

非晶質ナノシリカの免疫系への影響に関する研究

2017

戸田 嗣人



# 目次

略語表 .....	2
緒論 .....	4
本論 .....	8
第1章  非晶質ナノシリカのアジュバント効果 .....	8
第1節  非晶質シリカの物性評価 .....	8
第2節  非晶質ナノシリカの用量依存的アジュバント効果 .....	10
第3節  アジュバント効果を示さない非晶質ナノシリカの用量に関する研究 .....	28
第4節  非晶質シリカの粒子径とアジュバント効果の関係 .....	41
第5節  考察 .....	53
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 .....	58
第1節  非晶質ナノシリカ単回投与の経口免疫寛容誘導に対する影響 .....	58
第2節  非晶質ナノシリカ反復投与の経口免疫寛容誘導に対する影響 .....	74
第3節  考察 .....	86
結語 .....	88
謝辞 .....	89
参考文献 .....	90

## 略語表

A405	absorbance at 405 nm
A450	absorbance at 450 nm
ADI	acceptable daily intake
ADME	absorption distribution metabolism and excretion
ALP	alkaline phosphatase
Alum	aluminum adjuvant
BCA Protein Assay	bicinchoninic acid protein assay
CD	cluster of differentiation
CFA	complete Freund's adjuvant
DNA	deoxyribonucleic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
HEL	hen egg-white lysozyme
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
LPS	lipopolysaccharide
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
mSP	amorphous silica microparticles
MSU	monosodium urate crystals
MyD	myeloid differentiation primary response
nSP	amorphous silica nanoparticles
NLRP3	NACHT-, LRR- and pyrin domain –containing protein 3
NOAEL	no observed adverse effect level
OECD	organisation for economic cooperation and development
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate-buffered saline
PRR	pattern recognition receptor
SEM	standard error of mean
SI	stimulation index
SP	silica particles
SPF	specific pathogen free
STAT	signal transducers and activators of transcription

TGF	transforming growth factor
Th	helper T cell
TLR	toll-like receptor
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TNF	tumor necrosis factor
Tr1	type 1 regulatory T cell
Treg	regulatory T cell
TRIF	Toll/IL-1R homology domain-containing adaptor inducing IFN- $\gamma$
TSLP	thymic stromal lymphopoietin
Tween	polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate

## 緒論

近年のナノテクノロジーの発展に伴い、少なくとも一次元の大きさが 1 nm~100 nm になるように製造された素材 (ナノマテリアル) の開発が盛んに行われている。ナノマテリアルは同一の原料で製造された従来までのサブミクロンサイズ以上 (100 nm 以上) の素材と比較して、組織浸透性、電気的性質および強度等の点において性質が異なることが報告されている[1-3]。そのためナノマテリアルは、従来までの大きなサイズの素材にはない有用機能を発揮し得ることから、次世代を担う新素材として注目されている。最近では医薬品分野においてもナノテクノロジーの活用が盛んであり、特に製剤技術への応用 (ナノ化製剤) が注目を集めている。医薬品をナノ化する目的として、主に以下の 2 点が挙げられる。

- ・ 有効成分の結晶をナノサイズに調製することによる溶解性、生物学的利用能の向上
- ・ ナノサイズのキャリアに有効成分を内包することによる生体内安定性や生体内分布の改善

これらの特性を利用することで、医薬品の有効性の向上および副作用の軽減等の効果が期待されている。ナノ化製剤として唯一承認を受けている AmBisome (大日本住友製薬) は、深在性真菌症治療薬の gold standard である Amphotericin B のリポソーム製剤で、原薬の有効性を維持したまま副作用を軽減することに成功している[4]。本剤は単層リポソーム構造を有し、投与後も血流中に遊離型 Amphotericin B をほとんど放出することなく、剤形を維持したまま感染組織に移行し効果を発揮する。また粒子径が小さいため (50-80 nm) 細網内皮系に取り込まれにくく、通常の毛細血管壁を通過せず臓器移行性は低いため長時間血中に滞留する等、薬物動態特性の改善が報告されている[5]。

このように今やナノマテリアルは人類に多大な恩恵をもたらす存在になりつつあるが、これらの実用化は十分な安全性が確認されないまま進展している。その要因として、ナノマテリアルが従来までのサブミクロンサイズ以上の粒子と分子組成的に同じであること、およびこれらの従来型粒子は消化管、鼻粘膜、皮膚からほとんど吸収されないためナノマテリアルも同様に吸収されないと以前は考えられていたことが挙げられている[1, 2]。

一方で近年、ナノマテリアルによって予期せぬ毒性が発現する可能性が懸念されている[6]。事実、遺伝子改変マウスを用いたがん原性試験においてカーボンナノチューブおよび酸化チタンといったナノマテリアルの発がんリスクが示唆される等、ヒトの健康を確保する上で軽視できない研究報告が相次いでいる[7-9]。特に、生体に取り込まれた異物排除の根幹を担う免疫担当細胞が、ナノマテリアルを異物として認識した際に、過剰反応や機能不全を起こす可能性が報告されており、ナノマテリアルが未知の免疫攪乱作用を呈する危険性が指摘されている[8, 9]。これらは、ナノマテリアルへの長期曝露、多量曝露が炎症性疾患や自己免疫疾患、あるいは感染症罹患率の増大等、予期せぬ毒性を引き起こす可能性

を示している。それ故、ナノマテリアルの安全性評価および安全なナノマテリアルの開発が急務となっているが、これらの安全性情報は未だ乏しいのが現状である。

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、制汗剤、ボディパウダー等の化粧品基材、歯磨き粉や歯の充填剤、さらには食品の固結防止、流動化剤等の食品添加物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[10, 11]。ナノシリカは食品中に最大 2%、化粧品に約 20% 配合されており、既に我々の生活に必須となっている。また従来使用されていた非晶質シリカは凝集しやすいため、実際の使用条件下ではサブミクロンサイズ以上であった。しかしながら粒子の微小化に伴い、使用感や透明性、吸湿性の向上等の様々な有用機能が付与できることから、この数年で更なる微小化および分散性の向上が加速度的に進展している。したがって、非晶質ナノシリカの環境中への流出や廃棄、非晶質ナノシリカ含有製品の使用により、生体が経口、経肺、経皮等、様々な経路で非晶質ナノシリカに、曝露される機会が増加していくと考えられる。これまでに非晶質シリカの体内動態評価として、従来型のサブミクロンサイズの非晶質シリカは、皮膚に塗布しても吸収されなかったのに対して、皮膚に塗布した非晶質ナノシリカは角質層を通過し、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[12]。以上のことから、体内に吸収された非晶質ナノシリカの免疫系へ影響を及ぼす可能性が示唆されている。このような背景の下、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。

まず、非晶質ナノシリカのアジュバント効果について検討した。近年、アレルギー性疾患の増加が社会問題となっており[13]、その要因の 1 つとして、生活環境における化学物質の増加が挙げられる。特に産業の発達とともに産出されてきた様々な微小粒子状物質（ナノ粒子、ディーゼル排気微粒子、黄砂等の砂塵、工場からの煤塵等）の関与が示唆されている。粒子状物質はアレルゲンとは異なり、それ自体は抗原性を有さないが、抗原とともに感作することで、その抗原に対する免疫応答を増強させる効果（アジュバント効果）を示す。興味深いことに、粒子状物質の多くが好酸球の活性化、IgE 産生を誘導する Th2 型免疫反応を活性化する特性を有しており、このようなアジュバントは特に Th2 アジュバントと呼ばれる。粒子状物質がどのような機序で免疫系を活性化し、Th2 型免疫反応を誘導するのかについては明らかにされていないが、多くの粒子状物質が類似した Th2 アジュバント効果を発揮することが報告されていることから、粒子状物質に共通する免疫活性化機構が存在することが示唆されている。これら粒子アジュバントの多くは 1  $\mu\text{m}$  以下の物質であり、抗原吸着能を有することを特徴としている。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と考えられる。他方で、アジュバント効果を有する物質の作用機序解明は、より効率的なワクチンアジュバントの開発、および環境因子によって引き起こされるアレルギー性疾患に対する新しい治療法の開発を可能とする。最近の自然免疫研究の進展

とともに種々のアジュバントによる自然免疫の活性化機構およびそれに続く獲得免疫の誘導機構が徐々に明らかになってきている。以上のように、アジュバントはワクチンアジュバントとして医療分野で有用である一方、環境中に存在する粒子状物質はアレルギー性疾患の憎悪因子としてその影響が懸念されている。粒子アジュバントの作用機序を明らかにすることは、次世代ワクチンアジュバントの開発のみならず、環境因子によって引き起こされるアレルギー性疾患に対する新しい治療法へと繋がる可能性がある。

本研究では非晶質ナノシリカの有するアジュバント効果の機序解明を目的として、抗原および非晶質ナノシリカ曝露後に脾臓細胞によって産生されるサイトカインを測定することで免疫応答への影響を精査した。免疫応答は大きく自然免疫および獲得免疫に分けられ、様々な免疫担当細胞が外来病原体を排除するため活性化し、協調して機能する。CD4 陽性 T 細胞は Th 細胞と呼ばれ、獲得免疫における中心的な役割を果たす。Th 細胞の機能には、B 細胞の抗体産生およびクラススイッチの促進、活性化した CD8 陽性 T 細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球等のエフェクター細胞の遊走等がある[14]。Th 細胞は大きく Th1 および Th2 の二つに分類され、それぞれ異なるサイトカインを分泌する[15]。Th1 細胞は IL-2, IFN- $\gamma$ 等のサイトカイン (Th1 サイトカイン) を分泌し、細胞傷害性 T 細胞を活性化して、細胞障害を誘導するとともにマクロファージを活性化して遅延型過敏反応等を促進する。すなわち Th1 細胞は主にウイルス感染等の細胞内感染防御および抗腫瘍免疫反応に関与する Th 細胞である。一方、Th2 細胞は IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 等のサイトカイン (Th2 サイトカイン) を産生することにより、IgG1, IgE 抗体のクラススイッチを誘導し、抗体産生を制御している。特に IL-4 は B 細胞に働いてクラススイッチを誘導することにより、IgG1, IgE クラスの抗体産生を引き起こす。IL-5 は好酸球の増殖を制御し、寄生虫感染に対する防御に重要な役割を果たしている。IgE 抗体は肥満細胞上の受容体と会合して、抗原刺激を介し、アレルギー反応のエフェクターとして働く。このことから、Th2 サイトカインの多くはアレルギー病態を形成するメディエーターであると考えられている。近年、Th17 が Th1, Th2 いずれにも属さない新たな Th 細胞サブセットとして同定された [16]。Th17 は自己免疫性関節炎、脳脊髄炎等の自己免疫疾患や感染症に関与する重要な T 細胞であると考えられている[17, 18]。Th17 によって産生される IL-17 は、様々な炎症性メディエーターを誘導することにより炎症を惹起し得るサイトカインであると考えられる[19]。例えば、接触過敏症、喘息、関節リウマチ等の炎症部分では IL-17 発現の亢進が認められる[20-22]。これら Th 免疫応答に環境因子、生理活性物質等が影響を及ぼす可能性がある。例えば、ディーゼル排気微粒子や環境ホルモンの一種であるビスフェノール A といった環境因子が免疫系、特に Th1 や Th2 のバランスに影響を与えるという報告がある[20, 23]。さらに生薬成分のシノメニンのような生理活性物質が Th1 および Th2 反応を抑制し、免疫系に影響を与えると考えられている[24]。それ故、医薬品から食品、環境化学物質に至るまで、免疫毒学的な評価の必要性は国内外を問わず益々高まっている。したがって、環境因子、生理活性物質等の Th 免疫応答に及ぼす影響について調査することは非常に重要であると考えられる。



そこで本研究では、非晶質ナノシリカのアジュバント効果を評価するため、マウスへの抗原卵白アルブミン (OVA) 免疫時に、非晶質ナノシリカを併用投与し、抗原特異的 IgG 産生および脾臓細胞増殖反応を測定した。さらに抗原と非晶質ナノシリカ曝露後の抗原特異的抗体サブクラスおよびサイトカインを測定することにより、非晶質ナノシリカの Th1, Th2, Th17 免疫系に与える影響について検討した。陽性対照としては、既に免疫賦活剤として汎用されている Alum を使用した。

次に、非晶質ナノシリカの経口免疫寛容誘導に対する影響について検討した。免疫系は自己と非自己を認識し、非自己 (異物) にのみ応答することで成立している (免疫寛容)[25]。一方で、食物等の非病原性異物抗原に常に曝されている腸管等の粘膜免疫系では、異物抗原への過剰な免疫応答を回避するため、抑制的免疫機構が存在する[26]。このように経口摂取された異物抗原に対して免疫応答が低下する現象は経口免疫寛容と呼ばれている。しかしながらその機序は未だ不明な点が多く、経口投与される抗原量によって誘導される寛容のタイプが異なると考えられている。低用量免疫寛容には、制御性 T 細胞 (Tr1, Th3, Treg 等) による抑制性サイトカイン (TGF- $\beta$ , IL-10) の産生が関与していると考えられている[27, 28]。これに対し高用量免疫寛容は、抗原特異的 T 細胞のアナジーおよびクローン除去が引き起こされることが報告されている[29]。またパイエル板や腸間膜リンパ節を選択的に欠損させたマウスを用いた解析から、これらが経口免疫寛容の誘導組織として関与していることが示されている[30]。

近年、経口投与された非晶質ナノシリカが、腸管バリアを通過することが報告された[31]。そのため食品添加物等に含まれる非晶質ナノシリカが経口摂取され、腸管免疫に影響を及ぼし、経口免疫寛容に影響を与える可能性がある。これまでも経口免疫寛容は環境因子、生理活性物質により影響を受けることが報告されている。例えばディーゼル排気微粒子は経口免疫寛容を破綻させ、食餌性タンパクおよび腸管共生細菌に対して過度の免疫応答を引き起こす可能性が示唆されている[32]。ひとたび経口免疫寛容が破綻すると、食物アレルギー、喘息等のアレルギー性疾患および関節リウマチ等の自己免疫疾患の発症に繋がる可能性がある。

そこで本研究では、経口免疫寛容誘導によって抑制される抗原特異的抗体産生、脾臓細胞増殖反応および Th1, Th2 細胞依存性サイトカイン産生に対する非晶質ナノシリカの影響について検討した。

# 本論

## 第1章 非晶質ナノシリカのアジュバント効果

我々の身近で利用されている非晶質ナノシリカの免疫系に与える影響についての解析は未だ不十分である。そこで非晶質ナノシリカの免疫系に対する影響について検討するため、マウスへの抗原免疫時に非晶質ナノシリカを併用し、抗原特異的 IgG 産生および脾臓細胞増殖反応に対する影響を調べた。さらに非晶質ナノシリカの Th1, Th2 および Th17 免疫系に与える影響について検討した。陽性対照としては、既に免疫賦活剤として汎用されている Alum を使用した。

### 第1節 非晶質シリカの物性評価

ナノマテリアルの粒子サイズが動態、安全性に影響を及ぼすことが近年報告されている。例えば、粒子サイズによって細胞内への取り込み経路、取り込み効率、細胞内への取り込み後の細胞応答が変化することが示唆されている[33–39]。そのため、ナノマテリアルの安全性評価を行うに当たり、試験条件における粒子サイズの測定を行うことは非常に重要である。そこでまず、本研究で用いた非晶質ナノシリカの平均粒子径について、動的光散乱法で測定した。

#### 1. 実験材料と方法

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。PBS (-) で 0.25 mg/mL (nSP30) , 0.5 mg/mL (nSP100, mSP1000) に希釈, ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE, Japan) で 5 分間超音波処理し, さらに 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後, 各シリカ粒子の平均粒子径を動的光散乱法で測定した。

#### 2. 結果

本研究で用いた各シリカ粒子の平均粒子径を動的光散乱法で測定した (表 1-1)。その結果, PBS (-) 中の粒子径は, メーカーのテクニカルデータシートに記載された一次粒子径とほぼ同等の値であった。そのためこれらの素材を用いることで, 粒子サイズが免疫系に与える影響に関する精度の高い情報が得られると考えられた。

表 1-1 非晶質シリカの粒子サイズ

	一次粒子径 (nm) <sup>a</sup>	PBS (-) 中の粒子径 (nm)
mSP1000	1000	1074 ± 29.8
nSP100	100	105 ± 3.1
nSP30	30	33 ± 2.6

データは mean ± SD (n=3) を示す

<sup>a</sup> メーカーのテクニカルデータシートに記載された情報

## 第2節 非晶質ナノシリカの用量依存的アジュバント効果

抗原卵白アルブミン (OVA) 免疫時に、粒子径 30 nm の非晶質ナノシリカ (0.3, 1, 3 mg/マウス) を投与し、非晶質ナノシリカのアジュバント効果について検討した。

### 1. 実験材料

- 1) 実験動物：8 週齢，SPF 雄性，BALB/cCr Slc マウス（日本エスエルシー株式会社）を用いた。
- 2) 試薬：非晶質ナノシリカは Micromod 社 (Micromod Partikeltechnologie GmbH, Germany) から購入した一次粒子サイズが 30 nm (nSP30) のものを使用した (表 1-2)。実験で用いた試薬と供給元を表 1-3 に示す。なお、非晶質ナノシリカは使用直前に ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE, Japan) で 5 分間超音波処理し、さらに 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後、粒子分散液の調製を行った。

表 1-2 非晶質ナノシリカ (30 nm) の特性

非晶質ナノシリカ	
濃度	25 mg/mL
形状	球形
密度	2.0 g/ccm
平均粒子径 (実測値)	33 nm

表 1-3 試薬

試薬名	供給元
ALP-anti-mouse IgG1	Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA)
ALP-anti-mouse IgG2a	Becton Dickinson and Company
Albumin, from chicken egg white, 5×crystalline (cal-OVA)	Merck Chemicals (Calbiochem®) (Darmstadt, Germany)
Albumin from chicken egg white, Grade V, minimum 98% agarose gel electrophoresis	Sigma-Aldrich Co. LLC. (St Louis, MO, USA)
Aluminium adjuvant (Alum)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Alkaline phosphatase conjugate anti-mouse IgG (Fc specific)	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Ammonium chloride (NH <sub>4</sub> Cl)	関東化学株式会社 (東京)
BCA Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc.

Casein	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich Co. LLC.
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinlation kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
Fetal bovine serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Horseradish peroxidase streptavidin	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA)
Hydrochloric acid	Sigma-Aldrich Co. LLC.
IgE, Murine clone LO-ME-3	MONOSAN (Uden, the Netherlands)
Methyl-[ <sup>3</sup> H]-thymidine	GEヘルスケア・ジャパン株式会社 (東京)
Mouse IFN-γ ELISA kit	Endogen, Inc. (Woburn, MA, USA)
Mouse IL-4 ELISA kit	Endogen, Inc.
Mouse IL-5 ELISA kit	Endogen, Inc.
Mouse IL-10 ELISA kit	Endogen, Inc.
Mouse IL-13 ELISA kit	Endogen, Inc.
Mouse IL-17 Quantikine ELISA kit	R&D System Inc. (Minneapolis, MN, USA)
2-Amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol (Tris aminomethane)	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Sulfuric acid	Sigma-Aldrich Co. LLC.
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Co. LLC.
1-Step™ Ultra TMB-ELISA	Thermo Fisher Scientific Inc.
Penicillin-streptomycin	Life Technologies Co. (Carlsbad, CA, USA)
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
RPMI1640	Sigma-Aldrich Co. LLC.
SEPACLEAN A-5 tubes	栄研化学株式会社 (東京)
Super Blocking® Buffer	関東化学株式会社
ダルベッコPBS (-)	日水製薬株式会社 (東京)
マイクロシンチ20	Perkin Elmer Inc. (Waltham, MA, USA)

## 2. 試薬調製

- 1) Tris-NH<sub>4</sub>Cl : 3.735 g NH<sub>4</sub>Cl と 1.030 g Tris aminomethane を高圧蒸気滅菌水に溶解し、hydrochloric acid で pH 7.2 に調製した後、さらに高圧蒸気滅菌水を添加して 500 mL とし、0.22 μm フィルターを用いて濾過滅菌し調製した。
- 2) ELISA blocking solution : 1 g casein を 100 mL PBS (-) に溶解した。
- 3) tPBS : 0.5 mL Tween と 1L PBS (-) を混合した。
- 4) RPMI (+) : FBS を 56°C, 30 分間加熱処理することによって非動化した。非動化した FBS は 0.22 μm フィルターを用いて濾過滅菌した。12 mL RPMI1640 に 4 μL 2-mercaptoethanol を添加し、2-ME sol. (w) を作製した。500 mL RPMI1640 に 55 mL 非動化 FBS, 5.5 mL penicillin-streptomycin および 5.5 mL 2-ME sol. (w) を添加した。
- 5) OVA-biotin : 2 mg OVA を 1 mL PBS (-) に溶解し、44.4 μL 10 mM EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin を添加し、転倒混和後、室温で 30 分間反応させた。Zeba™ Desalt Spin Column (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて蛋白と未反応の EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin を分離した。回収した溶液は、BCA Protein Assay Reagent を用いてタンパク濃度を定量した。作製した OVA-biotin は 1.356 mg/mL であり、小分け分注し -20°C で保存した。

## 3. 実験方法

### 3-1 動物管理

本実験は塩野義製薬株式会社開発研究所の飼育域で行った。さらに動物実験に関する指針を遵守し、動物愛護にも配慮し、社内動物実験適正運用委員会の承認を得て実験を行った。設定温度 23°C, 設定湿度 50%, 換気回数 1 時間当たり 10 回以上, 12 時間照明 (8:00 ~ 20:00) に調節された一般飼育域で飼育した。検疫飼育期間のケージはアルミケージ (W400×D500×H200 mm), 馴化および実験飼育期間のケージはクリーンケージ (W262×D425×H150 mm) を使用した。床敷はペパークリーン (日本エスエルシー株式会社) を使用した。検疫飼育期間の収容密度は 5~15 匹/ケージ, 馴化および実験飼育期間の収容密度は 5 匹/ケージとした。餌は固形飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母株式会社) を自由摂取させた。飲水はフィルター (孔径 30 および 3 μm) で濾過し、殺菌灯照射した豊中市上水を給水瓶で自由摂取させた。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。実験には検疫飼育の結果, 一般状態に異常が認められなかった動物を用いた。検疫期間終了後, 1 週間の馴化飼育を実施した。ランダムに 1 群 5 匹として各群に配分し, 耳パンチにより各ケージ内のマウスに対して, No.1-5 までの個体識別を実施した。投与開始 3 日前から解剖日まで適宜体重測定を実施した。

### 3-2 免疫および非晶質ナノシリカの投与

投与群としては以下の 7 群を設定した (表 1-4)。1 群当たり 5 匹のマウスを用いた。

各々の投与物質は投与前に転倒混和し、十分に均一になった後、腹腔内投与した。陽性対照群は、0.25 mLのアジュバント効果を有する Alum (10 mg) と 0.25 mL の OVA (0.4 mg/mL) を混合し、スターラーで 30 分以上攪拌した後、投与した。投与の際、1 mL 注射筒および 22G 注射針 (テルモ) を用いた。非晶質ナノシリカの投与用量は、酸化亜鉛 (ナノマテリアル) においてアジュバント効果が認められた用量を設定した[40]。非晶質ナノシリカは粒子径 30 nm (Micromod 社) を使用した。

表 1-4 群構成

群	免疫抗原	抗原量 (mg)	抗原との併用物質	併用物質量 (mg)	動物数
1	PBS (-)	-	PBS (-)	-	5
2	PBS (-)	-	非晶質ナノシリカ	3	5
3	OVA	0.1	PBS (-)	-	5
4	OVA	0.1	非晶質ナノシリカ	0.3	5
5	OVA	0.1	非晶質ナノシリカ	1	5
6	OVA	0.1	非晶質ナノシリカ	3	5
7	OVA	0.1	陽性対照 (Alum)	10	5

### 3-3 抗 OVA 抗体の測定

OVA 免疫後 21 日にイソフルラン麻酔下で、心臓から全採血を実施した。採取した血液を SEPACLEAN A-5 tubes に注入し 4°C で遠心した。遠心により分離した血清を回収後、測定日まで -20°C にて保存した。

血清中の抗 OVA IgG, IgG1, IgG2a および IgE を、ELISA 法によって測定した。血清中の抗 OVA IgG, IgG1, IgG2a を測定する場合は、96 穴平底マイクロプレート (Corning) に、PBS (-) で溶解した OVA 溶液 (100 µg/mL) を 100 µL/well 添加し、4°C で一晩静置することによってコーティングを行ったものを用いた。上記プレートを PBS (-) で 2 回洗浄し、ELISA blocking solution を 200 µL/well 添加し、37°C 恒温器内で 1 時間静置した。その後、tPBS で 3 回洗浄し、tPBS で希釈した被験血清 (IgG および IgG1 検出時：10000 倍、IgG2a 検出時：50 倍) を 100 µL 添加し 37°C 恒温器内で 1 時間静置した。続いて tPBS で 3 回洗浄し、tPBS で 1000 倍に希釈した alkaline phosphatase conjugate anti-mouse IgG, ALP anti-mouse IgG1, 又は ALP anti-mouse IgG2a をそれぞれ 100 µL/well 添加し、37°C 恒温器内で 1 時間静置した。プレートを tPBS で 4 回洗浄後、3 mM p-nitrophenyl phosphate を 100 µL/well 添加し、405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて測定した。

血清中の抗 OVA IgE を測定する場合は、96 穴平底マイクロプレート (Corning) に 10 µg/mL の IgE, murine clone LO-ME-3 を 100 µL 添加し、4°C で一晩静置することによってコーティングを行った。Super Blocking<sup>®</sup> Buffer を 300 µL 添加し、添加後すぐにプレートを逆さにして溶液を取り除く操作を 2 回繰り返した。その後、tPBS で 5 倍希釈した被験血清を

100  $\mu$ L 添加し, 37°C 恒温器内で 1 時間静置した. 次に tPBS で 3 回洗浄し, tPBS で希釈した OVA-biotin を 0.1  $\mu$ g/100  $\mu$ L/well 添加し, 37°C 恒温器内で 1 時間静置した. プレートを tPBS で 3 回洗浄後, tPBS で希釈した HRP 標識ストレプトアビジンを 0.1  $\mu$ g/100  $\mu$ L/well 添加し, 37°C 恒温器内で 1 時間静置した. プレートを tPBS で 4 回洗浄後, 1-Step™ Ultra TMB-ELISA を 100  $\mu$ L 添加した. 発色後, sulfuric acid (3N) を 50  $\mu$ L 添加して反応を停止し, 450nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて測定した.

### 3-4 サイトカインの測定

OVA 免疫後 21 日にマウスの脾臓を摘出し, RPMI (+) (5mL) が入った氷冷下の 50 mL チューブ (Falcon) に回収した. その際, 各群の 5 匹分の脾臓を 1 つのチューブにプールした. それらを 60 mm/Non-treated dish (IWAKI) 内のセルストレーナー (Falcon) 上に移した. 5 mL 注射筒 (テルモ) のピストンを用いて脾臓をセルストレーナーに押し付けて潰し, 細胞を分散させた. 再度セルストレーナーを通して細胞を回収し, RPMI (+) で洗浄した. Tris-NH<sub>4</sub>Cl を 12 mL 添加して懸濁し, 赤血球を除去した. さらに 3 回 RPMI (+) で洗浄し, トリパンブルーを用いて生細胞数を数え  $6 \times 10^6$  cells/mL になるように RPMI (+) で懸濁した. 再度, 生細胞数を数え, さらに RPMI (+) で希釈することにより細胞数を  $5 \times 10^6$  cells/mL に調製した. この細胞懸濁液を 24 well plate (NUNC) に 1 mL/well で各群 12 well ずつ播種し, 3 well ずつに, Albumin, from chicken egg white, 5×crystalline (cal-OVA) を 0, 20, 100, 500  $\mu$ g/mL になるよう添加し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した. 4 日後に培養液を回収し, 270×g で 5 分間遠心し, その上清をサイトカイン測定資料とした. 測定試料中の IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 は ELISA kit (Endogen, Inc.) を用いて測定した. 同様に IL-17 も ELISA kit (R&D System, Inc.) を用いて測定した.

### 3-5 脾臓細胞増殖反応

3-4 のサイトカイン測定に調製した脾臓細胞懸濁液の一部を細胞増殖反応の検討に使用した.  $5 \times 10^6$  cells/mL の脾臓細胞懸濁液を 96 well plate (NUNC) に 0.1 mL/well で各群 6 well ずつ播種し, 3 well ずつに, cal-OVA を 0, 500  $\mu$ g/mL になるよう添加し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した. 2 日後に methyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine (37 kBq/10  $\mu$ L/well) を添加し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下でさらに一晩培養後, セルハーベスター (Perkin Elmer) を用いて, 培養した細胞をガラス繊維フィルターである Unifilter GF/C (Perkin Elmer) に回収した. シンチレーションカウンター (Perkin Elmer) を用いて標識化したチミジンから発せられる放射活性を測定することにより, DNA 合成 (脾臓細胞増殖反応) を定量化した.

