制機構と合わせて詳細に検討することが望まれる。

E. 結論

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、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検討を試みた。卵白アルブミン及び酸化チタンを 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。他方、抗原未添加の THP-1-DC 培養系に酸化チタンを添加した群の一部において、抗原提示細胞活性化マーカーの発現上昇が認められたことから、ナノマテリアル単体の THP-1-DC 細胞へのベーサルな影響に関しても考慮しなければならないことが示唆された。

【参考文献】

1) Katayama S, Kukita T, Ishikawa E, Nakashima S, Masuda S, Kanda T, Akiyama H, Teshima R, Nakamura S. Apple polyphenols suppress an-

tigen presentation of ovalbumin by THP-1-derived dendritic cells. *Food Chemistry* **138**, 757-761 (2013)

- 2) 片山茂. 培養細胞株を用いた抗原感作性の評価法. 食物アレルギーの現状とリスク低減化食品素材の開発 pp. 154-158 (2013) シーエムシー出版
- 3) 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).

F. 健康危険情報

なし

G. 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 ナノマテリアル試料

Sample	平均一次粒子径 (nm)
A	15
B	35
C	6

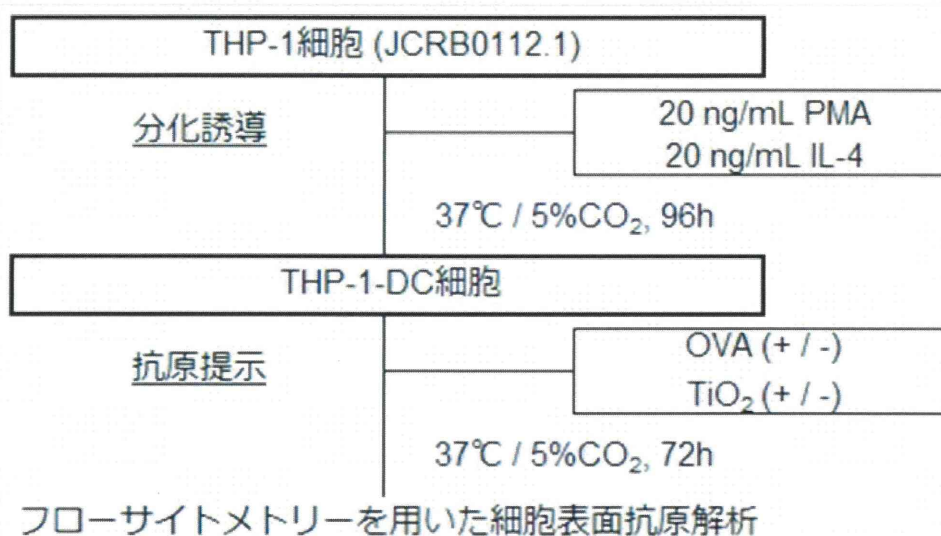


Figure 1 THP-1細胞の分化誘導と抗原提示

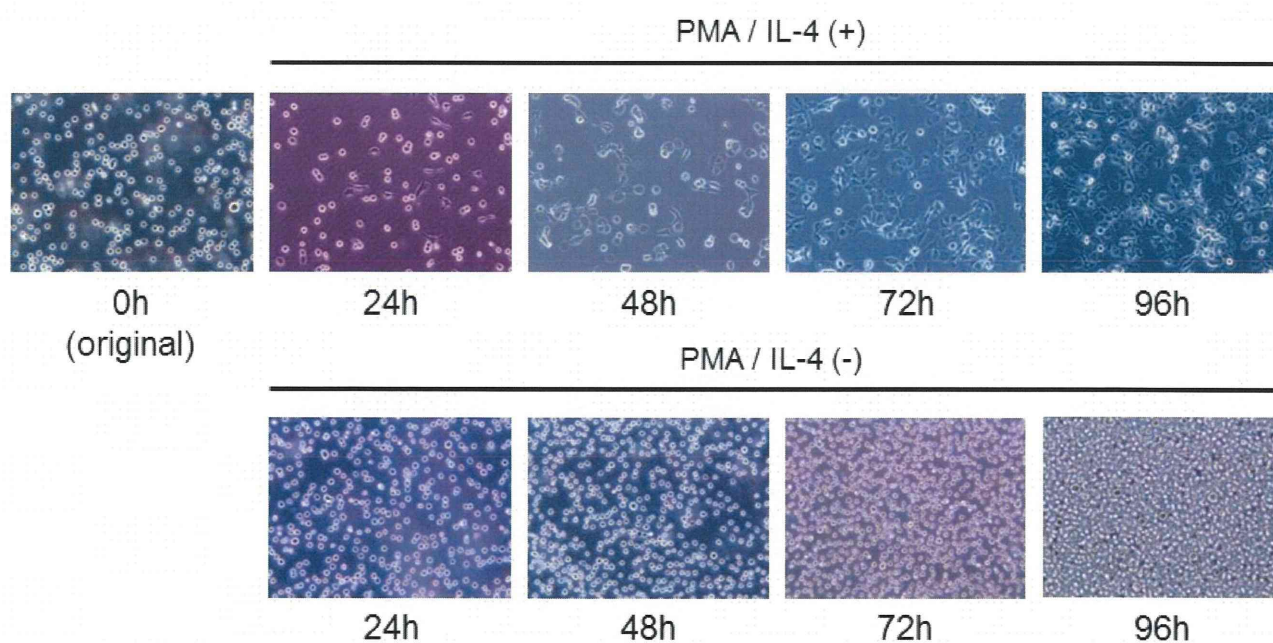
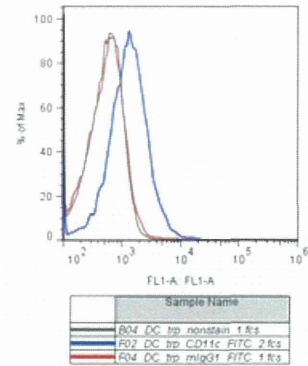
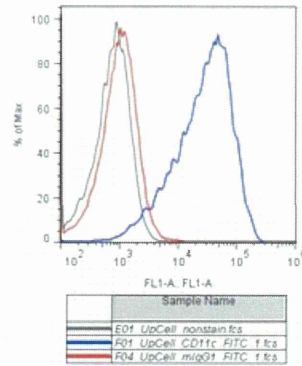
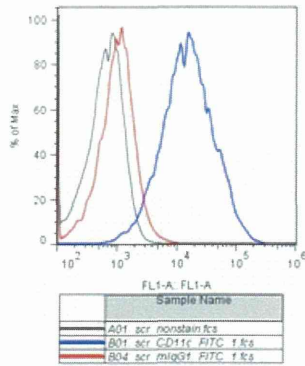
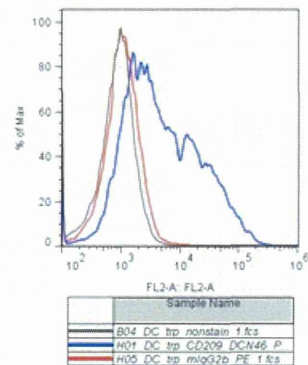
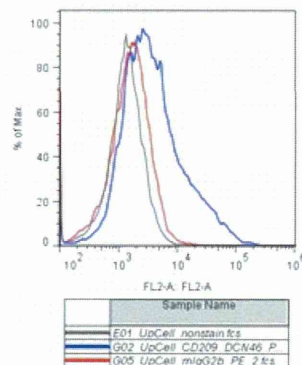
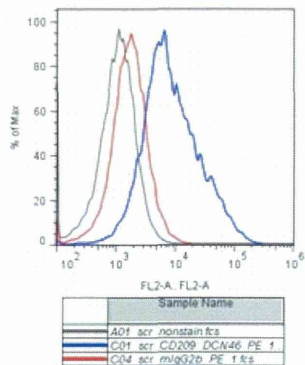


