

201524010A

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27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28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 1 2

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 2 3

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 3 4

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

. 4 0

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] 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、OVA 経皮感作の際に酸化チタンナノマテリアルを共存させると感作が増強されること、またその際に、至適用量（OVA との最適な量比）が存在すること、この至適用量は酸化チタンのサイズにより異なることが示された。

[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、THP-1 細胞より分化した樹状細胞様細胞に、ナノマテリアルによるマクロファージのインフラマソーム活性化によって産生される炎症性サイトカインを含む培地を添加する新たな評価法について検討を行った。その結果、炎症性サイトカインを含む培養上清により抗原提示細胞の HLA-DR、CD86、CD54 の発現量が増大することを示した。

[III] アジュバント活性の *in vitro* 評価手法の検討を行い、マクロファージ系培養細胞において、酸化チタン粒子が濃度ならびに NLRP3 依存的な TNF α 分泌促進活性を有することを示した。IL-6 産生促進も認められた。一方ケラチノサイトにおいては、NLRP3 発現が著しく低く、IL-1 系サイトカイン産生応答は全く認められなかった。

今後、それぞれの検討項目において、ナノマテリアルの効果のメカニズムや、異なる種類のナノマテリアルの影響等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
生活衛生化学部 室長

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。

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。

26 年度は、抗原の腹腔内投与による感作において、酸化チタンが、水酸化アルミニウムゲル (Alum) と同様に感作を増強する (アジュバント作用を有する) こと、及び、抗原の経皮感作において、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すること、抗原とナノマテリアルとの同時共存における抗原提示細胞の免疫応答の詳細、3 種の酸化チタンを THP1 マクロファージに曝露し NLRP3 インフラマソームを介する濃度依存的な IL-1 β 産生促進が見られること、粒子径の小さな酸化チタンでは、貪食によらない活性化を示唆する知見等を示した。

27 年度は、実験条件を最適化による酸化チタンが抗原経皮感作に与える影響についてのより詳細な検討、ナノマテリアルによるインフラマソーム活性化によってマクロファージから産生される炎症性サイトカインが抗原提示細胞の活性化に及ぼす影響についての検討、マクロファージからの他の炎症性サイトカイン産生を促進する可能性や表皮ケラチノサイトにおいて IL-1 系炎症性サイトカイン産生を促進する可能性についての検討等を行った。

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 μm , 径 150 nm) である。サイトカイン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。酸化アルミニウムゲル Alum (免疫グレートアダジュバント用) 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 (hIL-4; PeproTech 200) は試薬標準品を購入した。その他の試薬は特級グレードのものを用いた。

ナノマテリアル等の懸濁液調製

3種の酸化チタンは PBS に 50mg/mL の濃度に懸濁し、3-4 分間バス型超音波発生装置での処理・vortex を 3 回繰り返し、ピペッティング、25G シリンジ通過により分散した。Alum は 0.9%NaCl 溶液に 20mg/mL に懸濁された製品を解凍後 vortex し使用した。MWCNT-SD1 は 0.5%Tween 20 を含む PBS に 5 mg/mL の濃度で懸濁し、1~5 分間バス型超音波発生装置での処理、ピペッティング、25G シリンジ通過により分散した。

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、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。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「トリー」(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 μL 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 μL 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、既報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。

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。

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 μM 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、引き続き上記の酸化チタン、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。

マクロファージ様細胞 (THP-1-M ϕ) より産生される炎症性サイトカイン類の調製

THP-1 細胞は、0.3 μ M PMA と 10% FBS を含む RPMI1640 培地中で 37°C, 5% CO₂ の条件下 72 時間培養してマクロファージ様細胞 (THP-1-M ϕ 細胞) に分化させた。PMA を除去した培地中で 24 時間培養した後に、微粒子酸化チタン (100 μ g/mL) を培地に添加して 6 時間培養しインフラマソーム活性化によって産生される炎症性サイトカイン類を含む培養上清を得た。培養上清は無菌条件下遠心分離によって酸化チタンを除去して以降の実験に供した。

樹状細胞様細胞 (THP-1-DC 細胞) の抗原刺激

酸化チタンで処理した THP-1-M ϕ 細胞より産生される炎症性サイトカイン類を含む培養上清に OVA を 1.0 mg/mL の終濃度で添加し、THP-1-DC 細胞の培養プレートに加えて 37°C, 5% CO₂ の条件下 72 時間培養し抗原提示を行った。

