

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28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29年3月

目 次

・ 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

・ 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 11

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 21

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 32

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

. 37

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。ナノマテリアルとしては、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）、酸化チタン D（アナターゼ型、粒子径：15 nm）及び酸化亜鉛 A（粒子径：25 nm）を用いた。

[I] 26-27 年度においては、抗原の腹腔内投与による感作において、酸化チタン A-C 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、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、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）が存在することが示された。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。

[II] 抗原提示細胞による抗原取込みに対するナノマテリアルの影響を評価するため、蛍光顕微鏡を用いた汎用性の高い定量的分析法を開発した。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結果、ナノマテリアルの共存によって抗原取込みが抑制される傾向が示された。

[III] 26-27 年度においては、*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、THP-1 マクロファージにおいて、酸化チタンナノマテリアル A-C がいずれも IL-1 と同様に、NLRP3 インフラマソーム依存的に TNF 産生を促進する応答を見いだしている。28 年度はその解析を行い、酸化チタンが産生する IL-1 の autocrine 作用により TNF 産生が促進される機序を明らかにした。一方、IL-1 産生促進において酸化チタンのルチル型・アナターゼ型の顕著な違いは認められず、酸化

亜鉛ナノ材料は IL-1・TNF 産生に全く効果を示さないことが判明した。

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材料の効果について更なる検討を進めることが必要である。

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材料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。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。

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 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 を産生することを報告しており、酸化チタン等のナノ材料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、[I] 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材料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材料の *in vitro* アジュバント活性評価法の検討を行う。

26-27 年度の検討においては、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、抗原の経皮感作において酸化チタンナノ材料の共存により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、抗原提示細胞の免疫応答において酸化チタンナノ材料の共存により抗原提示細胞活性化が減弱する傾向があること、酸化チタンのマクロファージへの曝露により、NLRP3 イン

フラマソームを介する濃度依存的な IL-1 及び TNF 産生が促進されること、この応答が NLRP3 を介すること、等の知見が得られている。

これらの結果を受け、28年度は、抗原経皮感作増強効果における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マテリアルの共存効果に関する検討、抗原提示細胞への抗原取込みに対するナノマテリアルの影響に関する蛍光顕微鏡を用いた検討、ナノマテリアルによる NLRP3 を介する TNF 産生促進の機構に関する検討、IL-1 産生における酸化チタンの結晶型の違いによる影響及び酸化亜鉛の効果に関する検討、表皮ケラチノサイトにおける NLRP3 インフラマソームに関する基礎的検討等を実施した。

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マテリアル(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、上記3種に加え、下記の酸化チタンナノマテリアル(表面未処理)及び酸化亜鉛ナノマテリアルを新たに用いた。

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)

陽性対照として多層カーボンナノチューブ MWCNT-SD1 (長さ 8 μ m, 径 150 nm) を用いた。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。抗原タンパク質としては、卵白アルブミン (OVA; Sigma-Aldrich 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。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

各種ナノマテリアルは 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 回繰り返して、ピペティング、25G シリンジ通過により分散した。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及び酸化亜鉛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/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測定、及びアナフィラキシー症状スコアリングを行った。惹起 30 分後に採血し、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 THP-1 細胞は、ATCC (American Type Culture Collection) より入手した。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 の条件下で培養した。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、PBS 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刺激を行った。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 BZ-X700 (キーエンス社) を用い、抗原取込み量の解析は付属アプリケーションを用いて行った。Alexa Fluor® 488, TRITC で Alexa Fluor® 555 コンジュゲートの蛍光を測定した。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 回細胞を洗浄し、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。洗浄後直ちに位相差画像及び蛍光画像を取得した。蛍光画像の取込みにおいては、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。蛍光標識抗原の取込み量 (%) 及び取込み輝度は以下の方法で評価した。

- ・面積割合による評価 (抗原取込み量(%))

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

- ・輝度による評価 (抗原取込み輝度)

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

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 0.3µM 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、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。

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 (Epilife, HKGS 含有) で 6 日間コンフルエントまで培養し、分化培地 (Epilife, 1.2mM Ca²⁺ 含有) でさらに 24 時間培養した。LPS (0, 25 あるいは 125pg/mL) を 6 時間あるいは 24 時間曝露したのち、5µM ionomycin (1.5mM Ca²⁺ 含有 Epilife 培地) でインフラマソームを活性化した。2 時間後に培地上清を回収し、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。

(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動物施設利用規定に従った。

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

本分担研究においては、27年度までに、OVA 貼付量を一定 ($1-2 \mu\text{g}$) にし、酸化チタン量を $12.5\text{ng} \sim 1.25\text{mg}$ 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。

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 15nm) 及び酸化チタン C (アナターゼ型、粒子径 6nm) 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: 15nm) の経皮感作増強効果について検討した。また、酸化亜鉛ナノマテリアル (粒子径: 15nm) の効果についても同様に検討を行った。

酸化チタン D (アナターゼ型) の共存効果

OVA1 群 (OVA $1 \mu\text{g}$ 貼付)、TiO₂ $1.25 \mu\text{g}$ 群、TiO₂ 125ng 群、及び TiO₂ 12.5ng 群 (OVA $1 \mu\text{g}$ +それぞれ記載量の酸化チタンを貼付) 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。経皮感作終了後の抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー惹起において、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 $1.25 \mu\text{g}$ 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。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、TiO₂ $1.25 \mu\text{g}$ 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。アナフィラキシー症状に関しては、OVA1 群では V 群とほぼ同程度のスコアであったのに対し、TiO₂ $1.25 \mu\text{g}$ 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 $1 \mu\text{g}$ を貼付して経皮感作を行う際に、酸化チタン D を $1.25 \mu\text{g}$ 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。

酸化亜鉛 A の共存効果

OVA2 群 (OVA $2 \mu\text{g}$ 貼付) 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 (OVA $2 \mu\text{g}$ +記載量の酸化亜鉛を貼付) 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 $1.25 \mu\text{g}$ 群、ZnO 125ng 群でも IgE、IgG1 の産生が増大する傾向が見られた。経皮感作終了後の抗原腹腔内投与によるアナフィラキシー惹起において、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 $1.25 \mu\text{g}$ 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 OVA2 群との有意

差は見られなかった)。血清中ヒスタミン濃度に関しては、OVA2 群では V 群と比較して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。アナフィラキシー症状スコアに関しては、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)。

III] 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

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。Alexa Fluor® 488 コンジュゲートオボアルブミンを使用した場合は、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。Alexa Fluor® 555 コンジュゲートオボアルブミン (0.25 mg/mL) を使用した場合は、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。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。

TiO₂ 添加濃度の最適化

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。TiO₂ 添加濃度としては、0.1,

1, 10 µg/mL の間に大差は認められなかったが、TiO₂ を 10 µg/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 µg/mL に固定した。

THP-1-DC 細胞の抗原取込みにおける TiO₂ の影響

前述の検討で最適化した条件 (抗原量 0.25 mg/mL 及び TiO₂ 10 µg/mL の添加) 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。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。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。

【III】 ナノ材料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

酸化チタンナノ材料による TNF 産生促進の機構

27年度の研究において、酸化チタンナノ材料 A~C 暴露により TNF が産生されること、さらにこの応答は NLRP3 ノックダウンおよび caspase-1 阻害により抑制され、IL-1 分泌と同様に NLRP3 インフラマソームを介することを明らかにした。28年度は酸化チタンによる TNF 産生促進の機構を解析した。酸化チタン A による TNF 産生は、I- B キナーゼ阻害剤である ML120B により完全に抑制され、IL-1 受容体アンタゴニストの共存によっても抑制された。したがって、酸化チタンにより分泌される IL-1 が IL-1 受容体を活性化し、autocrine 作用により NF- B 活性化を介して TNF が産生される機序が推察される。

酸化チタンナノ材料の物理化学的形状の影響

酸化チタンナノ材料の結晶型の違いが IL-1 産生に及ぼす影響を、同一の平均一次粒子径(15nm)を有するルチル型の酸化チタン A とアナターゼ型の酸化チタン D を用いて比較検討したところ、どちらもほぼ同程度の IL-1 分泌促進を示した。

一方、平均一次粒子径 25nm の酸化亜鉛ナノ材料については、5~50 µg/mL、あるいは 50~250 µg/mL の濃度範囲において検討を行ったが、IL-1 ならびに TNF 産生の促進効果は全く認められなかった。

ケラチノサイトを用いた評価手法の検討

27年度、培養ヒトケラチノサイトを用い、酸化チタンナノ材料による IL-1 ならびに IL-1 分泌促進の可能性を検討したが、酸化チタン粒子のみならず、NLRP3 インフラマソ

