

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 28 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：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

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た。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。27 年度は、実験条件を最適化してより詳細な検討を行い、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、酸化チタンのサイズにより異なる至適用量 (OVA との最適な量比) が存在することを示した。28 年度は酸化チタンの結晶型の影響及び酸化亜鉛ナノマテリアルについて検討し、酸化チタンナノマテリアルのタンパク質経皮感作増強作用においては、結晶型による違いはほとんど見られず、粒子径が重要な要因となること、また酸化亜鉛ナノマテリアルも経皮感作を増強することを示した。

本研究により、粒子径の小さいナノマテリアルを皮膚に適用する際には経皮感作に与える影響について注意が必要であることが示された。今後は、タンパク質経皮感作の際に生体内で起きている現象に対するナノマテリアルの効果について検討を進めることが必要である。

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、報告書がまとめられつつある。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、タンパク質が皮膚から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、酸化チタン等ナノ材料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、酸化亜鉛等のナノ材料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てより詳細な検討を行い、OVA 経皮感作の際に酸化チタンナノ材料を共存させると感作が増強されること、またその際に、酸化チタンのサイズにより異なる至適用量(OVA との最適な量比)が存在することを示した。28年度は、酸化チタンの結晶型の違いによる影響、及び酸化亜鉛ナノ材料のタンパク質経皮感作に対する効果について検討した。

B . 研究方法

試料及び試薬

被検物質として、27年度までは下記の3種類の酸化チタンナノ材料(表面未処理)を使用した。

酸化チタン A (ルチル型、粒子径 15 nm)

酸化チタン B (ルチル型、粒子径 35 nm)

酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm)

28年度は、下記の酸化チタンナノ材料(表面未処理)及び酸化亜鉛ナノ材料を用いた。

酸化チタン D (アナターゼ型、粒子径:15 nm)

酸化亜鉛 A (粒子径:25 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。

酸化チタン及び酸化亜鉛ナノ材料の懸濁液調製

酸化チタン及び酸化亜鉛は、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及び酸化亜鉛の影響に関する検討 (【実験 1, 2】)

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 / 酸化亜鉛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-BI0)にて測定した。

統計解析

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。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動物施設利用規定に従った。

C. 研究結果

抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタン/酸化亜鉛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、タンパク質が皮膚から取り込まれ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あるいは酸化亜鉛ナノ材料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、OVA経皮感作の際に酸

化チタンナノ材料を共存させると感作が増強されること、またその際に、酸化チタンのサイズにより異なる至適用量(OVAとの最適な量比)が存在することを示した。

工業的に利用されている酸化チタンにはルチル型とアナターゼ型の2種の結晶型が存在する。27年度の検討において経皮感作増強効果が見られたのは、酸化チタン A (ルチル型、粒子径 15 nm) 及び酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6 nm) であり、酸化チタン Cの方が強い効果を示した。そこで28年度は、酸化チタンの結晶型の影響について調べるため、酸化チタン D (アナターゼ型、粒子径: 15 nm) の経皮感作増強効果について検討した。また、酸化亜鉛ナノ材料(粒子径: 15 nm)の効果についても同様に検討を行った。

【実験1】酸化チタン D (アナターゼ型) 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。OVA1 群、TiO₂ 1.25 μ g 群、TiO₂ 125ng 群、及び TiO₂ 12.5ng 群では、IgE 及び IgG1 が V 群と比較して増大する傾向が見られた。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、OVA1群ではV群と比較して直腸温が平均0.7低下していた。TiO₂ 1.25 μ g群では、OVA1群よりもさらに平均2.6低下しており、OVA1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。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 1.25 μg 群では OVA1 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。OVA1 群では V 群とほぼ同程度のスコアであった。TiO₂ 1.25 μg 群では OVA1 群と比較してアナフィラキシー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 D を 1.25 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が増大する（直腸温低下及びヒスタミン濃度については OVA1 群と比較して有意に増大する）ことが示された。他の用量の酸化チタン D 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 2】酸化亜鉛 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。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。酸化亜鉛 A を共存させた場合、ZnO 12.5ng 群において、IgE、IgG1 の産生が V 群と比較して有意に増大した（OVA2 群との有意差は見られなかった）。また、ZnO 1.25 μg 群、ZnO 125ng 群でも IgE、IgG1 の産生が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、OVA2 群では V 群と比較して平均 1.4 低下し

