

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26～28年度 総合研究報告書

(H26 - 化学 - 一般 - 004)

研究代表者 安達 玲子

平成29年3月

目 次

. 総合研究報告	
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
. 研究成果の刊行に関する一覧表 11

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合研究報告書

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きた。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。本研究課題では、酸化チタン、酸化亜鉛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 *in vivo* 及び *in vitro* 評価系を開発し検討するとともに、細胞を用いたアジュバント活性評価系の検討を行った。

マウスを用いる *in vivo* 評価系に関しては、抗原の腹腔内投与による感作時に酸化チタンが抗原特異的抗体産生を増強することが示された。また、抗原の経皮投与による感作実験系を確立し、酸化チタンナノマテリアルを共存させることにより抗原タンパク質の経皮感作が増強されること、その際、酸化チタンの効果が粒子径に依存する（粒子径が小さい方が効果が大きい）こと、結晶構造（ルチル型、アナターゼ型）による顕著な差は見られないこと、また、酸化亜鉛ナノマテリアルもまた抗原タンパク質の経皮感作を増強することを示した。

抗原感作への影響に関する培養細胞を用いた *in vitro* 評価系に関しては 2 種の評価法を開発した。初年度は、フローサイトメトリーを用いた抗原提示細胞活性化の評価法を構築した。2 年目には、初年度に開発した *in vitro* 評価法を用い、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貪食細胞から産生されるサイトカイン類が抗原提示細胞の活性化に与える影響を明らかにした。3 年目には、より汎用性の高い *in vitro* 評価手法として、蛍光顕微鏡を用いた定量的評価法を新たに開発し、ナノマテリアルが抗原取込みに及ぼす影響を明らかにした。

アジュバント活性に関する評価系については、培養細胞を用いたマクロファージにおける NLRP3 インフラマソーム活性化のアッセイ系を確立した。酸化チタンナノマテリアルが濃度依存的な活性を有し、IL-1 産生、さらには autocrine により TNF 産生を促進することを明らかにした。酸化チタンのルチル型・アナターゼ型により顕著な違いは認められなかった。

本研究課題で開発した上記の評価法をナノマテリアル経皮曝露の安全性評価に複合的に適用することにより、また、タンパク質経皮感作時に生体内で起きている現象に対するナノマテリアルの影響についてさらに解析を進めることにより、ナノマテリアルの安全性に関する科学的知見の集積につながるものと考えられる。

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
安全性予測評価部 主任研究官

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きた。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皮膚透過性試験や皮膚感作性試験等が行われたが、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茶のしずく石鹸の例のように、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。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、抗原免疫時に Alum (水酸化アルミニウムゲル) 等がアジュバント効果を発揮するには、貪食細胞の 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つことが報告されている。我々はこれまでに貪食細胞がカーボンナノチューブを貪食し、NLRP3 インフラマソーム活性化により炎症性サイトカインを産生することを報告しており、酸化チタン等についても同様にインフラマソーム活性化を介してアジュバント作用を發揮し、抗原感作を促進する可能性が懸念される。

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評価系を開発し検討するとともに、ナノマテリアルのアジュバント活性評価の検討を行う。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、及び in vitro 評価手法の開発研究、ナノマテリアルのアジュバント活性に関する細胞を用いた in vitro 評価手法の開発研究の 3 項目について実施する。

B. 研究方法

被検物質としては、下記の 4 種類の酸化チタンナノマテリアル (表面未処理) 及び 1 種類の酸化亜鉛ナノマテリアルを用いた。

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)
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)

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

(1) 抗原腹腔内投与によるマウス感作におけるアジュバント効果の検討

上記の酸化チタン A、B、C のそれぞれについて、モデル抗原 (卵白アルブミン; OVA、20 μ g) 及び酸化チタン (2 mg あるいは 10 mg) を生理食塩水 300 μ L に懸濁し、BALB/c マウス (雌性、7 週齢、1 群 5 匹) に腹腔内投与した (1 次免疫)。陽性対照アジュバントとしては Alum (2 mg) を用いた。14 日後に再度投与し (2 次免疫)、翌日に血液を採取して、血清中の OVA 特異的 IgE 及び IgG1 抗体を ELISA 法で測定した。

