

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 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	田原麻衣子	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部	研究助手

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、蛍光顕微鏡を用いた汎用性の高い定量的分析法を開発した。

誘導剤によりヒト急性単球性白血病細胞株 THP-1 細胞を樹状細胞様細胞に分化させた後、蛍光標識抗原タンパク質(卵白アルブミン)及びナノマテリアル(酸化チタン)を培養液中に同時に共存させ、蛍光標識抗原タンパク質の抗原提示細胞への取込み量を画像解析した。位相差顕微鏡で接着細胞の総面積を定量化し、接着細胞面積当たりの蛍光色素量(取込み面積・積算輝度)を評価した結果、ナノマテリアルの共存によって抗原取込み量が抑制される傾向が認められた。前年度までの研究結果を併せて総括し、細胞培養液中に存在するナノマテリアルによる抗原提示細胞の活性化減弱に関しては、抗原提示におけるタンパク質の取込み自体を抑制していることが示唆された。

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、*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 26-27 年度に行った抗原提示細胞の細胞表面抗原発現量を指標とする評価において、ナノマテリアルが抗原提示細胞の活性化を減弱させる傾向が認められたことから、平成 28 年度は、

ナノマテリアルが抗原提示細胞の抗原取込みの段階において影響を及ぼすか否かを明らかにするため、蛍光顕微鏡を用いた汎用性の高い定量的分析法を新たに開発した。

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。抗原にはオボアルブミン (OVA; Sigma-Aldrich A5503) を、蛍光標識抗原には Alexa Fluor[®] 488 コンジュゲートオボアルブミン及び Alexa Fluor[®] 555 コンジュゲートオボアルブミン (Molecular Probes 034781 及び 034782) 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、12-well もしくは 24-well 培養プレートに 2.5 x 10⁵ cells/mL (12-well; 1mL/well, 24-well; 0.5 mL/well) の密度で播種し、終濃度 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。

THP-1-DC 細胞の抗原刺激

培養プレートに接着した THP-1-DC 細胞は、

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline [(PBS) Life Technologies] で 2 回洗浄した後、抗原 (0 及び 0.25 mg/mL) 及び TiO₂ (0, 0.1, 1 及び 10 µg/mL) を含む Complete 培地に加えることで抗原提示を行った。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。THP-1-DC 細胞の抗原刺激 (抗原-ナノマテリアル共培養) は、37°C, 5% CO₂ の条件下培養し、0-72 時間経時的に評価を行った。

蛍光顕微鏡を用いた抗原取込み量の解析

蛍光顕微鏡には BZ-X700 (キーエンス社) を用い、抗原取込み量の解析は付属するアプリケーションソフトウェア (BZ-X アナライザー及びハイブリッドセルカウント) を用いて定量分析を行った。対物レンズは倍率 20 倍 (S PL FL ELWD ADM 20xC) 固定とし、標準フィルターキューブ GFP で Alexa Fluor[®] 488、TRITC で Alexa Fluor[®] 555 コンジュゲートを褪色軽減モードで測定した。

0-72 時間の経時的な抗原刺激の後、遮光下 Complete 培地で 2 回、PBS で 2 回 well 内を洗浄し、THP-1-DC 細胞に取込まれなかった余剰な蛍光標識抗原と TiO₂ を除去した。洗浄後、直ちに蛍光顕微鏡に well 内の 50 - 75% コンフルエント領域を指定し、以下の測定条件で位相差画像及び蛍光画像を取得した。なお、培養プレートに付着し、洗浄で除去しきれなかった TiO₂ は解析ソフトウェアの領域整形設定で「不要領域の除去機能」を利用して定量総面積の対象から除外した。蛍光画像の取込みは、無標識のオボアルブミンをネガティブコントロールとして用いた。

【位相差画像の取込み条件】

- ・露光時間: 1/40 秒
- ・位相差閾値: 230
- ・穴埋め: 弱

- ・分離: OFF
- ・領域指定: OFF
- ・不要領域の除去: 面積 100 μm^2

【蛍光画像の取込み条件】

- ・露光時間: 1/10 秒
- ・輝度閾値: 10
- ・ぼかしフィルタ: ON
- ・明るさムラ除去: OFF
- ・領域指定: OFF
- ・分離: 100
- ・不要領域の除去: 面積 10 μm^2

【抗原取込み量の定量計算】

蛍光標識抗原の取込み量は以下の2法で評価した。

- ・面積割合による評価

$$\frac{[(\text{蛍光画像}) \text{ 抗原取込み総面積}] - (\text{ネガティブコントロールの抗原取込み総面積})}{[(\text{位相差画像}) \text{ THP-1-DC 細胞の総面積}]}$$

$$= \text{抗原取込み量 (\%)}$$

- ・輝度による評価

$$\frac{[(\text{蛍光画像}) \text{ 輝度積算値の総和}] - (\text{ネガティブコントロールの輝度積算値の総和})}{[(\text{位相差画像}) \text{ THP-1-DC 細胞の総面積}]}$$

$$= \text{抗原取込み輝度}$$

C. 研究結果

【検討1】 抗原取込み量の経時変化

THP-1-DC 細胞による蛍光標識抗原取込み量を評価するための培養時間を最適化する目的で、0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48, 72 時間後の画像を解析した (Figure 1)。