### 3-6 統計解析

Day 21 の体重データは, PBS (-) 投与群と比較して一元配置分散分析で有意差を検定し Dunnett's の多重比較検定法を実施した. 抗 OVA IgG, IgG1, IgG2a および IgE 産生の解析は,



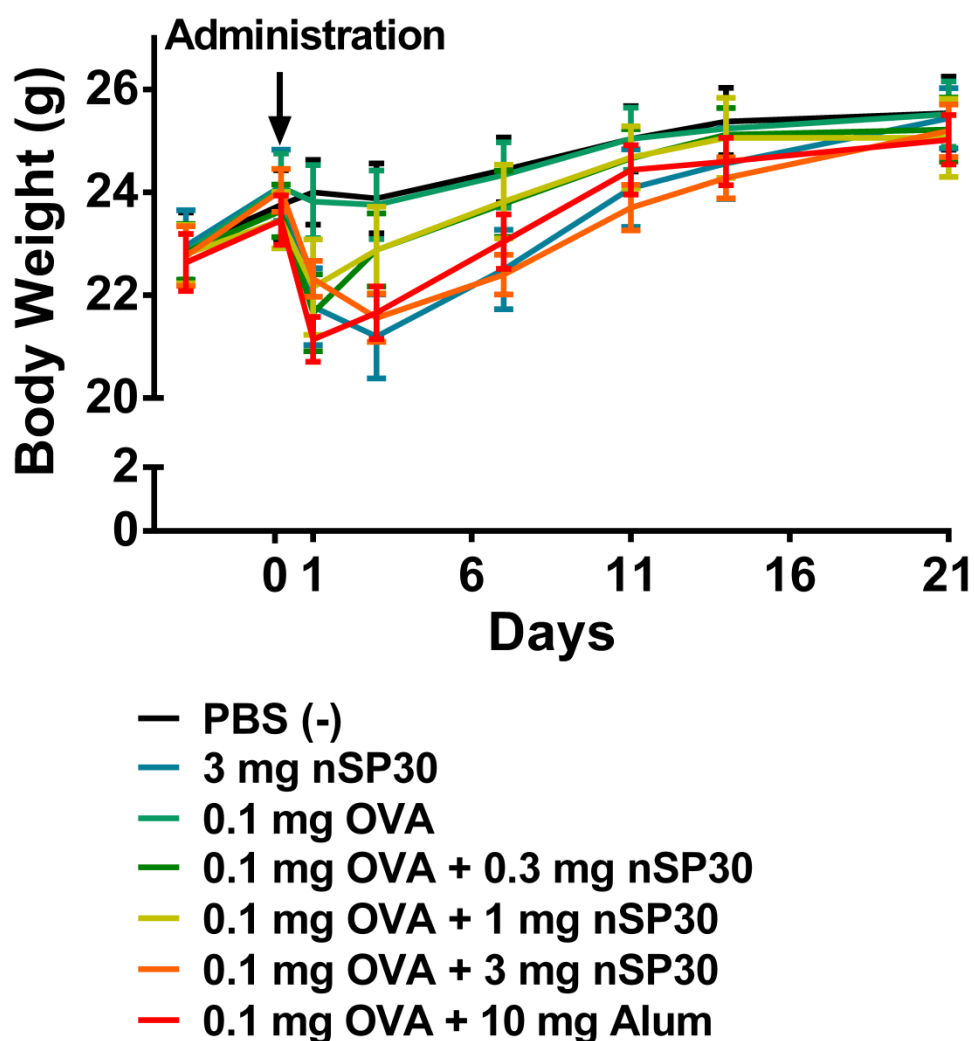
OVA/PBS (-) 投与群と比較して一元配置分散分析で有意差を検定し Dunnett's の多重比較検定法を実施した。有意水準 5%未満を有意差ありとした。

#### 4. 結果

##### 4-1 非晶質ナノシリカ投与および免疫後の体重変化

OVA 免疫時 (day 0) に非晶質ナノシリカを併用投与したマウスの体重変化を図 1-1 に示した。非晶質ナノシリカ又は Alum 投与群では、一過性の体重減少が認められたが、血清採取および脾臓採取した day 21 では各群の体重に有意差は認められなかった。

図 1-1 非晶質ナノシリカ投与後および OVA 免疫後の体重変化

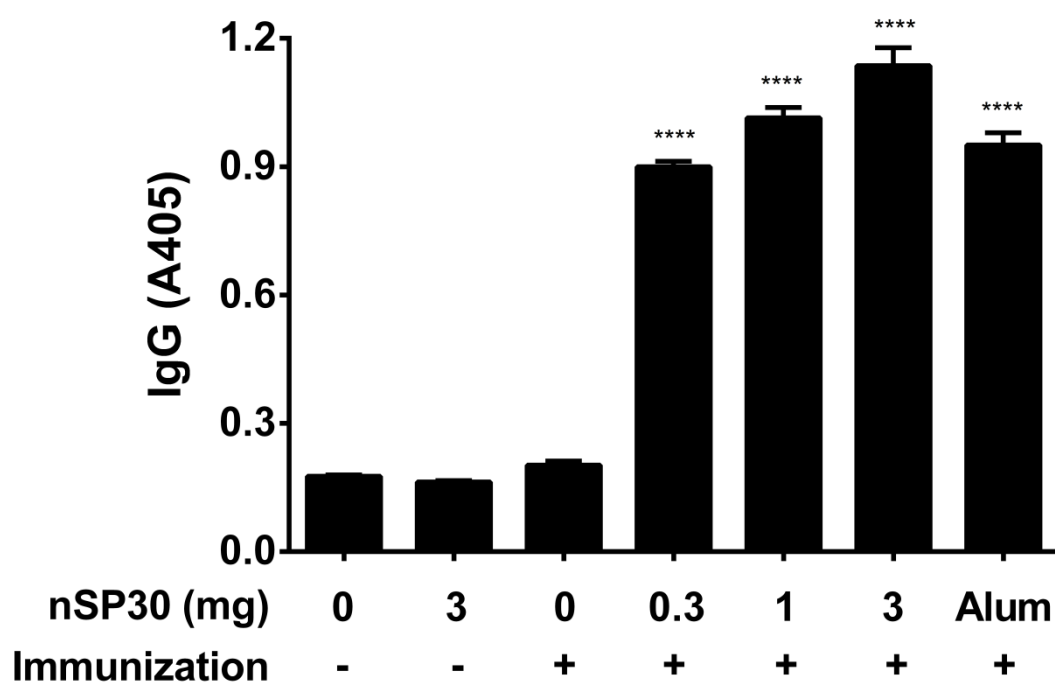


データは mean  $\pm$  SEM (n=5)を示す

#### 4-2 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgG 産生に対する効果

非晶質ナノシリカの抗原特異的抗体産生に与える影響について検討するため, day 21 における血清中の抗 OVA IgG を ELISA によって測定した (図 1-2). その結果, OVA 単独投与群と比較して, 非晶質ナノシリカ併用投与群 (0.3, 1, 3 mg), および陽性対照 Alum 併用投与群において有意な抗 OVA IgG 産生の増加が認められた. このことから, 非晶質ナノシリカは Alum と同様, 用量依存的に抗 OVA IgG 産生を増強することが示唆された.

図 1-2 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgG 産生に対する効果



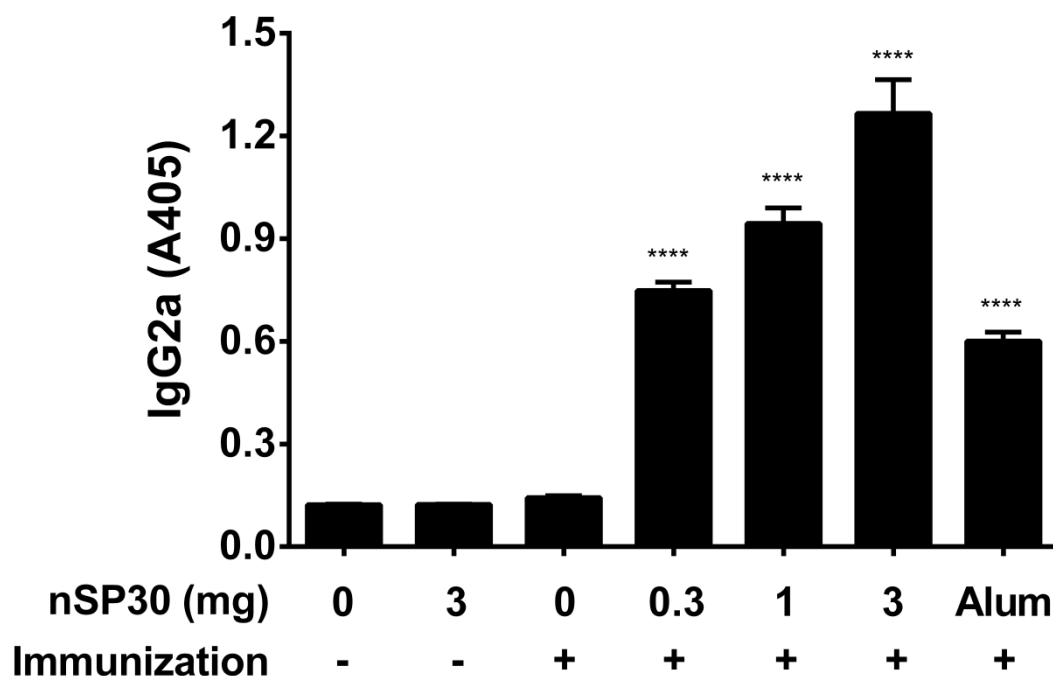
データは mean  $\pm$  SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

#### 4-3 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgG2a 産生に対する効果

IgG2a は Th1 細胞から産生される IFN- $\gamma$  の刺激により産生されるため、その産生は Th1 反応の指標となる。そこで、非晶質ナノシリカの Th1 反応に与える影響について検討するため、day 21 における血清中の抗 OVA IgG2a を ELISA によって測定した (図 1-3)。その結果、OVA 単独投与群と比較して、非晶質ナノシリカ併用投与群 (0.3, 1, 3 mg)、および陽性対照 Alum 併用投与群において有意な抗 OVA IgG2a 産生の増加が用量依存的に認められた。このことから、非晶質ナノシリカは Th1 反応を増強することが示唆された。

図 1-3 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgG2a 産生に対する効果



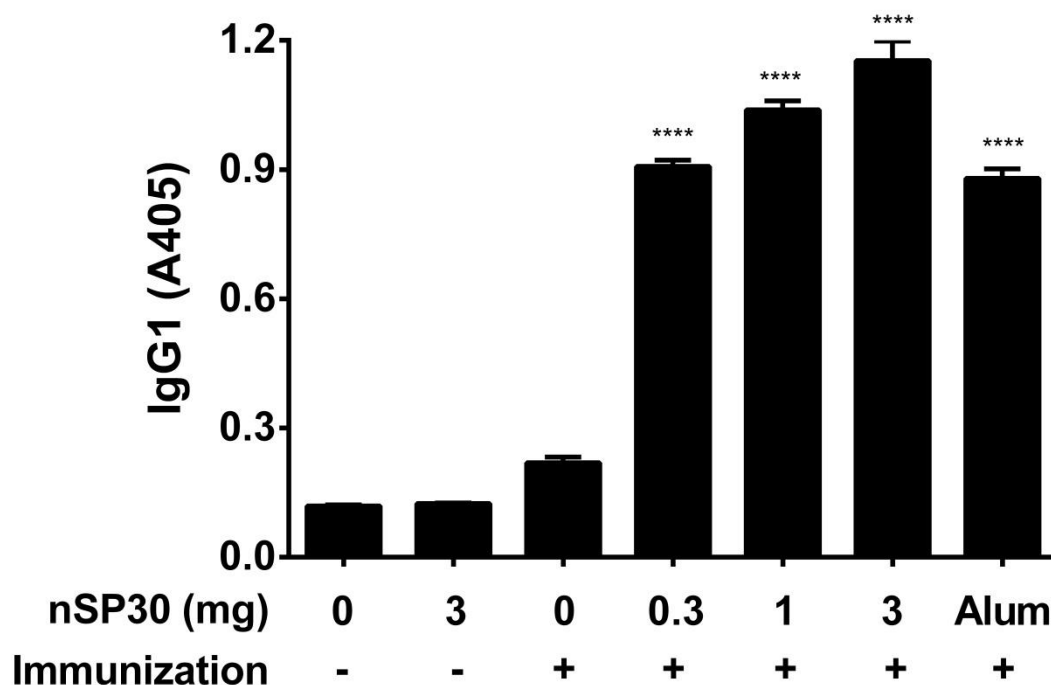
データは mean  $\pm$  SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

#### 4-4 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgG1 産生に対する効果

IgG1 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、その産生は Th2 反応の指標となる。そこで、非晶質ナノシリカの Th2 反応に与える影響について検討するため、day 21 における血清中の抗 OVA IgG1 を ELISA によって測定した (図 1-4)。その結果、OVA 単独投与群と比較して、非晶質ナノシリカ併用投与群 (0.3, 1, 3 mg)、および陽性対照 Alum 併用投与群において有意な抗 OVA IgG1 産生の増加が用量依存的に認められた。このことから、非晶質ナノシリカは Th2 反応を増強することが示唆された。

図 1-4 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgG1 産生に対する効果



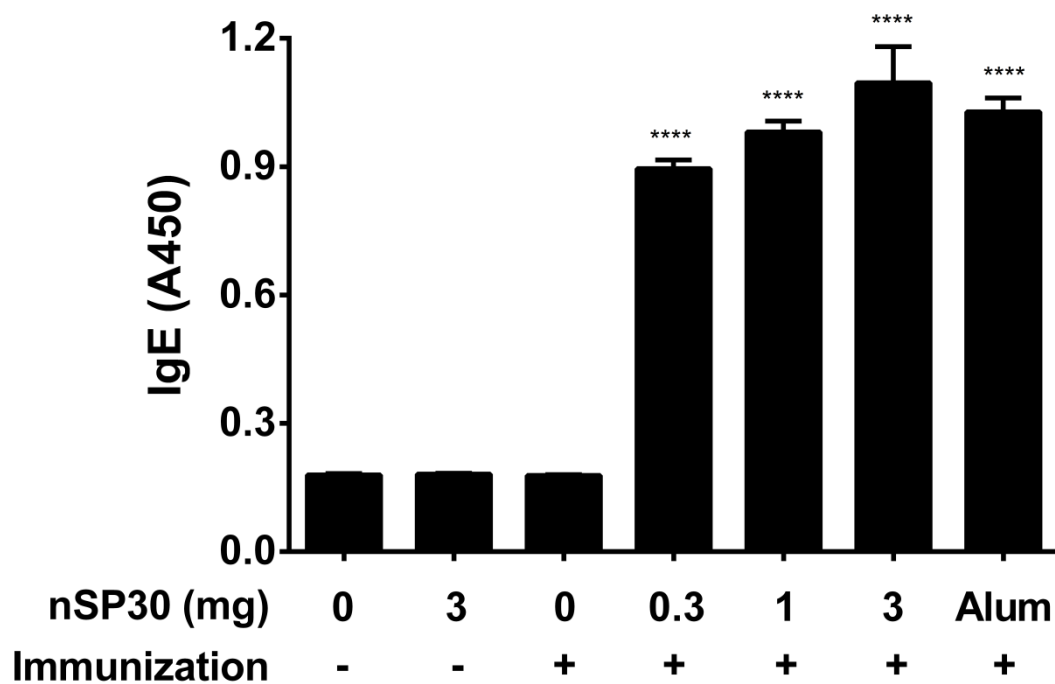
データは mean  $\pm$  SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

#### 4-5 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgE 産生に対する効果

IgE は、IgG1 と同様に、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、その産生は Th2 反応の指標となる。そこで、非晶質ナノシリカの Th2 反応に与える影響について検討するため、day 21における血清中の抗 OVA IgE を ELISA によって測定した (図 1-5)。その結果、OVA 単独投与群と比較して、非晶質ナノシリカ併用投与群 (0.3, 1, 3 mg)、および陽性対照 Alum 併用投与群において有意な抗 OVA IgE 産生の増加が用量依存的に認められた。このことから、非晶質ナノシリカは Th2 反応を増強することが本実験によっても示唆された。

図 1-5 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgE 産生に対する効果



データは mean  $\pm$  SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

#### 4-6 非晶質ナノシリカの脾臓細胞増殖反応に対する効果

OVA 免疫を行ったマウスの脾臓細胞を OVA 刺激すると、抗原特異的増殖反応が誘導される。そこで非晶質ナノシリカ (0.3, 1, 3 mg)の脾臓細胞増殖反応に対する効果について methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine を用いて検討した (表 1-5)。その結果、非晶質ナノシリカ投与群において投与用量依存的な OVA 特異的脾臓細胞増殖反応の促進が認められた。

表 1-5 非晶質ナノシリカの OVA 特異的脾臓細胞増殖反応に対する効果

非晶質ナノシリカ (mg/mouse)	増殖 (c.p.m./well)		
0 [PBS (-)]	438	±	22
0.3	13424	±	530
1	18765	±	641
3	20367	±	305

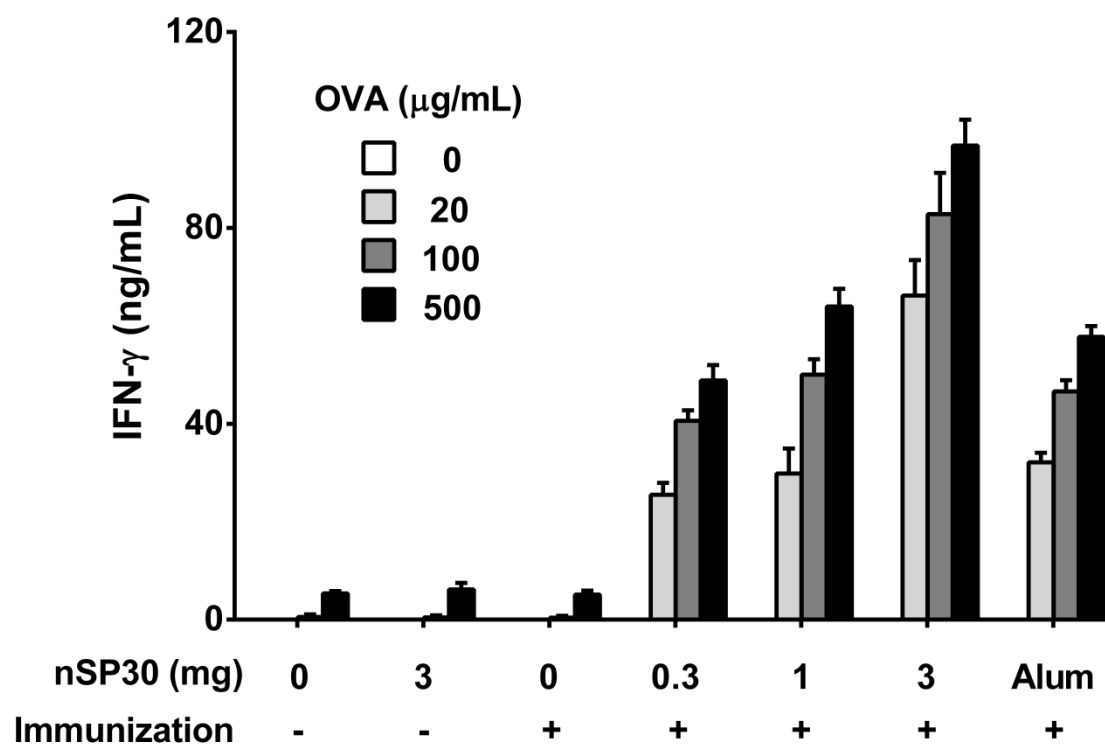
脾臓細胞 ( $5 \times 10^6$  cells/mL) を 2 日間培養後、methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine (37 kBq/10  $\mu$ L/well) を添加し一晩培養した細胞の放射活性。

データは mean  $\pm$  SEM (n=3)を示す

#### 4-7 非晶質ナノシリカの IFN- $\gamma$ 産生に対する効果

Th1 細胞は IFN- $\gamma$  を産生する。脾臓細胞によって分泌される IFN- $\gamma$  を測定し、非晶質ナノシリカの Th1 細胞の分化成熟に与える影響について検討した (図 1-6)。その結果、非晶質ナノシリカ併用投与によって IFN- $\gamma$  産生が促進した。このことから、非晶質ナノシリカは IgG2a の場合と同様、Th1 反応を増強することが示唆された。

図 1-6 非晶質ナノシリカの IFN- $\gamma$  産生に対する効果



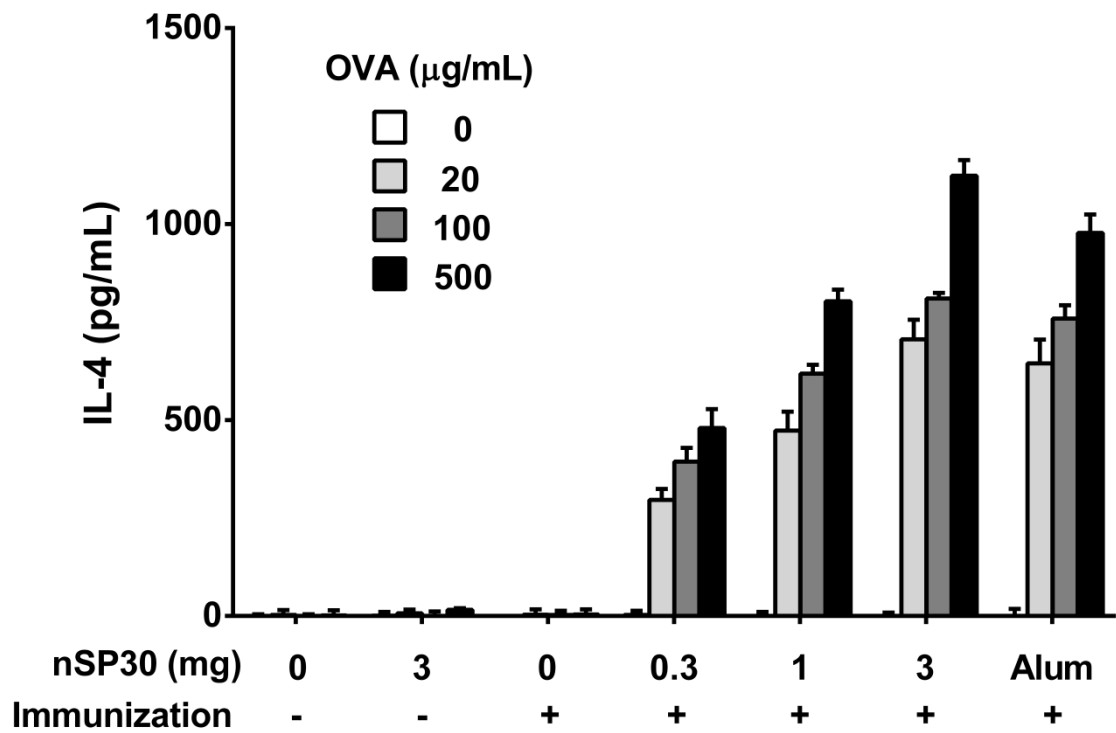
データは mean  $\pm$  SEM (n=3) を示す



4-8 非晶質ナノシリカの IL-4, IL-5, IL-10 および IL-13 産生に対する効果

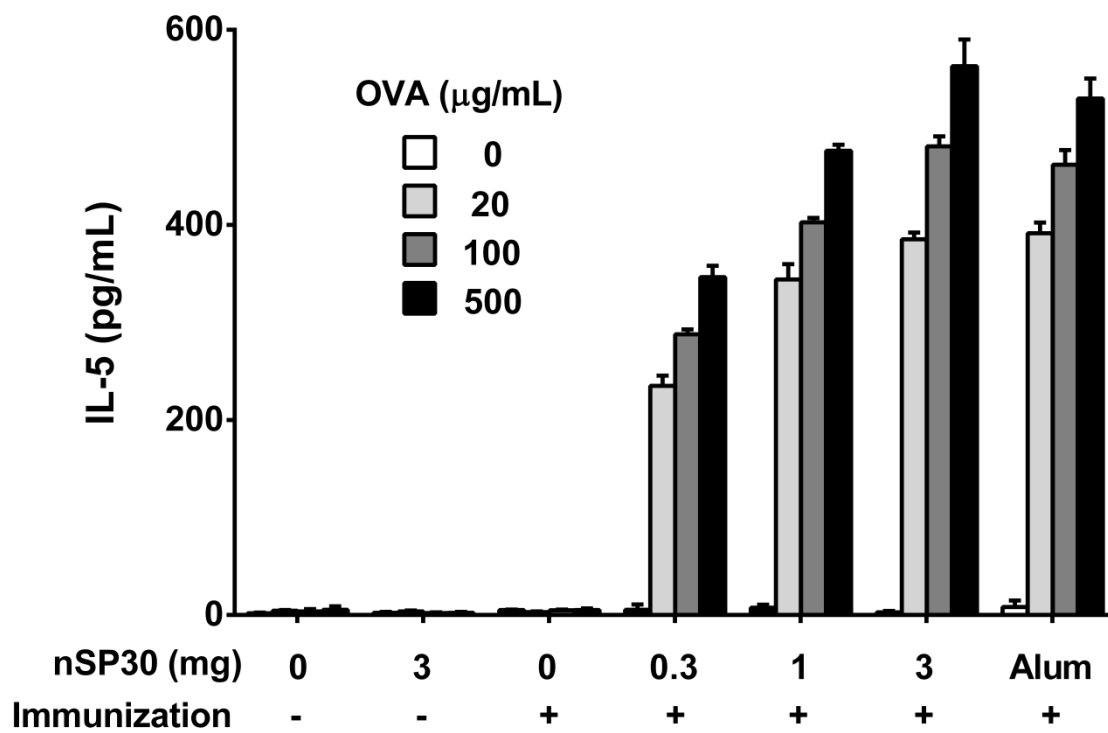
Th2 細胞は IL-4, IL-5, IL-10 および IL-13 等のサイトカインを産生する。脾臓細胞によって分泌される IL-4, IL-5, IL-10 および IL-13 を測定し、非晶質ナノシリカの Th2 細胞の分化成熟に与える影響について検討した (図 1-7~1-10)。その結果、非晶質ナノシリカ併用投与によって IL-4, IL-5, IL-10 および IL-13 産生が促進した。このことから、これまでの実験結果と同様に、非晶質ナノシリカは Th2 反応を増強すると考えられる。

図 1-7 非晶質ナノシリカの IL-4 産生に対する効果



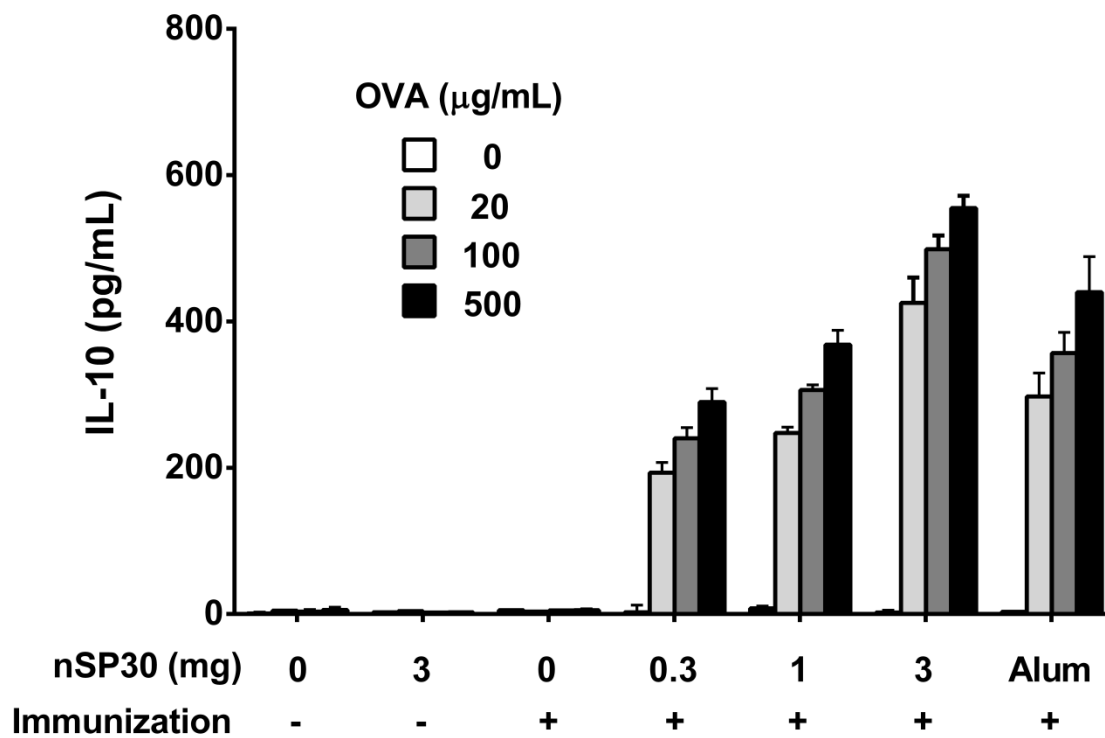
データは mean ± SEM (n=3)を示す

図 1-8 非晶質ナノシリカの IL-5 産生に対する効果



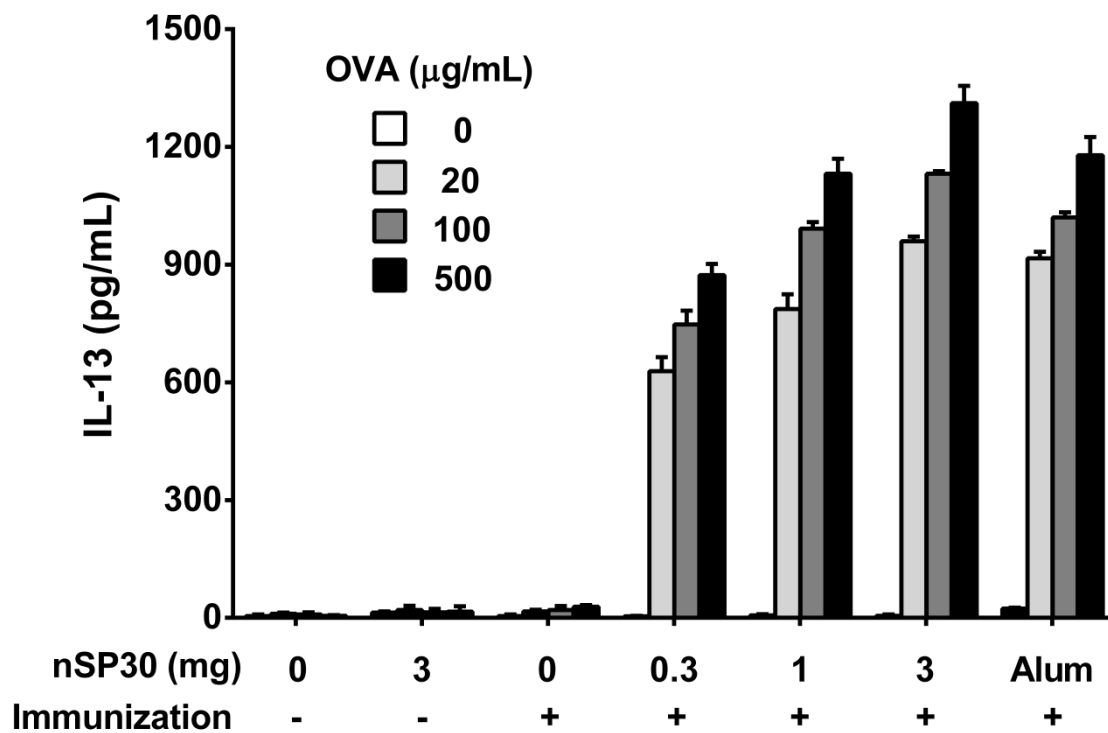
データは mean ± SEM (n=3)を示す

図 1-9 非晶質ナノシリカの IL-10 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=3)を示す