(2) 抗原経皮感作時の共存効果の検討

BALB/c マウス (雌性、8 週齢、1 群 5 匹) の背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より 3 日間抗原懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。貼付にはパッチテスター「トリイ」 (鳥居薬品株式会社) を用い、パッド部に 50 μ L の抗原懸濁液 (OVA (1-2 μ g) のみ、あるいは OVA 及び酸化チタン / 酸化亜鉛ナノマテリアル (12.5 ng-1.25 mg) を含む生理食塩水) を浸潤させて貼付した。3 日間の連続貼付後にパッチを

外し(Day 4)、その後 4 日間休ませるという操作を 1 サイクルとし、これを 4 サイクル繰り返して経皮感作を行った。感作期間中、経時的に採血し、血清中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体を ELISA 法で測定した。感作終了翌日(Day 25)に感作抗原 1 mg/100 μ L を腹腔内投与し、アレルギー反応(アナフィラキシー)を惹起した。投与後 30 分間、直腸温の測定、及びアナフィラキシー症状のスコアリングを行った。30 分後に麻酔下で全血を採取し、血清中ヒスタミンの濃度を Histamine EIA Kit(SPI-BIO)にて測定した。

(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。

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

(1) フローサイトメトリーを用いた抗原提示細胞活性化の評価法

(1-1) ヒト単球系白血病細胞株の樹状細胞への分化誘導

ヒト単球系白血病細胞株 THP-1 を PMA(phorbol-12-myristate-13-acetate)及びヒトリコンビナント IL-4(いずれも終濃度 20 ng/mL)存在下で 96 時間培養し、樹状細胞様に分化誘導した。

(1-2) 貪食細胞より産生されるサイトカイン類を含む培養上清の調製

後述の 3. の評価系の方法により THP-1 マクロファージに酸化チタン添加してインフラマソームを活性化させた。すなわち、THP-1 細胞を 185 ng/mL (0.3 μ M) PMA 存在下で 72 時間培養してマクロファージ様貪食細胞に分化させ、PMA を除いた培地中で 24 時間培養した後

に、酸化チタン(100 μ g/mL)を培地に添加して 6 時間培養し、酸化チタンによるインフラマソーム活性化によって産生されるサイトカイン類を含む培養上清を得た。遠心分離によって酸化チタンを除去した培養上清を以降の実験に供した。

(1-3) 樹状細胞の抗原刺激

分化誘導した樹状細胞様細胞に対し、抗原として OVA(0.1 あるいは 1.0 mg/mL)を添加し、72 時間培養した。また、貪食細胞を酸化チタンで処理して得られたサイトカイン類を含む培養上清に OVA を添加し、THP-1 樹状細胞の培養プレートに加えて 72 時間培養した(OVA 終濃度: 1.0 mg/mL)。

(1-4) 抗原提示細胞の活性化

抗原提示細胞の活性化マーカーとして、THP-1 樹状細胞表面上の HLA-DR(ヒト主要組織適合遺伝子複合体クラス II)、CD86 及び CD54(共刺激分子)の発現量について、フローサイトメトリーを用いて定量的に解析した。

(2) 蛍光顕微鏡を用いた抗原提示細胞活性化の評価法

(2-1) 蛍光顕微鏡を用いた抗原取込み量の解析

蛍光顕微鏡を用い、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で定量分析を行った。対物レンズは倍率 20 倍固定とし、標準フィルターキューブで Alexa Fluor[®] 488、Alexa Fluor[®] 555 コンジュゲートを測定した。

0-72 時間の経時的な抗原刺激の後、遮光下 well 内を洗浄し、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、位相差画像及び蛍光画像を取得した。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。