Alexa Fluor[®] 488 コンジュゲートオボアルブミンの使用 (0.25 mg/mL) においては、培養時

間 24 時間で抗原取込み量が 20.7%、抗原取込み輝度が 36.7 となり、その後 72 時間で抗原取込み量が 30.3%、抗原取込み輝度が 76.5 まで上昇した。他方、Alexa Fluor[®] 555 コンジュゲートオボアルブミンの使用 (0.25 mg/mL) においては、培養時間 24 時間で抗原取込み量が 40.5%、抗原取込み輝度が 91.8 となり、その後 72 時間で抗原取込み量が 40.5%、抗原取込み輝度が 124.3 まで上昇した (Figure 2)。72 時間以降の抗原取込み量について検討を加えたが、THP-1-DC 細胞の生細胞数と抗原タンパク質の蛍光色素量減衰が懸念されたため、以降の実験においても最長培養時間を 72 時間に固定した。無標識のオボアルブミンを用いた培養系においては、細胞の自家蛍光を含めた非特異的なバックグラウンドは観察されなかった。

【検討2】 TiO₂ 添加濃度の最適化

平成 26 - 27 年度に THP-1-DC 細胞培養系に共培養する TiO₂ 濃度を検討し、100 $\mu\text{g/mL}$ 以上の添加濃度においては、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することを明らかにしている。そこで、平成 28 年度の *in vitro* 評価系開発においては、TiO₂ 添加濃度を 0 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で条件の最適化を試みた (Figure 3)。

抗原刺激時間を 0, 4, 8, 12 時間とし、抗原取込み量を解析した結果、Alexa Fluor[®] 488 コンジュゲートオボアルブミン、Alexa Fluor[®] 555 コンジュゲートオボアルブミンの両方の使用において、TiO₂ 無添加と比較して TiO₂ 添加群における抗原取込み量の抑制傾向が認められた (Figure 4)。TiO₂ 添加濃度としては、0.1, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ の間に大差は認められなかったが、TiO₂ を 10 $\mu\text{g/mL}$ で添加した培養プレートの蛍光画像では、洗浄で除去しきれなかった TiO₂ 等のデブリスが多く観察されたことから、以降の実験における TiO₂ 添加濃度を 1 $\mu\text{g/mL}$ に固定した。

【検討3】 THP-1-DC細胞の抗原取込みにおけるTiO₂の影響

【検討1】および【検討2】で最適化した条件すなわち、抗原添加量 (0.25 mg/mL) 及びTiO₂ (0もしくは10 µg/mL)の共培養において、THP-1-DC細胞の蛍光標識抗原取込みにおけるTiO₂の影響を評価した (Figure 5)。

Alexa Fluor[®] 488 コンジュゲートオボアルブミンの使用において、TiO₂添加群は培養24時間で抗原取込み量が42.5%となり、以降48時間で52.5%、72時間で45.8%とほぼ飽和に達した。一方、TiO₂無添加群は培養24時間で抗原取込み量が45.3%とTiO₂添加群と同等であったが、その後48時間で69.5%、72時間で67.3%と上昇した。蛍光輝度を用いた評価においても同様に、培養24時間でTiO₂添加群は75.5、TiO₂無添加群は74.7と同等の抗原取込み量であったが、24時間以降の培養においてTiO₂無添加群の輝度は、培養48時間で118.3、培養72時間で131.4と上昇し続けて両者の差が顕著となった (Figure 6)。

Alexa Fluor[®] 555 コンジュゲートオボアルブミンの使用においても同様に、TiO₂添加群は培養24時間で抗原取込み量が42.7%となり、以降48時間で42.9%、72時間で43.4%と飽和に達した。一方、TiO₂無添加群は培養24時間で抗原取込み量が50.0%とTiO₂添加群と同等であったが、その後48時間で55.6%、72時間で58.3%と上昇した。蛍光輝度を用いた評価においても同様に、培養24時間でTiO₂添加群は87.1、TiO₂無添加群は88.9と同等の抗原取込み量であったが、24時間以降の培養においてTiO₂無添加群の輝度は、培養48時間で130.4、培養72時間で126.0と上昇し続けて両者の差が顕著となった (Figure 6)。

D. 考察

抗原提示細胞は、[1] 抗原の取込み、[2] 取込んだ抗原の分解・断片化 (プロセッシング)、[3] プ

ロセッシングした抗原 (ペプチド断片) を MHC クラス II 分子と結合させ、細胞表面に発現させる、[4] CD4 陽性 T 細胞 (ヘルパー T 細胞) に抗原認識させ、T 細胞を活性化する、という4つの過程の働きをする。平成26-27年度の検討において、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として、上述 [3] の細胞表面抗原の発現量を指標とした評価を進め、ナノマテリアル (TiO₂) は濃度依存的に抗原提示細胞の活性化を減弱させることを明らかにしてきた。平成28年度は、これらの機序として、抗原提示のトリガーとなる [1] 抗原取込みにおいてナノマテリアルが影響を及ぼすか否かを明らかにするため、蛍光顕微鏡を用いた新たな定量的分析法を開発した。

一般的に蛍光顕微鏡を用いた定量分析では、手動計算による蛍光発現細胞の選別が恣意的になる恐れがあるため、汎用性・再現性が高く客観的な定量化を行なうことが重要となる。また、バックグラウンドの明るさムラや、細胞の輪郭のコントラストの強弱が顕著な位相差画像においては細胞だけを正確に抽出することが困難である。そこで、これらの諸問題を解決した *in vitro* 評価系を構築するために、高精度定量化機能を具備した解析アプリケーションを利用した新たな *in vitro* 評価法を考案し、培養プレートに接着した THP-1-DC 細胞を位相差画像解析で総面積を定量し、蛍光画像解析で蛍光標識抗原の取込まれた総面積、及び輝度積算値の総和を評価軸とした。