ームを直接活性化することが知られている nigericin や ATP 刺激によっても IL-1・TNF 産生は全く認められなかった。ヒトケラチノサイトでは NLRP3 の mRNA 発現量が、THP-1 マクロファージの 0.1~0.5%と著しく低いことが判明したことから、28年度は、NLRP3 などインフラマソーム関連遺伝子発現の誘導(priming)を試みた。ヒトケラチノサイトを 1.2 mM カルシウム処理により分化誘導し、さらに代表的な priming 剤である LPS を 6 時間あるいは 24 時間処理したが、NLRP3、IL-1 前駆体、caspase-1 の mRNA レベルはやや低下、あるいは全く影響されなかった。引き続きケラチノサイトでのインフラマソーム活性化の報告がある ionomycin を用いて刺激を行ったが、培地中に IL-1 β 、IL-1 α は全く検出されなかった。

D. 考察

本研究班では、酸化チタン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、[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] 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。

[I]に関して、26-27年度においては、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、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、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:6nm、至適用量:125ng)であり、酸化チタンA(ルチル型、粒子径:15nm、至適用量:12.5 μ g)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:15nm)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 μ g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、酸化亜鉛ナノマテリアル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 μ g~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。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、粒子径が小さいナノマテリアルを皮膚に適用する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マテリアルの影響について検討を進めることが必要であろう。

[II]に関して、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、酸化チタンナノマテリアル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ッシングに至るまで 72 時間を要し、ゆっくりとした抗原のプロセッシングが免疫応答において重要であると報告している。研究結果の項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。

[III]に関して、抗原免疫時に Alum がアジュバント作用を発揮する際には、炎症性サイトカイン IL-1 産生を誘導する NLRP3 インフラマソームが決定的な役割を果たすことが報告されている。27 年度までに THP-1 マクロファージを用い、Alum ならびに 3 種類の酸化チタンナノ材料がいずれも、濃度に応じて NLRP3 依存的に IL-1 産生を促進することを明らかにした。引き続き炎症性サイトカイン TNF ならびに IL-6 の分泌も促進され、TNF α 分泌応答も NLRP3 インフラマソームに依存することを見いだしている。

28 年度は TNF 産生促進の機構を解析した。TNF 産生については、TLR 刺激が NF- κ B 活性化・転写誘導を介して産生を促進する経路が知られている。実際、酸化チタンナノ材料による産生は NF- κ B 阻害剤により完全に抑制され、さらに IL-1 受容体アンタゴニストによっても抑制されることが判明した。したがって、酸化チタンが直接 NF- κ B を活性化するよりはむしろ、酸化チタンが NLRP3 を活性化して産生された IL-1 が、autocrine により二次的に IL-1 受容体を活性化し、NF- κ B 活性化を介して TNF 分泌を誘導した可能性が強く示唆される。

この結果はまた、獲得免疫誘導における NLRP3 の重要性を強く支持すると考えられる。

一方、酸化チタンナノ材料の結晶型の違いによる影響を、同一の平均一次粒子径 (15nm) を有するルチル型とアナターゼ型と比較したが、IL-1 産生促進の効果は同程度であった。また、酸化亜鉛ナノ材料は IL-1 ならびに TNF 産生を全く誘導しなかった。HUVEC では高濃度の酸化亜鉛ナノ材料がアポトーシスを誘導する報告から、より低濃度までの検討も行ったが、IL-1・TNF は産生されなかった。

27 年度までの成果から、サイズが小さい酸化チタン粒子は経皮暴露において表皮ケラチノサイトのインフラマソームを直接活性化する可能性が考えられる。そこで培養ヒトケラチノサイトでの NLRP3 活性化/IL-1 産生への影響を解析したが、ケラチノサイトには NLRP3 が全く発現せず、酸化チタン A~C や ionomycin 刺激により IL-1 産生促進は全く認められなかった。一部の報告では、UV 照射により表皮ケラチノサイトの NLRP3 インフラマソームが誘導されることから、ケラチノサイトでは IL-1 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” が必要と考えられた。そこで 28 年度はケラチノサイトの分化誘導処理や priming 効果の知られる LPS 処理を試みたが、NLRP3 は全く発現誘導されなかった。一方、ケラチノサイトの IL-1 前駆体の発現量は THP-1 マクロファージの 20~40%、caspase-1 は 220~300% に相当することから、ケラチノサイトにインフラマソームは存在するものの、酸化チタン A~C 刺激には応答しないタイプのインフラマソームと推定される。関連論文を精査すると、ケラチノサイトではウィルス感染時などに NLRP3 以外のインフラマソームが機能する可能性が示唆されている。

E . 結論

酸化チタン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] 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 / 酸化亜鉛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、この至適用量はナノマテリアルのサイズや種類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、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。27 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。

マクロファージ系培養細胞において、酸化チタンが autocrine 作用により TNF 産生を促進する機構を明らかにした。IL-1 ・ TNF 産

生において、酸化チタンのルチル型・アナターゼ型による顕著な違いは認められず、酸化亜鉛ナノマテリアルは全く効果を示さなかった。

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. 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

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

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

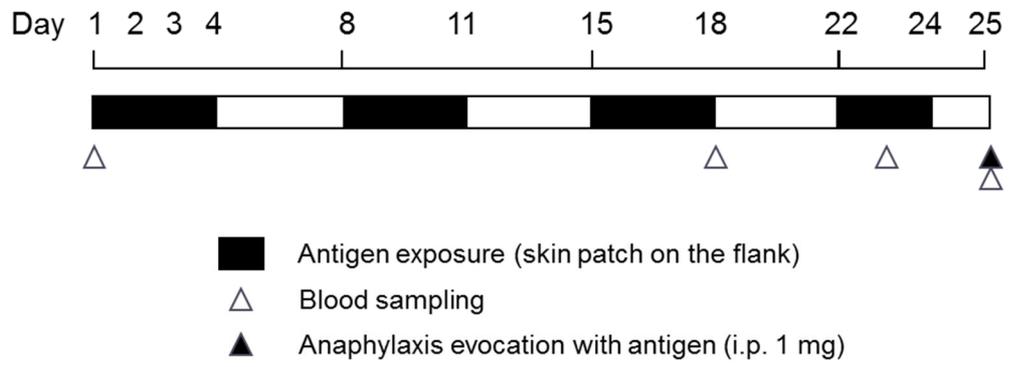
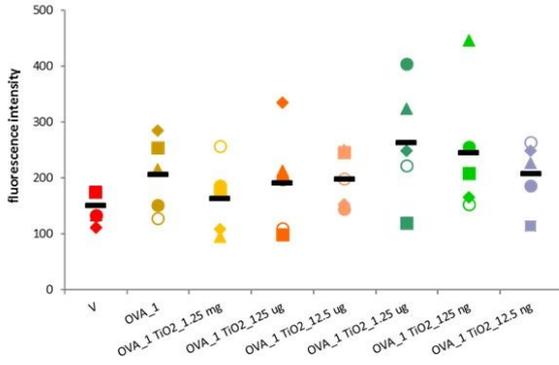
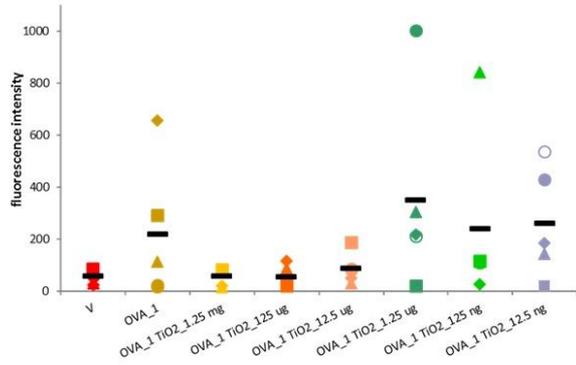