たが、有意な差は見られなかった。ZnO 1.25 μg 群、ZnO 125ng 群、及び ZnO 12.5ng 群では、直腸温が V 群と比較してそれぞれ平均 3.5 、 3.2 、 2.9 、有意に低下していた。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。ZnO 12.5ng 群では OVA と比較して有意に大きな増大が見られた（OVA2 群との有意差は見られなかった）。また、ZnO 1.25 μg 群、ZnO 125ng 群でもヒスタミン濃度が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。OVA2 群、ZnO 1.25 μg 群、ZnO 125ng 群、及び ZnO 12.5ng 群ではともに V 群と比較してスコアが有意に増大した。また、ZnO 1.25 μg 群、ZnO 125ng 群、及び ZnO 12.5ng 群では OVA2 群と比較して大きなスコアを示す傾向が見られた（有意差は無かった）。

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。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くなるよう実験系の最適化を行った。3 種の酸化チタン（A、B、C）について、OVA 貼付量を一定（1-

2 µg) 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 (アナターゼ型、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。中間のサイズの酸化チタン A (ルチル型、粒子径 : 15 nm) では、TiO₂ 12.5 µg 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 (ルチル型、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材料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。

工業的に利用されている酸化チタンには前述のようにルチル型とアナターゼ型の 2 種の結晶型が存在する。ルチル型は原子配列が最も緻密で安定な結晶型である。一方アナターゼ型はルチル型と比較して酸化還元等の反応性が高く光触媒等に利用されている。27 年度の結果では、経皮感作増強作用が最も強く示したのは酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 : 6 nm、至適用量 : 125ng) であり、酸化チタン A (ルチル型、粒子径 : 15 nm、至適用量 : 12.5 µg) では作用が弱かった。そこで、酸化チタンの結晶型の影響を調べるため、28 年度においては酸化チタン D (アナターゼ型、粒子径 : 15 nm) の経皮感作に対する効果について検討した。その結果、経皮感作増強効果は酸化チタン C よりも弱く、酸化チタン A と同程度であった (但し至適用量は 1.25 µg であり、酸化チタン A よりも低かった)。これらの結果、及び、酸化チタン B では効果が見られなかったことも考慮すると、酸化チタン C で強い経皮感作増強効果が見ら

れたのは粒子径が最も小さかったためと考えられる。

また、28 年度においては、酸化亜鉛ナノ材料が経皮感作に与える影響についても検討した。その結果、酸化亜鉛 A (粒子径 : 25nm) の場合も 1.25 µg ~ 12.5ng の用量においてタンパク質経皮感作を増強する傾向が見られた。

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、酸化チタンや酸化亜鉛のような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。酸化チタンと酸化亜鉛では化学的な特性は異なるものと思われるが、これまでの検討結果を考え合わせると、粒子径 30nm 未満程度のナノ材料を皮膚に適用する際には注意が必要であると考えられる。また、今後は、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ナノ材料の影響について検討を進めることが必要であろう。

E . 結論

酸化チタン及び酸化亜鉛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 / 酸化亜鉛ナノ材料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、この至適用量はナノ材料

ルのサイズや種類により異なることが示された。今後、ナノマテリアル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ことが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 安達玲子、木村美恵、酒井信夫、崔 紅艶、最上（西巻）知子、抗原感作に対する酸化チタンナノマテリアルの影響