構築した新規 *in vitro* 評価手法を用いて、ナノマテリアル (TiO₂) が抗原提示細胞の抗原取込みの段階において影響を及ぼすか否かを定量的に解析したところ、抗原の取込み量の顕著な抑制が認められ、これまでの抗原提示細胞の活性化の減弱を支持する結果を示した。抗原刺激時間においては、24時間以降の取込み抑制が観察された。Mellman らは、*in vivo* において外来

抗原の取込みからプロセシングに至るまで 72 時間を要し、ゆっくりとした抗原のプロセシングが免疫応答において重要であると報告している。【検討 1】の結果でも記述したとおり、蛍光標識抗原を用いた *in vitro* 評価系は蛍光色素量の減衰から培養時間 72 時間が限界となる。今後、新たな *in vitro* 評価系を構築するためには、蛍光強度の維持に加え、培養細胞の生存率を保持する条件検討が必要であると考えられた。

E. 結論

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、平成 28 年度は蛍光顕微鏡を用いた新たな定量的分析法を開発した。

THP-1-DC 細胞培養系に、蛍光標識抗原タンパク質及びナノマテリアルを同時に共存させ、蛍光標識抗原タンパク質の抗原提示細胞への取込みを画像解析した。位相差顕微鏡で接着細胞の総面積を定量化し、接着細胞面積当たりの蛍光量を評価した結果、ナノマテリアルの共存によって抗原取込み量が抑制されることを明らかにした。前年度までの研究結果を併せて総括し、細胞培養液中に存在するナノマテリアルによる抗原提示細胞の活性化減弱に関しては、抗原提示におけるタンパク質の取込み自体を抑制していることが示唆された。

【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 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) Mellman I. Antigen processing and presentation by dendritic cells: cell biological mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* **560**, 63-67 (2005)