(2-2) 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

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

= 抗原取込み量 (%)

・輝度による評価

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

= 抗原取込み輝度

3. ナノマテリアルのアジュバント活性に関する細胞を用いた in vitro 評価手法の開発研究

THP-1 細胞を PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate, 185 ng/mL) 処理してマクロファージ様に分化誘導し、上記の酸化チタンにそれぞれ暴露し、培地への IL-1、TNF、IL-6 産生を milliplex で測定した。NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3、インフラマソームを構成するタンパク質) は特異的 siRNA を用いてノックダウンした。ノックダウンは mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定し判定した。

ヒトケラチノサイトは市販品を増殖培地で培養後、分化培地、LPS、上記の酸化チタン、ATP、nigericin にそれぞれ暴露し、培地への IL-1 /IL-1 分泌を milliplex で測定し、細胞内のインフラマソーム構成因子 mRNA レベルを測定した。

C. 研究結果

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

(1) 抗原腹腔内投与によるマウス感作におけるアジュバント効果の検討[平成 26 年度]

酸化チタンナノマテリアルが免疫応答に及ぼす影響を検討するため、まず、OVA の腹腔内投与によるマウス感作時に酸化チタンを共存

させ、そのアジュバント効果について検討した (アジュバントとは、抗原と一緒に投与され、その抗原性を増強するために用いられる物質である)。その結果、3 種の酸化チタン A-C とも、陽性対照アジュバントとして用いた Alum と同様に、OVA 特異的な IgE 及び IgG1 抗体の産生を用量依存的に増強することが示された。

(2) 抗原経皮感作時の共存効果の検討[平成 26-28 年度]

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。OVA をモデル抗原として、マウスの皮膚に抗原溶液を 3 日間貼付し 4 日間休止するというサイクルを 4 回繰り返すことにより経皮感作性をアッセイするモデル実験系を確立した。この系を用い、OVA(1-2 µg) 及び酸化チタン(12.5 ng-1.25 mg) の混合懸濁液により経皮感作を行った。粒子径が最も小さい酸化チタン C (6 nm、アナターゼ型) では、OVA 貼付時に 125 ng を添加した場合に、抗原特異的抗体産生、アレルギー反応惹起時の体温低下、アナフィラキシスコア、血中ヒスタミン濃度の全てにおいて、OVA 単独群と比較して有意な増大が見られた。酸化チタン A (15 nm、ルチル型) では、OVA 貼付時に 12.5 µg を添加した場合に、アレルギー反応惹起時の体温低下及びアナフィラキシスコアにおいて、OVA 単独群と比較して有意な増大が見られ、抗体産生や血中ヒスタミン濃度においては増大する傾向が見られた。また、1.25 µg、125 µg を添加した場合にも同様の傾向が見られた。酸化チタン D (15 nm、アナターゼ型) では、OVA 貼付時に 1.25 µg を添加した場合に、アレルギー反応惹起時の体温低下及び血中ヒスタミン濃度において、OVA 単独群と比較して有意な増大が見ら

れ、抗体産生やアナフィラキシスコアにおいては増大する傾向が見られた。酸化チタン A、C、D とも、他の用量ではこのような変化は見られなかった。一方、粒子径が最も大きい酸化チタン B では、どの用量の場合も有意な変化は見られなかった。これらの結果より、酸化チタンナノマテリアルが抗原タンパク質の経皮感作を増強すること、また、この効果は粒子径に依存する(粒子径が小さい方が効果が大きい)こと、結晶構造(ルチル型、アナターゼ型)による顕著な差は見られないことが示された。

また、酸化亜鉛ナノマテリアル A についても、酸化チタンと同様に抗原経皮感作に対する影響について検討した。OVA 貼付時に 12.5ng を添加した場合に、抗原特異的 IgE、IgG1 の産生、直腸温低下、アナフィラキシスコアが V 群と比較して有意に増大しており、OVA のみ貼付した群と比較しても増大する傾向が見られた。