フローサイトメトリーを用いた抗原提示細胞の活性化の解析

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、トリプシン/EDTA による細胞表面抗原の損傷を回避する目的でセルスクレイパーを用いた。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。抗原提示細胞の活性化マーカーとして、細胞表面上の HLA-DR (ヒト主要組織適合遺伝子複合体クラス II), CD86 (共刺激分子; B7) 及び CD54 (接着分子; ICAM-1) の発現量についてフリーサイトメトリーを用いて定量的に解析した。

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

mRNA は定量的リアルタイム RT-PCR により測定した。細胞から RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出し、DNase 処理を行い、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) を用いて ABI Prism 7300 で測定した。発現量データは 18S rRNA の量で補正した。

ケラチノサイトからのサイトカイン放出の測定

ケラチノサイト (ヒト新生児表皮由来) は凍結品を購入し、増殖培地 (クラボウ) で 6 日間コンフルエントまで培養し、増殖培地 (増殖因子入り、G+) あるいは 0.01% アルコルビン酸 0.2% BSA を含む DMEM-F12 (増殖因子無し、G-) でさらに 24 時間培養した。ナノマテリアル曝露は増殖因子無しの培地に添加し、6 時間曝露した。培地上清を回収し、サイトカインを測定した。

統計解析

動物試験のデータは Microsoft Excel により集計し、V 群あるいは OVA 群を基準とした

Dunnett の検定を行い、 $p < 0.05$ 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) 及び FCS Express 5 (デノボソフトウェア社) 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)

本研究における動物実験は、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。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。

C. 研究結果

II] 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。26年度は、モデル抗原である OVA $20 \mu\text{g}$ をマウス皮膚に貼付して経皮感作を行った場合、酸化チタン A (1.25mg) の共存により抗原特異的抗体の産生が増大することを示した。この結果を受け、27年度は、OVA 貼付量を一定 ($1\text{-}2 \mu\text{g}$) にし、酸化チタン量を 12.5ng ~ 1.25mg まで変化させた場合の共存効果について検討した。

【実験 1】酸化チタン C の共存効果

OVA2 群 (OVA $2 \mu\text{g}$ のみ貼付群) では、IgG1 は V 群と比較して有意に増大し、IgE はわずかに増大する傾向が見られた。酸化チタン C を共存させた場合、IgE に関しては、TiO₂ 125ng 群 (OVA $2 \mu\text{g}$ 貼付時に酸化チタン C 125ng を共存させた群)、及び TiO₂ 12.5ng 群において、OVA2 群と比較して有意な増大が見られた。IgG1 に関しては、同じく TiO₂ 125ng 群、及び TiO₂ 12.5ng 群において、OVA 群と比較して増大する傾向が見られた。なお、IgG2a に関しては、どの群においても V 群と比較して大きな増大は見られなかった。

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。惹起 30 分後、OVA2 群では V 群と比較して直腸温が平均 1.4°C 低下していた。TiO₂ 125ng 群では、OVA2 群よりもさらに平均 2.0°C 低下しており、OVA2 群と比較して有意な差が見られた。また、OVA2 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度が増大する傾向が見られた。TiO₂ 125ng 群では OVA2 群と比較して血清中ヒスタミン濃度がさらに有意に増大していた。また OVA2 群では V 群と比較して有意なアナフィラキシースコアの増大がみられた。TiO₂ 125ng 群では OVA2 群と比較してアナフィラキシースコアがさらに有意に増大していた。これらの結果から、OVA $2 \mu\text{g}$ を貼付して経皮感作を行う際に、酸化チタン C を 125ng 共存させた場合、抗原特異的抗体の産生が有意に増大すること、及び、その後の抗原腹腔内投与によりアナフィラキシー反応 (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スコア) も有意に増大することが示された。他の用量の酸化チタン C を用いた場合にはこのような明確な効果は見ら

れなかった。

【実験 2】酸化チタン A の共存効果

OVA1 群 (OVA 1 μg のみ貼付群) では、IgE、IgG1 とともに V 群に対する有意な増大は見られなかった。酸化チタン A を共存させた場合、TiO₂ 125 μg 群、TiO₂ 12.5 μg 群、TiO₂ 1.25 μg 群、TiO₂ 12.5ng 群において、IgE、IgG1 の産生が OVA1 群と比較して増大する傾向が見られた。なお、IgG2a に関しては、どの群においても V 群と比較して有意な増大は見られなかった。