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

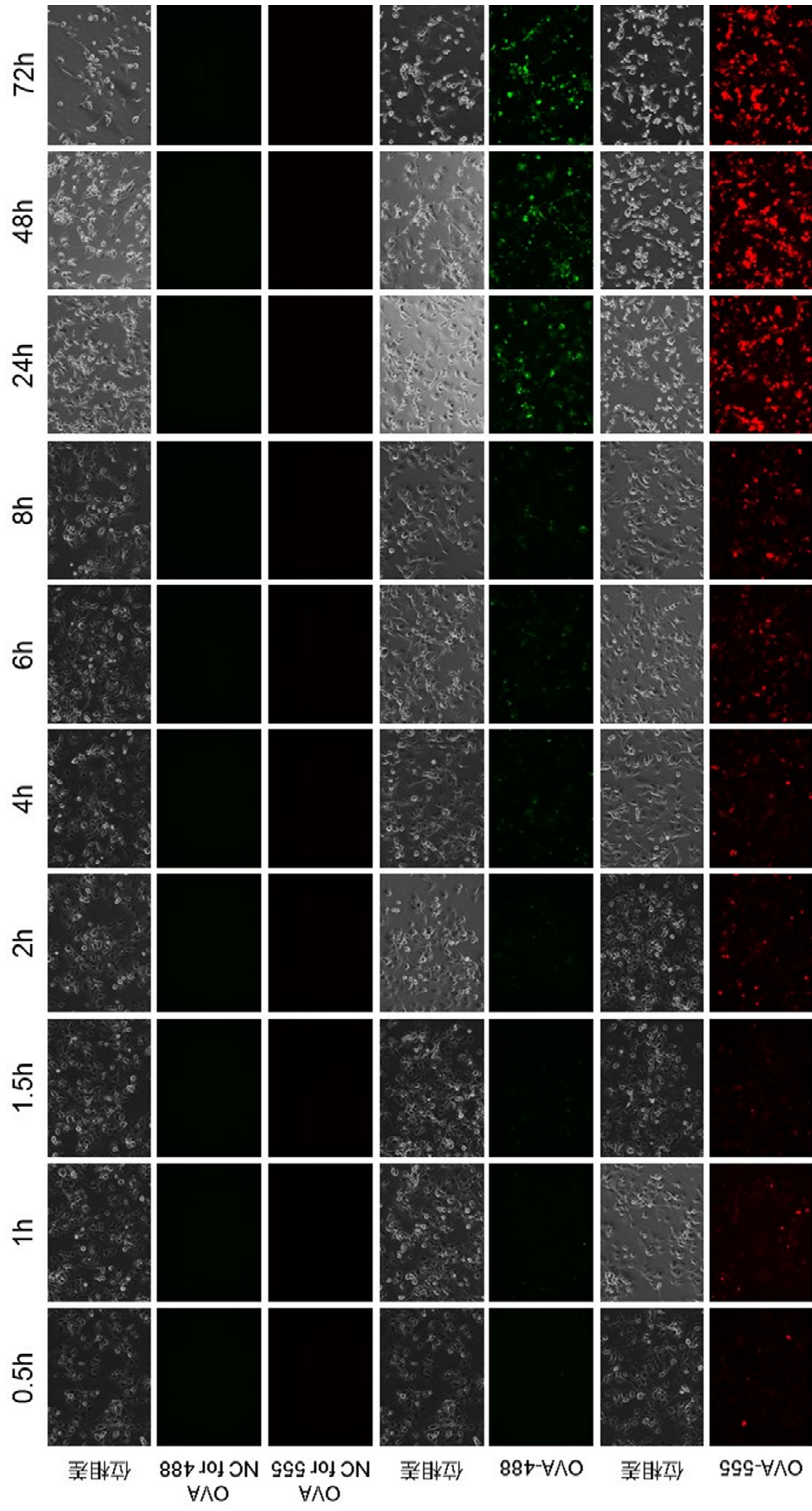


Figure 1 【検討1】 抗原取込み量の経時変化

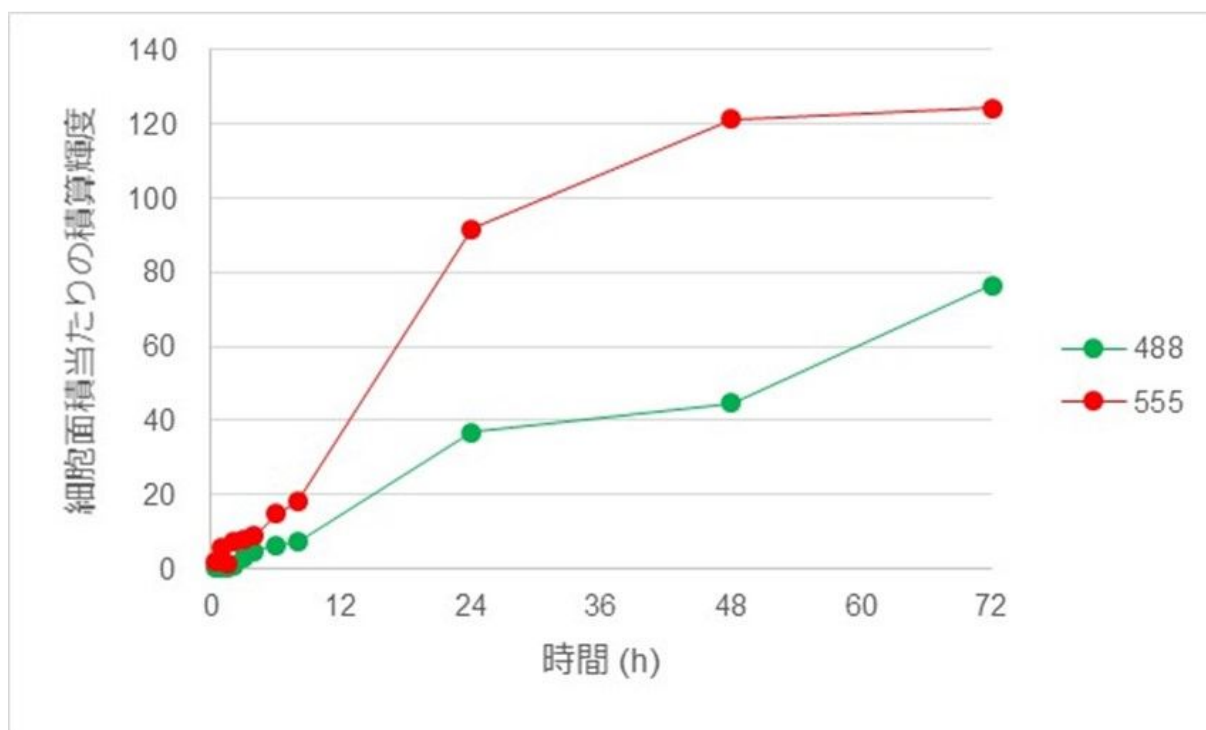
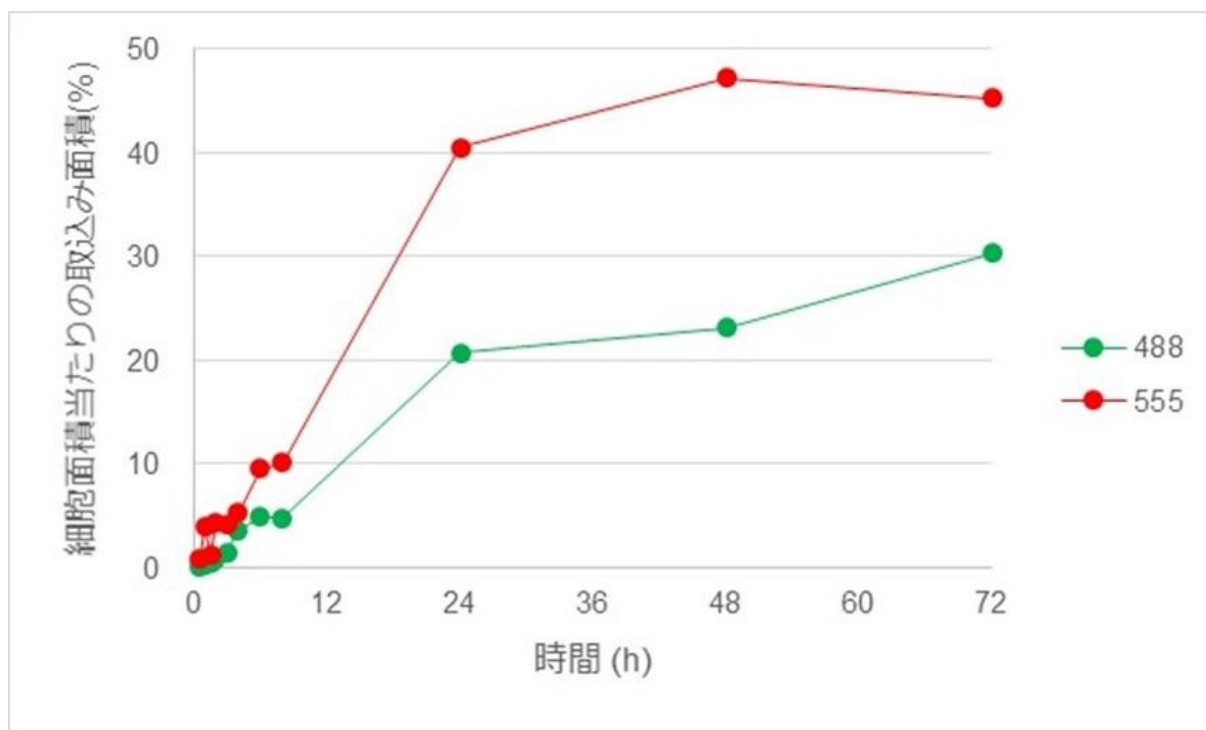