第43回日本毒性学会学術年会（2016年6-7月）

2) 曹 永晩、水田保子、豊田武士、赤城純一、曾根瑞季、安達玲子、木村美恵、最上（西巻）知子、小川久美子、マウス経皮曝露モデルにおけるコレラトキシンのアジュバント作用の検討
第43回日本毒性学会学術年会（2016年6-7月）

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1:酸化チタンD(アナターズ型、粒子径:15 nm)

実験2 抗原の経皮感作に及ぼす酸化亜鉛の影響(1群5匹 x 8群)

| 群名 | 感作検体 | 共存物質 |
|-----------------|----------|--------------|
| V | PBS | — |
| OVA2 | OVA 2 µg | — |
| OVA2 ZnO 1.25mg | OVA 2 µg | 酸化亜鉛 1.25 mg |
| OVA2 ZnO 125µg | OVA 2 µg | 酸化亜鉛 125 µg |
| OVA2 ZnO 12.5µg | OVA 2 µg | 酸化亜鉛 12.5 µg |
| OVA2 ZnO 1.25µg | OVA 2 µg | 酸化亜鉛 1.25 µg |
| OVA2 ZnO 125ng | OVA 2 µg | 酸化亜鉛 125 ng |
| OVA2 ZnO 12.5ng | OVA 2 µg | 酸化亜鉛 12.5 ng |

※実験2:酸化亜鉛A(粒子径:25 nm)

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 |

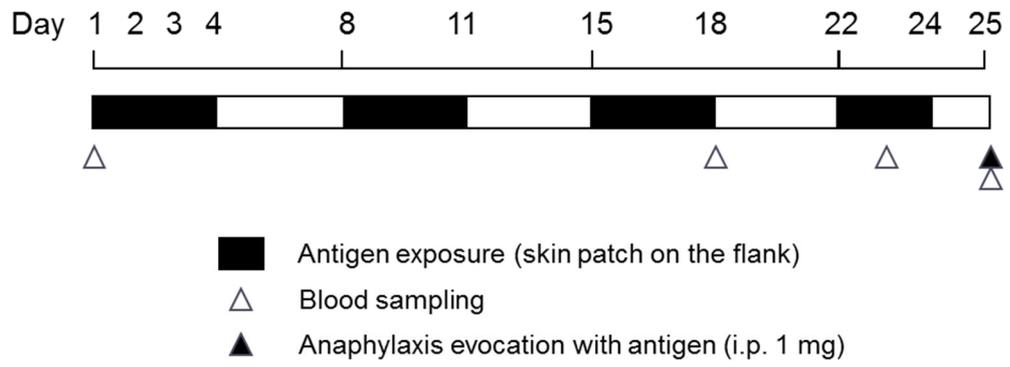
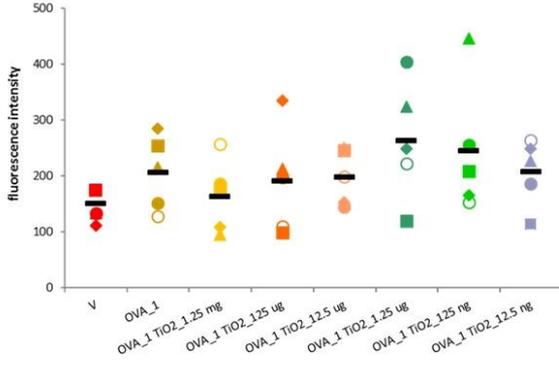
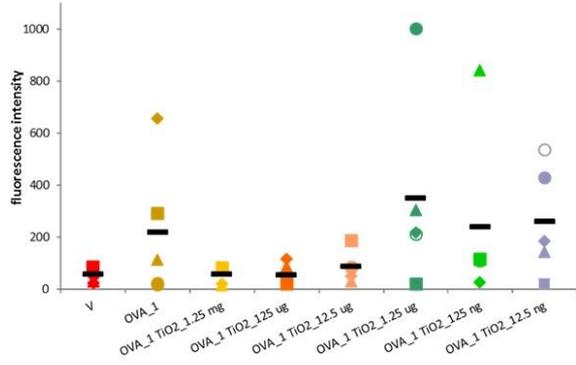