Figure 2 THP-1細胞分化の経時的なモルフォロジー変化

CD11c FITC



CD209 PE



cell scraper

UpCell®

trypsin/EDTA

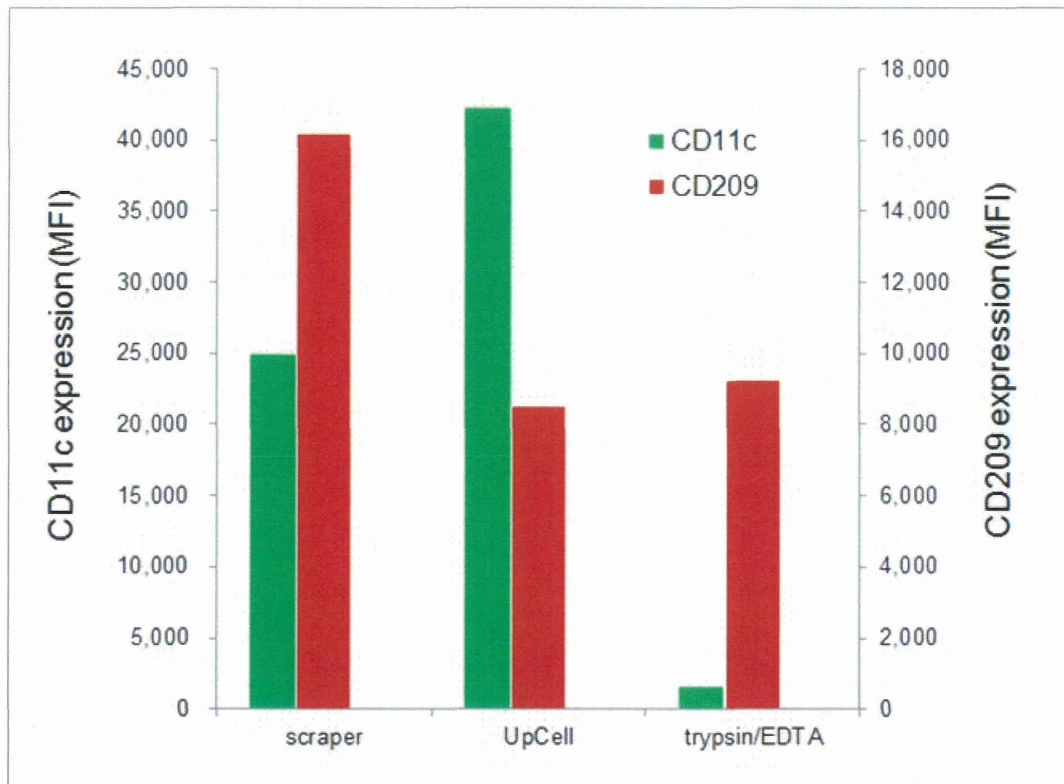
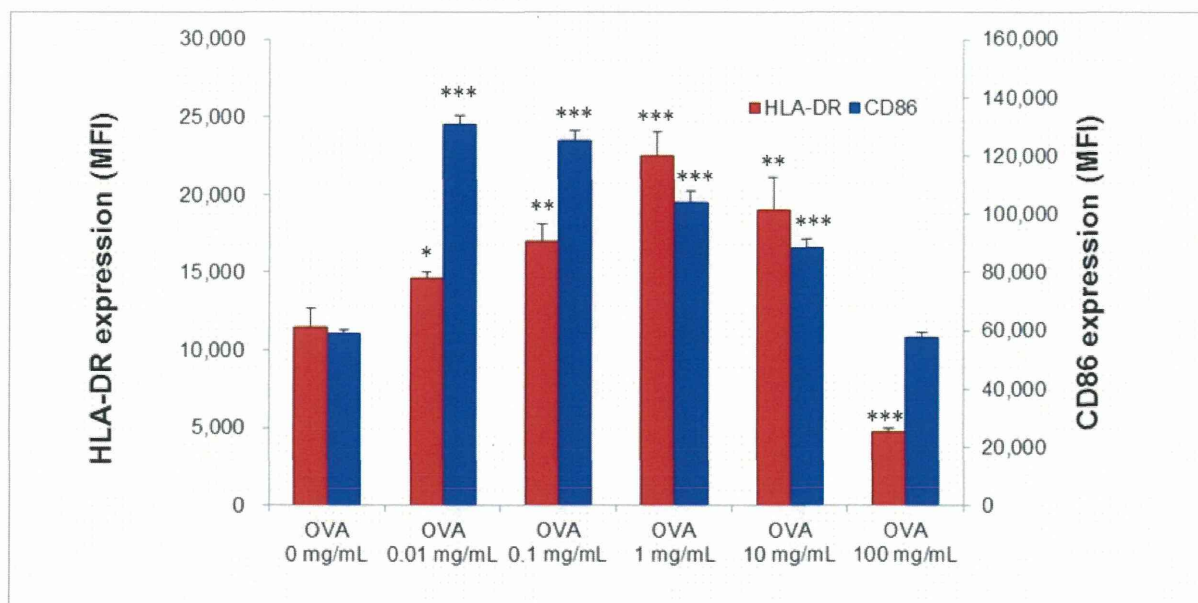
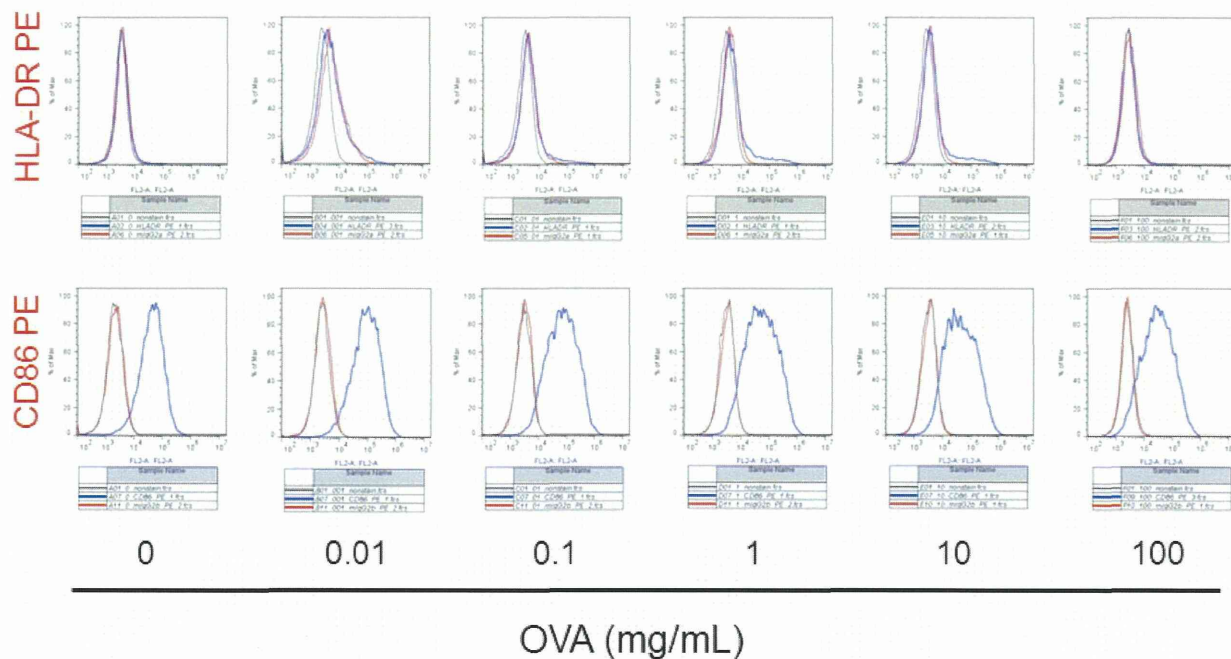