Figure 2 【検討1】 抗原取込み量の経時変化

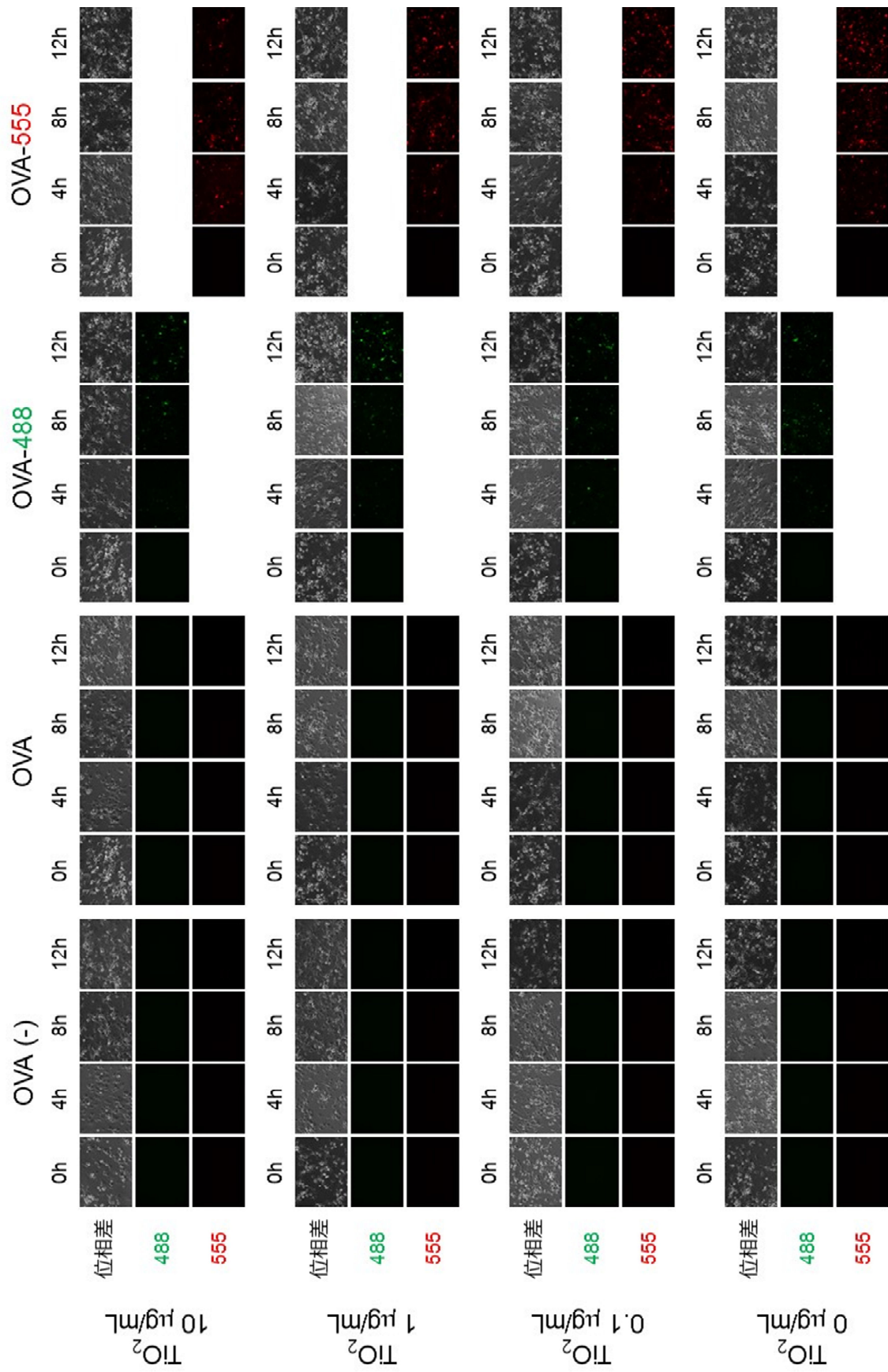


Figure 3 【検討2】 TiO_2 添加濃度の最適化

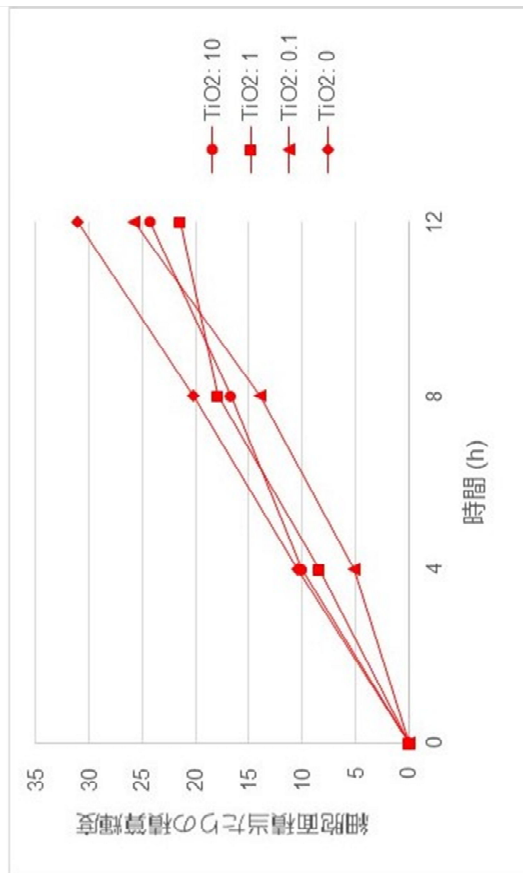