Figure 1 経皮感作試験スケジュール

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1



C. 抗原特異的IgG2a

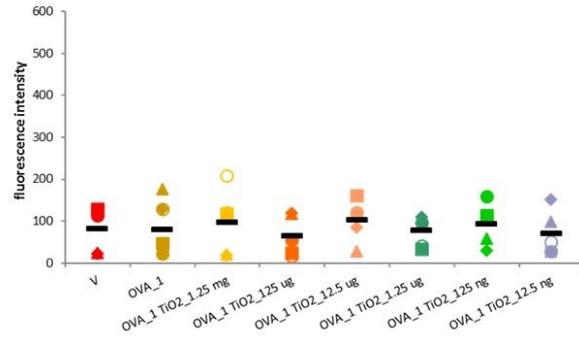
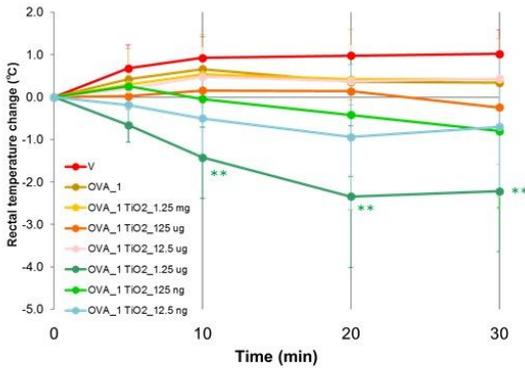
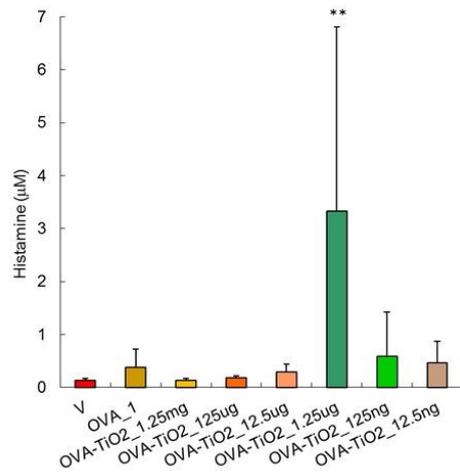


Figure 2 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験1】酸化チタンD)
各群の処理抗原(についてはTable 1)を示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

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

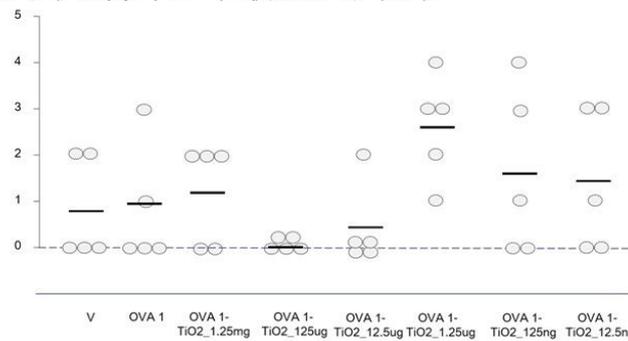
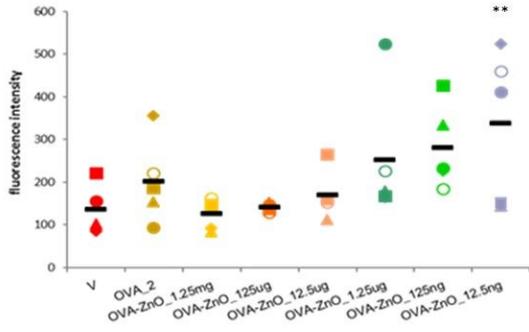


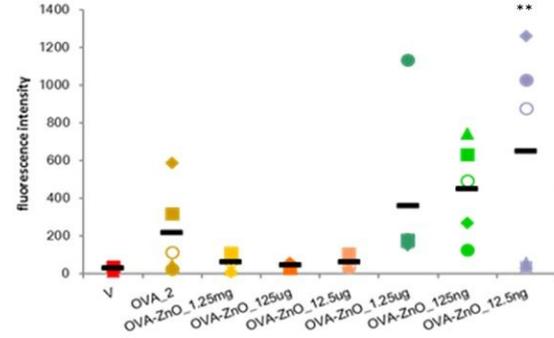
Figure 3 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験1】酸化チタンD)

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

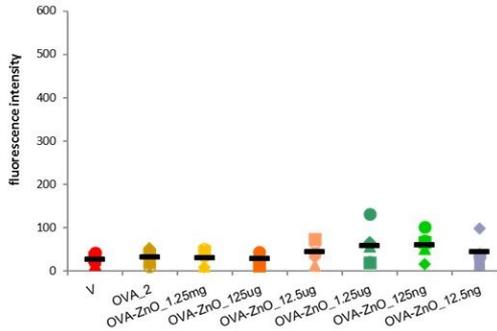
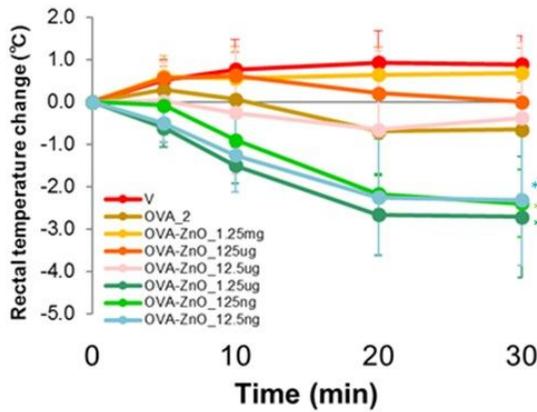


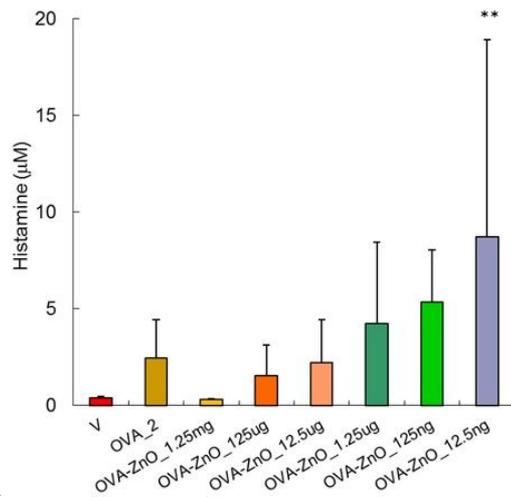
Figure 4 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生 (【実験2】酸化亜鉛A)

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

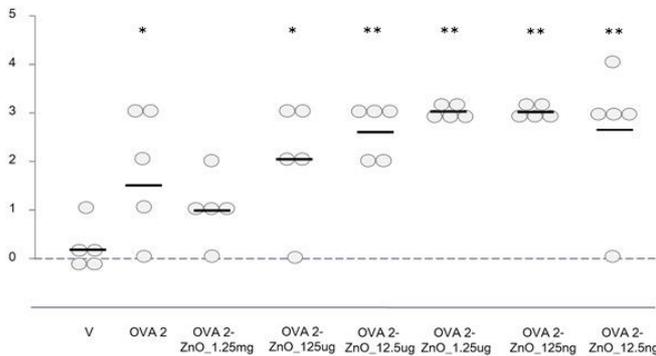


Figure 5 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起 (【実験2】酸化亜鉛A)

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.

