

**厚生労働科学研究費補助金(食の安全確保推進研究事業)  
分担研究報告書(平成26年度)**

**経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果について**

研究分担者： 曹 永暁 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部)  
研究分担者： 西川 秋佳 (国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター)  
研究代表者： 小川 久美子 (国立医薬品食品衛生研究所 病理部)  
研究協力者： 最上 知子 (国立医薬品食品衛生研究所 生化学部)  
研究協力者： 安達 玲子 (国立医薬品食品衛生研究所 生化学部)

**研究要旨：**

ナノ銀 (AgNP) の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び 90 日間反復投与毒性試験等において、肝臓や腎臓に軽度の変化が示されているものの、十分な評価は行われていない。AgNP のサイズによる毒性の違いに関連する情報はさらに少ない。また、免疫毒性についての報告は限られている。一方、AgNP は、食品・食品容器包装用途として経口曝露されるのみならず、消臭・殺菌剤として化粧品にも含まれており、皮膚からも曝露される。AgNP の経皮経口複合曝露による、免疫毒性の有無について検討する評価方法を確立するため、各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) の卵白アルブミン (OVA) との混合物の 1) 経皮曝露後、抗原である OVA を腹腔内投与、2) 経皮曝露後、OVA を強制経口内投与を行い、AgNP アジュバント活性の有無を調べる実験を実施した。また、各々 Alum 及びコレラトキシン (CT) をアジュバントの陽性候補物質として用いた。実験 1) 及び 2) 共に、いずれの OVA 処置群でも、感作 4 週後のマウス血清中の OVA 特異的な血中 IgG1 及び IgE が溶媒対照群 (Vehicle) 群と比較して有意に増加又は増加傾向を示したが、投与群間の差は認められなかった。抗原再曝露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン IL-2、IL-4、IL-5 及び IFN- $\gamma$  分泌について、群間に有意な変化は見られなかった。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の濾胞の数においては、Vehicle 群と比較して全投与群で増加または増加傾向が認められた。実験 1) について、Vehicle 群と比較して OVA 群、OVA+60 nm AgNP 群及び OVA+100 nm AgNP 群では惹起 30 分後の体温の有意な低下及び血中ヒスタミン濃度並びにアナフィラキシースコアの有意な高値が認められたが、投与群間に有意な変化は見られなかった。皮膚病変のスコアリングを行った結果、Vehicle 群と比較していずれの群においても有意な増加が認められなかった。実験 2) について、直腸内体温の変化において、惹起 30 分後、Vehicle 群と比較して OVA 群で低下傾向があったものの、いずれの群においても、有意な低下は見られなかった。惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度測定及び惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリング結果、群間に有意な変化は見られなかった。皮膚病変のスコアリングを行った結果、Vehicle 群と比較して OVA+100 nm AgNP 群で有意な増加が認められた。以上の結果から、OVA+AgNP の経皮曝露後、OVA を腹腔内または強制経口投与する本モデルにおいて、AgNP の明らかなアジュバント活性は認められなかった。今後、皮膚感作性試験の陽性対照物質や貼付する OVA 抗原の濃度などさらなる検討が必要であると考えられた。

キーワード：ナノ銀、経皮感作性、アジュバント効果、マウスモデル

**A. 研究目的**

ナノ銀 (AgNP) の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び 90 日間反復投与毒性試験等において、肝臓や腎臓に軽度の変化が示されているものの、十分な評価は行われていない (Bergin IL et. al., Int J Biomed Nanosci Nanotechnol. 2013;3. doi:

10.1504/IJBNN.2013.054515.)。また、免疫毒性についての報告は限られている (Shin S-Het al., Clinical and Experimental Otorhinolaryngology. 2012;4 (222-227))。AgNP のサイズによる毒性の違いについて、細胞を用いた検討では可能性が指摘されているが (Park MVDZ et. al., Biomaterials. 2011;32

(9810-9817) )、動物を用いた検討での報告はない。

一方、AgNP は、食品・食品容器包装用途として経口曝露されるのみならず、消臭・殺菌剤として化粧品にも含まれており、皮膚からも曝露される。金属はアレルギーの原因となりうるが、一般に、銀やチタンのアレルギーとしての性質は低いとされている。しかし、経口曝露では免疫寛容が成立する物質でも、ナノマテリアルとして経皮的に繰り返し曝露された後に、経口曝露されることにより、アレルギー反応が惹起される可能性や、他のアレルギー曝露に対してアジュバント効果を示す可能性の検討は十分ではない。

最近、ある特定の小麦タンパク質加水分解物（グルパール 19S）を含有する洗顔石鹸（茶のしずく石鹸：医薬部外品）の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告され、非常に大きな問題となっている。我々は、当所生化学部との共同研究で、即時型アレルギー誘発経皮感作モデル実験系を用いると、小麦タンパク質加水分解物の経皮感作性、及び種々の要因が経皮感作性に与える影響について解析ができ、被験物質をマウス皮膚曝露後に腹腔内投与によって惹起させると、所属リンパ節の腫大を伴うアレルギー反応を示す事を病理組織学的に見いだしてきた。

本研究では、AgNP の経皮経口複合曝露による、免疫毒性の有無について検討する評価方法を確立するため、各サイズの AgNP（直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm）の卵白アルブミン（OVA）との混合物の 1）経皮曝露後、抗原である OVA を腹腔内投与、2）経皮曝露後、OVA を強制経口投与し、AgNP アジュバント活性の有無を調べる実験を実施した。

## B . 研究方法

### 実験 1)

AgNP の経皮感作、腹腔内投与惹起による免疫毒性に関して、アジュバント効果及び AgNP のサイズによる影響についても合わせて検討するため、OVA を Alum 又は各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) を混合して処置する群を設定し、感作及び惹起に関する比較を行った。

動物実験は Adachi ら (Allergy. 2012;67 (1392-1399)) の方法に準じて実施した。

AgNP は nanoComposix 社の銀ナノ粒子(直径 10 nm (AGCB10)、60 nm (AGCB60) 及び 100 nm

(AGCB100)、濃度 1 mg/ml) を用いることとした。抗原懸濁液は OVA (SIGMA A5503) 及び Alum (LSL LG-6000) 又は AgNP を各々 0.1、0.25 及び 0.049 mg/50  $\mu$ L /マウスとなるよう 2 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.4-7.6) に加えて投与する前に調製した。

