

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

Table 1 各実験群の感作検体及び共存物質

実験1/実験3 抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタンの影響(1群5匹 x 8群)

| 群名 | 感作検体 | 共存物質 |
|------------------|----------|---------------|
| V | PBS | — |
| OVA2 | OVA 2 µg | — |
| OVA2 TiO2 1.25mg | OVA 2 µg | 酸化チタン 1.25 mg |
| OVA2 TiO2 125µg | OVA 2 µg | 酸化チタン 125 µg |
| OVA2 TiO2 12.5µg | OVA 2 µg | 酸化チタン 12.5 µg |
| OVA2 TiO2 1.25µg | OVA 2 µg | 酸化チタン 1.25 µg |
| OVA2 TiO2 125ng | OVA 2 µg | 酸化チタン 125 ng |
| OVA2 TiO2 12.5ng | OVA 2 µg | 酸化チタン 12.5 ng |

※実験1: 酸化チタンC、実験3: 酸化チタンB

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 8群)

| 群名 | 感作検体 | 共存物質 |
|------------------|----------|---------------|
| V | PBS | — |
| OVA1 | OVA 1 µg | — |
| OVA1 TiO2 1.25mg | OVA 1 µg | 酸化チタン 1.25 mg |
| OVA1 TiO2 125µg | OVA 1 µg | 酸化チタン 125 µg |
| OVA1 TiO2 12.5µg | OVA 1 µg | 酸化チタン 12.5 µg |
| OVA1 TiO2 1.25µg | OVA 1 µg | 酸化チタン 1.25 µg |
| OVA1 TiO2 125ng | OVA 1 µg | 酸化チタン 125 ng |
| OVA1 TiO2 12.5ng | OVA 1 µg | 酸化チタン 12.5 ng |

※実験2: 酸化チタンA

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 |

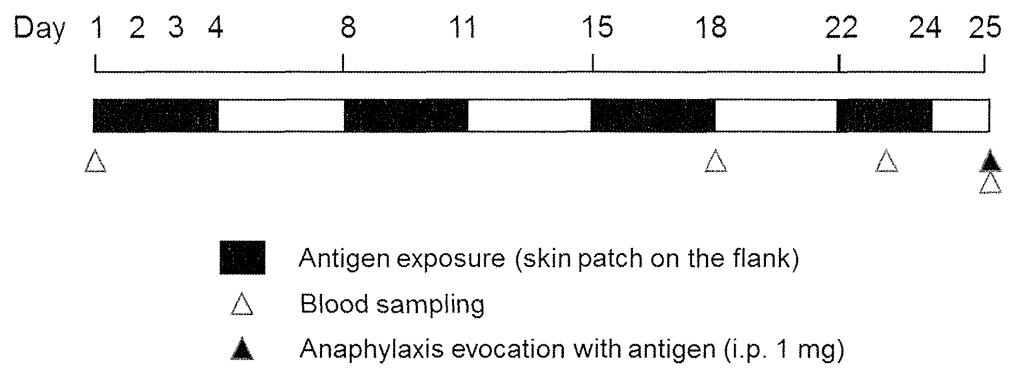
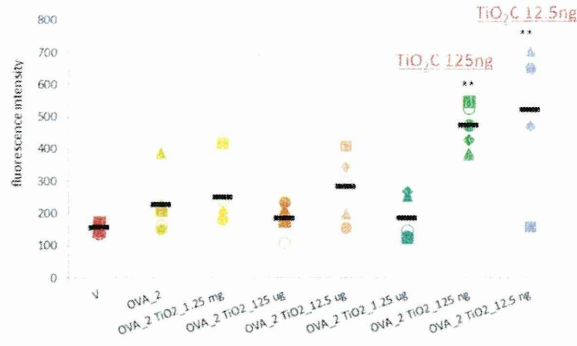
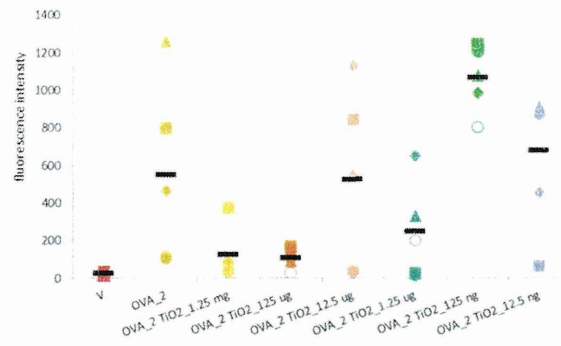


Figure 1 経皮感作試験スケジュール

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1



C. 抗原特異的IgG2a

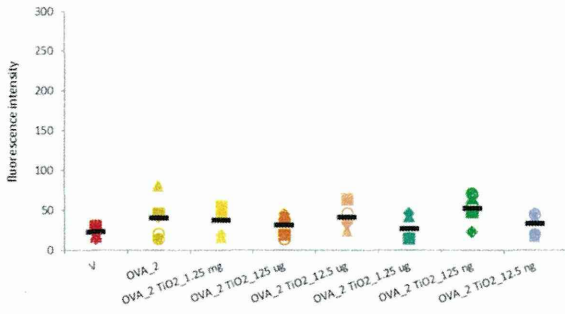
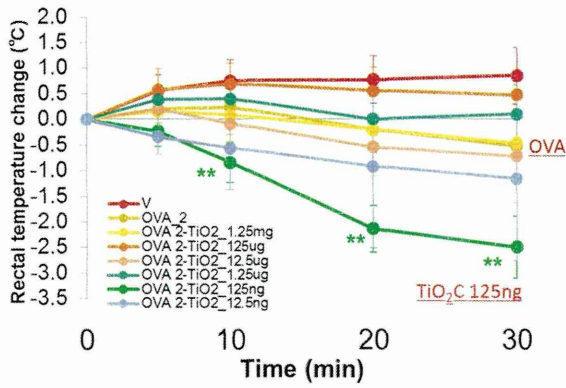
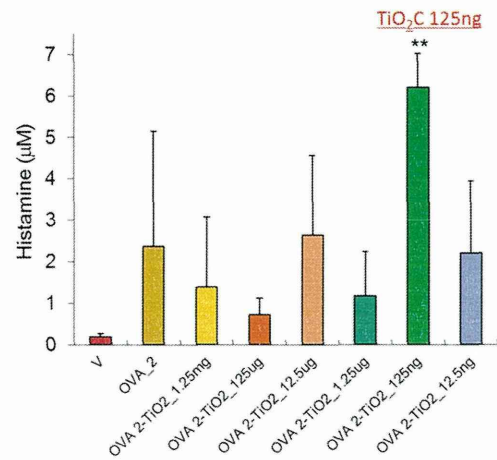


