

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	ナノ物質の経口暴露による免疫系への影響評価手法の開発 (課題番号：1008) (研究期間：平成22年度～平成24年度)
主任研究者名	研究者名：蜂須賀 暁子 所属機関：国立医薬品食品衛生研究所

本研究は、経口摂取されたナノ物質の健康影響のうち、腸管免疫系に対する免疫増強作用について調査研究することを目的とする。経口摂取されたナノ物質は、主に腸管から吸収されると考えられ、さらに貪食細胞である樹状細胞に取り込まれることにより、腸管免疫系への影響、中でも食品アレルギーに関与する免疫増強作用であるアジュバント作用が危惧されており、安全性評価手法の確立が望まれている。本研究では、腸管免疫系の培養細胞系を用い、ナノ物質のアジュバント作用を簡便にスクリーニング評価する *in vitro* 測定法を確立し、ヒトが摂取する可能性の高いナノ物質について調査を行った。また、不明な点が多いナノ物質の食品中あるいは消化液中での挙動に関する知見を集積し、安全性評価においては存在形態が重要であることを示した。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	ナノ物質の経口暴露による免疫系への影響評価手法の開発 (研究期間：平成22年度～平成24年度)
主任研究者名	所属：蜂須賀 暁子 氏名：国立医薬品食品衛生研究所（研究課題番号：1008）

I 研究の期間及び研究目標等

1 研究期間 平成22年度～24年度（3年間）

2 研究目的

本研究は、経口摂取されたナノ物質の健康影響のうち、腸管免疫系に対する免疫増強作用について調査研究することを目的とする。経口摂取されたナノ物質は、主に腸管から吸収されると考えられ、さらに貪食細胞である樹状細胞に取り込まれることにより、腸管免疫系への影響、中でも食品アレルギーに関与する免疫増強作用であるアジュバント作用が危惧されており、安全評価法が望まれている。本研究は、腸管免疫系の培養細胞系を用い、ナノ物質のアジュバント作用を簡便にスクリーニング評価する *in vitro* の測定法を確立し、ヒトが摂取する可能性の高いナノ物質について調査を行う。また、報告が少なく不明な点が多いナノ物質の小腸での吸収に関しても知見を蓄積する。

まず、ヒト樹状細胞を用いた *in vitro* におけるナノ粒子のアジュバント活性測定法を構築する。構築にあたっては、二酸化ケイ素（別名シリカ、食品添加物）などの非金属物質、酸化亜鉛（食品包装材）などの金属物質、ポリ乳酸/グリコール酸コポリマー（食品容器）などの生分解性ポリマー、ポリスチレンなどの非分解性ポリマーなど性質の異なるナノ物質をモデル物質とする。ポリスチレンは、食品分野での使用報告はないが、一般に粒子径の標品として利用され、表面加工や蛍光標識など粒子の種類も豊富であることから、測定法を確立するための標品の一つとして用いる。これら各種ナノ物質の粒径、形状及び材質と、アジュバント活性やT細胞の分化誘導についての関係を調べる。構築した測定系を用いて、指定添加物である微粒二酸化ケイ素（粒径15マイクロ以下のシリカ）、二酸化チタンなど、既存添加物である白金、銀、鉄などの使用紹介のあるナノ物質について調べる。

また、*in vitro*系と同時に、マウスを用いた経口投与 *in vivo* におけるナノ粒子のアジュバント活性を測定する。ナノ物質の免疫系への影響としては、経気道暴露により、カーボンナノチューブ（CNT）がアジュバント活性を有するとの報告がある。一方、経口摂取については、データが少なく影響については不明な点が多いが、気管支粘膜と同様のことが腸管粘膜免疫系でも起こる可能性が考えられている。報告例のないナノ物質の経口免疫影響

について調べる。

次いで、ナノ物質のヒト樹状細胞を用いたin vitroにおけるアジュバント活性と、マウスを用いたin vivoにおける免疫応答の相違について解析する。測定系の違いだけでなく、ナノ物質の経口暴露での動態については不明な点が多く、pHの変化による凝集、消化管内内容物との相互作用など、解析を複雑にする因子も関与する。in vitroと in vivo測定結果の相違について、動物種その他、凝集などナノ物質の消化管における特性を考慮して解析を行い、in vitro系が評価法としての性能を担保しているかを検討する。

食品添加物、補助食品、調理器具、容器及び包装材料の使用状況に鑑みて、これらに使われるナノ物質の消化器経路の吸収と体内分布、毒性について解明する必要がある。ナノ物質の生体機能に及ぼす影響を見る上で、試験物質の大きさの関与を確認するには、試験時のナノ物質のキャラクタライゼーションが重要である。本研究ではナノ物質の存在状態を測定し、食品または生体組織中のナノ物質について考察し、サイズや物理学的性質の違うナノ物質の貪食細胞への作用の違いについて評価することにより、ナノ物質の消化管吸収と体内分布の解析、及びその免疫機能影響の解析に寄与する。

マイクロサイズでは消化管から吸収されず無害である化学物質が、ナノ化されたために体内分布が変化し、マイクロサイズでは表れない生体反応が起こる可能性がある。経口摂取されたナノ物質は、大きな粒子に比べて腸管組織に吸収され易いことが知られているが、特定のナノ物質の腸管吸収の実態は明らかにされていない。そこで本研究では、腸管上皮細胞株のin vitro単層培養系を用いて、細胞層の頂端側から側基底膜側への移動、腸管上皮細胞内への取り込みを解析することにより、特定のナノ物質の腸管吸収に関する情報を得る。シリカ、ポリマー、金属などのモデルナノ物質の定量的な解析方法を確立し、腸管上皮層の透過吸収率を明らかにする。

また、腸管上皮細胞は腸管での異物侵入に対するバリア機能や栄養素の吸収を担うだけでなく、腸管腔の物質の刺激を受けて様々な液性因子を分泌し、腸管免疫応答を調節する役割を果たしていることも明らかにされてきている。したがって、経口暴露されたナノ物質の免疫系に対する影響を考える際には、腸管上皮細胞の免疫調節機能に対する影響を検討することも重要である。そこで、腸管上皮細胞の各種サイトカイン・ケモカインなどの液性因子の分泌に対するナノ物質の影響を、in vitro 培養系を用いて解析する。特に酸化ストレスや微生物成分刺激で誘導される炎症性サイトカインの産生に対するナノ物質の影響について明らかにする。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名 (所属機関名)
樹状細胞を用いるin vitroアジュバント活性測定法の	樹状細胞を用いるin vitroアジュバント活性測定法の	樺山浩 (国立医薬品食品衛生研究所)

確立	確立	
	ナノ物質のアジュバント活性の評価	穂山浩 (国立医薬品食品衛生研究所)
ナノ物質経口投与による <i>in vivo</i> アジュバント活性測定	ナノ物質経口投与による <i>in vivo</i> アジュバント活性測定	手島玲子 (国立医薬品食品衛生研究所)
<i>in vivo</i> 系と <i>in vitro</i> 系との測定結果の比較	<i>in vivo</i> 系と <i>in vitro</i> 系との測定結果の比較	蜂須賀暁子 (国立医薬品食品衛生研究所)
ナノ物質の存在形態と分析法に関する研究	ナノ物質の存在形態と分析法に関する研究	五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)
ナノ物質の腸管上皮細胞層の透過吸収及び腸管上皮細胞機能への影響	ナノ物質の腸管上皮細胞層の透過吸収	戸塚護 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
	ナノ物質の腸管上皮細胞機能への影響	戸塚護 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

4 倫理面への配慮について

ヒト細胞は市販品を使用する。動物実験は、動物愛護の精神に則り、各研究所・大学のガイドラインに準拠し、実験動物委員会の承認に基づき実施する。

II 研究内容及び成果等

1 研究内容及び方法

(1) 研究項目名：樹状細胞を用いる *in vitro* アジュバント活性測定法の確立

(研究担当者名：穂山浩、国立医薬品食品衛生研究所)

1) 個別課題名：樹状細胞を用いる *in vitro* アジュバント活性測定法の確立

i) 培養ヒト樹状細胞とヒトリンパ球細胞の共培養評価系

培養ヒト樹状細胞と異ドナーのヒトリンパ球細胞を用いる。培養樹状細胞にアジュバント物質を添加して感作した後、アロジェニックな CD4 陽性 T 細胞と共培養する。モデルとして、アジュバントにはリポ多糖 (LPS)、forskolin、PGE2 を用いる。これらのアジュバントは、樹状細胞に作用し、CD4 陽性 T 細胞と共培養することで各々 Th1、Th2、Th17 など種々の T 細胞サブセットへ分化誘導する。共培養後、CD4 陽性 T 細胞を採取し、CD3 抗体と CD28 抗体で刺激し、培地中に産生されたサイトカイン類 (IL-2、IL-8、IL-17、IFN- γ 、MCP-1 (MCAF)、MIP-1 β 、TNF- α など) を Multiple beads-assay 法で測定し、T 細胞の分化、

活性化について解析を行う。長期にわたり経口摂取する可能性を考慮し、感作抗原とアジュバントの共存条件を検討し、測定項目セットの選定を行い、*in vitro* のアジュバント活性測定系の構築を行う。

ii) ヒト単球系細胞株を使用する評価系

ヒト単球系細胞株 THP-1 に phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA、20 ng/mL) および IL-4(20 ng/mL) を添加し 4 日間培養することによって、THP-1 由来樹状細胞 (TDDC) への分化誘導を行う。形態変化およびフローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原解析 (樹状細胞の特異マーカー: CD11c、DC-SIGN) によって樹状細胞への分化を確認する。得られた TDDC に対して、各種タンパク質抗原 (鶏卵主要アレルゲン Ovalbumin (OVA) 、Ovomucoid (OM) 、牛乳主要アレルゲン β -lactoglobulin、小麦主要アレルゲン gliadin、ソバ主要アレルゲン Fag e1、Fag e2、スギ花粉主要アレルゲン Cry j1、ダニ主要アレルゲン Der f1) 、OVA 酵素消化物、およびウシ血清アルブミン (BSA) を用いて 3 日間抗原刺激を行った。抗原提示能の指標として、抗原提示分子 MHC クラス II の構成分子である HLA-DR および補助刺激分子である CD86 および CD80 分子の発現量の変化をフローサイトメトリーにより測定した。抗原取り込み能は、FITC 標識 OVA を添加して 30 分間培養した後、フローサイトメトリーで蛍光強度を測定した。また、TexasRed 標識 OVA を添加して 4 h 培養した後、蛍光顕微鏡により OVA の細胞内局在を観察した。

2) 個別別課題名: ナノ物質のアジュバント活性の評価

培養ヒト樹状細胞とヒトリンパ球細胞の共培養評価系を用いて、食品に使用されるシリカのナノ粒子の粒径毎のアジュバント活性を評価する。T細胞の分化誘導やリンパ球からのサイトカイン産生を調べた。

(2) 研究項目名: ナノ物質経口投与による *in vivo* アジュバント活性測定 (研究担当者名: 手島玲子、国立医薬品食品衛生研究所)

1) 個別課題名: ナノ物質経口投与による *in vivo* アジュバント活性測定

マウスを用いた *in vivo* におけるナノ粒子のアジュバント影響を測定する。平成 22 年度にシリカ、ポリスチレン、平成 23 年度に二酸化チタンと市販白金水、平成 24 年度は、酸化亜鉛、カルシウム等についての *in vivo* での免疫影響を調べ、今までのデータの総括を行う。

BALB/c または B10.A マウスにモデル抗原タンパク質 OVA とナノ物質を週に 5 日、免疫増強作用があるサリチル酸を週に 2 日、3 週間経口投与し感作を行った。経時的に採血を行い、血清中抗原特異的 IgE 及び IgG 抗体価を測定し、4 週目および 6 週目に OVA 10 mg を感作と同様の方法で経口投与により惹起し、立毛・チアノーゼなどのアナフィラキシーショック等の全身症状を観察した。2 回めの惹起後、血清中抗原特異的 IgE 及び IgG 抗体価、

ヒスタミン濃度を ELISA により測定し、腸管免疫を担当する臓器、特に、パイエル板、腸管膜リンパ節を構成する抗原提示細胞並びにリンパ球のポピュレーション、T リンパ球の産生するサイトカインについて FACS 解析を行った。モデルアジュバントとしてサリチル酸、リノール酸、レシチンを用いたときの免疫反応と比較し、ナノ物質の免疫修飾活性を評価した。

(3) 研究項目名： *in vivo* 系と *in vitro* 系との測定結果の比較 (研究担当者名：蜂須賀 暁子、国立医薬品食品衛生研究所)

1) 個別課題名： *in vivo* 系と *in vitro* 系との測定結果の比較

ナノ物質の情報収集と、ヒト樹状細胞を用いた *in vitro* におけるアジュバント活性と、マウスを用いた *in vivo* における免疫応答の相違について解析する。ナノ物質の経口投与による生体影響については報告数が少なく、解明されていないため、*in vivo* の免疫影響の結果については慎重に検討する。

測定結果の比較に当たっては、動物種、系の相違の他、ナノ物質特有の物性についても検討する。粒径については、凝集やマトリックスとの相互作用に留意し、必要に応じて、生体試料中の粒径の測定を行う。ナノ物質の単位としては、重量の他、表面積、粒子数等についても比較検討を行う。

食品関連分野でのナノ物質の使用に関しては正確なデータはないが、2007 年の CSJ/JIFSA 共同シンポジウム「食品と化粧品分野におけるナノテクノロジー」でナノ製品は、食品分野において 500 品目程度上市されているとしており、現在ではさらに増加していると推定される。流通ナノ物質について情報の収集に努め、それらの情報をもとにサンプルの選定に反映させる。入手したナノ物質の粒子径、分散性等を統一したナノ物質試料を分担研究者に配布し、研究に供することにより、分担研究間のデータの比較を行う際の情報を可能な限り制御することを試みる。

(4) 研究項目名：ナノ物質の存在形態と分析法に関する研究 (研究担当者名：五十嵐 良明、国立医薬品食品衛生研究所)

1) 個別課題名：ナノ物質の存在形態と分析法に関する研究

化粧品には 100 nm 以下のいわゆるナノサイズの酸化チタンやシリカ粒子が機能性の向上のために添加されている。食品添加物や補助食品のような食品にも同様の物質が使用されているが、ナノサイズをアピールしているものはごくわずかであり、その存在状態や使用状況については明らかではない。調理器具や食品容器の添加剤についても劣化によって食品に混入する可能性があることから、その存在形態を明らかにすることが重要であり、消化器経路の吸収の有無及び体内分布について解明する必要がある。近年、ナノ物質のリスクを指摘する研究結果、一方でサイズによる明確な違いはないとする報告もある。ナノ物質の生体機能に及ぼす影響すなわちそのサイズが関与するのかどうかを確認するため

には、試験時のナノ物質のキャラクタライゼーションが重要である。

本研究では、食品に用いられる、あるいは混入する可能性のあるナノ物質の生体あるいは細胞への曝露時のナノ物質の存在状態を解析するとともに、食品、消化管、及び生体組織中でのナノ物質の安定性や再分散性等の挙動を評価した。ナノ物質に対する曝露がアレルギー反応性に影響を及ぼすかを明らかにするため、特に、化学物質による皮膚感作誘導性の観点からヒト培養細胞の表面抗原発現率及びサイトカイン放出を指標に評価した。ナノ物質の材質及びサイズ等の物理学的性状の違いが感作性反応に影響するかどうか、*in vitro* 試験によるナノ物質のサイズの影響評価の適切性を明らかにした。

試料として、シリカ粒子は平均一次粒子径 500 nm のもの (SiO₂-500)、及びシリカ懸濁液としては平均一次粒子径 20、50 及び 100 nm のシリカ粒子が水またはエチレングリコール (EG) に懸濁した 4 種 (SiO₂-20W, SiO₂-20EG, SiO₂-50EG, SiO₂-100EG) を用いた。化成品原料のシリカとして、親水性フュームドシリカ粒子 (A200, 平均一次粒子径 12 nm)、及びシリカ懸濁液 3 種類 (G1220, W7520, W7512S) を用いた。一次粒子径 35 nm の表面処理していない TiO₂-B、またはシリコンで表面処理した TiO₂-SAS の水分散液を用いた。酸化亜鉛は非イオン性界面活性剤で懸濁した ZnO 3010、陽イオン性界面活性剤で懸濁した ZnO 3008C、陰イオン性界面活性剤で懸濁した ZnO 3014A (いずれも一次粒子径 70 nm)、及び ZnO 1121W (一次粒子径 40 nm) を用いた。銀 (Ag) ナノ粒子は市販試薬で、極性溶媒分散用に表面コーティングし一次粒子径は 100 nm 以下とされている。プラチナ (Pt) 粒子も試薬であり、TEM 観察で 50 nm 以下と表示されている。なお Pt ナノコロイドを含むと謳うボトル水 3 種を入手した。Pt 濃度は製品 2 が最も高く (50 µg/500 ml)、以下、製品 3、製品 1 の順とされている。カルシウムナノ粒子は、牡蠣殻から製造されたナノカルシウム (NHB、平均粒子径 30~600 nm)、乳由来カルシウム (P-10、200 nm)、炭酸カルシウム (P-20、120 nm) 及びリン酸カルシウム (P-24、200 nm) を入手した。酸化アルミニウム懸濁液は、Al₂O₃-6- X1121W (50%、一次粒子径 45 nm) 及び Al₂O₃-7- AL-110 (10%、一次粒子径 10~20 nm) を供与された。

これら懸濁液、または自家調製した各ナノ物質懸濁液 (0.01、0.1%及び1%) の粒度分布及び平均粒子径を動的光散乱法により測定した。懸濁液の調製法 (攪拌や超音波処理等) による分散性の違い、及び経口摂取を想定した各種人工消化液、体内吸収を想定した血清、*in vivo*、*in vitro* 試験における動物や細胞に投与した媒体あるいは培養液中のナノ物質の存在状態について解析した。また、水に懸濁した時のゼータ電位についても測定した。