動物は、7週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料を給餌した。1群の匹数は5匹とし、各群は以下の通りに構成した、Vehicle 群、OVA 群、OVA + Alum 群、OVA + 10 nm AgNP、OVA + 60 nm AgNP、OVA + 100 nm AgNP (Figure 1)。8週齢時に背面片側を剃毛し (Day 0)、翌日より3日間被験物質懸濁液を剃毛部に貼付して経皮感作を行った (Day 1-3)。抗原懸濁液の貼付には、パッチテスター「トリイ」(鳥居薬品株式会社) を 2 cm 角に切り取ったものを用い、パッド部に 50  $\mu$ L の抗原懸濁液を浸潤させ剃毛部に貼付した。パッチの上からサージカルテープを巻いてパッチを保護し、さらにマウスの首にエリザベスカラーを装着してパッチの剥脱を防いだ。3日間の感作後にパッチを外し (Day 4)、その後4日間休ませるという操作を1クールとし、4クールの感作後、血中の OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体を ELISA 法で測定した。アレルギー反応の惹起は Day 25 に、感作抗原 1 mg を腹腔内投与して行った。腹腔内投与後 30 分間のマウスの直腸内体温変化及びアナフィラキシー症状を観察し、症状については基準に従ってスコアリングした。また、惹起 30 分後に麻酔下で全血を採取し、血漿中ヒスタミンの濃度を、Histamine EIA Kit (SPI-B10) にて測定した。解剖時に採取した脾臓細胞は再懸濁後、OVA (最終濃度 10  $\mu$ g/ml) を添加、37 $^{\circ}$ C 24 時間、又は 72 時間培養し、培地中のサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2 及び IFN- の濃度を、BD OptEIA ELISA Sets を用いて測定した。

更に、全身状態観察、体重、腋窩および腸間膜リンパ節重量の測定を行った。病理組織学的検査は、脾臓、曝露皮膚局所、各所のリンパ節について実施し、リンパ組織については、リンパ球の増殖状態や表面抗体による細胞種の変化を検討した。

### 実験 2)

経口投与による惹起は腹腔内投与による惹起よりも弱いと考えられたため、実験 2 の実験デザインから、OVA の曝露量を 0.1 から 0.3 mg

に、アジュバントの陽性対照である Alum(0.25 mg) をコレラトキシン (CT, LIST BIOLOGICAL LABORATORIES, INC. #101C, 0.4 µg) に変更して実施した (Figure 2)。また、Day 25 に、OVA の感作抗原の投与経路は腹腔内投与(1 mg) から強制経口投与(5 mg)に変更して実験 1 と同様に実施した。

#### 統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エクセル統計 2012 for Windows ソフトウェアを用いて、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett 法により有意差検定を行った。不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Steel 法により多重検定を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。なお、図中には \*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  で有意差の程度を記した。

#### (倫理面への配慮)

投与実験は熟練者による腹腔内並びに強制経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

### C . 研究結果

#### 実験 1)

技術的なトラブルにより OVA+60 nm AgNP 群及び OVA+100 nm AgNP 群の各 1 匹が 1 週及び 2 週目に死亡した。AgNP を浸潤させたパッチの皮膚貼付終了後、一部の動物の皮膚に灰色の着色が認められたが、1 日以上は持続しなかった。処置開始 2 週まではサージカルテープやエリザベスカラーの装着によって体重増加抑制が認められたが、3 週目からは回復し、群間の差は見られなかった (Figure 3)。感作 4 週後のマウス血清中の OVA 特異的抗体について、いずれの OVA 処置群でも、血中の OVA 特異的な IgG1 及び IgE が Vehicle 群と比較して有意に増加又は増加傾向を示したが、群間の差は認められなかった (Figure 4)。直腸内体温の変化において、惹起 30 分後、Vehicle 群と比較して OVA 群、OVA+100 nm AgNP 群及び OVA+60 nm AgNP 群で

は各々平均 3.3、3.2 及び 2.7 度と、統計学的に有意な体温の大きな低下が認められた (Figure 5)。また、OVA+10 nm AgNP 群及び OVA+Alum 群では各 1.7 及び 1.2 度低下していた。体温が有意に低下した OVA 群及び何れの OVA+AgNP 群では惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意に増大していた (Figure 5)。OVA+Alum 群でも増加傾向はあるものの、有意な増加は見られなかった。惹起後 30 分間、アナフィラキシー症状をスコアリングした結果、OVA 群、OVA+100 nm AgNP 群及び OVA+60 nm AgNP 群では全匹 3.0 以上と統計学的有意な高いスコアであった (Figure 5)。また OVA+Alum 群及び OVA+10 nm AgNP 群でも平均 2.2 及び 2.8 と Vehicle の 1.0 に比べ高いスコアであった。抗原再暴露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を調べたが、IL-2、IL-4、IL-5 及び IFN- $\gamma$  において、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 6)。

皮膚病変のスコアリングを行った結果、Vehicle 群と比較していずれの群においても有意な増加が認められず、貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量及び細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の数においては、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で増加または増加傾向が認められた (Figure 7, Table 1)。

#### 実験 2)

実験中の体重及び解剖時の絶対及び相対脾臓重量に群間の差は見られなかった (Figure 8)。感作 4 週後のマウス血清中の OVA 特異的抗体について、いずれの OVA 処置群でも、血中の OVA 特異的 IgG1 及び IgE が Vehicle 群と比較して有意に増加していたが、群間の差は認められなかった (Figure 9)。直腸内体温の変化において、惹起 30 分後、Vehicle 群と比較して OVA 群で低下傾向があったものの、いずれの群においても、有意な低下は見られなかった。惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度測定及び惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリング結果、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 10)。

抗原再暴露による経皮感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を調べたが、IL-2、IL-4、IL-5 及び IFN- $\gamma$  において、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 11)。

皮膚病変のスコアリングを行った結果、Vehicle 群と比較して OVA+100 nm AgNP 群で有意な増加が認められ、貼付部位近傍の左腋窩リ

ンパ節の濾胞の数においては、Vehicle 群と比較して全投与群で増加または増加傾向が認められた(Figure 12, Table 2)。

#### D. 考察

AgNP の経皮経口複合曝露による、免疫毒性の有無について検討する評価方法を確立するため、各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) の卵白アルブミン (OVA) との混合物の 1) 経皮曝露後、抗原である OVA を腹腔内投与、2) 経皮曝露後、OVA を強制経口内投与を行い、AgNP アジュバント活性の有無を調べる実験を実施した結果、本モデルにおいて、AgNP の投与による明らかなアジュバント活性は認められなかった。