Figure 2 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験1】酸化チタンC)
各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
*p<0.05, **p<0.01 by Dunnett's test vs. OVA group.

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

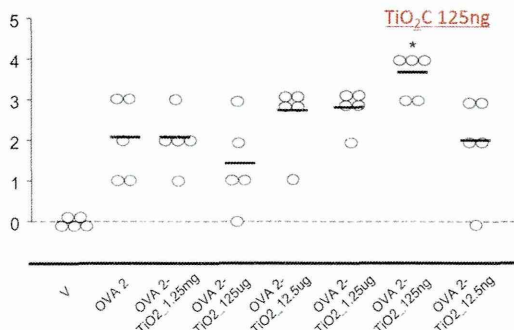
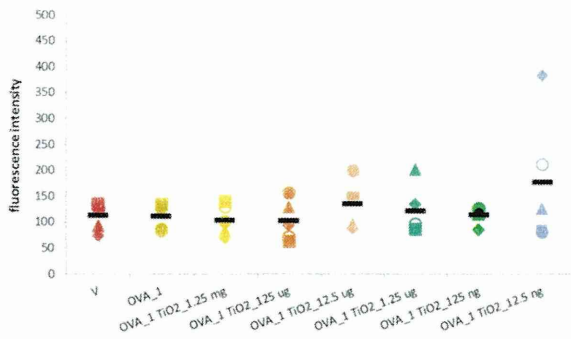
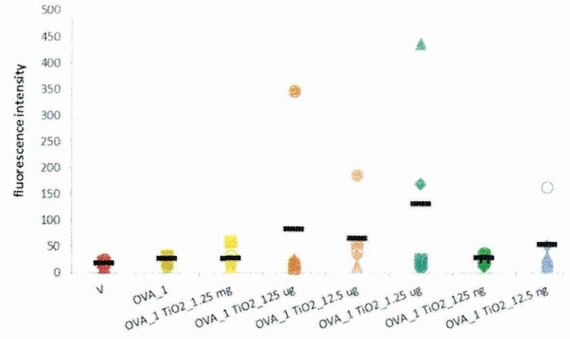


Figure 3 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験1】酸化チタンC)
A: 各群のデータをMean±S.D.で示す。B, C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
**p<0.01 by Dunnett's test vs. OVA group.

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1



C. 抗原特異的IgG2a

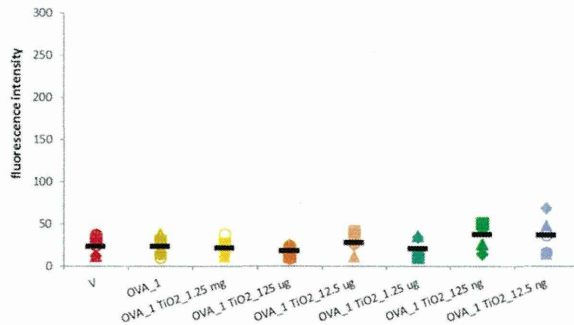
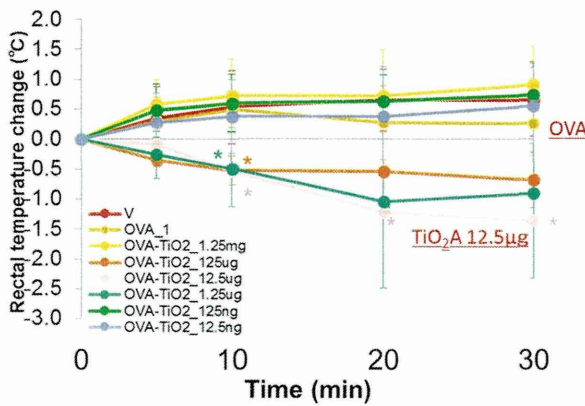
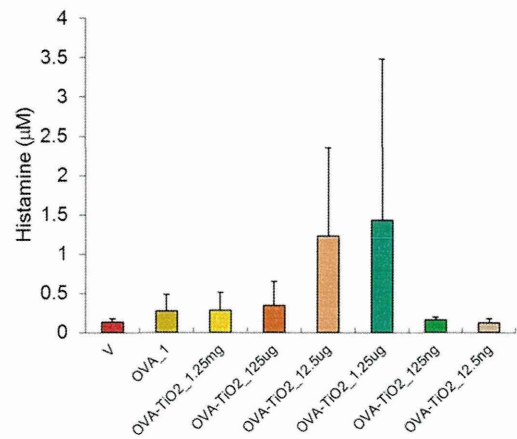


Figure 4 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験2】酸化チタンA)
 各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. OVA group.

