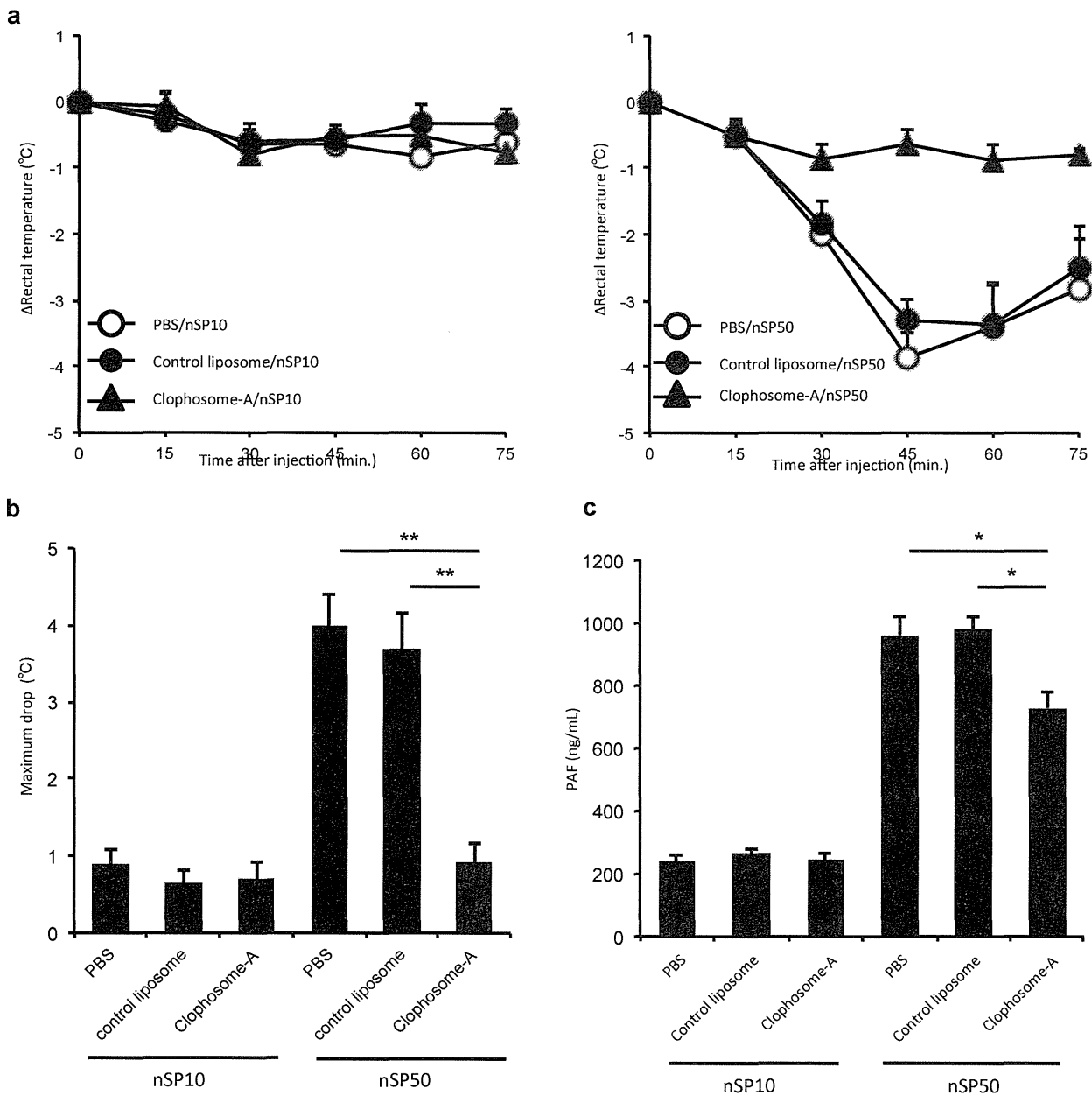


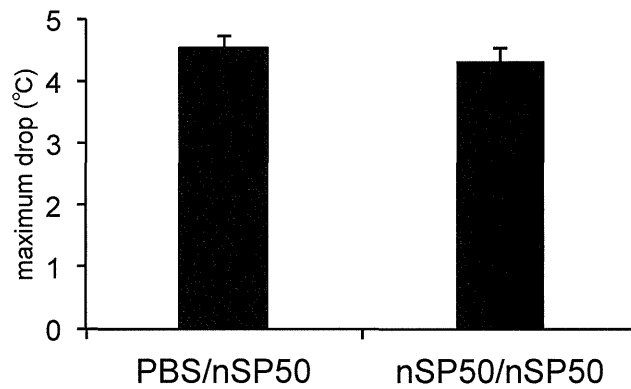
**Fig.48. 非晶質ナノシリカ誘導性の体温低下におけるPAFの関与**

C3H/HeN mice (雄性, 10 週齢, n=5) に、PAF受容体阻害剤 CV6209 (50  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ )、コントロールであるPBSを前処置した30分後に、15 mg/kg nSP10もしくは80 mg/kg nSP50を静脈内投与し、直腸体温を静脈投与後0分から75分まで15分毎に測定した。(a) 経時的な体温低下 (b)最大体温低下値をそれぞれグラフとした。実験結果は、平均値および標準誤差で表記(n=5).

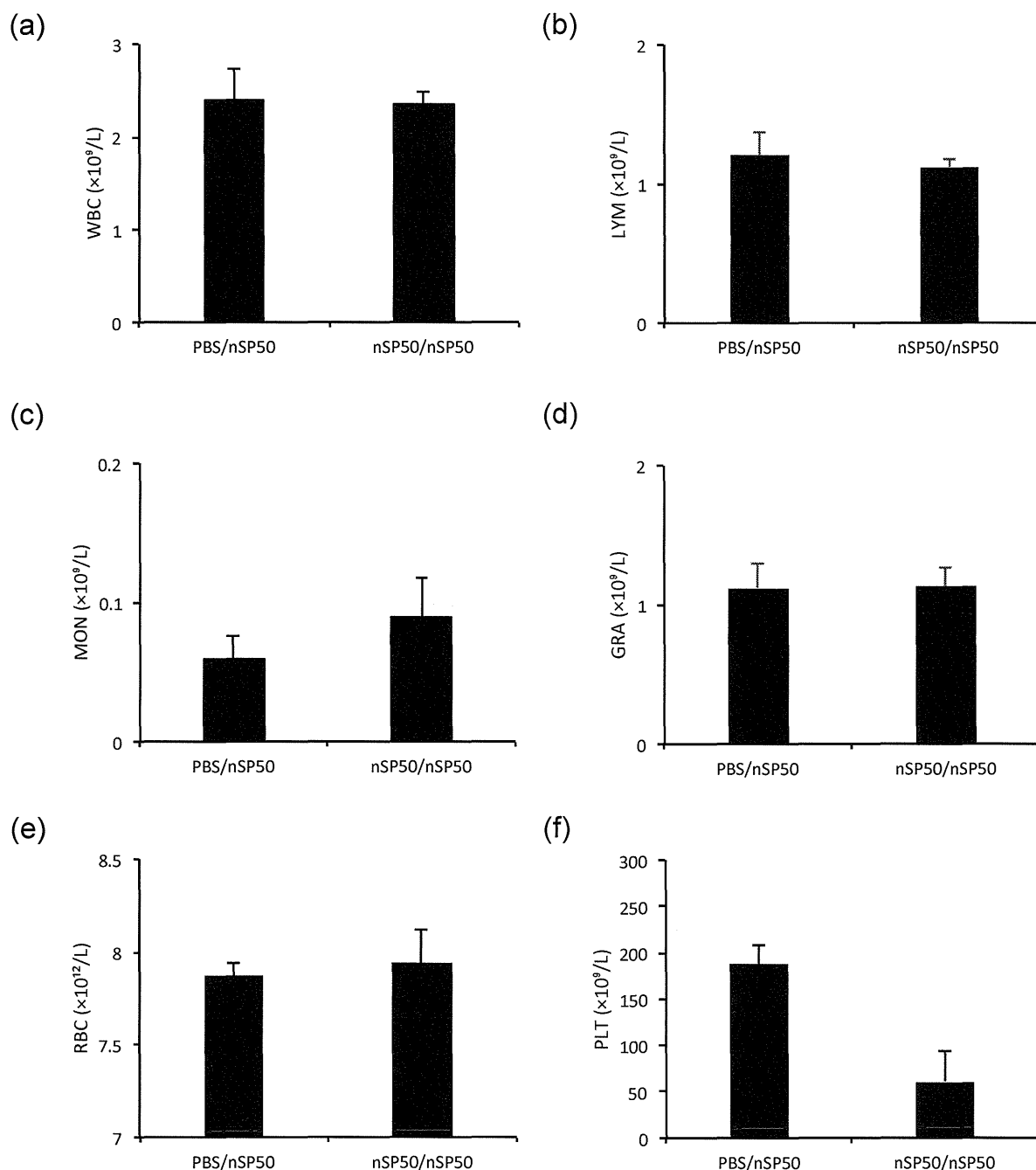
\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. control group.