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

[平成 26 年度]

THP-1 細胞の分化は、モルフォロジー及び分化マーカー(CD11c 及び CD209)の発現により確認した。THP-1 樹状細胞に抗原(OVA)を添加して、抗原提示細胞活性化マーカーである HLA-DR 及び CD86 の発現を定量的に解析したところ、抗原未刺激のコントロール群と比較して発現量の上昇が認められた。本評価法を用いて酸化チタンの効果を検討したところ、添加濃度依存的に抗原提示細胞の活性化を減弱させる傾向が認められた。

[平成 27 年度]

本評価法の適応性を探索するため、THP-1 樹状細胞様細胞を OVA で刺激する際に、ナノマテリアルによるインフラマソーム活性化時の貪食細胞の培養上清を添加し、貪食細胞が産生するサイトカイン類が抗原提示細胞活性化マーカーの発現に与える影響を定量的に解析し

た。その結果、培養上清を添加しなかった群と比較して、CD86 の発現量がやや上昇した。他方、HLA-DR 及び CD54 では発現量に変化は認められなかった。

[平成 28 年度]

蛍光顕微鏡を用いた樹状細胞様細胞の蛍光標識抗原取込み量の定量分析法を新たに考案した。

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ほぼ飽和に達した。一方、TiO₂ 無添加群は培養 24 時間における抗原取込み量が TiO₂ 添加群と同等であったが、その後上昇した。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、TiO₂ 無添加群は同等の抗原取込み量であったが、TiO₂ 無添加群の輝度は、培養 72 時間まで上昇し続けた。

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 TiO₂ 添加群と同等であったが、その後 72 時間まで上昇した。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 添加群と TiO₂ 無添加群は同等の抗原取込み量であったが、TiO₂ 無添加群の輝度は、培養 72 時間まで上昇し続けた。

3 . ナノマテリアルのアジュバント活性に関する細胞を用いた in vitro 評価手法の開発研究

(1) 貪食細胞を用いた in vitro 評価手法の検討

[平成 26-28 年度]

ナノマテリアルのアジュバント活性に深く関わる NLRP3 インフラマソーム活性化作用を、マクロファージ系培養細胞を用いて評価する手法を検討した。PMA により分化させた THP-1 マクロファージを用い、NLRP3 の siRNA ノックダウン、及び caspase-1 (インフラマソームを構成し、インフラマソーム活性化時に IL-1 前駆体を分解して分泌型 IL-1 に変換する)の阻

害剤を利用して、NLRP3 インフラマソーム依存的なサイトカイン産生応答をアッセイする系を確立した。

この系を用い、一般的なアジュバントである Alum と同様に、被検物質として用いた 3 種類の酸化チタンが、いずれも濃度依存的(50 ~ 250 $\mu\text{g/mL}$)に IL-1 産生を促進し、またその作用は NLRP3 および caspase-1 活性に依存することを明らかにした。貪食阻害剤である cytochalacin D の影響は粒子によって異なり、Alum による IL-1 産生は阻害されたが、サイズが小さい酸化チタン C による IL-1 産生は全く阻害されなかった。従って、インフラマソーム活性化に至る経路は、ナノマテリアル粒子により異なることが示唆された。

引き続き、IL-1 以外の炎症性サイトカインの産生についても検討した。その結果、3 種類の酸化チタンがいずれも濃度依存的に TNF α および IL-6 産生を誘導することを確認した。IL-1

分泌と同様に、TNF α 産生は NLRP3 ノックダウンおよび caspase-1 阻害により抑制されること、サイズが小さい酸化チタン C による産生は cytochalacin D に影響されないことが判明した。

酸化チタン A による TNF α 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る一方、IL-1 受容体アンタゴニストを共存させても抑制された。したがって、酸化チタンにより分泌される IL-1 β 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) ナノマテリアルの物理化学的形狀に関する検討[平成 28 年度]