Figure 3 THP-1-DC細胞の分化マーカーの解析



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, when compared with the control (OVA 0 mg/mL)

Figure 4 THP-1-DC細胞の抗原提示細胞活性化マーカーの解析 (抗原添加濃度の検討)

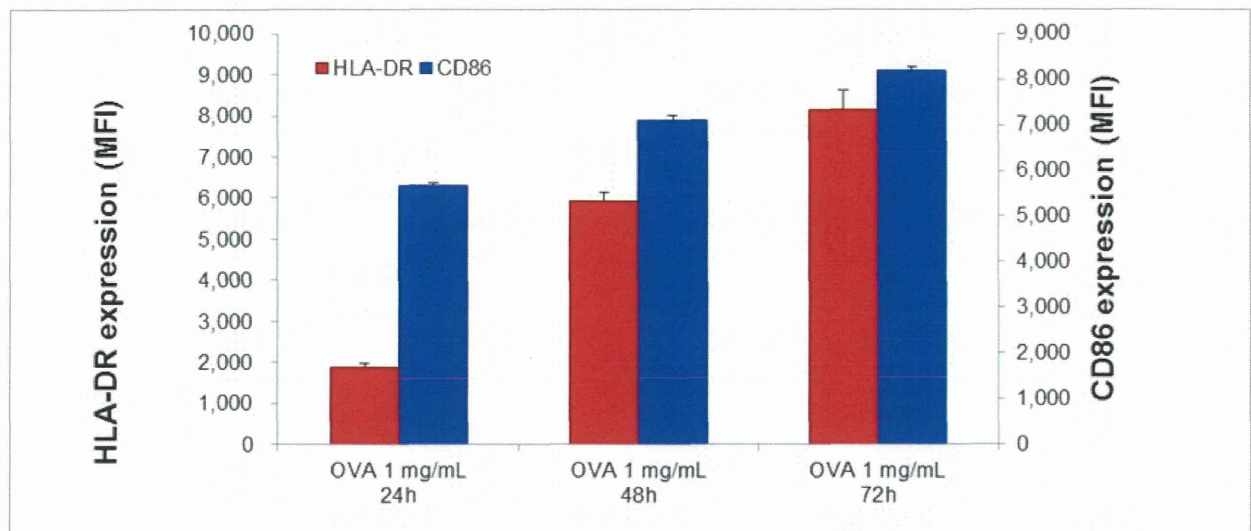
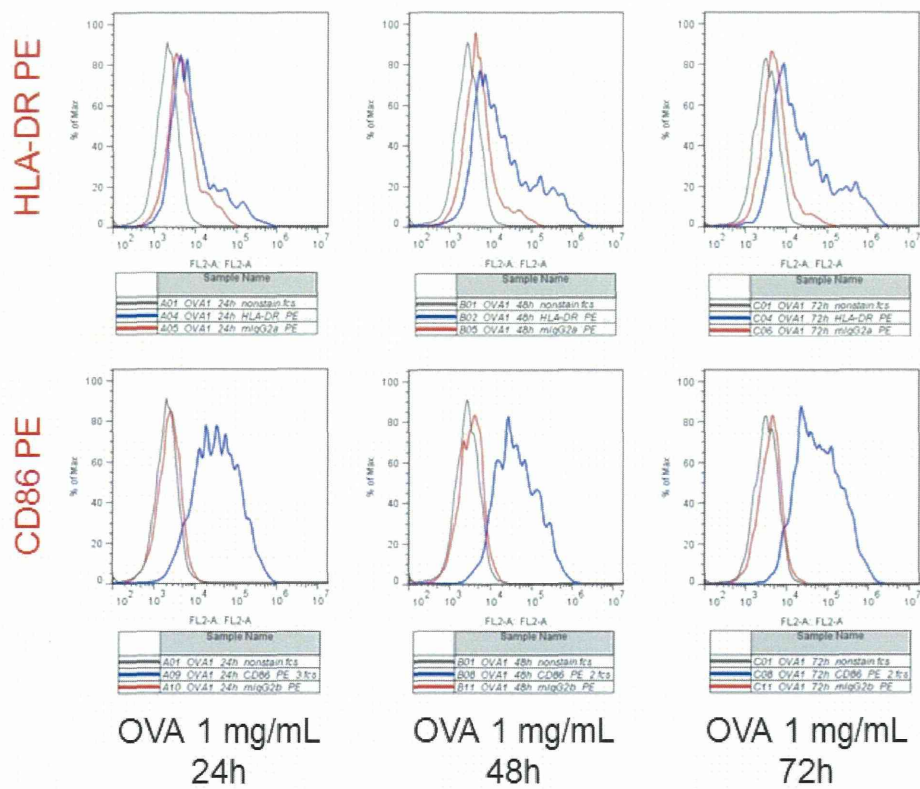
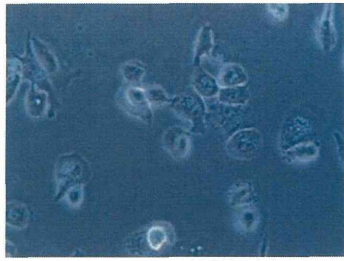
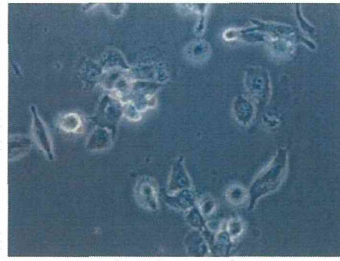


