

トダ ッグト

氏名(本籍)	戸田 嗣人(奈良県)
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博第38号
学位授与年月日	平成29年3月9日
学位授与の条件	学位規程第3条第1項該当者
学位論文の題名	非晶質ナノシリカの免疫系への影響に関する研究
論文審査委員	主査 教授 小西 守周 副査 教授 岩川 精吾 副査 教授 吉野 伸 副査 教授 加藤 郁夫

論文内容の要旨

【緒言】

非晶質ナノシリカはナノマテリアルの中で最も汎用されているものの一つであり、日焼け止め、ファンデーション等の化粧品基材、食品添加物(例:流動化剤等)としてタブレット菓子、粉ミルク等に幅広く利用されている[1, 2]。しかし、これまでに非晶質ナノシリカの体内動態評価として、皮膚に塗布した非晶質ナノシリカが角質層を通過し、表皮層にまで到達するとともに、全身血流に移行し、リンパ節、脾臓等の免疫組織へ移行し得ることが報告されている[3]。したがって、体内に吸収された非晶質ナノシリカの免疫へ影響を及ぼす可能性が示唆されている。本研究では、非晶質ナノシリカの免疫系に与える影響について種々の検討を行った。

生活環境中物質による免疫毒性の代表的な例として、大気汚染物質に起因するアレルギー罹患率の増加が挙げられる[4]。例えばディーゼル排気微粒子はアレルギー反応を増強することが知られており、マウスにおいてディーゼル排気微粒子と抗原を経口投与すると、抗原単独の場合ではみられなかった抗原特異的免疫応答は増強されることが報告されている[5]。このように単独では免疫原性を有さないが、抗原との併用投与によって抗体産生やリンパ球増殖反応を増強することをアジュバント効果といい、ディーゼル排気微粒子はアジュバント効果を示す物質の一つである。アジュバント物質は、アレルギーを誘発する原因と考えられ、抗原とともに曝露されると、免疫系を過度に亢進させる可能性がある。したがって、生活環境中物質のアジュバントリスク評価は非常に重要であると考えられる。

アジュバント効果を示す物質は免疫寛容を破綻させ、食物アレルギーあるいは自己免疫疾患を誘発又は増悪させる可能性がある。またナノサイズの粒子は、サブミクロンサイズ以上の粒子とは異なり、粘膜組織から吸収されるという報告があり[6]、腸管粘膜免疫系が深く関与している経口免疫寛容に影響を及ぼす可能性がある。例えば、アジュバント効果を有するディーゼル排気微粒子は経口免疫寛容誘導を阻止するため、食物アレルギーの発症に関与する可能性が示唆されている[7]。またフロイント完全アジュバント(CFA)は、実験的自己免疫疾患モデルであるアジュバント関節炎、コラーゲン関節炎および自己免疫性脳脊髄炎の誘発のため、それぞれCFA単独、II型コラーゲンおよびミエリタンパク質と併用して用いられる[8-10]。

本研究においては、非晶質ナノシリカのアジュバント効果および経口免疫寛容誘導に対する影響について

検討した。

第1章 非晶質ナノシリカのアジュバント効果

【方法】

実験動物には8週齢，SPF 雄性 BALB/cCr Slc マウス（日本エスエルシー株式会社）を使用した。非晶質ナノシリカのアジュバント効果について検討するため，以下の群を設定し（表 1, 2），免疫抗原および本ナノ粒子をマウスに腹腔内投与した（day 0）。陽性対照アジュバントとして Alum を用いた。Day 21 に血清中の抗 OVA IgG, IgG1, IgG2a および IgE を ELISA 法によって測定した。さらに脾臓細胞を OVA 存在下（20, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），37°C，2 日間培養した。その後，methyl- ^3H -thymidine（37 kBq/10 $\mu\text{L}/\text{well}$ ）を添加し，さらに一晩培養後，シンチレーションカウンター（Perkin Elmer）を用いて細胞内放射活性を測定した。また脾臓細胞を OVA 存在下（20, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），37°C，4 日間培養し，培養上清中の IFN- γ , IL-4, IL-17 を ELISA で測定した。非晶質ナノシリカは Micromod 社から購入した一次粒子サイズが 30 nm（nSP30）および 100 nm（nSP100）を使用し，従来型シリカとして 1000 nm（mSP1000）を用いた。