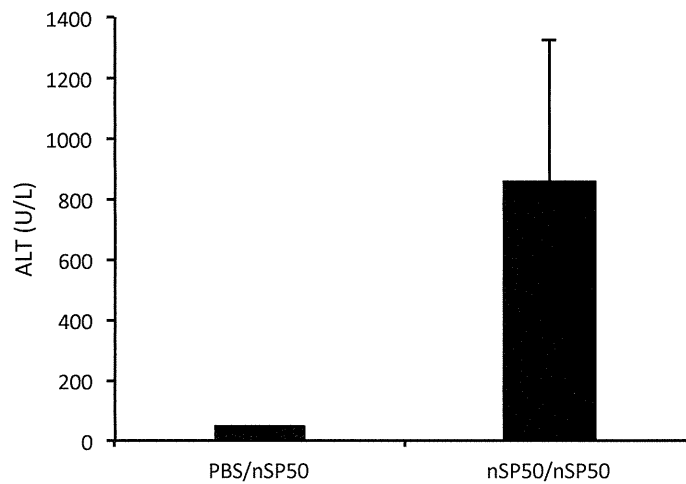
**Fig.49. PAF依存的な非晶質ナノシリカ誘導性の体温低下におけるマクロファージの関与**  
 C3H/HeN mice (雄性, 10 週齢, n=5) に、Clophosome-A (150  $\mu$ L/mouse) を前処置し、マクロファージを枯渇させた。前処置を行ったマウスとコントロールであるPBSを前処置したマウスに、24時間後に、15 mg/kg nSP10 もしくは80 mg/kg nSP50を静脈内投与し、直腸体温を静脈投与後0分から75分まで15分毎に測定した。(a) 経時的な体温低下 (b)最大体温低下値をそれぞれグラフとした。(c)非晶質ナノシリカ投与後20分の血漿を回収し、ELISAにより、血漿中のPAF産生量を測定した。実験結果は、平均値および標準誤差で表記(n=6-7)。  
 \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. control group.



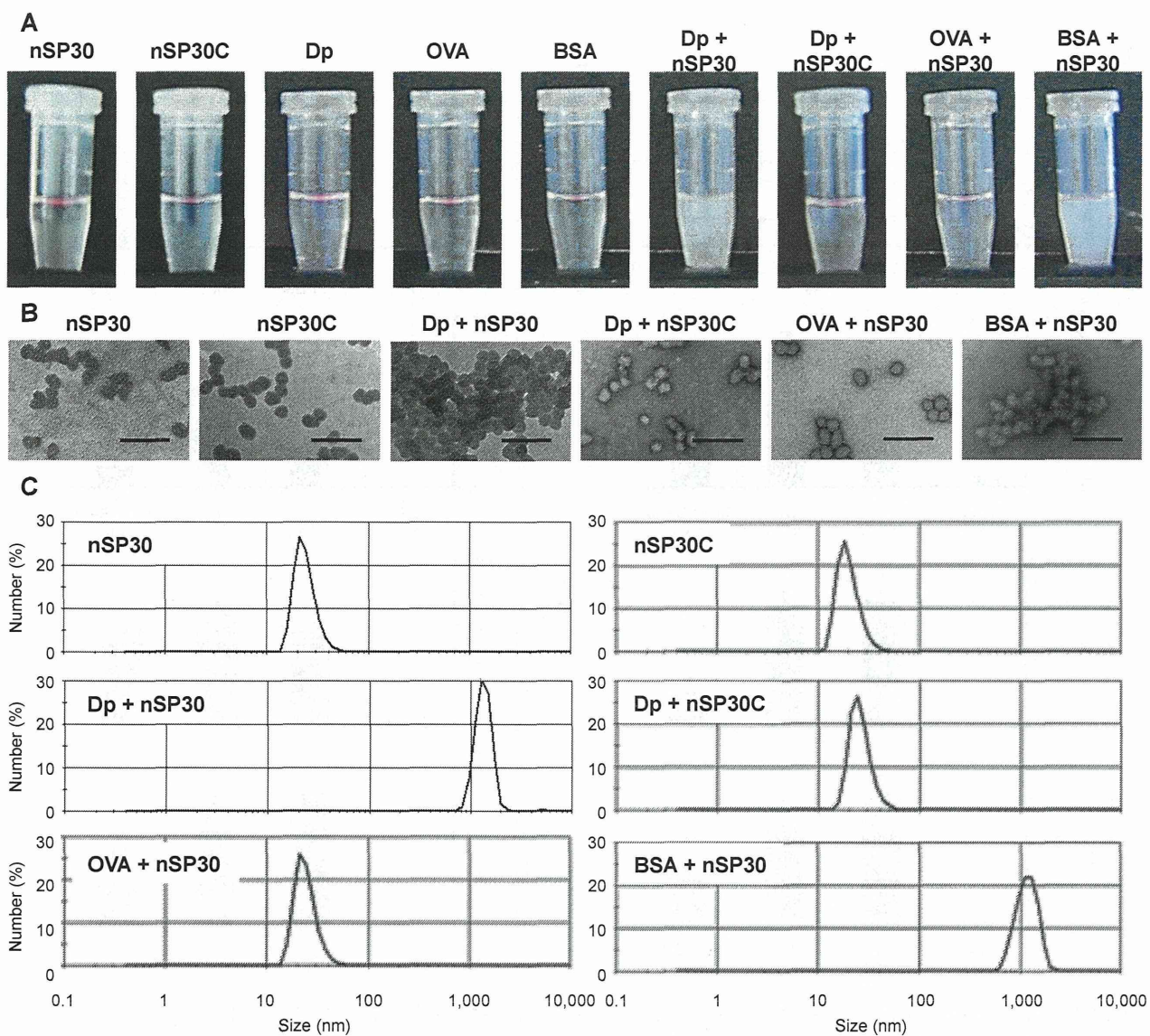
**Fig.50. ナノシリカの事前反復投与がナノシリカ誘導性の体温低下に与える影響評価.** マウスにnSP50 (12.5 mg/mL) を週1回、計4週にわたって耳介部皮内へ事前投与した。最終投与の1週間後、nSP50を尾静脈より投与した (80 mg/kg)。投与直後から15分毎に直腸体温を測定した。最大体温低下値を示した75分後の結果を示す。 Data are reported as means  $\pm$  SEMs (n = 7).



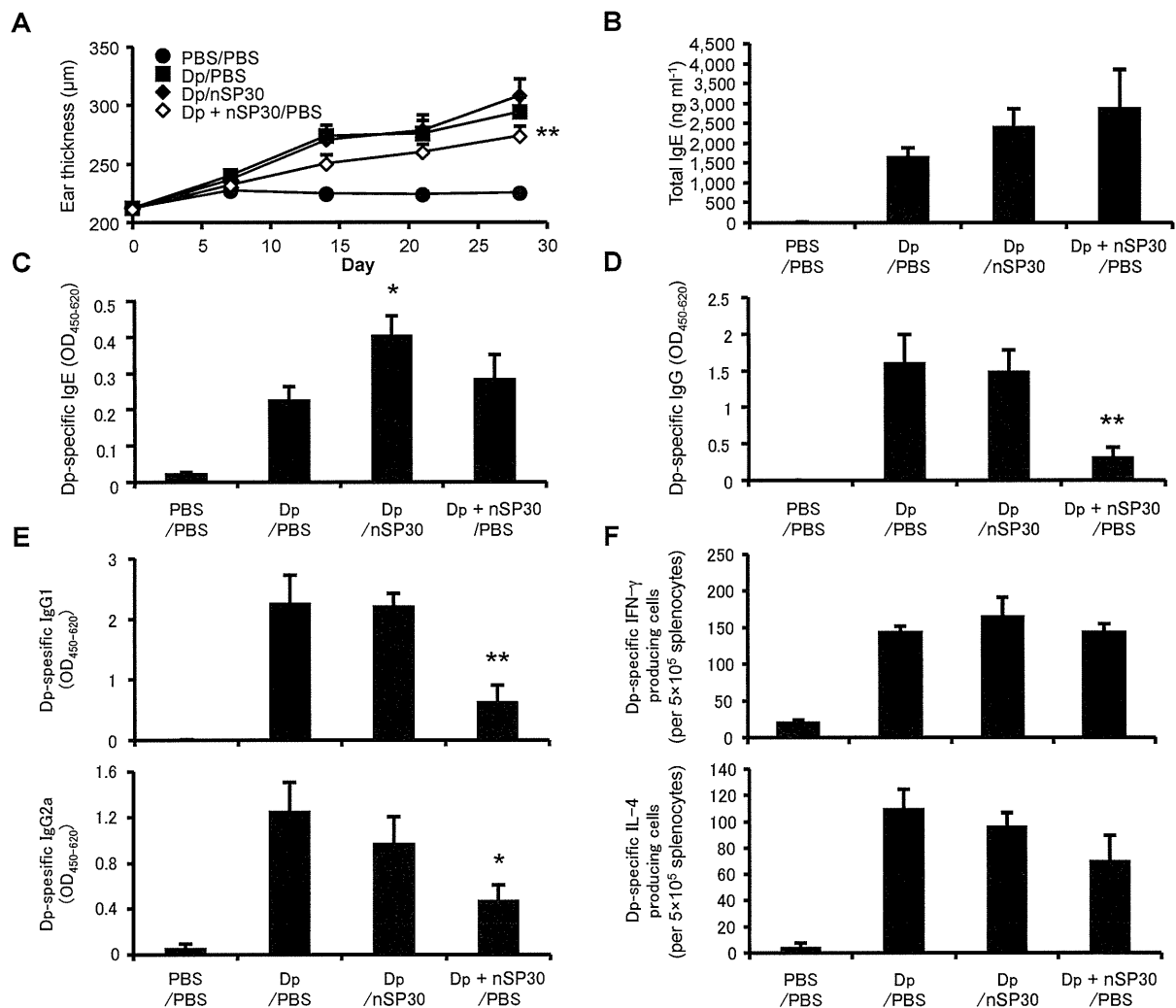
**Fig.51. ナノシリカの事前反復投与がナノシリカ誘導性の急性毒性に与える影響評価。** マウスにnSP50 (12.5 mg/mL) を週1回、計4週にわたって耳介部皮内へ事前投与した。最終投与の1週間後、nSP50を尾静脈より投与した (80 mg/kg)。投与4時間後に血液を回収し、(a) 白血球数、(b) リンパ球数、(c) 単球数、(d) 顆粒球数、(e) 赤血球数、(f) 血小板数を測定した。Data are reported as means  $\pm$  SEMs (n = 7).