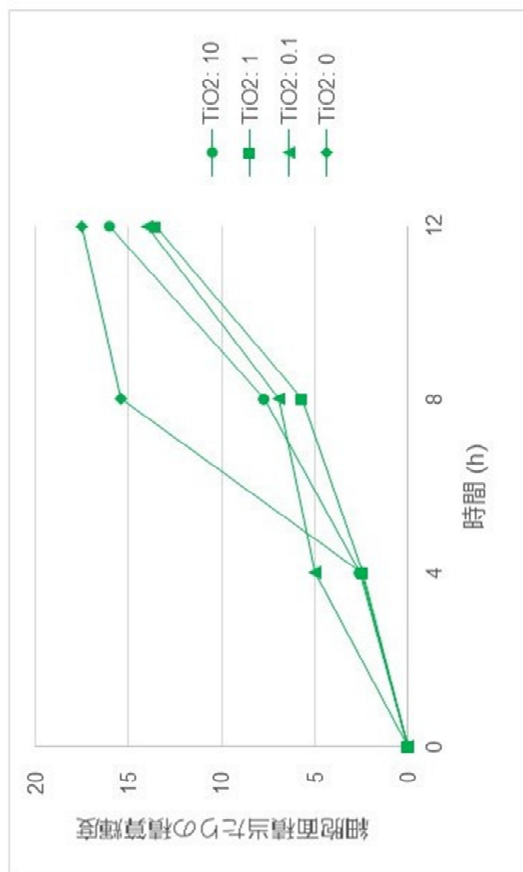
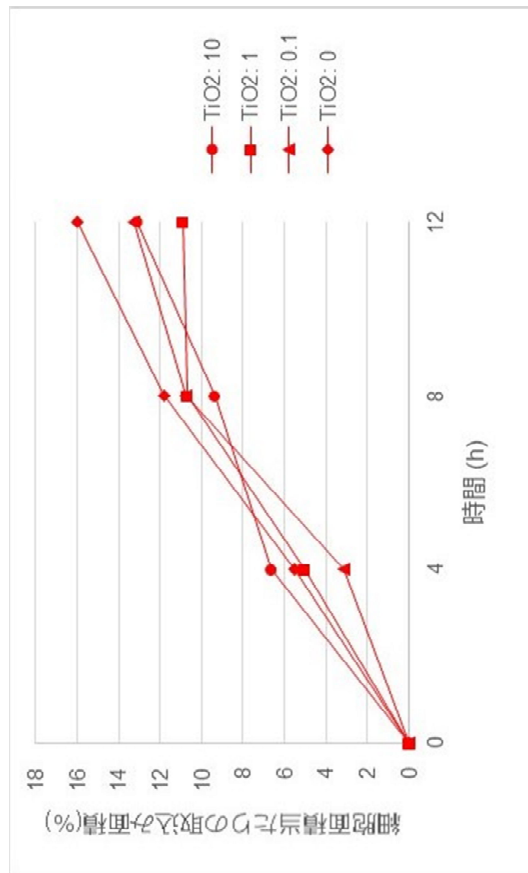
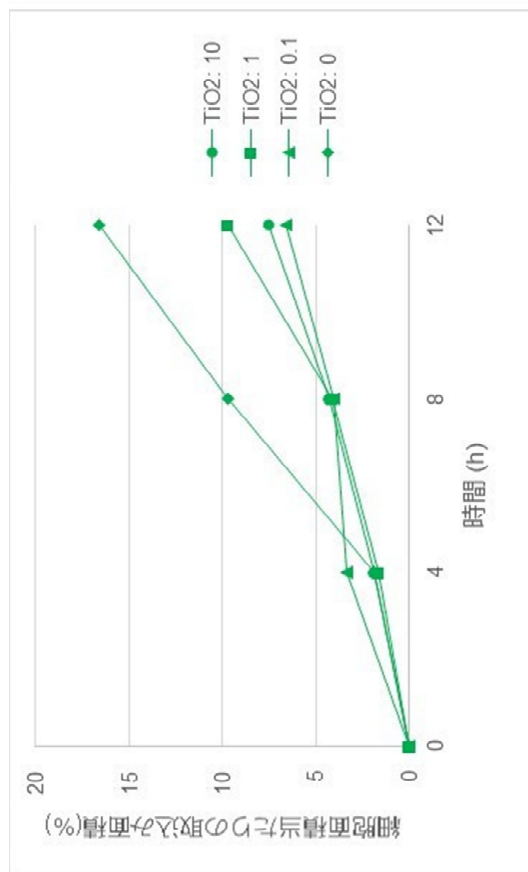