Figure 1 経皮感作試験スケジュール

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1



C. 抗原特異的IgG2a

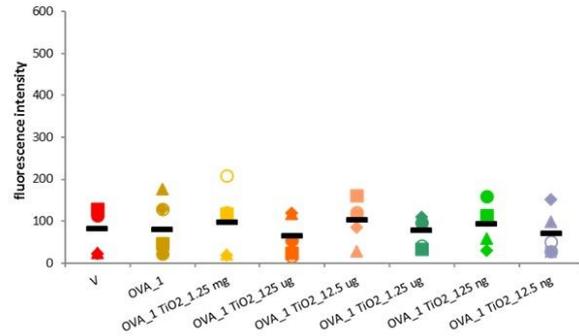
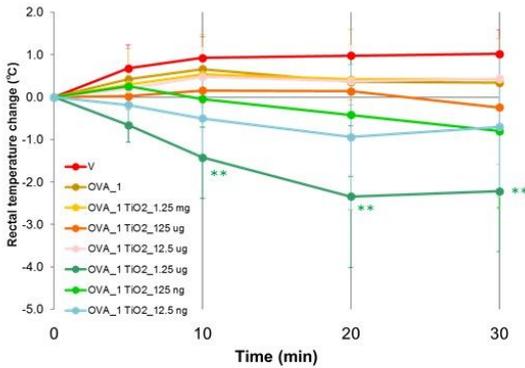
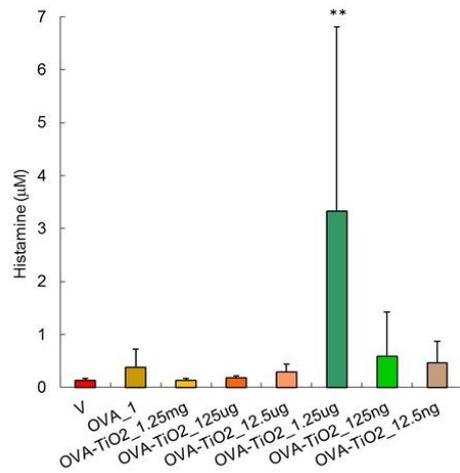


Figure 2 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験1】酸化チタンD)
各群の処理抗原(についてはTable 1)を示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

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

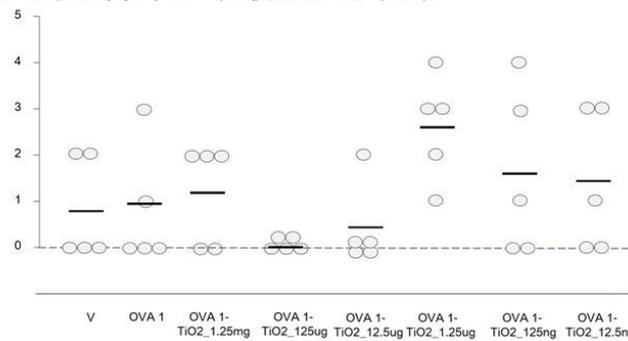
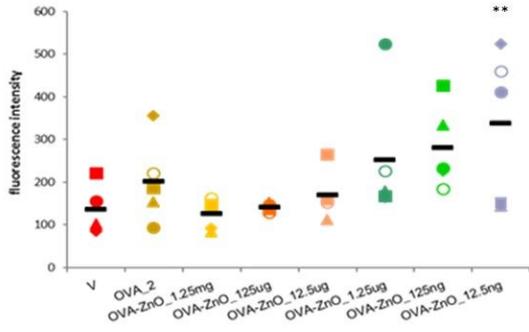