まず、各濃度 (0.1~1000 µg/ml) のナノ物質懸濁液を細胞に添加し、24~72 時間後の細胞生存率を調べるとともに、ナノ物質によるサイトカイン産生能を評価した。以下の試験に用いる細胞毒性が認められないナノ物質の前処理あるいは共存濃度を求めた。すなわち、ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞浮遊液 (2×10⁶ cells/ml) 500 µl に各ナノ物質懸濁液 500 µl を添加して、24~72 時間培養した。培養終了後、遠心して得られた上清の炎症性サイトカイン (IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70) 及びケモカイン (IL-8,

RANTES, MIG, MCP-1 及び IP-10) をビーズアレイキットで測定した。細胞生存率は WST-8 等の試薬や ATP 測定キットを用いて評価した。

次に、ナノ物質のアレルギー反応性に及ぼす影響を h-CLAT 法を利用して評価した。24 穴プレートに THP-1 細胞 2×10^6 cells/ml の細胞浮遊液 500 μ l 及び各濃度に調製したナノ物質懸濁液 250 μ l を入れ 24 時間培養した。次に、種々の濃度の感作性物質 (2,4-ジニトロクロロベンゼン, DNCB) 溶液 250 μ l を追加し、更に 24 時間培養した。培養終了後、常法に従って細胞表面を FITC 標識した抗体で染色し、PI 色素を添加後、フローサイトメトリーを用いて生細胞の CD54 及び CD86 抗原の発現増加率を求めた。

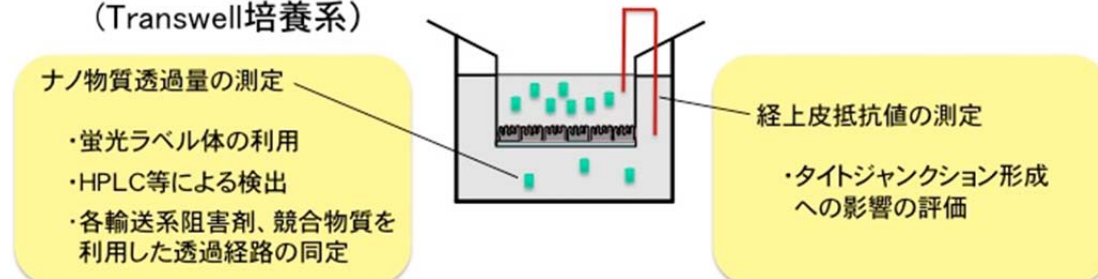
(5) 研究項目名：ナノ物質の腸管上皮細胞層の透過吸収及び腸管上皮細胞機能への影響
(研究担当者名：戸塚護、東京大学大学院農学生命科学研究科)

1) 個別課題名：ナノ物質の腸管上皮細胞層の透過吸収

ヒト腸管上皮細胞株Caco-2細胞の透過膜上での単層培養系 (Transwell培養系) を用いて、細胞層の頂端側から側基底膜側への移動を解析する。すなわち、頂端側の培地に各種ナノ物質を添加し、一定時間経過後の基底膜側の培地中の存在量を測定する。また、ナノ物質自身および他の物質の上皮細胞間隙を介した透過への影響の指標となる経上皮抵抗値の変化についても解析を行う。さらに、Caco-2細胞およびマウス小腸上皮細胞株MoS13細胞を用いて、通常の培養ディッシュを用いた単層培養系に各種ナノ物質を添加し、上皮細胞内への取り込みについても検討する。各輸送系の阻害剤、競合物質を添加した際の透過吸収量の変化を測定することにより、透過吸収経路の推定を行う。

モデルナノ物質としては、酸化亜鉛などの金属物質、シリカなどの非金属物質、ポリスチレンなどのポリマー等を用いる。各ナノ物質ごとに独自の検出・定量方法を確立する。ナノ物質の粒径、材質などと透過吸収性の関係について検討する。

ヒト腸管上皮細胞株Caco-2の
透過膜上単層培養系
(Transwell培養系)



2) 個別課題名：ナノ物質の腸管上皮細胞機能への影響

各種ナノ物質が腸管上皮細胞の免疫調節機能に与える影響について解析する。腸管上皮

細胞株に酸化ストレス刺激や微生物成分刺激を加えた時に誘導される、各種サイトカイン・ケモカインなどの液性因子の産生、膜表面分子の発現などに対して、ナノ物質が及ぼす影響を解析する。

Caco-2細胞、MoS13細胞、およびマウス大腸上皮細胞株MoC5細胞を用いる。これらの細胞の通常の培養ディッシュにおける単層培養系に対して、酸化ストレスや微生物成分刺激を加える際に各種ナノ物質を添加し、その影響を解析する。酸化ストレスとしては過酸化水素水を、微生物成分刺激としてはToll様受容体（TLR）の各種リガンド（リポ多糖、フラジェリン、poly I:C、Pam3CSK4）を用いる。培地中に分泌されたインターロイキン6（IL-6）などの炎症性サイトカイン、IL-8、MIP-2などのケモカインをELISA法にて定量するとともに、そのmRNA発現を定量的RT-PCR法にて解析する。分泌型IgAの管腔側への輸送に関わる多量体免疫グロブリン受容体（pIgR）の発現に対する影響についても検討する。さらに、マウス腸管粘膜固有層由来の免疫細胞との相互作用に与える影響についても解析を行う。

マウス腸管上皮細胞株において得られた結果については、他の*in vivo*および*in vitro*マウス実験系で得られたアジュバント効果などの結果と比較検討する。

2 研究成果、考察、今後の課題

(1) 研究項目名：樹状細胞を用いる *in vitro*アジュバント活性測定法の確立
(研究担当者名：穂山浩 所属機関名 国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部)

1) 個別課題名：樹状細胞を用いる*in vitro*アジュバント活性測定法の確立

a. 培養ヒト樹状細胞とヒトリンパ球細胞の共培養評価系

陽性コントロールアジュバンドとして、Th1 アジュバンドとして知られている LPS (0.1 ppm)、Th2 アジュバンドとして知られている flagelin (0.05 ppm)、Th17 アジュバンドとして知られている curdlan (0.05 ppm)を用いた。測定した 17 サイトカインの中で顕著な産生が得られたのは、IL-2、IL-8、IL-17、IFN- γ 、MCP-1 (MCAF)、MIP-1 β 、TNF- α の7サイトカイン・Fig. 1~Fig. 7)であった。LPS で対照と比べ顕著に高い産生を示すサイトカインは 7 サイトカインすべてで、flagelin で対照と比べ顕著に高い産生を示すサイトカインは、IL-2 (Fig. 1) と TNF- α (Fig. 7) の 2 サイトカインであった。Curdlan で対照と比べ顕著に高い産生を示すサイトカインは、IL-8 (Fig. 2)、MCP-1 (Fig. 5)、MIP-1 β (Fig. 6) であった。

b. ヒト単球系細胞株を使用する評価系

THP-1 細胞は 20 ng/mL PMA および 20 ng/mL IL-4 を添加し培養することで培養フラスコに接着し、典型的な樹状細胞様の形態を示すことを確認した。また、樹状細胞の特異マーカー (CD11c, DC-SIGN) が PMA および IL-4 添加により発現上昇することを明らかにした。また、抗原提示分子の一つである HLA-DR, 補助刺激分子である CD86 および CD80 の発現が

上昇することをフローサイトメトリーにより確認した。以上の結果より、PMA および IL-4 で分化誘導した TDDC が樹状突起を有した CD11c⁺, DC-SIGN⁺の樹状細胞様に分化することが示された。

TDDC の抗原取り込み能について、鶏卵の主要アレルゲンである OVA を用いて検討した。蛍光標識した OVA を TDDC に添加し、取り込み能をフローサイトメトリーおよび蛍光顕微鏡を用いて測定した。その結果、37°C 下でのインキュベートにより TDDC の蛍光強度は顕著に上昇した。また、蛍光顕微鏡観察によると、TDDC 内において核と Texas Red 蛍光標識 OVA が共局在していることが確認された。以上の結果から、TDDC が OVA 取り込み能を有していることが示された。

TDDC が種々の抗原刺激に対して抗原提示が誘導されるかを検討した。抗原として、OVA, OM (鶏卵), β ラクトグロブリン (牛乳), グリアジン (小麦), Fag e 1, Fag e 2 (ソバ), Cry j 1 (スギ花粉), Der f 1 (ダニ) の 8 種類を使用した。その結果、それぞれの抗原刺激に応じて、HLA-DR ならびに CD86 の著しい発現上昇が認められた。続いて、抗原提示のネガティブサンプルとして、BSA やアミノ酸の一種であるグリシンを用いて、TDDC に対する抗原提示能を検討した。その結果、BSA とグリシンの刺激では、HLA-DR, CD80 および CD86 の発現量について有意な上昇は認められなかった。以上の結果より、誘導樹状細胞様 THP-1 の抗原提示能を指標としたタンパク質のアレルゲン性評価手法として有用であり、アジュバンド物質を共存することにより、アジュバンド活性を評価できる可能性が示唆された。

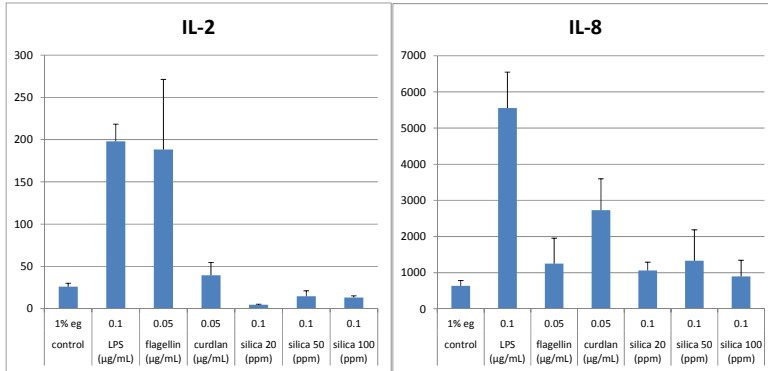


Fig.1 IL-2 サイトカイン産生

Fig.2 IL-8 サイトカイン産生

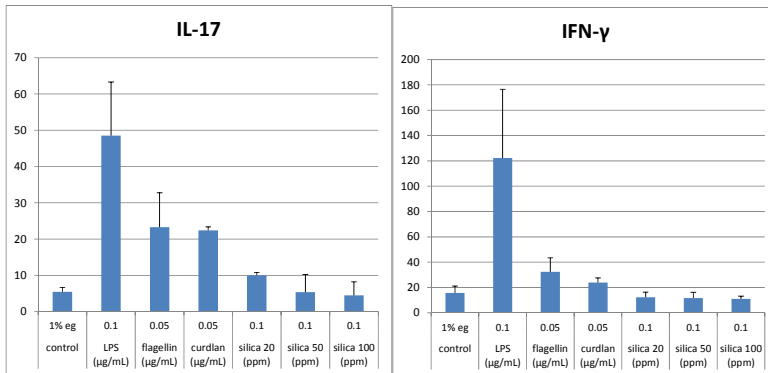


Fig.3 IL-17 サイトカイン産生

Fig.4 IFN-γ サイトカイン産生

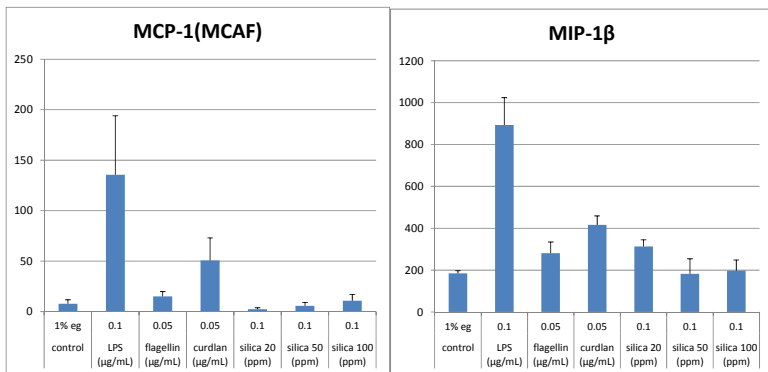


Fig.5 MCP-1 サイトカイン産生

Fig.6 MIP-1β サイトカイン産生

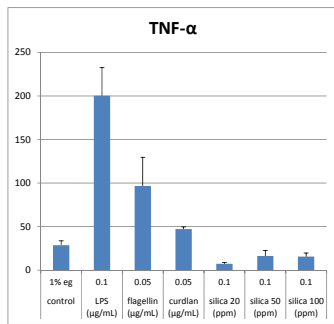


Fig.7 TNF- α サイトカイン産生

2) 個別課題名：ナノ物質のアジュバント活性の評価

培養ヒト樹状細胞にナノシリカ粒子を添加し 24 時間培養後、洗浄した後に異ドナーの培養ヒト CD4+RA+T 細胞との共培養評価系によりアジュバント活性評価法を検討した。平成 22 年度のナノシリカ粒子の検討は添加濃度が顕微鏡観察で毒性が見られる 0.01% (100ppm) 以下の検討であったが、未だ高濃度付近で行った結果を示した (100 および 10ppm)。平成 24 年度はナノシリカ粒子の添加濃度は、0.1 ppm、1 ppm、10ppm の添加で行った。この濃度幅では顕微鏡観察上毒性が見られなかった。多くのサイトカイン濃度がナノシリカ粒子 0.1 ppm 濃度で高い産生量を示していることから、添加濃度を増やすことにより、サイトカイン産生の機能的な抑制が示唆された。そのため、ナノシリカ粒子 20 nm、50 nm、100 nm の各粒子 0.1 ppm で評価した。

ナノシリカ粒子 20 nm、50 nm、100 nm 添加のサイトカイン産生はすべて対照と比べて顕著な差がなかった。しかし IL-2 (Fig.1)、MCP-1 (Fig.5)、TNF- α (Fig.7) のサイトカイン産生に関しては粒径 20 nm 添加は抑制傾向が見られた。IL-2 の機能としては、T 細胞の増殖及び活性化、B 細胞の増殖と抗体産生能の亢進、単球・マクロファージの活性化、ナチュラルキラー細胞の増殖・活性化、リンホカイン活性化キラー細胞 (LAK 細胞) の誘導などが挙げられる。MCP-1 は単球の走化性促進、ライソゾーム酵素や活性酸素の放出促進、抗腫瘍活性の促進等の生理活性がある。TNF- α は細胞接着分子の発現やアポトーシスの誘導、炎症メディエーター (IL-1、IL-6、プロスタグランジン E2 など) や形質細胞による抗体産生の亢進を行うことにより感染防御や抗腫瘍作用に関与するといわれている。従って本評価系を用いてナノシリカ粒子によるアジュバント活性を評価したが、粒径 20 nm から 100 nm の範囲では、顕著なアジュバント活性は示さないことが判明した。しかし粒径 20 nm のシリカ微粒子は、IL-2 (Fig. 1)、MCP-1 (Fig. 5)、TNF- α (Fig. 7) の産生が若干抑制傾向あることが示唆された。本研究で確立した *in vitro* アジュバント評価では、ナノシリカ粒子は粒径 20 nm では、IL-2、MCP-1、TNF- α の産生に若干の抑制影響があるものの、顕著なアジュバント活性の影響はないことが示唆された。

(2) 研究項目名：ナノ物質経口投与による *in vivo* アジュバント活性測定 (研究担当者名：手島玲子、国立医薬品食品衛生研究所) 手島

1) 個別課題名：ナノ物質経口投与による *in vivo* アジュバント活性測定

マウスにモデル抗原タンパク質オボアルブミン (OVA) とナノ物質を週に5日、免疫増強作用があるサリチル酸を週に2日、3週間経口投与しOVA感作マウスを作成した。投与スケジュールを表2-1に示す。一部、サリチル酸投与経路を経口と腹腔内で比較した。穏やかな条件として、サリチル酸を用いない場合は、抗原OVAとナノ物質のみ9週間投与した。マウスについては、BALB/cとB10.Aの2系統を用いた。

対照群としては、ナノ物質のシリカの代わりに生理食塩水を用いた群 (C群)、および食物アレルギー陽性群としてリノール酸：レシチン (4：1) にOVAを乳化して投与した群 (B群：SLL)、OVAを投与しない群 (A群) 無処理群 (NT群) を設定した。

経時的に採血を行い、血清中抗原特異的IgE及びIgG抗体価を測定し、4週目および6週目にOVA 10 mgを感作と同様の方法で経口投与により惹起し、立毛・チアノーゼなどのアナフィラキシーショック等の全身症状を観察した。2回目の惹起後、血清中抗原特異的IgE及びIgG抗体価、ヒスタミン濃度の他、腸管免疫を担当する臓器であるパイエル板、腸管膜リンパ節を構成する抗原提示細胞並びにリンパ球のポピュレーション、Tリンパ球の産生するサイトカインについて解析を行った。

表2-1 経口感作スケジュール

(動物：マウス、メス、7週令)

試験期間 (SA投与なしの場合)	1 w	2 w	3 w (~9w)	4 w (10w)	5 w (11w)	6 w (12w)
経口感作 ±OVA 1mg	○○○○○	○○○○○	○○○○○			
経口投与 SA 0.3mg	● ●	● ●	● ●			
経口惹起 OVA 10 mg				◎		◎
	観			察		解剖

シリカ

4週目では、陽性群 (B群：SLL) で、頻繁な鼻こすり、立毛等の症状が見られた。ナノシリカ投与群では、それよりも弱い鼻こすり行動が観察されたが、ナノ非投与群 (C群) との差は明瞭ではなかった。6週目での経口惹起においても同様の傾向が認められた。

血清中抗原特異的IgG1抗体価を表2-2に示す。

数回の試行において、抗原OVAを投与していない陰性対照群では抗体価の上昇は認められず、陽性対照であるSLL乳化投与群では、抗体価の上昇が8割以上の個体で認められた。ナノシリカ非投与の検体対照群においては、各条件、試行において抗体価の上昇が時として観察された。20 nm (EG) 及び50 nmナノシリカでは、常に抗体価が上昇する個体が認めら