酸化チタンナノマテリアルの結晶構造の違いが 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 とアナターゼ型の酸化チタン D を用いて比較検討した。どちらもほぼ同程度の IL-1 分泌促進を示した。またいずれの場合も、低濃度の貪食阻害剤 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 A については、5 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ 、および 50 ~ 250 $\mu\text{g/mL}$ の濃度範囲において、IL-1 ならびに TNF 産生の促進は全く認められなかった。

(3) 表皮ケラチノサイトを用いた評価手法の検討[平成 27-28 年度]

培養ヒトケラチノサイトを用いて IL-1 および IL-1 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、NLRP3 インフラマソームを直接活性化する nigericin および ATP のいずれも効果を示さなかった。ケラチノサイトの NLRP3 および IL-1 の mRNA 発現量を測定したところ、THP-1 マクロファージに比較し caspase-1 は 220 ~ 300% に相当する発現を示したが、IL-1 は 20~40%、NLRP3 は 0.1 ~ 0.5% と著しく低いこと、増殖因子存在下で培養することによりさらに低下することが判明した。

そこでケラチノサイトのカルシウム処理による分化誘導、あるいは LPS 処理により、インフラマソーム関連遺伝子発現の誘導(priming)を試みたが効果は認められなかった。ケラチノサイトのインフラマソーム活性化の報告がある ionomycin で細胞を刺激した場合にも、IL-1、IL-1 分泌促進は認められなかった。

D. 考察

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

本研究は、ナノマテリアルが抗原感作の際のアジュバントとなる可能性、すなわちナノマテリアルの経皮曝露が抗原感作性を増強する可能性について検討するものである。

まず、OVA の腹腔内投与による感作時に酸化チタンを抗原と共存させたところ、抗原特異的 IgE、IgG1 抗体産生を増強することが示された (IgE 及び IgG1 抗体は、免疫応答の中でも、ア

レルギーを引き起こす Th2 型応答の結果産生される抗体である)。

次に、OVA 経皮感作に関するアッセイ系を確立し、経皮感作時に酸化チタンを共存させたところ、酸化チタン C、A 及び D では、それぞれある用量において OVA 経皮感作及びその後の抗原腹腔内投与によるアレルギー反応を増強することが示された。粒子径が最も小さい酸化チタン C では抗体産生やアレルギー反応の 3 種の指標の全てにおいて、OVA 単独群との間に有意差が見られたが、酸化チタン A 及び D ではアレルギー反応の 2 種の指標のみで有意差が見られた。一方、粒子径が最も大きい酸化チタン B では、抗体産生、アレルギー反応ともに OVA 単独群との間に有意な差は見られなかった。これらの結果より、酸化チタンナノマテリアルによる経皮感作増強効果は粒子径に依存する(粒子径が小さい方が効果が大きい)こと、結晶構造(ルチル型、アナターゼ型)による顕著な差は見られないことが示された。

一方、酸化亜鉛ナノマテリアルについても同様に検討した結果、酸化チタンナノマテリアルよりもやや低用量で抗原経皮感作を増強する傾向が見られた(OVA 単独群との間に有意な差は見られなかった)。

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(30 nm 未満程度)ナノマテリアル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。

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

平成 26 年度に構築したフローサイトメトリーを用いた評価手法は、経皮感作における重要なステップである抗原提示細胞の応答、即ち抗原提示細胞の活性化を評価する際に有用である。他方、本評価法は単一ポピュレーションの免疫担当細胞の影響を評価しているに過ぎな

い。そこで、平成 27 年度には、抗原の経皮曝露における複合的な免疫担当細胞の影響を評価するために、貪食細胞をナノマテリアルで処理することによって産生されるサイトカイン類を用いた検討を実施した。その結果、抗原刺激時にサイトカイン類を含む培養上清を添加することにより、主要な抗原提示細胞活性化マーカーの 1 つである CD86 発現量の上昇が認められた。