続いて、抗原の腹腔内投与によるアナフィラキシー反応の惹起を行った。実験 1 と同様に、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い、また、惹起 30 分後の血清中のヒスタミン濃度を測定した。30 分後、OVA1 群では V 群と比較して平均 0.4°C 低下したが、有意な差は見られなかった。TiO₂ 12.5 μg 群では OVA1 群と比較して平均 1.7°C 低く、有意な差が見られた。また、TiO₂ 125 μg 群、及び TiO₂ 1.25 μg 群でも OVA1 群と比較して直腸温が低下する傾向が見られた。また、OVA1 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度がやや増大する傾向が見られた。TiO₂ 12.5 μg 群、及び TiO₂ 1.25 μg 群では OVA 群と比較して血清中ヒスタミン濃度がさらに増大する傾向が見られた。また、OVA1 群では V 群と比較してアナフィラキシースコアがやや増大する傾向が見られた。TiO₂ 12.5 μg 群では、OVA1 群と比較して大きくスコアが増大し、OVA1 群との間に有意な差が見られた。また、TiO₂ 125 μg 群、及び TiO₂ 1.25 μg 群でも OVA1 群と比較してスコアが増大する傾向が見られた。これらの結果から、OVA 1 μg を貼付して経皮感作を行う際に、酸化チタン A を 12.5 μg 共存させた場合、抗原特異的抗体の産生が増大する傾向が見られ、その後の抗原腹腔内投与によりアナフィラキシー反応も有意に増大することが示された。また、TiO₂

125 μg 群、及び TiO₂ 1.25 μg 群でも、抗原特異的抗体産生やアナフィラキシー反応が増大する傾向がみられた。他の用量の酸化チタン A を用いた場合にはこのような効果は見られなかった。

【実験 3】酸化チタン B の共存効果

OVA2 群では、IgE、IgG1 とともに V 群と比較して増大する傾向が見られた。酸化チタン B を共存させた場合、どの TiO₂ 群においても OVA2 群との間に差は見られなかった。なお、IgG2a に関しては、どの群においても V 群と比較して有意な増大は見られなかった。

続いて、抗原の腹腔内投与によるアナフィラキシー反応の惹起を行った。実験 1、2 と同様に、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い、また、惹起 30 分後の血清中のヒスタミン濃度を測定した。30 分後、OVA2 群では V 群と比較して直腸温が平均 1.5°C 低下していた。TiO₂ 125 μg 群、TiO₂ 12.5 μg 群、TiO₂ 1.25 μg 群、TiO₂ 125ng 群、TiO₂ 12.5ng 群でも直腸温は低下したが、OVA2 群との間に有意差は見られなかった。また、OVA2 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度が増大していた。TiO₂ 125 μg 群、TiO₂ 12.5 μg 群、TiO₂ 1.25 μg 群、TiO₂ 125ng 群、TiO₂ 12.5ng 群でもヒスタミン濃度の増大が見られたが、OVA2 群との間に有意差は見られなかった。また、OVA2 群ではアナフィラキシースコアが大きく増大し、V 群との間に有意差が見られた。TiO₂ 125 μg 群、TiO₂ 12.5 μg 群、TiO₂ 1.25 μg 群、TiO₂ 125ng 群、TiO₂ 12.5ng 群でもスコアが増大したが、OVA2 群との間に有意差は見られなかった。

【II】 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

THP-1-M ϕ 細胞より産生される IL-1 β の定量

THP-1-M ϕ 細胞及び THP-1-DC 細胞培養系に微粒子酸化チタンを添加し、インフラマソーム活性化によって培地中に産生される IL-1 β について Bio-Plex マルチプレックスアッセイ (BIO-RAD 社) で定量した。その結果、微粒子酸化チタンは THP-1-M ϕ 細胞は濃度依存的に IL-1 β 産生を促進したが、THP-1-DC 細胞に対しては IL-1 β 産生を誘導しなかった。

THP-1-DC 細胞の抗原提示における培地中炎症性サイトカインの影響

これまでの研究において、THP-1-DC 細胞の抗原提示能を評価するための抗原添加濃度、抗原添加時間を詳細に検討し、OVA 濃度: 1 mg/mL、培養時間: 72 時間が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 (共刺激分子)] の発現量解析の至適条件であることを示した。本年度は上記 2 種の細胞表面抗原に加え、IL-1 β 等の炎症性サイトカインによって誘導される接着分子の一つである CD54 (ICAM-1) の発現量についても合わせて解析した。