Figure 5 THP-1-DC細胞の抗原提示細胞活性化マーカーの解析 (抗原添加時間の検討)

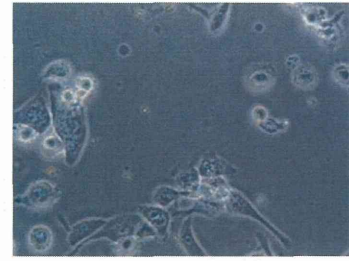
(A)



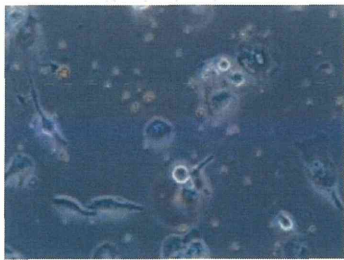
OVA_1 mg/mL
TiO₂_0 ug/mL



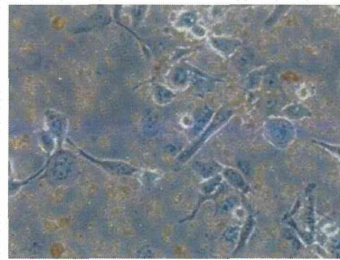
OVA_1 mg/mL
TiO₂_0.1 ug/mL



OVA_1 mg/mL
TiO₂_1 ug/mL



OVA_1 mg/mL
TiO₂_10 ug/mL

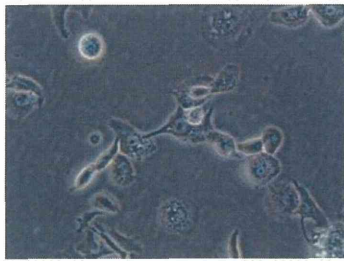


OVA_1 mg/mL
TiO₂_100 ug/mL

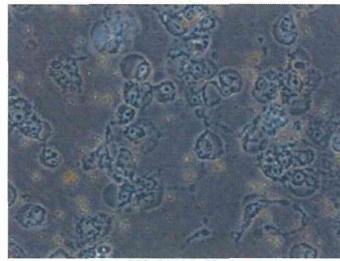


OVA_1 mg/mL
TiO₂_1,000 ug/mL

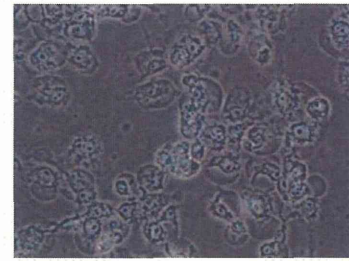
(B)