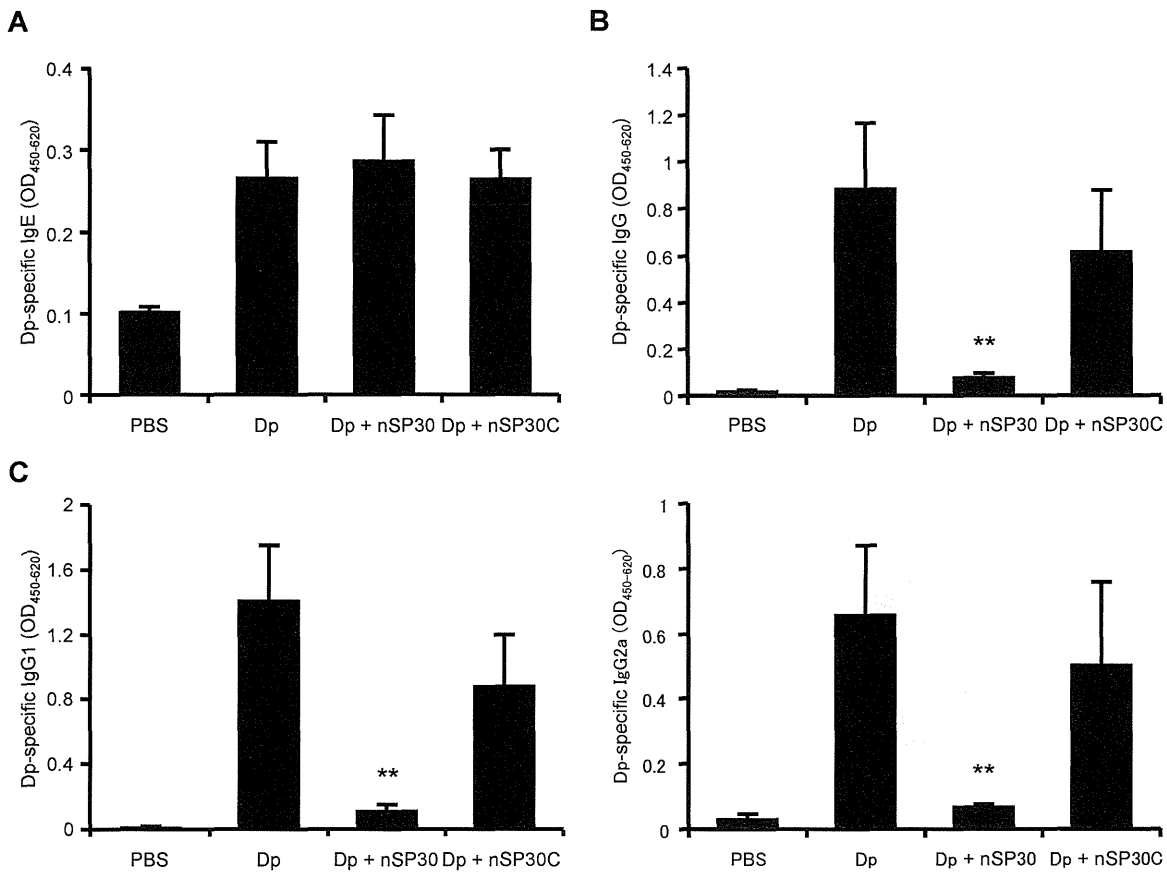
**Fig.52. ナノシリカの事前反復投与がナノシリカ誘導性の急性毒性に与える影響評価.** マウスにnSP50 (12.5 mg/mL) を週1回、計4週にわたって耳介部皮内へ事前投与した。最終投与の1週間後、nSP50を尾静脈より投与した (80 mg/kg)。投与4時間後に血液を回収し、血液生化学検査を実施し血中ALT量を測定した。Data are reported as means  $\pm$  SEMs (n = 7).



**Fig.53. 塗布サンプルの性状.** 各塗布サンプルの肉眼 (A)、および透過型電子顕微鏡 (B) による観察を行った。また、各サンプルの凝集状態を評価するため、動的光散乱法により、サンプル中粒子の粒子径を測定した (C)。

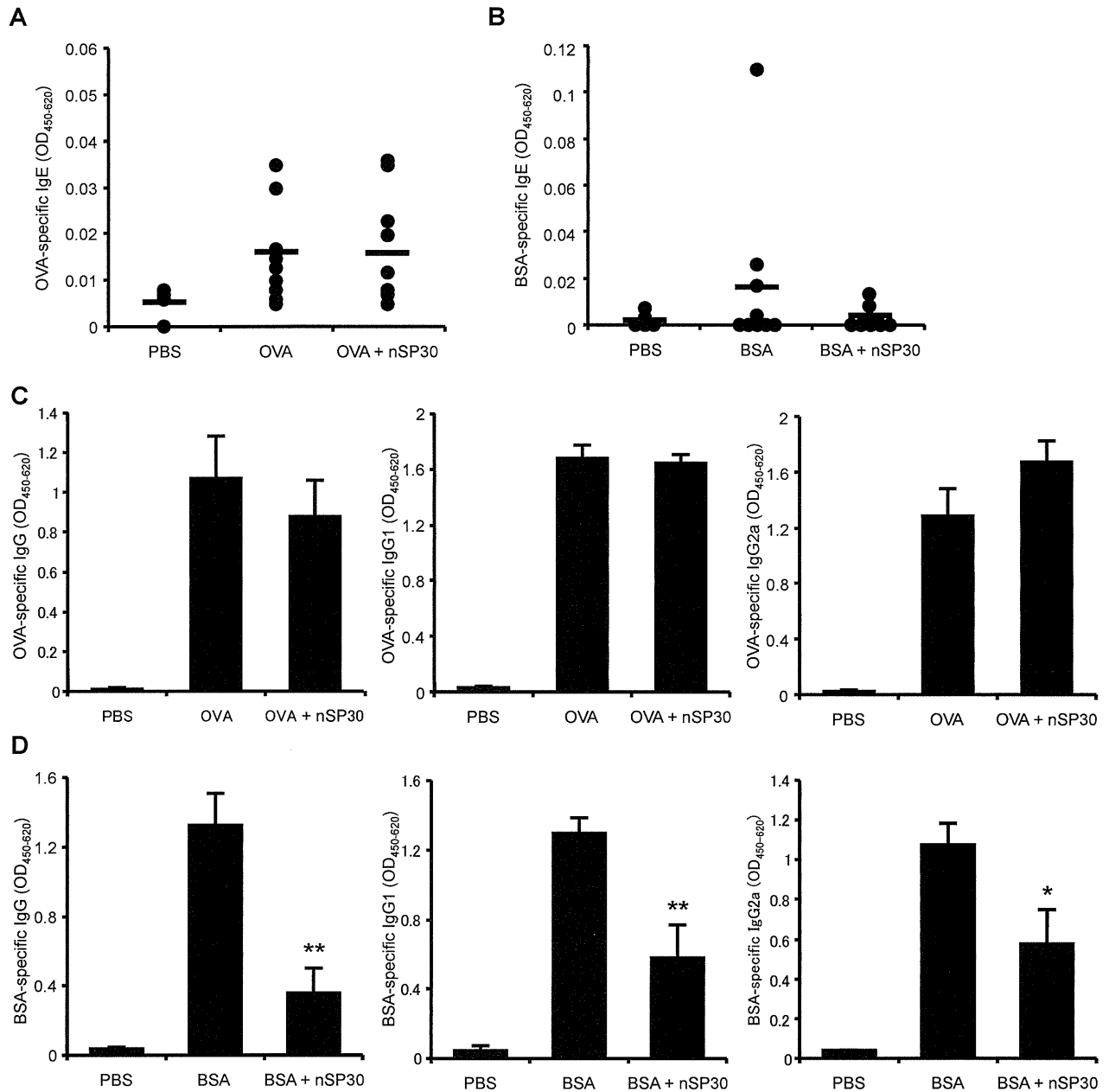


**Fig.54. DpとnSP30の交互塗布がアトピー病態、及びDp特異的免疫誘導に与える影響.** NC/Nga slcマウス（雌性 6週齢）の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ヤケヒョウダニ抽出抗原（Dp）とnSP30の混合溶液（Dp ; 1 mg/ml、nSP30 ; 12.5 mg/ml）（Dp + nSP30/PBS群）、またはDpとnSP30を24時間間隔で別々に塗布し（Dp/nSP30群）、それぞれがアトピー病態、及びDp特異的免疫誘導に与える影響を評価した。各サンプルはそれぞれ週3回、4週間塗布した。病態の重症度は、経過的に耳介厚を測定することにより解析した。最終投与から24時間後に解剖し、血中のtotal IgE量（B）抗原特異的抗体価（C-E）、および脾臓中の抗原特異的IFN- $\gamma$ 、IL-4産生細胞数（F）をELISPOT法により評価した。Data are means  $\pm$  SEMs ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Dp/PBS group.