OVA の経皮曝露後、OVA を腹腔内投与した動物において、Vehicle 群と比べ、明らかな OVA 特異的抗体産生増加、直腸内体温の低下、血中ヒスタミン濃度増加、アナフィラキシースコアリングの高値及び Ki67 陽性左腋窩リンパ節濾胞数の増加が認められ、本モデルは皮膚感作後、腹腔内惹起による影響を調べるモデルとして適していることが明らかとなった。しかし、OVA の経皮曝露後、OVA を強制経口投与した動物において、直腸内体温の軽度の低下がみられたが、血中ヒスタミン濃度及びアナフィラキシー症状のスコアリングの明らかな変化は認められなかった。以前報告された OVA の経皮曝露後、強制経口投与による惹起による直腸内体温の低下は本試験の結果とほぼ同じ程度であった (Muto T et al., *Int. Immunol.* 2014; 26 (539-549))。OVA の経皮曝露による OVA 特異的抗体の産生は十分であったことから、明らかな惹起を誘導するには、OVA の強制経口投与条件に更なる検討が必要であると考えられた。

皮膚感作性試験のアジュバント陽性対照を想定して用いた、Alum 及び CT とともに明らかなアジュバント効果を示さなかった。未だ皮膚感作試験における、優れたアジュバント陽性対照物質は知られていない。Alum は分子量が大きいことで表皮を通過し、アジュバント作用を果たすことが困難と推測される。また、CT は消化管の粘膜においては、アジュバント作用が示されており、経口ワクチンのアジュバントとして期待されているが (Holmgren J et al., *Vaccine.* 1993; 11 (1179-1184)) 皮膚感作性試験のアジュバント陽性対照物質として適用するためには更なる検討が必要である。

本モデルにおいては、貼付する OVA 抗原の濃

度が高く被験物質のアジュバント活性が見えにくくなっている可能性があった。両試験の何れの OVA 処置群においても、血中の OVA 特異的な IgG1 及び IgE の産生量は極めて多いと考えられ、この状態では感作を促進する作用については感度が低くなる可能性がある。被験物質のアジュバント作用をより高感度に検出するため、OVA 抗原の濃度について検討を行う必要がある。

当所生化学部で確立された本モデルは、即時型アレルギー誘発経皮感作モデル実験系で被験物質をマウス皮膚曝露後に腹腔内投与によって惹起させることができる。近年、大きな話題になったある特定の小麦タンパク質加水分解物 (グルパール 19S) を含有する洗顔石鹸 (茶のしずく石鹸: 医薬部外品) の使用により重篤な小麦アレルギーを発症する事例が多数報告された問題で、本モデルを使用し、グルパール 19S による経皮感作性が証明された。このモデルを使った本研究の成果は、ナノ銀の免疫毒性に対する情報のみならず、今後の食品成分関連新規物質の免疫毒性評価法の改良に資するデータが得られ、他の食品関連物質や化学物質の評価に有用な情報になるものと考えられる。

#### E. 結論

我々が実施した、OVA+AgNP の経皮曝露後、OVA を腹腔内または強制経口投与する本モデルにおいて、AgNP の明らかなアジュバント活性は認められなかった。今後、皮膚感作性試験の陽性対照物質や貼付する OVA 抗原の濃度などさらなる検討が必要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

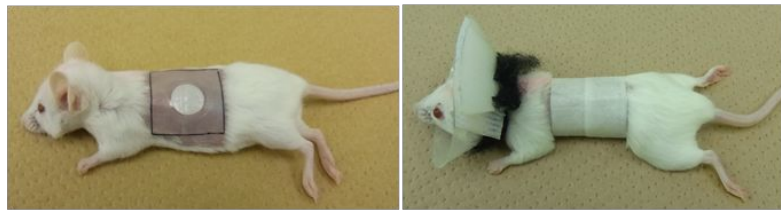
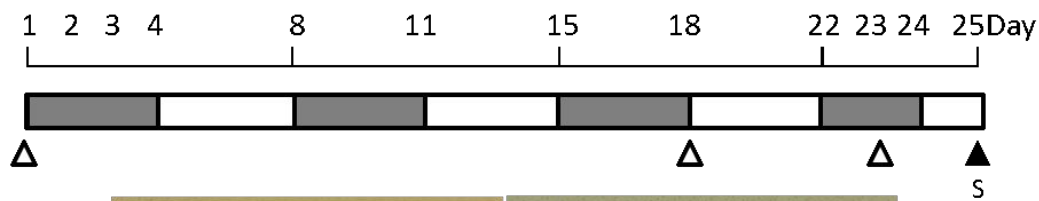
なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)  
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

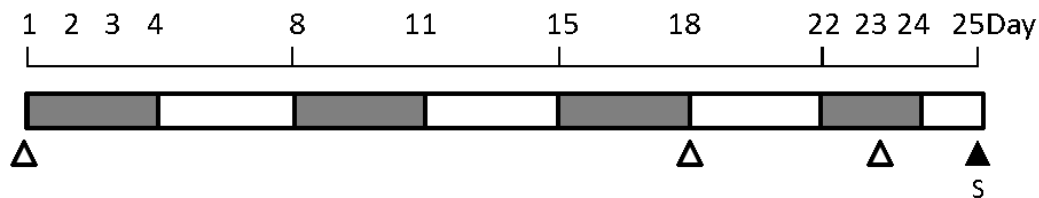
1. 特許所得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



Animal 8-week old female BALB/c mouse (n=5/group)

- █ Test chemicals exposure (skin patch on the flank, 50  $\mu$ l/mouse),  
OVA (Ovalbumin, 0.1 mg) + Alum (0.25 mg) or silver nanoparticles (AgNP, 0.049 mg/mouse)
- ① 2 mM citrate (vehicle)
- ② OVA
- ③ OVA + Alum
- ④ OVA + 10 nm AgNP
- ⑤ OVA + 60 nm AgNP
- ⑥ OVA + 100 nm AgNP
- Δ Blood sampling
- ▲ Evocation with OVA (i.p. 1mg)
- S Sacrifice (30 min after evocation)

Figure 1. 実験デザイン (実験 1)