図 1-10 非晶質ナノシリカの IL-13 産生に対する効果

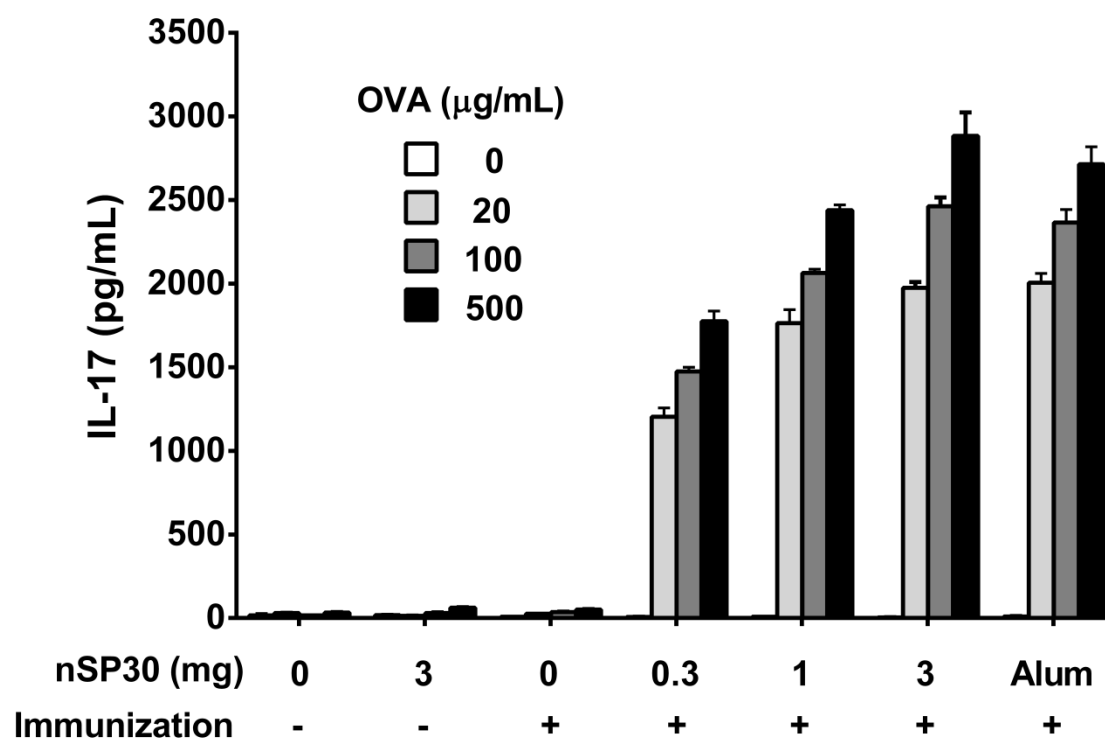


データは mean ± SEM (n=3)を示す

#### 4-9 非晶質ナノシリカの IL-17 産生に対する効果

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 Th17 細胞は IL-17 を産生する Th 細胞である。本研究では、非晶質ナノシリカの Th17 反応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 1-11)。その結果、免疫脾臓細胞への OVA 刺激により 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 1-11 非晶質ナノシリカの IL-17 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=3)を示す

### 第3節 アジュバント効果を示さない非晶質ナノシリカの用量に関する研究

非晶質ナノシリカの用量依存的なアジュバント効果について明らかにした第2節では、低用量 (0.3 mg/マウス) においても極めて強いアジュバント効果が認められた。このことから、OVA 抗原および非晶質ナノシリカ併用腹腔内投与時において、アジュバント効果が認められない用量を検討するため、さらに低用量 (3, 30, 300  $\mu$ g/マウス) で実験を実施した。

#### 1. 実験材料

- 1) 実験動物：8週齢，SPF 雄性，BALB/cCr Slc マウス（日本エスエルシー株式会社）を用いた。
- 2) 試薬：非晶質ナノシリカは Micromod 社から購入した（本章第2節の表 1-2）。Mouse IL-2 ELISA kit は Endogen, Inc.から購入した。また、その他の試薬は本章第2節の表 1-3 に示したものを、本章第2節 2.と同様に調製した。

#### 2. 実験方法

##### 2-1 動物管理

本実験は塩野義製薬株式会社開発研究所の飼育域で行い、社内動物実験適正運用委員会の承認を得て実験を行った（本章第2節の 3.3-1）。

##### 2-2 免疫および非晶質ナノシリカの投与

投与群としては以下の7群を設定した（表 1-6）。

各々の投与物質は投与前に転倒混和し、十分に均一になった後、腹腔内投与した。陽性対照群は、0.25 mL のアジュバント効果を有する Alum (10 mg) と 0.25 mL の OVA (0.4 mg/mL) を混合し、スターラーで 30 分以上攪拌した後、投与した。1 群当たり 5 匹のマウスを用いた。その際、1 mL 注射筒および 22G 注射針（テルモ）を用いた。非晶質ナノシリカは粒子径 30 nm (Micromod 社) を使用した。

表 1-6 群構成

群	免疫抗原	抗原量 (mg)	抗原との併用物質	併用物質 量 ( $\mu$ g)	動物数
1	PBS (-)	-	PBS (-)	-	5
2	PBS (-)	-	非晶質ナノシリカ	300	5
3	OVA	0.1	PBS (-)	-	5
4	OVA	0.1	非晶質ナノシリカ	3	5
5	OVA	0.1	非晶質ナノシリカ	30	5
6	OVA	0.1	非晶質ナノシリカ	300	5
7	OVA	0.1	陽性対照 (Alum)	10 mg	5

### 2-3 抗 OVA 抗体の測定

抗 OVA 抗体は本章第 2 節 3.3-3 に示した ELISA 法により測定した。

### 2-4 サイトカインの測定

脾臓細胞を OVA と培養することによって産生されるサイトカインは本章第 2 節 3.3-4 に示した ELISA 法により測定した。

### 2-5 脾臓細胞増殖反応

2-4 のサイトカイン測定に調製した脾臓細胞懸濁液の一部を細胞増殖反応の検討に使用した。  $5 \times 10^6$  cells/mL の脾臓細胞懸濁液を 96 well plate (NUNC) に 0.1 mL/well で各群 6 well ずつ播種し、3 well ずつに、cal-OVA を 0, 20, 100, 500  $\mu$ g/mL になるよう添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。その他は本章第 2 節 3.3-5 に示した手法により測定した。

### 2-6 統計解析

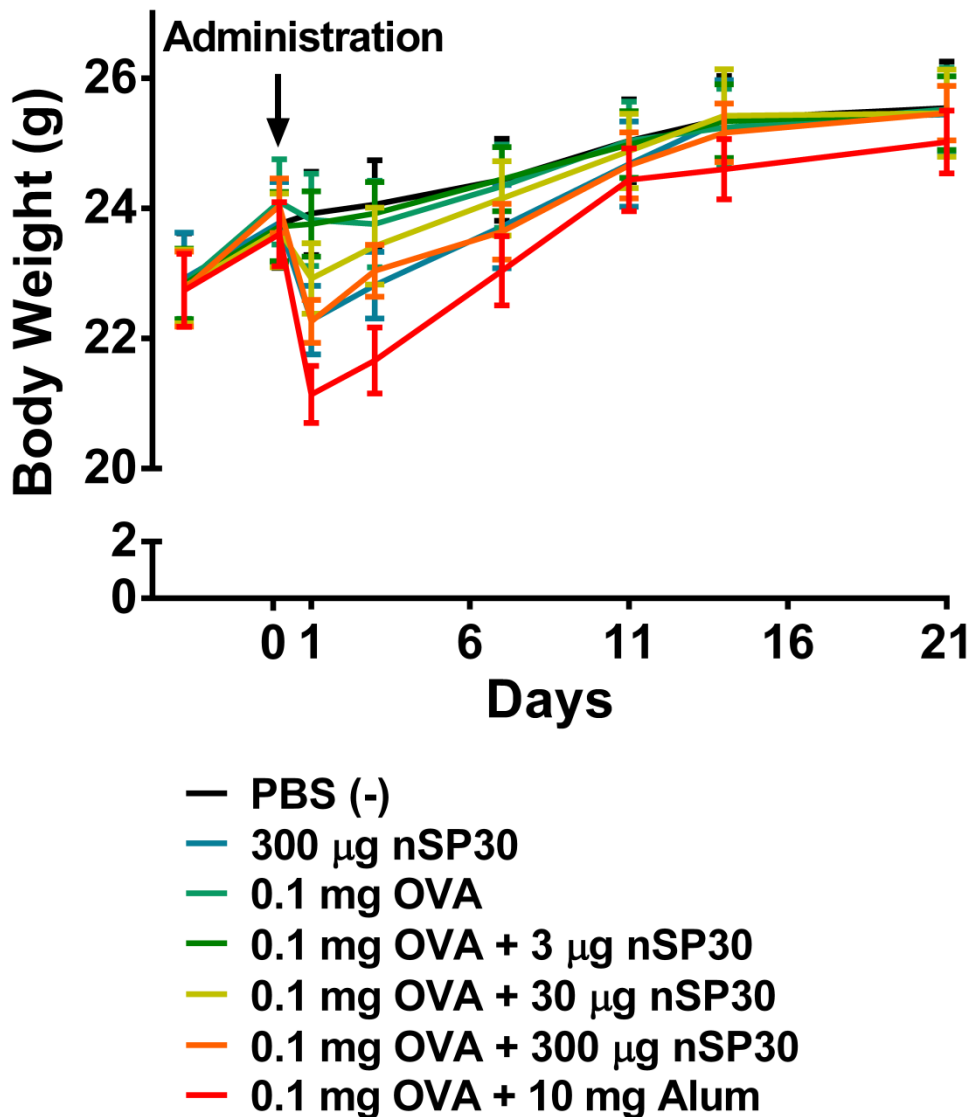
Day 21 の体重データは、PBS (-) 投与群と比較して一元配置分散分析で有意差を検定し Dunnett's の多重比較検定法を実施した。抗 OVA IgG, IgG1, IgG2a および IgE 産生の解析は、OVA/PBS (-) 投与群と比較して一元配置分散分析で有意差を検定し Dunnett's の多重比較検定法を実施した。有意水準 5%未満を有意差ありとした。

### 3. 結果

#### 3-1 非晶質ナノシリカ投与および免疫後の体重変化

OVA 免疫時 (day 0) に非晶質ナノシリカを併用投与したマウスの体重変化を図 1-12 に示した。非晶質ナノシリカ又は Alum 投与群では、一過性の体重減少が認められたが、血清採取および脾臓採取した day 21 では各群の体重に有意差は認められなかった。

図 1-12 非晶質ナノシリカ投与後および OVA 免疫後の体重変化



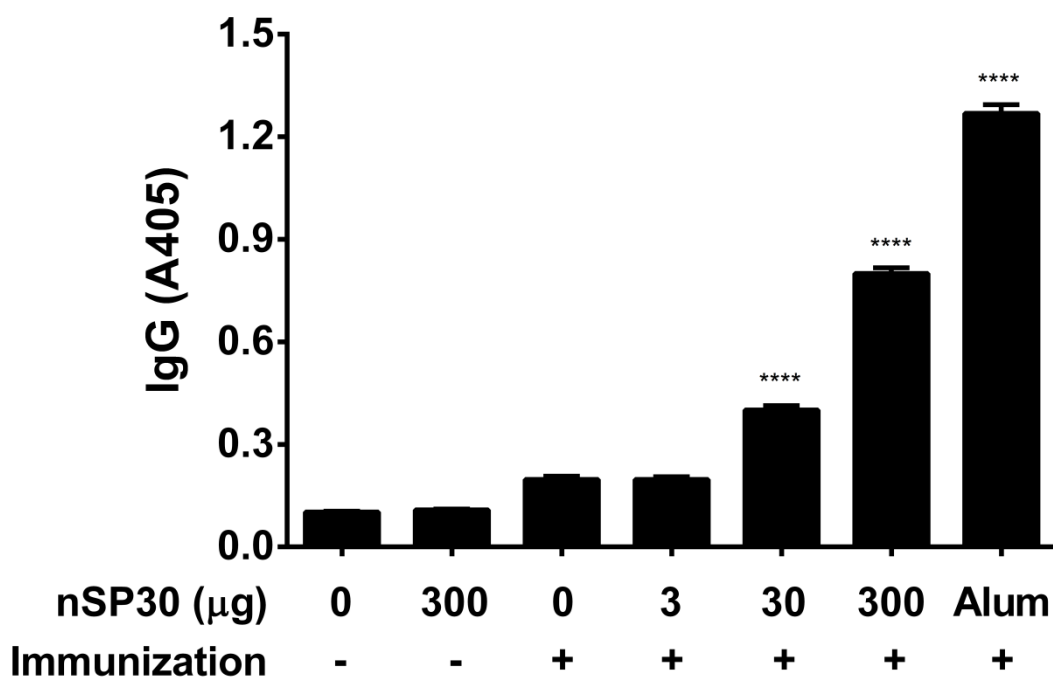
データは mean  $\pm$  SEM (n=5)を示す



### 3-2 非晶質ナノシリカの抗 OVA 抗体産生に対する効果

アジュバント効果を示さない非晶質ナノシリカ量について検討するため, 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 1-13~1-16). その結果, OVA 単独投与群と比較して, 非晶質ナノシリカ併用投与群 (30, 300  $\mu\text{g}$ ), および陽性対照 Alum 併用投与群において有意な抗 OVA IgG, IgG2a, IgG1, IgE 産生の増加が認められ, 本実験においても非晶質ナノシリカは Th1, Th2 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. 一方, 非晶質ナノシリカ併用投与群 (3  $\mu\text{g}$ ) では, OVA 単独投与群と比較して, 有意な変化は認められなかった. したがって, アジュバント効果を示す本ナノ粒子の最小量は 30  $\mu\text{g}$  であると考えられる.

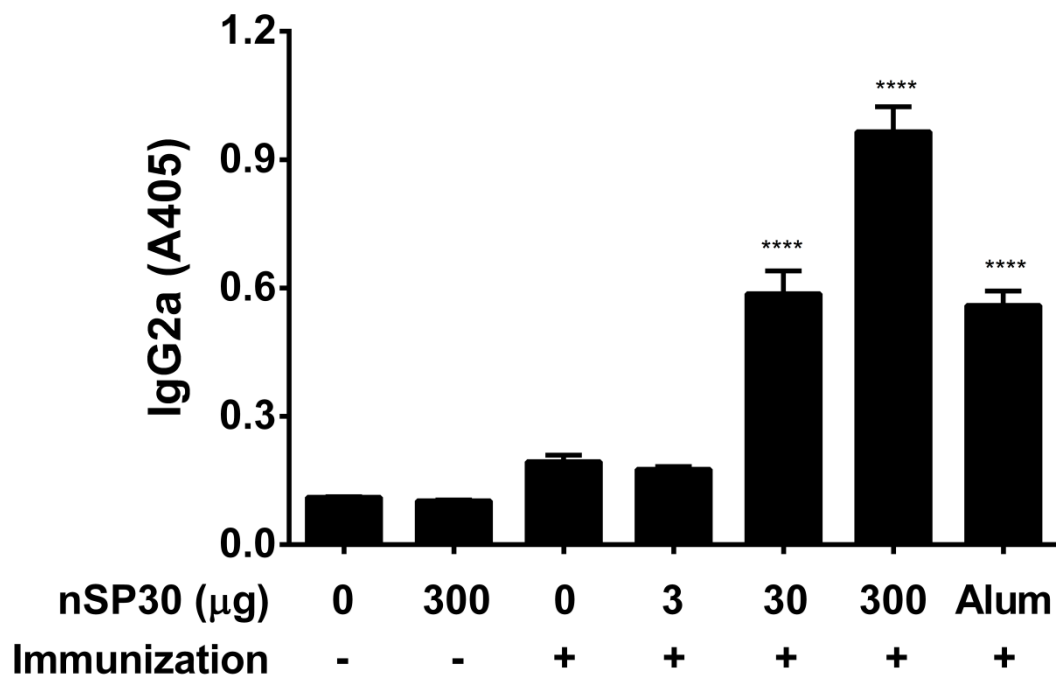
図 1-13 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgG 産生に対する効果



データは mean  $\pm$  SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

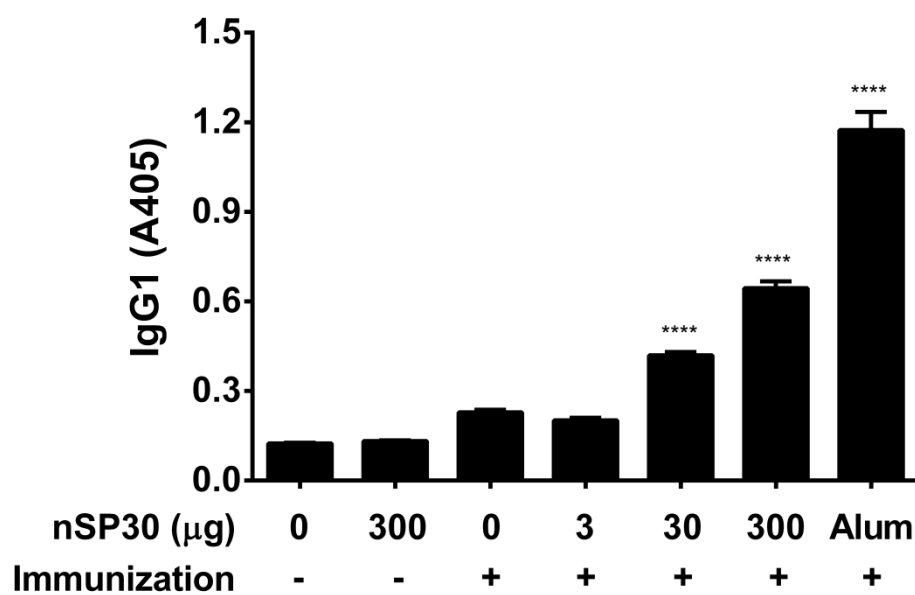
図 1-14 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgG2a 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

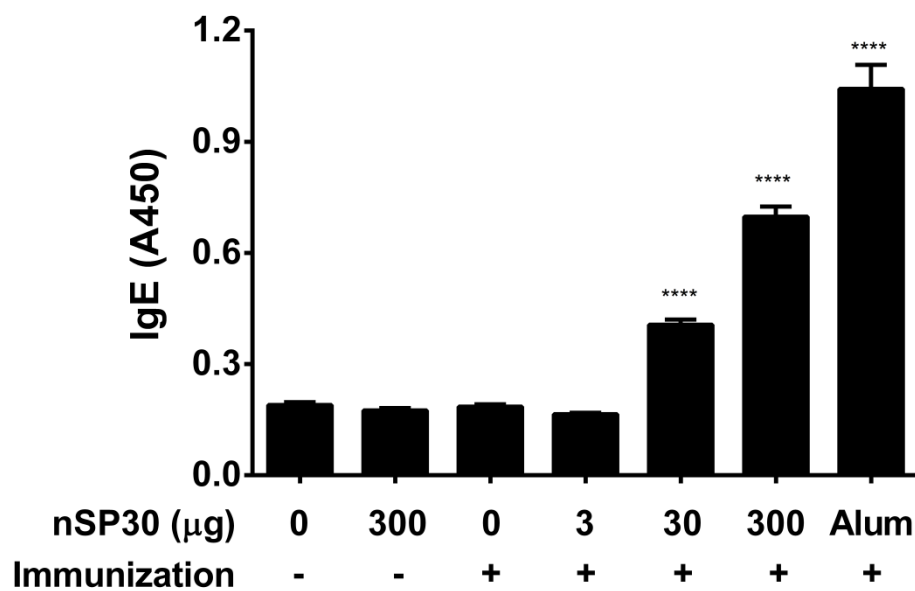
図 1-15 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgG1 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

図 1-16 非晶質ナノシリカの抗 OVA IgE 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

### 3-6 非晶質ナノシリカの脾臓細胞増殖反応に対する効果

非晶質ナノシリカ (3, 30, 300  $\mu\text{g}$ ) の脾臓細胞増殖反応に対する効果について検討した (表 1-7). その結果, OVA 単独投与群 (3 群) と比較して, OVA および非晶質ナノシリカ併用投与群 (5, 6 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. 一方で, 低用量 (4 群) の非晶質ナノシリカ併用投与群では, OVA 単独投与群と比較して有意な差は認められなかった.

表 1-7 非晶質ナノシリカ低用量の OVA 特異的脾臓細胞増殖反応に対する効果

群 <sup>1)</sup>	増殖 (c.p.m.) <sup>2)</sup>							
	OVA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )							
	0		20		100		500	
1	461	$\pm$ 39	488	$\pm$ 15	548	$\pm$ 37	594	$\pm$ 42
2	464	$\pm$ 38	435	$\pm$ 25	444	$\pm$ 34	542	$\pm$ 30
3	421	$\pm$ 49	843	$\pm$ 73	943	$\pm$ 87	1173	$\pm$ 114
4	631	$\pm$ 127	1108	$\pm$ 124	1386	$\pm$ 220	1896	$\pm$ 283
5	1174	$\pm$ 207	3143	$\pm$ 1078	8212	$\pm$ 1188	10783	$\pm$ 1649
6	1801	$\pm$ 220	6229	$\pm$ 862	12370	$\pm$ 1858	19544	$\pm$ 1928
7	1915	$\pm$ 230	14305	$\pm$ 636	20456	$\pm$ 608	28832	$\pm$ 510

1) 表 1-6 を参照

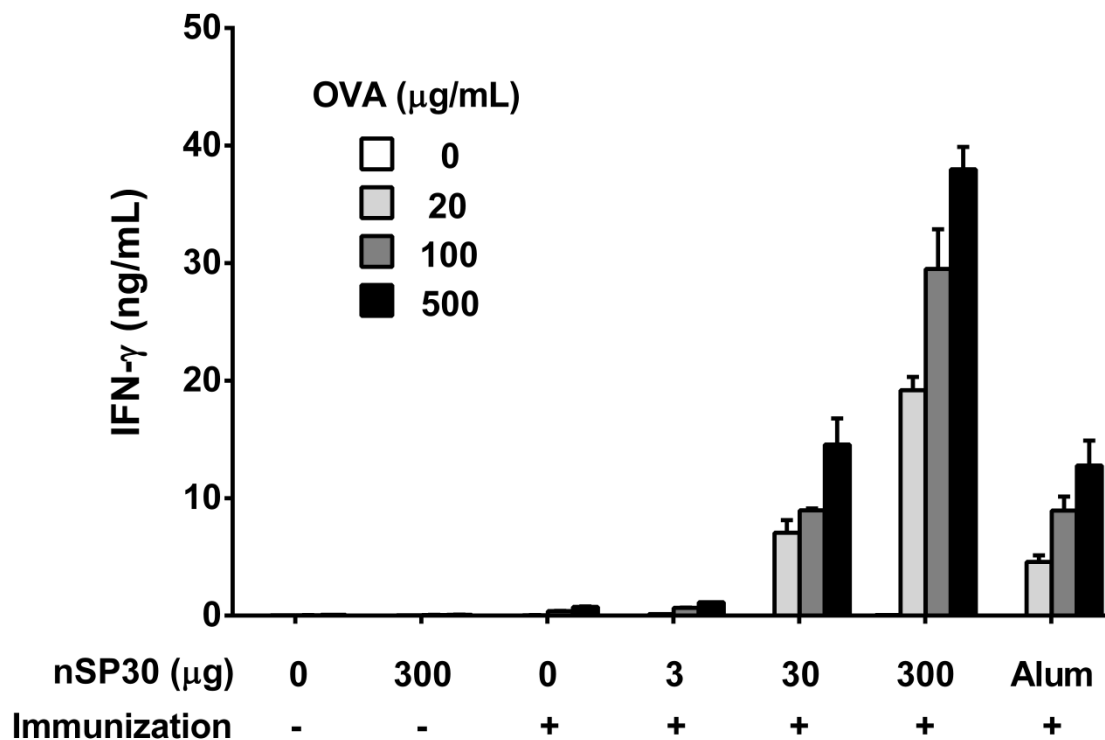
2) 脾臓細胞 ( $5 \times 10^6$  cells/mL) を 2 日間培養後, methyl- $^3\text{H}$ -thymidine (37 kBq/10  $\mu\text{L}/\text{well}$ ) を添加し一晚培養した細胞の放射活性.

データは mean  $\pm$  SEM (n=3)を示す

### 3-7 非晶質ナノシリカ低用量のサイトカイン産生に対する効果

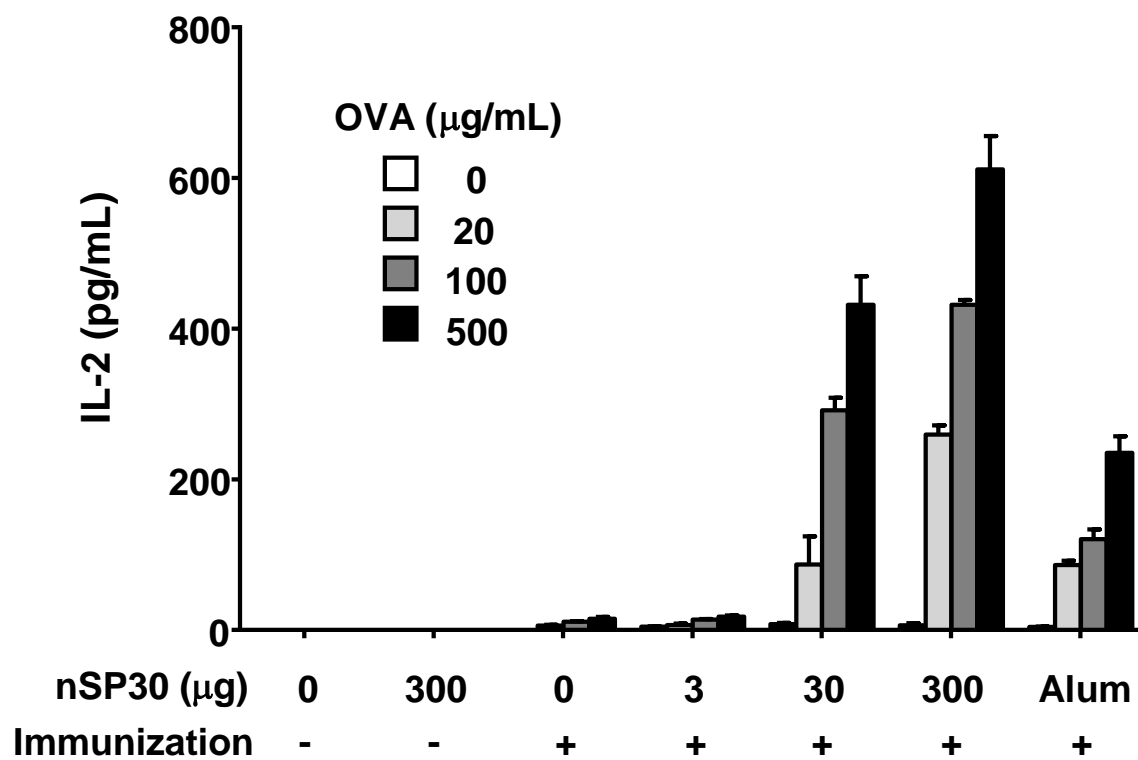
Th1 細胞の指標として IFN- $\gamma$ , IL-2, Th2 細胞の指標として IL-4, IL-5, IL-10, Th17 細胞の指標として IL-17 を測定し, 非晶質ナノシリカの Th 細胞の分化成熟に与える影響について検討した (図 1-17~1-22). その結果, OVA 単独投与群と比較して, OVA・非晶質ナノシリカ併用投与群 (30, 300  $\mu\text{g}$ ) において, 測定した全てのサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-17) 産生は促進され, これまでの実験結果と同様に, 非晶質ナノシリカによる特異的な Th 細胞の分化・誘導は認められなかった. 一方で, 非晶質ナノシリカ併用投与群 (3  $\mu\text{g}$ ) では, OVA 単独投与群と比較して, 測定した全てのサイトカイン産生において影響は認められなかった.