れた。スコア 3 は、ELISAの50%反応値を与える希釈倍率としておよそ10000 倍以上、スコア 2 はおよそ1000倍に相当するが、その程度まで上昇する個体も見られた。表 2 の中で斜体として記載している 2 回目の試行においては、実験途中でマウスの死亡が多発した。、5 6匹中12匹 (21%) が1回目の惹起1日後までに死亡したため理由としては動物によるものと飼育を含む実験によるものが考えられるが、死亡は2 日間の内に集中し、ほぼ全ての群で見られ、腸管の炎症によるものと考えられたが、原因は特定出来なかった。全身症状と抗体価の上昇に相関がないことから、ナノ物質の免疫応答とは直接関係しない事象と判断した。この試行を除くと、検体対照群で抗体価の上昇が見られたものは、1 匹である。一方、20 nm及び50 nmナノシリカでの抗体価の上昇は複数匹において観察されているため、20 nm (EG) 及び50 nmナノシリカにおいては、抗体価の上昇傾向が示唆された。100 nm及び500 nmナノシリカでは、顕著な抗体産生は認められなかった。また、同じ公称粒径である20 nm (H20) では、反応は見られなかった。

血清中OVA特異的IgE抗体価は、おおむねIgG1の上昇が大きい個体において、弱い上昇が認められた。特異的IgG2a抗体価については、IgEよりさらに弱いものの、同様の傾向が認められた。血中ヒスタミン濃度、については、群間での明確な差は認められなかった。

表2-2 ナノシリカ投与のマウス血清中抗原特異的IgG抗体価の結果

シリカ SiO ₂	感作期間：3 週間 SA：経口投与 0.3mg							感作期間：9 週間 SA：-									
	動物数	抗体価*1				死亡数	スコア*2	動物数	抗体価				死亡数	スコア*2			
		-	+	++	+++				-	+	++	+++					
マウス：BALB/c																	
-/EG (陰性対照)	6	6	0	0	0		0.0										
OVA/SLL (陽性対照)	5	1	0	1	3		2.2										
OVA/EG (溶媒対照)	5	4	0	0	1		0.6										
OVA/EG-SiO ₂ 20nm	6	5	1	0	0		0.2										
OVA/EG-SiO ₂ 50nm	6	3	1	1	1		1.0										
OVA/EG-SiO ₂ 100nm	6	6	0	0	0		0.0										
OVA/EG-SiO ₂ 500nm	6	6	0	0	0		0.0										
OVA/EG-SiO ₂ (H20) 20nm	6	6	0	0	0		0.0										
-/EG (陰性対照)	9	8	0	0	0	1	0.0	3	3	0	0	0	0	0	0	0.0	
OVA/SLL (陽性対照)	3	0	1	0	1	1	2.0	8	1	0	2	4	1	2.3			
OVA/EG (溶媒対照)	6	2	0	2	1	1	1.4	6	6	0	0	0	0	0.0			
OVA/EG-SiO ₂ 20nm	6	1	0	1	1	3	1.7	6	2	0	2	0	2	1.0			
OVA/EG-SiO ₂ 50nm	7	4	0	1	0	2	0.4	7	3	1	0	0	3	0.3			
OVA/EG-SiO ₂ 100nm	7	5	0	0	1	1	0.3	7	4	0	0	0	3	0.0			

OVA/EG-SiO ₂ 500nm	6	3	0	0	0	3	0.0							
OVA/EG (SA:静注)	3	3	0	0	0		0.0							
OVA/EG (SA:経口)	3	3	0	0	0		0.0							
OVA/EG-SiO ₂ 50nm (SA:静注)	6	4	0	2	0		0.7							
OVA/EG-SiO ₂ 50nm (SA:経口)	3	2	0	1	0		0.7							
マウス : B10. A														
-/ EG (陰性対照)	6	0	0	0	0		0.0							
OVA/SLL (陽性対照)	6	0	0	2	4		2.7							
OVA/EG (溶媒対照)	6	4	2	0	0		0.3							
OVA/EG-SiO ₂ 20nm	6	4	1	1	0		0.5							
OVA/EG-SiO ₂ 50nm	6	5	0	1	0		0.3							

*1 : 500倍希釈血清のELISA数値で分類 - : <200, + : 200-500, ++ : 500-1000, +++ : >1000

*2 : 抗体価一、+、++、+++を各々0、1、2、3としたときの荷重平均

OVA : オボアルブミン、EG : エチレングリコール、SLL : リノール酸 : 大豆レシチン=4 : 1、
SA : サリチル酸

また、脾臓重量においても群間での差は認められなかった。脾臓、パイエル板、腸間膜リンパ節のリンパ球のサブセット解析をCD3、CD4およびCD8aの抗体を用いてFACSにより行った。パイエル板および腸間膜リンパ節では、リンパ球当たりのCD4陽性細胞（ヘルパーT細胞）の比率が検体対照群と比較して20nm（EG）ナノシリカ群で上昇傾向にあった（パイエル板、9.7(対照)/15.5(20nm)%、腸間膜リンパ節、48.3(対照)/53.6(20nm)%）。3臓器の細胞を培養し、細胞内サイトカインについてTh1サイトカインであるIFN- γ 、Th2サイトカインであるIL-4およびTh17サイトカインであるIL-17について同様に測定したが、顕著な差は認められなかった。Tregについては、CD25および核内Foxp3の抗体を用いて測定したところ、パイエル板において、対照群と比較して20nmのE群で上昇傾向が認められ（CD4+CD25+、1.09(C)/1.55(E)%、CD4+Foxp3+、0.71(C)/1.12(E)%、）、Tregの比率の上昇が示唆された。

二酸化チタン

ナノシリカと同様にナノ二酸化チタンをマウスに投与し、免疫影響を観察した。血清中OVA特異的IgG1抗体価の結果を表2-3に示す。ナノ二酸化チタンは、アナターゼ型（Aldrich #637254）とルチル型（Aldrich #637262）、およびシリカとの混合物（Aldrich #641731）の3種を用いた。サリチル酸併用の3週間投与では、抗体価の上昇がアナターゼ型、ルチル型共に7匹中1匹で認められた。感受性の上昇を期待して、マウスを今までのBALB/cからB10. Aに変えて

同条件での実験を行ったところ、抗体価が上昇するマウスが増加した。ただし、ナノ非投与の群でも応答性が上昇した。同じくB10.Aマウスで、サリチル酸なしの9週間投与を行ったところ、3週間投与よりも全体的に抗体価の上昇が認められた。IgE抗体価はシリカのとおり同じように、IgG1より弱く同傾向に変動した。腸管免疫を担当する臓器である脾臓、パイエル板、腸管膜リンパ節の細胞を用いて、T細胞サブセット等の解析を行ったが、いずれの投与系においても、顕著な変化は認められなかった。

表2-3 ナノ二酸化チタン投与のマウス血清中抗OVA特異的IgG抗体価の結果

二酸化チタンTiO ₂	感作期間： 3週間 SA：経口投与 0.3mg						感作期間： 9週間 SA：－						
	動物数	抗体価				スコア *	動物数	抗体価				スコア *	
		-	+	++	+++			-	+	++	+++		
マウス：BALB/c													
-/- (無処置群)	6	6	0	0	0	0.0	6	6	0	0	0	0.0	
OVA/SLL (陽性対照)	6	1	0	2	3	2.2							
OVA/H2O (検体対照)	3	3	0	0	0	0.0							
OVA/TiO ₂ anatase	7	6	0	1	0	0.3	1	1	0	0	0	0.0	
OVA/TiO ₂ rutile	7	6	0	0	1	0.4	1	1	0	0	0	0.0	
OVA/TiO ₂ +SiO ₂	7	7	0	0	0	0.0	1	1	0	0	0	0.0	
マウス：B10.A													
-/- (無処置群)	6	6	0	0	0	0.0	3	3	0	0	0	0.0	
OVA/SLL (陽性対照)	6	1	1	2	2	1.8	3	0	0	1	2	2.7	
OVA/H2O (検体対照)	6	3	0	1	2	1.3	3	1	1	1	0	1.0	
OVA/TiO ₂ anatase	7	4	1	1	1	0.9	3	1	0	1	1	1.7	
OVA/TiO ₂ rutile	7	3	0	2	2	1.4	4	0	1	1	2	2.3	
OVA/TiO ₂ +SiO ₂	7	2	3	0	2	1.3	3	2	0	0	1	1.0	

白金

BALB/cマウスに市販ナノ白金水3種(A、B、C)および試薬白金粉末(50nm)水溶液を自由飲水摂取させ、他はナノシリカと同様に3週間OVA感作を行った。サリチル酸の投与ありなしで、ナノ摂取期間を2種類設定した。消費水量はおよそ5ml/日であった。全身症状には、コントロール群と比較し、顕著な変化は認められなかった。血清中OVA特異的IgG1抗体価の結果を表2-4に示す。各群において、数匹の抗体価の上昇が見られた。それ以外の検査項目においては、顕著な差は認められなかった。

表2-4 ナノ白金投与のマウス血清中抗OVA特異的IgG1抗体価の結果

白金 自由摂取 マウス：BALB/c	感作期間： 3 週間 SA：経口投与 0.3mg						感作期間： 9 週間 SA：－					
	動物 物 数	抗体価				スコア *	動物 物 数	抗体価				スコア *
		-	+	++	+++			-	+	++	+++	
OVA/50nm Pt 4 ug/ml	-						3	3	0	0	0	0.0
OVA/白金水A 0.1 ug/ml	3	3	0	0	0	0.0	4	2	1	1	0	0.8
OVA/白金水B 0.023 ug/ml	3	2	1	0	0	0.3	3	0	0	0	0	0.0
OVA/白金水C 0.05 ug/ml	3	2	0	1	0	0.7	3	0	0	0	0	0.0

酸化亜鉛

公称粒径70nmの酸化亜鉛を、無極（3010）、カチオン性（3008C）、アニオン性（3014A）のコロイド水溶液に調製したもの、および電荷調整をしていない40nmの水溶液（1121W）を、B10.AマウスにOVAと共に投与し、免疫影響を観察した。その結果、3週間の感作終了後の1回目の惹起投与で、陽性対照では軽度の体温降下が認められたが、被験物質の酸化亜鉛では顕著な反応は認められなかった。血清中OVA特異的IgG1抗体価の結果を表2-5に示す。B10.Aマウスであるので、検体対照群においても若干の抗体価の上昇が認められたが、4種の酸化亜鉛全てで、陽性対照群と同等以上の強い応答が認められた。IgG2aについても上昇傾向が見られ、特にIgG1が投与開始2週目から上昇が見られた個体において、顕著であった。IgG1の上昇が強い個体においては、IgEの上昇もIgG2aよりも弱いものの認められた。脾臓重量、それ以外の検査項目においては、測定のパラツキ以上の顕著な差は認められなかった。

亜鉛は、必須微量元素であり、その欠乏は、成長遅延、味覚障害、創傷治癒遅延、免疫不全などの疾患の発症に関与する。数多くの亜鉛タンパク質が知られており、近年では伝達因子としての役割も明らかにされてきている。

使用した酸化亜鉛ナノ粒子は、動的光散乱法による測定によれば、4種とも水溶液中では平均粒径200 nm程度であり、濃度によらず一定の値を示し、安定に分散していた。しかし、PBS溶液では、無極（3010）及びカチオン性（3008C）界面活性剤含有の70nmの粒子は、激しい凝集を起こして沈殿し、40nmの水溶液（1121W）も0.01%以下の濃度になると沈殿したが、アニオン性界面活性剤のコロイド水溶液（3014A）は安定であり、添加剤の極性による分散性の違いが大きかった。

今回、酸化亜鉛ナノ粒子4種とも強いIgG1抗体産生作用を示した。これは、生体内で粒子が4種とも同等に作用し、ナノ粒子としての刺激が免疫系に影響を与えたと考えるよりも、亜鉛そのものが作用した可能性が高いと考えられる。

表2-5 ナノ粒子投与のマウス血清中抗OVA特異的IgG1抗体価の結果

Zn0 マウス : B10.A	感作期間 : 3週間 SA : 経口投与 0.3mg					スコア *
	動物 物 数	抗体価				
		-	+	++	+++	
-/- (無処置)	6	6	0	0	0	0.0
OVA/SLL (陽性対照)	6	2	0	1	3	1.8
OVA/- (溶媒対照)	6	3	2	0	1	0.8
OVA/Zn0 3010	6	1	0	1	4	2.3
OVA/Zn0 3008C	6	1	1	0	4	2.2
OVA/Zn0 3014A	6	1	1	0	4	2.2
OVA/Zn0 1121W	6	0	1	0	5	2.7

炭酸カルシウム、酸化アルミニウム

市販栄養補助食品として市販されているカルシウム4製品の中で、約200 nmと比較的分散性が良好であったカルシウムC (炭酸カルシウム)、及び酸化アルミニウム試薬2製品の中で、100 nm以下の割合が高かったAL-110について、ナノシリカと同様にB10.Aマウスで投与実験を行った。

血清中OVA特異的IgG1抗体価の結果を表2-6に示す。カルシウムCについては、抗体価の上昇が数匹のマウスで認められたが、検体対照群においても弱い上昇が認められたため、明確な差異ではなかった。

酸化アルミニウムについては6匹中、1匹で2週目から中程度のIgG1抗体価の上昇が見られ、この個体においてはIgG2a抗体価の上昇も認められた。陽性対照群の抗体価の上昇が、IgG1 > IgG2a > IgG2bの順で見られるのに対し、酸化アルミニウムでは、IgG1 > IgG2aであり、IgG2bの上昇は認められなかった。抗体価以外の検査項目においては、両被験物質とも測定のパラツキ以上の顕著な差は認められなかった。

無機アジュバントとして知られているAlumは水酸化アルミニウムゲルであり、Th2細胞が関与するIgG1サブクラス抗体の産生を増加させる。今回、酸化アルミニウムによる3匹中1匹の抗体価の上昇は、アルミニウムの影響も考えられる。

ポリスチレン

粒子系の標準品として用いられるポリスチレンについて、ナノシリカと同様にBALB/cマウスで実験を行った。血清中OVA特異的IgG1抗体価の結果を表2-6に示す。ポリスチレン25、50、100、500 nmの水溶液での分散性は良好であったが、抗体価の上昇は認められず、抗

体価以外の検査項目においても、顕著な変化は認められなかった。

表2-6 ナノ粒子投与のマウス血清中抗OVA特異的IgG1抗体価の結果

マウス : B10. A	感作期間 : 3週間 SA : 経口投与 0.3mg					スコア *
	動物 数	抗体価				
		-	+	++	+++	
-/- (無処置)	6	6	0	0	0	0.0
OVA/SLL (陽性対照)	6	0	0	2	4	2.7
OVA/- (溶媒対照)	6	4	2	0	0	0.3
OVA/カルシウムC (P-20)	6	4	1	1	0	0.5
OVA/AL203 (AL110)	6	5	0	0	1	0.5
マウス : BALB/c						
-/EG	2	2	0	0	0	0.0
OVA/SLL	3	2	0	1	0	0.7
OVA/-	5	4	1	0	0	0.2
OVA/PS 25nm	6	6	0	0	0	0.0
OVA/PS 50nm	5	5	0	0	0	0.0
OVA/PS 100nm	6	6	0	0	0	0.0
OVA/PS 500nm	5	4	0	0	1	0.6

PS: ポリスチレン

試薬グレードのナノ物質の経口投与により、同時投与のOVAに対する特異的抗体価の上昇がナノシリカ20および50 nmにおいて観察された。この現象は、ナノシリカの粒径により異なり、100、500 nmでは認められなかった。また、製法が異なり表面がマイナス電荷を帯びている20 nmのナノシリカは反応性が低かった。ナノシリカと同様にナノ二酸化チタンにおいても、マウス2系統において弱い抗体価の上昇の可能性が示唆された。マウスを用いた動物実験であり、匹数が少ないため、今回の結果のみで結論を出すことは困難であるが、ナノ物質によっては経口摂取によりアジュバント活性を示す可能性が示唆された。今後、匹数を増やした実験と、粒径依存の現象が他物質でも起こるかどうかを、20~200 nm程度の粒径系列で、塩、pH、タンパク質の共存においても安定した分散を示す粒子、あるいは同じ粒径で異なる材質の粒子を用いて調査し、データを蓄積していくことが課題である。

(3) 研究項目名： *in vivo* 系と *in vitro* 系との測定結果の比較（研究担当者名：蜂須賀 暁子、国立医薬品食品衛生研究所）

1) 個別課題名： *in vivo* 系と *in vitro* 系との測定結果の比較

平成22年度においては、生産量が多く、食品での使用も多いと予測されるシリカ（二酸化ケイ素、指定添加物）、平成23年度は引き続き粒径や電荷など系列として入手が可能なナノ粒子の検索に努め、酸化亜鉛、二酸化チタン（指定添加物）、白金（既存添加物）、銀（既存添加物）など金属ナノ粒子を選択した。平成24年度は、食品として市販されている物質の検索に努め、栄養補助食品のカルシウム製品4点等を入手した。表3-1に実験で使用したナノ物質を示す。