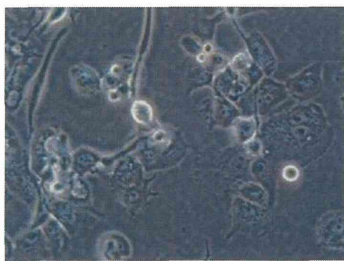
OVA_0 mg/mL
TiO₂_0 ug/mL



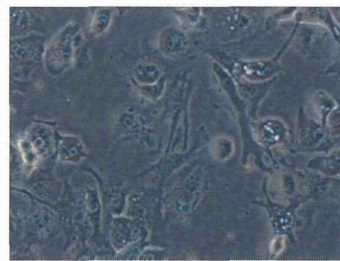
OVA_0 mg/mL
TiO₂_10 ug/mL



OVA_1 mg/mL
TiO₂_0 ug/mL



OVA_1 mg/mL
TiO₂_0.1 ug/mL



OVA_1 mg/mL
TiO₂_1 ug/mL

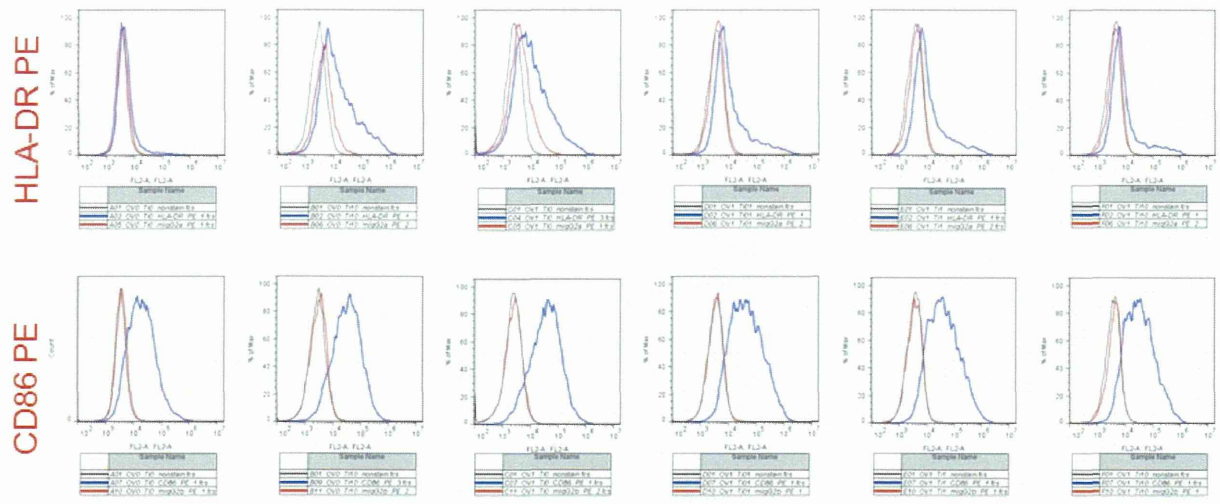


OVA_1 mg/mL
TiO₂_10 ug/mL

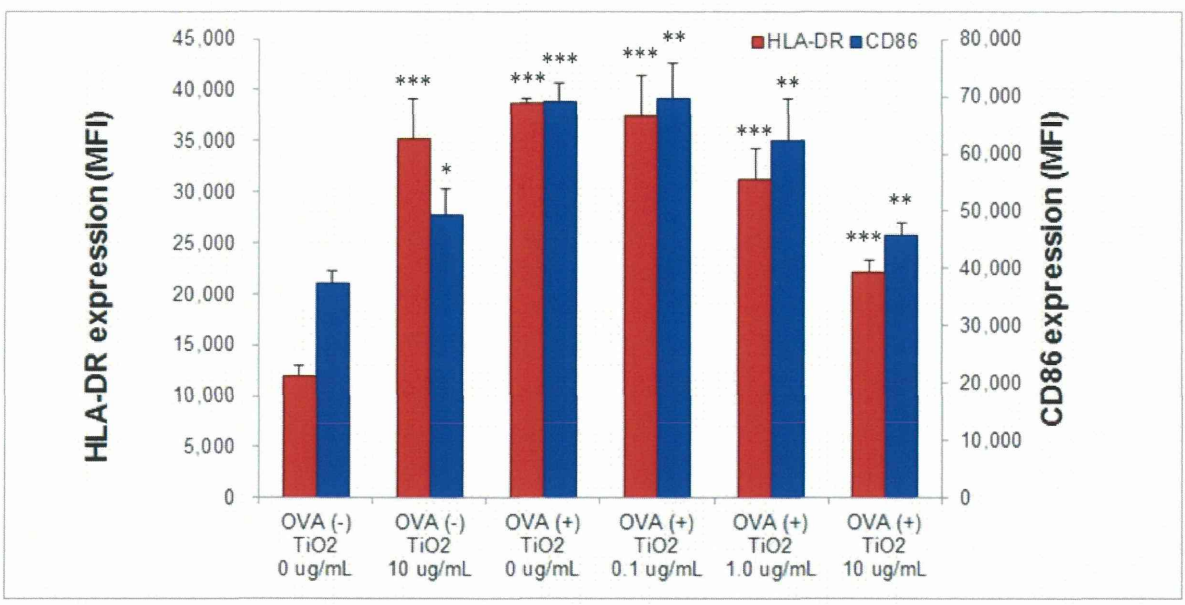
Figure 6 THP-1-DC細胞とナノマテリアルの共培養

(A) TiO₂添加濃度の検討 (0~1,000 ug/mL)

(B) 実際の培養条件 (0~10 ug/mL)

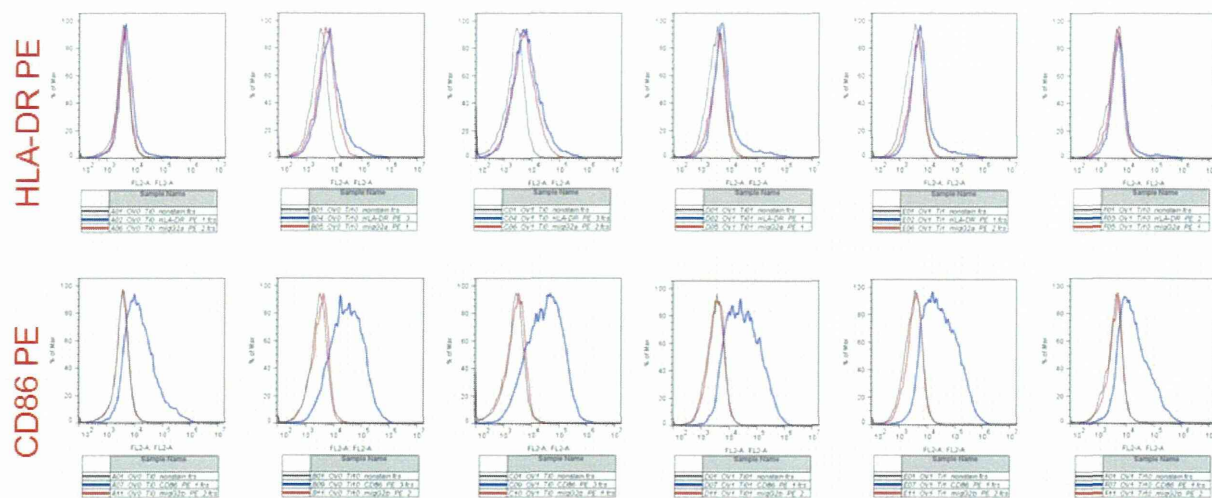


OVA (mg/mL)	0	0	1	1	1	1
TiO ₂ (ug/mL)	0	10	0	0.1	1	10

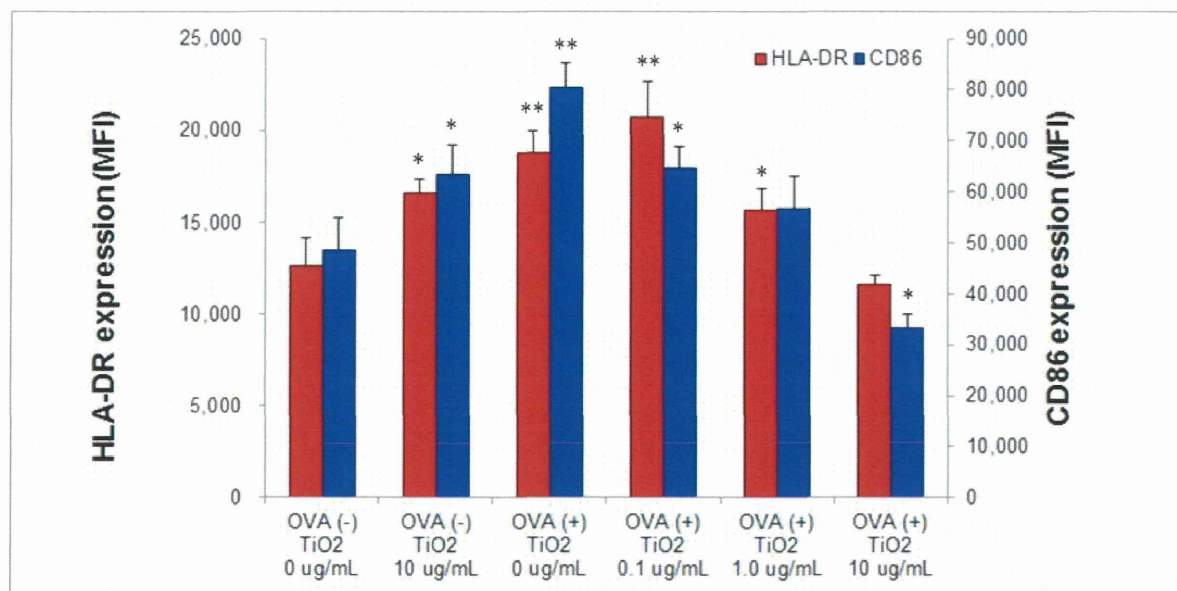


* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, when compared with the control [OVA(-) TiO₂ 0 ug/mL].