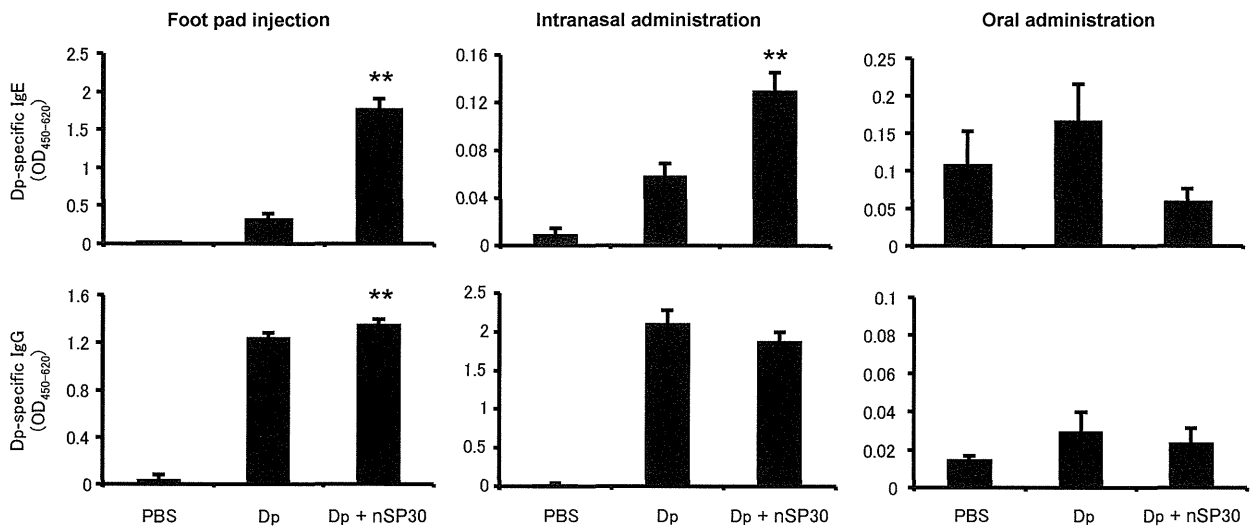


**Fig.55. DpとnSP30Cの混合塗布がDp特異的抗体産生に与える影響.** NC/Nga slcマウス (雌性 6週齢) の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ヤケヒョウダニ抽出抗原 (Dp ; 1 mg/ml)、DpとnSP30、またはその表面をカルボキシル機で修飾したnSP30Cの混合溶液 (Dp ; 1 mg/ml、nSP30 ; 12.5 mg/ml) をそれぞれ20  $\mu$ l/ear、80  $\mu$ l/backで週3回、4週間塗布した。最終投与から24時間後に解剖し、Data are means  $\pm$  SEMs ( $n = 5$ ). \*\* $P < 0.01$  vs. Dp group.



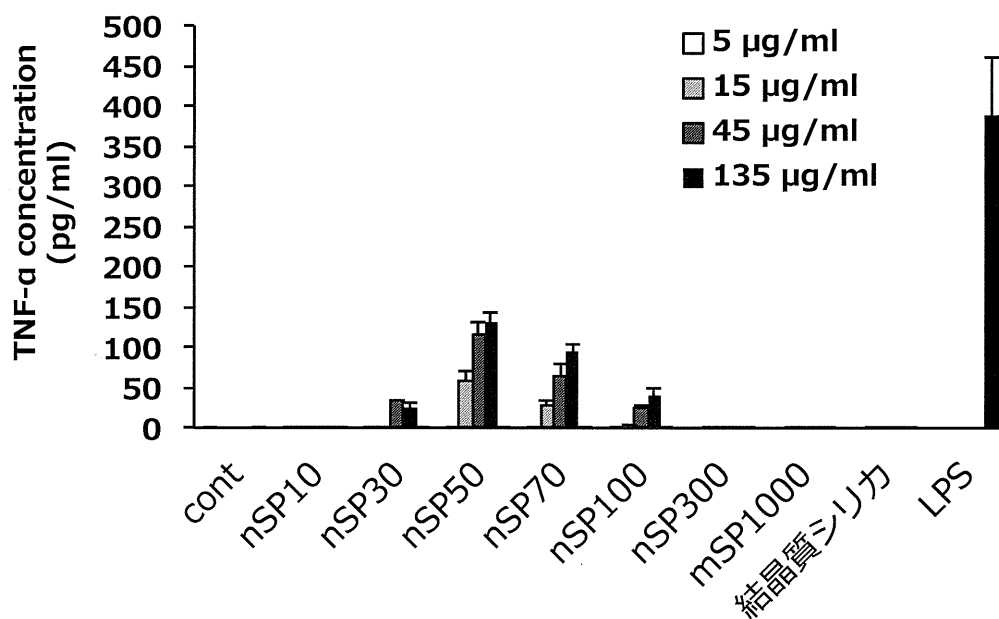


**Fig.56. nSP30と抗原の相互作用とIgG抑制作用の関連.** NC/Nga slcマウス (雌性 6週齢) の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ニワトリ卵白アルブミン (OVA ; 1 mg/ml)、ウシ血清アルブミン (BSA ; 1 mg/mL)、または、それぞれの抗原とnSP30の混合溶液 (OVA or BSA ; 1 mg/ml、nSP30 ; 12.5 mg/ml) をそれぞれ20  $\mu$ l/ear、80  $\mu$ l/backで週3回、4週間塗布した。最終投与から24時間後に解剖し、血中のOVA特異的抗体価 (A, C)、もしくはBSA特異的抗体価(B, D)をELISA法により測定した。Data are means  $\pm$  SEMs ( $n = 5-10$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. OVA or BSA group.

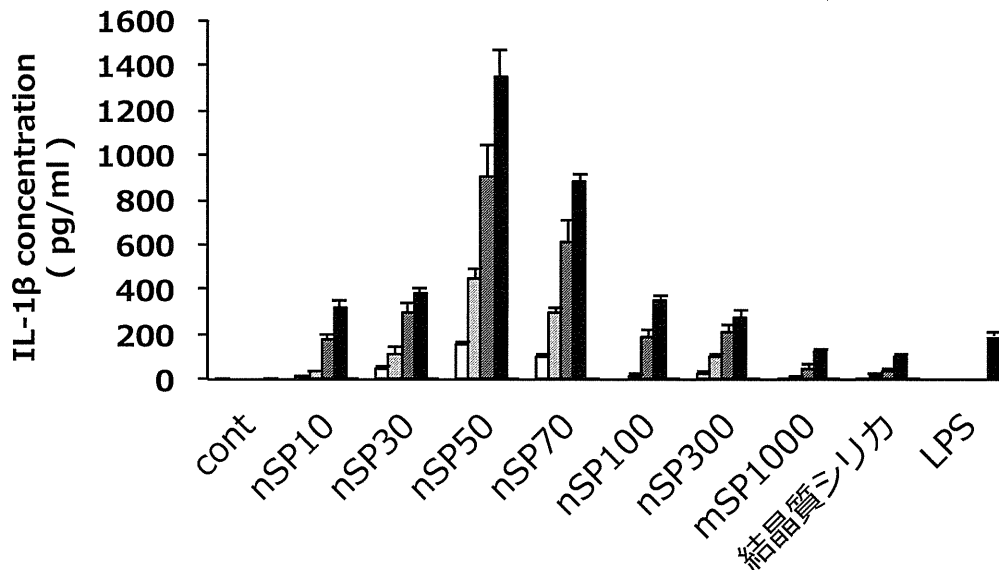


**Fig.57. nSP30がDp特異的抗体産生に与える影響と投与経路の連関.** NC/Nga slcマウス（雌性 6週齢）に、ヤケヒョウダニ抽出抗原（Dp ; 1 mg/ml）またはDpとnSP30の混合溶液（Dp ; 1 mg/ml、nSP30 ; 12.5 mg/ml）を、週3回、4週間、フットパッドへ皮内投与(40  $\mu$ l/mouse)、経鼻投与（ 20  $\mu$ l/mouse ）、あるいは経口投与（ 120  $\mu$ l/mouse ）した。最終投与から24時間後に解剖し、血中のDp特異的抗体価をELISA法により解析した。 Data are means  $\pm$  SEMs ( $n = 3-6$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. Dp group.