Animal 8-week old female BALB/c mouse (n=5/group)

- █ Test chemicals exposure (skin patch on the flank, 50  $\mu$ l/mouse),  
OVA (Ovalbumin, 0.3 mg) + Cholera toxin (CT, 0.4  $\mu$ g) or silver nanoparticles (AgNP, 0.049 mg/mouse)
- ① 2 mM citrate (vehicle)
- ② OVA
- ③ OVA + CT
- ④ OVA + 10 nm AgNP
- ⑤ OVA + 60 nm AgNP
- ⑥ OVA + 100 nm AgNP
- Δ Blood sampling
- ▲ Evocation with OVA (i.g. 5 mg)
- S Sacrifice (30 min after evocation)

Figure 2. 実験デザイン (実験 2)

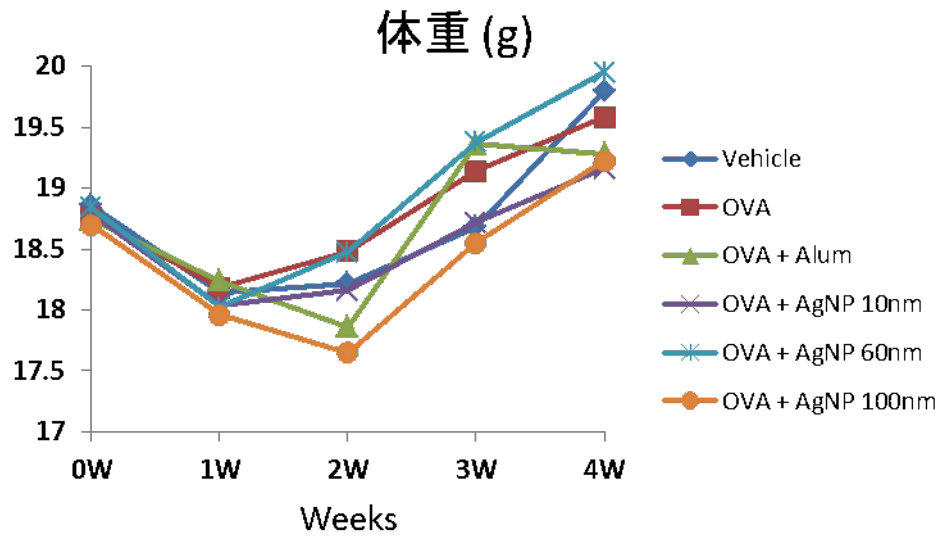


Figure 3. 体重 (実験 1)

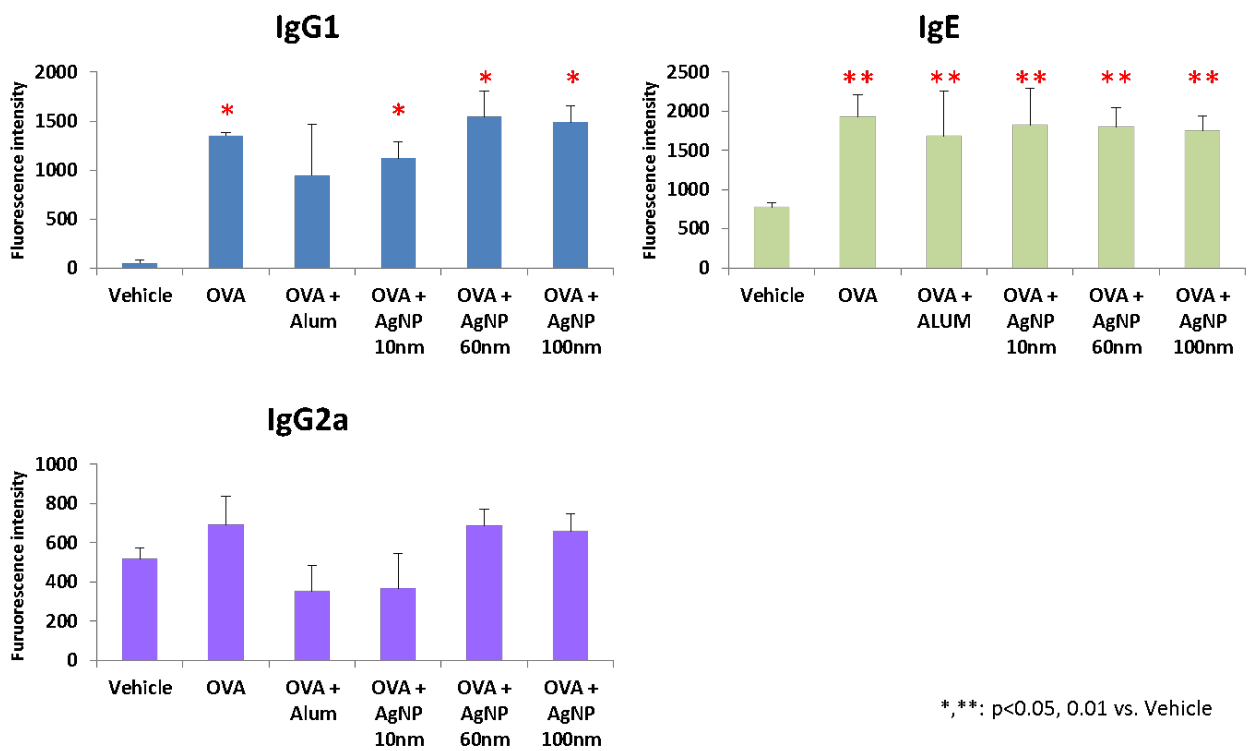
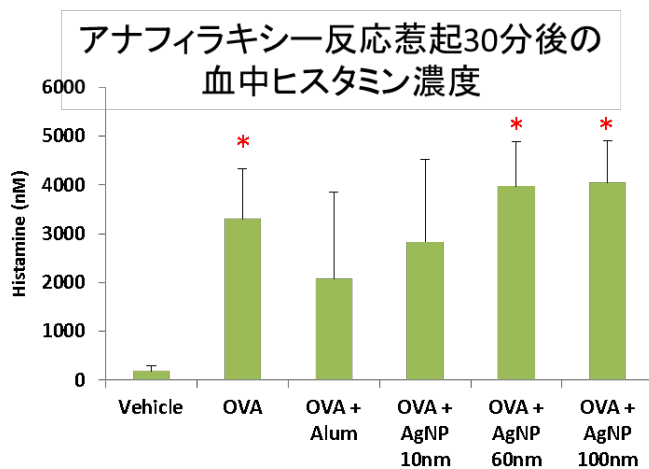
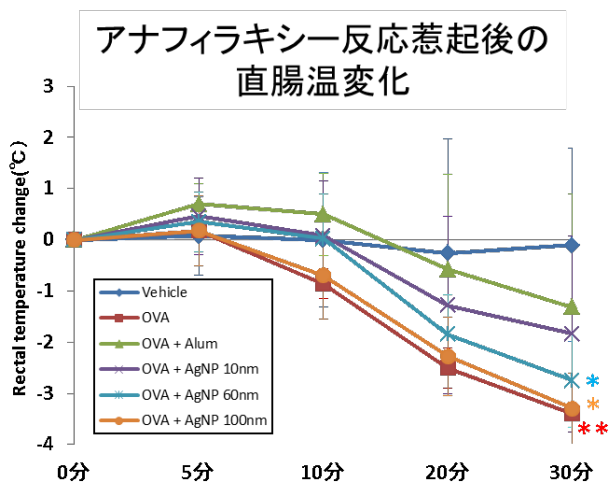