図 1-17 非晶質ナノシリカ低用量の IFN- $\gamma$ 産生に対する効果



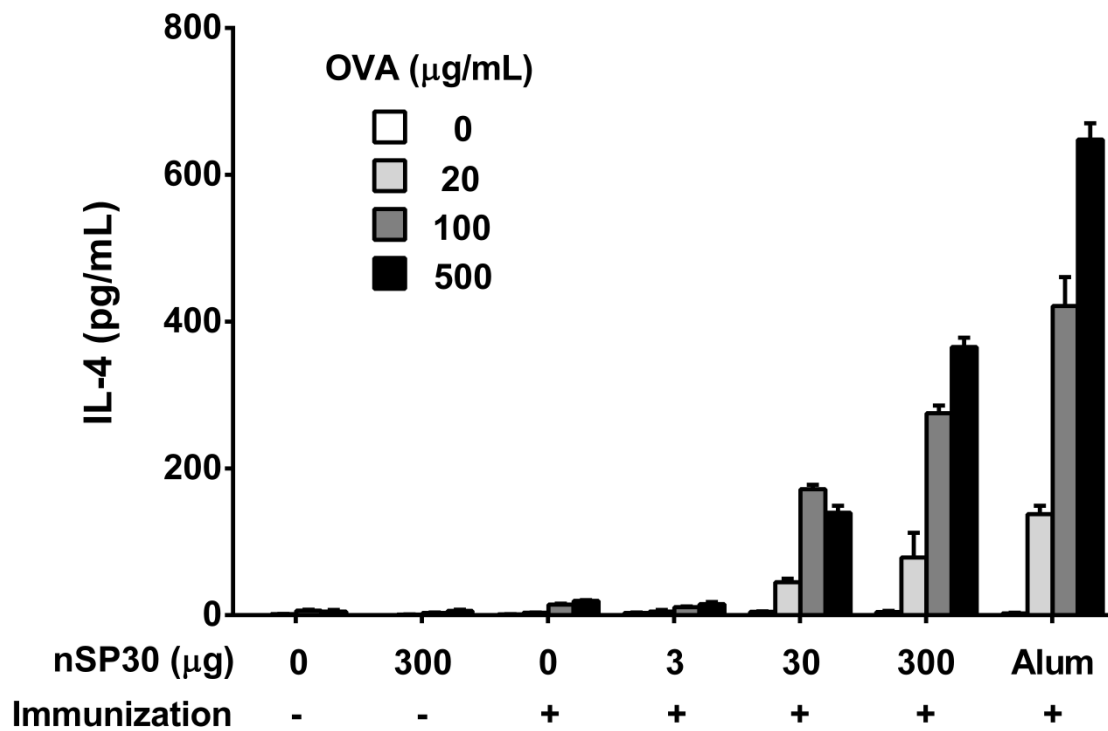
データは mean  $\pm$  SEM (n=3)を示す

図 1-18 非晶質ナノシリカ低用量の IL-2 産生に対する効果



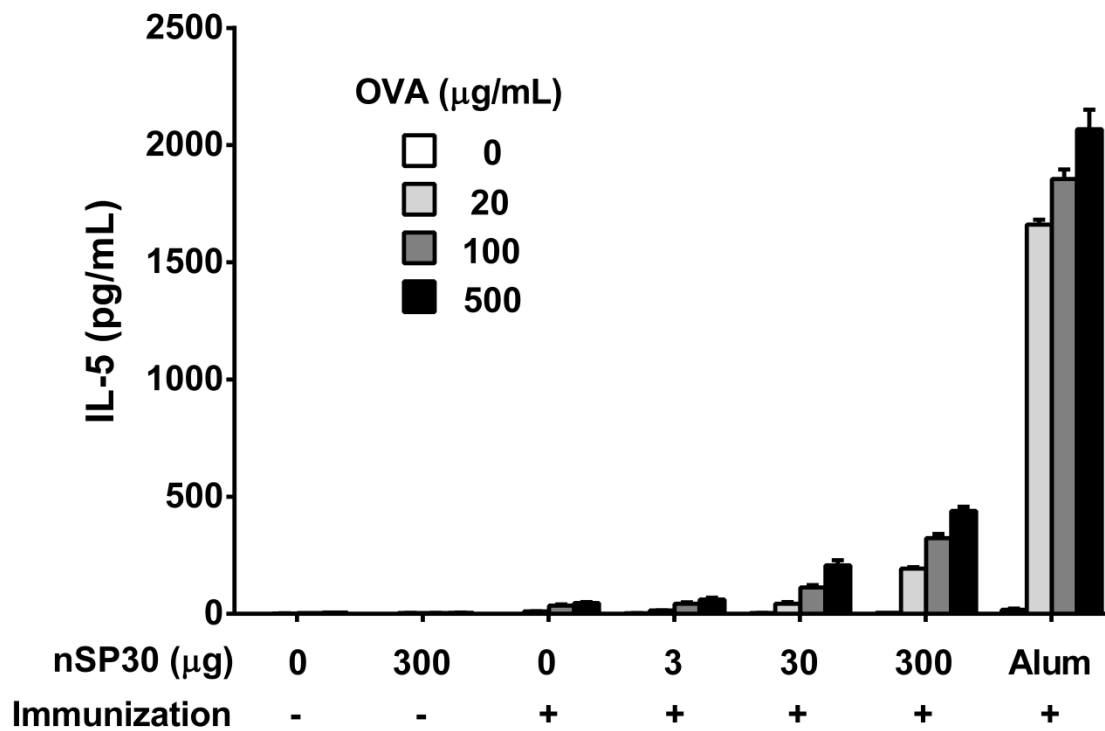
データは mean ± SEM (n=3)を示す

図 1-19 非晶質ナノシリカ低用量の IL-4 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=3)を示す

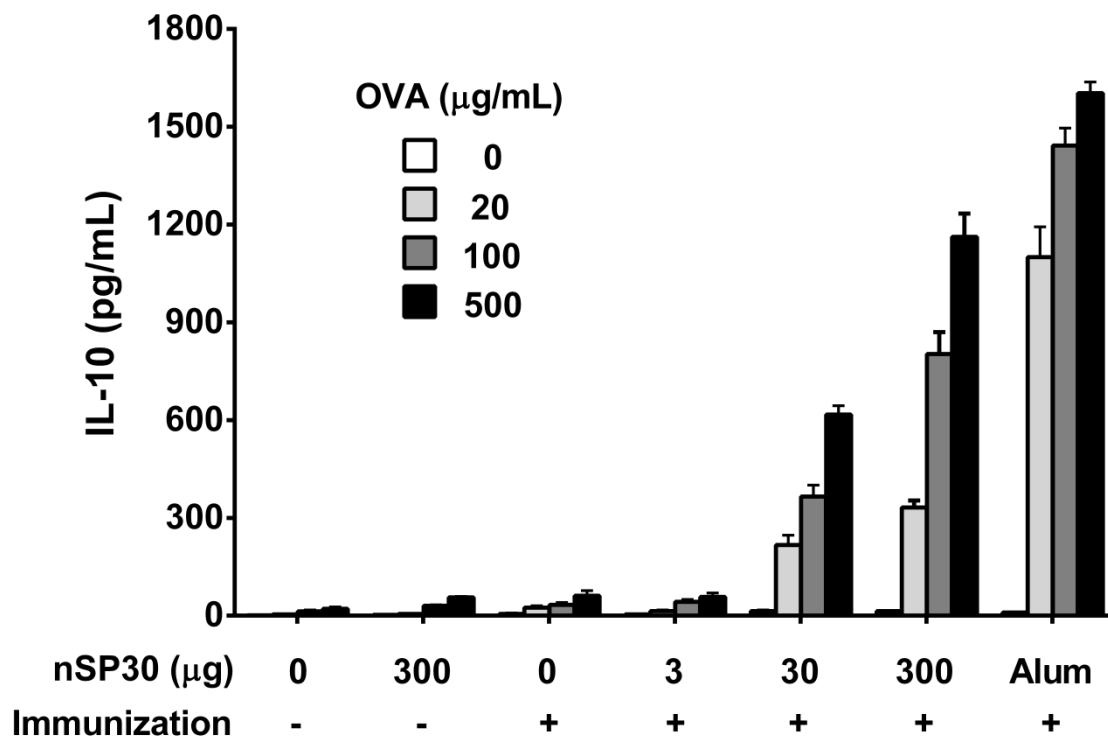
図 1-20 非晶質ナノシリカ低用量の IL-5 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=3)を示す

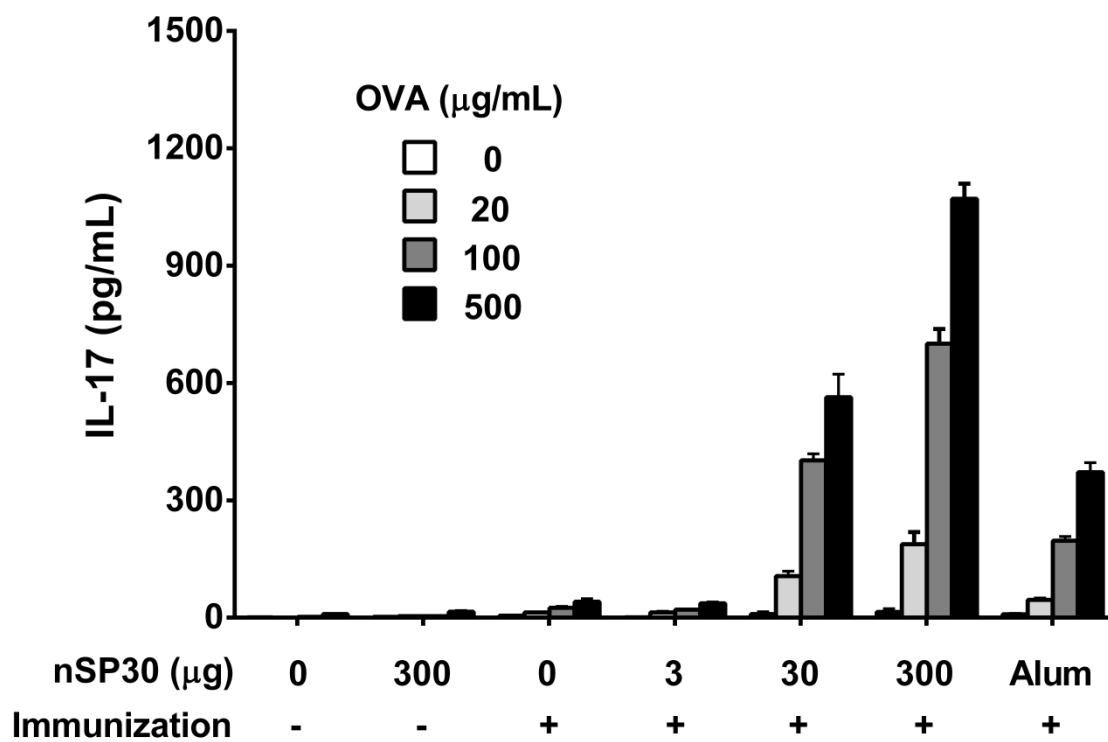


図 1-21 非晶質ナノシリカ低用量の IL-10 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=3)を示す

図 1-22 非晶質ナノシリカ低用量の IL-17 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=3)を示す

#### 第4節 非晶質シリカの粒子径とアジュバント効果の関係

第1, 2節では, 粒子径 30 nm の非晶質ナノシリカがアジュバント効果を有することを明らかにした. そこで非晶質シリカの粒子径とアジュバント効果の関係について検討するため, 様々な粒子径の非晶質シリカ (30, 100, 1000 nm)を用いて実験を実施した.

##### 3. 実験材料

- 1) 実験動物: 8週齢, SPF 雄性, BALB/cCr Slc マウス (日本エスエルシー株式会社) を用いた.
- 2) 試薬: 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 1-8~1-10, 平均粒子径は第1章第1節で測定した各ナノ粒子の平均粒子径を記載). また, その他の試薬は本章第2節の表 1-3 に示したものを, 本章第2節 2.と同様に調製した. なお, 使用直前に各粒子を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE, Japan) で5分間超音波処理し, さらに1分間ボルテックスミキサーで攪拌した後, 粒子分散液の調製を行った.

**表 1-8 非晶質ナノシリカ (30 nm) の特性**

非晶質ナノシリカ	
濃度	25 mg/mL
形状	球形
密度	2.0 g/ccm
平均粒子径 (実測値)	33 nm

**表 1-9 非晶質ナノシリカ (100 nm) の特性**

非晶質ナノシリカ	
濃度	50 mg/mL
形状	球形
密度	2.0 g/ccm
平均粒子径 (実測値)	105 nm

**表 1-10 非晶質シリカ (1000 nm) の特性**

非晶質シリカ	
濃度	50 mg/mL
形状	球形
密度	2.0 g/ccm
平均粒子径 (実測値)	1074 nm

#### 4. 実験方法

##### 2-1 動物管理

本実験は塩野義製薬株式会社開発研究所の飼育域で行い、社内動物実験適正運用委員会の承認を得て実験を行った (本章第 2 節の 3.3-1).

##### 2-2 免疫および非晶質ナノシリカの投与

投与群としては以下の 5 群を設定した (表 1-11).

1 群当たり 5 匹のマウスを用いた. 各々の投与物質は投与前に転倒混和し, 十分に均一になった後, 腹腔内投与した. その際, 1 mL 注射筒および 22G 注射針 (テルモ) を用いた. 非晶質シリカは粒子径 30 nm, 100 nm, 1000 nm (Micromod 社) を使用した.

表 1-11 群構成

群	免疫抗原	抗原量 (mg)	抗原との併用物質	粒子径 (nm)	併用物質量 (μg)	動物数
1	PBS (-)	-	PBS (-)	-	-	5
2	OVA	0.1	PBS (-)	-	-	5
3	OVA	0.1	非晶質ナノシリカ	30	300	5
4	OVA	0.1	非晶質ナノシリカ	100	300	5
5	OVA	0.1	非晶質シリカ	1000	300	5

##### 2-3 抗 OVA 抗体の測定

抗 OVA 抗体は本章第 2 節 3.3-3 に示した ELISA 法により測定した.

##### 2-4 サイトカインの測定

脾臓細胞を OVA と培養することによって産生されるサイトカインは本章第 2 節 3.3-4 に示した ELISA 法により測定した.

## 2-5 脾臓細胞増殖反応

脾臓細胞増殖反応は本章第 2 節 3.3-5 に示した手法により測定した.

## 2-6 統計解析

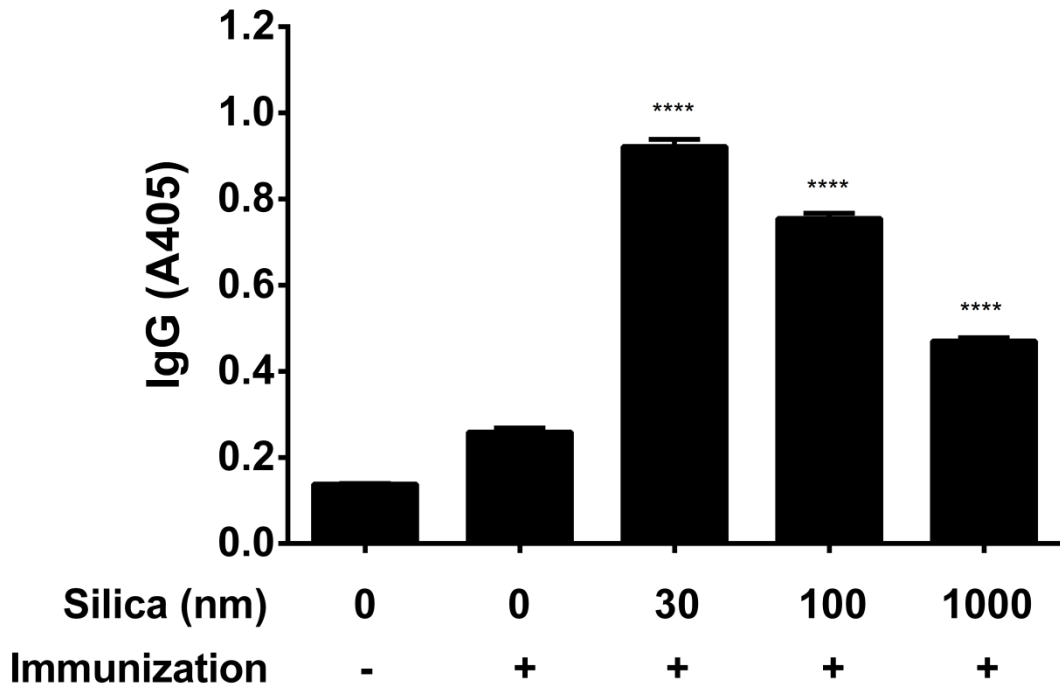
抗 OVA IgG, IgG1, IgG2a および IgE 産生の解析は, OVA/PBS (-) 投与群と比較して一元配置分散分析で有意差を検定し Dunnett's の多重比較検定法を実施した. 有意水準 5%未満を有意差ありとした.

## 5. 結果

### 3-1 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の抗 OVA 抗体産生に対する効果

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, 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 1-23~1-26). その結果, OVA 単独投与群と比較して, 非晶質シリカ併用投与群 (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) では, 粒子径が小さいほど, 抗 OVA IgG, IgG2a, IgG1, IgE 産生が増加する傾向が認められた. 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.

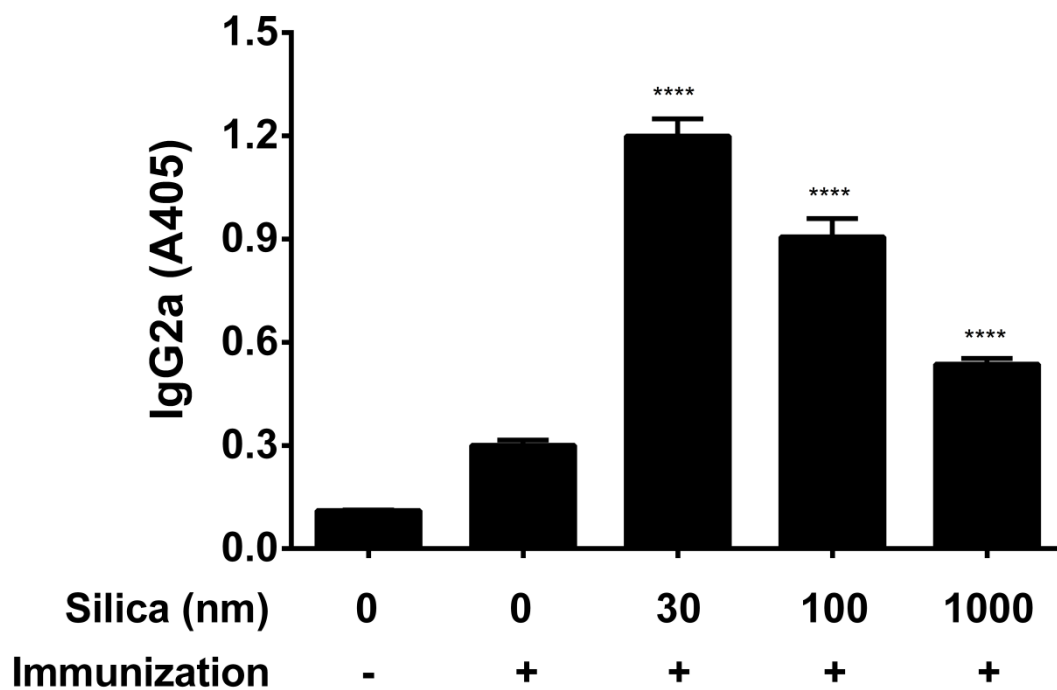
図 1-23 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の抗 OVA IgG 産生に対する効果



データは mean  $\pm$  SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

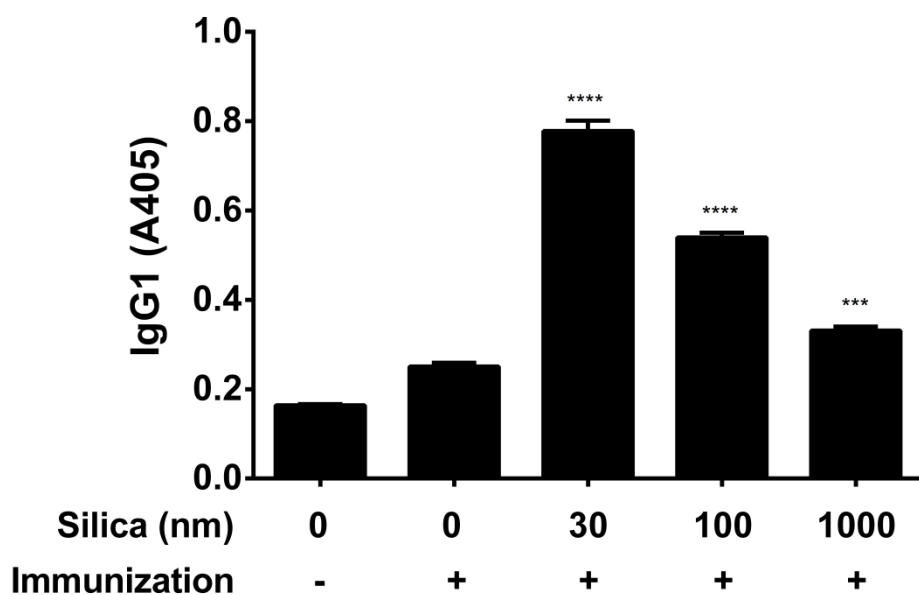
図 1-24 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の抗 OVA IgG2a 産生に対する効果



データは mean  $\pm$  SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

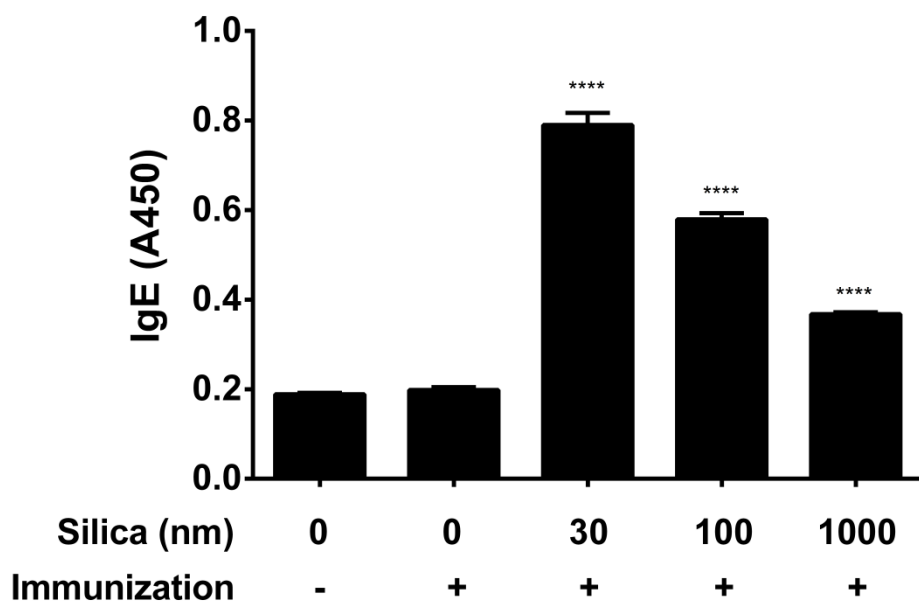
図 1-25 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の抗 OVA IgG1 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

図 1-26 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の抗 OVA IgE 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)



3-6 非晶質ナノシリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の脾臓細胞増殖反応に対する効果

非晶質ナノシリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の脾臓細胞増殖反応に対する効果について検討した (表 1-12). その結果, OVA 単独投与群 (2 群) と比較して, 非晶質シリカ併用投与群 (3, 4, 5 群) において非晶質シリカの粒子径が小さいほど, OVA 特異的な脾臓細胞増殖反応の促進が認められた.

表 1-12 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の OVA 特異的脾臓細胞増殖反応に対する効果

群 <sup>1)</sup>	増殖 (c.p.m.) <sup>2)</sup>			
	OVA (μg/mL)			
	0	20	100	500
1	386 ± 13	391 ± 14	416 ± 11	438 ± 22
2	410 ± 13	536 ± 25	865 ± 62	1247 ± 93
3	564 ± 27	7431 ± 543	12295 ± 936	18372 ± 1544
4	477 ± 18	3147 ± 215	7842 ± 471	13432 ± 1124
5	437 ± 8	1214 ± 89	2742 ± 226	5098 ± 605

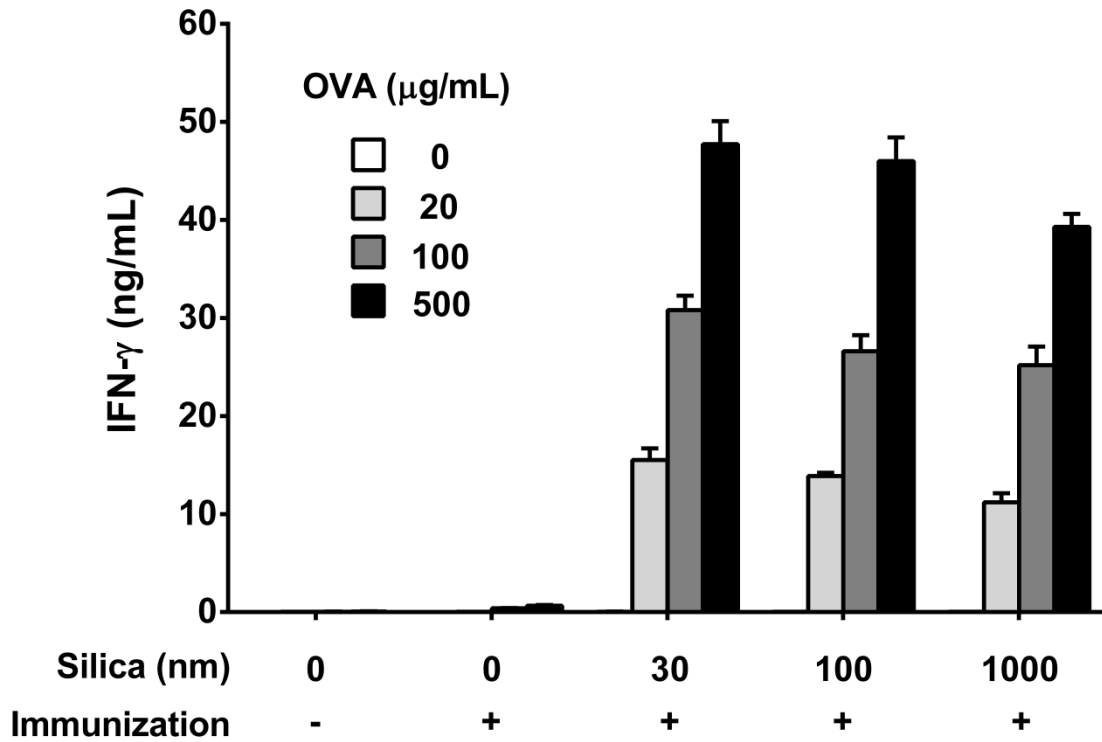
1) 表 1-11 を参照

2) 脾臓細胞 ( $5 \times 10^6$  cells/mL) を 2 日間培養後, methyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine (37 kBq/10 μL/well) を添加し一晩培養した細胞の放射活性.  
データは mean ± SEM (n=3)を示す

### 3-7 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) のサイトカイン産生に対する効果

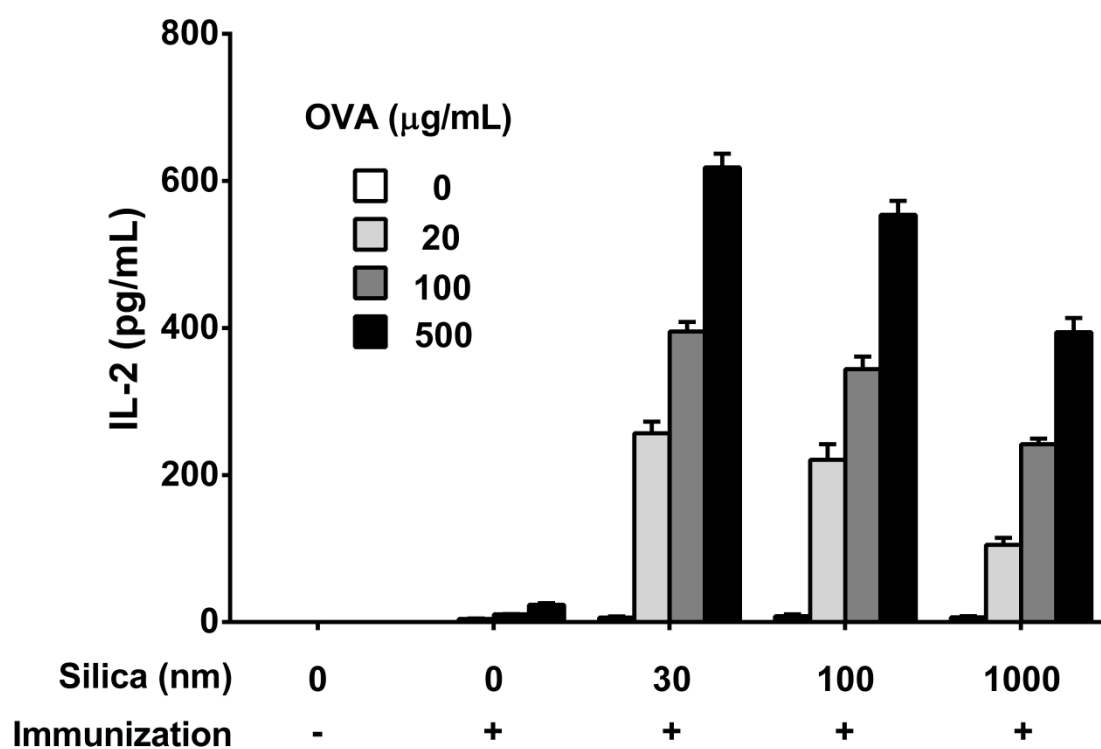
Th1 細胞の指標として IFN- $\gamma$ , IL-2, Th2 細胞の指標として IL-4, IL-5, IL-10, Th17 の指標として IL-17 を測定し, 非晶質ナノシリカの Th 細胞の分化成熟に与える影響について検討した (図 1-27~1-31). その結果, OVA 単独投与群と比較して, OVA・非晶質シリカ併用投与群において非晶質シリカの粒子径が小さいほど, 測定した全てのサイトカイン (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-17) 産生は促進した. これまでの実験結果と同様に, 非晶質シリカによる特異的な Th 細胞の分化・誘導は認められなかった.