表 1. 群構成（非晶質ナノシリカのアジュバント効果）

群	免疫抗原	抗原量 (mg)	抗原との併用物質	併用物質質量 (μg)	動物数
1	PBS (-)	-	PBS (-)	-	5
2	PBS (-)	-	nSP30	300	5
3	OVA	0.1	PBS (-)	-	5
4	OVA	0.1	nSP30	3	5
5	OVA	0.1	nSP30	30	5
6	OVA	0.1	nSP30	300	5
7	OVA	0.1	陽性対照 (Alum)	10 mg	5

表 2. 群構成（非晶質ナノシリカの粒子径とアジュバント効果）

群	免疫抗原	抗原量 (mg)	抗原との併用物質	粒子径 (nm)	併用物質質量 (μg)	動物数
1	PBS (-)	-	PBS (-)	-	-	5
2	OVA	0.1	PBS (-)	-	-	5
3	OVA	0.1	nSP30	30	300	5
4	OVA	0.1	nSP100	100	300	5
5	OVA	0.1	mSP1000	1000	300	5

【結果】

nSP30 のアジュバント効果について検討するため，day 21 におけるマウス血清中の抗 OVA IgG を ELISA によって測定した。その結果，nSP30 併用投与群において用量依存的な抗 OVA IgG 産生の増加が認められた（図 1A）。さらにマウス脾臓細胞を OVA 刺激し，OVA 特異的脾臓細胞増殖反応を測定した。IgG と同様に，nSP30 併用投与群において用量依存的な OVA 特異的脾臓細胞増殖反応の促進が認められた（図 1B）。このことから nSP30 がアジュバント効果を示すことが示唆された。

次にアジュバント効果の機序解明として nSP30 が Th1, Th2 反応に及ぼす影響について評価するため，血清中の抗 OVA IgG2a, IgG1, IgE を測定した（図 2A, 2B, 2C）。IgG2a は Th1 細胞から産生される IFN- γ の刺激により，IgG1, IgE は Th2 細胞から産生される IL-4 の刺激により産生されるため，これらは Th1, Th2 反応

の指標となる。その結果、nSP30 併用投与群において有意な抗 OVA IgG2a, IgG1, IgE 産生の増加が認められた。また脾臓細胞によって分泌される IFN- γ (Th1 サイトカイン), IL-4 (Th2 サイトカイン) を測定した結果、nSP30 併用投与群において用量依存的な IFN- γ および IL-4 産生の促進が認められた (図 3A, 3B)。以上の結果から、nSP30 は Th1 型, Th2 型反応の両方に対してアジュバント効果を示すことが示唆された。さらに nSP30 の Th17 反応に与える影響について検討するため、*in vitro* において脾臓細胞を OVA 刺激することによって分泌される IL-17 を測定した (図 3C)。Th17 細胞は IL-17 を産生し、自己免疫疾患および真菌感染症において重要な役割を果たすと考えられている Th 細胞である。その結果、免疫脾臓細胞と OVA との混合培養によって IL-17 産生が認められた。本 IL-17 産生は、OVA を nSP30 と併用して培養することによって用量依存的に促進された。このことから、nSP30 は Th1, Th2 のみならず、Th17 反応も増強すると考えられる。