Figure 4. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 1)



アナフィラキシー症状のスコアリング

Score 0 症状なし

1 口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ肢で耳の穴を掻く

2 活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛

3 1分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣

4 ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣

5 死亡

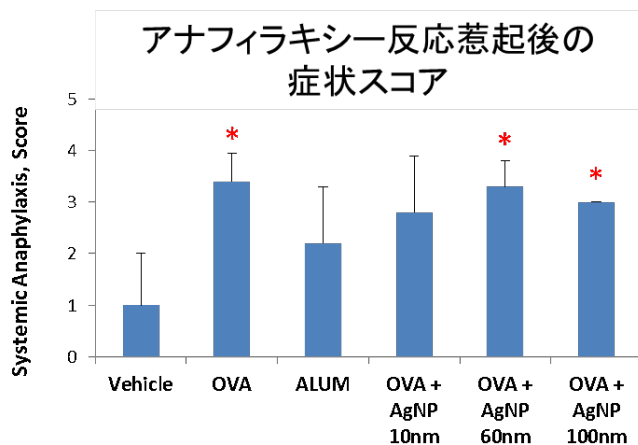


Figure 5. アナフィラキシー反応惹起後の応答 (実験 1) \*, \*\*:  $p < 0.05, 0.01$  vs. Vehicle

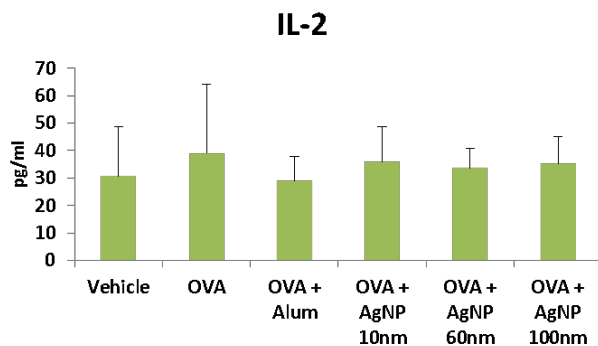
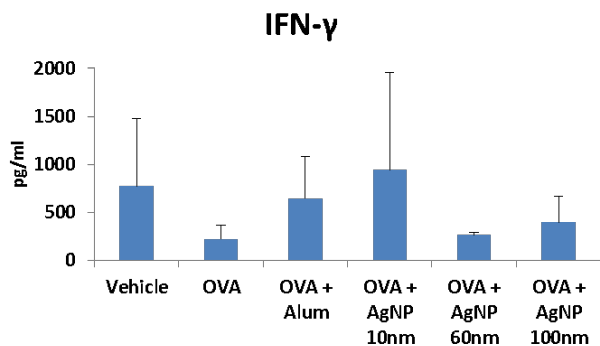
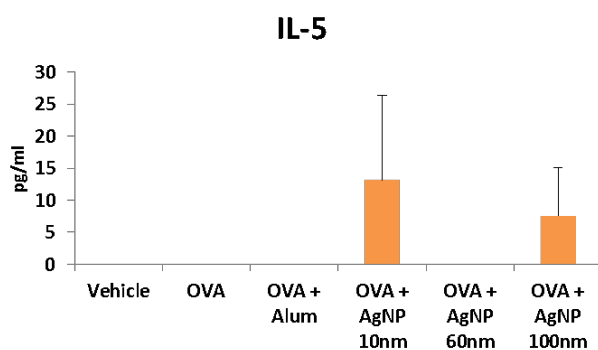
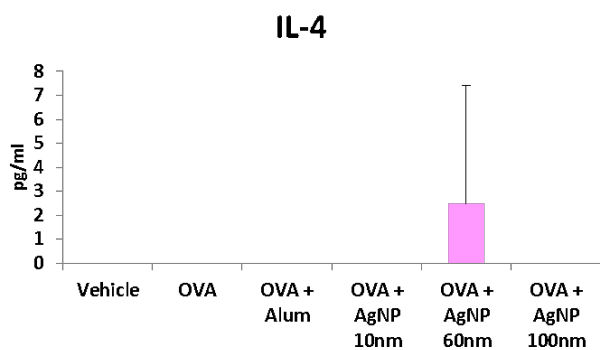


Figure 6. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験1)