(A)

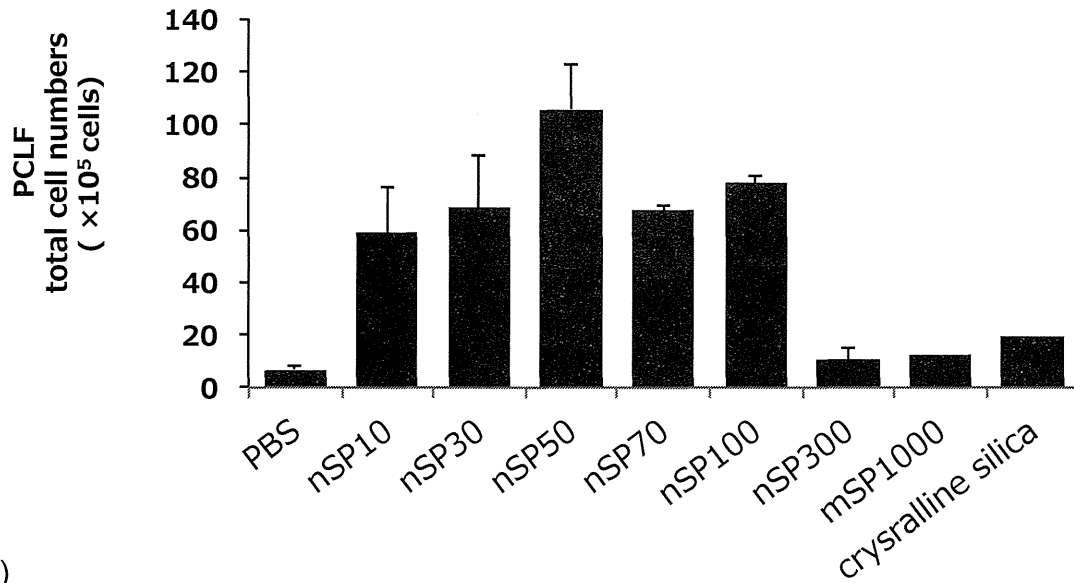


(B)

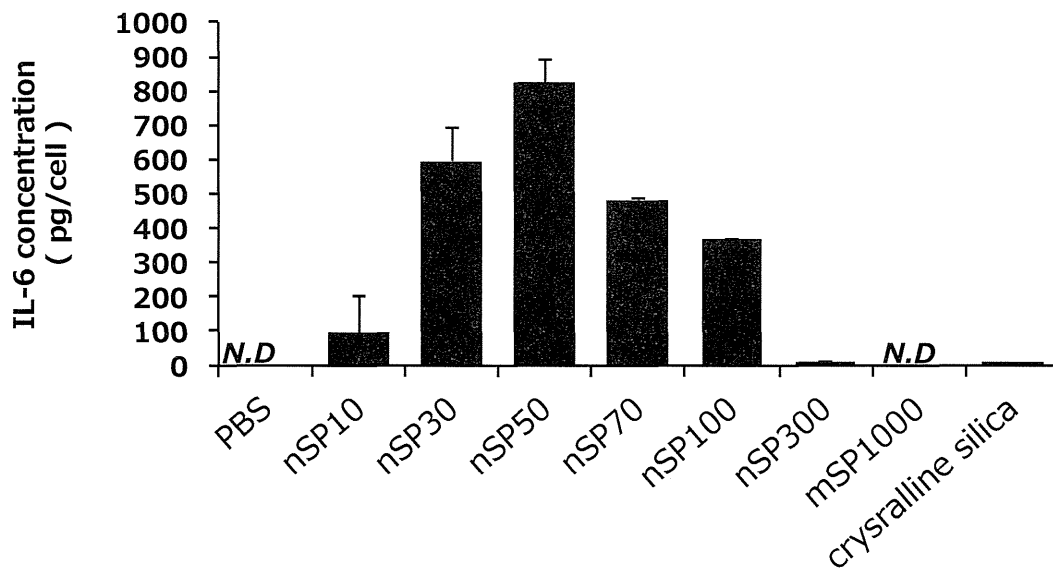


**Fig.58. 非晶質ナノシリカが誘導するサイトカイン産生量の評価.** ヒト単球細胞株(THP-1)を $3.0 \times 10^4$  cells/wellで96穴プレート上に播種し、分化促進のために、12-O-テトラデカノイルホルボル 13-アセテート(PMA)を $0.5 \mu\text{M}$ となるように加えた。一晚培養後、各粒子径の非晶質ナノシリカ溶液、結晶質シリカ、またはLPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ )を各濃度で添加し、24時間後にELISA法によって細胞上清中の (A) TNF- $\alpha$ 、(B) IL-1 $\beta$ 産生量を評価した。

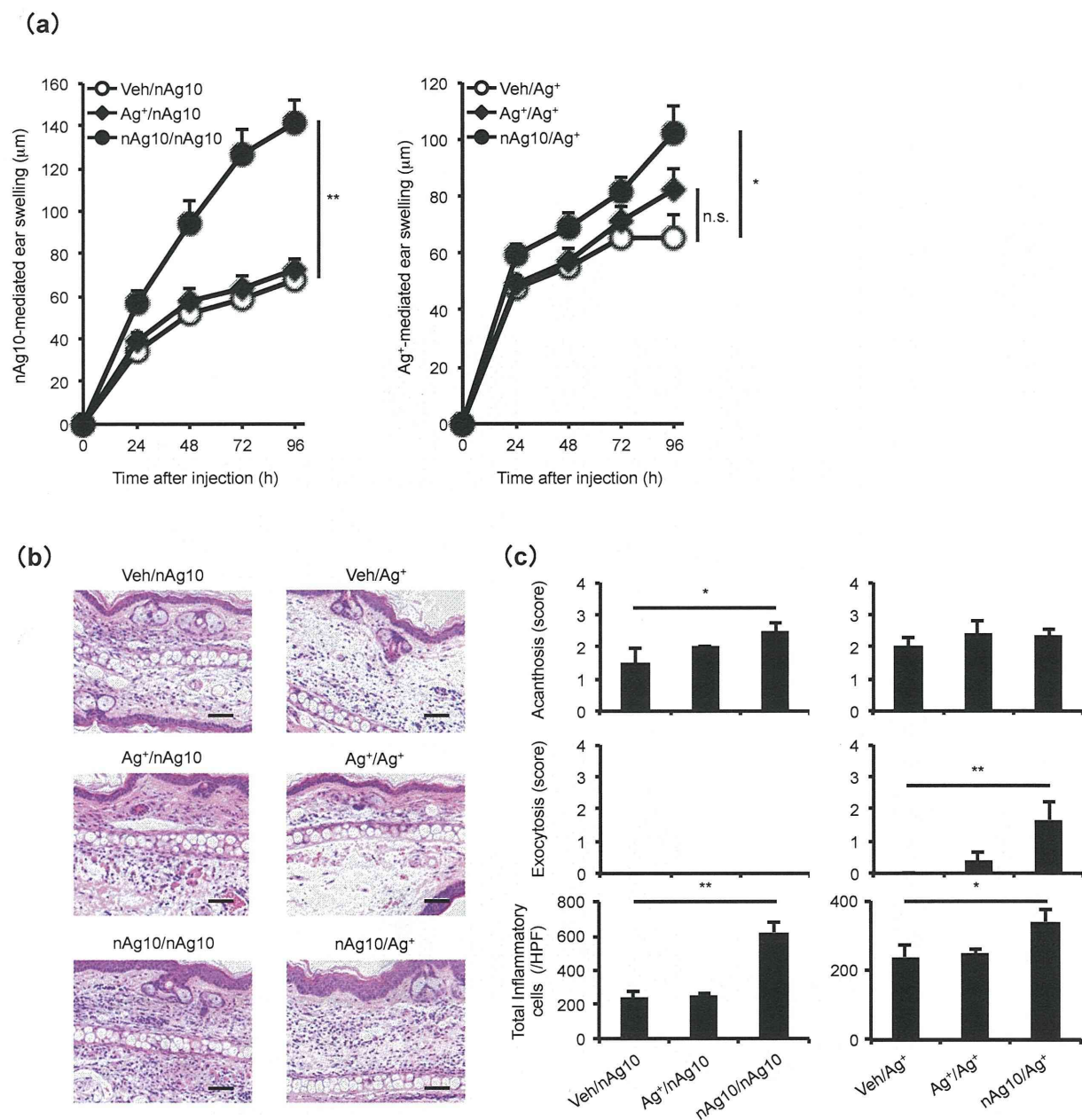
(A)