表3-1 実験で使用したナノ物質一覧

<p>1. シリカ（二酸化ケイ素、5種） （試薬）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 20 nm, 40% in H₂O (Alfa Aesar社43110) ・ 20 nm, 30% in Ethylen glycol (Alfa Aesar社43091) ・ 50 nm, 30% in Ethylen glycol (Alfa Aesar社43093) ・ 100 nm, 30% in Ethylen glycol (Alfa Aesar社43094) ・ powder 500 nm (Alfa Aesar社 L16985)
<p>2. 酸化亜鉛（4種） （試薬）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ ZN-3010, 70nm, 50% in H₂O with nonionic dispersant (Alfa Aesar社44905) ・ ZN-3008C, 70nm, 50% in H₂O with cationic dispersant (Alfa Aesar社45009) ・ ZN-3014A, 70nm, 50% in H₂O with anionic dispersant (Alfa Aesar社45012) ・ ZH1121W, 40nm, 40% in H₂O (Alfa Aesar社45409)
<p>3. 二酸化チタン（3種） （試薬）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ TiO₂ anatase, <25 nm, powder, 99.7% (Aldrich社 637254) ・ TiO₂ rutile, <100 nm, powder, 99.5% (Aldrich社 637252) ・ TiO₂+SiO₂, <50 nm, powder, 99.8% (Aldrich社 641731) SiO₂とTiO₂の非晶質混合物
<p>4-1. 白金（1種） （試薬）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ <50 nm, nanopowder, ≥99.9% (Aldrich社 685453) <p>4-2. 白金水及び口腔内洗浄液（5種） （食品等）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 白金水A：白金ナノコロイド配合ウォーター、白金ナノコロイド 100 ng/ml ・ 白金水B：白金ナノコロイド配合ウォーター、白金ナノコロイド 23 ng/ml ・ 白金水C：2ナノサイズの白金ナノコロイド配合、白金ナノコロイド 50 ng/ml ・ 白金水D：白金ナノコロイド配合ウォーター、白金ナノコロイド 16 ng/ml ・ 白金水E：白金ナノコロイド配合口腔内洗浄液、含有量不明
<p>5. 銀（1種） （試薬）</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Silver, <100 nm, powder (Aldrich社 576832) 有機コーティング。 10.49 g/cm³

6. 銀-銅合金 (1種) (試薬)
・ Silver-Copper alloy, 100 nm, powder (Aldrich社 576824)
7. 金 (1種) (試薬)
・ <100 nm, nanopowder, 99.9% (Aldrich 636347)
8. カルシウム栄養補助食品 (4種) (食品等)
・ カルシウムA : 30~600 nm, Ca 13.7126g/100g 含有 ナノカルシウム
・ カルシウムB : 高分散ミルクカルシウム製剤、平均粒子 $0.20 \pm 0.06 \mu\text{m}$ (ナノカルシウム) 乳清ミネラル 40%以上含有、HD ミルクカルシウム P-10 粉末
・ カルシウムC : 炭酸カルシウム製剤、平均粒子 $0.12 \pm 0.06 \mu\text{m}$ (ナノカルシウム) 炭酸カルシウム 51% 含有、ナノカルシウム P-20 粉末
・ カルシウムD : リン酸カルシウム製剤、平均粒子 $0.20 \pm 0.06 \mu\text{m}$ (ナノカルシウム) リン酸カルシウム 63%以上含有、フォスカルシウム P-24 粉末
9. ハイドロキシアパタイト (1種) (試薬)
・ SHAp (焼成ハイドロキシアパタイトナノ粒子)、平均粒径40nm、(株) ソフセラ
10. 酸化アルミニウム (2種) (試薬)
・ Aluminum oxide, NanoDur™ X1121W, 35nm, 50% in H ₂ O (Alfa Aesar 社)
・ Aluminum Oxide, TECNADIS-AL-110-1KG, 10-20nm, 10 w/w% in H ₂ O (AR BROWN 社)
11. ポリスチレン (4種) (試薬)
・ micromer ® 01-00-251修飾なし25 nm、単分散ポリマーラテックス粒子、micromod社製
・ micromer ® 01-00-501修飾なし50 nm
・ micromer ® 01-00-102修飾なし100 nm
・ micromer ® 01-00-502 修飾なし500 nm
12. 酸化マグネシウム (1種) (試薬)
・ Magnesium oxide, nanopowder, <50 nm (Aldrich社 549649)

初年度に試薬グレードのシリカ粒子を購入し、各分担研究者に配布した。粒子の性状等を表3-2に示す。粒子径としては、20、50、100 nmのエチレングリコール溶液と500 nmの粉体、および製法が異なると思われる20 nmの水溶液を実験に用いた。粒子径が2倍になると体積は8倍の変化を示すことから、約2倍ごとに異なる粒径を選択した。また、ナノの定義にも用いられる100 nmを挟んだ粒径を用いた。

試薬グレードの粒子径は、希釈溶液においてほぼ表示通りであることが確かめられている(分担研究者：五十嵐)ことから、表示粒子径における計算値も表3-2に示した。

*in vivo*では、1回に1%溶液を0.1ml経口投与したことから、ナノ粒子としては計算上 $10E+12 \sim 10E+16$ 個程度が毎回投与されていることになる。一方、*in vitro*で、0.01%の溶液を用いた場合は、約 $10E+11 \sim 10E+15$ 個/ml程度存在することになり、細胞を $10E+6$ /mlと仮定すると、計算上は細胞1個あたり約 $10E+5 \sim 10E+9$ 個のナノ粒子に相当することになる。実験での投

与量に関しては、*in vivo*では、シリカが食品添加物として2%の濃度まで認められていること、および溶媒のエチレングリコール量の影響を考慮して設定し、*in vitro*では、細胞毒性から設定した。

表3-2 実験に用いたシリカ（二酸化ケイ素）ナノ粒子の性質

	20 nm (H ₂ O)	20 nm	50 nm	100 nm	500 nm
Alfa Aesar #	43110	43091	43093	43094	L16985
Silicon(IV) oxide, SiO ₂	コロイド分散液	コロイド分散液	コロイド分散液	コロイド分散液	粉体
溶液濃度 (%)	40	30	30	30	—
溶媒	H ₂ O	ethylene glycol (EG)	EG	EG	—
粒子径 (μm)	0.02	0.02	0.05	0.1	0.5
表面積 (m ² /g)	180				
密度 (溶液、粉体g/cm ³)	1.3	1.3	1.3	1.3	2
粒子電荷	(-)				
添加物	Na ₂ O 0.38%	H ₂ O 1.0%	H ₂ O 1.0%	H ₂ O 1.0%	—
pH	10	6	3	3	—
粘度 (Pa·s)	13	85	60	60	—
表示粒子径による計算値					
1粒子の体積 (μm ³)	3.3E-05	3.3E-05	5.2E-04	4.2E-03	5.2E-01
1粒子の表面積 (μm ²)	5.0E-03	5.0E-03	3.1E-02	1.3E-01	3.1E+00
市販溶液1ml中ナノ重量 (g)	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3 ※
市販溶液1ml中ナノ体積 (μm ³)	2.3E+14	1.5E+14	1.5E+14	1.5E+14	5.0E+14
市販溶液1ml中ナノ個数	6.8E+18	4.5E+18	2.9E+17	3.6E+16	9.6E+14
1%溶液1ml中ナノ個数	1.7E+17	1.5E+17	9.6E+15	1.2E+15	3.2E+13

平成23年度には、酸化チタン、酸化亜鉛、銀、白金について入手可能なナノ粒子を調べた。酸化チタンは、着色料に分類される食品添加物であり、白色の食品に使用される。試薬として、結晶系の異なるアナターゼ型とルチル型、およびシリカとの混合品を入手し、ゼータサイザーナノ (nano-ZS, Malvern社) を用いて、平均粒子径Z-average(d.nm)を求め、分散溶媒と希釈方法による分散性を調べた。

表3-3に示すように、水溶液では超音波で分散しても、表示されている粒子径以下で存在するものは非常に少なかった。2%水溶液をPBSで2倍希釈すると沈殿が生じた。実験におい

では、投与あるいは添加直前まで水溶液中で分散させる必要があるが、反応系のマトリックスにより凝集することが考えられた。（詳しいデータは五十嵐分担任で報告されている。）

酸化亜鉛は、ナノ粒子として欧州で食品包装用途が認められているものであり、懸濁液の試薬品4点（Zn3010、Zn3008C、Zn3014A、ZH1121W）を入手した。水での分散は比較的安定しており、荷電の異なる界面活性剤を用いて懸濁した粒子での比較では、陰陽共にイオン性界面活性剤による方がやや分散性が良好であった。ただし、塩溶液になると分散性は大きく変化し、特にPBSにおいては、非イオン性のZn3010、陽イオン性のZn3008Cは短時間に沈殿した。

表3-3 二酸化チタンの水およびPBSでの分散性

溶媒：水	表示径	処理	平均粒子径 d. nm			
			溶液濃度			
			2%	1%	0.1%	0.01%
アナターゼ Aldrich #637254, 粉末	25 nm	超音波	153.4	384.8	179.9	449.8
		攪拌	1024.0	746.5	396.2	
ルチル Aldrich #637262, 粉末	100 nm	超音波	177.1	221.9	238.0	1977.0
		攪拌	309.2	352.1	525.0	
TiO ₂ + SiO ₂ Aldrich #641731, 粉末	50 nm	超音波	726.7	597.4	611.7	186.5
		攪拌	2957.0*	2363.0*	1283.0	
溶媒：PBS						
アナターゼ	25 nm	超音波		4574.0*	3886.0	2235.0
ルチル	100 nm	超音波		3334.0*	4201.0*	4024.0
TiO ₂ + SiO ₂	50 nm	超音波		3135.0*	5177.0*	2110.0

* 沈殿

銀、白金は既存添加物であり、銀は銀箔として着色料用途、白金は製造用剤である。銀はその殺菌、抗菌作用により、食品容器や調理用具に用いられている。試薬として2点（銀ナノ粉末、銀銅合金ナノ粉末）を購入した。白金も同様の作用の他、抗酸化作用を掲げて健康食品で使用されている。ネット上では、ナノ白金水およびサプリメントとして少なくとも10商品以上が流通している。そのうちのナノ白金水4点（A：白金ナノコロイド100 ng/ml、B：23 ng/ml、C：50 ng/ml、D：16 ng/ml）を、白金金属として1点（白金ナノ粉末）を購入した。水での分散性は、金属粉末、白金水AおよびDが100nm程度、Bが300nm程度、Cでははっきりした分布ピークが認められなかった。

平成24年度には、栄養補助食品として市販されているカルシウムナノ粉末を購入した（表3-1）。カルシウムAは、水溶液中で平均粒子径500nm以上、カルシウムB、Dは、300 nm程

度、カルシウムCが250 nm程度であり、水懸濁液でもナノサイズのものも観察されなかった。カルシウムCは、エチレングリコールを溶媒として30%程度で調整すると、平均粒子径が、200nm弱となり、一部100nm以下の粒子も観測された。ハイドロキシアパタイトはリン酸カルシウム的一种で、歯と骨の主成分であり、歯磨き粉などに配合されている。試薬市販品を1種入手したが、水溶液での分散性が低く、溶媒等を変えても100nm以下の粒子は認められなかった。酸化アルミニウムは試薬2種 (X1121W 35nm、AL-110 10-20nm) を購入したが、X1121Wは、水溶液において平均粒子径150nmと安定して分散し、AL-110は、200nmと30nm程度に分布がわかれ、一次粒子径と二次粒子系が観測された。これらのナノ物質を分散データと共に、分担研究者に配布した。

ナノ物質の免疫影響の指標としては、各種表面マーカー、サイトカインが考えられるが、これらマーカーの選択も重要であるため、抗原を投与した直後の消化管免疫組織のT細胞サブポピュレーションの変化をサイトカインの分泌を指標にして調べた。

無処置のマウスに通常の摂食条件として生理食塩液に溶解したOVAを経口投与した群をOVA/S、食物アレルギーの投与条件としてリノール酸とレシチンを用いた乳化媒体でOVAを経口投与し、サリチル酸ナトリウムを併用した群をOVA/LL+SAとした。OVAの経口投与後3時間および6時間にそれぞれ3匹のマウスからパイエル板および腸管膜リンパ節を取り出し、細胞液を調製した。対照として、OVAを投与しない無処置マウスからも同様に細胞液を調製した。それぞれの細胞液からCD4陽性細胞を精製し、精製したCD4陽性細胞にCD3およびCD28を表面に固定したビーズを細胞活性化のために加え、4日間培養し、培養上清中に分泌されたサイトカインをELISAで測定した。測定結果を表3-5に示す。

表3-5の上段に通常の摂食条件 (OVA/S)、食物アレルギーの投与条件 (OVA/LL+SA) でそれぞれOVAを経口投与した3時間および6時間後のパイエル板CD4+細胞から分泌されたサイトカイン濃度変化を示す。通常の摂食条件であるOVA/Sでは投与後3時間で無処置群に対してIFN- γ 、IL-4、IL-21の分泌が上昇したのに対して食物アレルギーの投与条件であるOVA/LL+SA群では変化なし、あるいは低下した。投与後6時間ではOVA/LL+SAでのIL-4、IL-21の分泌の低下が著明であった。

表3-5 腸管リンパ組織系CD4陽性T細胞の培養時のサイトカイン産生

Group	Sampling Time	Th1		Th2		Treg	Th17	fTh
		IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10	IL-10	IL-17	IL-21
Peyer's patch								
OVA/S	3h	↑	↑	→	→	→	→	↑
OVA/LL+SA		→	→	↓	→	→	→	↓
OVA/S	6h	↓	→	→	→	→	↓	↓

OVA/LL+SA		↓	→	↓	→	→	→	↓
Mesenteric Lymph Node								
OVA/S	3h	→	→	↑	→	→	→	↑
OVA/LL+SA		→	→	→	→	→	→	→
OVA/S	6h	↓	↓	→	→	→	→	↓
OVA/LL+SA		↓	→	→	→	→	→	↓

同様に、OVA/SおよびOVA/LL+SAのそれぞれの条件でOVAを経口投与した3時間および6時間後の腸管膜リンパ節のCD4+細胞から分泌されたサイトカイン濃度を表3-5の下段に示した。投与後3時間でOVA/Sでは無処置群に対してIL-4およびIL-21の分泌が上昇したのに対して、OVA/LL+SA群では変化がなかった。一方、投与後6時間ではOVA/S、OVA/LL+SA群とも無処置群との間にいくつかの有意差を認めたが、両者の間に差は検出されなかった。これらのサイトカインはそれぞれT細胞サブポピュレーションを反映しており、食物アレルギー感作条件下では腸管リンパ組織中のTh1、Th2およびIL-21分泌細胞への影響が示唆された。IL-21の産生がOVA/LL+SA群で下がることにより、局所性の防御抗体であるIgA抗体のろ胞性BヘルパーT細胞(fTh細胞)からの産生が下がる可能性も考えられた。

このように、通常の摂食条件に比べて食物アレルギーモデルの条件では、初めて抗原に暴露される初回感作の3~6時間後に、すでにパイエル板(PP)および腸間膜リンパ節(MLN)においてTh1、Th2およびIL-21産生(濾胞ヘルパーT: Tfh)細胞の変動が認められた。Tfh細胞は、B細胞への情報伝達により、生体防御に直接的に関与する腸管IgA産生を促すとされているため、糞中IgAを指標に、IgAの変動を調べた。7週令のBALB/cマウスに食物アレルギーモデルの条件、サリチル酸を併用し、乳化液媒体(ELL)でOVAを経口投与した群(OVA/ELL+SA)、通常の摂食条件として生理食塩液に溶解したOVAを経口投与した群(OVA/S)、無処置マウスの群から、初回、2回目、4回目、6回目の感作投与の翌日および初回、2回目の惹起投与の翌日にそれぞれ糞を集め、糞中IgAを測定した(表3-6)。

表3-6 経口感作スケジュール

動物：マウス、メス、7週令

試験期間	1 w	2 w	3 w	4 w	5 w	6 w
経口感作 ±OVA 0.8 mg	● ●	● ●	● ●			
経口投与 SA 0.3mg	● ●	● ●	● ●			
経口惹起 OVA 8 mg				◎		◎

採糞	○	○	○	○	○	○
----	---	---	---	---	---	---

無処置群の糞中IgAは3週間の実験期間中、ほぼ一定であった。通常の摂食条件であるOVA/S群の糞中IgAは1回目の投与後に比べ、2、4回目の感作投与後において低値を示した。一方、食物アレルギー感作群OVA/ELL +SAでは1、2、4、6回目のOVA投与後の値に増減はなかった。腸管での産生量を反映する糞中IgAは、経口免疫寛容となるOVA/S群では、1回目の抗原情報の認識により2回目以降のIgA産生量が抑制されるのに対して、食物アレルギー感作群では1回目の抗原情報が認識されないため、2回目以降のIgA産生量が1回目と同等になると考えられた。また、2回目の感作投与以降IgA産生量の傾向は変化しないことから、B細胞の反応においても食物アレルギー感作群の初期変化がその後の変化を決定づけていると考えられた。惹起段階においてもOVA/S群では多量抗原を認識してIgA産生が増えたが、食物アレルギー感作群では抗原量に対する認識も消失していた。以上、食物アレルギーの投与条件でのIL-21の産生抑制は、B細胞の機能にも影響を及ぼすものと思われた。

試薬および化成品グレードのナノ物質の質の高い情報並びに物質の入手が研究遂行には必要である。今回、ナノシリカでは試薬グレードと化成品グレードにおいて凝集性に違いが認められたことから、実験室データから市販ナノ食品の影響を考える上では注意が必要であると考えられた。また、実験結果を評価する場合においても、ナノ物質の物性は重要である。エチレングリコール溶液では、粒子は安定に分散しているが、ナノ粒子自体の比重が大きいため、塩濃度、タンパク質などの共存物質の影響では凝集や沈降が起きる可能性も考えられる。基礎的なデータを得るためには、試薬グレードのナノ粒子による検討も不可欠であると考え、食品分野で使用される可能性が高い二酸化チタン、酸化亜鉛、銀、白金について情報を収集し、試薬グレードのナノ粒子を入手し、実験に供した。また、食品での応用では、実際に市販され摂取されているナノ物質の測定が必要であるため、市販の白金水飲料も購入し、粒子径分布など基本的データを測定した。マトリックスが一般食品に比べ単純であるため、水溶液と仮定し機器分析を行ったところ、100 nm以下の粒子も存在する結果が得られた。栄養補助剤のカルシウムについても入手し、測定したが、公称の1次粒子径で分散させるのは困難であり、メーカーが推奨するように食材に添加した場合には、ナノ状態で存在している可能性は極めて低いと考えられた。