平成 28 年度には、より簡便な評価手法として、蛍光顕微鏡を用いた抗原提示細胞の蛍光標識抗原取込み量の定量分析法を新たに開発した。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、抗原提示細胞の活性化の減弱を支持する結果を示した。

3. ナノマテリアルのアジュバント活性に関する細胞を用いた in vitro 評価手法の開発研究

抗原免疫時に Alum がアジュバント作用を発揮する際には、NLRP3 インフラマソーム活性化による炎症性サイトカイン IL-1 産生が決定的な役割を持ち、NLRP3 ノックアウトマウスでは Alum のアジュバント作用は消失することが報告されている。そこで本研究では、ナノマテリアルのアジュバント活性の評価に、細胞での NLRP3 インフラマソーム活性化を指標とすることの妥当性を検討した。

THP-1 マクロファージを用い、Alum が NLRP3 依存的に IL-1 を産生する応答を評価できる系を確立し、3 種類の酸化チタンナノマテリアルがいずれも、濃度に応じ NLRP3 依存的に IL-1 産生を促進することを明らかにした。また、貪食阻害剤の影響は粒子によって異なり、サイズが小さい酸化チタン C は貪食を経ずに細胞膜を透過して NLRP3 インフラマソームを活性化することが示唆された。

Alum および酸化チタンは、THP-1 マクロフ

アージにおいて TNF の分泌も促進した。この応答は、NF- κ B 活性化阻害剤により完全に抑制されたが、NLRP3 インフラマソームに依存しており、また IL-1 受容体アンタゴニストにより抑制された。したがって、酸化チタンが直接 NF- κ B を活性化するというよりはむしろ、酸化チタンが NLRP3 を活性化して産生された IL-1 β 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 α 分泌を誘導したと考えられる。この結果は、獲得免疫誘導における NLRP3 の重要性を強く支持する結果と考えられる。

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を想定し、培養ヒトケラチノサイトでの NLRP3 活性化/IL-1 \cdot 産生への影響を解析した。しかしながら、酸化チタン A~C や ionomycin 刺激による IL-1 \cdot 産生促進は全く認められなかった。ケラチノサイトには NLRP3 がほとんど発現しておらず、分化誘導や LPS 処理によっても全く発現誘導されなかった。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。

以上、本研究課題においては、酸化チタン等のナノマテリアルの経皮暴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 及び in vitro 評価系を開発し検討するとともに、細胞を用いたアジュバント活性評価系の検討を行った。その結果、酸化チタンナノマテリアルが抗原経皮感作を増強することや、アジュバント効果の発現において重要な貪食細胞のインフラマソーム活性化・炎症性サイトカイン産生を誘導することを明らかにした。一方でナノマテリアルが抗原提示細胞への抗原の取り込みを抑制する傾向も示され、ナノマテリアルが免疫応答に与える影響の複雑が示唆された。本研究課題で開発した評価法をナノマテリアル経

皮曝露の安全性評価において複合的に適用すること、及び、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に対するナノマテリアルの影響についてさらに解析を進めることにより、ナノマテリアルの安全性に関する科学的知見の集積につながり、今後の厚生労働行政施策に貢献できるものとする。

E. 結論

4 種の酸化チタンナノマテリアル及び 1 種の酸化亜鉛ナノマテリアルを検体とし、抗原性物質への免疫応答に及ぼす影響に関する検討を行った。

マウスを用いる in vivo 評価系に関しては、抗原の腹腔内投与による感作時に酸化チタンが抗原特異的抗体産生を増強することが示された。さらに、抗原の経皮投与による感作実験系を確立し、酸化チタンナノマテリアルを共存させることにより抗原タンパク質の経皮感作が増強されること、その際、酸化チタンの効果は結晶構造（ルチル型かアナターゼ型か）には依存せず、粒子径に依存する（粒子径が小さい方が効果が大きい）ことが示された。また酸化亜鉛ナノマテリアルも抗原経皮感作を増強する傾向があることが示された。