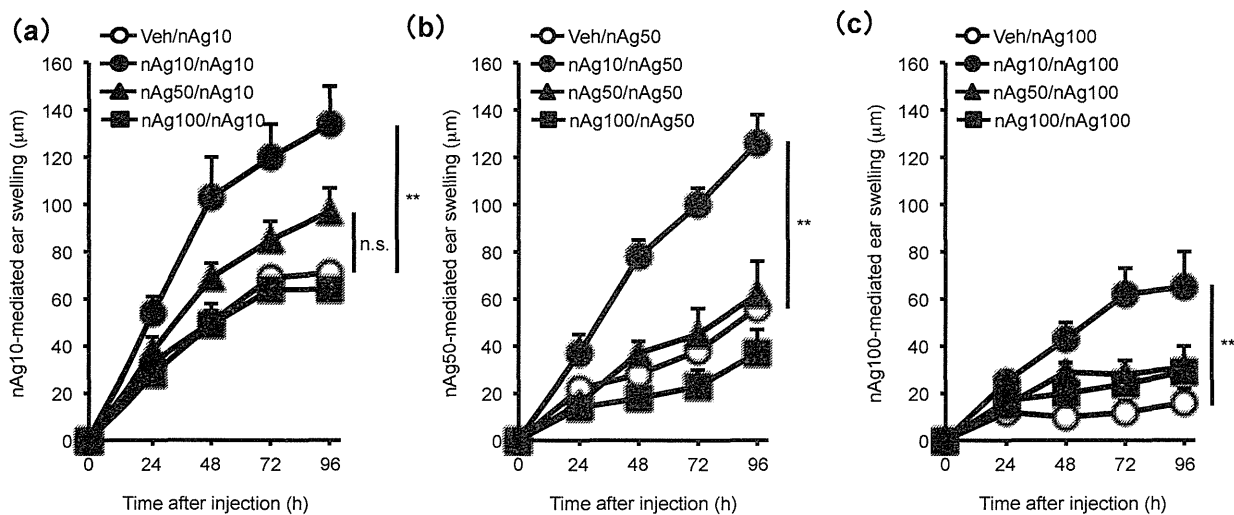
(B)



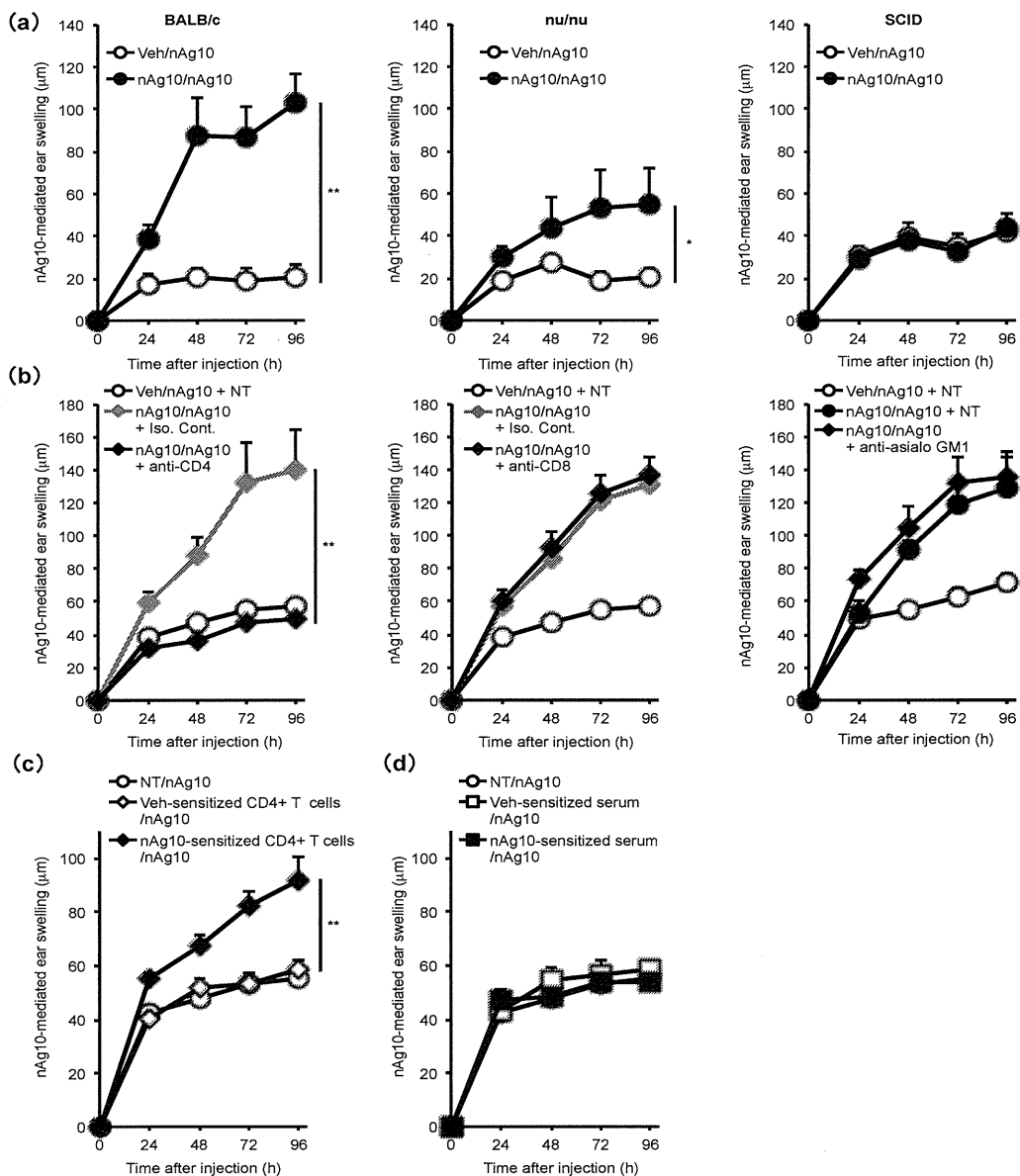
**Fig.59. 非晶質ナノシリカを腹腔投与したマウス腹水中の浸潤細胞数及びサイトカイン産生.** C57BL/6マウスに各粒子径の非晶質シリカ、結晶質シリカを1 mg/200  $\mu$ l/mouseで腹腔投与し、24時間後に腹水を回収した。(A) 腹水中の浸潤細胞数をnucleo counterによって計数した。(B) 腹水中のIL-6量をELISA法によって計測した。



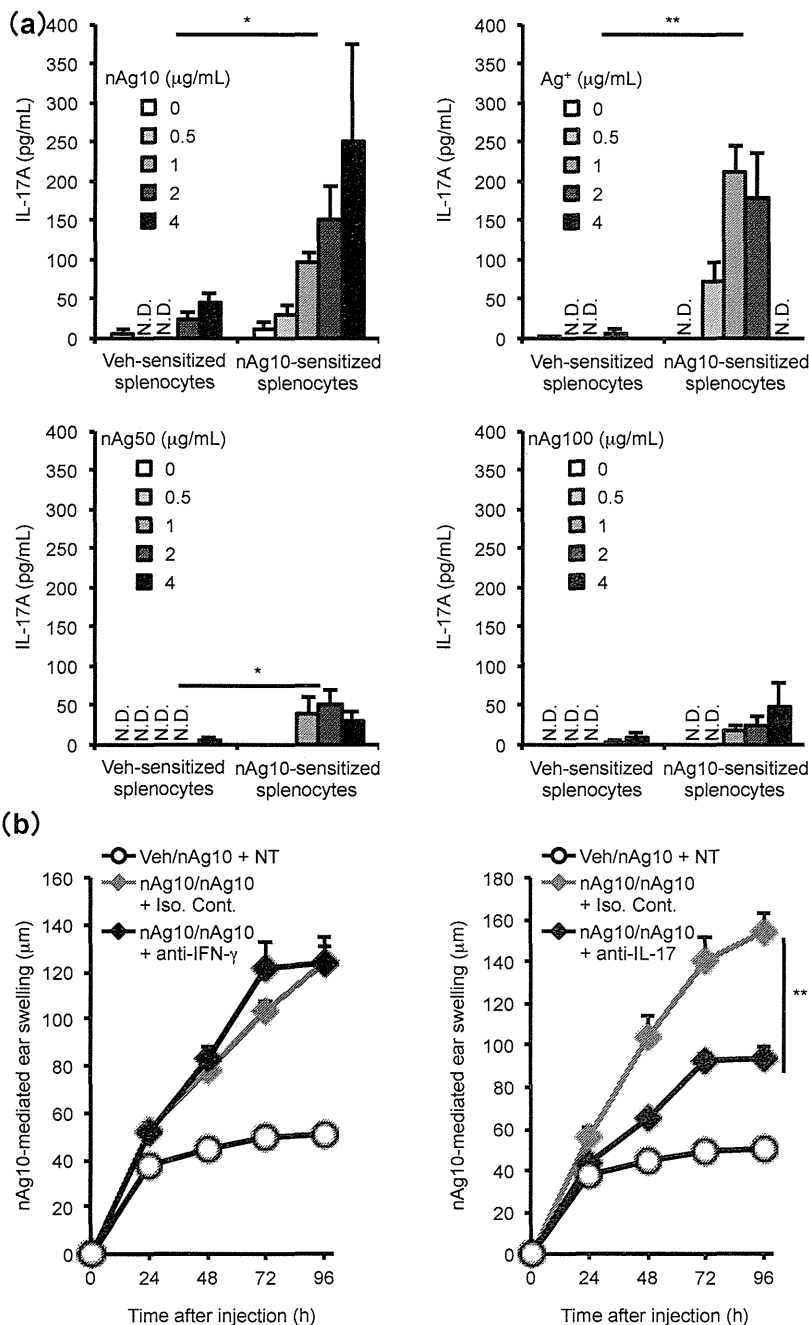
**Fig.60. 銀ナノ粒子の感作性評価.** nAg10、あるいはAg+を、マウスの足蹠に週1回、計4回投与した。最終投与の1週間後、今度は耳介にnAg10あるいはAg+を皮内投与した。(a) nAg10あるいはAg+による耳介の腫れを経時的に測定した。(b) チャレンジ投与から96時間後に耳介を回収し、HE染色による病理学的解析を実施し、所見による各項目のスコアをグラフ化した。Scale bars = 50  $\mu\text{m}$ , Data are means  $\pm$  SEMs (a; n=10-12, b; n=5-6).