ナノシリカを用いた今年度の研究結果においては、*in vivo*系では、50nmが最も影響が大きく、*in vitro*系では、濃度によっては100nm以上に比較して50nm以下で影響が強く認められるなど、比較的相関する結果が得られた。二酸化チタンは、*in vivo*系でも、*in vitro*系でも反応が弱く、明確な関係までは確認できなかったが、大きく矛盾することはなかった。免疫反応は個体差が大きいため、*in vivo*でのわずかな反応変化の解釈は困難である。今後、データが蓄積され、*in vivo*で明確な陽性対照となるような物質が発見されれば、その反応を模した*in vitro*での研究も大きく進むと考えられる。

ナノの免疫影響の指標として、各種表面マーカー、サイトカイン等のマーカーの選択は重要であるが、*in vivo*系、*in vitro*系どちらにおいてもイベントと時間経過が複雑に関係し、また、その絶対量、変化量も微量であることも予想される。今までの結果をもとに、さらに感度の高い測定条件、免疫影響指標マーカーの探索が課題となる。

(4) 研究項目名：ナノ物質の存在形態と分析法に関する研究（研究担当者名：五十嵐良明，所属機関名 国立医薬品食品衛生研究所）

1) 個別課題名：ナノ物質の存在形態と分析法に関する研究

i. 粒度分布

市販シリカ懸濁液（SiO₂-20W, SiO₂-20EG, SiO₂-50EG, SiO₂-100EG）を、シリカが0.1%または1%になるように水、EG、及びリン酸緩衝液（PBS、pH 7.2）で希釈して vortex mixer で攪拌したのち、粒度分布を測定した。これら希釈液で観察された平均粒子径は、試薬に表示されている平均一次粒子径とほぼ同じであった（図1）。試薬懸濁液中ではシリカ粒子はほぼ単分散していることがわかった。本試薬は PBS に希釈した場合でもサイズ変化は認められなかったことから、*in vitro* で細胞へ適用する、あるいは *in vivo* で動物に適用する段階でもナノレベルの大きさと予想され、ナノサイズのシリカ粒子の影響を見る検体として適切と思われた。良好に分散した懸濁液中でシリカの粒子表面は負に荷電していた（表1）。

化成品原料で観察された二次粒子径は、水をベースにするW7520とW7512Sが126～140 nmで、100 nm以下の粒子も存在した（図2）。これらの製品のラベル表示では平均凝集粒子サイズ(d-50値)が100～120 nmと記載があり、得られた値はこれにほぼ相当する。一次粒

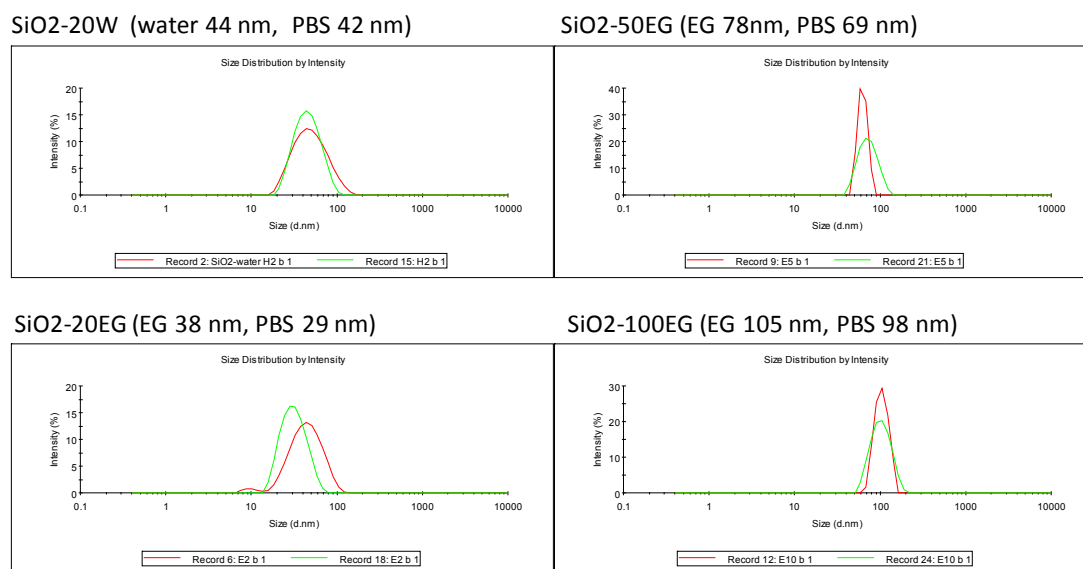


図1. シリカ懸濁液（試薬グレード）の粒径分布

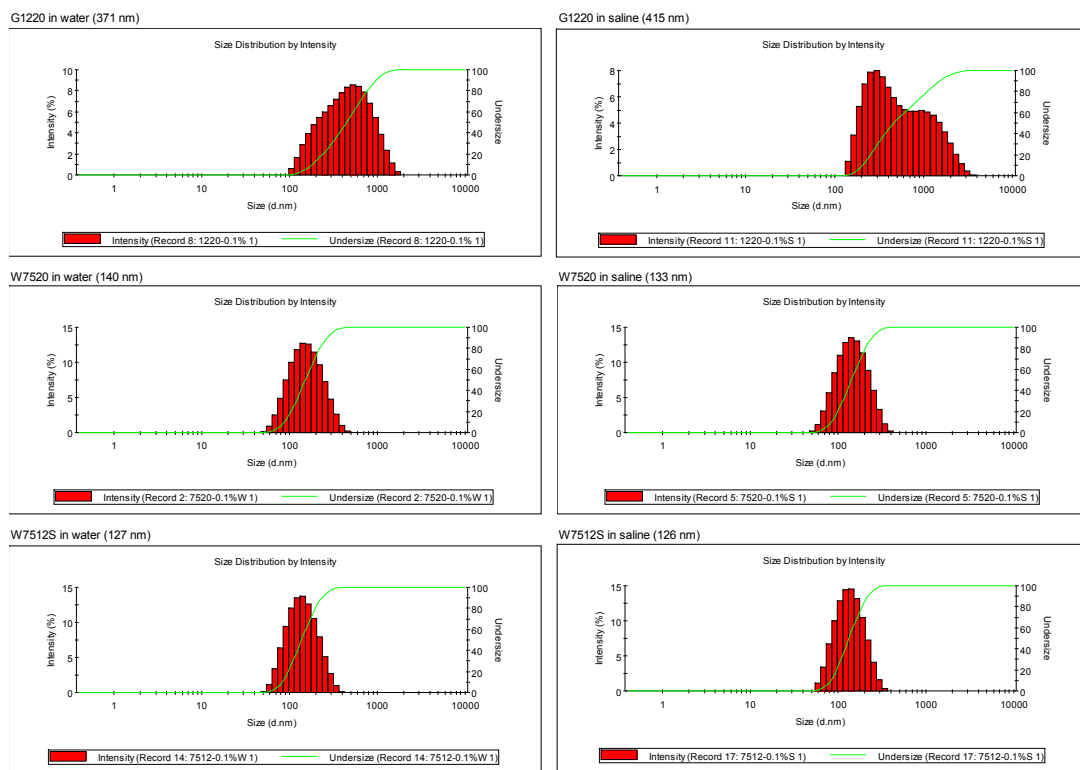


図2. シリカ懸濁液（化成品）の粒度分布

表1. 水に懸濁した金属酸化物の粒度分布及びゼータ電位

Sample	Average size (nm)	Zeta potential (mV)
SiO ₂ 20nm	36	-31
SiO ₂ 50nm	81	-35
SiO ₂ 100nm	145	-42
SiO ₂ W 7520	140	not tested
TiO ₂ -SAS	82	-55
ZnO 3010	306	-12
ZnO 3008C	232	27
ZnO 3014A	244	-21
ZnO 1121W	171	-15

表2. 人工消化液及びタンパク含有液中のナノ物質の平均粒子径

Solvent	SiO ₂ 50nm		SiO ₂ W7520 alkaline	
	Size (nm)	PdI	Size (nm)	PdI
Water	77	0.109	140	0.139
Saline	75	0.066	133	0.140
PBS	77	0.063	138	0.143
No.1 solution (pH 1.2)	78	0.062	136	0.142
No.2 solution (pH 6.8)	75	0.042	137	0.124
1% BSA in water	77	0.145	142	0.245
10% BSA in PBS	113	0.222	154	0.245
10% FBS in RPMI1640	145	0.160	1350	0.687
FBS	222	0.743	274	0.528

No.1 solution: 日本薬局方崩壊試験に用いられる人工胃液第1液.

No.2 solution: 日本薬局方崩壊試験に用いられる人工腸液第2液.

PBS: リン酸緩衝液.

BSA: 牛血清アルブミン.

FBS: 牛胎児血清.

RPMI1640: 細胞培養用RPMI1640培地.

子径は不明であるが、粒度分布の形から100 nm以下のナノサイズと考えられる。化成品は、先の試薬懸濁液とは異なり凝集体が安定に存在していると予想される。G1220の粒子径は200 nmと表示されているが、水や生理食塩水で希釈すると粒度分布の幅が広がり、平均粒子径も371 nm及び415 nmと大きくなった。これは、EGからの液性の変化によってシリカの分散性が不安定になり凝集したものである。本懸濁液については細胞への適用時には培地中でサイズ変化が起こる可能性が示唆される。

更に、親水性シリカ粒子（A200、一次粒子径約10 nm）の1%濃度の懸濁液を作製して5分間超音波処理し粒度分布を観察した。A200の平均粒子径は、0.1% Tween 80溶液中で468 nm、EG液では210 nm、コール酸ナトリウム溶液で238 nmと、100 nm以下で存在する粒子はほとんど検出できなかった。Tween 80は多くの粒子の分散に用いられる界面活性剤であるが、本粒子には優れているとはいえなかった。

シリカは粉末食品や工業用粉末の流動性の向上を目的に添加される。食品と混和されるときは、塩あるいはタンパク質と共存することになる。そこで、シリカ懸濁液を PBS、アルブミン等タンパク質を含む媒体で希釈した。また経口摂取を想定した消化過程、あるいは体内吸収された場合の血中の存在形態を知るため、人工胃液、人工腸液及び血清に希釈させ粒子径を測定した（表 2）。シリカの分散性は非常に高く、消化液による凝集は少ないことがわかった。単純組成の液状食品のシリカ粒子は吸収されるまでナノサイズで存在する可能性がある。一方、培地などタンパク溶液や血清中では凝集が認められた。食品中のナノ物質のサイズを直接測定することは不可能であるが、この結果は食品に混和されるとほとんどナノサイズで存在しないことを示唆する。更に、細胞への適用時にはサイズ変化

が起こる可能性が示唆される。こうした凝集性はシリカの種類によって異なるが、ゼータ電位との相関性はなかった。

凝集の有無や程度は、ナノ物質の材質及び種類によって変化した。ルチル型結晶型の酸化チタン（一次粒子径35 nm）をビーズミル法により懸濁したものについては、70~80 nmとほとんどが単一のナノサイズのナノ粒子として分散していることを確認した（図3）。市販の酸化亜鉛懸濁液の粒度分布を図4に示した。酸化亜鉛はPBSで著しい粒子径の増加が認められ、タンパク質よりも凝集効果が表れた。

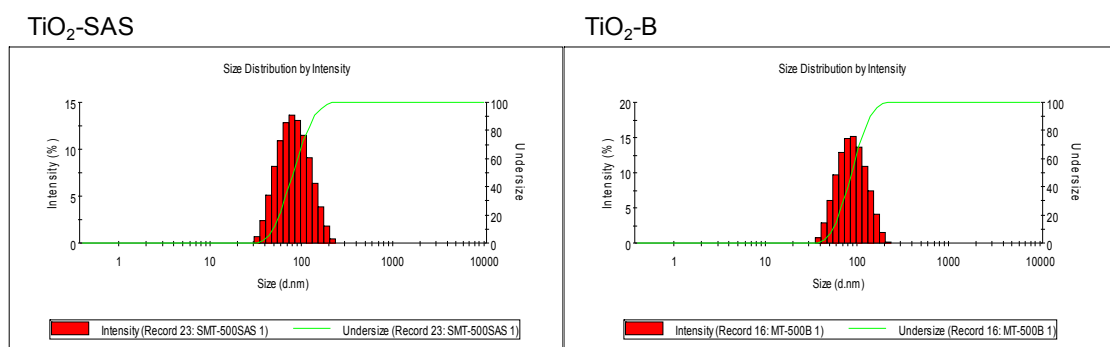


図3. 酸化チタンの粒度分布

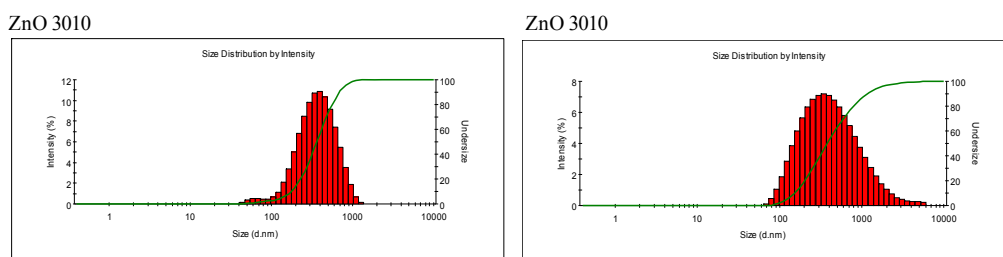
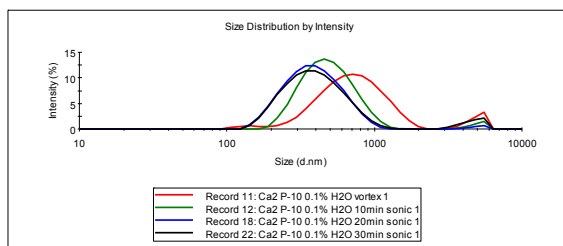


図4. 酸化亜鉛懸濁液（化成品）の粒度分布

P-10



P-20

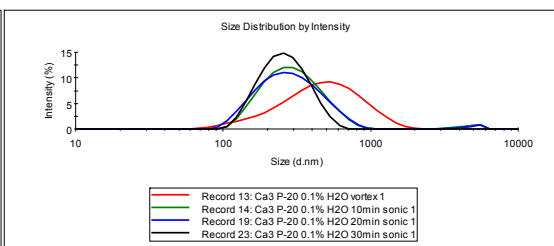


図5. カルシウム製剤の水への分散性：超音波処理時間の影響

NHB

P-24

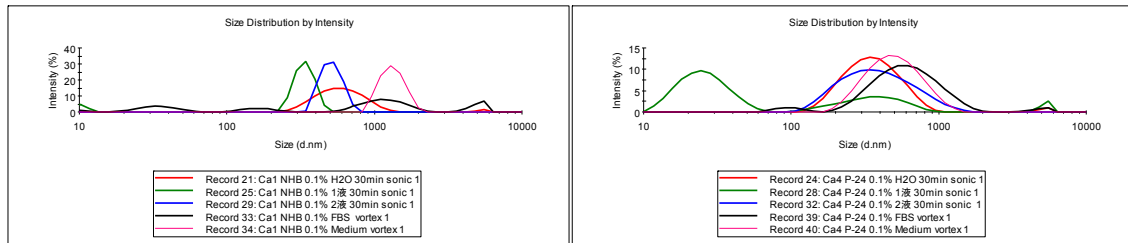


図6. カルシウム製剤が経口摂取、体内吸収されたと想定した媒体中での粒度分布

カルシウムは栄養補助食品として意図的に添加され、微小化すると吸収性が増加すると謳われている。今回粒子径は100 nm以上とされ、水懸濁液でもナノサイズのものも観察されなかった。超音波処理時間を長くすると分散度は増加するが、粒子によって差があった(図5)。NHBの0.1%懸濁液を、更に1液(人工胃液pH 1.2)、2液(人工腸液pH 6.8)、牛胎児血清(FBS)または10%FBS-RPMI1640培地(Medium)で10倍希釈し粒度分布を測定した(図6)。1液中では粒子径が小さく粒度分布も狭くなった。2液では平均粒子径は650 nmと変化ないが、粒度分布は狭くなった。血清では様々なピークを有する分布を示し、培地では著しい凝集が起こった。P-10及びP20においてはNHB同様に1液で粒子径が小さくなるが、2液では凝集が進んだ。P-24についてはNHBと類似のパターンの変化を示すが、2液での凝集はそれほどなかった。カルシウム製剤は1液で粒子径が小さくなることから、酸性の強い胃液で溶けたためと思われる。腸のpHは中性付近であり凝集の方向にあるが、材質によって程度は異なることがわかった。粒子の材質によっては体内でナノサイズに変化するものがあり注意が必要である。

酸化アルミニウム(アルミナ、 Al_2O_3)は食品容器のフィルム等に用いられており、劣化によって食品に混入する可能性がある。 Al_2O_3 -6(X1121W)(一次粒子径45 nm)の水希釈時の平均粒子径は154 nm(PdI 0.145)で、人工消化液1液および2液で希釈した後は144 nm(PdI 0.140)、148 nm(PdI 0.171)とほとんど差はなかった。血清中でも粒子径はほとんど変化ないが、培地中では著しく凝集した。 Al_2O_3 -7(AL-110)(一次粒子径は10~20 nm)も同様の平均粒子径を示す。 Al_2O_3 -7(AL-110)は2液中で著しく凝集した(>2000 nm)。培地中では分布幅が広がり平均粒子径も大きくなるが(502 nm, PdI 0.454)、 Al_2O_3 - X1121Wほどではなかった。これは、*in vitro*試験で酸化アルミニウムのナノサイズの影響を正確に評価することは困難であることを示す。

試薬プラチナ (Pt) 粒子 (一次粒子径50 nm以下) に0.01%濃度となるよう水を加えて10分間攪拌したところ、平均粒子径は160 nm (PDI 0.21) であった (図7)。この懸濁液を超音波洗浄器で10~30分間処理すると、時間の延長に伴って平均粒子径はわずかに小さくなった。なおプラチナナノコロイドを含むと謳うボトル水3種の粒度分布を測定した。製造会社ホームページの記載によると、製品1のPt濃度は製品2(A)が最も高く (50 $\mu\text{g}/500\text{ ml}$)、以下製品3(C)、製品1(B)の順とされている。これらの製品はそのまま分析したが、希薄なため正確な粒度分布かどうかかわからないと注意表示された。製品2(A)ではナノサイズの粒子は観察されなかった。製品1(B)と製品3(C)で観察された粒度分布像はPt粒子懸濁液で得られた粒度分布像と大きな差はなかった (図8)。