図 1. nSP30 の抗 OVA IgG 産生および OVA 特異的脾臓細胞増殖反応に対する効果

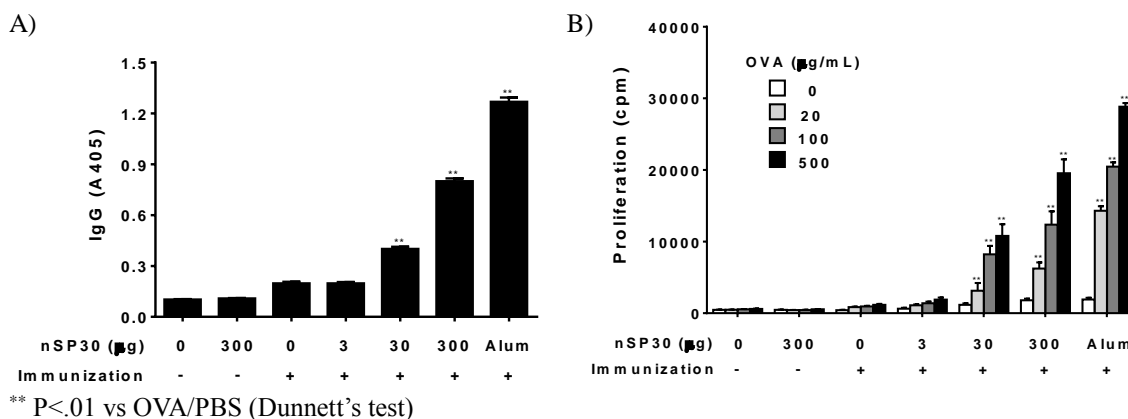
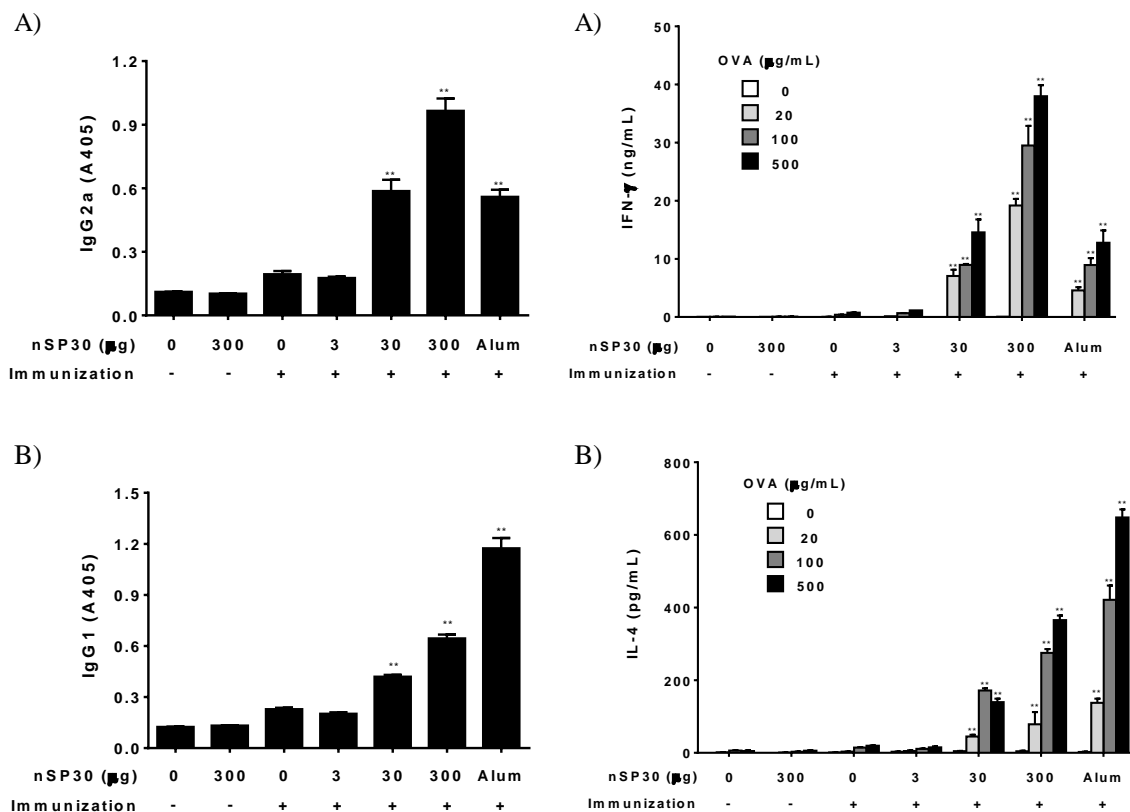
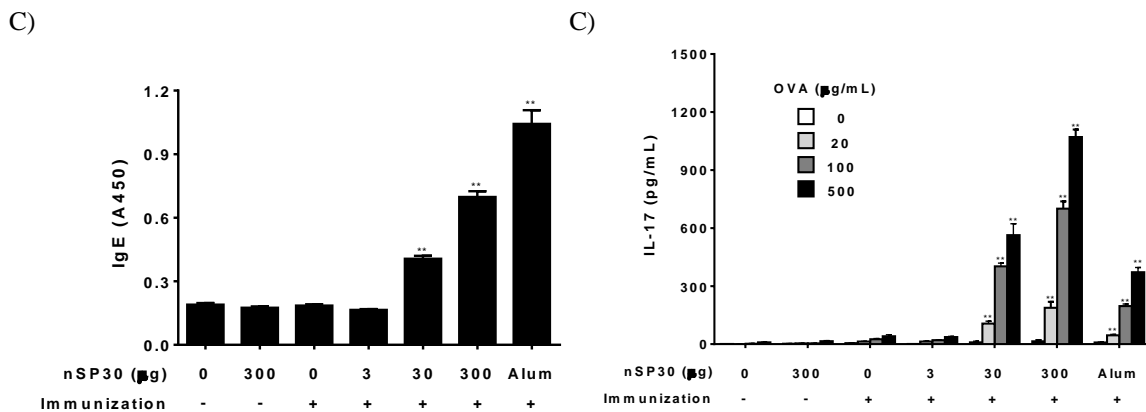