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

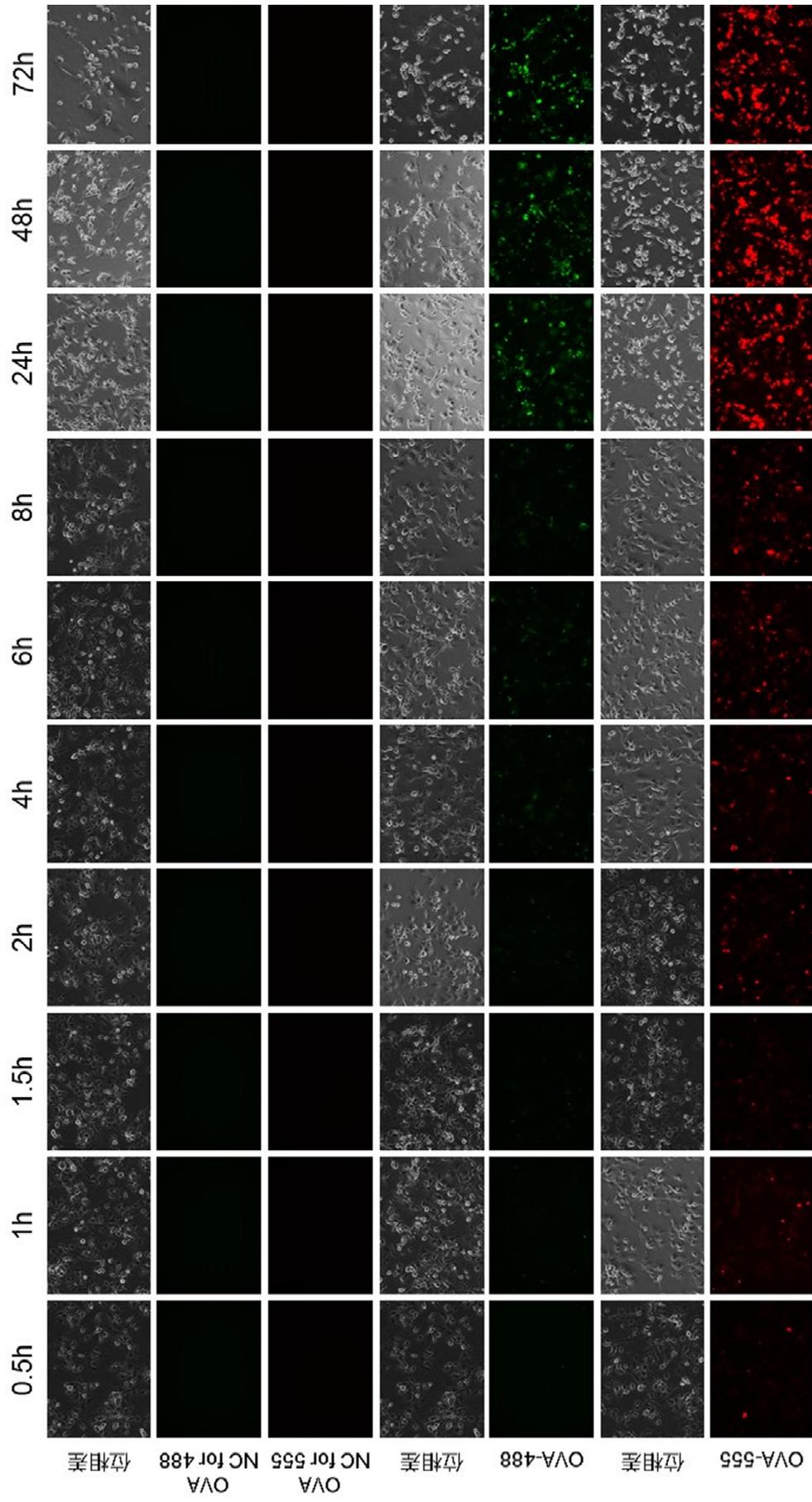


Figure 1 【検討1】 抗原取込み量の経時変化

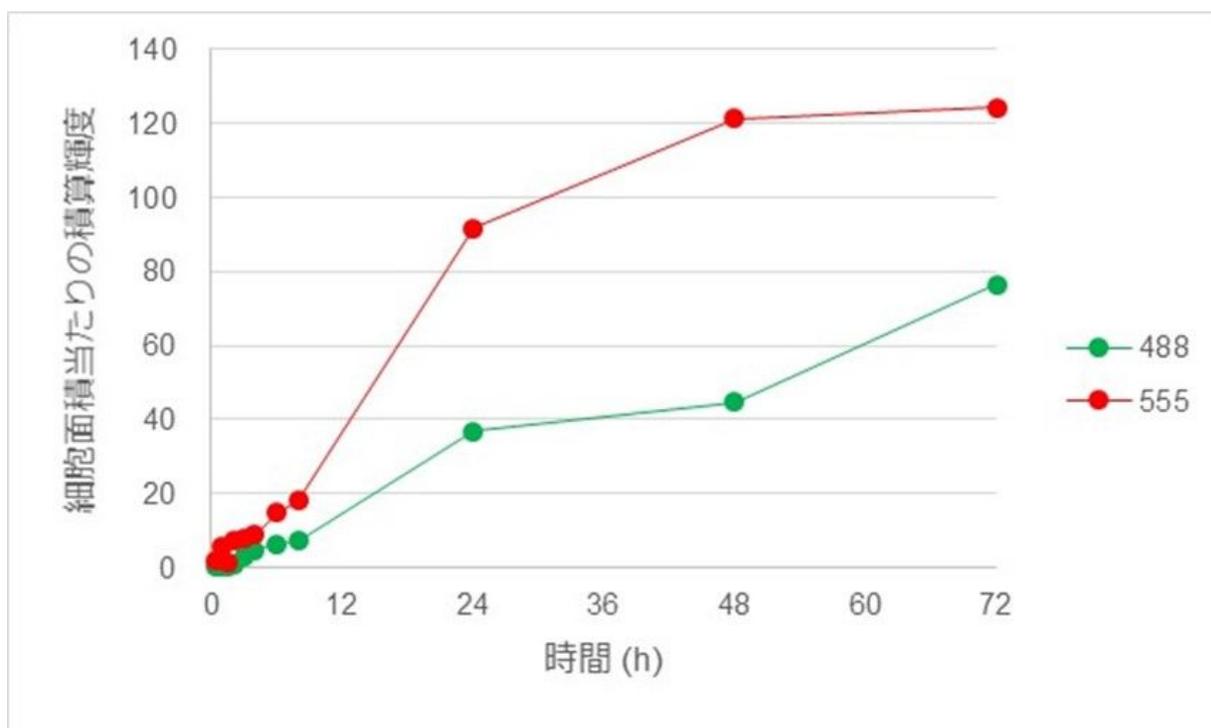
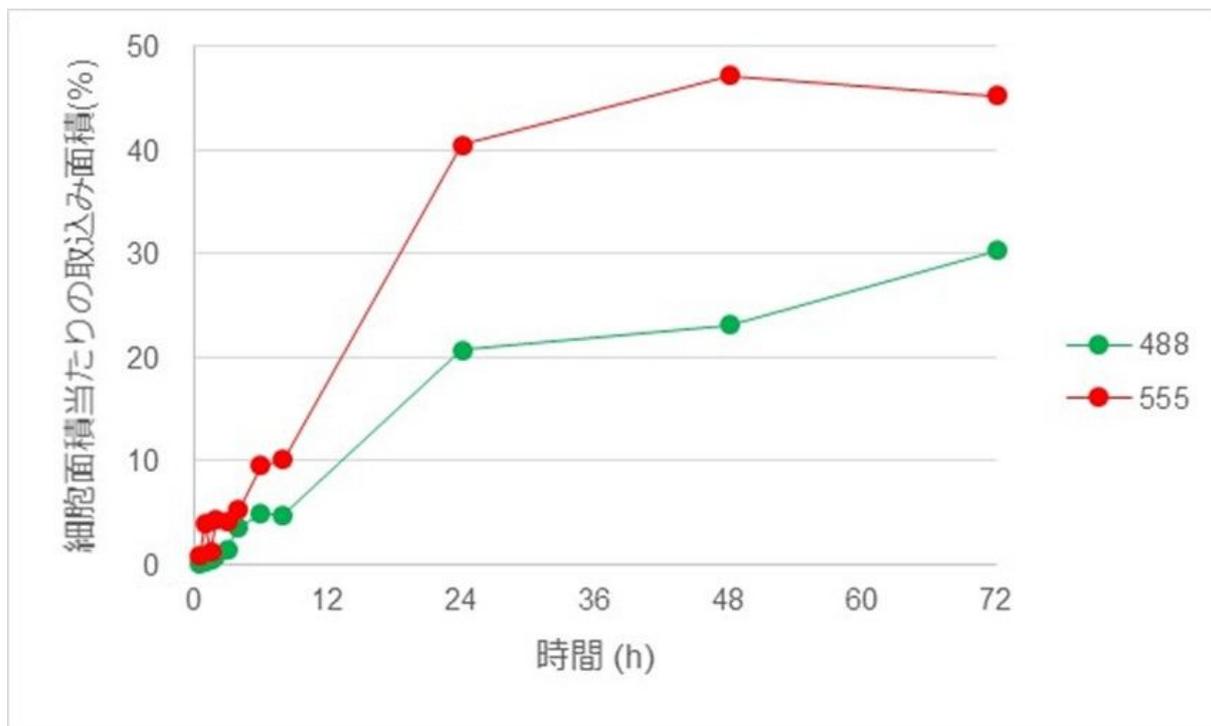