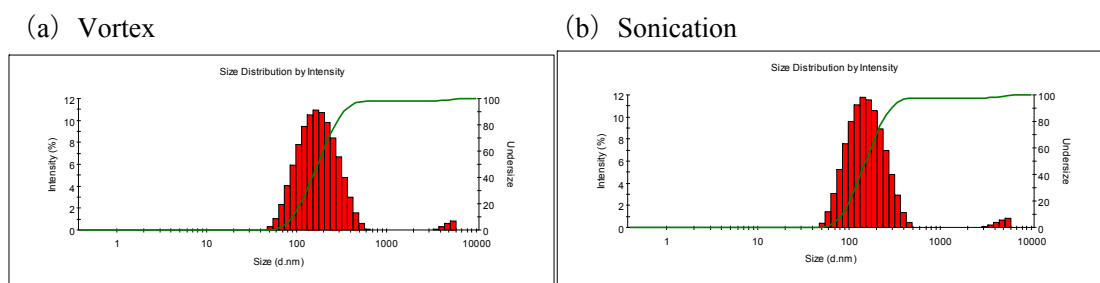
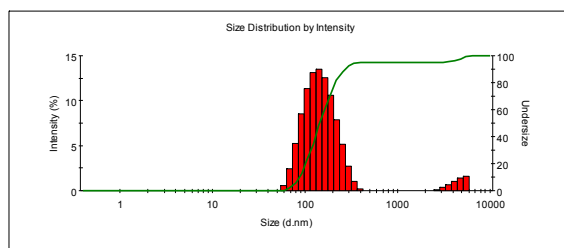
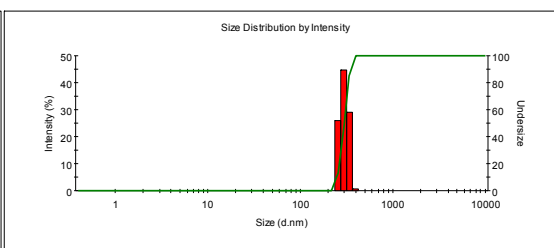


図7. プラチナ粒子の水懸濁液中の粒度分布

製品1



製品2



製品3

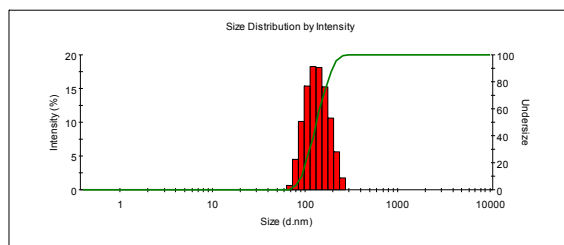


図8. プラチナナノコロイド配合をうたうボトル水の粒度分布

ナノ物質のサイズの差による生体影響を評価するため、各種in vivo、in vitro試験が実施されているが、ナノ物質自身の材質、表面処理、一次粒子径とともに、適用する媒体によって分散性が変化する。シリカは比較的単分散する傾向があるが、酸化チタン、カルシウム、酸化アルミニウムに関しては細胞培養に用いる培地中では凝集する。in vitro試験でサイズの影響を見るためには培地中の粒度分布や平均粒子径を求めておくとともに、培養期間中のサイズの安定性についても確認しておくことが重要である。

食品に添加されたナノ物質は経口摂取されると想定される。食品のような複雑なマトリックスの中のナノ粒子のサイズを直接測定する方法は存在しないため、水や組成に近い媒体に希釈して計測することになるが、希釈液によっては凝集し、食品中の存在状態を反映しないことがほとんどである。ナノ物質を人工胃液や人工腸液に懸濁した時も多くの材質のものは凝集してしまう。ナノ物質の一次粒子径から考えると細胞間隙等を通じる、あるいは貪食細胞によって消化管から吸収される可能性もあるが、分析した結果では凝集体となっており、サイズの観点からの可能性は少ないと考えられる。

以上、各種試験法を用いて食品中のナノ物質の吸収性及び体内分布による生体影響を評価するためには、ナノ物質のキャラクタライゼーションは必須の項目であり、得られた結果を適切に評価する上でも重要である。

ii. In vitro 感作性反応に及ぼす影響

アレルギーの感作誘導期の抗原提示反応を模倣するヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を用いて各ナノ物質の細胞毒性を評価し、以下に続く試験の適用濃度を決定した。シリカ SiO₂ 20nm は 1000 µg/ml で THP-1 細胞の生存率を低下させた。水に分散したものの方が EG に分散したものより細胞毒性が強かった。いずれのサイズのシリカ粒子も 100 µg/ml では細胞毒性を示さなかった。酸化チタンは 1000 µg/ml まで細胞毒性を示さなかった (図 9)。

THP-1 細胞浮遊液に各ナノ物質懸濁液を添加して、24~72 時間培養した上清中の炎症性サイトカイン (IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF, IL-12p70) 及びケモカイン (IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 及び IP-10) を測定した。シリカを添加したときに検出されるサイトカイン/ケモカインは IL-8 で、48 時間で産生量は一定となった。SiO₂ 50 nm, SiO₂ 100 nm が SiO₂ 20 nm よりも産生量は若干多かった (図 10)。RANTES についても多量に産生され、IL-8 と同様の傾向を示した。しかし、シリカによるこれらケモカイン産生量は、別実験で実施している陽性対照物質 NiSO₄ と比べると微量であり、刺激性物質 SLS (ラウリル硫酸ナトリウム) と同程度であった。また、酸化チタンはいずれのサイトカインも産生しなかった。

シリカは 100 µg/ml で細胞表面抗原 CD54 (ICAM-1) の発現量を若干増加させたが、CD86 に対しては影響なかった。感作性物質 DNCB (2,4-ジニトロクロロベンゼン) は CD54 及び CD86 発現量ともに増加させるが、CD54 発現量のみシリカ前処理により増加した (表 4)。CD54 は細胞活性化により発現が増強し、抗原提示細胞への T リンパ球接着を媒介に関与する。CD54 は炎症性メディエーターによって発現が増強する。高濃度のシリカではわずか

ながら炎症性サイトカイン IL-8 の産生が増加しており、CD54 の発現量に影響した可能性がある。CD86 は細胞活性化により発現し、T 細胞への抗原提示におけるインテグリンリガンド（補助刺激分子）として働く。抗原提示能の増加として捉えるには CD54 よりも CD86 の発現の方が重要と思われる。シリカによって CD86 が増加しない理由はわからないが、アレルギー性物質によっても CD54 と CD86 の発現の増強率が異なることが知られている。一方、酸化チタン前処理、共存下では細胞表面抗原量は増加しなかった。シリカと酸化チタンのサイズはほとんど変わらないため、材質が反応性に影響を及ぼしていると思われる。本試験は 1 回きりの試験であり、再現性の検討が必要である。

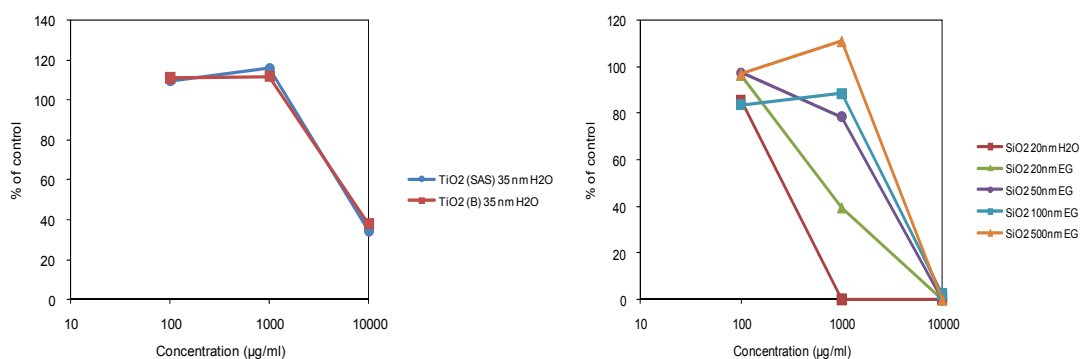


図9. シリカ及び酸化チタン粒子の細胞毒性強度

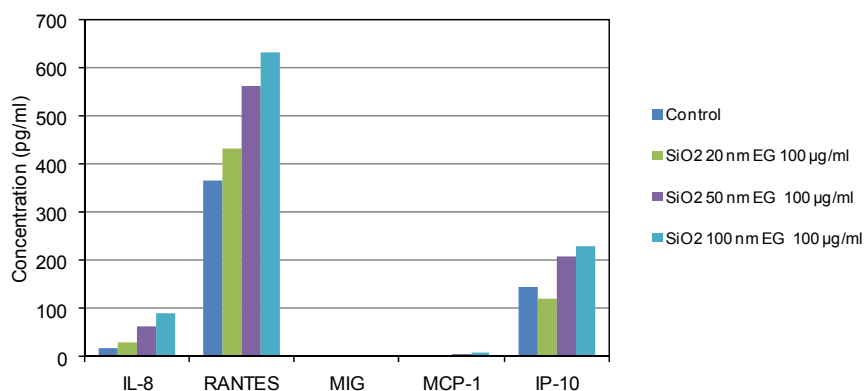


図 10. 粒径の異なるシリカによる各種ケモカイン産生

表 4. シリカ及び酸化チタンが THP-1 細胞の細胞表面抗原発現に及ぼす影響

(a) SiO₂ 50 nm

Conc. (µg/ml)	Sensitizer	Antigen		Cell viability (%)
		CD54	CD86	
0	-	1.4	7.3	94
1	-	1.5	7.2	93
10	-	1.4	6.4	94
100	-	4.3	5.0	91
0	DNCB	3.1	11.0	87
1	DNCB	3.9	14.3	82
10	DNCB	5.3	12.9	76
100	DNCB	14.1	14.3	68

(b) TiO₂-SAS

Conc. (µg/ml)	Sensitizer	Antigen		Cell viability (%)
		CD54	CD86	
0	-	1.1	9.0	93
1	-	2.0	9.1	93
10	-	1.3	6.8	92
100	-	1.6	6.1	91
0	DNCB	4.8	14.9	86
1	DNCB	3.6	9.1	87
10	DNCB	4.4	14.1	83
100	DNCB	4.8	15.4	78

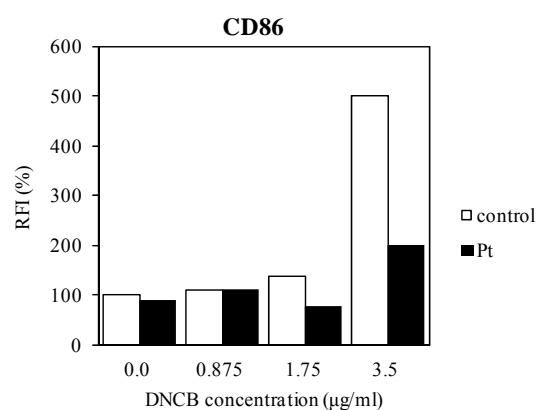
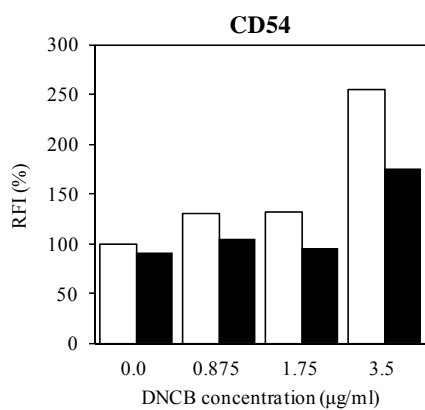


図 11. DNCB による THP-1 細胞の CD54 及び CD86 表面抗原発現率に及ぼすプラチナ (Pt) 粒子の前処理の影響

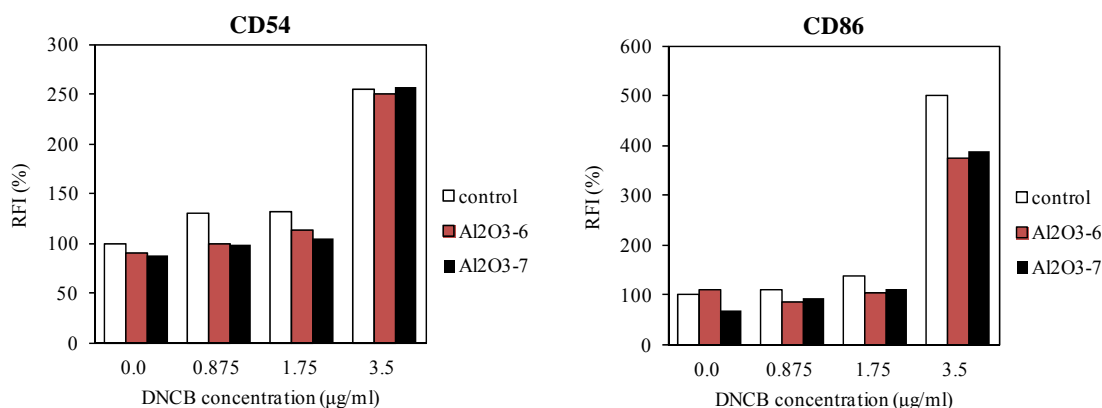


図 12. DNCB による THP-1 細胞の CD54 及び CD86 表面抗原発現率に及ぼす酸化アルミニウム粒子の前処理の影響

Pt 粒子は、試験した最高濃度の 100 µg/ml で生存率 98%であった。Al₂O₃-6(X1121W) 及び Al₂O₃-7(AL-110)についても同濃度で細胞生存率 87%及び 84%と細胞毒性を示さなかった。以下ナノ粒子の感作誘導反応に対する増強効果の検討では、100 µg/ml を試験濃度とした。THP-1 細胞をナノ粒子と 24 時間前培養し、次に、種々の濃度の DNCB 溶液を追加して更に 24 時間培養した。培養終了後、h-CLAT 法に準じて操作し、生細胞の CD54 及び CD86 抗原の発現増加率を求めた。Pt 100 µg/ml と培養した細胞は、コントロールに比べて DNCB の反応も低下した (図 11)。Al₂O₃-6(X1121W) 及び Al₂O₃-7(AL-110)についても同様に反応性は低下した (図 12)。よって、Pt 及び酸化アルミニウム粒子は細胞表面抗原の発現率を増加させることはなく、感作誘導反応を増強する効果は有しないと考えられた。

本研究では、化学物質の皮膚感作性を評価する試験系である h-CLAT 法を応用し、ナノ粒子で前処理した THP-1 細胞に感作性物質を適用したときの細胞表面抗原発現率及びサイトカイン産生量に変化するかどうか検討した。大気中の粒子状物質が気管支ぜんそくなどを増悪する可能性が疑われており、カーボンナノチューブを吸入暴露したマウスの OVA に対する即時型アレルギー反応が増強されたとの報告がある。今回は、ナノ物質に曝露されると、感作性物質 DNCB の遅延型アレルギーが起こりやすくなるかどうか *in vitro* 試験で調べた。シリカ 50 nm 共存下では DNCB による CD54 の発現が増加し、シ

リカが感作誘導をしやすくする可能性が示された。一方、酸化チタン、プラチナ及び酸化アルミニウムについてはこうした効果は認めなかった。シリカには起炎性が知られており、ナノ物質の材質による影響が疑われる。粒度分布の測定ではシリカについては培地中でもナノサイズで存在する率が多いが、他の粒子では著しい凝集が起きるものもあり、こうした影響も考えられる。In vitro 試験で感作性反応の増強効果を調べる評価手法は確立されていないが、今回用いた h-CLAT は一つの評価手段として有効と思われた。今回 CD54 等の細胞表面抗原の発現率の数値で増強効果を判断したが、こうした数値は試験ごとに大きなばらつきがあり、認められた差が増強といえるレベルにあるかどうか分からない。いずれにしても 1 回限りの実験結果であり、正確な判断をするには繰り返し試験が必要である。また、ナノ物質のアレルギー増強メカニズムを解析することが必要である。更に、タンパク質による即時型アレルギーはより大きな問題である。ナノ物質の即時アレルギー増強効果を調べるには現在動物を用いた検討が進められているが、動物実験廃止の動きを考えると、早急に即時型アレルギーの in vitro 検出系の開発が求められる。これを応用し、ナノ物質の即時アレルギー増強作用の解析を進めることが今後の課題として上げられる。

(5) 研究項目名：ナノ物質の腸管上皮細胞層の透過吸収及び腸管上皮細胞機能への影響
(研究担当者名：戸塚護、東京大学大学院農学生命科学研究科)

1) 個別課題名：ナノ物質の腸管上皮細胞層の透過吸収

本研究課題は、ナノ物質の腸管吸収の実態を明らかにすることを目的としている。ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 細胞の in vitro 単層培養系を用いて、細胞層の頂端側から側基底膜側への移動、および細胞内への取り込みについて解析を試みる。

本研究で用いたシリカナノ粒子は、下記の通りである。

- Silicon(IV)oxide, 40% in H₂O 20 nm (Alfa Aesar社43110) : 20 nm (H₂O)
- Silicon(IV)oxide, 30% in Ethylen glycol 20 nm (Alfa Aesar社43091) : 20 nm (EG)
- Silicon(IV)oxide, 30% in Ethylen glycol 50 nm (Alfa Aesar社43093) : 50 nm (EG)
- Silicon(IV)oxide, 30% in Ethylen glycol 100 nm (Alfa Aesar社 43094) ; 100 nm (EG)
- Silicon(IV)oxide, powder 500 nm (Alfa Aesar社 L16985) : 50 nm (EG) (Ethylen glycolに懸濁して使用した)

本研究で用いた金属ナノ粒子は、下記の通りである。

1) 酸化亜鉛 (4種)