図 2. nSP30 の抗 OVA 抗体産生に対する効果

図 3. nSP30 のサイトカイン産生に対する効果



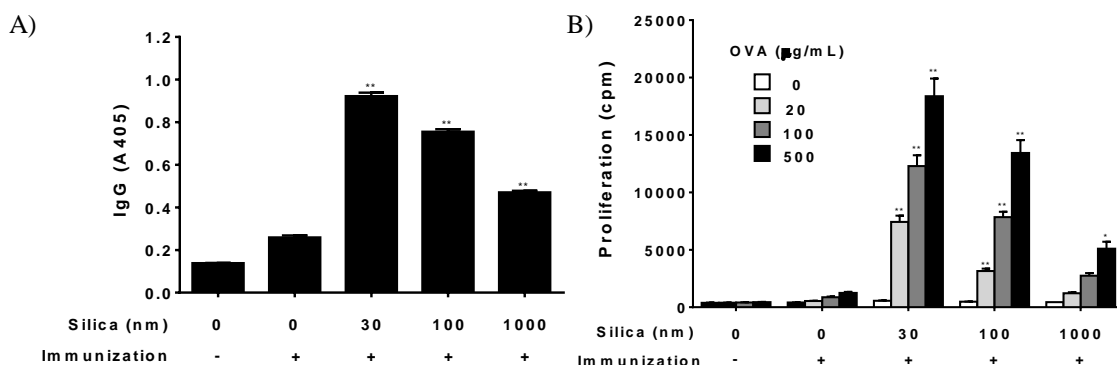


** P<.01 vs OVA/PBS (Dunnett's test)

** P<.01 vs OVA/PBS (Dunnett's test)

非晶質シリカの粒子径がアジュバント効果に及ぼす影響について検討するため、OVA と粒子径が異なる本ナノ粒子 (粒子径: 30, 100, 1000 nm) とをマウスに併用投与し (day 0), day 21 における血清中の抗 OVA 抗体を ELISA によって測定した (図 4A). その結果, 非晶質シリカの粒子径が小さいほど, 抗 OVA IgG 産生が増加する傾向が認められた. また, OVA 特異的脾臓細胞増殖反応も, 本ナノ粒子径が小さいほど促進された (図 4B). 以上の結果から, 非晶質シリカは粒子の微小化に伴い, より強いアジュバント効果を有することが示唆された.

図 4. 異なるサイズを有する非晶質シリカの抗 OVA IgG 産生および OVA 特異的脾臓細胞増殖反応に対する効果



** P<.01 vs OVA/PBS (Dunnett's test)

【考察】

本研究では, マウスに抗原 OVA を nSP30 と併用して投与し, OVA 特異的免疫反応に対する nSP30 の影響について検討した. その結果, nSP30 は用量依存的に抗 OVA IgG 抗体産生を促進することを見出した. また nSP30 によって抗原特異的脾臓細胞増殖反応も用量依存的に増強された. このことから nSP30 はアジュバント効果を有することが示唆された. また液性免疫の指標である Th2 型抗 OVA IgG1 および IgE 抗体, 細胞性免疫の指標である Th1 型抗 OVA IgG2a 抗体を測定した結果, これら抗体産生はいずれも nSP によって用量依存的に促進された. さらに培養脾臓細胞によって産生されるサイトカインを測定したところ, 全てのサブタイプの Th 細胞 (Th1, Th2 および Th17) 由来のサイトカイン IFN- γ , IL-4, IL-17 産生が促進された. このことから, nSP は主に Th2 型を比較的選択的に誘導する一般的な粒子アジュバントとは異なり, 免疫応答全般を促進することが示唆された. また粒子径の異なる非晶質シリカ (粒子径: 30, 100, 1000 nm) を用いて評価したところ, 粒子径の縮小に伴い, アジュバント効果がさらに増強されることが示された. 以上, nSP は Th1, Th2 および Th17 免疫系をはじめとする免疫全般に対しアジュバント効果を有することが明らかとなり, その