図 1-27 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の IFN- $\gamma$ 産生に対する効果



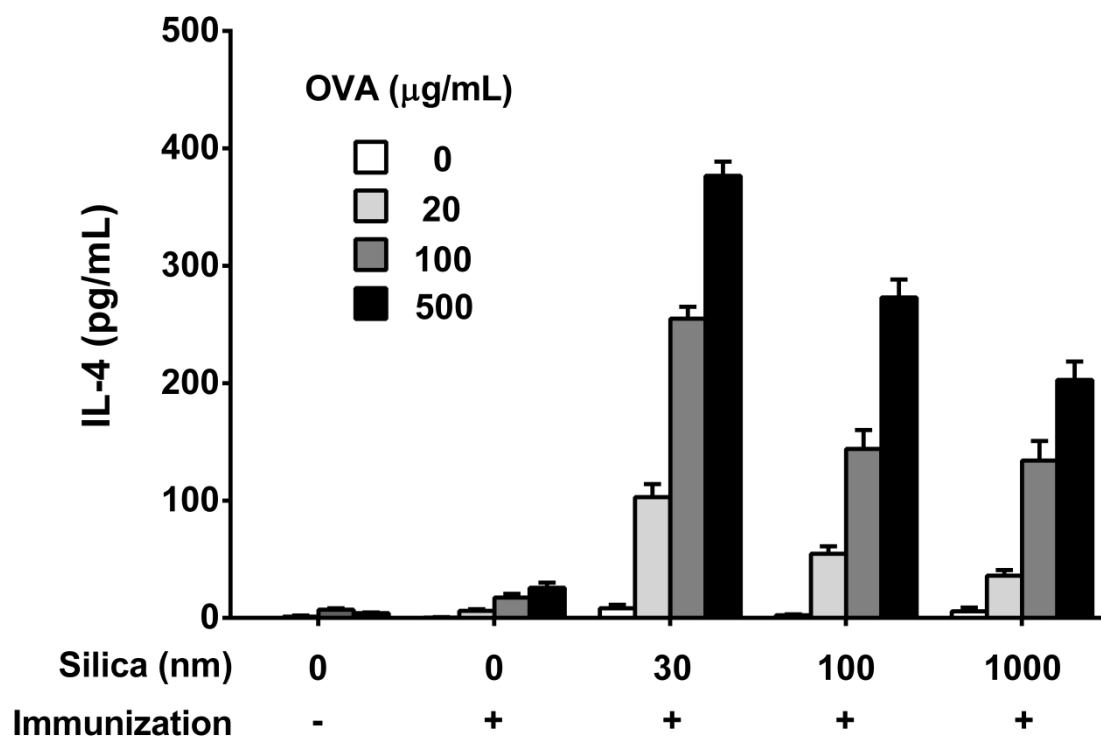
データは mean  $\pm$  SEM (n=3)を示す

図 1-28 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の IL-2 産生に対する効果



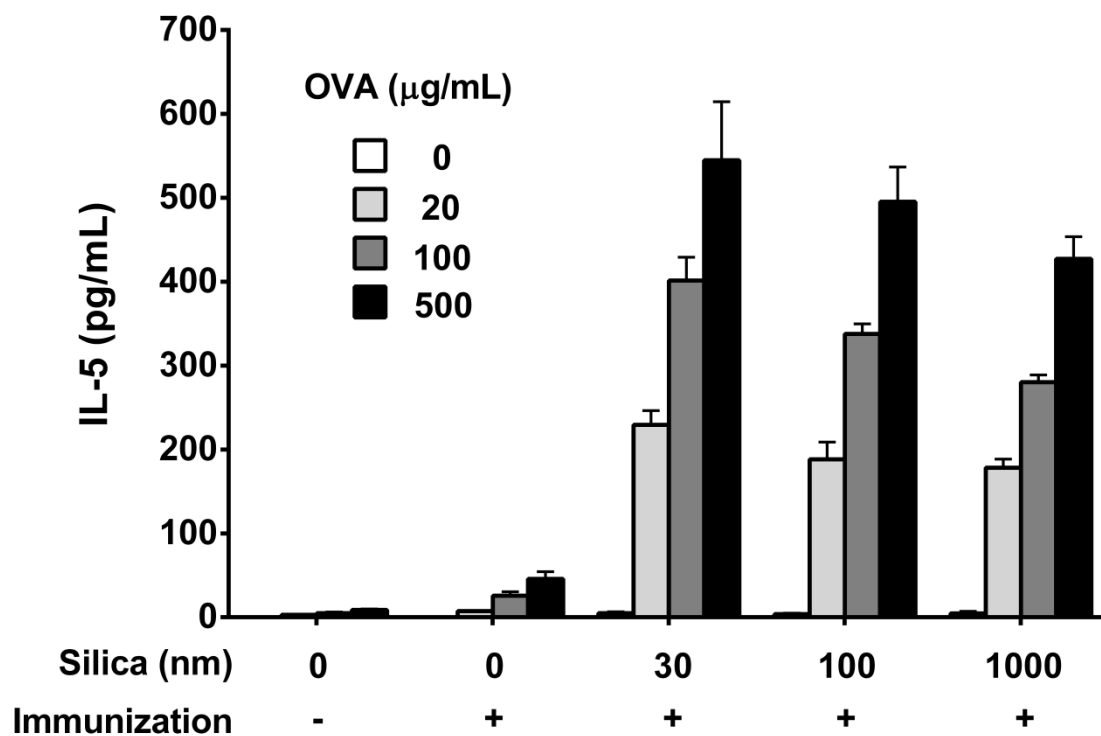
データは mean ± SEM (n=3)を示す

図 1-29 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の IL-4 産生に対する効果



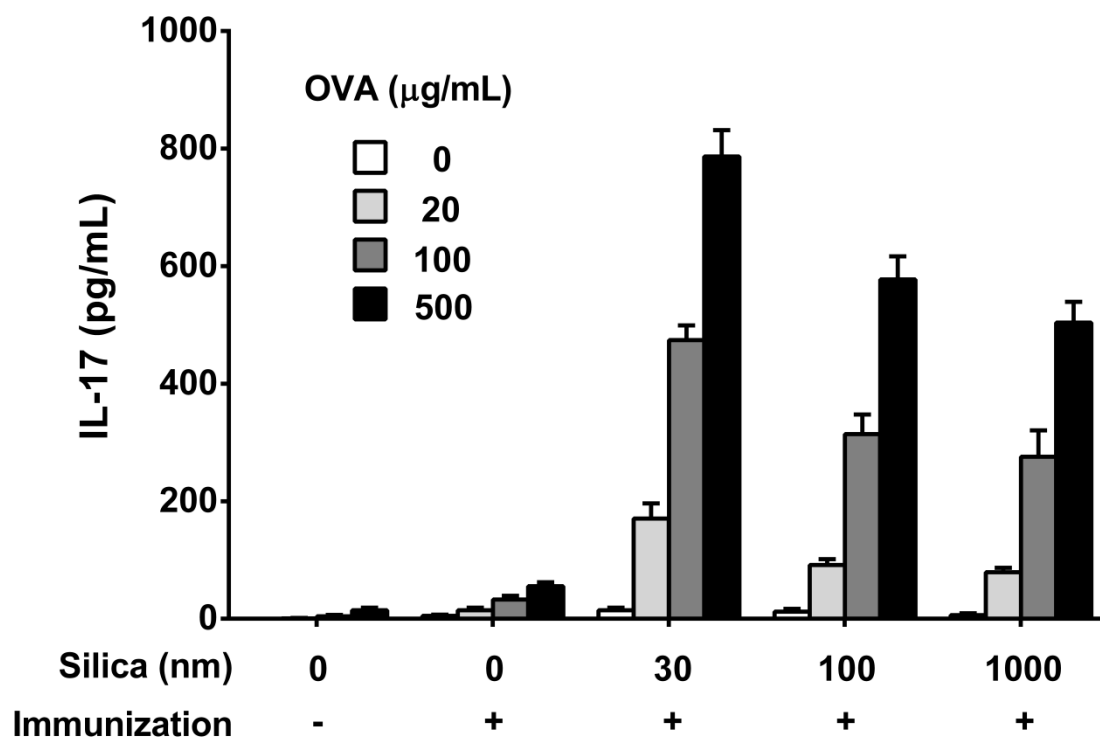
データは mean ± SEM (n=3)を示す

図 1-30 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の IL-5 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=3)を示す

図 1-31 非晶質シリカ (粒子径 : 30, 100, 1000 nm) の IL-17 産生に対する効果



データは mean ± SEM (n=3)を示す

## 第5節 考察

### 第1項 非晶質ナノシリカのアジュバント効果およびそのメカニズムについて

本研究では、まずマウスに免疫抗原 OVA を nSP30 (平均粒子径 : 33 nm) とともにを腹腔内投与し、抗原特異的免疫反応に対する本ナノ粒子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は用量依存的に増強された。このことは、nSP30 が免疫反応増強作用、すなわちアジュバント効果を有することを示している。本知見は nSP30 がアレルギー性疾患の発症又は増悪に寄与しうることを示唆している。事実、アトピー性皮膚炎モデルマウスに抗原と nSP30 を併用投与すると、IL-18 および TSLP の産生を介してアレルギー症状を増悪させることが示唆されている[41]。また非晶質ナノシリカをマウスマクロファージ系細胞株 (RAW264.7) に添加すると TNF- $\alpha$  を産生することが報告されている[42]。さらに nSP30 をマウスに気管内投与すると炎症性サイトカイン産生および好中球浸潤が誘導され、肺炎が生じることが示されている[43]。これらの報告は nSP30 が *in vitro* および *in vivo* で自然免疫を活性化することを示唆しており、nSP30 がアジュバント効果を有するという今回の結果を支持している。

次に nSP30 の Th1 および Th2 免疫応答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 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、両者において OVA + nSP30 併用投与による用量依存的な抗体産生増強が認められた。さらに *in vitro* における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、OVA + nSP30 併用投与によって Th1 サイトカイン (IFN- $\gamma$ ) および Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5, IL-10 および IL-13) の産生はともに促進された。以上の結果から、nSP30 は Th1 および Th2 免疫応答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。緒論に述べたように、多数の微小粒子状物質がアジュバント効果を有することが報告されており、粒子アジュバントと呼ばれている。粒子アジュバントの中で、最も古くから頻用されているものは Alum である。Alum は 80 年以上前から液性免疫を誘導するアジュバントとして種々のワクチンに添加されており、抗原特異的 IgE や IgG1 を誘導することが報告されている[44]。また生体内で形成される粒子状物質として monosodium urate crystals (MSU) がある。MSU は傷害を受けた細胞から放出されるダメージ関連分子パターンの 1 つであり、痛風の原因因子と考えられているが[45]、強い炎症反応を誘導するとともに、強力な Th2 型免疫反応を誘導する。さらに化学合成された粒子状物質である乳酸、グリコール酸重合体、ポリスチレン粒子およびカーボンナノチューブもマウスを用いた基礎研究において抗原特異的な IgG1 を誘導することが報告されている[46–48]。また酸化ニッケルナノ粒子も強い炎症反応と抗原特異的な IgE を誘導することが明らかにされている[49]。さらにマラリア原虫が産生する代謝産物で、遊離ヘムのポリマーであるヘモゾインもアジュバントとして使用することで液性免疫を活性化することが報告されている[50]。このように既知の粒子アジュバントの大部分は Th2 優位の免疫応答を誘導することが知られている。しかしながら、本

研究において示した様に、nSP30はTh1、Th2免疫応答の両反応を同程度に誘導したことから、既知の粒子アジュバントとは異なる作用機序を有すると考えられる。この要因の一つとして、非晶質ナノシリカはクロスプレゼンテーションにより液性免疫だけでなく細胞性免疫を誘導することが報告されていることから、それによって免疫応答の選択性が低い可能性が考えられる[51]。

さらに本研究では、nSP30 + OVA 併用投与によってTh17反応の指標であるIL-17産生の増強が認められたことから、nSP30はTh1およびTh2免疫応答のみならず、Th17免疫応答に対してもアジュバント効果を有することが示唆された。Th17細胞は未感作CD4 T細胞からIL-6およびTGF- $\beta$ によって分化誘導される[16, 17]。非晶質ナノシリカはIL-6およびTNF- $\alpha$ 産生を誘導することが知られているため[52, 53]、非晶質ナノシリカによるIL-6産生促進が、Th17細胞分化に関与している可能性が考えられる。Th17細胞は腸管粘膜固有層に多く存在し、病原体感染防御に重要な役割を担っている。また腸管Th17細胞は腸内常在細菌であるセグメント細菌、*Citrobacter rodentium*、*Escherichia coli* および *Candida albicans* によって誘導、活性化されることが明らかとなっている。Th17が産生するIL-17は好中球遊走、上皮細胞からの抗菌ペプチド産生に関与し、主に真菌や細胞外寄生菌の排除に関与する[54]。以上のようにTh17は粘膜免疫において重要な役割を担っているため、Th17アジュバントは、感染症ワクチンの開発に役立つ可能性がある。実際に、肺感染症動物モデルにTh17細胞を誘導することで、生存率が上昇することが報告されている[55-57]。さらに *Mycobacterium tuberculosis*、*Bordetella pertussis* 等の感染症にTh1、Th17細胞の両方を誘導することで治癒効果が増強されることが知られており、Th17ワクチンアジュバントが注目を集めている。従来のワクチンはTh2細胞を介して液性免疫を誘導するものが多く、抗原特異性に縛られるため治療できる菌種が制限される。一方、Th1、Th17アジュバントを用いたワクチンは、細胞性免疫を誘導することができる。そのため、菌種に共通する抗原を認識することで治療可能な菌種の幅が広がると考えられる。これまでにTh17アジュバントとしてはナノエマルジョンが報告されている[58]。しかしながら、自己免疫反応を引き起こす可能性があり、より安全なアジュバントの選抜が必要である。このように未だ安全性面に課題があるが、アジュバントの作用機序の解明が進むことで、メカニズムに基づいた特異性の高いワクチンの開発が可能になる。さらに病原微生物や疾患特性に応じたアジュバントを選択することで、ワクチンの安全性および治療効果の向上に繋がると期待される。

近年のアジュバント研究によって、アジュバント効果を示す物質の多くは自然免疫を活性化する能力を有していることが示されている。一般的に自然免疫はTLRを始めとするパターン認識受容体 (PRR) を介して活性化され、サイトカイン産生および共刺激分子群の発現を介して、獲得免疫応答を誘導する[59]。そのためPRRのリガンドはアジュバントとして有用であると考えられており、そのシグナル伝達にはMyD88およびTRIFが関与していることが報告されている[60]。そこでMyD88欠損マウスにAlumを免疫したところ、野生型と同等の抗原特異的なIgG1およびIgE応答を示した[61, 62]。さらにMyD88/TRIF二重欠



損マウスにおいても Alum による抗体応答には変化がないことが報告されている[63]. これらの結果より, Alum による抗体応答は TLR 非依存性であると考えられる. 一方, ヘモゾインについてはそのアジュバント活性化が MyD88 依存性であることが報告されており, 粒子状物質のアジュバント活性における MyD88 シグナルの関与に関しては今後も解析が必要と考えられる[50]. 近年, 粒子アジュバントが NLRP3 インフラマソームを活性化することが相次いで報告されている. インフラマソームは細胞内 PRR であり, NLRP3 インフラマソームは最もよく解析されているインフラマソームの1つである[64]. NLRP3 インフラマソームが活性化されると caspase-1 の活性化を通じて炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ および IL-18 が活性化される. Alum がマクロファージ, 樹状細胞の NLRP3 インフラマソームを活性化し, IL-1 $\beta$ , IL-18 を誘導すること, さらに Alum により抗原特異的な IgG1 産生が NLRP3 インフラマソーム欠損マウスでは低下すること明らかとなった[65, 66]. しかしながら, その後 NLRP3 インフラマソームは抗原特異的な IgG 産生には関与しないという報告や IgE 産生のみに影響するといった報告もなされており, 一定の見解が得られていないのが現状である. また粒子アジュバントの機序において宿主核酸の関与が示唆されている. Alum は細胞死を誘導するが, Alum を投与することにより, 好中球を始めとする貪食細胞が障害を受け, その結果 DNA が放出されること, この宿主由来の DNA が抗原特異的な IgG, IgE の誘導に関与することが報告された[44]. さらに Alum の代わりに DNA を抗原とともに投与することでアジュバント効果が誘導されること, DNA 分解酵素の処理によりアジュバント効果が消失することも示された. この結果は宿主由来の核酸もアジュバント活性の誘導に重要であることを示唆している. メカニズムとして, TANK-Binding Kinase 1, interferon regulatory factor 3 の関与が示唆されており, いずれの欠損マウスでも野生型マウスに比して DNA および Alum によるアジュバント効果の低下, 特に IgE の誘導が顕著に減弱することが示された. 興味深いことに粒子アジュバントの多くが細胞死を誘導する特性を有していることが示唆されており, アジュバント活性, 細胞死, さらに宿主の DNA 放出が密接に関与していることが推察される. 以上の知見を踏まえて, 非晶質ナノシリカのアジュバント効果の作用機序について考察すると, 以下の二つの機序が考えられる. 一つは非晶質ナノシリカがタンパク質へ吸着し, タンパク質を抗原提示細胞へ送達し易くなること, もう一つは非晶質ナノシリカが直接免疫細胞を活性化することで, 免疫応答が増強されることである. 特に, 非晶質ナノシリカは高い細胞傷害性を発揮すること, および静脈内投与等で強い好中球の誘導作用があることから, Alum で報告されている自己由来の DNA 等の danger signal を誘導することがアジュバント効果の本体である可能性が高いと考えられる[44, 51].

## 第2項 アジュバント効果を示さない非晶質ナノシリカの用量について

本研究では, マウスに抗原 OVA を非晶質ナノシリカ (3, 30, 300  $\mu$ g) とともに投与し, OVA 特異的免疫反応に対するアジュバント効果を示さない非晶質ナノシリカの用量について検討した. その結果, 非晶質ナノシリカは 30  $\mu$ g 以上では用量依存的に抗 OVA 抗体産生

を促進するが、3  $\mu\text{g}$  以下の用量では抗 OVA 抗体産生を促進しないことが明らかとなった。また抗原特異的脾臓細胞増殖反応においても 30  $\mu\text{g}$  以上では用量依存的に増強されたが、3  $\mu\text{g}$  以下の用量では抗原特異的脾臓細胞増殖反応の促進は認められなかった。これらのことから、アジュバント効果を示さない非晶質ナノシリカの用量は 3  $\mu\text{g}$  以下であることが示唆された。シリカの安全性情報としては、欧州食品安全機関から ADI (1 日許容摂取量) は 20–50 mg/day であることが報告されている[67]。また Expert Group on Vitamins and Minerals では、成人におけるシリカの ADI は 700 mg/day に設定されている[68]。本研究はマウスに腹腔内投与しており、現実的な曝露経路とは異なるため、現実的に生体に及ぼす影響について考察することは困難である。しかしながら、非晶質ナノシリカの使用量は増加傾向にあり、体内に日々蓄積していく可能性も否定できないことから、本アジュバント効果を見逃すことは出来ない。ハザード情報不足によりもたらされたアスベストによる健康被害の事例もあるため、ハザード情報を提供することでナノマテリアルの軽率な使用に警笛を鳴らし慎重な使用を推奨することは重要と考えられる。これらの成果を基盤に、ナノマテリアルの NOAEL (最大無毒性量) および ADI の設定に向けて、体内吸収後の体内動態・蓄積性・排泄経路を含めた定量的な ADME 情報の収集を図る必要がある。

### 第 3 項 非晶質ナノシリカの粒子径とアジュバント効果の関係について

本研究では、マウスに OVA と粒子径 (30, 100, 1000 nm) が異なる非晶質シリカとを併用して腹腔内投与し、粒子径とアジュバント効果の関係性をについて検討した。その結果、OVA 単独投与群と比較して、非晶質シリカ併用投与群においては、粒子径が小さいほど抗 OVA IgG, IgG1, IgG2a, IgE 産生の増加傾向が認められた。以上の結果から、非晶質シリカは粒子径が縮小するにつれ、より強いアジュバント効果を有する可能性がある。さらに非晶質シリカの Th1 および Th2 免疫応答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 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、両者において非晶質シリカの粒子径が縮小するにつれ抗体産生増強が認められた。さらに *in vitro* における脾臓細胞によって産生されるサイトカインに関しても、今回測定した全てのサブタイプの Th 細胞 (Th1, Th2, Th17) 由来のサイトカイン産生 (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-17) は非晶質シリカの粒子径の縮小に伴い促進された。以上の結果から、nSP のアジュバント効果は粒子径が小さいほど強いことが示唆された。

これまでナノマテリアルの安全性評価においては、各粒子サイズについて単位重量当たりの影響が評価されてきた[69]。しかしながら、粒子サイズを縮小することで単位重量当たりの粒子数は増加するため、認められた毒性が粒子サイズの影響によるものか、粒子数の増加によるものかの判断が困難である。また OECD からナノマテリアルの評価について、粒子表面積や粒子数等の様々な基準により特性を評価することで、有害性の作用メカニズムに最も関係の深い測定方法の評価が進み、リスク評価法が改善されることが報告されている[69]。これらの報告を受けて、非晶質ナノシリカの表面積当たり、粒子数当たりの細胞

障害性への影響評価が試みられた。その結果、表面積、粒子数で換算した際は 50 nm までは粒子サイズが縮小するにつれて細胞障害性が増強するが、50nm よりも粒子サイズが縮小すると細胞障害性は低減し、50 nm で細胞障害性のピークを迎えるという結果であった[43]。原因は不明であるが、多くのナノマテリアルで同様の傾向が認められており、毒性回避には粒子サイズの最適化が重要と考えられている。実際、ナノマテリアルを使用する現場では重量に基づいて利用するため、重量当たりの評価が最も現実に即していると考えられる。しかしながらナノマテリアルの特性を明らかにするため、複数の視点から評価を行う必要があり、今後の課題と考えられる。

## 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

本章では、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誘導に対する非晶質ナノシリカの影響について検討した。

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、喘息等のアレルギー疾患あるいは関節リウマチ等の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[70]、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[32]。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ンタンパク質と併用して用いられている[71-73]。

以上の報告を踏まえ、本実験ではアジュバント効果を有する非晶質ナノシリカの経口免疫寛容に対する影響について検討した。これまで比較的高用量 (10 mg 以上) の経口抗原投与では、Th1 および Th2 免疫応答に対する免疫寛容が誘導され[74]、比較的低用量 (1 mg 以下) では Th1 免疫応答に対する選択的免疫寛容が誘導されることが報告されている[75]。本実験では非晶質ナノシリカの Th1 および Th2 経口免疫寛容誘導に対する影響について調べるため、高用量 (25 mg) の経口抗原 OVA を用いて検討した。

### 第1節 非晶質ナノシリカ単回投与の経口免疫寛容誘導に対する影響

抗原 OVA 免疫 5 日前に、粒子径 30 nm の非晶質ナノシリカ (0.1, 1, 10 mg/マウス) を OVA と共に単回経口投与し、本ナノ粒子の経口免疫寛容誘導に及ぼす影響について検討した。

#### 1. 実験材料

- 1) 実験動物：8 週齢，SPF 雄性，BALB/cCr Slc マウス (日本エスエルシー株式会社) を用いた。
- 2) 試薬：非晶質ナノシリカは Micromod 社から購入した (表 2-1)。実験で用いた試薬と供給元を表 2-2 に示す。なお、非晶質ナノシリカは使用直前に ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE, Japan) で 5 分間超音波処理し、さらに 1 分間ボルテックスマキサーで攪拌した後、粒子分散液の調製を行った。

**表 2-1 非晶質ナノシリカ (30 nm) の特性**

非晶質ナノシリカ	
濃度	25 mg/mL
形状	球形
密度	2.0 g/ccm
平均粒子径 (実測値)	33 nm

**表 2-2 試薬**

試薬名	供給元
ALP-anti-mouse IgG1	Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, USA)
ALP-anti-mouse IgG2a	Becton Dickinson and Company
Albumin, from chicken egg white, 5× crystalline (cal-OVA)	Merck Chemicals (Calbiochem®) (Darmstadt, Germany)
Albumin from chicken egg white, Grade V, minimum 98% agarose gel electrophoresis	Sigma-Aldrich Co. LLC. (St Louis , MO, USA)
Alkaline phosphatase conjugate anti-mouse IgG (Fc specific)	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Ammonium chloride (NH <sub>4</sub> Cl)	関東化学株式会社 (東京)
BCA Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc.
Casein	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Complete Freund's Adjuvant (CFA)	Becton Dickinson and Company
Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich Co. LLC.
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinlation kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
Fetal bovine serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Lysozyme, from chicken egg white (HEL)	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Horseradish peroxidase streptavidin	Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA)
Hydrochloric acid	Sigma-Aldrich Co. LLC.
IgE, Murine clone LO-ME-3	MONOSAN (Uden, the Netherlands)
Methyl-[ <sup>3</sup> H]-thymidine	GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 (東京)
Mouse IFN-γ ELISA kit	Endogen, Inc. (Woburn, MA, USA)
Mouse IL-4 ELISA kit	Endogen, Inc.
Mouse IL-5 ELISA kit	Endogen, Inc.

Mouse IL-10 ELISA kit	Endogen, Inc.
Mouse IL-17 Quantikine ELISA kit	R&D System Inc. (Minneapolis, MN, USA)
2-Amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol (Tris aminomethane)	Sigma-Aldrich Co. LLC.
Sulfuric acid	Sigma-Aldrich Co. LLC.
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Co. LLC.
1-Step™ Ultra TMB-ELISA	Thermo Fisher Scientific Inc.
Penicillin-streptomycin	Life Technologies Co. (Carlsbad, CA, USA)
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
RPMI1640	Sigma-Aldrich Co. LLC.
SEPACLEAN A-5 tubes	栄研化学株式会社 (東京)
Super Blocking® Buffer	関東化学株式会社
ダルベッコ PBS (-)	日水製薬株式会社 (東京)
マイクロシンチ 20	Perkin Elmer Inc. (Waltham, MA, USA)

## 2. 試薬調製

- 1) Tris-NH<sub>4</sub>Cl : 3.735 g NH<sub>4</sub>Cl と 1.030 g Tris aminomethane を高圧蒸気滅菌水に溶解し、hydrochloric acid で pH 7.2 に調製した後、さらに高圧蒸気滅菌水を添加して 500 mL とし、0.22 μm フィルターを用いて濾過滅菌し調製した。
- 2) ELISA blocking solution : 1 g casein を 100 mL PBS (-) に溶解した。
- 3) tPBS : 0.5 mL Tween と 1L PBS (-) を混合した。
- 4) RPMI (+) : FBS を 56°C, 30 分間加熱処理することによって非動化した。非動化した FBS は 0.22 μm フィルターを用いて濾過滅菌した。12 mL RPMI1640 に 4 μL 2-mercaptoethanol を添加し、2-ME sol. (w) を作製した。500 mL RPMI1640 に 55 mL 非動化 FBS, 5.5 mL penicillin-streptomycin および 5.5 mL 2-ME sol. (w) を添加した。
- 5) OVA-biotin : 2 mg OVA を 1 mL PBS (-) に溶解し、44.4 μL 10 mM EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin を添加し、転倒混和後、室温で 30 分間反応させた。Zeba™ Desalt Spin Column (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて蛋白と未反応の EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin を分離した。回収した溶液は、BCA Protein Assay Reagent を用いてタンパク濃度を定量した。作製した OVA-biotin は 1.356 mg/mL であり、小分け分注し -20°C で保存した。

### 3. 実験方法

#### 3-1 動物管理

本実験は塩野義製薬株式会社開発研究所の飼育域で行った。さらに動物実験に関する指針を遵守し、動物愛護にも配慮し、社内動物実験適正運用委員会の承認を得て実験を行った。設定温度 23°C, 設定湿度 50%, 換気回数 1 時間当たり 10 回以上, 12 時間照明 (8:00 ~20:00) に調節された一般飼育域で飼育した。検疫飼育期間のケージはアルミケージ (W400×D500×H200 mm), 馴化および実験飼育期間のケージはクリーンケージ (W262×D425×H150 mm) を使用した。床敷はペパークリーン (日本エスエルシー株式会社) を使用した。検疫飼育期間の収容密度は 5~15 匹/ケージ, 馴化および実験飼育期間の収容密度は 5 匹/ケージとした。餌は固形飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母株式会社) を自由摂取させた。飲水はフィルター (孔径 30 および 3 μm) で濾過し, 殺菌灯照射した豊中市上水を給水瓶で自由摂取させた。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。実験には検疫飼育の結果, 一般状態に異常が認められなかった動物を用いた。検疫期間終了後, 1 週間の馴化飼育を実施した。ランダムに 1 群 5 匹として各群に配分し, 耳パンチにより各ケージ内のマウスに対して, No.1-5 までの個体識別を実施した。投与開始 3 日前から解剖日まで適宜体重測定を実施した。

#### 3-2 免疫

OVA を PBS (-) に溶解し (2 mg/mL), 免疫賦活剤である CFA を等量加え, ホモジナイザー (NISSEI, AM-2) を用いて乳化した (1000 rpm, 3 分間)。ガラスシリンジおよび 24 G 注射針 (テルモ) を用いて 0.1 mL の抗原乳化液をイソフルラン麻酔下でマウス尾根部に皮下投与した (day 0)。

#### 3-3 免疫寛容誘導および非晶質ナノシリカの投与

経口免疫寛容に対する非晶質ナノシリカの影響を明らかにするため, 以下の計 6 群を設定した(表 2-3)。ディスポーザブル経口ゾンデを装着した注射筒を用い, OVA 免疫 5 日前 (day -5) に単回経口投与した (0.5 mL/マウス)。経口抗原と非晶質ナノシリカの投与は連続して行った。

表 2-3 群構成

群	経口抗原	抗原量 (mg)	事前投与の抗原との併用物質	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	非晶質ナノシリカ	0.1	5
5	OVA	25	非晶質ナノシリカ	1	5
6	OVA	25	非晶質ナノシリカ	10	5