Figure 2 【検討1】 抗原取込み量の経時変化

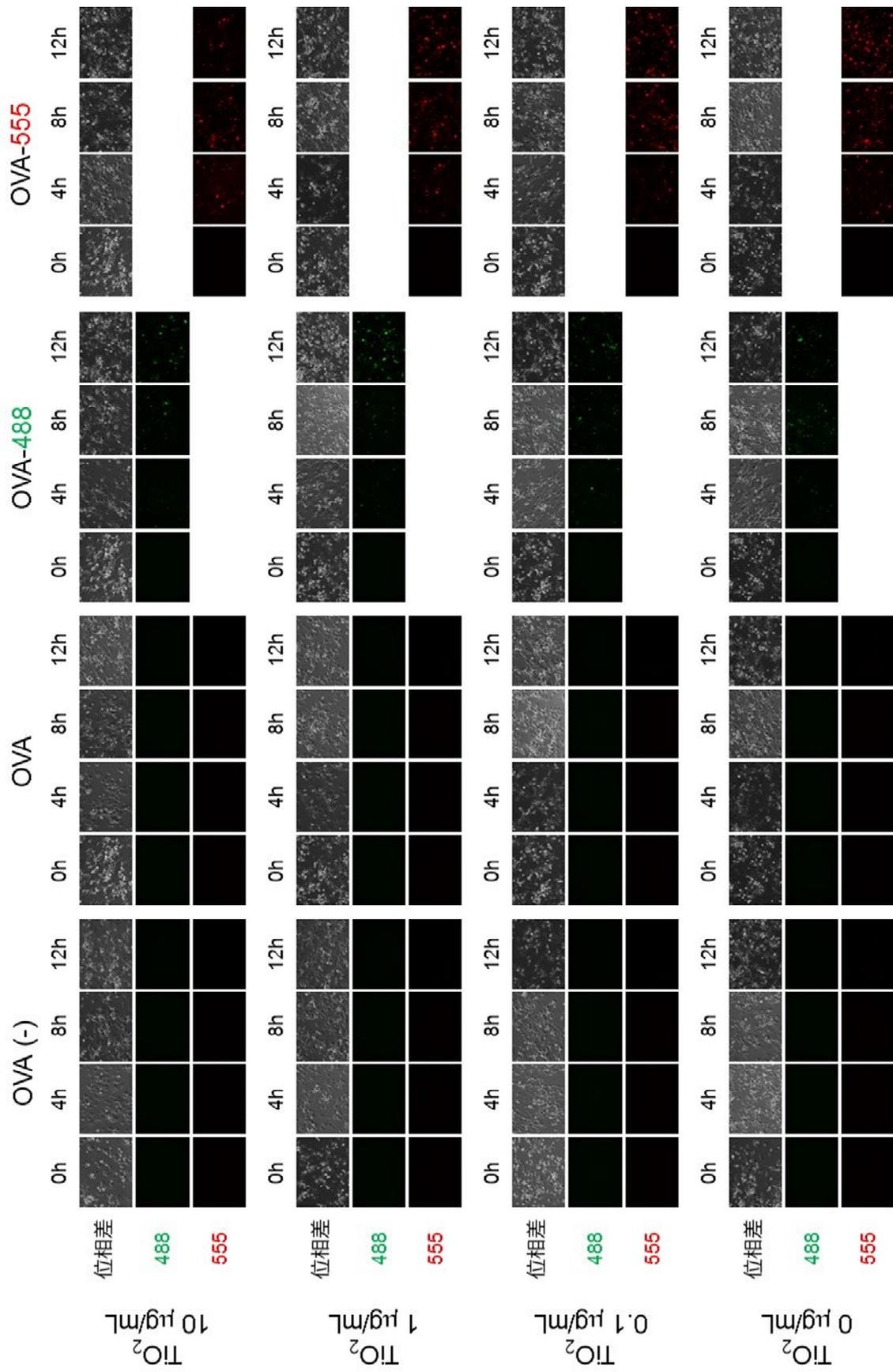


Figure 3 【検討2】 TiO_2 添加濃度の最適化

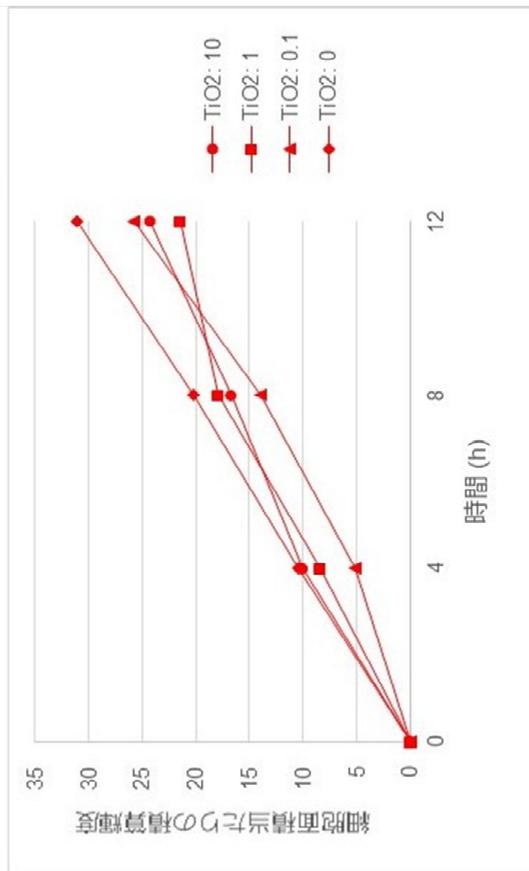
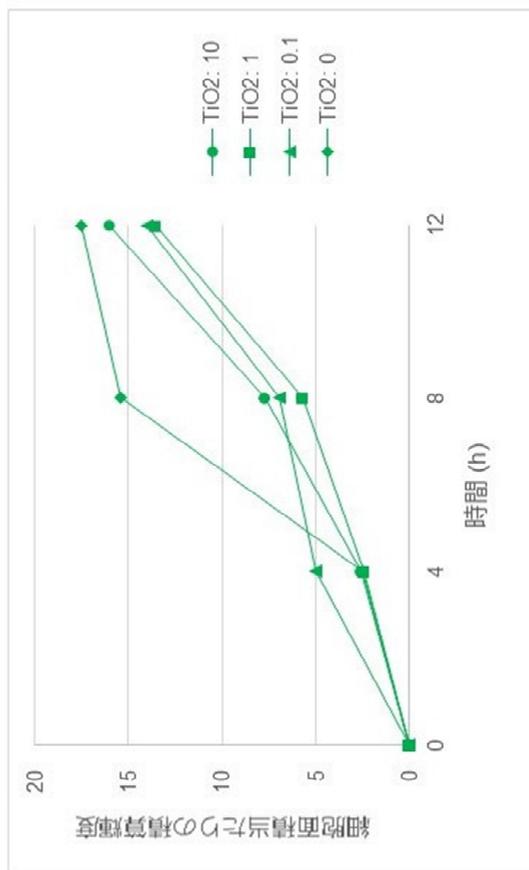
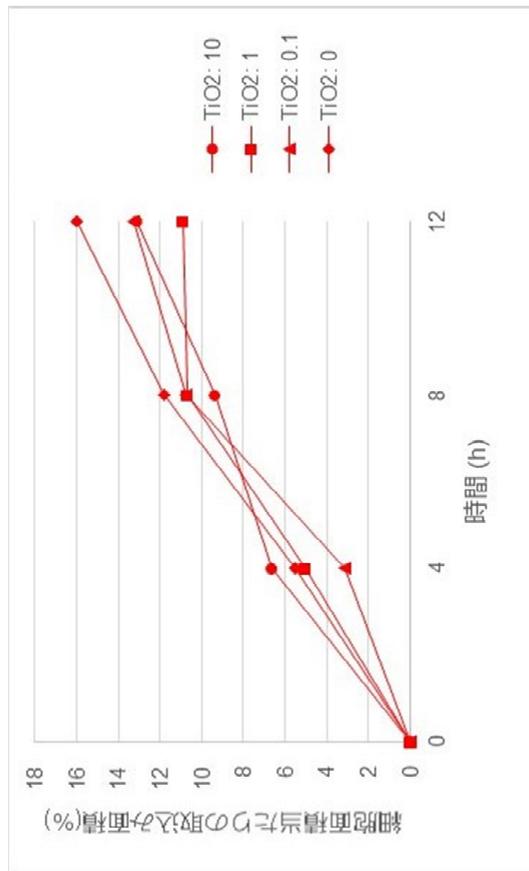
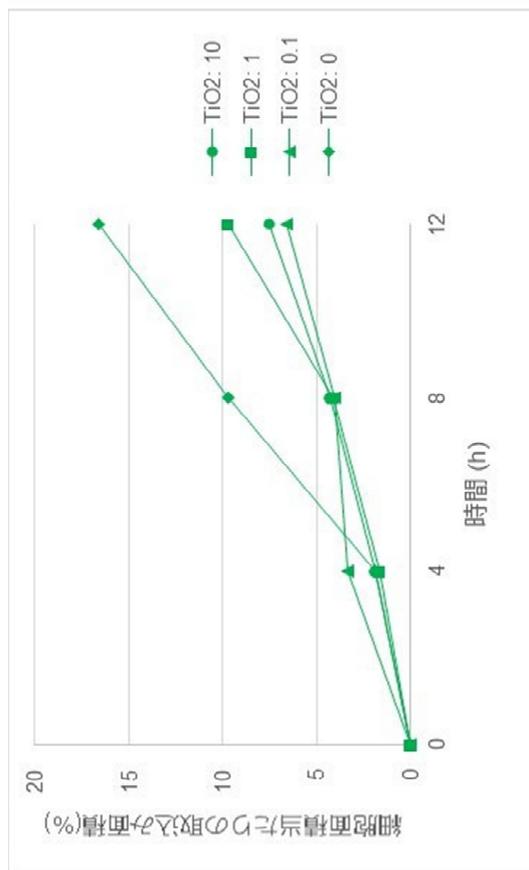