効果は粒子径が小さいほど強いことが示唆された。

第2章 非晶質ナノシリカの経口免疫寛容誘導に対する影響

【方法】

実験動物には8週齢、SPF 雄性 BALB/cCr Slc マウスを使用した。免疫反応誘導のため、OVA (0.1 mg) を CFA と共に皮下投与した (day 0)。経口免疫寛容誘導のため、免疫前に5日間 (day -5~day -1) 25 mg OVA を PBS に溶解し経口投与した。非晶質ナノシリカ (nSP30) の経口免疫寛容誘導に対する影響について検討するため、以下の群を設定し (表 3)、本ナノ粒子は各 OVA 経口投与直前に経口投与した。Day 21 に血清および脾臓細胞を回収し、血清中の抗 OVA 抗体、脾臓細胞増殖反応、サイトカインを第 1 章に記載した方法に準じて測定した。

表 3. 群構成 (nSP30 の経口免疫寛容誘導に対する影響)

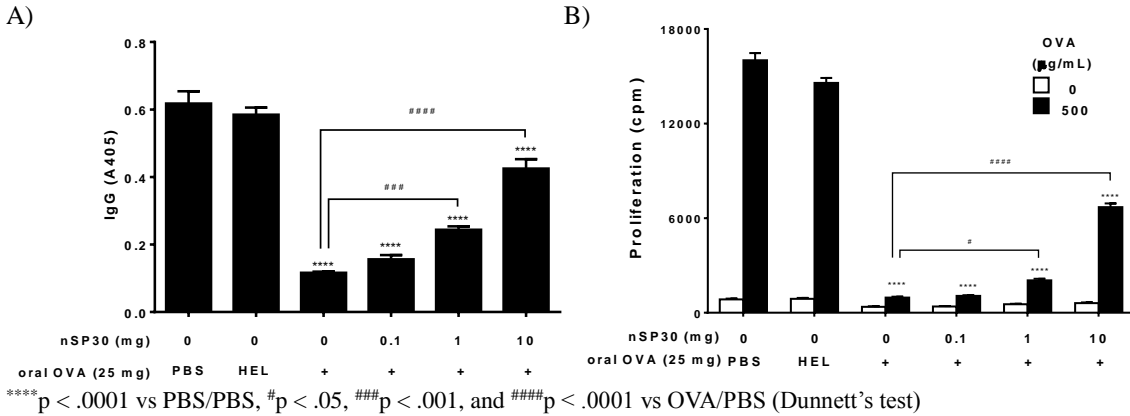
群	経口抗原	抗原量 (mg)	抗原との併用物質	併用物質 (mg)	動物数
1	PBS (-)	-	PBS (-)	-	5
2	HEL*	25	PBS (-)	-	5
3	OVA	25	PBS (-)	-	5
4	OVA	25	nSP30	0.1	5
5	OVA	25	nSP30	1	5
6	OVA	25	nSP30	10	5

*HEL, hen egg-white lysozyme (対照抗原)

【結果】

nSP30 の経口免疫寛容誘導に及ぼす影響について検討するため、まずマウス血清中の抗 OVA IgG を測定した。その結果、PBS 経口投与群 (対照群) と比較すると、OVA 経口投与群において抗 OVA IgG 産生は有意に抑制された (経口免疫寛容誘導)。対照抗原 HEL 経口投与群では PBS 経口投与群と抗 OVA IgG 産生量は同程度であり、経口免疫寛容は OVA に特異的に誘導された。本抗 OVA IgG 産生抑制は、nSP30 併用投与群において有意に阻害され、その阻害効果は用量依存的であった (図 5A)。さらにマウス脾臓細胞を OVA 刺激し、OVA 特異的脾臓細胞増殖反応を測定した。IgG 産生の場合と同様に、経口免疫寛容誘導により脾臓細胞増殖反応は抑制され、本抑制は nSP30 併用投与群において用量依存的に阻害された (図 5B)。このことから nSP30 は経口免疫寛容誘導阻害作用を有することが示唆された。