### 3-4 抗 OVA 抗体の測定

OVA 免疫後 21 日にイソフルラン麻酔下で、心臓から全採血を実施した。採取した血液を SEPACLEAN A-5 tubes に注入し 4°C で遠心した。遠心により分離した血清を回収後、測定日まで -20°C にて保存した。

血清中の抗 OVA IgG, IgG1, IgG2a および IgE を、ELISA 法によって測定した。血清中の抗 OVA IgG, IgG1, IgG2a を測定する場合は、96 穴平底マイクロプレート (Corning) に、PBS (-) で溶解した OVA 溶液 (100 µg/mL) を 100 µL/well 添加し、4°C で一晩静置することによってコーティングを行ったものを用いた。上記プレートを PBS (-) で 2 回洗浄し、ELISA blocking solution を 200 µL/well 添加し、37°C 恒温器内で 1 時間静置した。その後、tPBS で 3 回洗浄し、tPBS で希釈した被験血清 (IgG および IgG1 検出時：10000 倍、IgG2a 検出時：50 倍) を 100 µL 添加し 37°C 恒温器内で 1 時間静置した。続いて tPBS で 3 回洗浄し、tPBS で 1000 倍に希釈した alkaline phosphatase conjugate anti-mouse IgG, ALP anti-mouse IgG1, 又は ALP anti-mouse IgG2a をそれぞれ 100 µL/well 添加し、37°C 恒温器内で 1 時間静置した。プレートを tPBS で 4 回洗浄後、3 mM p-nitrophenyl phosphate を 100 µL/well 添加し、405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて測定した。

血清中の抗 OVA IgE を測定する場合は、96 穴平底マイクロプレート (Corning) に 10 µg/mL の IgE, murine clone LO-ME-3 を 100 µL 添加し、4°C で一晩静置することによってコーティングを行った。Super Blocking<sup>®</sup> Buffer を 300 µL 添加し、添加後すぐにプレートを逆さにして溶液を取り除く操作を 2 回繰り返した。その後、tPBS で 5 倍希釈した被験血清を 100 µL 添加し、37°C 恒温器内で 1 時間静置した。次に tPBS で 3 回洗浄し、tPBS で希釈した OVA-biotin を 0.1 µg/100 µL/well 添加し、37°C 恒温器内で 1 時間静置した。プレートを tPBS で 3 回洗浄後、tPBS で希釈した HRP 標識ストレプトアビジンを 0.1 µg/100 µL/well 添加し、37°C 恒温器内で 1 時間静置した。プレートを tPBS で 4 回洗浄後、1-Step<sup>™</sup> Ultra TMB-ELISA を 100 µL 添加した。発色後、sulfuric acid (3N) を 50 µL 添加して反応を停止し、450nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて測定した。



### 3-5 サイトカインの測定

OVA 免疫後 21 日にマウスの脾臓を摘出し、RPMI (+) (5 mL) が入った氷冷下の 50 mL チューブ (Falcon) に回収した。その際、各群の 5 匹分の脾臓を 1 つのチューブにプールした。それらを 60 mm/Non-treated dish (IWAKI) 内のセルストレーナー (Falcon) 上に移した。5 mL 注射筒 (テルモ) のピストンを用いて脾臓をセルストレーナーに押し付けて潰し、細胞を分散させた。再度セルストレーナーを通して細胞を回収し、RPMI (+) で洗浄した。Tris-NH<sub>4</sub>Cl を 12 mL 添加して懸濁し、赤血球を除去した。さらに 3 回 RPMI (+) で洗浄し、トリパンブルーを用いて生細胞数を数え  $6 \times 10^6$  cells/mL になるように RPMI (+) で懸濁した。再度、生細胞数を数えさらに RPMI (+) で希釈することにより細胞数を  $5 \times 10^6$  cells/mL に調製した。この細胞懸濁液を 24 well plate (NUNC) に 1 mL/well で各群 12 well ずつ播種し、3 well ずつに、Albumin, from chicken egg white, 5×crystalline (cal-OVA) を 0, 20, 100, 500 μg/mL になるよう添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。4 日後に培養液を回収し、270×g で 5 分間遠心し、その上清をサイトカイン測定資料とした。測定試料中の IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10 は ELISA kit (Endogen, Inc.) を用いて測定した。同様に IL-17 も ELISA kit (R&D System, Inc.) を用いて測定した。

### 3-6 脾臓細胞増殖反応

3-5 のサイトカイン測定に調製した脾臓細胞懸濁液の一部を細胞増殖反応の検討に使用した。 $5 \times 10^6$  cells/mL の脾臓細胞懸濁液を 96 well plate (NUNC) に 0.1 mL/well で各群 6 well ずつ播種し、3 well ずつに、cal-OVA を 0, 500 μg/mL になるよう添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。2 日後に methyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine (37 kBq/10 μL/well) を添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下でさらに一晩培養後、セルハーベスター (Perkin Elmer) を用いて、培養した細胞をガラス繊維フィルターである Unifilter GF/C (Perkin Elmer) に回収した。シンチレーションカウンター (Perkin Elmer) を用いて標識化したチミジンから発せられる放射活性を測定することにより、DNA 合成 (脾臓細胞増殖反応) を定量化した。

### 3-7 統計解析

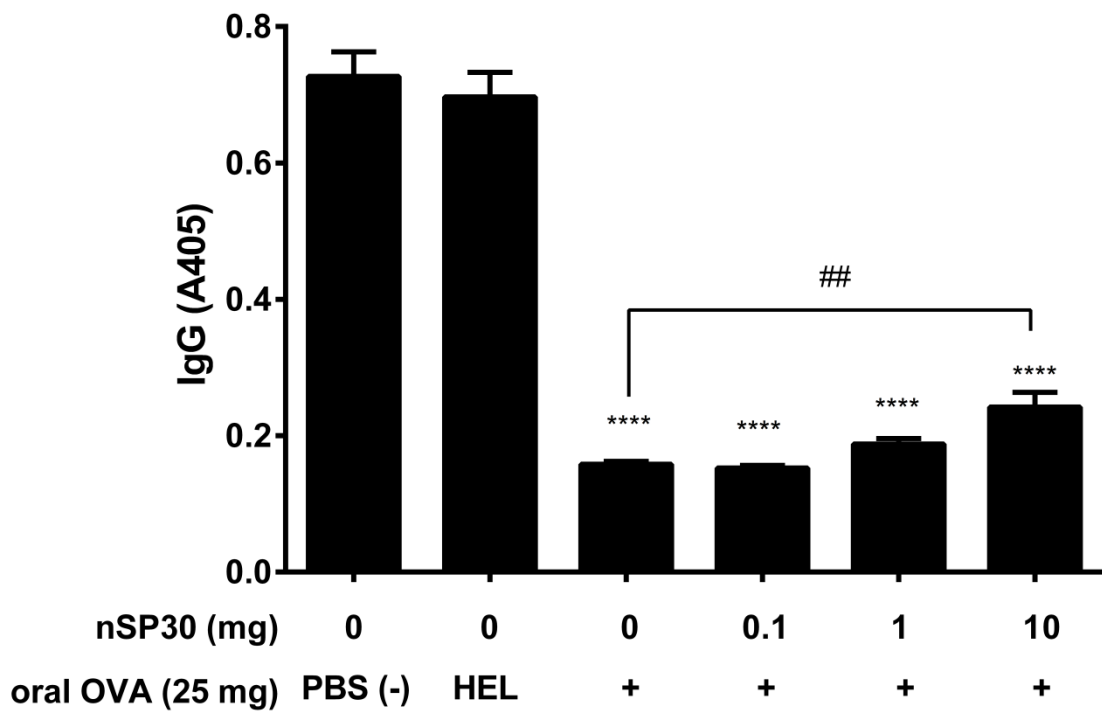
抗 OVA IgG, IgG1, IgG2a および IgE 産生の解析は、PBS (-)/PBS (-) 投与群および OVA/PBS (-) 投与群と比較して一元配置分散分析で有意差を検定し Dunnett's の多重比較検定法を実施した。有意水準 5%未満を有意差ありとした。

#### 4. 結果

##### 4-1 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgG 産生抑制に対する非晶質ナノシリカの効果

非晶質ナノシリカ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, day 21 における血清中の抗 OVA IgG を ELISA によって測定した (図 2-1). その結果, PBS (-) を経口投与した群 (PBS (-) 投与群) と比較すると, 免疫前に OVA を経口投与した群 (OVA 単独投与群) における抗 OVA IgG 産生は, 著明に抑制された (経口免疫寛容の誘導). 一方, OVA の対照抗原として HEL を経口投与した群 (HEL 投与群) では, PBS (-) 投与群とほぼ同程度の抗 OVA IgG 産生が認められ, 経口免疫寛容誘導における抗原特異性が認められた. 本 OVA 経口免疫寛容による抗 OVA IgG 産生抑制は, OVA を非晶質ナノシリカと併用して経口投与することによって用量依存的に阻害され, 10 mg 投与群においては有意な阻害効果が見られた. このことから, 非晶質ナノシリカは経口免疫寛容阻害作用を有することが示唆された.

図 2-1 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgG 産生抑制に対する nSP30 単回投与の阻害効果



データは mean  $\pm$  SEM (n=5) を示す

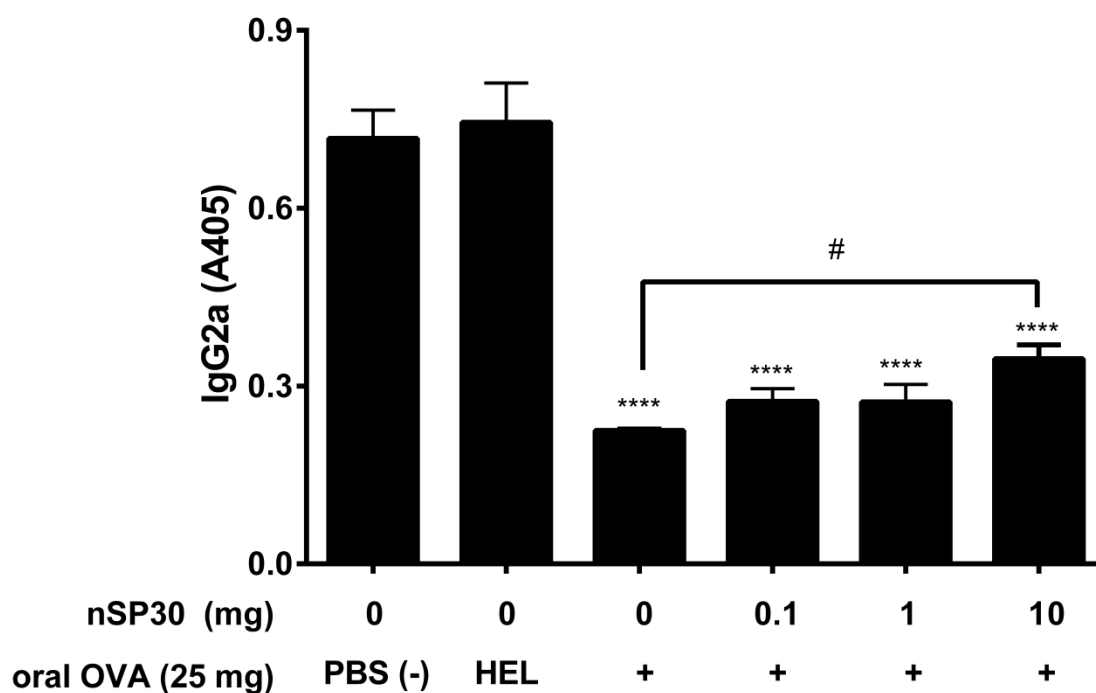
\*\*\*\* P<.0001 vs. PBS (-) / PBS (-) (Dunnett's test)

## P<.01, vs. OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

#### 4-2 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgG2a 産生抑制に対する非晶質ナノシリカの効果

Th1 経口免疫寛容に与える非晶質ナノシリカの影響について検討するため, day 21 における血清中の抗 OVA IgG2a を ELISA によって測定した (図 2-2). その結果, PBS (-) 投与群と比較すると, OVA 単独投与群における抗 OVA IgG2a 産生は有意に抑制された (Th1 経口免疫寛容の誘導). 本 OVA 経口免疫寛容による抗 OVA IgG2a 産生抑制は, 非晶質ナノシリカの投与によって有意差は認められなかったが, 用量依存的に阻害される傾向が見られ, 10 mg 投与群において有意に阻害された. このことから, 非晶質ナノシリカは Th1 経口免疫寛容の誘導を阻害する可能性が示唆された.

図 2-2 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgG2a 産生抑制に対する nSP30 単回投与の阻害効果



データは mean ± SEM (n=5) を示す

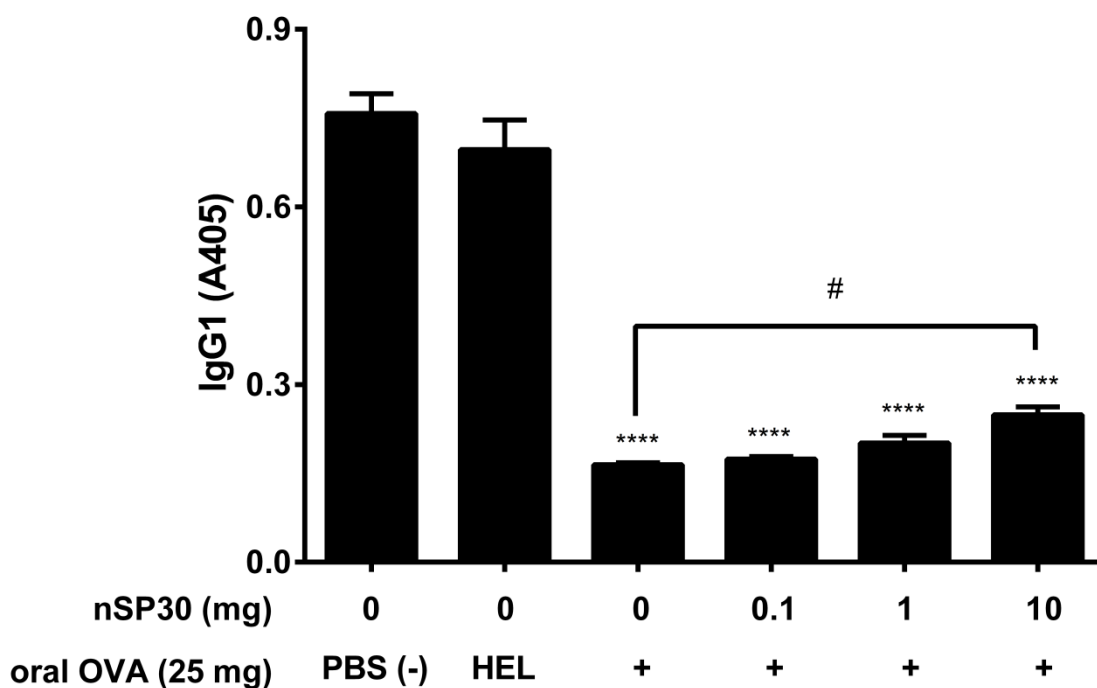
\*\*\*\* P<.0001 vs. PBS (-) / PBS (-) (Dunnett's test)

#P<.05, vs. OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

#### 4-3 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgG1 産生抑制に対する非晶質ナノシリカの効果

Th2 経口免疫寛容に与える非晶質ナノシリカの影響について検討するため, day 21 における血清中の抗 OVA IgG1 を ELISA によって測定した (図 2-3). その結果, PBS (-) 投与群と比較すると, OVA 単独投与群においては抗 OVA IgG1 産生は有意に抑制された (Th2 経口免疫寛容の誘導). 本 Th2 経口免疫寛容による抗 OVA IgG1 産生抑制は, 非晶質ナノシリカの併用投与によって用量依存的に阻害され, 10 mg 投与群において有意な阻害効果が見られた. このことから, 非晶質ナノシリカは Th2 経口免疫寛容の誘導を阻害する可能性が示唆された.

図 2-3 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgG1 産生抑制に対する nSP30 単回投与の阻害効果



データは mean  $\pm$  SEM (n=5) を示す

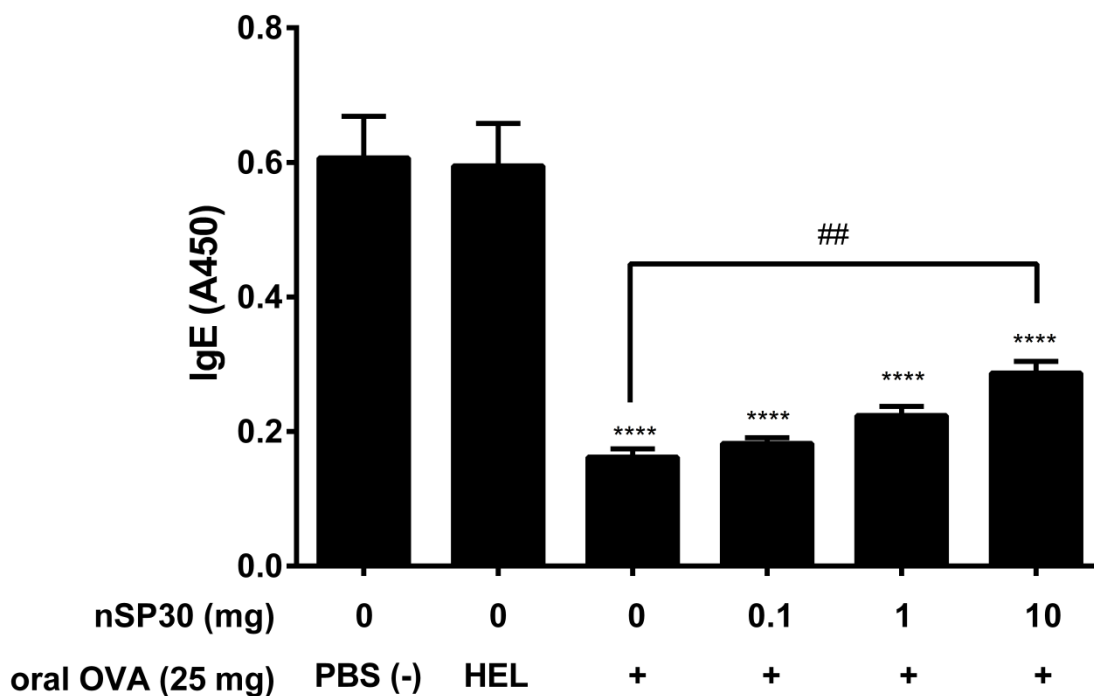
\*\*\*\* P<.0001 vs. PBS (-) / PBS (-) (Dunnett's test)

# P<.05 vs. OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

#### 4-4 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgE 産生抑制に対する非晶質ナノシリカの効果

Th2 経口免疫寛容に与える非晶質ナノシリカの影響について検討するため, day 21 における血清中の抗 OVA IgE を ELISA によって測定した (図 2-4). その結果, PBS (-) 投与群と比較すると, OVA 単独投与群において抗 OVA IgE 産生は有意に抑制された (Th2 経口免疫寛容の誘導). 本 Th2 経口免疫寛容による抗 OVA IgE 産生抑制は, 非晶質ナノシリカの併用投与によって用量依存的に阻害され, 10 mg 投与群において有意な阻害効果が見られた. このことから, 非晶質ナノシリカは Th2 経口免疫寛容の誘導を阻害する可能性が示唆された.

図 2-4 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgE 産生抑制に対する nSP30 単回投与の阻害効果



データは mean  $\pm$  SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P < .0001 vs. PBS (-) / PBS (-) (Dunnett's test)

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

#### 4-5 経口免疫寛容誘導による脾臓細胞増殖反応抑制に対する非晶質ナノシリカの効果

経口免疫寛容誘導による脾臓細胞増殖反応抑制に対する非晶質ナノシリカ (0.1, 1, 10 mg) の効果について検討した (表 2-4). その結果, OVA 単独投与群では, PBS (-) 投与群と比較して OVA 特異的な脾臓細胞増殖反応の抑制が見られた. 一方, HEL 投与群では, PBS (-) 投与群とほぼ同程度の OVA 特異的な脾臓細胞の増殖反応が認められた. このことから, これまでの実験結果と同様に, 免疫前の OVA 経口投与による抗原特異的な経口免疫寛容誘導を確認できた. 本増殖反応抑制に対する非晶質ナノシリカの影響については, 有意差は見られなかったが, 抗 OVA 抗体を測定した場合と同様, 用量依存的に阻害される傾向が見られた.

表 2-4 経口免疫寛容誘導による OVA 特異的脾臓細胞増殖反応抑制に対する nSP30 単回投与の阻害効果

非晶質ナノシリカ (mg)	増殖 (c.p.m./well)		
0 [PBS (-)]	17743	±	431
0 (HEL)	17138	±	417
0 (OVA)	1181	±	82
0.1	1118	±	29
1	1307	±	101
10	2220	±	79

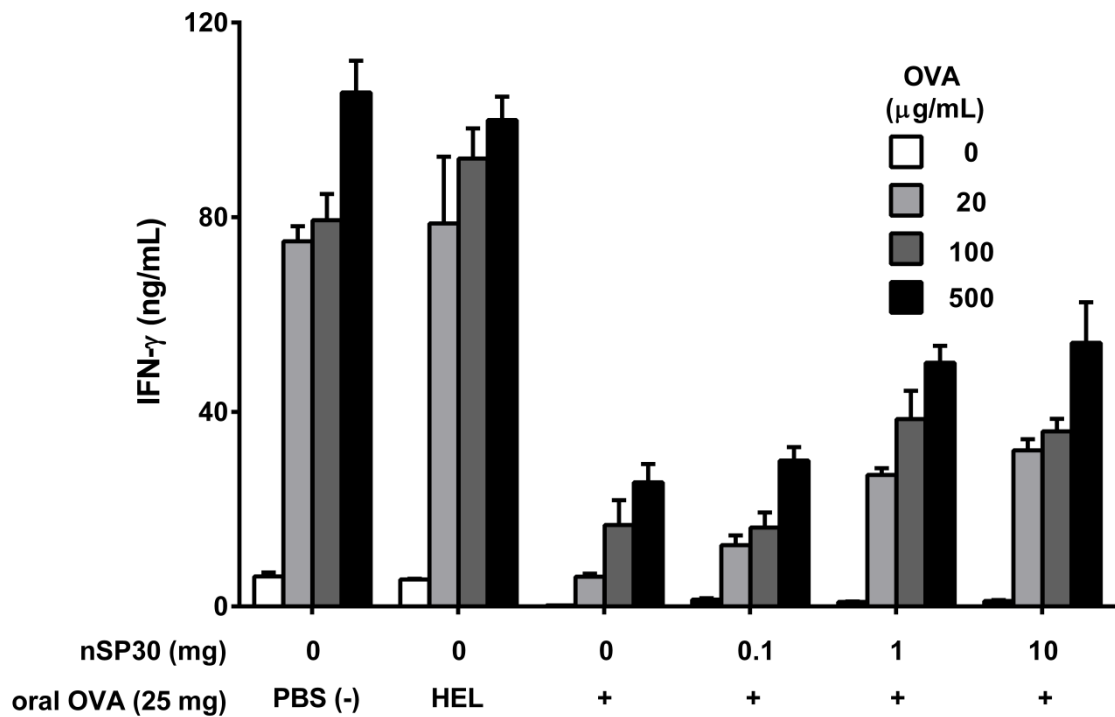
脾臓細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/well) を 2 日間培養後, methyl- $^3\text{H}$ -thymidine を添加し, 一晚培養した細胞の放射活性

データは mean  $\pm$  SEM (n=3) を示す

4-6 経口免疫寛容誘導による IFN- $\gamma$  産生抑制に対する非晶質ナノシリカの効果

脾臓細胞によって分泌される IFN- $\gamma$  を測定し、非晶質ナノシリカの Th1 経口免疫寛容の誘導に与える影響について検討した (図 2-5). その結果, PBS (-) 経口投与の場合と比較すると, OVA の経口投与によって Th1 細胞によって産生される IFN- $\gamma$  は減少した (Th1 経口免疫寛容の誘導). 非晶質ナノシリカ投与によって, IFN- $\gamma$  産生抑制は用量依存的に阻害される傾向が見られた. このことから, 抗 OVA IgG2a を測定した場合も見られたが, 本ナノ粒子は Th1 経口免疫寛容の誘導を阻害する可能性がある.

図 2-5 経口免疫寛容誘導による IFN- $\gamma$  産生抑制に対する nSP30 単回投与の阻害効果

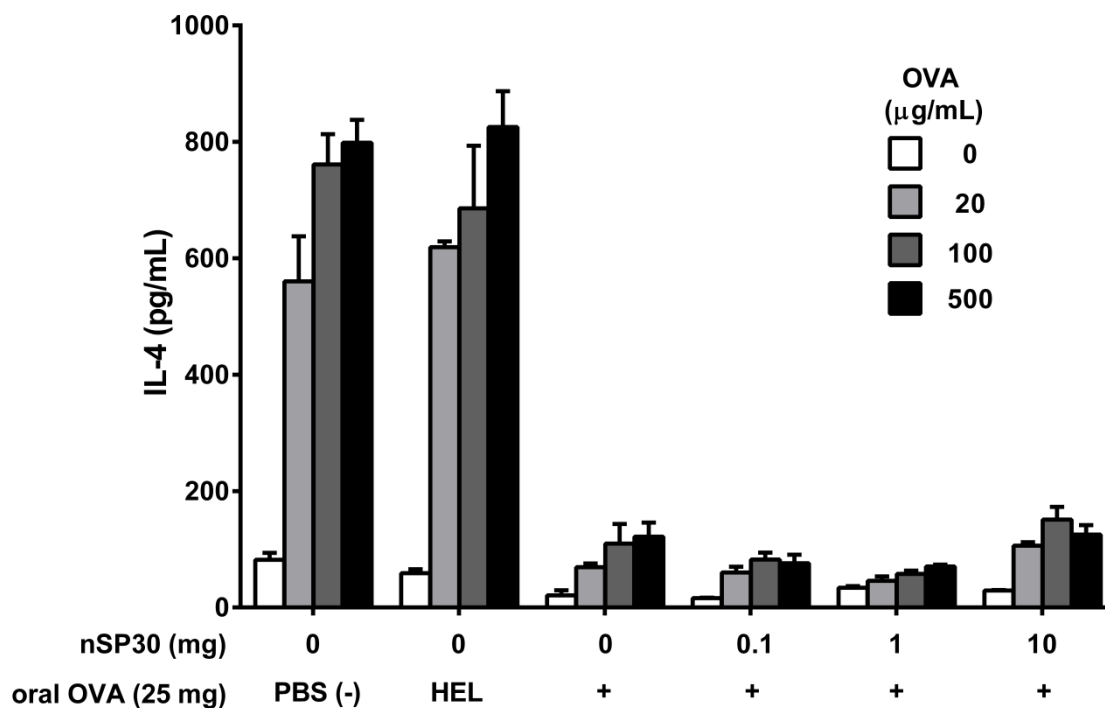


データは mean  $\pm$  SEM (n=3) を示す

4-7 経口免疫寛容誘導による IL-4, IL-5 および IL-10 産生抑制に対する非晶質ナノシリカの効果

脾臓細胞によって分泌される IL-4, IL-5 および IL-10 を測定し, 非晶質ナノシリカの Th2 経口免疫寛容の誘導に与える影響について検討した (図 2-6~2-8). その結果, OVA の経口投与によって Th2 細胞によって産生される IL-4, IL-5 および IL-10 は減少した (Th2 経口免疫寛容の誘導). OVA を非晶質ナノシリカと併用して経口投与することによって IL-5 および IL-10 産生抑制は阻害される傾向が見られたが, IL-4 産生抑制は影響を受けなかった. このことから, 本ナノ粒子は Th2 経口免疫寛容の誘導を阻害する可能性があるものの, 本試験条件下では影響が認められない Th2 サイトカインも存在することが明らかになった.