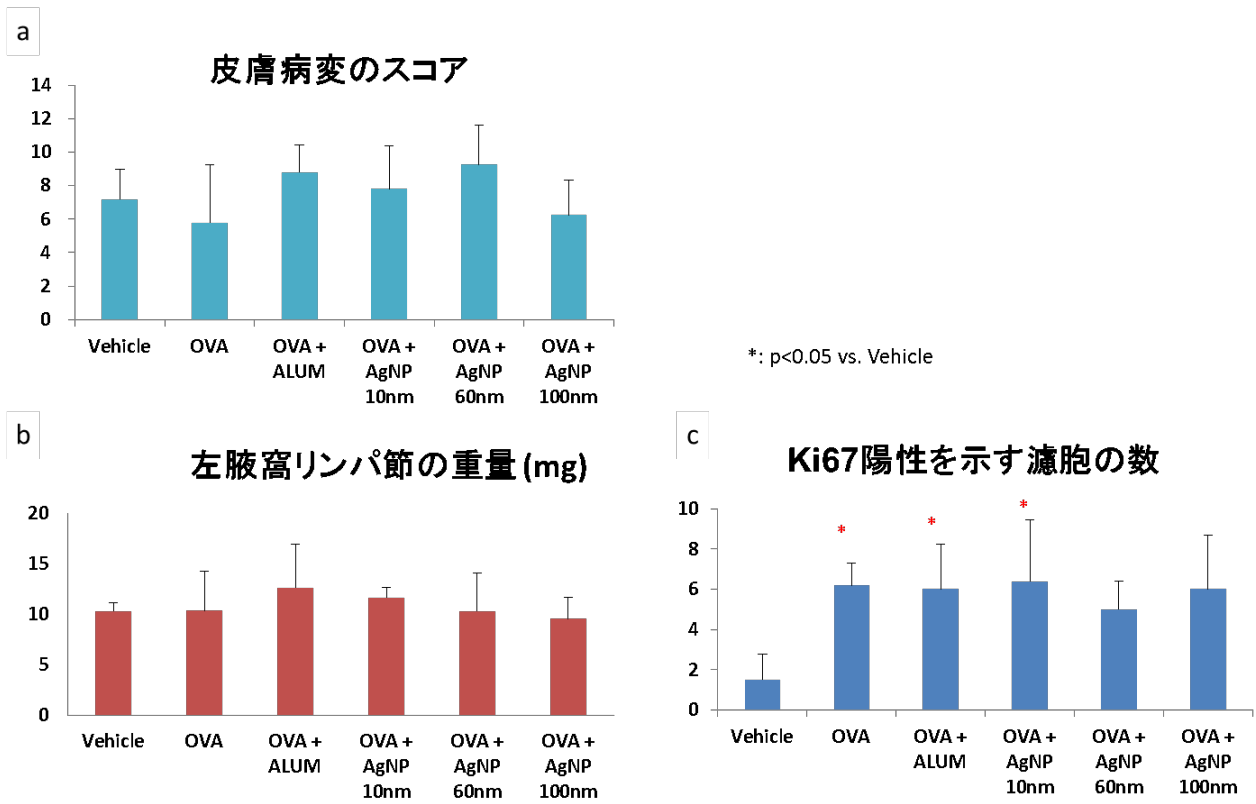


Figure 7. 皮膚病変のスコア(a)、左腋窩リンパ節の重量(b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(c)(実験 1)

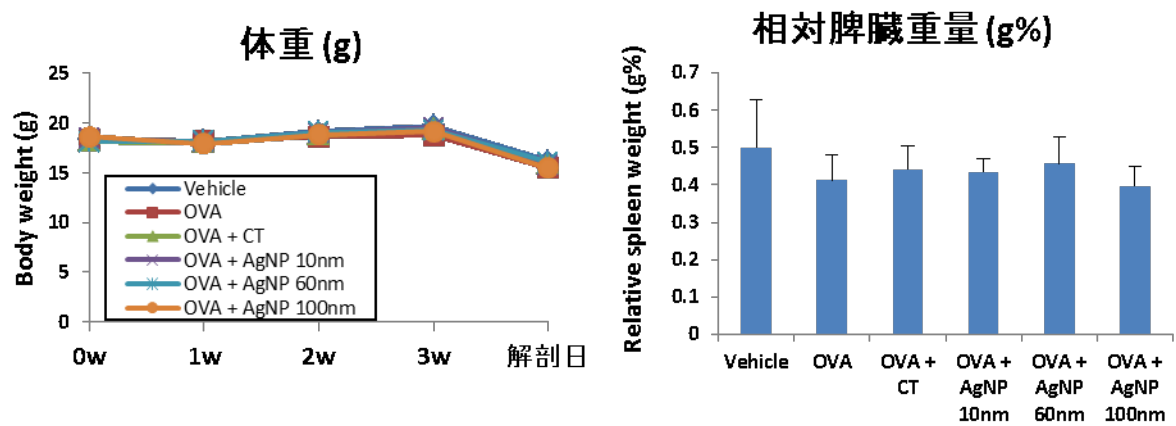


Figure 8. 体重(a)及び相対脾臓重量(b)(実験 2)



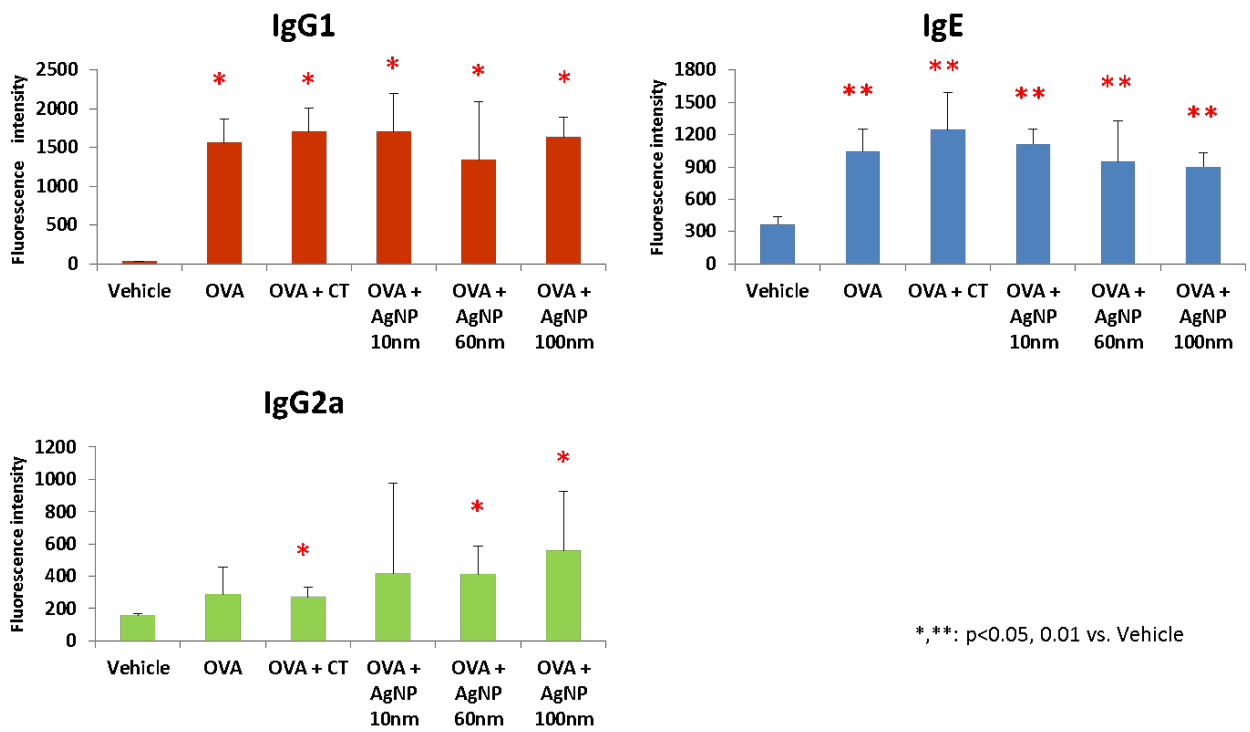


Figure 9. 血清中のOVA特異的抗体産生(実験 2)