図 5. 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgG 産生抑制および OVA 特異的脾臓細胞増殖反応抑制に対する nSP30 の効果



血清中の抗 OVA IgG2a を測定することにより nSP30 の Th1 経口免疫寛容誘導に与える影響について検討した。経口免疫寛容誘導により抗 OVA IgG2a 産生は有意に抑制され、本抑制は nSP30 投与によって用量依存的に阻害された (図 6A)。さらに血清中の抗 OVA IgG1, IgE を測定することにより, nSP30 の Th2 経口免疫寛容誘導に与える影響について検討した。経口免疫寛容誘導により抗 OVA IgG1, IgE 産生も有意に抑制され、本抑制は nSP30 投与によって用量依存的に阻害された (図 6B, 6C)。脾臓細胞によって分泌されるサイトカインの内, IFN- γ (Th1 サイトカイン), IL-4 (Th2 サイトカイン) を測定した結果, 経口免疫寛容誘導により IFN- γ , IL-4 産生は抑制され、本抑制は nSP30 投与によって用量依存的に阻害された (図 7A, 7B)。以上の結果から nSP30 は Th1 および Th2 経口免疫寛容誘導に対する阻害作用を有することが示唆された。さらに, OVA 経口投与による Th17 免疫寛容誘導の有無および, 誘導された場合, nSP30 の Th17 経口免疫寛容に与える影響について検討するため, 脾臓細胞によって分泌される IL-17 を測定した (図 7C)。その結果, OVA 経口投与によって IL-17 産生は抑制され (Th17 経口免疫寛容誘導), 本免疫寛容は nSP30 投与によって用量依存的に阻害された (図 7C)。したがって, nSP30 は Th1 および Th2 経口免疫寛容誘導のみならず, Th17 経口免疫寛容誘導に対しても阻害作用を有することが示唆された。

図 6. 経口免疫寛容誘導による抗 OVA 抗体産生抑制に対する nSP30 の阻害効果

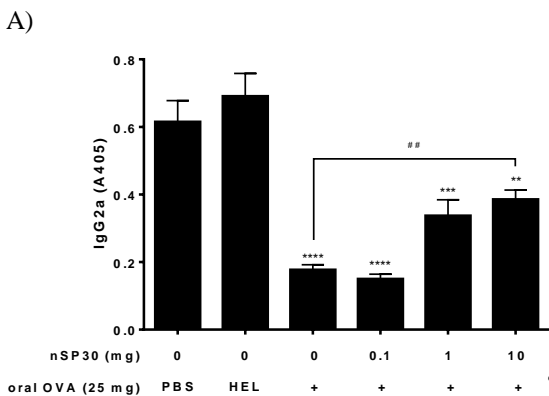
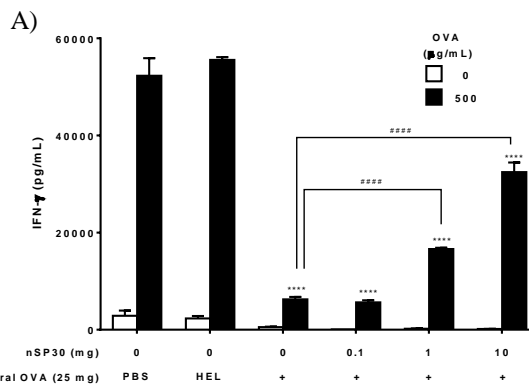
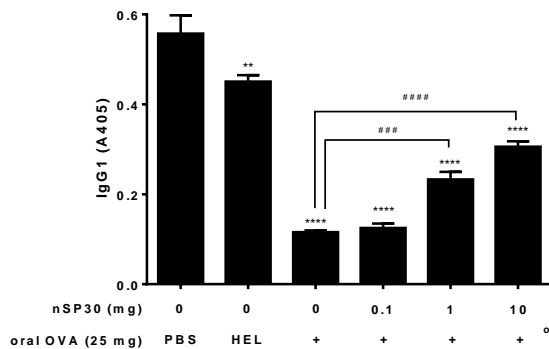