3.1 HLA-DR (MHC クラス II 分子) の発現量解析

HLA-DR (MHC クラス II 分子) の発現について、抗原添加時に培地中 THP-1-M ϕ 細胞由来の炎症性サイトカインの影響は認められなかったが、抗原未添加時には THP-1-M ϕ 細胞由来の炎症性サイトカインによって発現量が 1.62 倍に増加した。

3.2 CD86 (共刺激分子) の発現量解析

CD86 (共刺激分子) の発現について、抗原添加の有無にかかわらず、培地中 THP-1-M ϕ 細胞由来の炎症性サイトカインによって発現量が 1.26 倍 (抗原未添加)、1.11 倍 (抗原添加時) に増加した。

3.3 CD54 (ICAM-1) の発現量解析

CD54 (ICAM-1) の発現について、抗原添加時

に培地中 THP-1-M ϕ 細胞由来の炎症性サイトカインの影響は認められなかったが、抗原未添加時には THP-1-M ϕ 細胞由来の炎症性サイトカインによって発現量が 1.72 倍に増加した。

III] 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

酸化チタンナノマテリアルはマクロファージ系細胞からの TNF α 産生を促進する

昨年度の研究において、3 種類の酸化チタンナノマテリアル A,B および C を THP1 マクロファージに曝露すると、濃度依存的に IL-1 β 産生を促進すること、その効果は ALUM とほぼ同定程度であり、NLRP3 インフラマソームを介することを明らかにしている。

今年度は他の炎症性サイトカインに及ぼす影響を検討した。TNF α 産生促進は、酸化チタンナノマテリアル (A~C)、ALUM のいずれによっても濃度 (50~125 μ g/mL) 依存的な効果が認められた。また酸化チタンナノマテリアル (A~C) (50~250 μ g/mL) については IL-6 産生の促進を確認した。IL-6 産生については粒子径が大きいほど効果がより強力である傾向が認められた。

酸化チタンナノマテリアルは NLRP3-caspase1 を介して TNF α 産生を促進する

酸化チタンナノマテリアル (A~C) および Alum の TNF α 産生効果は、細胞の NLRP3 を特異的 siRNA で処理し、NLRP3 をノックダウンすると、ほぼ完全に抑制された。また、caspase1 阻害剤 z-YVAD-fmk によっても完全な抑制が認められた。

酸化チタンナノマテリアルによる TNF α 産生に対する貪食阻害剤の影響は粒子により異なる

THP1 マクロファージの貪食作用を阻害剤

cytochalacin D (Cyt D) で抑制すると、多層カーボンナノチューブ MWCNT-SD1 による TNF α 産生促進は 0.2 μ M Cyt D でほぼ完全に抑制された。一方、酸化チタンナノマテリアル (A~C) による TNF α 産生は 0.2 μ M Cyt D では全く影響されなかった。Cyt D を 1 μ M に上昇させると、酸化チタン A および B による産生は 60~50%抑制されたが、酸化チタン C では全く影響されず、食食阻害剤の効果は粒子により異なることが判明した。Alum による産生誘導は、濃度に応じて 60-90%抑制された。

表皮角化細胞を用いた評価手法の検討

培養ヒト角化細胞を用いて IL-1 β および IL-1 α の分泌誘導効果を検討したところ、酸化チタン粒子 A, B および C は全く効果を示さなかった。マクロファージでは強力な効果を示す多層カーボンナノチューブ MWCNT-SD1 の曝露、あるいは NLRP3 インフラマソームを直接活性化する nigericin (3.4 μ M) あるいは ATP (3mM) を培地に添加した場合も、全く効果が認められなかった。

そこで角化細胞の NLRP3、IL-1 β および caspase-1 の mRNA 発現量を測定したところ、NLRP3 および IL-1 β の発現は増殖因子により低下していた。NLRP3 の発現量は、増殖因子無しでも THP-1 マクロファージの 0.1%以下であり、著しく低いことが判明した。一方、caspase-1 の発現量は THP-1 の 220~300%に相当し、IL-1 β では 20~40%であった。

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、[I] 動物モデルを用いる in vivo 評価手法に関する検討、[II] 抗原提示細胞の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。