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

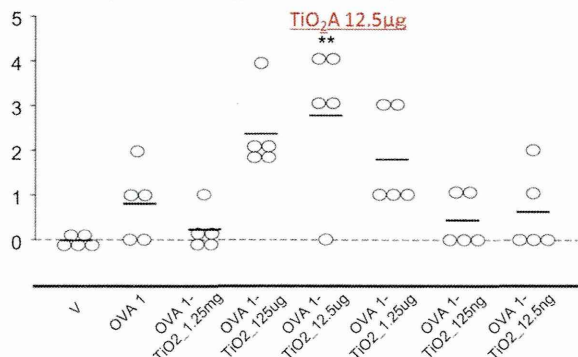
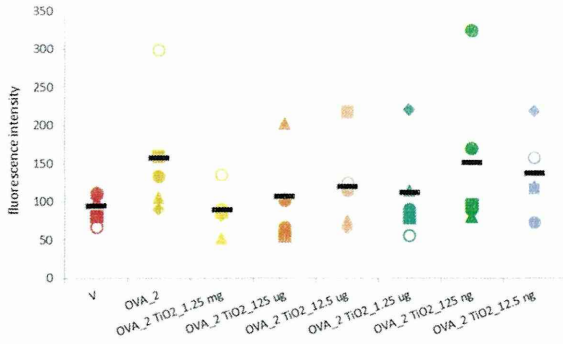
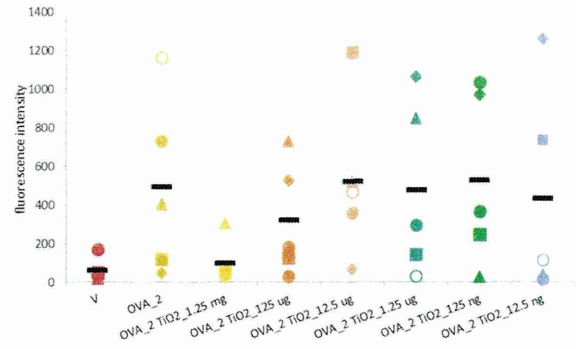


Figure 5 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験2】酸化チタンA)
 A: 各群のデータをMean±S.D.で示す。B, C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
 ** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. OVA group.

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1



C. 抗原特異的IgG2a

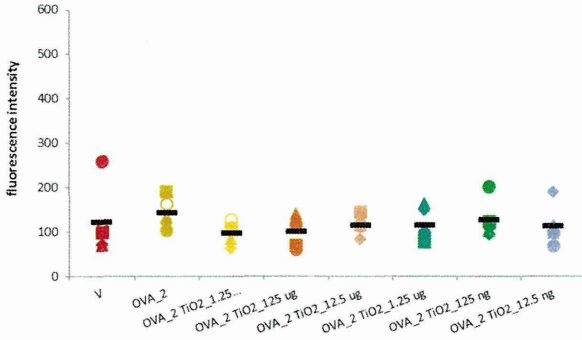
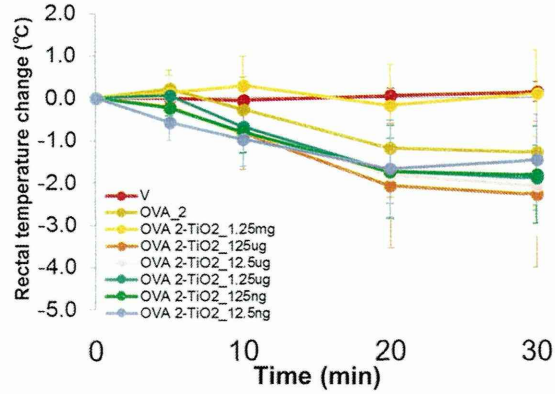
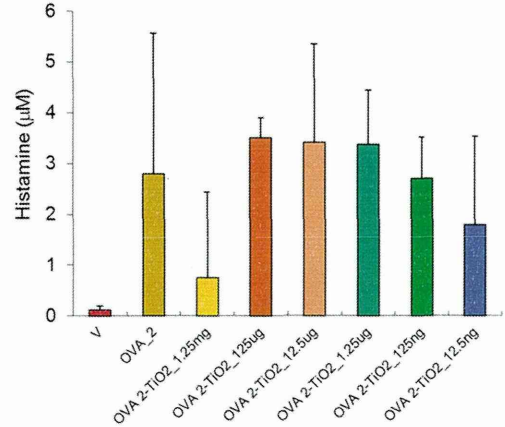


Figure 6 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験3】酸化チタンB)
 各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. OVA group.

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

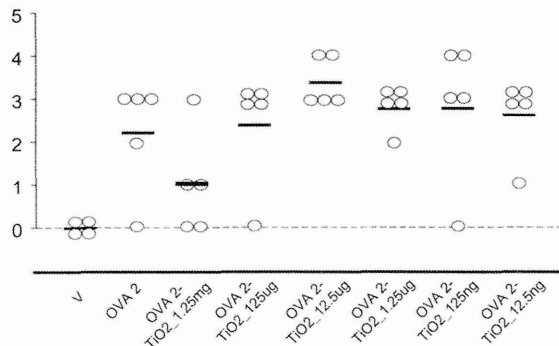


Figure 7 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験3】酸化チタンB)
 A: 各群のデータをMean \pm S.D.で示す。B, C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
 ** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. OVA group.