**Fig.61. 粒子径の違いによる銀ナノ粒子の感作性評価.** nAg10、nAg50、あるいはnAg100を、マウスの足蹠に週1回、計4回投与した。最終投与の1週間後、今度は耳介に (a) nAg10、(b) nAg50、あるいは (c) nAg100を皮内投与し、各粒子による耳介の腫れを経時的に測定した。Data are means  $\pm$  SEMs ( $n=4-6$ ), n.s.; not significant

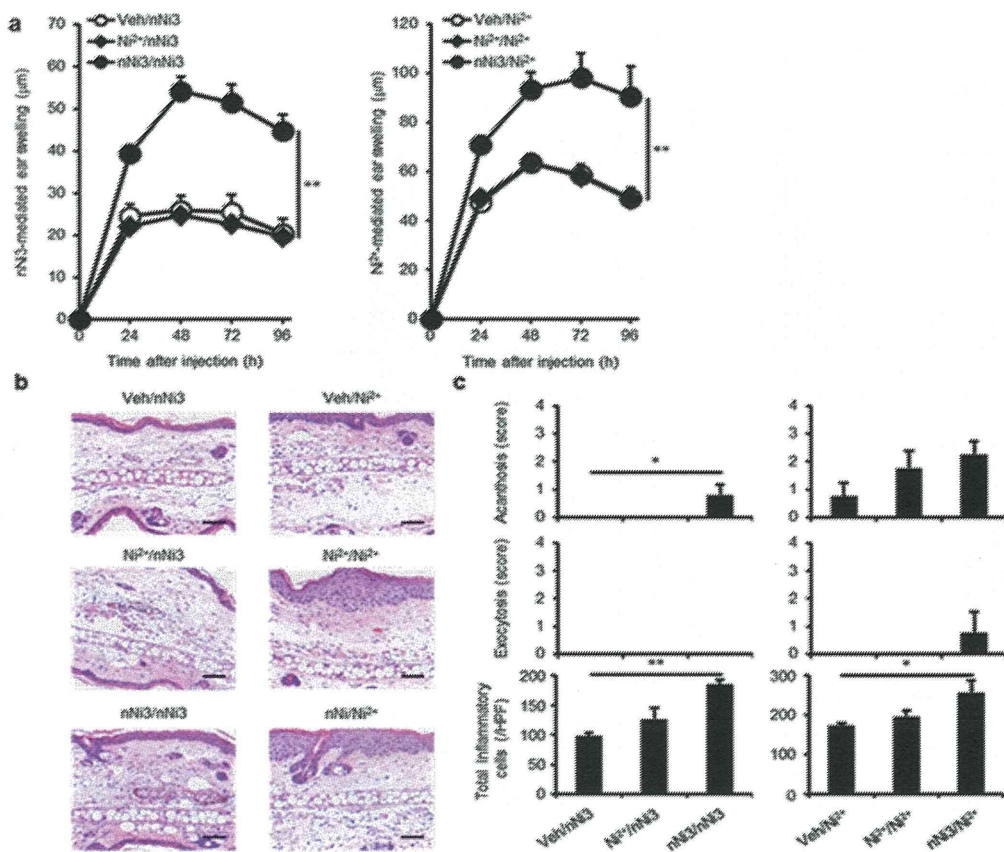


**Fig.62. 銀ナノ粒子の前投与による影響と獲得免疫応答の関連.** (a) nAg10、あるいはAg+を、BALB/c、nu/nu、あるいはSCIDマウスの足蹠に週1回、計4回投与した。最終投与の1週間後、今度は耳介にnAg10あるいはAg+を皮内投与した。nAg10あるいはAg+による耳介の腫れを経時的に測定した。(b) nAg10を4回感作投与したマウスに、最終投与の一週間後、500 µg/mouseで抗CD4中和抗体、またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG2b)、あるいは抗CD8中和抗体、またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG2a) をPBS溶媒で腹腔内投与した。抗asialo GM1ウサギ血清は50 µl/mouseで静脈内より投与した。各試薬の投与は、惹起投与の24時間前に実施した。(c) nAg10を4回感作投与したマウスの脾臓と膝下リンパ節を回収し、3-4匹分をプールして、単細胞浮遊液を調製した。CD4+T細胞は非CD4+T細胞を磁気標識後、磁気カラム内で除去することで精製した。CD4+T細胞は精製後、PBSに懸濁してすぐに、未処置のBALB/cマウスに、 $2 \times 10^7$  cells/mouseで静脈内より投与した。CD4+T細胞移入の24時間後、耳介皮内にnAg10を10 µL投与 (0.8 mg/mL) し、経時的に耳介の腫れを測定した。(d) nAg10を4回感作投与したマウスの心臓から未処理のシリンジを用いて血液を回収し、血清を回収した。血清は、2-3匹分をプールし、未処置のBALB/cマウスに、直ちに500 µL/mouseで腹腔投与した。24時間後、血清を移入されたマウスの耳介皮内へ、nAg10を10 µL投与 (0.8 mg/mL) し、経時的に耳介の腫れを測定した。Data are means  $\pm$  SEMs (n=3-6).



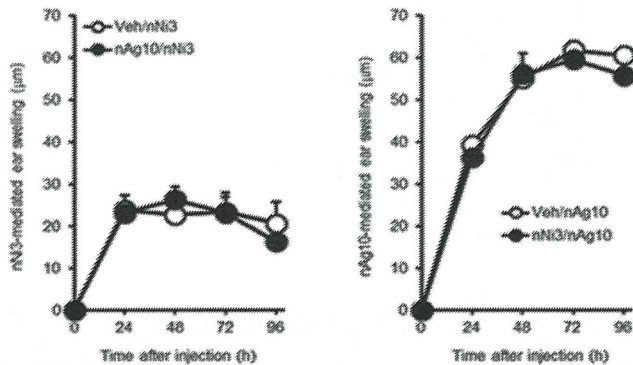
**Fig.63. 銀ナノ粒子誘導性のアレルギー病態を担う免疫応答.** nAg10、あるいはAg+を、マウスの足蹠に週1回、計4回投与した。(a) これらマウスの脾細胞を単離し、nAg10、nAg50、nAg100あるいはAg+で再刺激し、その際に産生されるIL-17A産生を評価した。(b) nAg10を4回感作投与したマウスに、最終投与の1週間後、耳介皮内にnAg10を10 μL投与 (0.8mg/mL) した。投与直後に、抗IFN-γ中和抗体またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG1) を500 μg/mouseで腹腔内へ、あるいは、抗IL-17A中和抗体、またはアイソタイプコントロール (rat IgG1) を200 μg/mouseで静脈内より投与した。その後、経時的に耳介の腫れを測定した。Data are means ± SEMs (a; n=3-6, b; n=7-10)





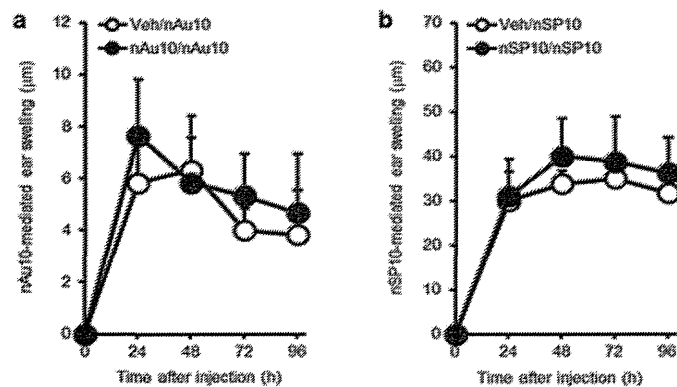
**Fig.64. nNiの感作性の評価.**

800 µl/ml nNi溶液を20 µlずつ、BALB/cマウスの足蹠に週1回4週にわたり感作投与した。最終投与1週間後にマウス左耳介部皮内に、同濃度のnNi3またはNi<sup>2+</sup>を10 µlを病態誘導のための惹起投与した。右耳介部皮内には同量の溶媒を投与した。この際のnNi3またはNi<sup>2+</sup>の惹起投与による経時的な耳介部の腫れの増強 (a)、投与4日後の病理像 (b)、また炎症性細胞浸潤数 (c) でnNi3の感作性を評価した。