Figure 4 【検討2】 TiO₂添加濃度の最適化

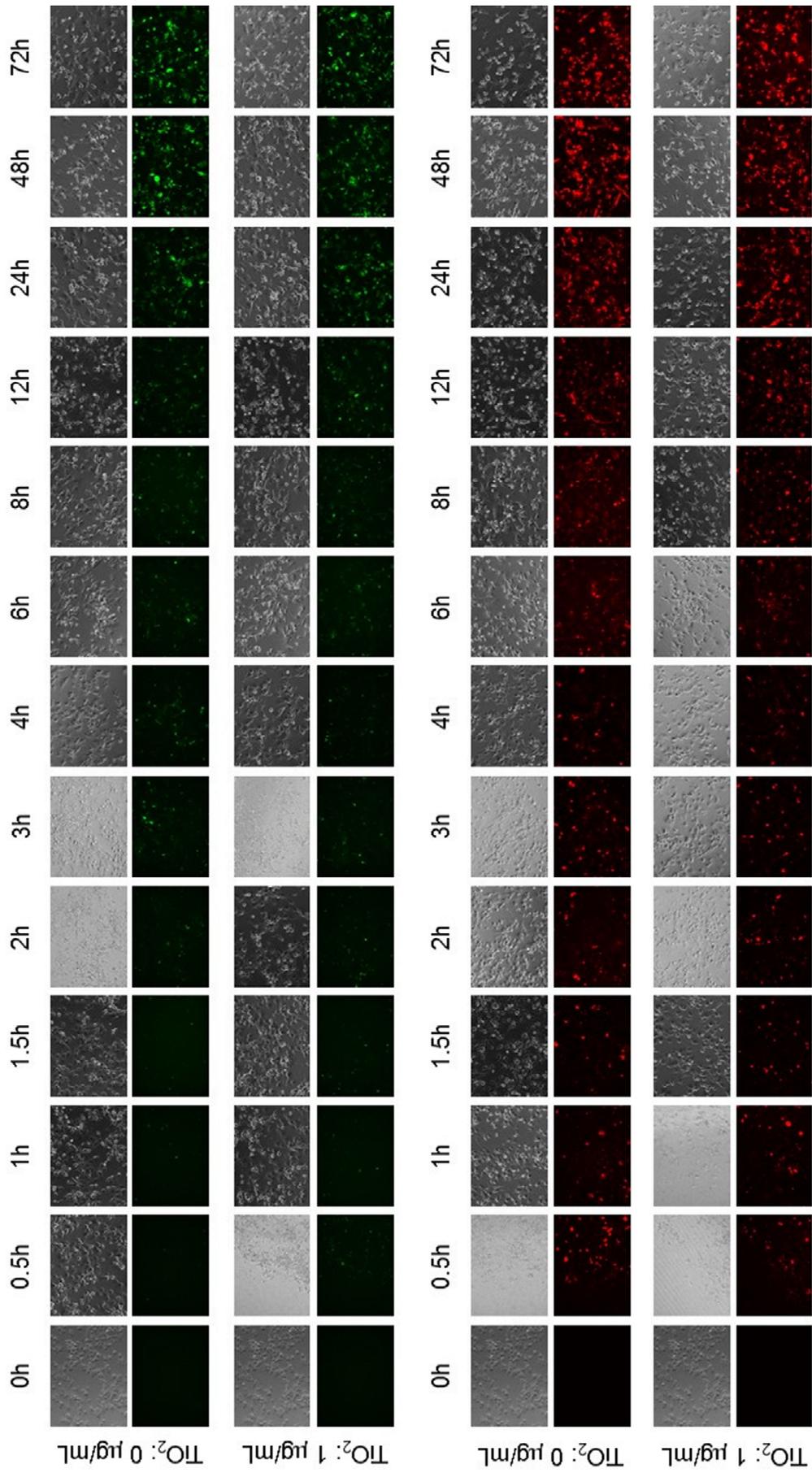


Figure 5 【検討3】 THP-1-DC細胞の抗原取込みにおけるTiO₂の影響

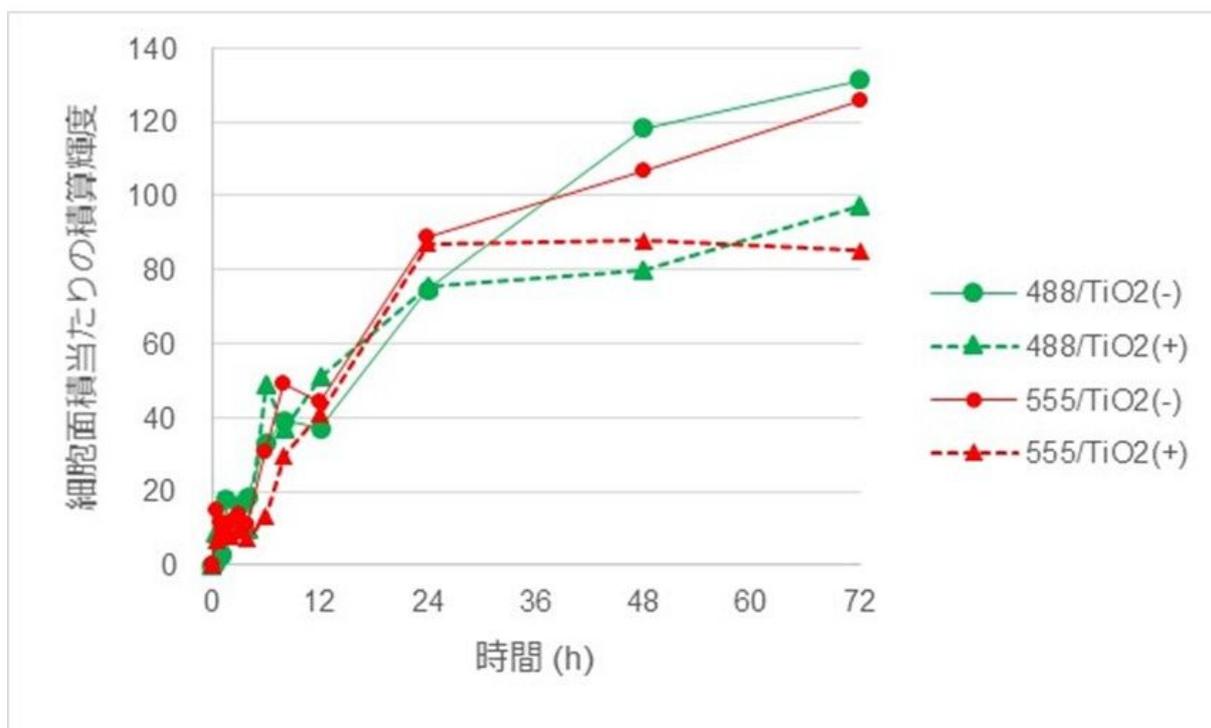
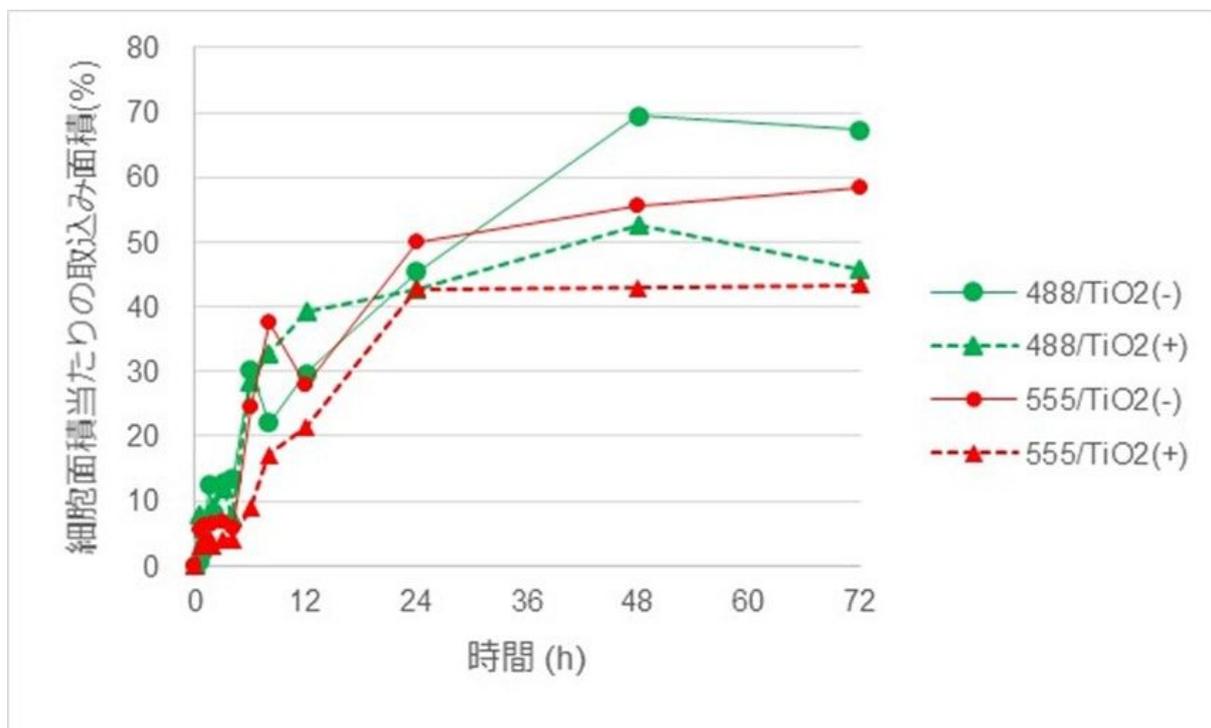