[I]に関しては、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) を用いた。26年度は、抗原の腹腔内投与による感作において、酸化チタンが、水酸化アルミニウムゲル (Alum) と同様に感作を増強する (アジュバント作用を有する) こと、及び、抗原の経皮感作において、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することを示した。26年度の経皮感作実験では OVA 100 μ g、50 μ g、20 μ g を用いたが、抗体産生やアナフィラキシー反応がかなり強く、これらに対する促進効果を検討するためには OVA 量が多すぎるものと考えられた。そこで、27年度は、貼付する OVA 量を少なくし、酸化チタンの効果をより観察しやすい実験系とした。3種の酸化チタン (A、B、C) について、OVA 貼付量を一定 (1-2 μ g) にし、酸化チタン量を 12.5ng ~1.25mg まで変化させた場合の共存効果について検討した。最もサイズが小さい酸化チタン C (粒子径 : 6 nm) では、TiO₂ 125ng 群において抗原特異的抗体産生、及びその後の抗原の腹腔内投与によるアナフィラキシー反応が顕著に増大し、OVA2 群との間に有意な差が見られた。(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。) 中間のサイズの酸化チタン A (粒子径 : 15 nm) では、TiO₂ 12.5 μ g 群において、抗原特異的抗体産生、及びアナフィラキシー反応が増大し、一部で OVA1 群との間に有意差が見られた。最もサイズが大きい酸化チタン B (粒子径 : 35 nm) では、酸化チタン C や A のような促進効果は見られなかった。これらの結果から、OVA 経皮感作の際に酸化チタンナノマテリアルを共存させると感作が増強されること、またその際に、至適用量 (OVA との最

適な量比)が存在すること、この至適用量は酸化チタンのサイズにより異なることが示された。

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。28年度以降は、これまでに得られた結果を受け、本評価系の重要なポイントである、タンパク質経皮感作の際に生体内で起きている現象、及びこの現象に対する酸化チタンの影響、また、ナノマテリアルの種類によって経皮感作への影響がどのように変わるのかといった点等について検討を進める予定である。

[II]に関して、免疫学的にマクロファージと樹状細胞の抗原提示スキームは同様であるが、その作用はマクロファージの方が弱く、樹状細胞の方がはるかに強い。また、THP-1-DC細胞は72時間以内にMHCクラスII分子及び共刺激分子の発現量の上昇が認められることから、THP-1-DC細胞を用いた *in vitro* における抗原提示活性化の評価系は汎用性が高い(酒井信夫:平成26年度分担研究報告「ナノマテリアルの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」)。また、ナノマテリアルのアジュバント活性として、水酸化アルミニウムゲルと同様に微粒子酸化チタンがマクロファージ様細胞由来のIL-1 β の産生を促進することが共同研究者より報告されている(最上知子:平成26年度分担研究報告「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」)。そこで27年度の本分担研究は、

微粒子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の中の抗原提示に及ぼす影響について *in vitro* 評価系を構築することを主たる目的とし、同一基原のTHP-1細胞株より異なる条件で分化した樹状細胞様細胞及びマクロファージ様細胞を用い、ナノマテリアルによるインフラマソーム活性化によってTHP-1-M ϕ 細胞から産生される炎症性サイトカインがTHP-1-DC細胞の抗原提示に及ぼす影響について解析した。

抗原提示の主要な活性化マーカーであるHLA-DR(MHCクラスII分子)の発現量を解析したところ、抗原添加時にTHP-1-M ϕ 細胞由来の炎症性サイトカインの影響は認められなかったが、抗原未添加時にはTHP-1-M ϕ 細胞由来の炎症性サイトカインによって発現量が有意に増加した。他方、抗原提示細胞の活性化によって発現するMHCクラスII分子に付随する共刺激分子について解析を行ったところ、抗原添加の有無にかかわらず、培地中THP-1-M ϕ 細胞由来のサイトカインによって発現量が有意に増加した。

前年までの分担研究において、抗原とナノマテリアルとの同時共存における抗原提示細胞の免疫応答の詳細を明らかにしてきた。今年度に検討した *in vitro* 評価系は、抗原提示における炎症性サイトカインの役割に着目した免疫担当細胞間の相互作用をモデル化したものである。次年度は、所期の研究計画である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系の構築と併せ、抗原提示活性化因子について詳細に検討する。

[III]に関して、昨年度までの研究において、THP-1マクロファージを用い、一般的なアジュバントであるAlumがNLRP3依存的にIL-1 β を産生する応答を評価する系を確立し、3種類の酸化チタンナノマテリアルがいずれも、NLRP3依存的に濃度に応じたIL-1 β 産生を促進することを明らかにした。