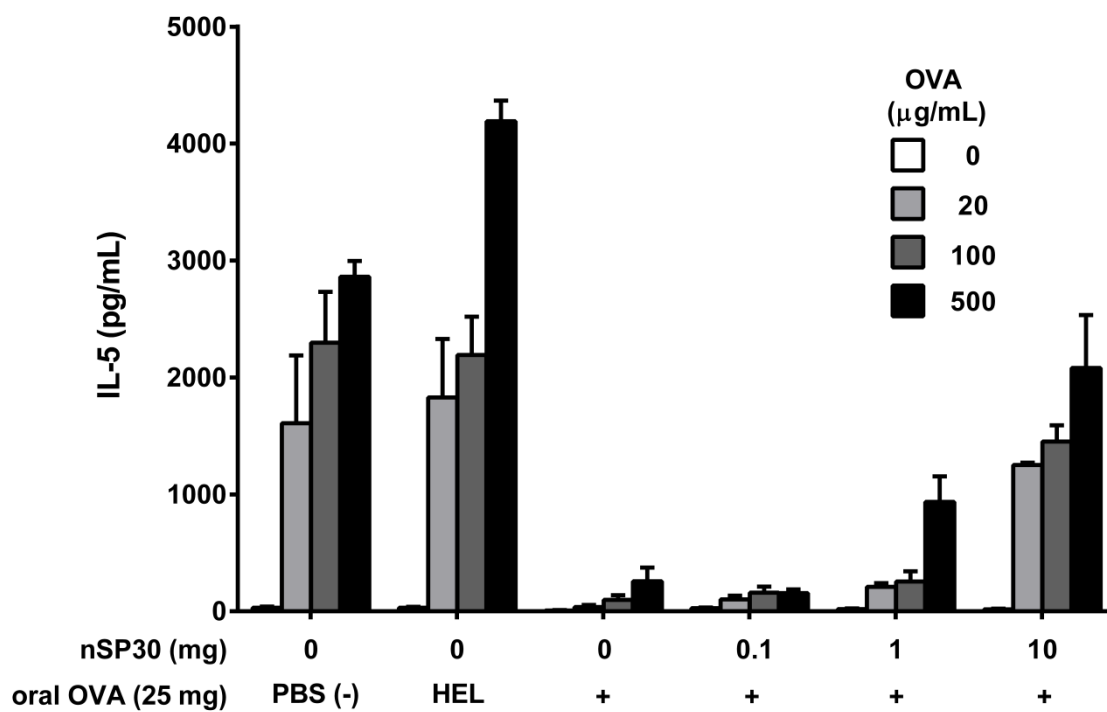
図 2-6 経口免疫寛容誘導による IL-4 産生抑制に対する nSP30 単回投与の阻害効果



データは mean ± SEM (n=3)を示す

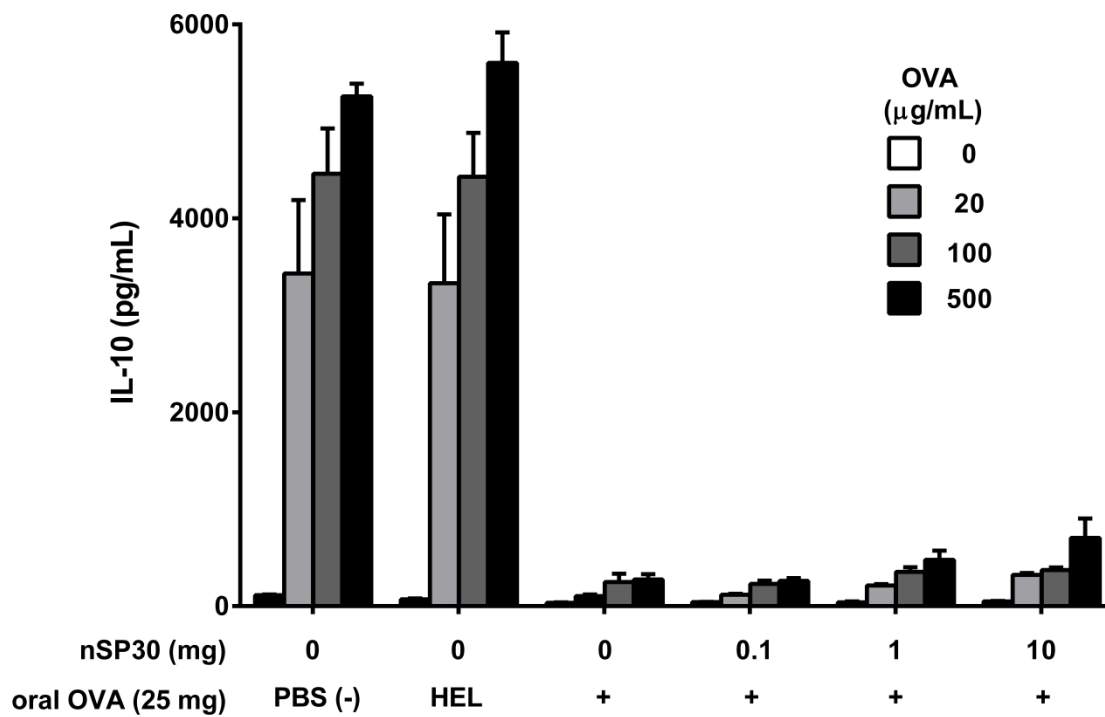


図 2-7 経口免疫寛容誘導による IL-5 産生抑制に対する nSP30 単回投与の阻害効果



データは mean ± SEM (n=3)を示す

図 2-8 経口免疫寛容誘導による IL-10 産生抑制に対する nSP30 単回投与の阻害効果

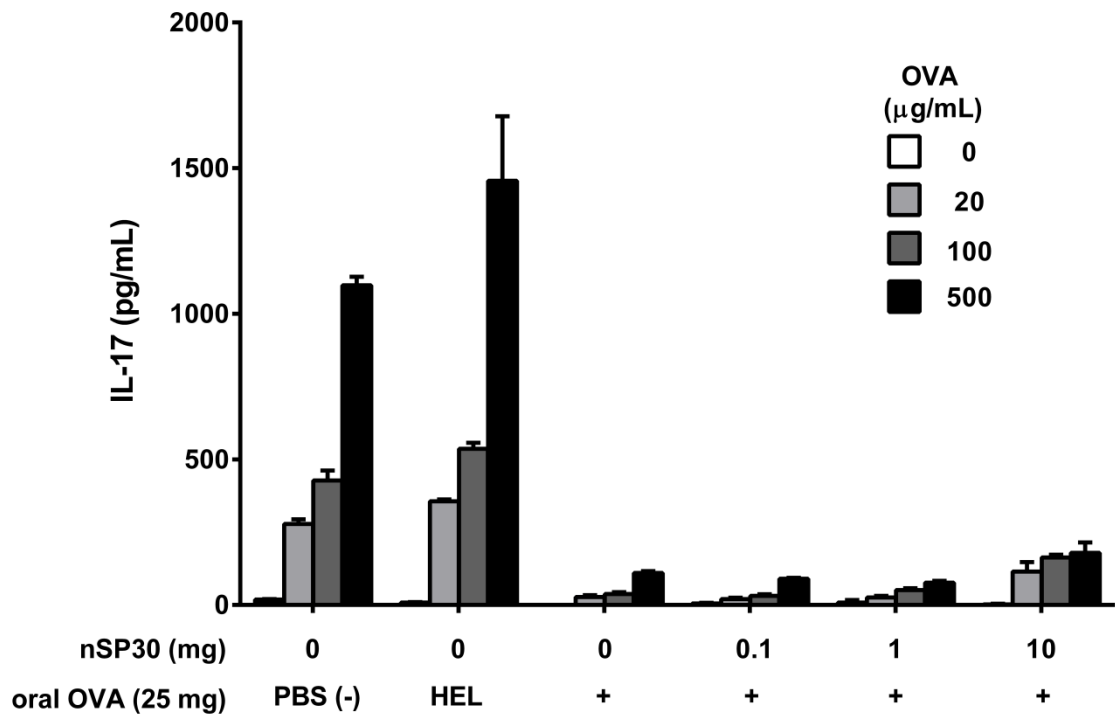


データは mean ± SEM (n=3)を示す

#### 4-9 経口免疫寛容誘導による IL-17 産生抑制に対する非晶質ナノシリカの効果

本研究では、まず、OVA 経口投与によって抗原特異的 Th17 免疫寛容が誘導されるかどうかについて検討し、次に Th17 経口免疫寛容が誘導された場合、本経口免疫寛容に対する非晶質ナノシリカの効果について調べた。OVA 経口投与後、脾臓細胞によって産生される IL-17 を測定した結果、本サイトカイン産生は抑制された (Th17 経口免疫寛容の誘導)。さらに非晶質ナノシリカ 10 mg 併用投与群において IL-17 産生抑制は阻害傾向が認められた。このことから、本ナノ粒子は Th17 経口免疫寛容の誘導を阻害する可能性が示唆された。

図 2-9 経口免疫寛容誘導による IL-17 産生抑制に対する nSP30 単回投与の阻害効果



データは mean ± SEM (n=3)を示す

## 第2節 非晶質ナノシリカ反復投与の経口免疫寛容誘導に対する影響

抗原 OVA 免疫 5 日前から、粒子径 30 nm の非晶質ナノシリカ (0.1, 1, 10 mg/マウス) を連続 5 日間経口投与し、本ナノ粒子の経口免疫寛容誘導に及ぼす影響について検討した。

### 1. 実験材料

- 1) 実験動物：8 週齢，SPF 雄性，BALB/cCr Slc マウス（日本エスエルシー株式会社）を用いた。
- 2) 試薬：非晶質ナノシリカは Micromod 社から購入した (表 1-2)。また，その他の試薬は本章第 2 節の表 1-3 に示したものをを用い，本章第 2 節 2. と同様に調製した。

### 2. 実験方法

#### 2-1 動物管理

本実験は塩野義製薬株式会社開発研究所の飼育域で行い，社内動物実験適正運用委員会の承認を得て実験を行った (本章第 2 節の 3. 3-1)。

#### 2-2 免疫

OVA を PBS (-) に溶解し (2 mg/mL)，免疫賦活剤である CFA を等量ずつ混合し，ホモジナイザー (NISSEI, AM-2) を用いて乳化した (1000 rpm, 3 分間)。ガラスシリンジおよび 24 G 注射針 (テルモ) を用いて 0.1 mL の抗原乳化液をイソフルラン麻酔下でマウス尾根部に皮下投与した (day 0)。

#### 2-3 免疫寛容誘導および非晶質ナノシリカの投与

経口免疫寛容に対する非晶質ナノシリカの影響を明らかにするため，以下の計 6 群を設定した (表 2-5)。ディスポーザブル経口ゾンデを装着した注射筒を用い，OVA 免疫 5 日前 (day -5) から前日 (day -1) まで 1 日 1 回 5 日間経口投与した (0.5 mL/マウス)。経口抗原 OVA と非晶質ナノシリカの併用投与は連続して行った。

表 2-5 群構成

群	経口抗原	抗原量 (mg)	事前投与の抗原との併用物質	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	非晶質ナノシリカ	0.1	5
5	OVA	25	非晶質ナノシリカ	1	5
6	OVA	25	非晶質ナノシリカ	10	5

#### 2-4 抗 OVA 抗体の測定

抗 OVA 抗体は本章第 2 節 3.3-4 に示した ELISA 法により測定した。

#### 2-5 サイトカインの測定

脾臓細胞を OVA と培養することによって産生されるサイトカインは本章第 2 節 3.3-5 に示した ELISA 法により測定した。

#### 2-6 脾臓細胞増殖反応

脾臓細胞増殖反応は本章第 2 節 3.3-5 に示した手法により測定した。

#### 2-7 統計解析

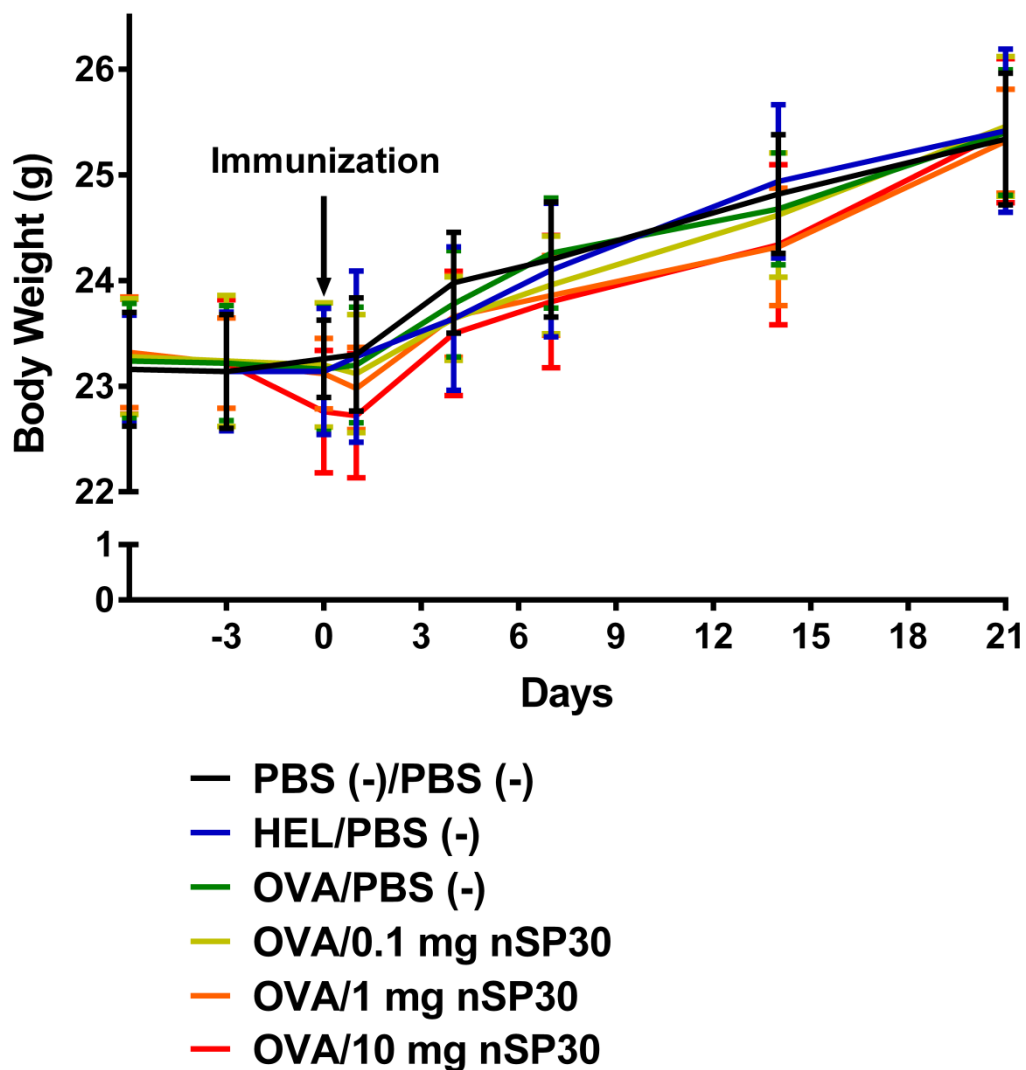
Day 21 の体重データは、PBS (-) 投与群と比較して一元配置分散分析で有意差を検定し Dunnett's の多重比較検定法を実施した。抗 OVA IgG, IgG1, IgG2a および IgE 産生の解析は、PBS (-)/PBS (-) 投与群および OVA/PBS (-) 投与群と比較して一元配置分散分析で有意差を検定し Dunnett's の多重比較検定法を実施した。有意水準 5%未満を有意差ありとした。

### 3. 結果

#### 3-1 抗原および非晶質ナノシリカ反復経口投与後の体重変化

OVA および非晶質ナノシリカ反復投与後の各群における平均体重変化を図 2-10 に示した。非晶質ナノシリカ高用量投与群では、一過性の体重減少が認められたが、血清採取および脾臓採取した day 21 では各群の体重に有意差は認められなかった。

図 2-10 抗原および非晶質ナノシリカ反復経口投与後の体重変化

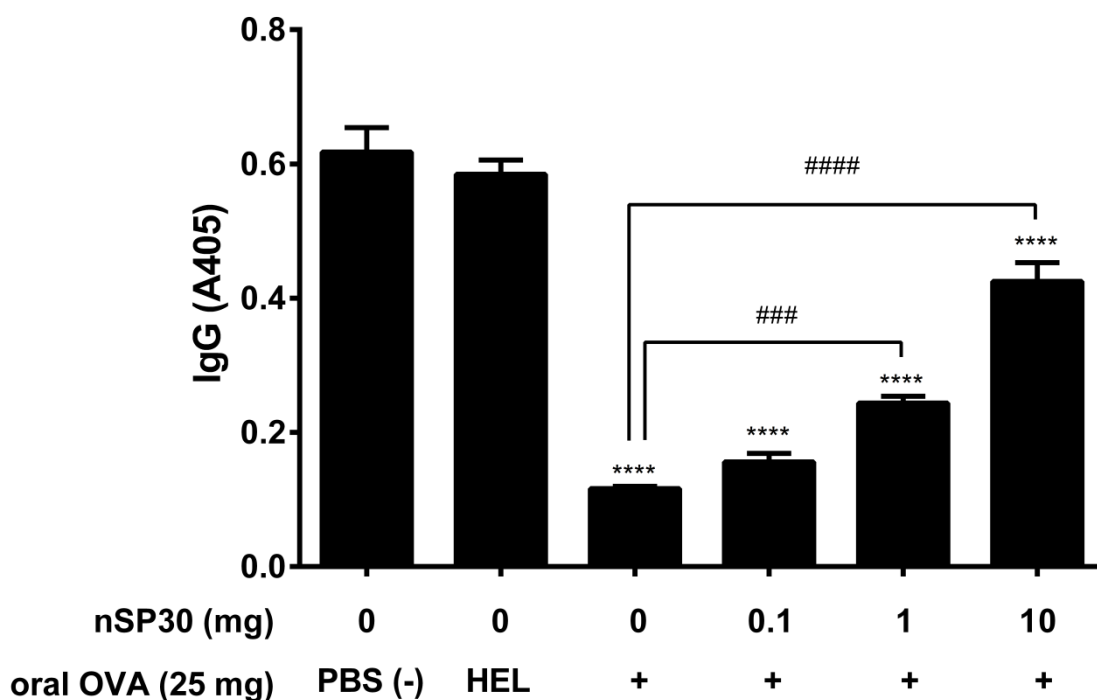


データは mean  $\pm$  SEM (n=5)を示す

### 3-2 経口免疫寛容誘導による抗 OVA 抗体産生抑制に対する非晶質ナノシリカ反復投与の効果

非晶質ナノシリカ反復投与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、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 2-11~2-14). その結果, PBS (-) 投与群と比較し, OVA 単独投与群においては抗 OVA IgG, IgG2a, IgG1, IgE 抗体産生の有意な抑制が見られた (Th1 および Th2 経口免疫寛容の誘導). OVA 経口投与によるこれらの抗 OVA 抗体産生抑制は, OVA と非晶質ナノシリカとの併用投与 (1, 10 mg) によって有意に阻害され, 本阻害効果は用量依存的であった. このことは, 非晶質ナノシリカ単回投与時の実験結果 (本章第 1 節)と同様, 非晶質ナノシリカが Th1 および Th2 経口免疫寛容誘導を阻害することを示唆している. また本結果を非晶質ナノシリカ単回投与時の結果と比較すると, 経口免疫寛容誘導阻害効果の増強が認められた. このことから経口免疫寛容誘導に対する非晶質ナノシリカの阻害効果は, 反復投与により増強する可能性が示唆された.

図 2-11 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgG 産生抑制に対する nSP30 反復投与の阻害効果

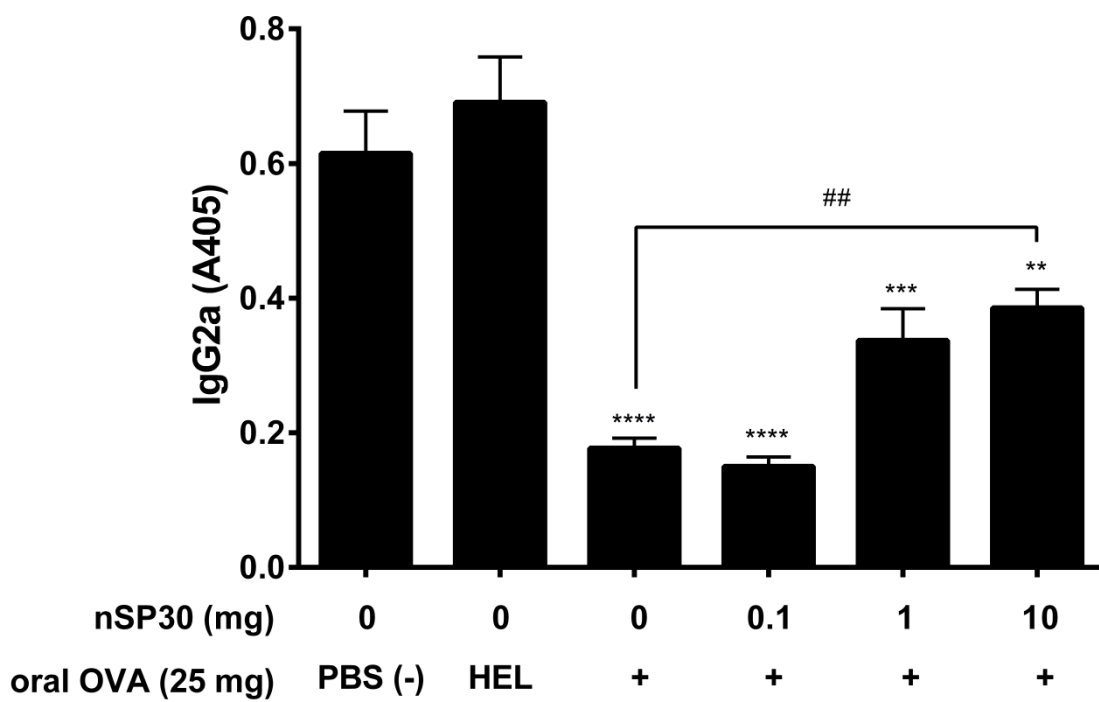


データは mean ± SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P<.0001 vs. PBS (-) / PBS (-) (Dunnett's test)

### P<.001, #### P<.0001 vs. OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

図 2-12 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgG2a 産生抑制に対する nSP30 反復投与の阻害効果



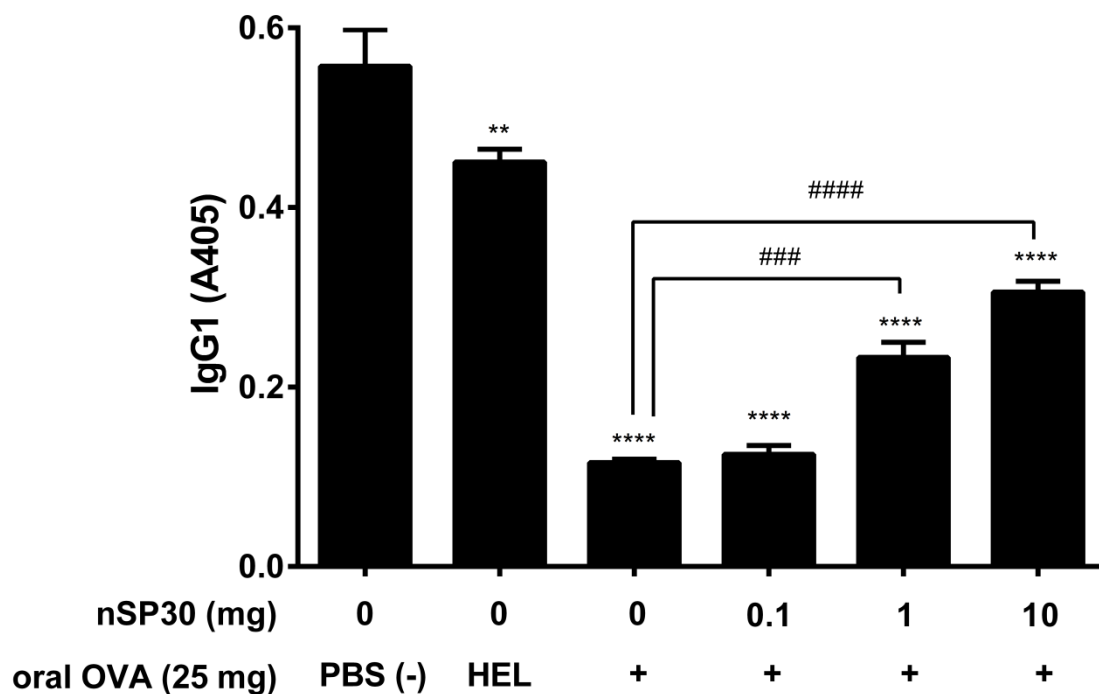
データは mean ± SEM (n=5) を示す

\*\* P<.01, \*\*\* P<.001, \*\*\*\* P<.0001 vs. PBS (-) / PBS (-) (Dunnett's test)

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



図2-13 経口免疫寛容誘導による抗OVA IgG1産生抑制に対するnSP30反復投与の阻害効果

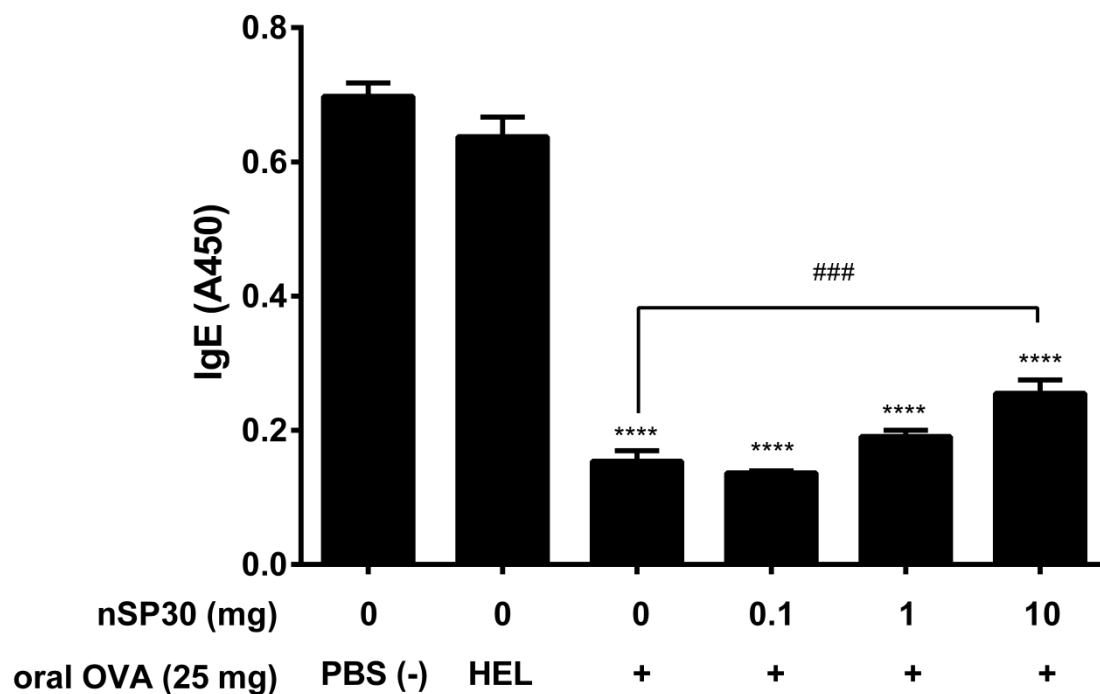


データは mean ± SEM (n=5) を示す

\*\* P<.01, \*\*\*\* P<.0001 vs. PBS (-) / PBS (-) (Dunnett's test)

### P<.001, #### P<.0001 vs. OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

図 2-14 経口免疫寛容誘導による抗 OVA IgE 産生抑制に対する nSP30 反復投与の阻害効果



データは mean ± SEM (n=5) を示す

\*\*\*\* P < 0.0001 vs. PBS (-) /PBS (-) (Dunnett's test)

### P < 0.001 vs. OVA/ PBS (-) (Dunnett's test)

### 3-6 経口免疫寛容誘導による脾臓細胞増殖反応抑制に対する非晶質ナノシリカ反復投与の効果

非晶質ナノシリカ反復投与 (0.1, 1, 10 mg) の脾臓細胞増殖反応に対する効果について検討した (表 2-6). その結果, OVA 単独投与群においては OVA 特異的な脾臓細胞増殖反応の抑制が見られたが, OVA と非晶質ナノシリカとの併用投与群において本細胞増殖反応抑制は用量依存的に阻害された. 非晶質ナノシリカ単回投与時の結果と比較すると, 脾臓細胞増殖反応抑制阻害効果の増強していた. このことは, これまでの実験結果と同様, 経口免疫寛容誘導に対する非晶質ナノシリカの阻害効果は, 反復投与により増強されることを示唆している.