Figure 6
【検討3】 THP-1-DC細胞の抗原取込みにおけるTiO₂の影響

平成 28 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：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

分担研究課題名：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

分担研究者：最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 主任研究官
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している。これまで 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いずれも IL-1 と同様に、NLRP3 インフラマソーム依存的に TNF 産生を促進する応答を見いだしている。今年度はその解析を行い、酸化チタンが産生する IL-1 の autocrine 作用により TNF 産生が促進される機序を明らかにした。一方、IL-1 産生促進において酸化チタンのルチル型・アナタース型の顕著な違いは認められず、酸化亜鉛ナノマテリアルは IL-1 ・TNF 産生に全く効果を示さないことが判明した。

A．研究目的

抗原免疫時に水酸化アルミニウム（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。

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。

昨年度までの研究において、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 産生

促進を明らかにした。引き続き TNF 産生促進とその応答が NLRP3 を介することを見いだしている。本年度は NLRP3 を介する TNF 産生促進の機構を解析するとともに、IL-1 産生への酸化チタンのルチル型・アナタース型による効果の違い、酸化亜鉛ナノマテリアルの効果について検討した。また 表皮ケラチノサイトにおける NLRP3 インフラマソームについて基礎的検討を行った。

B．研究方法

1．実験材料および試薬

被検物質としては、下記のナノマテリアル（表面未処理）を主に用いた。

酸化チタン A（ルチル型、粒子径：15 nm）

酸化チタン D（アナタース型、粒子径：15 nm）

酸化亜鉛 MZ-500（粒子径：25nm）

陽性対照として多層カーボンナノチューブ

MWCNT-SD1 (長さ 8 μm , 径 150 nm) を用いた。

2. ナノマテリアルの分散

酸化チタンおよび酸化亜鉛ナノマテリアルは 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 回繰り返す、ピペッティング、25G シリンジ通過により分散した。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。

3. 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 RPM1 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、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。

4. 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 (Epilife、HKGS 含有) で 6 日間コンフルエントまで培養し、分化培地 (Epilife、1.2mM Ca^{2+} 含有) でさらに 24 時間培養した。LPS (0、25 あるいは 125pg/mL) を 6 時間あるいは 24 時間曝露したのち、5 μM ionomycin (1.5mM Ca^{2+} 含有 Epilife 培地) でインフラマソームを活性化した。2 時間後に培地上清を回収し、サイトカインを測定した。

5. 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。

C. 研究結果

1. 酸化チタンナノマテリアルによる TNF 産生促進の機構

昨年度の研究において、酸化チタンナノマテリアル A~C 暴露により TNF が産生されること、さらにこの応答は NLRP3 ノックダウンおよび caspase-1 阻害により抑制され、IL-1 分泌と同様に NLRP3 インフラマソームを介することを明らかにした。本年度は酸化チタンによる TNF 産生促進の機構を解析した。酸化チタン A による TNF 産生は、I- κ B キナーゼ阻害剤である ML120B により完全に抑制され、IL-1 受容体アンタゴニストの共存によっても抑制された (図 1)。したがって、酸化チタンにより分泌される IL-1 が IL-1 受容体を活性化し、この autocrine 作用により NF- κ B 活性化を介して TNF が産生される機序が推察される。

2. 酸化チタンナノマテリアルの物理化学的性状の影響

酸化チタンナノマテリアルの表面構造の違いが IL-1 産生に及ぼす影響を、同一の平均一次粒子径 (15nm) を有するルチル型の酸化チタン A とアナタース型の酸化チタン D を用いて比較検討したところ、どちらもほぼ同程度の IL-1 分泌促進を示した (図 2A)。またいずれの場合も、低濃度の食害阻害剤 cytochalacin D が IL-1 分泌をむしろ促進する効果が認められた。

一方、平均一次粒子径 25nm の酸化亜鉛ナノマテリアルについては、5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、あるいは 50~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲において検討を行ったが、IL-1 ならびに TNF 産生の促進効果は全く認められなかった (図 2B~D)。

3. ケラチノサイトを用いた評価手法の検討

昨年度、培養ヒトケラチノサイトを用い、酸化チタンナノマテリアルによる IL-1 ならびに IL-1 分泌促進の可能性を検討したが、酸化チタン粒子のみならず、NLRP3 インフラマソームを直接活性化することが知られる nigericin や ATP 刺激によっても IL-1・TNF 産生は全く認められなかった。ヒトケラチノサイトでは NLRP3 の mRNA 発現量が、THP-1 マクロファージの 0.1~0.5%と著しく低いことが判明したことから、本年度は、NLRP3 などインフラマソーム関連遺伝子発現の誘導 (priming) を試みた。

ヒトケラチノサイトを 1.2 mM カルシウム処理により分化誘導し、さらに代表的な priming 剤である LPS を 6 時間あるいは 24 時間処理したが、NLRP3、IL-1 前駆体、caspase-1 の mRNA レベルはやや低下、あるいは全く影響されなかった (図 3)。引き続きケラチノサイトでのインフラマソーム活性化の報告がある ionomycin を用いて刺激を行ったが、培地中に IL-1、IL-1 は全く検出されなかった。

D. 考察

抗原免疫時に Alum がアジュバント作用を発揮する際には、炎症性サイトカイン IL-1 産生を誘導する NLRP3 インフラマソームが決定的な役割を果たすことが報告されている。昨年度までに THP-1 マクロファージを用い、Alum ならびに 3 種類の酸化チタンナノマテリアルがいずれも、濃度に応じて NLRP3 依存的に IL-1 産生を促進することを明らかにした。引き続き炎症性サイトカイン TNF ならびに IL-6 の分泌も促進され、TNF α 分泌応答も NLRP3 インフラマソームに依存することを見いだしている。

今年度は TNF 産生促進の機構を解析した。TNF 産生については、TLR 刺激が NF- κ B 活性化・転写誘導を介して産生を促進する経路が知られている。実際、酸化チタンナノマテリアルによる産生は NF- κ B 阻害剤により完全に抑制され、

さらに IL-1 受容体アンタゴニストによっても抑制されることが判明した。したがって、酸化チタンが直接 NF- κ B を活性化するよりはむしろ、酸化チタンが NLRP3 を活性化して産生された IL-1 が、autocrine により二次的に IL-1 受容体を活性化し、NF- κ B 活性化を介して TNF 分泌を誘導した可能性が強く示唆される。この結果はまた、獲得免疫誘導における NLRP3 の重要性を強く支持すると考えられる。