今年度は引き続き他の炎症性サイトカイン産生への影響について検討し、Alum および酸化チタンは、THP-1 マクロファージにおいて TNF α ならびに IL-6 の分泌も促進することを示した。TNF α 分泌応答も NLRP3 インフラマソームに依存していた。この結果は、ナノマテリアルが直接に TLR 経路を活性化するよりは、NLRP3 活性化を介して産生された IL-1 系サイトカインが autocrine により二次的応答を誘導した可能性が高いと推定され、獲得免疫誘導における NLRP3 の重要性を支持するものと考えられる。

また IL-1 β と同様 TNF α 分泌応答においても、食食阻害剤の影響は酸化チタン粒子により異なっていた。サイズが小さい酸化チタン C は阻害剤に全く影響されないことから、食食されずに細胞膜を透過して NLRP3 インフラマソームを活性化した可能性が示唆される。

経皮曝露において、サイズが小さい酸化チタン粒子は表皮ケラチノサイトに直接侵入し、インフラマソームを活性化する可能性が示唆される。そこで、培養ヒトケラチノサイトを用いて IL-1 β ならびに IL-1 α 分泌への影響を検討した。しかしながら、酸化チタン A~C のみならず、マクロファージでは強力な NLRP3 活性化を引き起こす多層カーボンナノチューブ MWCNT-SD1、細胞外への K⁺流出により直接 NLRP3 を活性化する ATP や nigercin のいずれを曝露した場合でも、全く応答が認められなかった。これはケラチノサイトでは、THP1 細胞に比較し、インフラマソーム構成成分 caspase-1 や IL-1 β の発現はほぼ同程度であったが、NLRP3 の発現が 0.1% 以下と著しく低いことが原因と考えている。表皮ケラチノサイトの NLRP3 インフラマソームは、UV 照射等により誘導されることが報告されていることから、ケラチノサイトを用いる際には IL-1 β 前駆体やインフラマソーム構成成分を発現誘導する過程 “priming” が必要と考えられ、今後、条件の検討を行う予定である。

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] 抗原提示細胞の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* 評価系を用いて検討を行った。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、OVA 経皮感作の際に酸化チタンナノマテリアルを共存させると感作が増強されること、またその際に、至適用量 (OVA との最適な量比) が存在すること、この至適用量は酸化チタンのサイズにより異なることが示された。

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* 評価法として、THP-1 細胞より分化した樹状細胞様細胞に、ナノマテリアルによるマクロファージのインフラマソーム活性化によって産生される炎症性サイトカインを含む培地を添加する新たな評価法について検討を行った。抗原未添加時において、炎症性サイトカインを含む培養上清により抗原提示細胞の HLA-DR、CD86、CD54 の発現量が、また、抗原添加時には CD86 の発現量が増大した。

アジュバント活性の *in vitro* 評価手法の検討を行い、マクロファージ系培養細胞において、酸化チタン粒子が濃度ならびに NLRP3 依存的な TNF α 分泌促進活性を有することを示した。IL-6 産生促進も認められた。一方ケラチノサイトにおいては、NLRP3 発現が著しく低く、IL-1

系サイトカイン産生応答は全く認められなかった。

今後、それぞれの検討項目において、ナノマテリアルの効果のメカニズムや、異なる種類のナノマテリアルの影響等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

なし

2. 学会発表

安達玲子、木村美恵、酒井信夫、最上（西巻）知子 タンパク質経皮感作に対する酸化チタンナノマテリアルの影響
日本薬学会第 136 年会

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 27 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 生活衛生化学部 室長
為広 紀正 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、抗原の腹腔内投与による感作において、酸化チタンが、水酸化アルミニウムゲル（Alum）と同様に感作を増強する（アジュバント作用を有する）こと、及び、抗原の経皮感作において、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することを示した。これらの結果を受け、27 年度は、実験条件を最適化し、酸化チタンが抗原経皮感作に与える影響についてより詳細な検討を行った。その結果、OVA 経皮感作の際に酸化チタンナノマテリアルを共存させると感作が増強されること、またその際に、至適用量（OVA との最適な量比）が存在すること、この至適用量は酸化チタンのサイズにより異なることが示された。今後、酸化チタンの効果が現れるメカニズムや、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。26年度は、抗原の腹腔内投与による感作において、酸化チタンが、水酸化アルミニウムゲル (Alum) と同様に感作を増強する (アジュバント作用を有する) こと、及び、抗原の経皮感作において、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することを示した。27年度は、実験条件を最適化し、酸化チタンが抗原経皮感作に与える影響についてより詳細な検討を行った。