Figure 4 【検討2】 TiO₂添加濃度の最適化

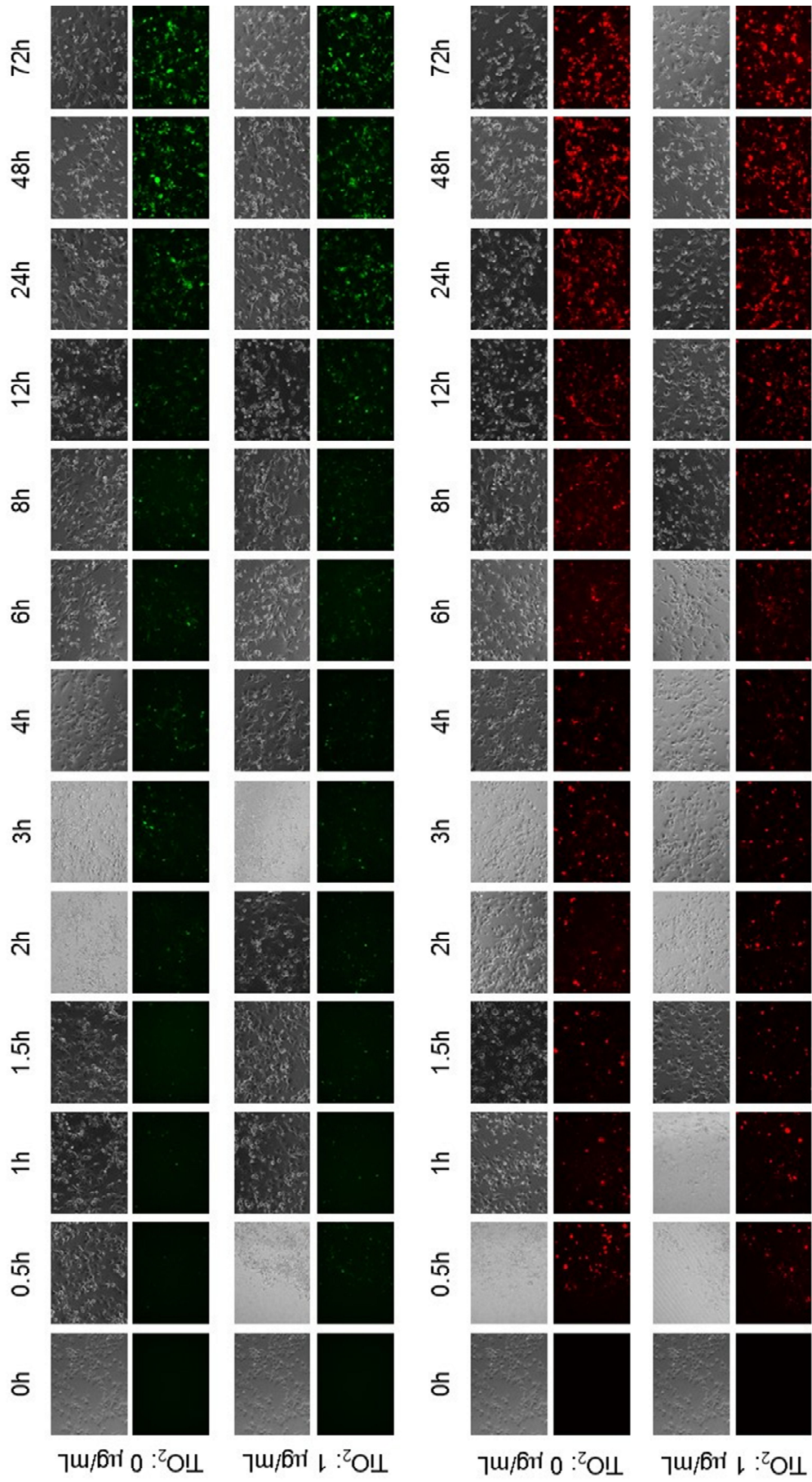


Figure 5 【検討3】 THP-1-DC細胞の抗原取込みにおける TiO_2 の影響