一方、酸化チタンナノマテリアルの表面構造の違いによる影響を、同一の平均一次粒子径 (15nm) を有するルチル型とアナターズ型で比較したが、IL-1 産生促進の効果は同程度であった。また、酸化亜鉛ナノマテリアルは IL-1 ならびに TNF 産生を全く誘導しなかった。HUVEC では高濃度の酸化亜鉛ナノマテリアルがアポトーシスを誘導する報告から、より低濃度までの検討も行ったが、IL-1・TNF は産生されなかった。

昨年度までの成果から、サイズが小さい酸化チタン粒子は経皮暴露において表皮ケラチノサイトのインフラマソームを直接活性化する可能性が考えられる。そこで培養ヒトケラチノサイトでの NLRP3 活性化/IL-1・TNF 産生への影響を解析したが、ケラチノサイトには NLRP3 が全く発現せず、酸化チタン A~C や ionomycin 刺激により IL-1・TNF 産生促進は全く認められなかった。一部の報告では、UV 照射により表皮ケラチノサイトの NLRP3 インフラマソームが誘導されることから、ケラチノサイトでは IL-1 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” が必要と考えられた。そこで本年度はケラチノサイトの分化誘導処理や priming 効果の知られる LPS 処理を試みたが、NLRP3 は全く発現誘導されなかった。一方、ケラチノサイトの IL-1 前駆体の発現量は THP-1 マクロファージの 20~40%、caspase-1 は 220~300%に相当することから、ケラチノサイトにインフラマソームは存在するものの、酸化チタン A~C 刺激には応答しないタイプのインフラマソームと推定される。関連論文を精査すると、ケラチノサイトではウィルス感

染時などに NLRP3 以外のインフラマソームが機能する可能性が示唆されている。

E . 結論

マクロファージ系培養細胞において、酸化チタンが autocrine 作用により TNF 産生を促進する機構を明らかにした。IL-1 産生におい

て、酸化チタンのルチル型・アナタース型による顕著な違いは認められず、酸化亜鉛ナノマテリアルは全く効果を示さなかった。

F . 研究発表

該当なし

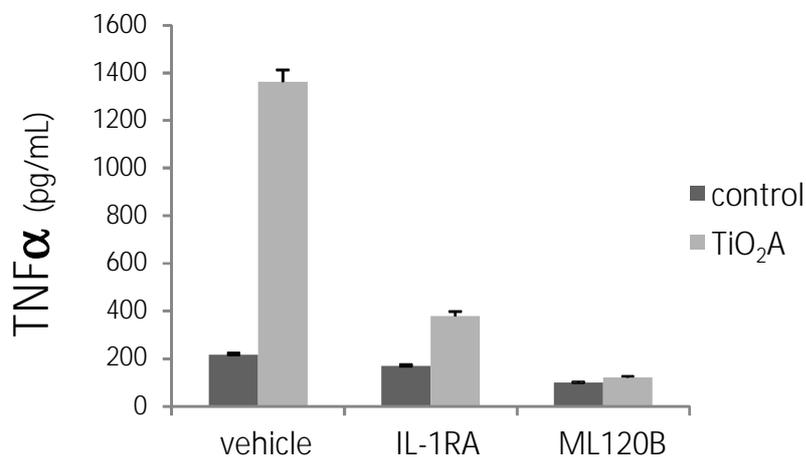


図1 . 酸化チタンナノマテリアルによるTNFα産生誘導に及ぼすIL-1受容体アンタゴニスト(IL-1RA)ならびにNF-κB阻害剤(ML120B)の影響

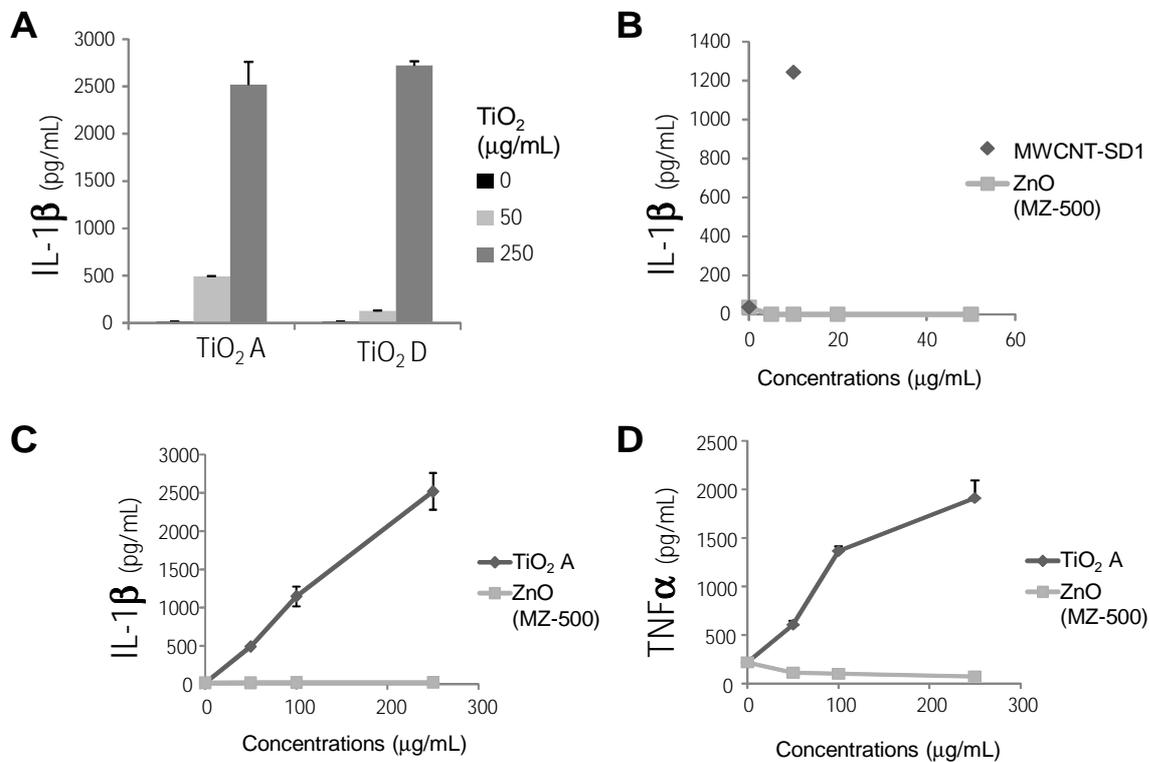


図2. 炎症性サイトカイン産生に及ぼす酸化チタンのルチル型・アナターズ型の影響 (A) ならびに酸化亜鉛の効果 (B,C,D)

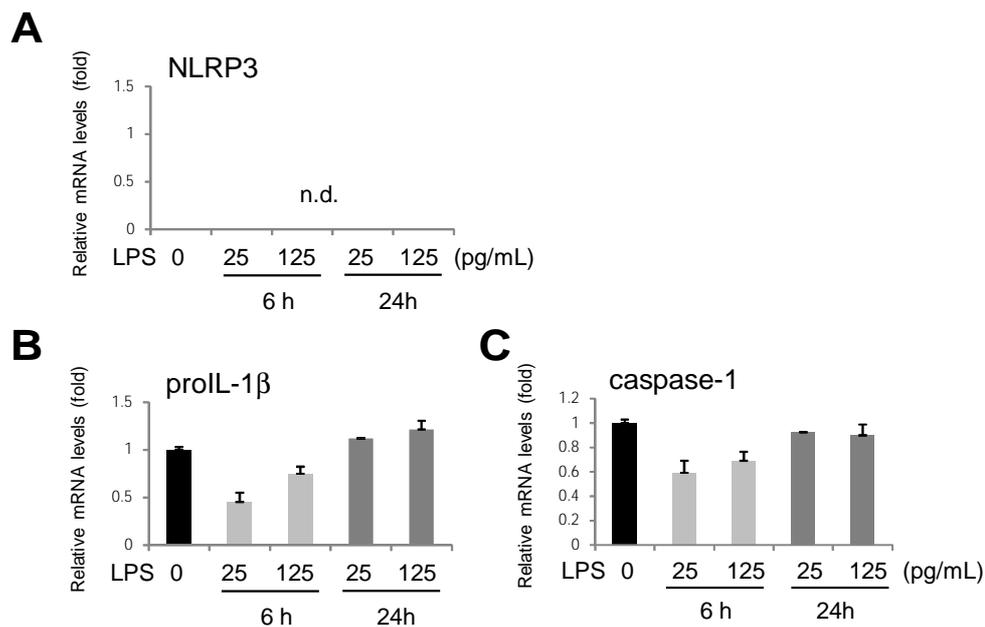


図3. 培養ヒトケラチノサイトにおけるインフラマソーム構成因子の発現ならびにLPS処理の影響

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					