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。

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 (【実験 1】 ~ 【実験 3】)

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、OVA 群を基準とした Dunnett の検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。図中には、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ で有意差の程度を示した。

(倫理面への配慮)

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。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。

C. 研究結果

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。26年度は、モデル抗原である OVA 20 μ g をマウス皮膚に貼付して経皮感作を行った場合、酸化チタン A (1.25mg) の共存により抗原特異的抗体の産生が増大することを示した。この結果を受け、27年度は、OVA 貼付量を一定 (1-2 μ g) にし、酸化チタン量を 12.5ng~1.25mg まで変化させた場合の共存効果について検討した。

【実験 1】酸化チタン C の共存効果

Fig. 2 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、IgG2a の測定結果を示す。OVA2 群では、IgG1 は V 群と比較して有意に増大し、IgE はわずかに増大する傾向が見られた。酸化チタン C を共存させた場合、IgE に関しては、TiO2 125ng 群、及び TiO2 12.5ng 群において、OVA 群と比較して有意な増大が見られた。IgG1 に関しては、同じく TiO2 125ng 群、及び TiO2 12.5ng 群において、OVA 群と比較して増大する傾向が見られた。なお、IgG2a に関しては、どの群においても V 群と比較して大きな増大は見られなかった。

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. 3 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、OVA2 群では V 群と比較して直腸温が平均 1.4°C 低下してい

た。TiO2 125ng 群では、OVA2 群よりもさらに平均 2.0°C 低下しており、OVA2 群と比較して有意な差が見られた。B には惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。OVA2 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度が増大する傾向が見られた。TiO2 125ng 群では OVA2 群と比較して血清中ヒスタミン濃度がさらに有意に増大していた。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。OVA2 群では V 群と比較して有意なスコアの増大がみられた。TiO2 125ng 群では OVA2 群と比較してアナフィラキシースコアがさらに有意に増大していた。これらの結果から、OVA 2 μ g を貼付して経皮感作を行う際に、酸化チタン C を 125ng 共存させた場合、抗原特異的抗体の産生が有意に増大すること、及び、その後の抗原腹腔内投与によりアナフィラキシー反応（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スコア）も有意に増大することが示された。他の用量の酸化チタン C を用いた場合にはこのような明確な効果は見られなかった。

【実験 2】酸化チタン A の共存効果

Fig. 4 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、IgG2a の測定結果を示す。OVA1 群では、IgE、IgG1 ともに V 群に対する有意な増大は見られなかった。酸化チタン A を共存させた場合、TiO2 125 μ g 群、TiO2 12.5 μ g 群、TiO2 1.25 μ g 群、TiO2 12.5ng 群において、IgE、IgG1 の産生が OVA1 群と比較して増大する傾向が見られた。なお、IgG2a に関しては、どの群においても V 群と比較して有意な増大は見られなかった。

続いて、抗原の腹腔内投与によるアナフィラキシー反応の惹起を行った。実験 1 と同様に、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い、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. 5 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、OVA1群ではV群と比較して平均0.4°C低下したが、有意な差は見られなかった。TiO₂ 12.5 μg群ではOVA1群と比較して平均1.7°C低く、有意な差が見られた。また、TiO₂ 125 μg群、及びTiO₂ 1.25 μg群でもOVA1群と比較して直腸温が低下する傾向が見られた。Bには惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。OVA1群ではV群と比較して血清中ヒスタミン濃度がやや増大する傾向が見られた。TiO₂ 12.5 μg群、及びTiO₂ 1.25 μg群ではOVA群と比較して血清中ヒスタミン濃度がさらに増大する傾向が見られた。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。OVA1群ではV群と比較してスコアがやや増大する傾向が見られた。TiO₂ 12.5 μg群では、OVA1群と比較して大きくスコアが増大し、OVA1群との間に有意な差が見られた。また、TiO₂ 125 μg群、及びTiO₂ 1.25 μg群でもOVA1群と比較してスコアが増大する傾向が見られた。これらの結果から、OVA 1 μgを貼付して経皮感作を行う際に、酸化チタンAを12.5 μg共存させた場合、抗原特異的抗体の産生が増大する傾向が見られ、その後の抗原腹腔内投与によりアナフィラキシー反応も有意に増大することが示された。また、TiO₂ 125 μg群、及びTiO₂ 1.25 μg群でも、抗原特異的抗体産生やアナフィラキシー反応が増大する傾向がみられた。他の用量の酸化チタンAを用いた場合にはこのような効果は見られなかった。