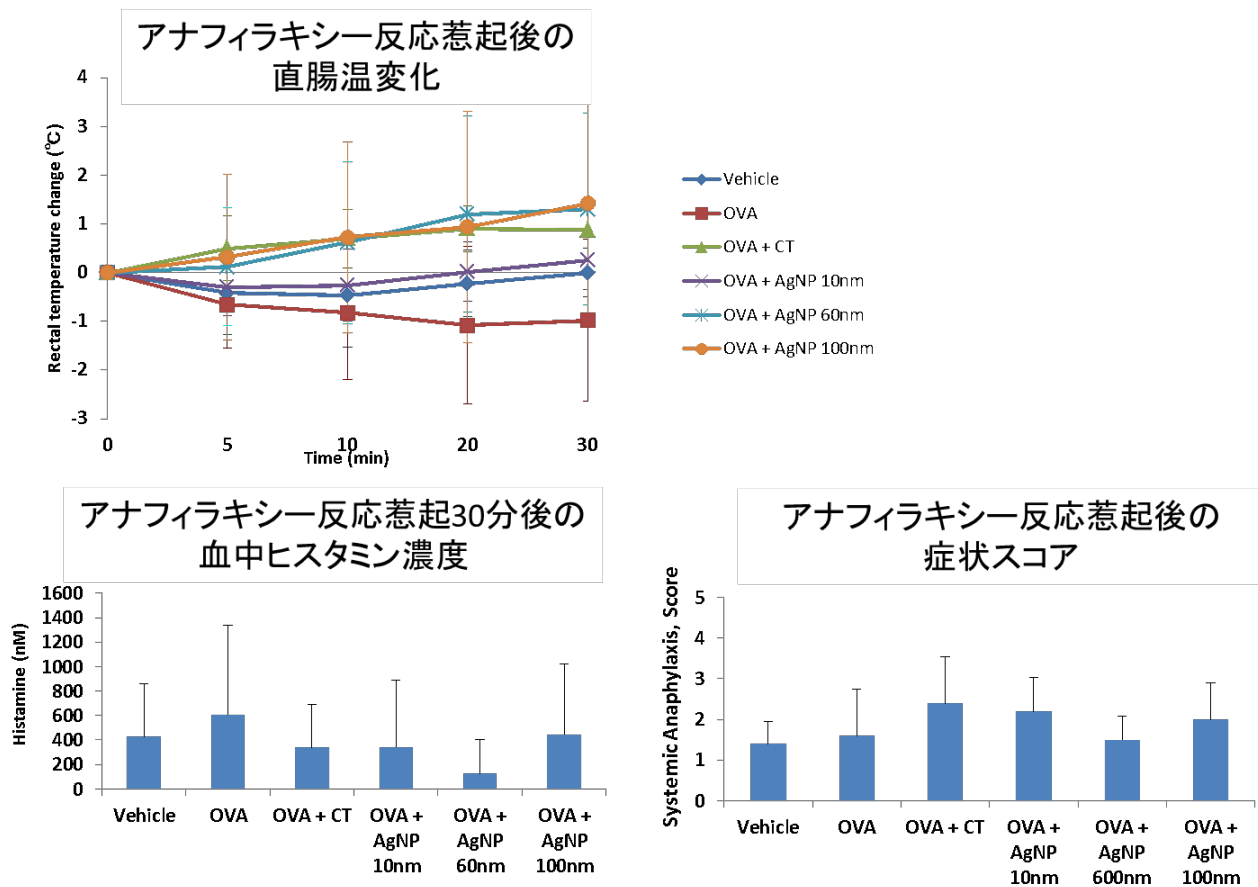


Figure 10. アナフィラキシー反応惹起後の応答(実験 2)