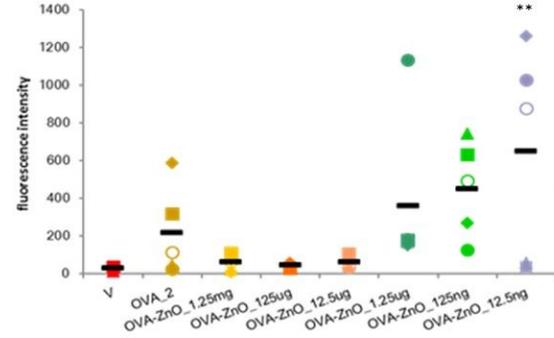
Figure 3 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験1】酸化チタンD)

A, B: 各群のデータをMean±S.D.で示す。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

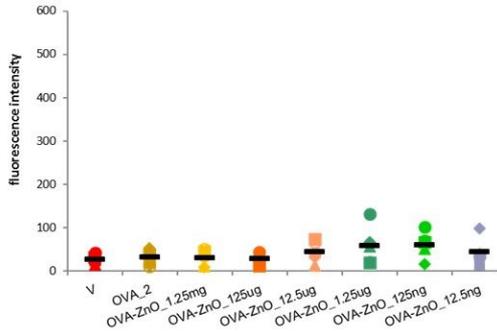
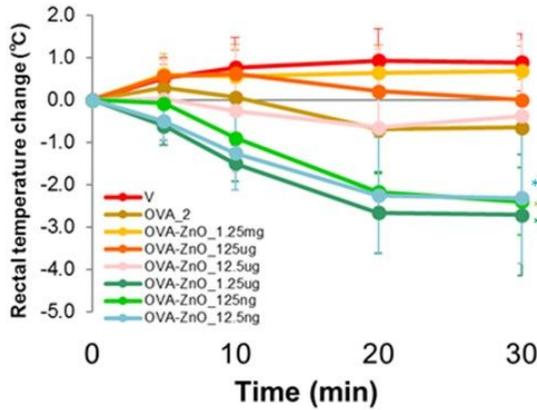


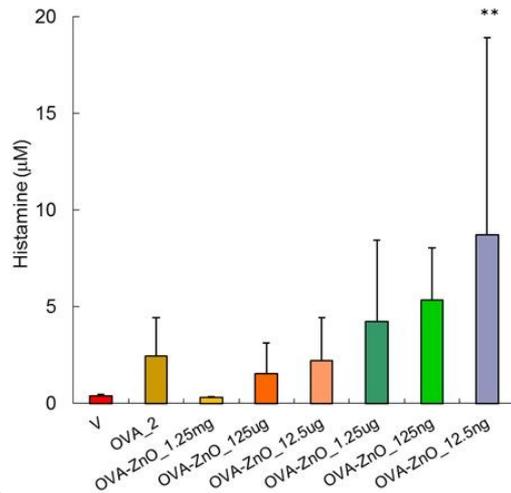
Figure 4 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生 (【実験2】酸化亜鉛A)

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。
** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. V 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

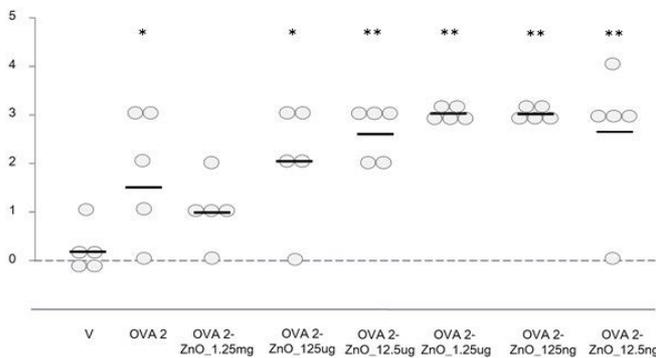


Figure 5 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起 (【実験2】酸化亜鉛A)

A, B: 各群のデータをMean \pm S.D.で示す。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。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. V group.