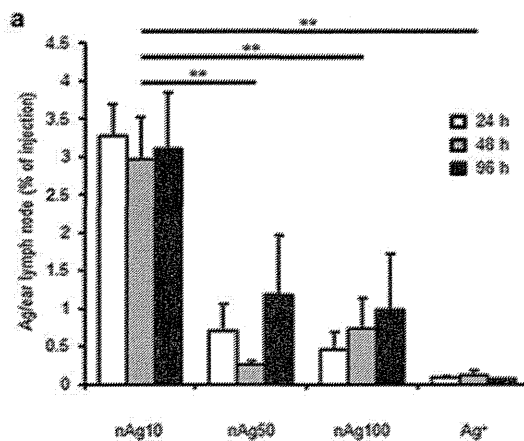
**Fig.65. nAg10とnNiの金属間交差性の評価.**

nAg溶液感作投与後、マウス左耳介部皮内にnNi3を10 µlを病態誘導のための惹起投与した。右耳介部皮内には同量の溶媒を投与した。この際のnNi3の惹起投与による経時的な耳介部の腫れの増強を指標に交差性を評価した。また、nNi3感作投与後、nAgを惹起投与した際の経時的な耳介部の腫れの増強も測定した。



**Fig.66. nAu10、nSP10の感作性の評価.**

800 µl/ml nAu10溶液もしくはnSP10を20 µlずつ、BALB/cマウスの足蹠に週1回4週にわたり感作投与した。最終投与1週間後にマウス左耳介部皮内に、同濃度のnAu10またはnSP10を10 µlを病態誘導のための惹起投与した。右耳介部皮内には同量の溶媒を投与した。この際のnAu10またはnSP10の惹起投与による経時的な耳介部の腫れ増強 (nAu10:a、nSP10:b) でそれぞれの粒子の感作性を評価した。



**Fig.67. nAg10のリンパ節移行性、滞留性の評価.**

800 µl/ml nAg10、nAg50、nAg100またはAg+溶液を10 µlずつ、BALB/cマウスの耳介部皮内に投与した。投与後24 h、48 h、96 h後に所属リンパ節を回収し、含有銀量をICP-MSにて測定した。

## ヒトインターフェースに着目したナノリスク解析基盤の構築に関する研究

研究分担者 八木 清仁 大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野

### 研究要旨

近年、酸化アルミニウムナノ粒子が脳微小血管内皮細胞層のタイトジャンクション（TJ）機能を崩壊させる、また酸化鉄ナノ粒子がヒト胎盤上皮細胞層の TJ シール機能を破壊するといったナノマテリアルの上皮バリア機能に及ぼす悪影響が報告されている。ナノマテリアルは医薬品、食品、化粧品分野において優れた機能を発揮する素材として世界的に使用量が飛躍的に増大している。したがって生体に対する影響を正確に評価する方法の確立が急務とされ、本研究においては上皮バリア機能に対するナノマテリアルのリスク解析基盤の構築を目的として、危険性を評価するためのマーカー遺伝子の同定を試みる。

生体内外・組織内外を隔てる上皮細胞層は TJ によってシールされており細胞間隙を介した物質の漏れが制限されている。TJ には 2 細胞間をシールする bicellular TJ (bTJ) と 3 細胞間をシールする tricellular TJ (tTJ) があり上皮バリアを構築している。bTJ を開口させる物質としてウェルシュ菌下痢毒素の受容体結合分子（C-CPE184）、tTJ を開口させる物質としてウェルシュ菌イオタ毒素受容体結合分子（Ib421-664）を用い、C-CPE あるいは Ib421-664 を上皮細胞層に添加した時、発現変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ技術により網羅的に解析した。平成 25 年度は C-CPE184、Ib421-664 を 12 時間処理後に 2 倍以上発現量が変動する遺伝子を抽出した。平成 26 年度はさらに 24 時間後も大きく変動する遺伝子をクラスター分けにより絞り込み、パスウェイ解析などによりマーカー遺伝子候補となるものを絞り込んだ。平成 27 年度は C-CPE 添加でコレステロール生合成系遺伝子群が一斉に発現低下することに着目し、ナノマテリアルの安全性評価のマーカー遺伝子として用いることができるか否か、ナノシリカ粒子を使用して検討を行った。

### A. 研究目的

近年、ナノテクノロジーは、今世紀における重要案件である地球温暖化、生物多様性保持などの環境・エネルギー問題、また高齢化社会で必要とされる医薬品分野の他、食品分野、化粧品分野へ向けて技術革新に資する大きな期待が寄せられている。

このように、あらゆる分野で利用されているナノテクノロジーにおいて中核を成しているのがナノマテリアルである。ナノマテリアルは ISO（国際標準化委員会）により、「少なくとも 1 次元の

大きさが 100 nm 以下に人工的に制御された素材」として定義され、従来までのサブミクロンサイズの素材に比して、粒子径の微小化に伴う組織浸透性や表面積の劇的増加により、電気・磁気・光学的特性や組織浸透性などが飛躍的に向上する。そのため、これら特有の機能を活かし既に食品・医薬品・化粧品などの領域で様々な改善が施された製品が流通し、ナノマテリアルの使用量・利用範囲共に世界的に広がり続けている。

最近、ナノ粒子が上皮細胞層のタイトジャンクション（TJ）を破壊するという報告がなされ、生体

の上皮バリアに与える悪影響が懸念されている。生体内外・組織内外を隔てる上皮細胞層は TJ によってシールされており細胞間隙を介した物質の漏れが制限されている。

TJ には2細胞間をシールする bicellular TJ (bTJ) と3細胞間をシールする tricellular TJ (tTJ)があり上皮バリアを構築している。TJ が何らかの原因で崩壊すると異物や抗原となる物質が透過し炎症性疾患を引き起こすことになる。上述のように食品、医薬品、化粧品に使用されているナノ粒子が上皮バリアを破壊すれば重篤な疾病につながる可能性がある。したがって上皮バリアに対するリスクを解析することはナノマテリアルの安全な使用において重要であると考えられる。

本研究においてはナノマテリアルの安全性評価に使用できるマーカー遺伝子の同定を目的として、bTJ と tTJ に作用し TJ を開口させる物質を用い、TJ が開口した時に発現が変動する遺伝子を網羅的に解析した。

## B. 研究方法

### 1. TJ binder の作製

ウェルシュ菌下痢毒素 (CPE) の C 末端側に存在する受容体結合部位 (C-CPE184) を bTJ binder として用いた。ネガティブコントロールとして受容体結合能が非常に低下した変異体 (C-CPE<sub>Y/L</sub>) を用いた。C-CPE184 および C-CPE<sub>Y/L</sub> は GST 融合蛋白質として大腸菌株 BL21 (DE3) で発現させた。まず、pGEX-C-CPE184 または pGEX-C-CPE<sub>Y/L</sub> プラスミドを BL21 に導入し、100 mL の LB (+amp) 液体培地で一晩振盪培養した。翌日、small culture を 1 L の TB (+amp) 液体培地に加え、IPTG を終濃度 1 mM で用いて発現誘導した。次に、増幅した大腸菌を集菌し、STE buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) で懸濁後、ソニケーションにより菌体を破壊した。菌体抽出物は Glutathione Sepharose 4B カラム (GE Healthcare) に添加し、GST-C-CPE184 また

は GST-C-CPE<sub>Y/L</sub> をカラムに結合させた。STE buffer を用いてカラムを丁寧に洗浄した後、Thrombin で GST を切断した。Thrombin は Benzamidine Sepharose 6B カラム (GE Healthcare) で除去し、C-CPE184 または C-CPE<sub>Y/L</sub> は PD-10 カラム (GE Healthcare) を用いて PBS にバッファー置換した。精製した C-CPE184 または C-CPE<sub>Y/L</sub> の濃度は BCA protein assay kit (Pierce Chemical) を用いて測定し、純度は SDS-PAGE により確認した。

ウェルシュ菌イオタ毒素 b (Ib) の C 末端側に存在する受容体結合部位 (Ib421-664) を tTJ binder として用いた。Ib421-664 は GST 融合蛋白質として大腸菌株 BL21 (DE3) で発現させた。まず、pGEX-Ib421-664 プラスミドを BL21 に導入し、200 mL の TB(+amp) 液体培地で一晩振盪培養した。翌日、small culture を 2 L の TB (+amp) 液体培地に加え、IPTG を終濃度 1 mM で用いて発現誘導した。次に、増幅した大腸菌を集菌し、BufferF (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) で懸濁後、ソニケーションにより菌体を破壊した。菌体抽出物は Glutathione Sepharose 4B カラム (GE Healthcare) に添加し、GST-Ib421-664 をカラムに結合させた。BufferF を用いてカラムを丁寧に洗浄した後、Thrombin で GST を切断した。Thrombin は Benzamidine Sepharose 6B カラム (GE Healthcare) で除去し、Ib421-664 は PD-10 カラム (GE Healthcare) を用いて PBS にバッファー置換した。精製した Ib421-664 の濃度は BCA protein assay kit (Pierce Chemical) を用いて測定し、純度は SDS-PAGE により確認した。

### 2. 膜電気抵抗値 (TEER) の測定

EpH4 細胞を 12 well transwell insert (Corning) に  $1 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup> で播種し、1 日毎に経上皮膜電気抵抗値 (Trans epithelial electric resistance : TEER) を Millicell ERS (Millipore)