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 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 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 | 生活衛生化学部 | 室長 |
| 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 |
| 研究協力者 | 最上知子 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 生化学部 | 部長 |
| 研究協力者 | 崔 紅艶 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 生化学部 | 研究助手 |
| 研究協力者 | 曾我慶介 | 国立医薬品食品衛生研究所 | 生化学部 | 研究員 |

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。本分担研究では、抗原提示における免疫応答にナノマテリアルの共存が及ぼす影響に着目して *in vitro* における安全性評価手法を確立することを目的とし、これまでに構築してきた抗原提示細胞の表面抗原の発現量を指標とする *in vitro* 評価法の適応性について、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類が抗原提示細胞の活性化に及ぼす影響について検討を行った。

抗原未添加時には、炎症性サイトカイン類を含む培養上清により抗原提示細胞表面の MHC クラス II 分子、共刺激分子の発現量が増大した。また、抗原添加時には、炎症性サイトカイン類を含む培養上清により共刺激分子の発現量が増大した。他方、抗原提示活性化には炎症性サイトカイン以外の因子による影響が示唆されたことから、*in vitro* 評価法の適応性について、引続き検証する必要があると考えられた。

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。本分担研究

では、抗原提示における免疫応答にナノマテリアルの共存が及ぼす影響に着目して *in vitro* における安全性評価手法を確立することを目的としている。

平成 27 年度は、初年度に構築した抗原提示細胞の表面抗原の発現量を指標とする *in vitro* 評価法の適応性について、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

影響について検討を行った。

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) をテイカ株式会社より入手した。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。抗原には卵白アルブミン (OVA; Sigma-Aldrich 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

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、ATCC (American Type Culture Collection) より入手した。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 hIL-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。

マクロファージ様細胞 (THP-1-Mφ細胞) 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 µM 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-Mφ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 µg/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-Mφ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。

[抗ヒトモノクローナル抗体]

フィコエリスリン(PE)標識 抗ヒト HLA-DR (clone L243 及び G46-6)

PE 標識 抗ヒト CD86 (clone IT2.2)

PE 標識 抗ヒト CD54 (clone HA58)

PE 標識 抗ヒト CD11c (clone 3.9)

PE 標識 抗ヒト CD209 (clone 9E9A8 及び DCN46)

[アイソタイプコントロール抗体]

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)

PE 標識マウス IgG1 κ isotype (clone MOPC-21)

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) 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。なお、図には $*p < 0.05$ で有意差の程度を示した。

C. 研究結果

1. THP-1 細胞の分化誘導

THP-1-DC 細胞、THP-1-M ϕ 細胞への分化誘導方法を図 1 に示す。本研究に用いた THP-1 細胞株は PMA 及び IL-4 非存在下において浮遊性を保ちながら倍加時間 48 ± 4 時間で良好な増殖能を示した。両者のモルフォロジーは図 2 に示すように、THP-1-M ϕ 細胞は $20 \sim 50 \mu\text{m}$ 程度の楕円状であり、THP-1-DC 細胞と比較して平均サイズ大きかった。他方、THP-1-DC 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示した。分化マーカーとして THP-1-DC 細胞の表面に発現する CD11c 及び CD209 (DC-SIGN) をフローサイトメトリーで解析したところ、分化誘導前の THP-1 細胞と比較して MFI が顕著に増大した (データ示さず)。

2. 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 (図 3)。

3. 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。本研究では上記 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) の発現量を解析した。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の概要を図 4 に示す。

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 (図 5A)。

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 (図 5B)。

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 (図 5C)。

4. THP-1-DC 細胞の抗原提示における培地中の炎症性サイトカイン濃度の影響

前項 3 で、THP-1-DC 細胞の抗原提示における培地中 THP-1-M ϕ 細胞由来の炎症性サイトカインの影響が認められたことから、Complete 培地で THP-1-M ϕ 細胞培養上清を希釈した培地 (10 倍希釈, 100 倍希釈) を調製し、それぞれの培地中に OVA を終濃度 1 mg/mL となるように添加して、培養 72 時間後の抗原提示細胞活性化マーカーの発現量を解析した、また、微粒子酸化チタンを添加しない THP-1-M ϕ 細胞の培養上清についても同様の希釈系列を調製した後に OVA を終濃度 1 mg/mL となるように添加した。

4.1 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、前項 3 と同様に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濃度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 1.40 倍に増加した。また、抗原未添加時には、サイトカイン濃度依存的に HLA-DR 発現の抑制が認められた (図 6A)。

4.2 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、抗原未添加時に培地中 THP-1-M ϕ 細胞由来の炎症性サイトカイン濃度の影響は認められなかったが、抗原添加時にはサイトカイン濃度依存的に CD86 発現の促進傾向が認められた (図 6B)。

4.3 CD54 (ICAM-1) の発現量解析

CD54 (ICAM-1)の発現について、培地中 THP-1-M ϕ 細胞由来の炎症性サイトカイン濃度の影響は認められなかった (図 6C)。

D. 考察

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。図 2 に示すように THP-1-DC 細胞と THP-1-M ϕ 細胞とのモルフォロジーは明らかに異なり、樹状細胞への分化マーカー (CD11c 及び CD209) の発現量も異なるパターンを示した。また、抗原提示スキームをみると 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すなわち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 (図 5A)。他方、培地中の炎症性サイトカイン濃度の影響を評価した検討(図 6A)

においては、抗原未添加時に炎症性サイトカイン濃度依存的に HLA-DR 発現の抑制傾向が認められたが、炎症性サイトカイン非存在下 (陰性コントロール; 微粒子酸化チタンを添加せずに THP-1-M ϕ 細胞のインフラマソーム活性化を誘導しなかった培養上清) においても同様のパターンが認められたことから、THP-1-DC 細胞の抗原提示活性化に対して抑制的に働く因子は IL-1 β 等の炎症性サイトカイン類でなく、培養上清中に含まれる THP-1-M ϕ 細胞由来の他の因子による可能性が示唆された。これらの事象について、細胞 (THP-1-DC 細胞) 及び抗体の結合能に問題があるかどうか明らかにするため、側方散乱光とアイソタイプコントロール抗体 (マウス IgG2a) の MFI について分光学的な解析を試みたが、陰性コントロールとの間に有意な差は認められなかった。以上の検討結果より、本評価系において MHC クラス II 分子は抗原提示細胞の活性化の分子マーカーとして不適であると推察された。