Figure 7 THP-1-DC細胞の抗原提示細胞活性化マーカーの解析 (ナノマテリアル添加濃度の検討)

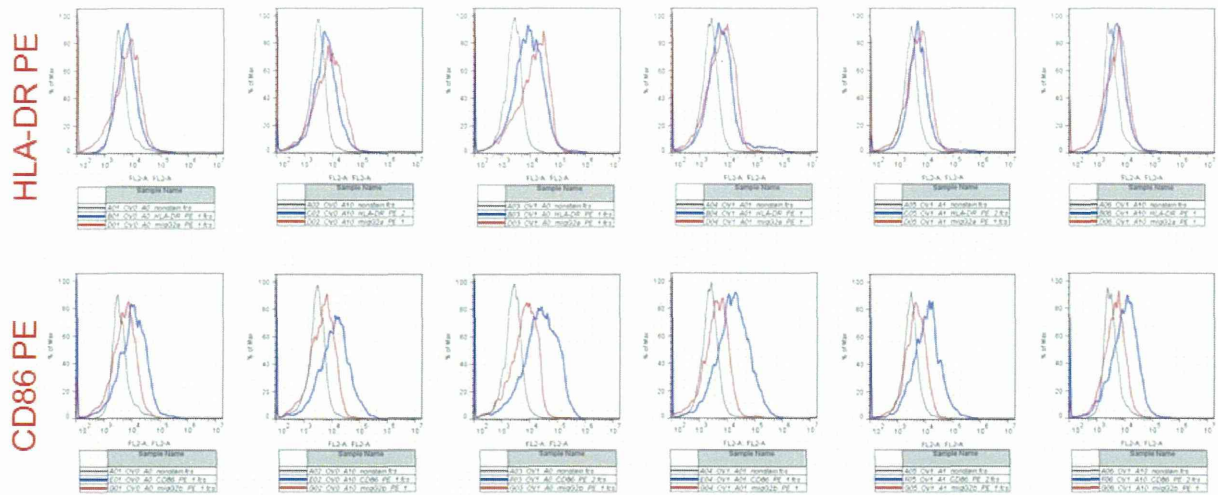


OVA (mg/mL)	0	0	1	1	1	1
TiO ₂ (ug/mL)	0	10	0	0.1	1	10

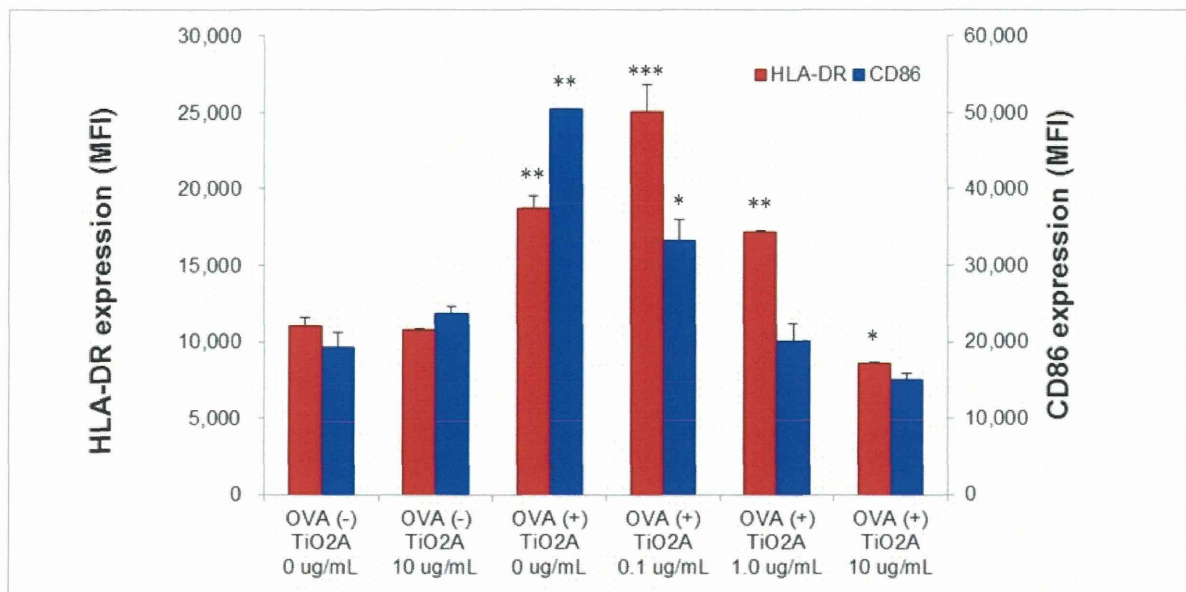


* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, when compared with the control [OVA(-) TiO₂ 0 ug/mL].

Figure 8 ATCCより分譲されたTHP-1-DC細胞の抗原提示細胞活性化マーカーの解析 (THP-1細胞株間の検討)