- ZN-3010, 50% in H₂O 70nm
- ZN-3008C, 50% in H₂O 70nm
- ZN-3014A, 50% in H₂O 70nm
- ZH1121W, 40% in H₂O 40nm

2) 銀 (1種)

- Silver 100 nm

3) 二酸化チタン (3種)

- TiO₂ anatase 25 nm
- TiO₂ rutile 100 nm
- Titanium silicon oxide 50 nm TiO₂+SiO₂

4) 銀-銅合金 (1種)

- Silver-Copper alloy 100 nm

ヒト腸管上皮細胞株Caco-2細胞を2週間培養し、吸収上皮細胞様に分化させた細胞を用いた。シリカナノ粒子 (粒径20 nm~100 nm) を添加し、その影響を検討したところ、0.3%(w/v) までの添加濃度では乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出量の増加は認められなかったことから、細胞毒性は認められなかった。また、トランズウェル上でCaco-2細胞を2週間培養した単層培養系を用いて、頂端側にシリカナノ粒子を添加し、経上皮抵抗値 (TER) を測定した。その結果、0.3%(w/v) までの添加濃度ではTERの低下は認められず、腸管上皮細胞層への影響は認められなかった。

また、酸化亜鉛、銀、二酸化チタン、銀-銅合金の4種類の金属ナノ粒子のCaco-2細胞への影響を検討したところ、いずれも0.1%濃度で添加した場合には細胞が剥がれた状態の顕微鏡像が得られ、明確な細胞毒性が認められた。銀-銅合金ナノ粒子については、0.01%濃度でも細胞の形態変化が生じた。いずれの金属ナノ粒子も0.001%添加時にはTERの変化は認められなかった。

シリカナノ粒子は平成22年度の検討で、20 nm~50 nmのものはマウス小腸上皮細胞株 MoS13細胞培養系への添加により、0.03%(w/v) 以上で細胞毒性を示すことが判明した。また、0.3%(w/v) の添加では調べた全てのシリカナノ粒子で細胞毒性が認められた。しかし、Caco-2細胞に対しては0.3%までの添加濃度では細胞毒性は認められず、単層上皮細胞層への影響も認められなかった。この違いは、動物種の違い、細胞株自体の性質の違いなどに起因している可能性が考えられる。

一方、銀-銅合金は高濃度では腸管上皮細胞層に損傷を与える可能性が示唆された。

シリカナノ粒子、金属ナノ粒子を細胞内あるいは培養液中でナノの状態を維持し、微量測定する方法は課題である。

2) 個別課題名：ナノ物質の腸管上皮細胞機能への影響

本研究課題では、マウス小腸上皮細胞株MoS13細胞およびヒト腸管上皮細胞株Caco-2細胞のサイトカイン産生に対するナノ粒子添加の影響を解析した。

上記の課題「(1) ナノ物質の腸管上皮細胞層の透過吸収」で用いたシリカ及び金属ナノ粒子を、本課題でも用いた。

マウス小腸上皮細胞株MoS13細胞は、BALB/cマウス胎仔小腸上皮細胞の初代培養にSV40

Large T抗原遺伝子を発現させることにより不死化した細胞株である。この細胞を10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で24時間培養し、confluent状態の細胞を実験に使用した。最初に MoS13 細胞に終濃度 0.003%、0.01%、0.03%、0.3% (w/v) の各粒径のシリカナノ粒子 (20 nm (H₂O) のみ 0.004%、0.013%、0.04%、0.4%) を添加し、5時間作用させた。その後培地交換を行い、さらに TLR2 リガンドである Pam3CSK4 と、前処理と同濃度のシリカナノ粒子を添加し 24 時間培養した後、培養上清中の IL-6 量を ELISA 法により測定した。その結果、図 1 に示すように 0.3% (w/v) 添加では調べた全てのシリカナノ粒子で細胞が死滅したことから、細胞毒性が認められた。また、100 nm 以下の粒径のシリカナノ粒子では、0.03% 添加の時に IL-6 の産生増強が観察された。また、20 nm (EG), 50 nm (EG) では、0.03% 添加時に Pam3CSK4 を添加しない条件下であっても、顕著な IL-6 の産生誘導が認められた。さらに 20 nm (H₂O) は 0.013% 添加でもそれ自体で IL-6 産生を誘導した。一方、500 nm (EG) は 0.03% までの添加濃度では Pam3CSK4 刺激の有無に関わらず、IL-6 産生に対する増強効果は認められなかった。

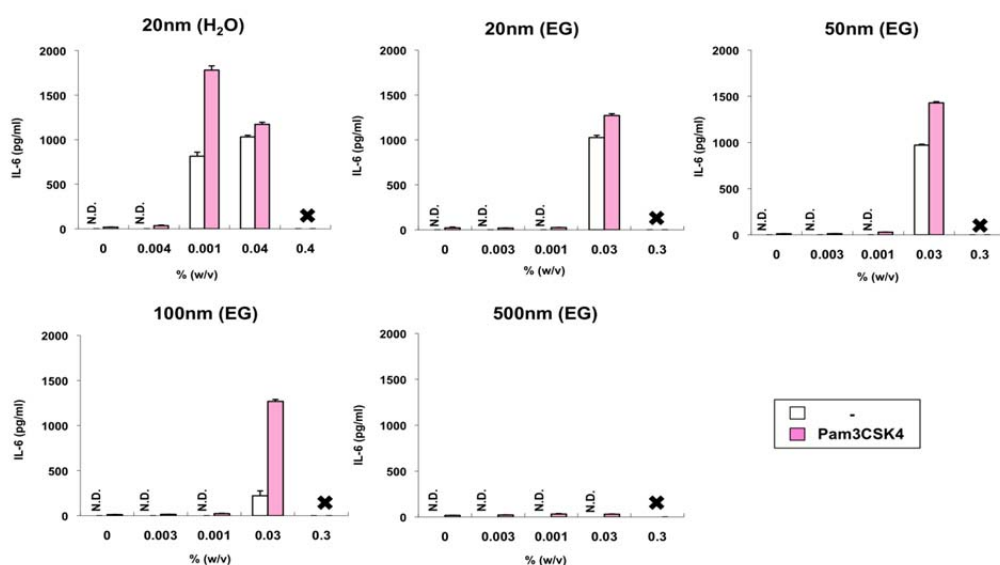


図1. マウス小腸上皮細胞株MoS13細胞のIL-6産生に対する各粒子径のシリカナノ物質の作用

MoS13細胞をプラスチックディッシュに播種し24時間培養した後、図に示した濃度のシリカナノ物質と5時間培養し、前処理した。培地交換後、再度同濃度のシリカナノ物質をTL2リガンドであるPam3CSK4と同時に添加し、その24時間後の細胞の培養上清を回収し、ELISA法によ

りIL-6産生量を検討した。×の印は細胞毒性により細胞が死滅したことを示している。

次に、シリカナノ粒子を作用させる時間を変化させて、上記と同様にIL-6産生に対する影響を観察した。すなわち、MoS13細胞にPam3CSK4と0.03%シリカナノ粒子（20 nm(H₂O)は0.04%）を同時に添加し5時間培養したもの、MoS13細胞にシリカナノ粒子を添加して5時間前処理をした後、Pam3CSK4とシリカナノ粒子を同時に添加し5時間あるいは24時間培養したもの、の間でIL-6産生量を比較した。

図2に示すように、5時間の同時処理のみの場合には、20 nm(EG)および20 nm (H₂O)でPam3CSK4でIL-6産生を増強する効果が認められた。5時間前処理+5時間同時処理の条件下では、50 nm (EG)もPam3CSK4でIL-6産生を増強する効果が認められ、20 nm(EG)および20 nm (H₂O)では、それのみでIL-6産生を誘導した。さらに、5時間前処理+24時間同時処理の条件下では、図1で示したことと同様であるが、100 nm(EG)でPam3CSK4でIL-6産生を増強する効果、50 nm以下のもの全てで、それ自体のIL-6産生誘導効果が認められた。Pam3CSK4刺激なしでもIL-6産生が認められた条件下では、MoS13細胞のプラスチックディッシュからの剥離が観察されたことから、何らかの毒性を示しているものと考えられる。

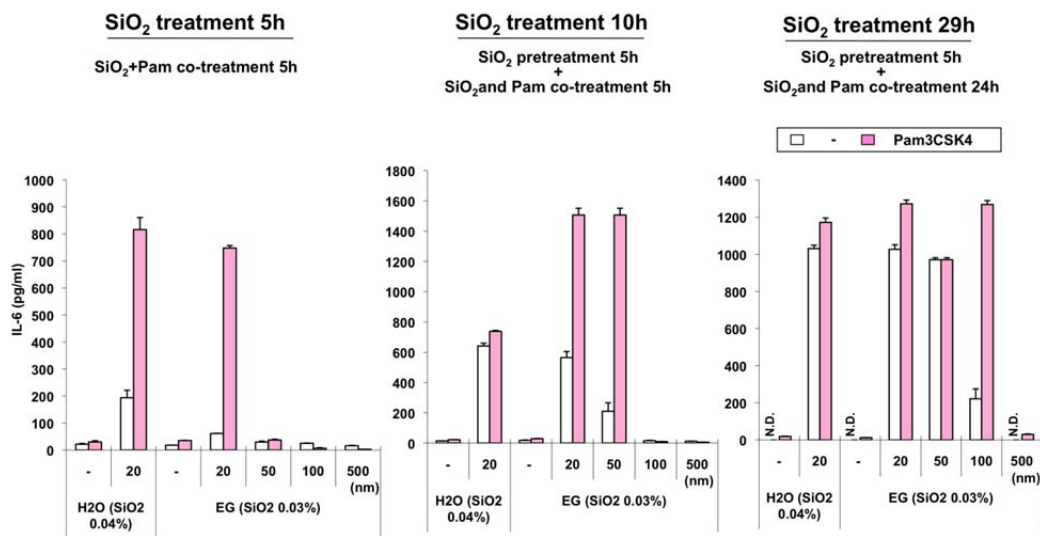


図2. マウス小腸上皮細胞株MoS13細胞のIL-6産生に対して、各粒子径のシリカナノ物質の作用時間が及ぼす影響

MoS13細胞をプラスチックディッシュに播種し24時間培養した後、図に示した3種類の 방법으로各粒子系シリカナノ物質を作用させ、培養上清を回収し、ELISA法にてIL-6

産生量を測定した。左パネルから、シリカナノ粒子とPam3CSK4との同時処理5時間、シリカナノ粒子5時間+同時処理5時間、シリカナノ粒子5時間+同時処理24時間。

粒径100 nm以下のシリカナノ粒子は、粒径が小さい物ほど腸管上皮細胞のIL-6産生を増強する活性が高く、また細胞毒性を示しやすいことが示された。一方、500 nmのシリカについては、0.3%添加では細胞死が誘導されたものの、それ以下の濃度では長時間細胞に作用させた場合も含めてIL-6産生に対する影響は認められなかった。このことより、腸管上皮細胞に対してはシリカナノ粒子は粒径が小さいものほど、サイトカイン産生に対する影響が大きいことが明らかとなった。このIL-6産生は細胞へのダメージと関連することが観察されており、低粒子径シリカナノ粒子の腸管上皮細胞への細胞毒性を表している可能性がある。

IL-6は炎症性サイトカインとして知られ、腸管で炎症が起こっている場合には産生量が増加する。低粒子径のシリカナノ粒子にその産生を増強する活性が認められたことから、炎症性腸疾患などの炎症性疾患を患っている患者に対しては、低粒子径シリカナノ粒子はその症状を悪化させる可能性がある。一方で、IL-6はB細胞のIgA産生を増強したり、生体防御にかかわる17型ヘルパーT細胞（Th17）を分化誘導する活性があり、健常人の腸管免疫系の応答を強化するという観点からは望ましい効果と考えることも可能である。

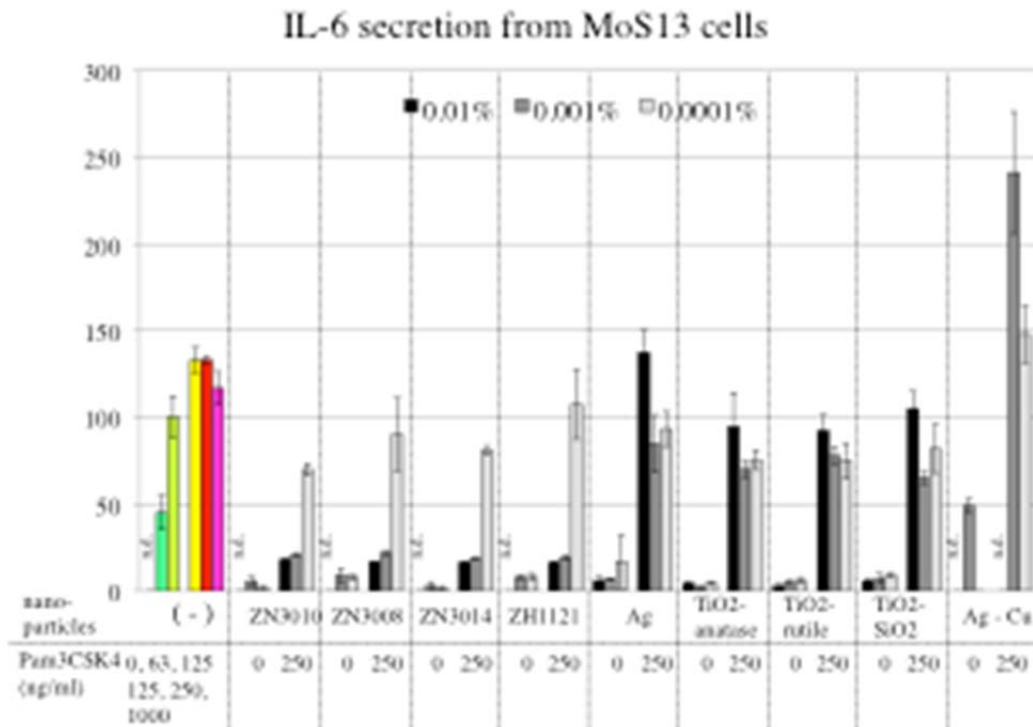


図3. マウス小腸上皮細胞株MoS13細胞のIL-6産生に対する金属ナノ粒子の影響

MoS13細胞に対して0.0001%~0.1%の金属ナノ粒子（4金属種、9試料）を単独で、あるいはToll様受容体(TLR)2の合成リガンドであるPam3CSK4とともに添加し、IL-6産生を測定した（図3）。いずれの試料も0.1%添加時には細胞が剥がれてしまい、明確な細胞毒性が認められた。

図1-3の解析ではマウス小腸上皮細胞株を使用したが、ヒト腸管上皮細胞Caco-2に対してもナノ粒子の作用を検討した。Caco-2細胞は、2週間培養し吸収上皮細胞様に分化させた細胞を用いた。このCaco-2細胞を10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で24時間培養し、confluent状態の細胞を実験に使用した。

Caco-2細胞に対して粒径20 nm~100 nm の4つのシリカナノ粒子試料を0.03% (w/v) の濃度で添加した場合には、IL-8産生に変化は認められなかった。また、20 nmのシリカナノ粒子を0.003%~0.3%の濃度で添加した場合にも、特にIL-8産生に変化は認められなかった。さらに、シリカナノ粒子を加えるときにH₂O₂を添加し、H₂O₂で誘導されるIL-8産生に対するシリカナノ粒子の影響も検討したが、IL-8産生に変化は認められなかった。

Caco-2細胞に対して0.0001%~0.01%の金属ナノ粒子（4金属種、9試料）を単独で、あるいはTNF- α （33 ng/ml）とともに添加した場合のIL-8産生を測定した（図4）。その結果、酸化亜鉛では0.001%の濃度での単独添加でIL-8産生が誘導され、0.01%でさらに大きくIL-8産生が誘導された。TNF- α で誘導されたIL-8産生に対する増強効果も0.001%から認められた。また、銀-銅合金は0.01%の添加で、著しいIL-8産生誘導が観察された。銀および二酸化チタンについては、いずれの試料についてもIL-8産生の変化は認められなかった。

IL-8 secretion from Caco-2 cells

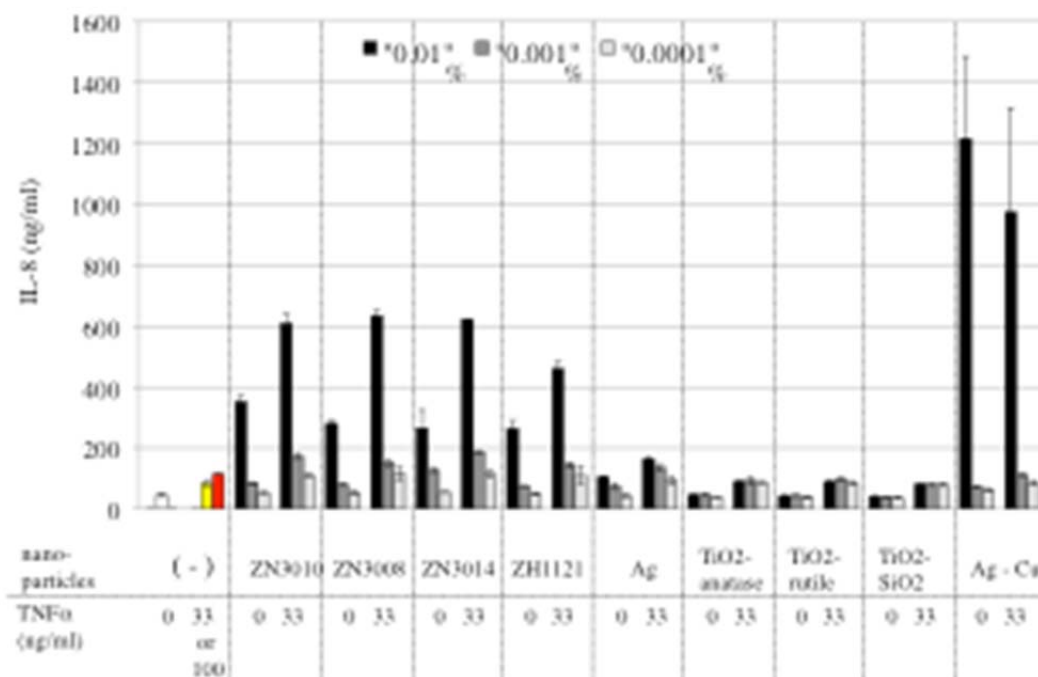


図4. ヒト腸管上皮細胞株Caco-2細胞のIL-8産生に対する金属ナノ粒子の影響

Caco-2 細胞の通常のプラスチックディッシュ上での培養系において、TNF- α 刺激で誘導される IL-8 産生が、酸化亜鉛ナノ物質 (0.01%) を添加した場合に増強される現象が観察され、この時 mRNA 発現が上昇していることが明らかとなった。また、酸化亜鉛ナノ物質 (0.01%) のみを添加した場合にも IL-8 mRNA 発現の上昇が観察された。白金ナノ物質には、上記のような IL-8 の発現が上昇する活性は認められなかった。