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 (図 5B)。また、培地中の炎症性サイトカイン濃度の影響を評価した検討(図 6A)においては、抗原未添加時に炎症性サイトカイン濃度依存的に HLA-DR 発現の抑制傾向が認められたが、CD86 (共刺激分子)の発現について、抗原未添加時に培地中 THP-1-M ϕ 細胞由来のサイトカイン濃度の影響は認められなかったが、抗原添加時にはサイトカイン濃度依存的に CD86 発現の促進傾向が認められた (図 6B)。この促進傾向は、MHC クラス II 分子の発現量解析と同様に陰性コントロールと同様のパターンが認められたことから、THP-1-DC 細胞の共刺激分子発現に促進的に作用する培地中の因子を同定することが重要であると考えられた。

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。他方、THP-1-DC 細胞に対して微粒子酸化チタン単独添加が抗原提示活性化マーカーの発現量に影響を及ぼさないという結果を得ていることから、抗原提示細胞の表面抗原の発現量をマーカーとする *in vitro* 評価法の適応性について詳細に検証する必要がある。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。

E. 結論

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* 評価法を構築するために、THP-1 細胞より分化した樹状細胞様細胞が抗原提示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用いた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。他方、抗原提示活性化に対して炎症性サイトカイン以外の因子の影響が示唆されたことから、これまでに構築した *in vitro* 評価法の適応性について、引続き検証する必要がある。

【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 antigen 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

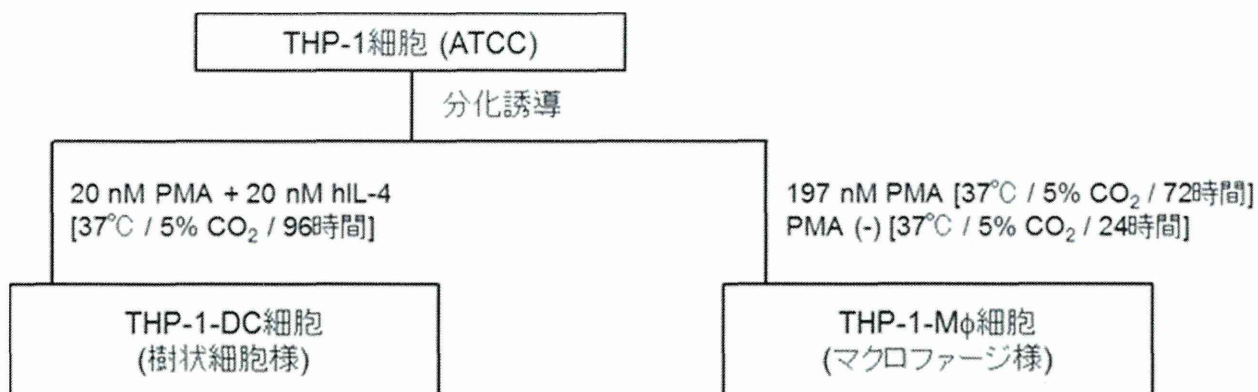
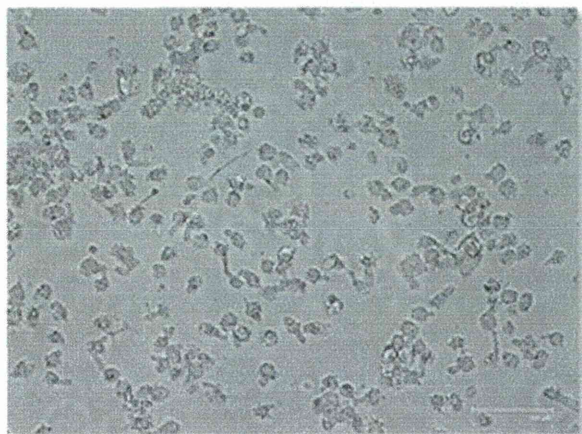
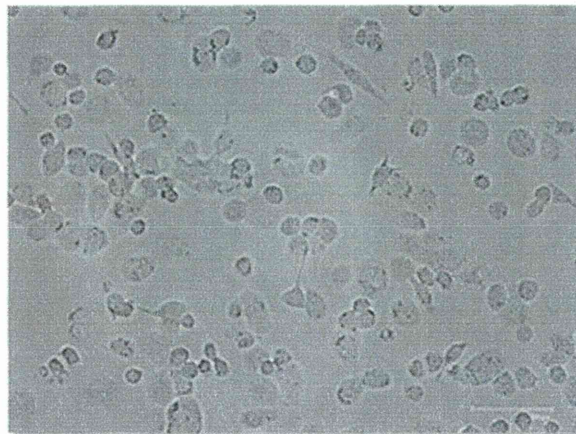