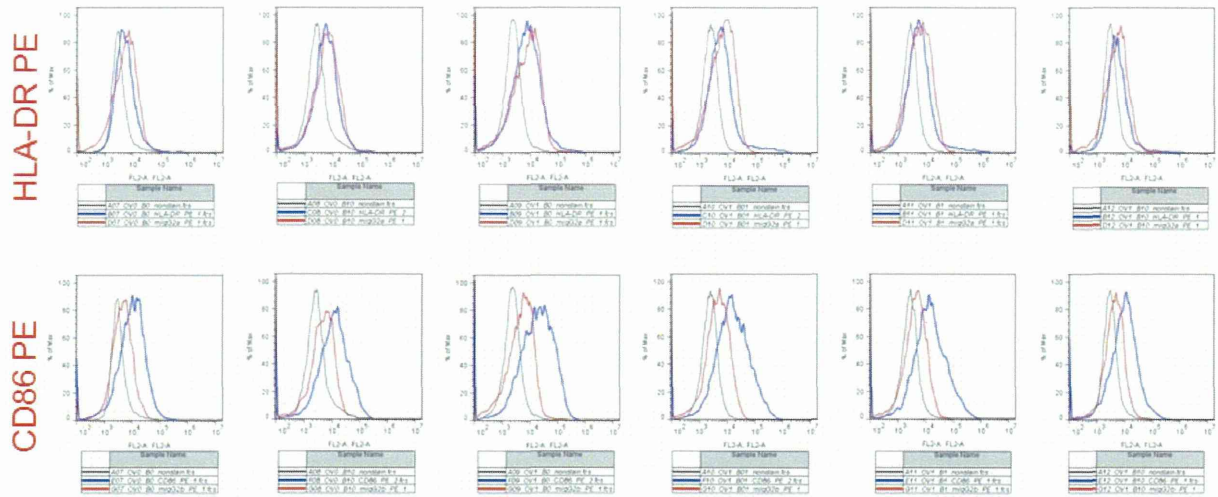


OVA (mg/mL)	0	0	1	1	1	1
TiO ₂ (ug/mL)	0	10	0	0.1	1	10

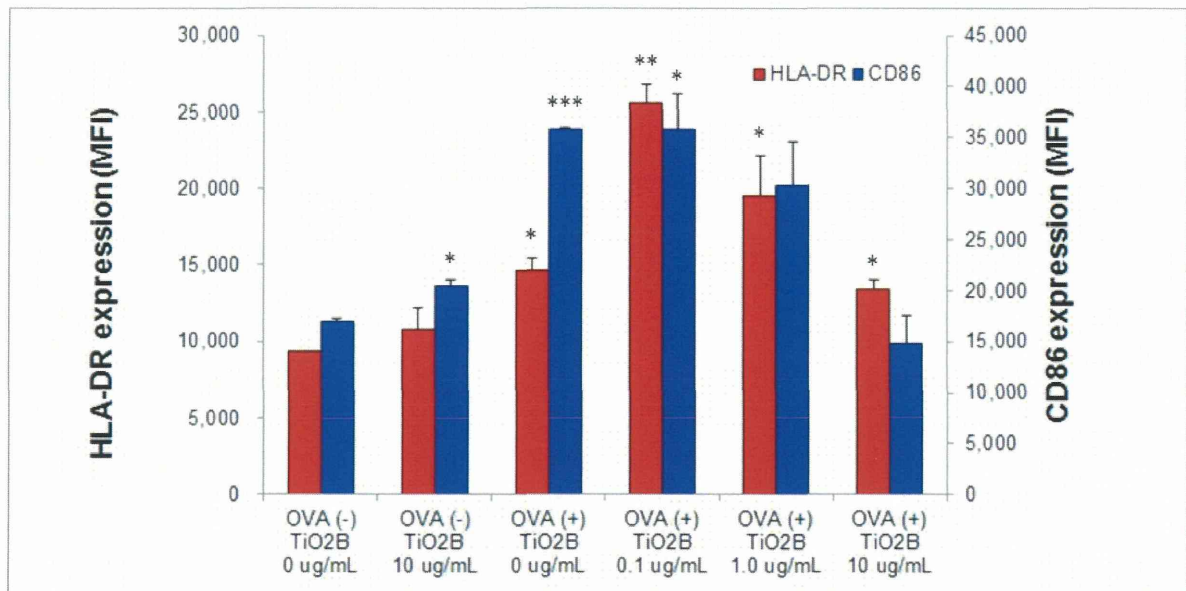


* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, when compared with the control [OVA(-) TiO₂ 0 ug/mL].

Figure 9 THP-1-DC細胞の抗原提示細胞活性化マーカーの解析 (ナノマテリアル試料間の検討; TiO₂ 試料A)

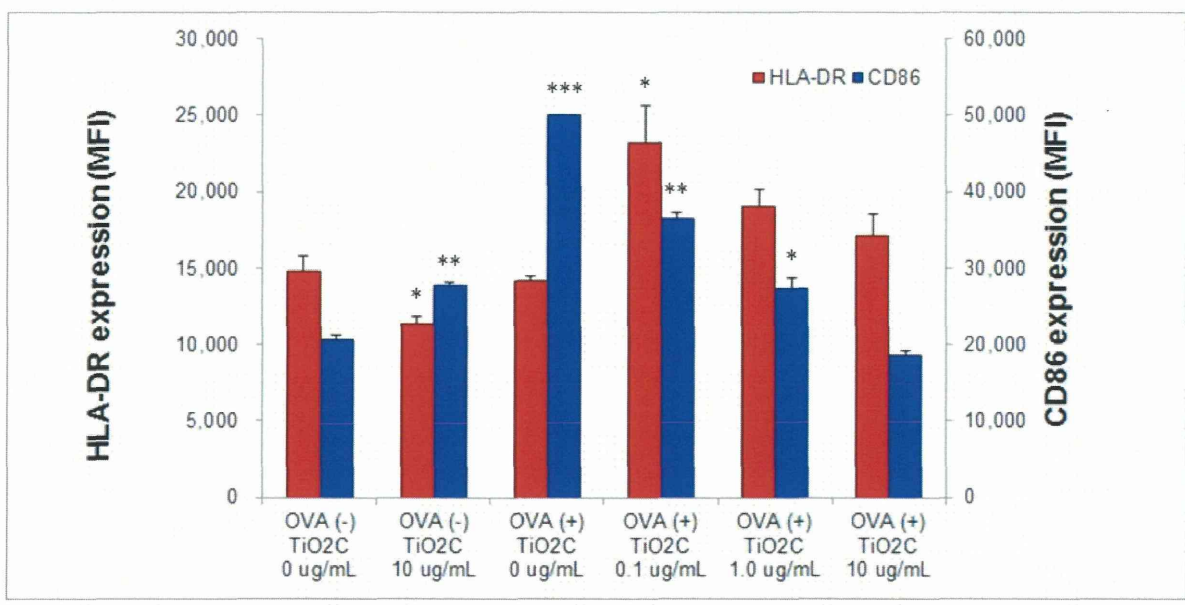
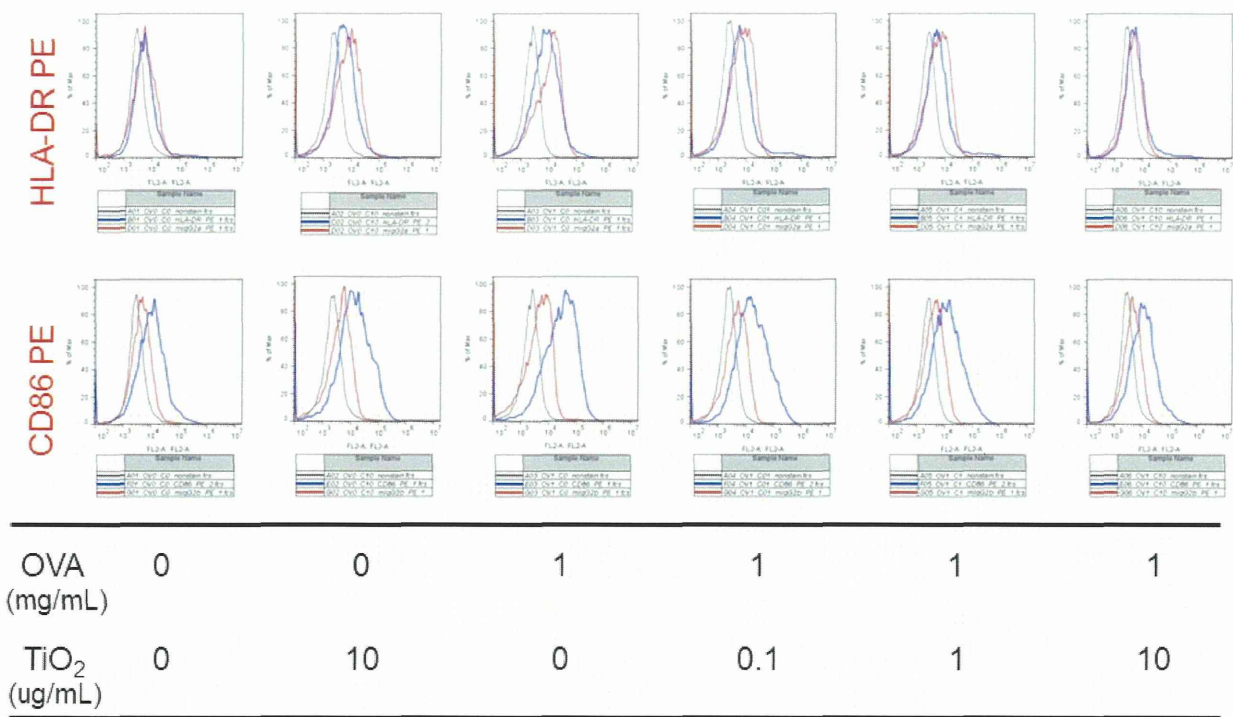