ナノマテリアルの抗原感作への影響に関する培養細胞を用いた in vitro 評価系に関しては、平成 26 年度はフローサイトメトリーを用いた評価手法を開発した。平成 27 年度は、本評価手法を用い、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貪食細胞から産生されるサイトカイン類が抗原提示細胞の活性化に与える影響について検討を加え、貪食細胞が産生するサイトカイン類が樹状細胞の活性化に影響を及ぼすことを明らかにした。平成 28 年度は、より簡便な評価手法として、蛍光顕微鏡を用いた定量分析法を開発した。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。

アジュバント活性に関する評価系については、培養細胞を用いたマクロファージにおけるNLRP3 インフラマソーム活性化のアッセイ系を確立し、酸化チタンが濃度依存的な活性を有し、IL-1 産生を、さらに autocrine 作用により TNF 産生を促進することを明らかにした。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。

本研究課題で開発した上記の評価法をナノマテリアル経皮曝露の安全性評価に複合的に適用することにより、また、タンパク質経皮感作時に生体内で起きている現象に対するナノマテリアルの影響についてさらに解析を進めることにより、ナノマテリアルの安全性に関する科学的知見の集積につながるものとする。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsunaga K, Kuroda Y, Sakai S, Adachi R, Teshima R, Yagami A, Itagaki H. Anaphylactic augmentation by epicutaneous sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein in a guinea pig model. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2015, 40, 745-752.
- 2) Sakai S, Nakamura R, Adachi R, Fukutomi Y, Saito Y, Nishimaki-Mogami T, Teshima R. Experimental assessments of the cross-reactivity of IgE from patients sensitised with acid-hydrolysed wheat

protein in a cosmetic soap *Clinical and Translational Allergy*, 2015, 5, 15-16.

- 3) Sakai, S., Adachi, R., Nakamura, R., Kikuchi, H., Watanabe, T., Sasaki, K., Nishijima, K., Ataku, H., Mogami, T., Teshima, R. Molecular Profile Analysis of Allergenic Hydrolyzed Wheat Protein, *Clinical Immunology & Allergology*, **62**, 492-495 (2014)
- 4) Sakai, S., Nakamura, R., Nakamura, R., Adachi, R., Teshima, R. Allergy of Hydrolyzed Wheat Protein via Cutaneous Sensitization, *Kagaku To Seibutsu*, **52**, 431-437 (2014)
- 5) 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-1beta secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452: 593-599

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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）
- 3) 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）

G. 知的所有権の取得状況

1．特許取得

なし

2．実用新案登録

なし

3．その他

なし

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
Matsunaga K, Kuroda Y, Sakai S, Adachi R, Teshima R, Yagami A, Itagaki H.	Anaphylactic augmentation by epicutaneous sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein in a guinea pig model	<i>The Journal of Toxicological Sciences</i>	40	745-752	2015
Sakai S, Nakamura R, Adachi R, Fukutomi Y, Saito Y, Nishimaki-Mogami T, Teshima R	Experimental assessment of the cross-reactivity of IgE from patients sensitized with acid-hydrolyzed wheat protein in a cosmetic soap	<i>Clinical and Translational Allergy</i>	5	15-16	2015
Sakai, S., Adachi, R., Nakamura, R., Kikuchi, H., Watanabe, T., Sasaki, K., Nishijima, K., Ataku, H., Mogami, T., Teshima, R.	Molecular Profile Analysis of Allergenic Hydrolyzed Wheat Protein,	<i>Clinical Immunology & Allergy</i>	62	492-495	2014
Sakai, S., Nakamura, R., Nakamura, R., Adachi, R., Teshima, R	Allergy of Hydrolyzed Wheat Protein via Cutaneous Sensitization,	<i>Kagaku To Seibutsu</i>	52	431-437	2014
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 calcinated fullerene nanowhiskers as well as long needle-like multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce NLRP3-mediated IL-1beta secretion	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	452	593-599	2014