図1 THP-1細胞の分化誘導



THP-1-DC細胞



THP-1-Mφ細胞

図2 THP-1細胞分化誘導後のモルフォロジー

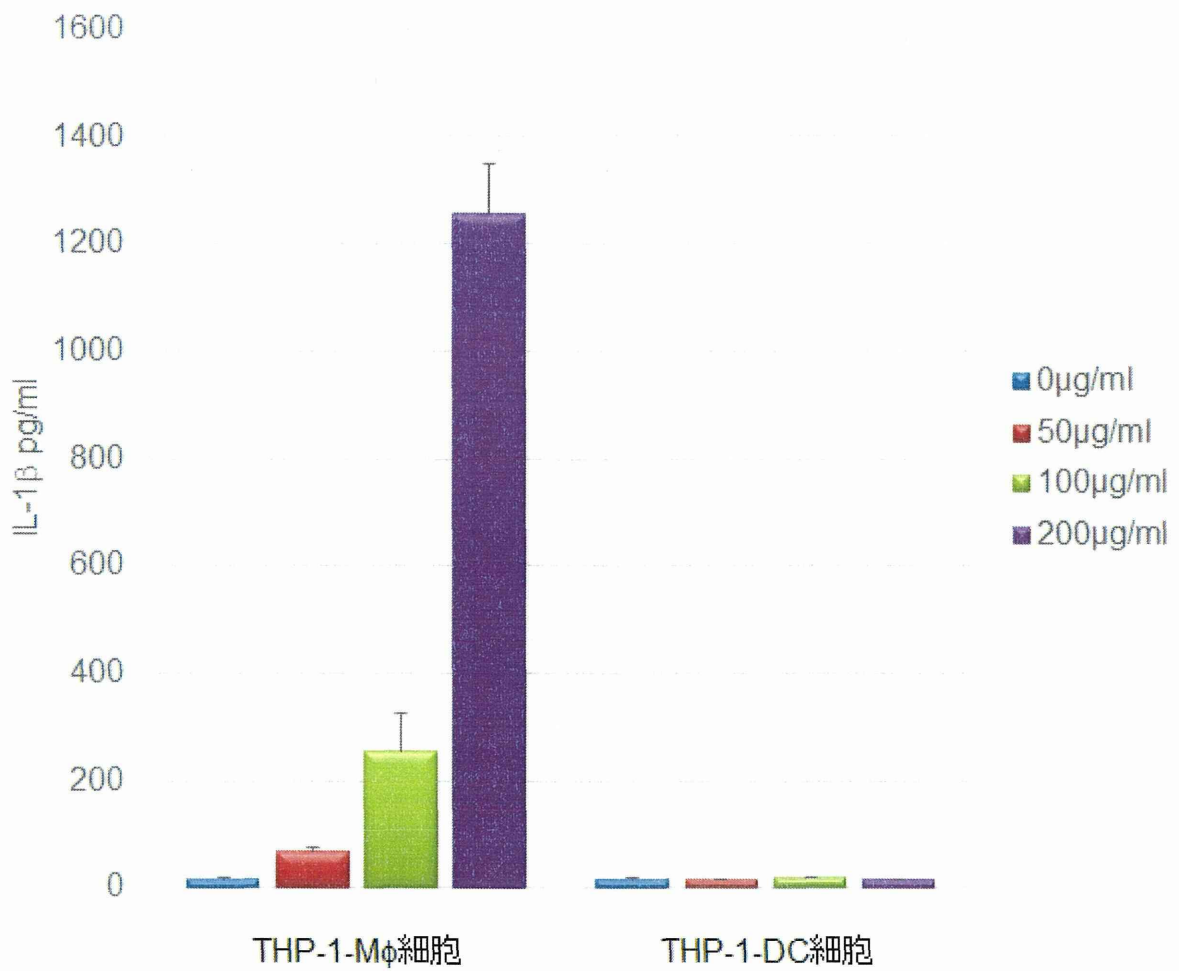


図3 THP-1-Mφ細胞より産生されるIL-1βの定量

An *in vitro* model of Initial cutaneous exposure to antigens