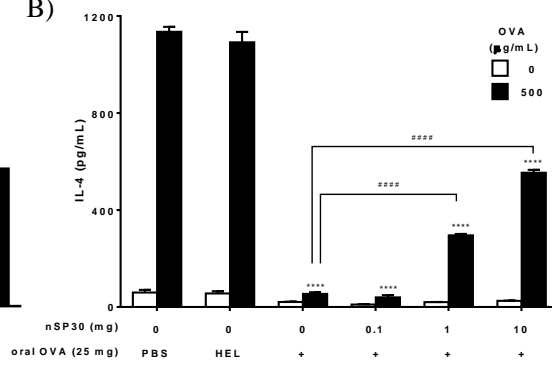
図 7. 経口免疫寛容誘導によるサイトカイン産生抑制に対する nSP30 の阻害効果



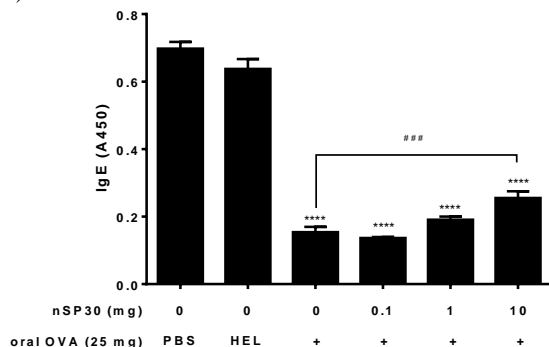
B)



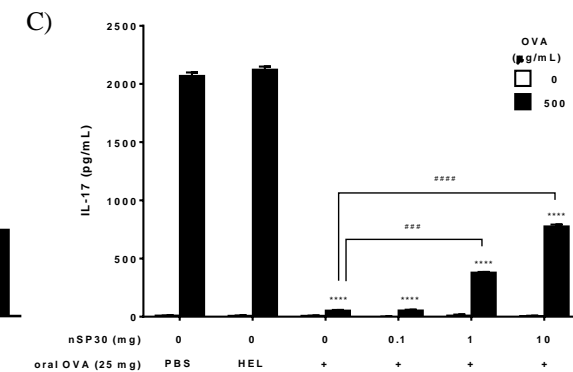
B)



C)



C)



***p < .0001 vs PBS/PBS, ##p < .01, ###p < .001, and ####p < .0001 vs OVA/PBS (Dunnett's test)

【考察】

本研究では、nSP30の経口免疫寛容誘導に対する効果について検討するため、抗原OVA免疫前にOVAおよびnSP30(0.1, 1, 10 mg/マウス)を連続5日間経口併用投与した。その結果、抗原の経口投与によって認められた抗原特異的抗体産生抑制、脾臓細胞増殖反応抑制(経口免疫寛容の誘導)はnSP30の併用投与によって用量依存的に有意に阻害された。このことから、nSP30は経口免疫寛容誘導を阻害することが示唆された。経口免疫寛容は、食物アレルギー阻止に重要な役割をはたしているため、本知見はnSP30が食物アレルギーを誘発又は増悪させる可能性を示唆している。次に、nSP30のTh1およびTh2経口免疫寛容に対する影響について検討した。液性免疫の指標であるTh2型の抗OVA IgG1およびIgE、細胞性免疫の指標であるTh1型抗OVA IgG2aを測定した結果、OVAの経口投与によってTh1およびTh2免疫応答は抑制、すなわち、これらの免疫系に対する免疫寛容の誘導が見られたが、nSP30をOVAと併用して投与することによって、本Th1およびTh2経口免疫寛容の誘導は阻害された。さらに、脾臓細胞によるTh1(IFN- γ)、Th2サイトカイン(IL-4)およびTh17サイトカイン(IL-17)産生もOVAの経口投与によって抑制され、本抑制はnSP30を併用して投与することによって阻害された。以上の結果から、nSP30はTh1、Th2およびTh17経口免疫寛容に対し、非選択的に阻害することが示唆された。

【結論】

アジュバント効果および経口免疫寛容誘導を指標に、非晶質ナノシリカの免疫系への影響について検討した。その結果、非晶質ナノシリカはTh1、Th2、Th17免疫応答に対してアジュバント効果を示すこと、またその効果は粒子の微小化に伴い、より増強されることを見出した。さらに非晶質ナノシリカは経口免疫寛容誘導を阻害し、また、Th1、Th2およびTh17経口免疫寛容誘導阻害作用を示したことから、本ナノ粒子は免疫寛容誘導阻害に選択性を有さないことが示唆された。