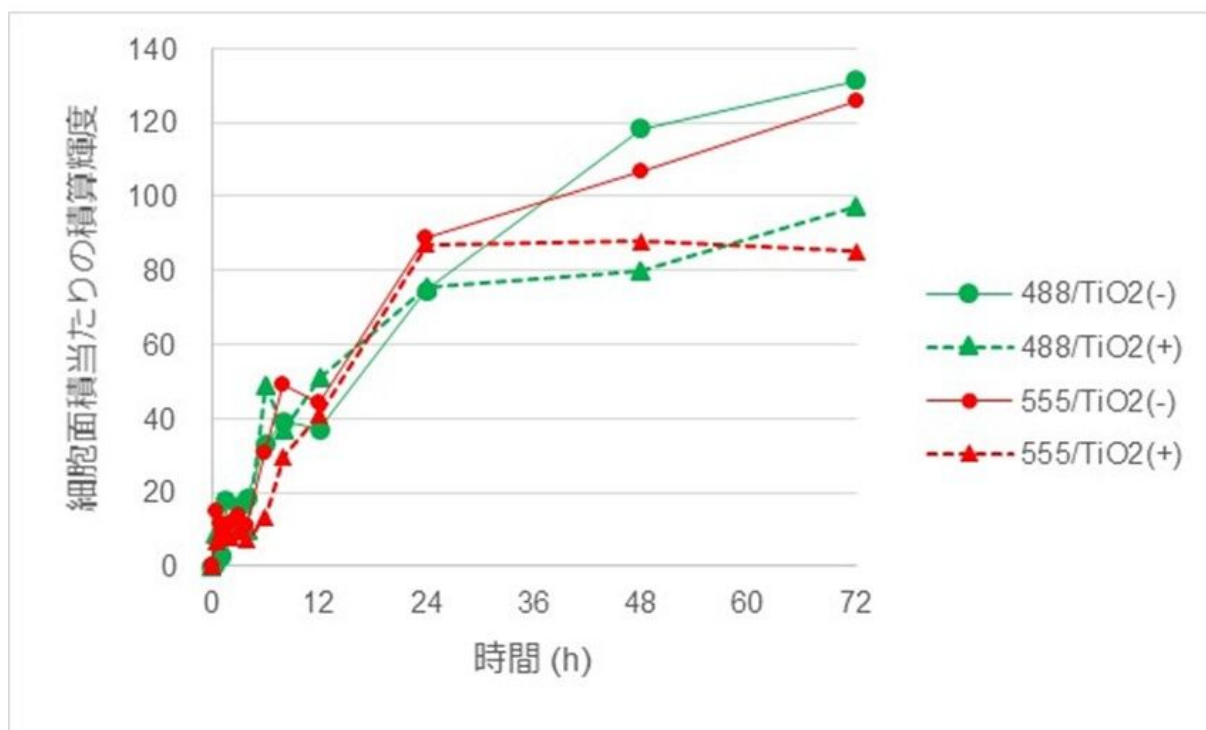
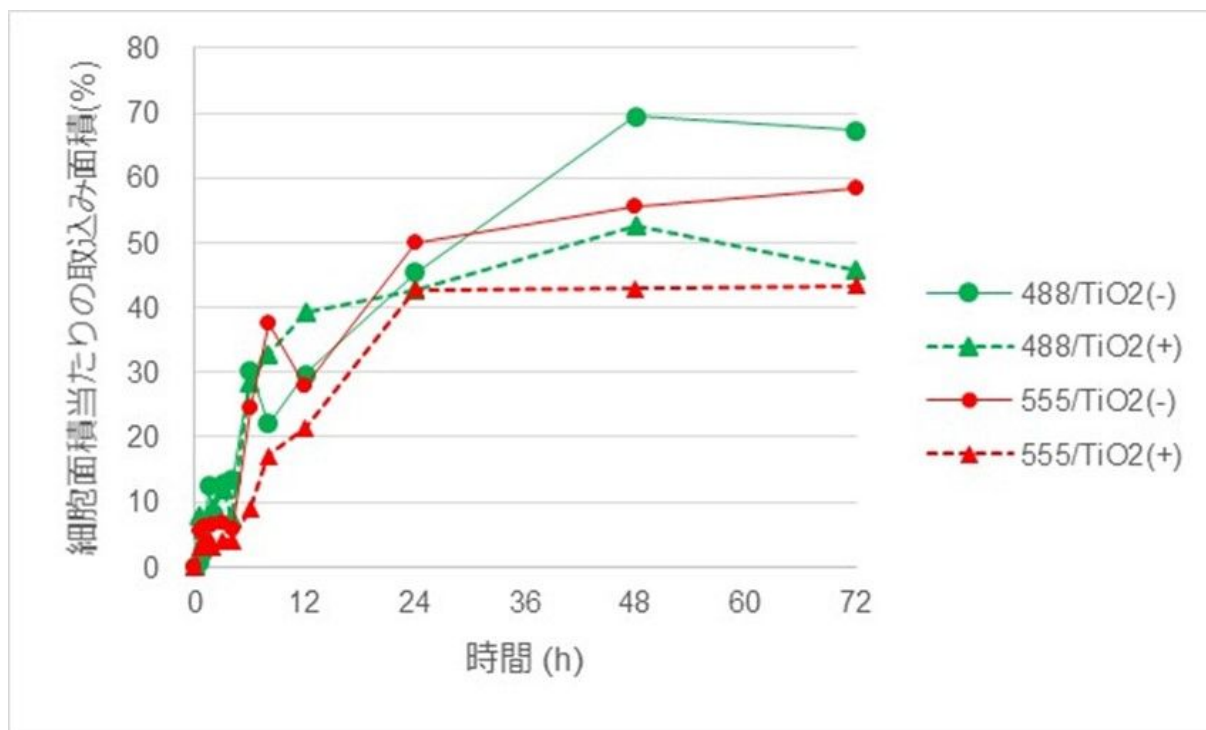


Figure 6
【検討3】 THP-1-DC細胞の抗原取込みにおけるTiO₂の影響