【実験3】酸化チタンBの共存効果

Fig. 6に血清中の抗原特異的IgE、IgG1、IgG2aの測定結果を示す。OVA2群では、IgE、IgG1ともにV群と比較して増大する傾向が見られた。酸化チタンBを共存させた場合、どのTiO₂群においてもOVA2群との間に差は見られなかった。なお、IgG2aに関しては、どの群においてもV群と比較して有意な増大は見られなかった。

続いて、抗原の腹腔内投与によるアナフィラキシー反応の惹起を行った。実験1、2と同様に、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い、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. 7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、OVA2群ではV群と比較して直腸温が平均1.5°C低下していた。TiO₂ 125 μg群、TiO₂ 12.5 μg群、TiO₂ 1.25 μg群、TiO₂ 125ng群、TiO₂ 12.5ng群でも直腸温は低下したが、OVA2群との間に有意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。OVA2群ではV群と比較して血清中ヒスタミン濃度が増大していた。TiO₂ 125 μg群、TiO₂ 12.5 μg群、TiO₂ 1.25 μg群、TiO₂ 125ng群、TiO₂ 12.5ng群でもヒスタミン濃度の増大が見られたが、OVA2群との間に有意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。OVA2群ではスコアが大きく増大し、V群との間に有意差が見られた。TiO₂ 125 μg群、TiO₂ 12.5 μg群、TiO₂ 1.25 μg群、TiO₂ 125ng群、TiO₂ 12.5ng群でもスコアが増大したが、OVA2群との間に有意差は見られなかった。一方、酸化チタンの用量が最大のTiO₂ 1.25mg群では、OVA2群と比較して、IgE及びIgG1産生、アナフィラキシー反応ともに減弱する傾向が見られた。

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ギータンパク質であり、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)を用いた。

26年度は、抗原の腹腔内投与による感作において、酸化チタンが、水酸化アルミニウムゲル (Alum) と同様に感作を増強する (アジュバント作用を有する) こと、及び、抗原の経皮感作において、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することを示した。26年度の経皮感作実験では OVA 100 μ g、50 μ g、20 μ g を用いたが、抗体産生やアナフィラキシー反応がかなり強く、これらに対する促進効果を検討するためには OVA 量が多すぎるものと考えられた。そこで、27年度は、貼付する OVA 量を少なくして、酸化チタンの効果をより観察しやすくなるような実験系とした。3種の酸化チタン (A、B、C) について、OVA 貼付量を一定 (1.2 μ g) にし、酸化チタン量を 12.5ng~1.25mg まで変化させた場合の共存効果について検討した。最もサイズが小さい酸化チタン C (粒子径 : 6 nm) では、TiO₂ 125ng 群において抗原特異的抗体産生、及びその後の抗原の腹腔内投与によるアナフィラキシー反応が顕著に増大し、OVA2 群との間に有意な差が見られた。(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。) 中間のサイズの酸化チタン A (粒子径 : 15 nm) では、TiO₂ 12.5 μ g 群において、抗原特異的抗体産生、及びアナフィラキシー反応が増大し、一部で OVA1 群との間に有意差が見られた。最もサイズが大きい酸化チタン B (粒子径 : 35 nm) では、酸化チタン C や A のような促進効果は見られなかった。これらの結果から、OVA 経皮感作の際に酸化チタンナノマテリアルを共存させると感作が増強されること、またその際に、至適用量 (OVA との最適な量比) が存在すること、この至適用量は酸化チタンのサイズにより異なることが示された。一方、酸化チタン B では、今回の最大用量である 1.25mg 群において、抗体産生やアナフィラキシー反応が抑制されたことから、酸化チタンの用量が多すぎる場合には逆に経皮感作が阻害されてしまうことが示唆

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。28年度以降は、これまでに得られた結果を受け、本評価系の重要なポイントである、タンパク質経皮感作の際に生体内で起きている現象、及びこの現象に対する酸化チタンの影響、また、ナノマテリアルの種類によって経皮感作への影響がどのように変わるのかといった点等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* 評価系を用いて検討を行った。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、OVA 経皮感作の際に酸化チタンナノマテリアルを共存させると感作が増強されること、またその際に、至適用量 (OVA との最適な量比) が存在すること、この至適用量は酸化チタンのサイズにより異なることが示された。今後、酸化チタンの効果が現れるメカニズムや、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