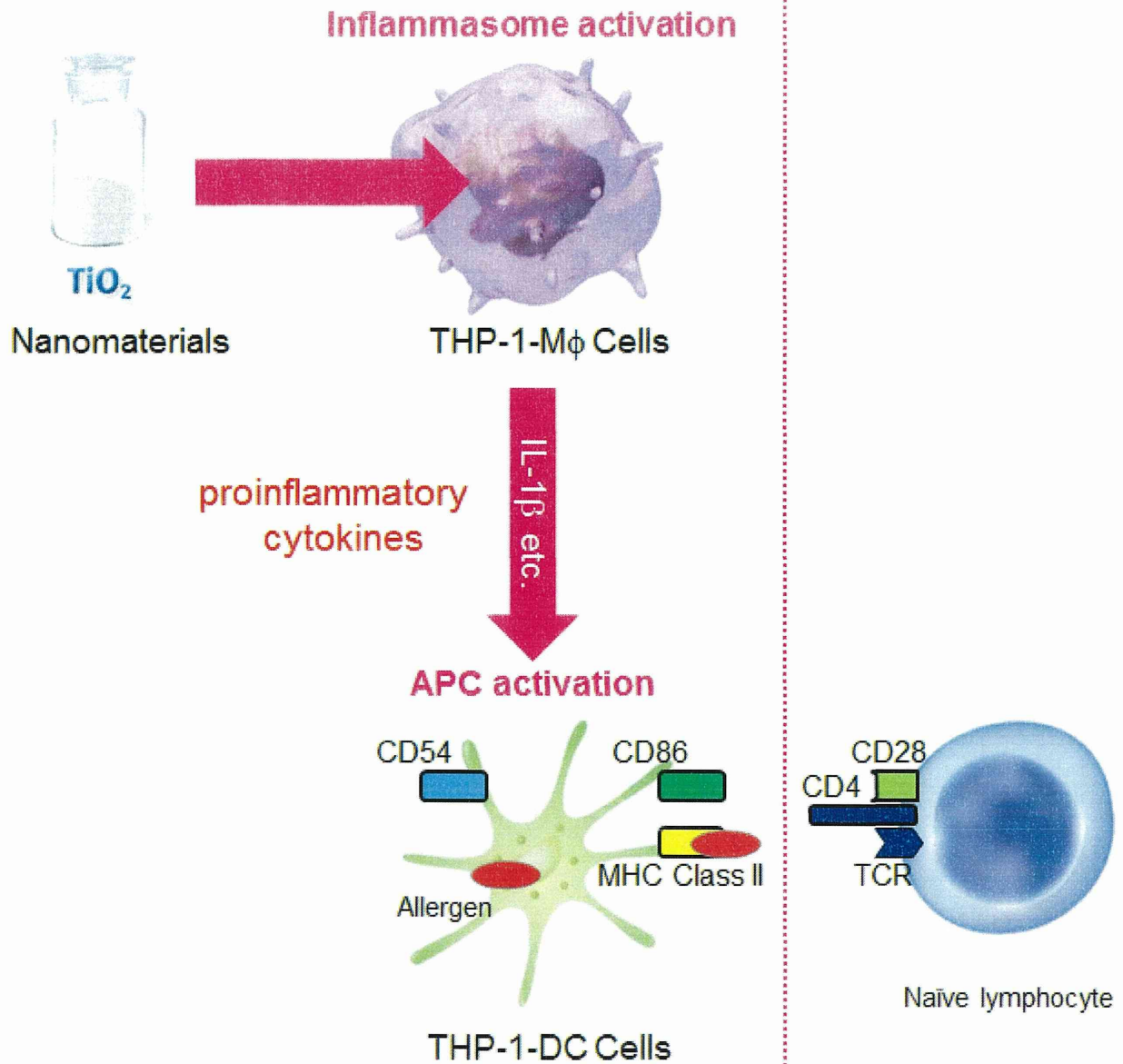


図4 THP-1-DC細胞の抗原提示における
培地中サイトカインの影響の概要図

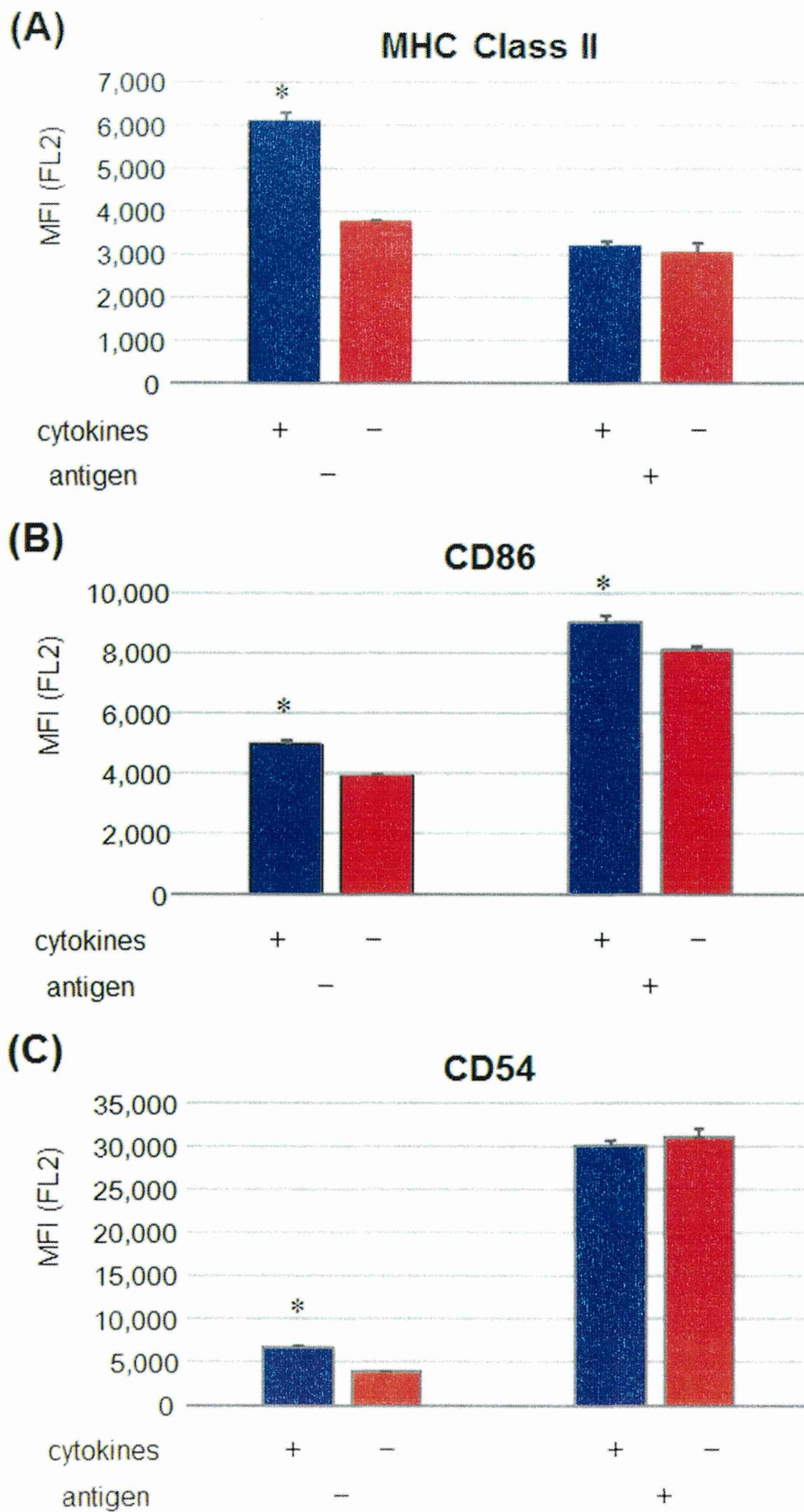
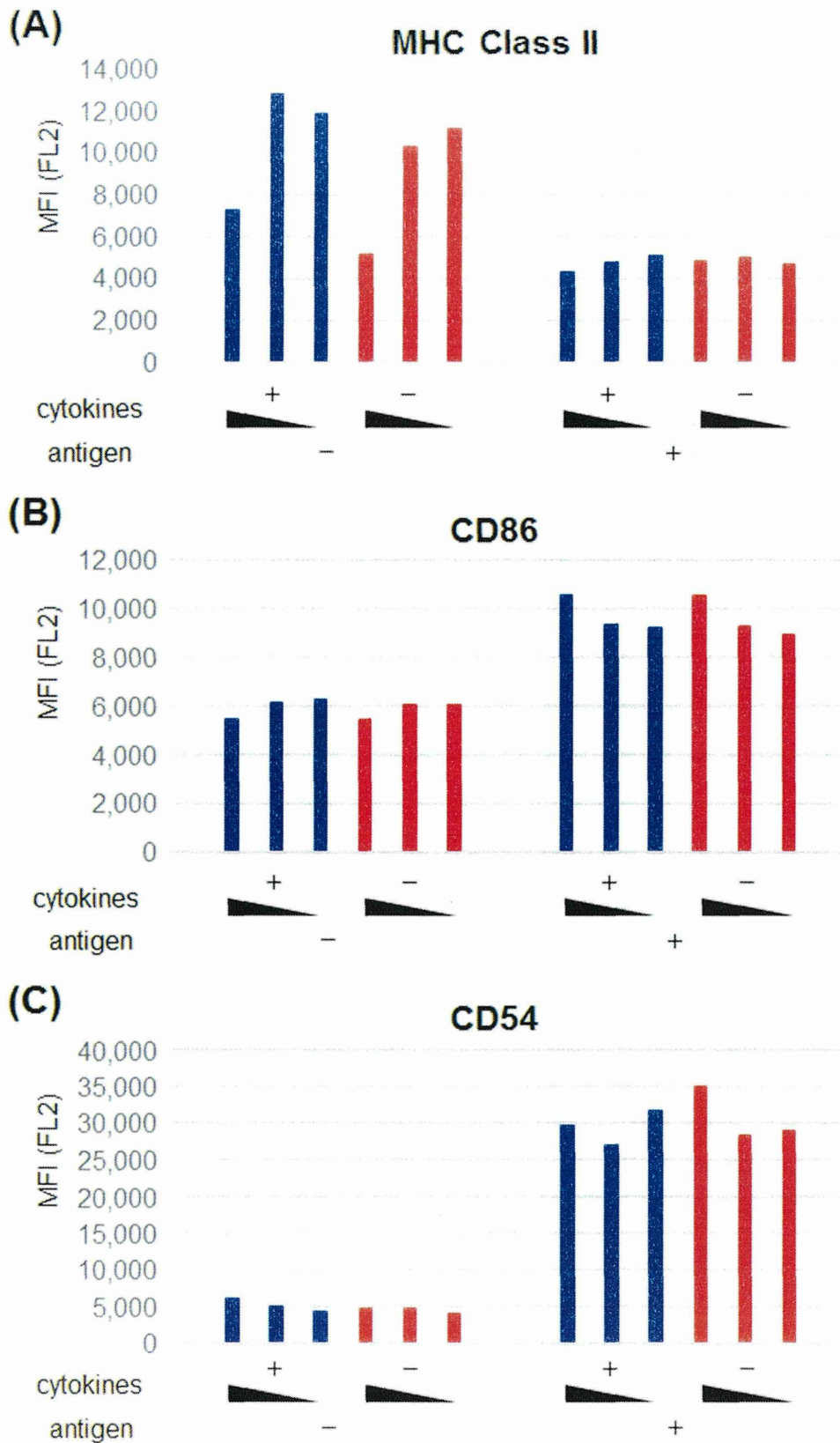