表 2-6 経口免疫寛容誘導による OVA 特異的脾臓細胞増殖反応抑制に対する nSP30 反復投与の阻害効果

非晶質ナノシリカ (mg)	増殖 (c.p.m./well)		
0 [PBS (-)]	16014	±	609
0 (HEL)	14581	±	313
0 (OVA)	961	±	54
0.1	1066	±	46
1	2055	±	96
10	6702	±	236

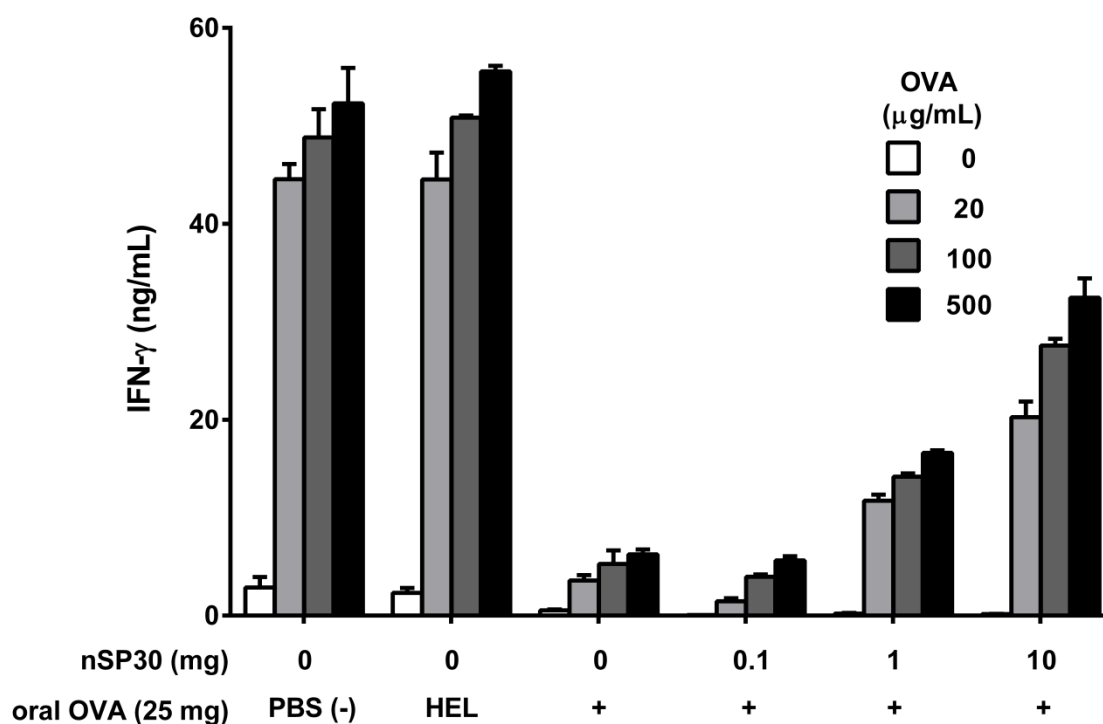
脾臓細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/well) を 2 日間培養後, methyl- $^3\text{H}$ -thymidine を添加し, 一晚培養した細胞の放射活性

データは mean  $\pm$  SEM (n=3) を示す

### 3-7 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非晶質ナノシリカ反復投与の効果

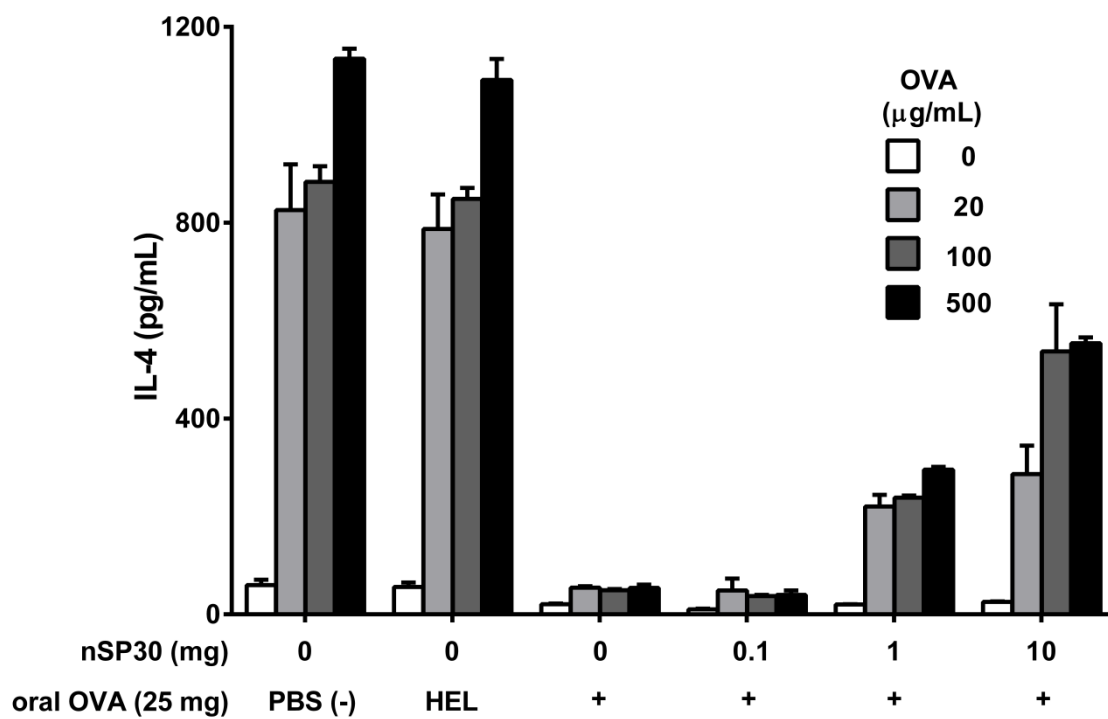
まず、経口免疫寛容誘導による Th1 および Th2 サイトカイン産生抑制に対する非晶質ナノシリカ反復投与の効果について検討した。その結果、OVA 経口投与によって抑制された IFN- $\gamma$  (Th1 サイトカイン) および IL-4, IL-5 (Th2 サイトカイン) 産生は非晶質ナノシリカを併用して反復投与することによって用量依存的に阻害され、本抑制は非晶質ナノシリカを単回投与した場合よりも強かった (図 2-15~2-17)。次に、経口免疫寛容誘導による Th17 サイトカイン産生抑制に対する非晶質ナノシリカ反復投与の効果について検討したところ、経口免疫寛容誘導による IL-17 産生抑制も、非晶質ナノシリカを併用して反復投与することによって用量依存的に阻害され、IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 の場合と同様に、本抑制は非晶質ナノシリカを単回投与した場合よりも強かった (図 2-18)。このように、非晶質ナノシリカの反復投与による経口免疫寛容阻害の更なる増強はサイトカインレベルでも明らかにされた。

図 2-15 経口免疫寛容誘導による IFN- $\gamma$ 産生抑制に対する nSP30 反復投与の阻害効果



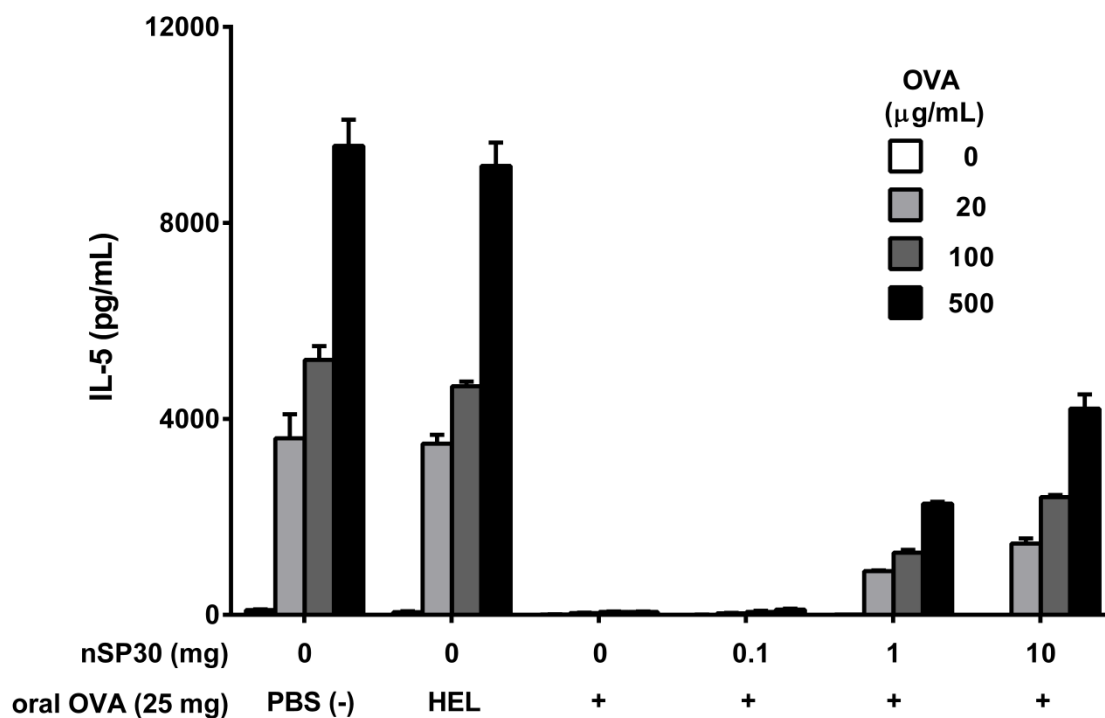
データは mean  $\pm$  SEM (n=3)を示す

図 2-16 経口免疫寛容誘導による IL-4 産生抑制に対する nSP30 反復投与の阻害効果



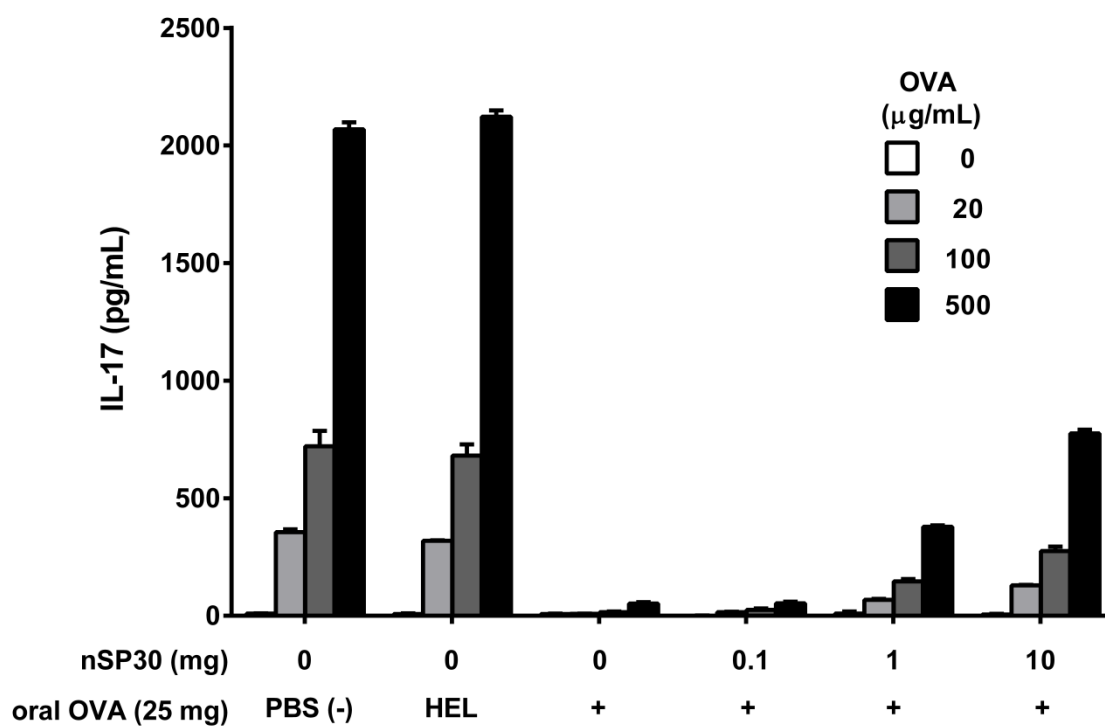
データは mean ± SEM (n=3)を示す

図 2-17 経口免疫寛容誘導による IL-5 産生抑制に対する nSP30 反復投与の阻害効果



データは mean ± SEM (n=3) を示す

図 2-18 経口免疫寛容誘導による IL-17 産生抑制に対する nSP30 反復投与の阻害効果



データは mean ± SEM (n=3) を示す

### 第3節 考察

本章では、非晶質ナノシリカ (平均粒子径 : 33 nm) の経口免疫寛容誘導に対する影響について検討した。まず抗原 OVA 免疫 5 日前に、非晶質ナノシリカ (0.1, 1, 10 mg/マウス) を OVA 単独あるいは OVA と併用して単回経口投与し、非晶質ナノシリカの経口免疫寛容誘導に及ぼす影響について検討した。その結果、OVA 経口投与による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、非晶質ナノシリカとの併用投与によって阻害される傾向が認められた。そこで非晶質ナノシリカの反復投与による経口免疫寛容誘導への影響を検証するため、抗原 OVA 免疫 5 日前から、非晶質ナノシリカ (0.1, 1, 10 mg/マウス) を連続 5 日間経口投与し、非晶質ナノシリカの本免疫寛容誘導に及ぼす影響について検討した。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は、非晶質ナノシリカの併用投与によって用量依存的に有意に阻害され、非晶質ナノシリカ単回投与時と比較すると、経口免疫寛容誘導阻害作用の増強が認められた。このことから、非晶質ナノシリカは経口免疫寛容誘導を阻害し、その阻害効果は反復投与により増強する可能性が示唆された。

次に非晶質ナノシリカの Th1, Th2 および Th17 経口免疫誘導に対する効果について検討した。細胞性免疫の指標である Th1 型の抗 OVA IgG2a 抗体および液性免疫の指標である Th2 型の抗 OVA IgG1 および IgE 抗体を測定した結果、OVA 単独の経口投与によってこれらアイソタイプの抗体産生は全て抑制されたが、これら抗体産生抑制は OVA・非晶質ナノシリカ併用投与によって阻害され、本阻害効果は非晶質ナノシリカ用量依存的であった。さらに、*in vitro* において脾臓細胞による Th1 (IFN- $\gamma$ ), 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 の連続 5 日間経口投与によって抑制されたが、これらサイトカインもまた全て非晶質ナノシリカとの併用投与によって阻害された。このことから、非晶質ナノシリカは Th1, Th2 および Th17 経口免疫寛容誘導を阻害することが示唆された。非晶質ナノシリカによって経口免疫寛容誘導が阻害されることは、本ナノ粒子が食物アレルギー、喘息等のアレルギー性疾患および関節リウマチ等の自己免疫疾患を誘発する要因となり得る可能性を示唆している。

経口免疫寛容誘導が阻害され、経口抗原に対する免疫学的感作が成立する機序 (食物アレルギーの発症機序) として、消化管におけるタンパク質の透過を防ぐ機構 (腸管バリア機能) の関与が示唆されている。例えば乳幼児は腸管バリア機能が未熟であるため、食物アレルギーの頻度が高いことが知られている[76]。腸管バリアはデスモソーム、アドヒージョンジャンクション、タイトジャンクションという 3 つの細胞間接着機構によって制御されている[77]。特にタイトジャンクションは種々の外的、内的因子の影響を受けやすく、食物アレルギーの病態形成に強く関与していることが示唆されている[78, 79]。TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 等の炎症性サイトカインは Zo-1, occludin, claudin 等のタイトジャンクションを形成するタンパク質の発現、機能を低下させ、上皮細胞のアポトーシスを誘導することによって、腸管上皮細胞のタンパク質透過性を亢進させることが報告されている[80]。非晶質ナノシリカは炎



症性サイトカイン産生を誘導することが知られており[42, 81], 腸管バリア機能の低下を介して経口免疫寛容誘導が破綻する可能性が考えられる. またナノ粒子は粒子サイズが小さいほど単位重量当たりの表面積が増大し, タンパク質との親和性が向上する. そのため OVA・非晶質ナノシリカ併用投与によって OVA の輸送および細胞内取り込みに影響を及ぼし, 経口免疫寛容誘導が破綻した可能性もある.

非晶質ナノシリカは食品添加物 (例: 凝固防止剤) として広く使用されている. 食品に含まれる非晶質ナノシリカの主流は 30 nm 前後であるが, 今後, サイズの微小化とそれに伴う機能の向上はさらに進行すると予想される. ヒトの 1 日シリカ摂取量は少なくとも 124 mg/day であると推定されている[82]. 今回の実験において, 10 mg/mouse/day の nSP30 で有意な経口免疫寛容誘導の破綻が認められた. 体重換算するとヒト (70 kg) では約 30 g/day となるので, 現実的には, 毎日この量に曝露されることはないと思われる. しかしながら, 非晶質ナノシリカは我々の生活に浸透し, 老若男女, 妊婦を問わず長期曝露による体内蓄積は避けられない状況にあり, その安全性確保, さらには安全な非晶質ナノシリカの設計が急務となっている. 一方で, 非晶質ナノシリカの表面修飾により, 誘導される炎症反応が抑制される等, 非晶質ナノシリカの表面性状の適切な制御が安全な非晶質ナノシリカの設計指針になり得ることが報告されている[42]. ヒトの健康への影響が疑われるナノマテリアルを単に規制するのではなく, 表面修飾等により安全なものに仕立てあげ, 有効活用に結び付けていくことが何よりも重要である. 今後, 非晶質ナノシリカによる経口免疫寛容誘導抑制機序の詳細な解析を通じて, 安全なナノマテリアルの開発およびナノマテリアルの恩恵を最大限に享受した豊かな社会の実現に繋がることを強く祈念している.

## 結語

OVA 免疫後，産生される抗 OVA IgG サブクラスおよびサイトカインを測定することにより，非晶質ナノシリカの Th1, Th2, および Th17 免疫反応に対する効果について検討した。その結果，以下の新しい知見を得た。

- 1) 非晶質ナノシリカは，30  $\mu\text{g}$  以上で Th1, Th2, および Th17 全ての免疫応答に対してアジュバント効果を示す。
- 2) 非晶質ナノシリカのアジュバント効果は，粒子の微小化に伴い増強する。

経口免疫寛容誘導によって抑制される抗原特異的抗体サブクラスおよびサイトカイン産生に対する非晶質ナノシリカの影響について検討した。その結果，以下の知見を得た。

- 1) 非晶質ナノシリカは，1 mg 以上で Th1, Th2, および Th17 経口免疫寛容誘導を阻害する。
- 2) 非晶質ナノシリカを反復投与することで，経口免疫寛容誘導に対する阻害効果は増大する。

以上，本研究では，非晶質ナノシリカが免疫系へ影響を及ぼすことを実証した。今後は，本研究で得られた知見を基盤として，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。

## 謝辞

本研究を行うに当たり、神戸薬科大学薬理学講座 吉野伸教授には御懇切な御指導、御鞭撻を賜るとともに、終始温かい御配慮を賜りました。ここに衷心より深甚なる感謝の意を表します。

本論文の審査に当たり、有益なご指導並びにご助言を賜りました本学微生物化学講座の小西守周教授、薬剤学講座の岩川精吾教授、病態生化学講座の加藤郁夫教授に深く感謝いたします。

最後に、長きにわたり物心両面で支えてくれた家族に心より感謝いたします。

## 参考文献

1. Borm P, Klaessig FC, Landry TD, Moudgil B, Pauluhn J, Thomas K, Trottier R, Wood S: **Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part V: role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles.** *Toxicol Sci* 2006, **90**:23–32.
2. Xia T, Kovoichich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE: **Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm.** *Nano Lett* 2006, **6**:1794–807.
3. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N: **Toxic potential of materials at the nanolevel.** *Science* 2006, **311**:622–7.
4. Fukasawa M: **Liposomal Amphotericin B.** *Jpn. J. Med. Mycol.* 2005, **46**:229–231.
5. Adler-moore JP, Proffitt RT: **Development, Characterization, Efficacy and Mode of Action of Ambisome, A Unilamellar Liposomal Formulation of Amphotericin B.** *J Liposome Res* 1993, **3**:429–450.
6. Zhao Y, Xing G, Chai Z: **Nanotoxicology: Are carbon nanotubes safe?** *Nat Nanotechnol* 2008, **3**:191–2.
7. Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J: **Induction of mesothelioma in p53<sup>+/-</sup> mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube.** *J Toxicol Sci* 2008, **33**:105–16.
8. Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WAH, Seaton A, Stone V, Brown S, Macnee W, Donaldson K: **Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study.** *Nat Nanotechnol* 2008, **3**:423–8.
9. Morishige T, Yoshioka Y, Tanabe A, Yao X, Tsunoda S-I, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S: **Titanium dioxide induces different levels of IL-1 $\beta$  production dependent on its particle characteristics through caspase-1 activation mediated by reactive oxygen species and cathepsin B.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **392**:160–5.
10. Contado C: **Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical problem.** *Front Chem* 2015, **3**:48.
11. Fruijtier-Pölloth C: **The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica—A nanostructured material.** *Toxicology* 2012, **294**:61–79.
12. 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.
13. Granum B, Gaarder PI, Groeng E, Leikvold R-B, Namork E, Løvik M: **Fine particles of widely different composition have an adjuvant effect on the production of allergen-specific antibodies.** *Toxicol Lett* 2001, **118**:171–181.
14. Germain RN: **T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:309–322.
15. Zhu J, Yamane H, Paul WE: **Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*).** *Annu Rev Immunol* 2010, **28**:445–89.
16. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T: **Microbial Lipopeptides Induce the Production of IL-17 in Th Cells.** *J Immunol* 2000, **165**:6107–6115.
17. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK: **Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.** *Nature* 2006, **441**:235–8.
18. Steinman L: **A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage.** *Nat Med* 2007, **13**:139–45.
19. Aarvak T, Chabaud M, Miossec P, Natvig JB, Jacob B: **IL-17 is produced by some proinflammatory Th1/Th0 cells but not by Th2 cells.** *J Immunol* 1999, **162**:1246–51.
20. Moran EM, Mullan R, McCormick J, Connolly M, Sullivan O, Fitzgerald O, Bresnihan B, Veale DJ, Fearon U: **Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, Oncostatin M and response to biologic therapies.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**:R113.
21. Hu L, Edamatsu H, Takenaka N, Ikuta S, Kataoka T: **Crucial role of phospholipase Cepsilon in induction of local skin inflammatory reactions in the elicitation stage of allergic contact hypersensitivity.** *J Immunol* 2010, **184**:993–1002.
22. Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, Li D, Zhang G, Huang B, Feng Z-H: **IL-17-Producing Alveolar Macrophages Mediate Allergic Lung Inflammation Related to Asthma.** *J Immunol* 2008, **181**:6117–6124.
23. 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.

24. Yoshino S, Yamaki K, Yanagisawa R, Takano H, Hayashi H, Mori Y: **Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of lymphoid cells, and TH1 and TH2 immune responses in mice.** *Br J Pharmacol* 2003, **138**:1271–6.
25. Rocha B, von Boehmer H: **Peripheral selection of the T cell repertoire.** *Science* 1991, **251**:1225–8.
26. Kiyono H, Fukuyama S: **NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity.** *Nat Rev Immunol* 2004, **4**:699–710.
27. Garside P, Mowat AM, Khoruts A: **Oral tolerance in disease.** *Gut* 1999, **44**:137–42.
28. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG: **A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis.** *Nature* 1997, **389**:737–42.
29. Whitacre CC, Gienapp IE, Orosz CG, Bitar DM: **Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy.** *J Immunol* 1991, **147**:2155–63.
30. Fujihashi K, Dohi T, Rennert PD, Yamamoto M, Koga T, Kiyono H, McGhee JR: **Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:3310–5.
31. Yoshida T, Yoshioka Y, Takahashi H, Misato K, Mori T, Hirai T, Nagano K, Abe Y, Mukai Y, Kamada H, Tsunoda S-I, Nabeshi H, Yoshikawa T, Higashisaka K, Tsutsumi Y: **Intestinal absorption and biological effects of orally administered amorphous silica particles.** *Nanoscale Res Lett* 2014, **9**:532.
32. Yoshino S, Ohsawa M, Sagai M: **Diesel exhaust particles block induction of oral tolerance in mice.** *J Pharmacol Exp Ther* 1998, **287**:679–83.
33. Li S-D, Huang L: **Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles.** *Mol Pharm* , **5**:496–504.
34. Fang C, Shi B, Pei Y-Y, Hong M-H, Wu J, Chen H-Z: **In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor-alpha-loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size.** *Eur J Pharm Sci* 2006, **27**:27–36.
35. Cuña M, Alonso-Sandel M, Remuñán-López C, Pivel JP, Alonso-Lebrero JL, Alonso MJ: **Development of phosphorylated glucomannan-coated chitosan nanoparticles as nanocarriers for protein delivery.** *J Nanosci Nanotechnol* , **6**:2887–95.
36. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, Jahnke-Dechent W: **Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles.** *Small* 2007, **3**:1941–9.
37. Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, 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, Tsunoda S, Tsutsumi Y: **Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica**

- nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie* 2010, **65**:199–201.
38. Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K: **Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2001, **175**:191–9.
39. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit J-P: **Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems.** *Biomaterials* 2006, **27**:4356–73.
40. Matsumura M, Nagata M, Nakamura K, Kawai M, Baba T, Yamaki K, Yoshino S: **Adjuvant effect of zinc oxide on Th2 but not Th1 immune responses in mice.** *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2010, **32**:56–62.
41. Hirai T, Yoshikawa T, Nabeshi H, Yoshida T, Tochigi S, Ichihashi K, Uji M, Akase T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Itoh N, Tsunoda S, Yoshioka Y, Tsutsumi Y: **Amorphous silica nanoparticles size-dependently aggravate atopic dermatitis-like skin lesions following an intradermal injection.** *Part Fibre Toxicol* 2012, **9**:3.
42. Morishige T, Yoshioka Y, Inakura H, Tanabe A, Narimatsu S, Yao X, Monobe Y, Imazawa T, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S: **Suppression of nanosilica particle-induced inflammation by surface modification of the particles.** *Arch Toxicol* 2012, **86**:1297–307.
43. Kusaka T, Nakayama M, Nakamura K, Ishimiya M, Furusawa E, Ogasawara K: **Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses.** *PLoS One* 2014, **9**:e92634.
44. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, Lekeux P, Coban C, Akira S, Ishii KJ, Bureau F, Desmet CJ: **DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity.** *Nat Med* 2011, **17**:996–1002.
45. Kool M, Willart M a M, van Nimwegen M, Bergen I, Pouliot P, Virchow JC, Rogers N, Osorio F, Reis e Sousa C, Reis E Sousa C, Hammad H, Lambrecht BN: **An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma.** *Immunity* 2011, **34**:527–40.
46. Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, Singh M, Tschopp J, Neill LAJO, Lavelle EC, Hagan DTO, Pe V, O'Hagan DT, Pétrilli V, O'Neill LAJ: **Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:870–5.
47. Granum B, Ivar P, Løvik M, Gaarder PI: **IgE adjuvant effect caused by particles - immediate and delayed effects.** *Toxicology* 2001, **156**:149–59.
48. Inoue K, Koike E, Yanagisawa R, Hirano S, Nishikawa M, Takano H: **Effects of multi-walled**

**carbon nanotubes on a murine allergic airway inflammation model.** *Toxicol Appl Pharmacol* 2009, **237**:306–16.

49. Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, Aritake K, Urade Y, Morimoto Y: **Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms.** *Immunity* 2011, **34**:514–26.

50. Coban C, Igari Y, Yagi M, Reimer T, Koyama S, Aoshi T, Ohata K, Tsukui T, Takeshita F, Sakurai K, Ikegami T, Nakagawa A, Horii T, Nuñez G, Ishii KJ, Akira S: **Immunogenicity of whole-parasite vaccines against Plasmodium falciparum involves malarial hemozoin and host TLR9.** *Cell Host Microbe* 2010, **7**:50–61.

51. Hirai T, Yoshioka Y, Takahashi H, Ichihashi K, Yoshida T, Tochigi S, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Nabeshi H, Yoshikawa T, Tsutsumi Y: **Amorphous silica nanoparticles enhance cross-presentation in murine dendritic cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2012, **427**:553–6.

52. Wottrich R, Diabaté S, Krug HF: **Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture.** *Int J Hyg Environ Health* 2004, **207**:353–61.

53. Nishimori H, Kondoh M, Isoda K, Tsunoda S-I, Tsutsumi Y, Yagi K: **Silica nanoparticles as hepatotoxicants.** *Eur J Pharm Biopharm* 2009, **72**:496–501.

54. Honda K, Littman DR: **The microbiome in infectious disease and inflammation.** *Annu Rev Immunol* 2012, **30**:759–95.

55. Wüthrich M, Gern B, Hung CY, Ersland K, Rocco N, Pick-Jacobs J, Galles K, Filutowicz H, Warner T, Evans M, Cole G, Klein B: **Vaccine-induced protection against 3 systemic mycoses endemic to North America requires Th17 cells in mice.** *J Clin Invest* 2011, **121**:554–68.

56. Lin J-S, Kummer LW, Szaba FM, Smiley ST: **IL-17 contributes to cell-mediated defense against pulmonary Yersinia pestis infection.** *J Immunol* 2011, **186**:1675–84.

57. Kumar P, Chen K, Kolls JK: **Th17 cell based vaccines in mucosal immunity.** *Curr Opin Immunol* 2013, **25**:373–80.

58. Bielinska AU, Gerber M, Blanco LP, Makidon PE, Janczak KW, Beer M, Swanson B, Baker JR: **Induction of Th17 cellular immunity with a novel nanoemulsion adjuvant.** *Crit Rev Immunol* 2010, **30**:189–99.

59. Takeuchi O, Akira S: **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell* 2010, **140**:805–20.

60. Coffman RL, Sher A, Seder RA: **Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work.** *Immunity* 2010, **33**:492–503.



61. Kool M, Petrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN, Tschopp J: **Cutting Edge: Alum Adjuvant Stimulates Inflammatory Dendritic Cells through Activation of the NALP3 Inflammasome.** *J Immunol* 2008, **181**:3755–3759.
62. Piggott DA, Eisenbarth SC, Xu L, Constant SL, Huleatt JW, Herrick CA, Bottomly K: **MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen.** *J Clin Invest* 2005, **115**:459–467.
63. Gavin AL, Hoebe K, Duong B, Ota T, Martin C, Beutler B, Nemazee D: **NIH Public Access.** 2007, **314**:1936–1938.
64. Kawai T, Akira S: **The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition.** *Int Immunol* 2009, **21**:317–37.
65. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell R a: **Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants.** *Nature* 2008, **453**:1122–6.
66. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald K a, Latz E: **Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization.** *Nat Immunol* 2008, **9**:847–56.
67. Aguilar F, Charrondiere UR, Dusemund B, Galtier P, Gilbert J, Gott DM, Grilli S, Guertler R, Kass GEN, Koenig J, Lambré C, Larsen J-C, Leblanc J-C, Mortensen A, Parent-Massin D, Pratt I, Rietjens IMCM, Stankovic I, P. Tobback, T. RAW: **Calcium silicate and silicon dioxide / silicic acid gel added for Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food.** *EFSA J* 2009, **1132**:1–24.
68. Safe EEG on V and M: **Safe upper levels for vitamins and minerals expert group on vitamins and minerals contents.** 2003, 306–12.
69. The OECD working party on chemicals pesticides and biotechnology: **Report of the workshop on risk assessment of manufactured nanomaterials in a regulatory context.** *Ser Saf Manuf Nanomater* 2010, **21**.
70. 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.
71. 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.
72. 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.

73. 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.

74. Weiner HL: **Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases.** *Immunol Today* 1997, **18**:335–43.

75. Gonnella PA, Kodali D, Weiner HL: **Induction of low dose oral tolerance in monocyte chemoattractant protein-1- and CCR2-deficient mice.** *J Immunol* 2003, **170**:2316–22.

76. Isolauri E, Kalliomäki M, Laitinen K, Salminen S: **Modulation of the maturing gut barrier and microbiota: a novel target in allergic disease.** *Curr Pharm Des* 2008, **14**:1368–75.

77. Groschwitz KR, Hogan SP: **Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis.** *J Allergy Clin Immunol* 2009, **124**:3–20.

78. Yu LC-H: **Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Food Hypersensitivity.** *J Allergy* 2012, **2012**:1–11.

79. Lerner A, Matthias T: **Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease.** *Autoimmun Rev* 2015, **14**:479–489.

80. Capaldo CT, Nusrat A: **Cytokine regulation of tight junctions.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1788**:864–71.

81. Li X, Hu Y, Jin Z, Jiang H, Wen J: **Silica-induced TNF-alpha and TGF-beta1 expression in RAW264.7 cells are dependent on Src-ERK/AP-1 pathways.** *Toxicol Mech Methods* 2009, **19**:51–8.

82. Dekkers S, Krystek P, Peters RJB, Lankveld DPK, Bokkers BGH, van Hoeven-Arentzen PH, Bouwmeester H, Oomen AG: **Presence and risks of nanosilica in food products.** *Nanotoxicology* 2011, **5**:393–405.