OVA (mg/mL)	0	0	1	1	1	1
TiO ₂ (ug/mL)	0	10	0	0.1	1	10



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, when compared with the control [OVA(-) TiO₂ 0 ug/mL].

Figure 10 THP-1-DC細胞の抗原提示細胞活性化マーカーの解析 (ナノマテリアル試料間の検討; TiO₂ 試料B)



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, when compared with the control [OVA(-) TiO₂ 0 ug/mL].

Figure 11 THP-1-DC細胞の抗原提示細胞活性化マーカーの解析 (ナノマテリアル試料間の検討; TiO₂ 試料C)

T細胞の活性化には抗原と共刺激シグナルの両方が必要

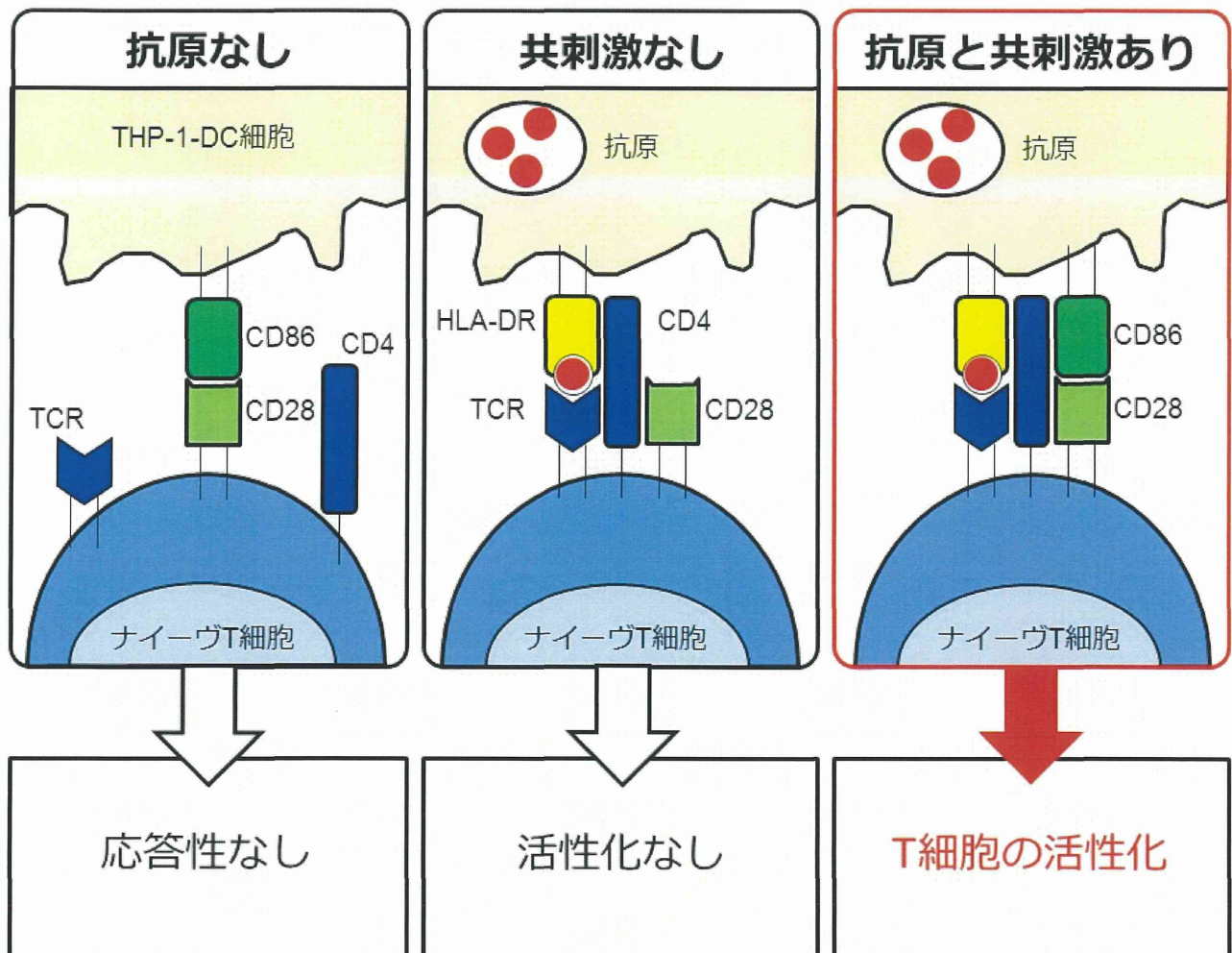


Figure 12 THP-1-DC細胞とナイーブT細胞との細胞間相互作用

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告

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