以上、本研究では 100 nm 以下の非晶質ナノシリカはアジュバント効果および経口免疫寛容誘導阻害作用を有すること、また粒子径がより大きな従来型非晶質シリカとは異なり、非晶質ナノシリカはより強いアジュバント効果を示すことを明らかにした。今後は、本研究で得られた情報を基盤として、ナノマテリアルの安全性確保および社会受容が進展し、ナノマテリアルを活用した利便性の高い豊かな社会が構築されることを願っている。

【参考文献】

1. Contado C: **Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical problem.** *Front Chem* 2015, **3**:48.
2. Fruijtier-Pöllöth C: **The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica—A nanostructured material.** *Toxicology* 2012, **294**:61–79.
3. Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Matsuo K, Arimori A, Isobe M, Tochigi S, Kondoh S, Hirai T, Akase T, Yamashita T, Yamashita K, Yoshida T, Nagano K, Abe Y, Yoshioka Y, Kamada H, Imazawa T, Itoh N, Nakagawa S, Mayumi T, Tsunoda S-I, Tsutsumi Y: **Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application.** *Biomaterials* 2011, **32**:2713–24.
4. Britton J: **Symptoms and objective measures to define the asthma phenotype.** *Clin Exp Allergy* 1998, **28**:2–7.
5. Yoshino S, Sagai M: **Induction of systemic Th1 and Th2 immune responses by oral administration of soluble antigen and diesel exhaust particles.** *Cell Immunol* 1999, **192**:72–8.
6. Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT: **Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency.** *J Pharm Pharmacol* 1990, **42**:821–6.
7. Yoshino S, Ohsawa M, Sagai M: **Diesel exhaust particles block induction of oral tolerance in mice.** *J Pharmacol Exp Ther* 1998, **287**:679–83.
8. Farez MF, Quintana FJ, Gandhi R, Izquierdo G, Lucas M, Weiner HL: **Toll-like receptor 2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1 promote central nervous system neuroinflammation in progressive EAE.** *Nat Immunol* 2009, **10**:958–964.
9. Notley CA, McCann FE, Inglis JJ, Williams RO: **ANTI-CD3 therapy expands the numbers of CD4+ and CD8+ treg cells and induces sustained amelioration of collagen-induced arthritis.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**:171–178.
10. Shahrara S, Proudfoot AEI, Park CC, Volin M V, Haines GK, Woods JM, Aikens CH, Handel TM, Pope RM: **Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 ameliorates rat adjuvant-induced arthritis.** *J Immunol* 2008, **180**:3447–56.

論文審査の結果の要旨

本研究は、化粧品基剤や食品添加物などに汎用されている非晶質ナノシリカの免疫系に対する影響について検討したものである。まず、非晶質ナノシリカの免疫促進作用（アジュバント作用）の有無について調べるため、抗原（卵白アルブミン、OVA）と非晶質ナノシリカとを併用してマウスに腹腔注射した。その結果、OVAのみを投与した対照群と比較し、併用投与群では抗OVAIgG抗体産生は増加し、また、OVAに対する脾臓細胞の増殖反応が促進されることを明らかにした。さらに、Th1 および Th2 細胞依存

性の抗 OVA 抗体アイソタイプ (IgG2a, IgG1, IgE) および Th1、Th2 および Th17 細胞依存性サイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-17) 産生も併用投与群において有意に促進されること、非晶質ナノシリカの粒子径とアジュバンド作用との関係も明らかにした。続いて、食物アレルギー発症阻止に重要な役割を果たしている経口免疫寛容についても非晶質ナノシリカの影響を検討した。経口免疫寛容は、抗原を経口投与することによって誘導される。抗原 OVA と非晶質ナノシリカとを併用して経口投与することによって、本来生じる経口免疫寛容が有意に阻止されることを明らかにした。また、非晶質ナノシリカは、Th1、Th2 および Th17 経口免疫寛容誘導を非選択的に阻害している可能性も明らかにした。以上、本研究によって、非晶質ナノシリカはアジュバンド作用を有すること、また、本ナノ粒子は経口免疫寛容誘導に対して阻止作用を有することが初めて明らかにされた。

非晶質ナノシリカは我々の生活に必須となっているものの、その安全性に関する情報は未だ乏しい。本研究で得られた知見は、非晶質ナノシリカの免疫系への影響を明らかにしただけではなく、その安全性やあるいは新たな利用法の開発に関わる有益な情報を提供したものと考えられる。

したがって、上記の論文は博士（薬学）論文として、相当と判定する。