今後は、酸化亜鉛の添加で IL-8 発現が増強される現象に関わるシグナル伝達系を、各種阻害剤を用いて推定する。カルシウムおよび酸化アルミニウムナノ物質の Caco-2 細胞の IL-8 産生、mRNA 発現に対する影響も検討する。また、MoS13 細胞に酸化亜鉛 (0.001%) を作用させた時に細胞がばらばらになり、IL-6 産生が低下する現象について、遺伝子発現レベルでの解析を進める。

平成22年度の検討で、粒径100 nm以下のシリカナノ粒子はマウス小腸上皮細胞株MoS13細胞培養系への添加により、0.03% (w/v) の濃度での添加でIL-6産生を誘導することが明らかとなったが、Caco-2細胞のIL-8産生には影響を与えないことが示された。上記の課題「(1) ナノ物質の腸管上皮細胞層の透過吸収」で示した細胞毒性の結果と同様に、この両細胞間での違いは動物種の違い、細胞株自体の性質の違いなどに起因している可能性が考えられる。

銀および二酸化チタンは比較的安全性が高いと考えられるのに対し、酸化亜鉛および銀-

銅合金については、高濃度では腸管上皮細胞の状態の変化を引き起こす可能性が高いと考えられる。

金属ナノ粒子の単層上皮細胞層の透過の状況を明らかにするためには、細胞内および溶液中に存在する金属ナノ粒子を検出する実験系を確立する必要がある。銀ナノ粒子については溶液中で凝集しやすく、*in vitro*実験系に供する際にナノ粒子として作用しているかどうか、不明確な点がある。

(2) 研究全体の成果、考察及び結論

本研究で *in vitro* アジュバント活性測定法として、培養ヒト樹状細胞とヒトリンパ球細胞の共培養評価系とヒト単球系細胞株を使用する評価系の二つの系を確立した。培養ヒト樹状細胞とヒトリンパ球細胞の共培養評価系を用いて、ナノシリカ粒子及び酸化亜鉛ナノ粒子のアジュバンド活性を評価した。ナノシリカ粒子の粒径 20 nm では、IL-2、MCP-1、TNF- α の産生に若干の抑制影響があるものの、両ナノ物質に関して強いアジュバンド活性はないことが示唆された。最終年度にヒト単球系細胞株を使用する評価系を構築した。ヒト培養細胞株を用いた試験であり、今後食用ナノ粒子の評価系に応用したい。

THP-1 由来樹状細胞 (TDDC) が、樹状細胞の特異マーカーを発現し、抗原取り込み能を有していることを確認し、ヒトにおいて抗原性を有する 8 種類の抗原に対して活性化されることを示した。この THP-1 由来樹状細胞 (TDDC) は、その抗原提示能によりアレルギー性評価手法として利用可能であることが示唆された。

酸化亜鉛ナノ粒子のアジュバンドを評価した結果、非イオン性酸化亜鉛ナノ粒子で Th17 の誘導が示唆されたが、全体的に顕著なアジュバンド活性が見られなかった。

試薬グレードのナノ物質の経口投与により、同時投与のOVAに対する特異的抗体価の上昇傾向がナノシリカ20および50nmにおいて観察された。この現象は、ナノシリカの粒径により異なり、100nm、500nmでは認められなかった。また、製法が異なり表面がマイナス電荷を帯びている20nmのナノシリカは反応性が低かった。ナノシリカと同様にナノ二酸化チタンにおいても、マウス2系統において弱い抗体価の上昇の可能性が示唆された。マウスを用いた動物実験であり、匹数が少ないため、今回の結果のみで結論を出すことは困難であるが、ナノ物質によっては経口摂取によりアジュバント活性を示す可能性が示唆された。今後、匹数を増やした実験と、粒径依存の現象が他の物質でも起こるかどうかを、20～200nm程度の粒径系列で安定した分散を示す粒子、あるいは同じ粒径で異なる材質の粒子を用いて調べ、データを蓄積していくことが課題である。

ナノシリカを用いた今年度の研究結果においては、*in vivo*系では、50nmが最も影響が大きく、*in vitro*系では、濃度によっては100nm以上に比較して50nm以下で影響が強く認められるなど、比較的相関する結果が得られた。二酸化チタンは、*in vivo*系でも、*in vitro*系

でも反応が弱く、明確な関係までは確認できなかったが、大きく矛盾することはなかった。酸化亜鉛については、*in vivo*系では抗体価の上昇が顕著に見られたのに対し、確立した*in vitro*系での反応は、顕著ではなかった。しかし、腸管培養細胞系においては、サイトカインの産生の増強が見られている。個体全体の反応である*in vitro*系に対し、局所の細胞系の反応である*in vitro*系について、全体を反映できる反応と反映できない反応の判断については、今後さらなる知見が必要である。また、免疫反応は個体差が大きいいため、*in vivo*でのわずかな反応変化の解釈は難しく、今後、データが蓄積され、*in vivo*で明確な陽性対照となるような物質が発見されれば、作用機序の解明も進み、その反応を模した*in vitro*系の研究も大きく前進すると考えられる。

本研究において、食品を目標に据えつつ、ナノの分散状態を維持している試薬グレードの粒子の入手にも努めた。流通量と反応性を考慮すると、ナノシリカ粒子に注意が必要と思われる。また、貴金属のナノコロイド飲料水も販売されている。公称通りの一次粒子状態で存在する商品は多くはないと予想されるが、マトリックスが単純なため、商品によっては摂取時までナノ状態である可能性もあり、注意が必要である。粉末状態、あるいは高分子と共存しているものは、ナノ状態で食品中に存在する可能性は低いと予想された。

ナノの免疫影響の指標として、各種表面マーカー、サイトカイン等のマーカーの選択は重要であるが、*in vivo*系、*in vitro*系どちらにおいてもイベントと時間経過が複雑に関係し、また、その変化の絶対量が微量であることも予想される。今までの結果をもとに、さらに感度の高い測定条件、免疫影響指標マーカーの探索が課題となる。

食品に用いられる、あるいは混入する可能性のあるナノ物質の食品、消化管、及び生体組織中でのナノ物質の安定性や再分散性等の挙動を解析するとともに、生体あるいは細胞への曝露時のナノ物質の存在状態を評価した。食品のような複雑なマトリックスの中のナノ粒子のサイズを直接測定する方法は存在しないため、水や組成に近い媒体に希釈して計測することになるが、希釈液によっては凝集し食品中の存在状態を反映しているか疑問であった。ナノ物質を人工胃液や人工腸液に懸濁した時も多くの材質のものは凝集した。ナノ物質の一次粒子径から考えると細胞間隙等を通じる、あるいは貪食細胞によって消化管から吸収される可能性もあるが、食品や消化過程において凝集体となっており、サイズの観点からの可能性は少ないと考えられる。粉末食品や工業用粉末の流動性の向上を目的に添加されるシリカに関しては、分散性が高く消化液による凝集は少ないが、培地などタンパク溶液や血清中では凝集が認められた。各種試験法を用いて食品中のナノ物質の吸収性及び体内分布による生体影響を評価するためには、ナノ物質のキャラクタライゼーションは必須の項目であり、得られた結果を適切に評価する上でも重要と考えられる。

ナノ物質への曝露、ナノ物質の材質及びサイズ等の物理学的性状の違いがアレルギー反応性に影響を及ぼすか、特に、化学物質による皮膚感作誘導性への影響を、*in vitro*でのヒト培養細胞の表面抗原発現率及びサイトカイン放出を指標に評価した。シリカ 50 nm 共存下では DNCB による CD54 の発現が増加し、シリカが感作誘導をやすくする可能性が

示された。一方、酸化チタン、プラチナ及び酸化アルミニウムについてはこうした効果は認めなかった。シリカには起炎性が知られており、培地中でも分散性も影響している可能性が考えられる。In vitro 試験で感作性反応の増強効果を調べる評価手法は確立されていないが、今回用いた h-CLAT は一つの評価手段として有効と思われた。CD54 等の細胞表面抗原の発現率の数値で増強効果を判断したが、こうした数値は試験ごとに大きなばらつきがあり、今回認められた差が増強といえるレベルにあるかどうか確証がない。正確な判断をするには繰り返し試験が必要であり、かつアレルギー増強メカニズムを解析することが必要である。一方、タンパク質による即時型アレルギーはより大きな問題である。ナノ物質の即時アレルギー増強効果を調べるには現在動物を用いた検討が進められているが、動物実験廃止の動きを考えると、早急に即時型アレルギーの in vitro 検出系の開発が求められる。これを応用し、ナノ物質の即時アレルギー増強作用の解析を進めること課題として挙げられる。

マウス小腸上皮細胞株 MoS13 細胞に、様々なナノ粒子を添加した場合のサイトカイン産生の変化について解析した。その結果、0.3% (w/v) 添加では調べた全てのシリカナノ粒子（粒径 20 nm～500 nm）で細胞毒性が認められた。また、Toll 様受容体（TLR）2 の合成リガンドである Pam3CSK4 との同時添加で粒径 100 nm 以下のシリカナノ粒子は、MoS13 細胞のインターロイキン 6（IL-6）産生を増強した。シリカナノ粒子を細胞に作用させる時間を変化させてその影響を観察したところ、粒径が小さいものほど、短時間の処理で IL-6 産生増効果が観察された。また、20 nm および 50 nm のものは長時間作用させると、シリカナノ粒子のみの刺激で IL-6 産生を増強する効果が認められ、この時細胞に対する毒性が認められた。粒径 100 nm 以下のシリカナノ粒子は、粒径が小さい物ほど腸管上皮細胞の IL-6 産生を増強する活性が高く、また細胞毒性を示しやすいことが明らかとなった。MoS13 細胞に対して 4 種類の金属ナノ粒子を添加した場合、0.1% 添加時には明確な細胞毒性が認められた。銀-銅合金は 0.001% 添加で細胞形態の変化が認められるとともに IL-6 産生が顕著に増加し、0.01% 添加では細胞は死滅した。酸化亜鉛は 0.001% 以上の添加で明確な細胞形態の変化が生じ、TLR リガンド（Pam3CSK4）刺激で誘導される IL-6 産生を抑制した。銀および二酸化チタンは、特に変化は認められなかった。

ヒト腸管上皮細胞株 Caco-2 細胞のサイトカイン産生に対するナノ粒子添加の影響を解析した。Caco-2 細胞に対してシリカナノ粒子（粒径 20 nm～100 nm）を 0.03% (w/v) の濃度で添加した場合には、インターロイキン 8（IL-8）産生に変化は認められなかった。Caco-2 細胞に対して酸化亜鉛、銀、二酸化チタン、銀-銅合金の 4 種類の金属ナノ粒子を添加した場合、酸化亜鉛および銀-銅合金については、0.01% 濃度の添加で顕著な IL-8 産生が認められた。銀および二酸化チタンについては、IL-8 産生の変化は認められなかった。

2 種類の培養細胞での結果より、銀およびチタンは比較的安全性が高いと考えられるのに対し、酸化亜鉛および銀-銅合金については、高濃度では腸管上皮細胞の状態の変化を引き起こす可能性が高いと考えられる。また、2 種の細胞間でのシリカナノ粒子に対する反

応性の違いは、動物種の違い、細胞株自体の性質の違いなどに起因している可能性が考えられた。

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

1. 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト
 - 1) Tsuruda S., Akaki K., Hiwaki H., Akiyama H., Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Omphalotus guepiniiformis* and *Lentinula edodes*, Biosci. Biotechnol. Biochem, 76, 1343-1349 (2012).
 - 2) Yoshimura M, Akiyama H, Kondo K, Sakata K, Matsuoka H, Amakura Y, Teshima R, Yoshida T. Immunological effects of oenothien B, an ellagitannin dimer, on dendritic cells. Int. J. Mol. Sci. 14, 46-56 (2012).
 - 3) 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 Chem. 138, 757-761 (2013).
 - 4) Akiyama H, Katayama S, Kanda T, Maeda-Yamamoto M, Totsuka M, Takahashi S, Shoji T, Inakuma T, Nakamura S, Prevention of allergic disease development and symptoms by food factors, Chem. Pharm. Des. in press (2013) .
2. 本研究を基にした学会発表の実績
 - 1) 穠山浩, 坂田こずえ, 松岡英樹, 佐藤恭子, 蜂須賀暁子, 手島玲子: 食品添加物用途ナノ粒子のアジュバンド活性評価について (第1報) 第102回日本食品衛生学会学術講演会(2011.9)
 - 2) 穠山浩, 松岡英樹, 坂田こずえ, 中村里香, 高橋慎吾, 相澤宏一, 稲熊隆博, 戸塚護, 手島玲子: β -カロテン強化摂取による食物アレルギー発症の抑制について 日本薬学会生薬天然薬物部会主催 第4回食品薬学シンポジウム(2011.10)
 - 3) 興石一郎, 荒木陽子, 横田あずさ, 穠山浩, 中島翔平, 舛田晋, 神田智正: 消化管粘膜細胞層バリアー機能へのポリフェノール類の影響、日本薬学会生薬天然薬物部会主催 第4回食品薬学シンポジウム(2011.10)
 - 4) 久木田卓弥, 石川えり, 片山 茂, 中島翔平, 舛田晋, 神田智正, 穠山浩, 中村宗一郎: 樹状細胞様THP-1細胞を用いた抗原提示能抑制物質の探索 日本薬学会生薬天然薬物部会主催 第4回食品薬学シンポジウム(2011.10)
 - 5) Kimura, Y., Katayama, S., Teshima, R., Akiyama, H., Nozawa, A., Tozawa, T. and Nakamura, S. :Analysis of T cell epitopes of a major buckwheat allergen, Fag e 2, by using cell-free protein synthesis system, The 9th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences (2011.9)
 - 6) Yamaguchi, Y., Katayama, S., Kukita, T., Ishikawa, E., Akiyama, H. and Nakamura, S. :Analysis of T cell epitopes of a major buckwheat allergen, Fag e 2, by using cell-free protein synthesis system, The 9th Matsuyama International Symposium on Cell-Free Sciences (2011.9)

- a, S. : Immune modulation effect of ovalbumin-acidic polysaccharides conjugate , The 5th Symposium of International Society of Rare Sugars (2011.11)
- 7) 蜂須賀暁子、木村美恵、手島玲子：経口摂取ナノシリカ粒子の免疫影響について、薬学会第131年会 (2011. 3)
- 8) 蜂須賀暁子、木村美恵、中村亮介、松岡英樹、穠山浩、手島玲子：経口摂取ナノシリカ粒子のマウス免疫影響について 薬学会第132年会 (2012. 3)
- 9) 蜂須賀暁子、木村美恵、中村亮介、中村里香、穠山浩、手島玲子：経口摂取酸化亜鉛ナノ粒子のマウス免疫影響について 薬学会第133年会 (2013. 3)
- 10) 新藤智子、香取輝美、金澤由基子、小島幸一、手島玲子：マウスの経口食物アレルギーモデルの発症機序：腸管におけるIgA産生の変化、第18回日本免疫毒性学会学術大会 (2011. 9)
- 11) 五十嵐良明、内野 正、西村哲治：酸化チタンナノ粒子の皮膚感作性反応に及ぼす影響。第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011. 7)

3. 特許及び特許出願の数と概要
なし

4. その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）の実績
なし

IV 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	4	ナノ物質の安全性については国際的にも問題になっている。物性から、細胞、動物反応まで、ナノ物質の安全性について各分野の専門家が集まり幅広く扱っており、時宜にかなった妥当な研究と思われる。
2 研究目標の達成度	4	免疫影響の in vitro 評価系を2系統確立し、ほとんど報告がないナノの経口摂取影響について、弱いながらアジュバント活性を示唆するデータを提出している。ナノ粒子のアジュバント活性が弱いため、必ずしもナノ物質で評価系の相関を得るまでには至らなかったが、既存の抗原活性物質で検証が行われている。ナノ物質のアジュバント活性が顕著でなかった理由としては、根本的に活性が弱いためか、ナノとしての存在比率が少ないためかは不明である。概ね、研究目標を達成していると思われる。
3 研究成果	4	ナノ食品の健康影響評価は、中でも免疫修飾作用について

の有用性		は、国際的にもほとんど研究がなされていない。吸入被ばくに比べて情報が極めて乏しいナノ物質の経口摂取免疫影響についての知見を得た。また、ナノ物質の分散性について、塩、pH、タンパク質の他、実際に経口摂取した場合を想定し人工消化液中でのデータを得た。凝集する物質が多く、ナノとしての配慮が無用なものが多い中で、分散方向に向かう場合もあり、注意が必要な物質があることを明らかにした。また、数種類の培養細胞において、ナノ物質との反応性について相違点も提示され、新しい知見が得られた。免疫は全身反応であるため、動物実験が不可欠な分野であるが、代替法への動きの中で、培養細胞による評価系の構築への知見は有用と考えられる。
合 計	1 2	
総合コメント 概ね計画通り進んでおり、新しい知見も得られた。今後、データが蓄積されれば、複雑な免疫現象の多様な評価法の一つとして期待される。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。