図5 THP-1-DC細胞の表面抗原解析

* $p < 0.05$ when compared with the nanomaterial (-) group.



**図6 THP-1-DC細胞の表面抗原解析
(サイトカイン濃度の影響)**

▲ ; 培養上清の希釈系列は左よりx1, x10, x100で示す

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

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

分担研究者：最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 部長

研究協力者：崔 紅艶 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 研究助手

研究要旨

本分担研究では **in vitro** でのアジュバント活性評価系を **NLRP3** インフラマソーム活性化に着目して確立し、酸化チタン等のナノマテリアルの活性を明らかにすることを目的とする。昨年度は **THP-1** マクロファージを用い、3種類の酸化チタンナノマテリアルがいずれも、汎用アジュバント剤の酸化アルミニウムゲル (**Alum**) と同様に、**NLRP3** インフラマソームを介する **IL-1 β** 産生を促進する作用を有することを明らかにした。今年度は引き続き **THP-1** マクロファージにおいて、3種類の酸化チタンナノマテリアルが **TNF α** ならびに **IL-6** 産生促進活性を有すること、**TNF α** 産生は **NLRP3** に依存した応答であることを示した。酸化チタンの粒子径が小さい場合には、**TNF α** 産生応答は食食阻害剤の影響を受けず、食食によらない直接の活性化が示唆された。そこで表皮細胞への影響評価を検討したが、培養ケラチノサイトでは **NLRP3** 発現が著しく低く、各種ナノマテリアル、**NLRP3** を直接活性化する **ATP** や **nigericin** のいずれの曝露によっても **IL-1** 系サイトカイン産生応答は全く認められないことが判明した。

A. 研究目的

水酸化アルミニウム (**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。抗原免疫時に **Alum** がアジュバント効果を発揮するには、**NLRP3** インフラマソーム活性化による **IL-1** 系炎症性サイトカイン産生が決定的な役割を持ち、**Alum** のアジュバント作用はインフラマソームを構成する **NLRP3** や **caspase-1** ノックアウトマウスでは失われることが報告されている。

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** などのナノマテリアルを食食し、**NLRP3** 活性化を介して **IL-1**

β を産生することを報告している。酸化チタン等のナノマテリアルについても同様にインフラマソーム活性化を介して炎症性サイトカイン産生を促進する可能性が推定される。

本研究班は、酸化チタン等のナノマテリアル経皮曝露が抗原タンパク質の経皮感作を増強する可能性を検証し、ナノマテリアルのアジュバント効果を **in vivo** 及び **in vitro** で評価する系を開発することを目的としている。本分担研究においては、**in vitro** 評価法として、細胞を用いた **NLRP3** 活性化の評価法とその妥当性について検討を行う。

昨年度の研究において、3種の酸化チタンを