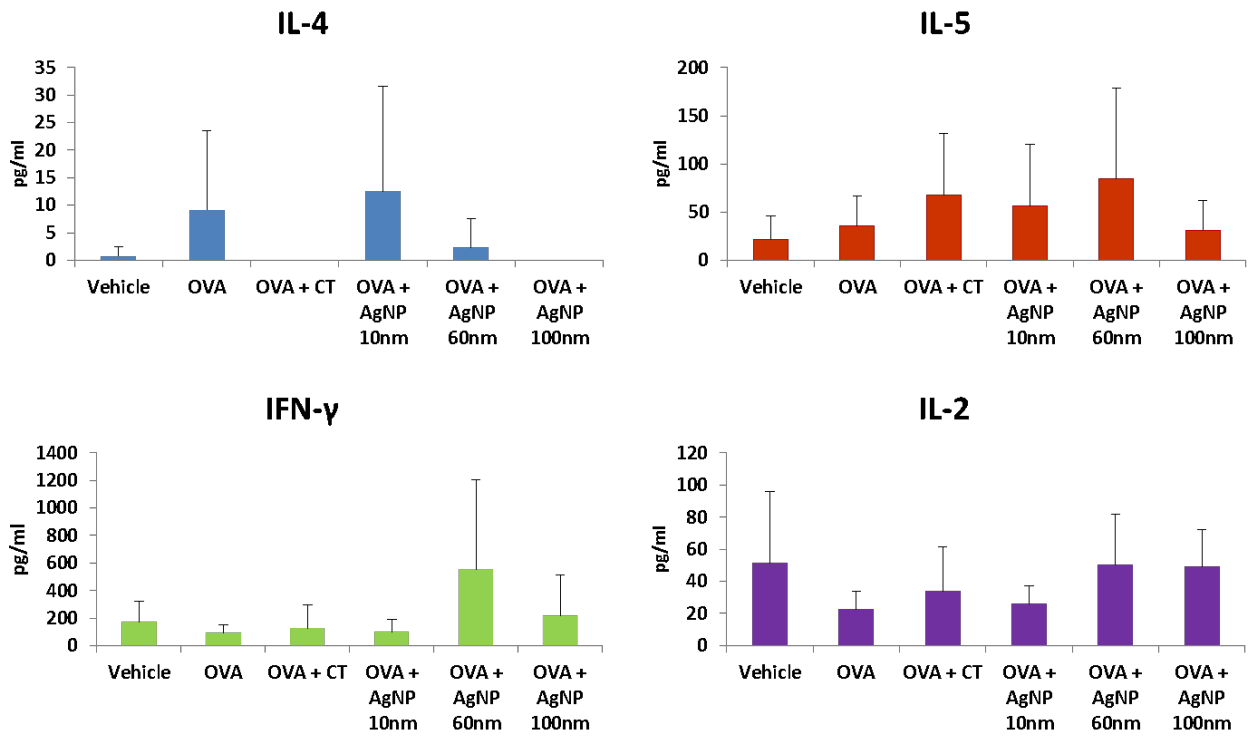


Figure 11. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 2)

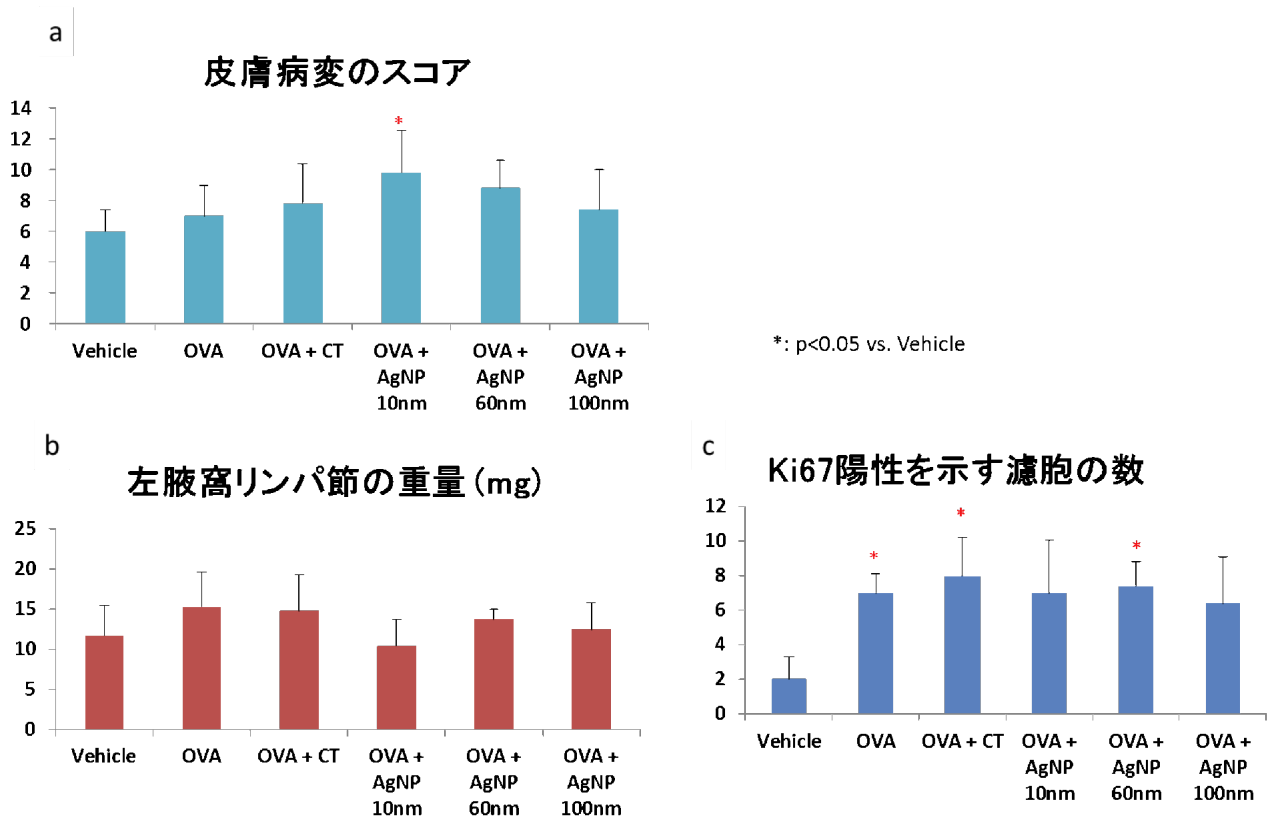


Figure 12. 皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(c) (実験 2)

**Table 1. 病理組織学的所見 (試験 1)**

Treatment	No. of animal	Skin			
		Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration
		+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++
Vehicle	5	1/4/0	2/1/2	0/4/0	3/0/2
OVA	5	1/3/0	0/4/0	3/1/0	1/1/2
OVA + ALUM	5	1/4/0	0/3/2	0/3/2	1/2/2
OVA + AgNP 10 nm	5	2/2/1	1/2/2	1/2/2	3/1/1
OVA + AgNP 60 nm	4	0/2/2	0/1/3	2/1/1	1/1/2
OVA + AgNP 100 nm	4	4/0/0	1/2/1	2/2/0	2/1/1

Scoring +=1, ++=2, +++=3

**Grading standard**

Grade	Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration
+: mild	4層以上の有棘細胞層 1-3箇所	びまん性角化亢進	隣接した3個以上の細胞による病変 1-10箇所	炎症細胞が真皮に浸潤 集簇無し
++: moderate	4-6箇所	びまん性角化亢進 有棘細胞2層以上の高さ、皮脂腺 1個分以上の高さを示す限局性角 化亢進 1-2箇所	11-20箇所	炎症細胞が真皮に浸潤 限局性集簇有り
+++: severe	7箇所以上	3箇所以上	21箇所以上	炎症細胞が皮下組織まで浸潤 びまん性浸潤

**Table 2. 病理組織学的所見 (試験 2)**

Treatment	No. of animal	Skin			
		Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration
		+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++
Vehicle	5	4/1/0	0/4/1	3/2/0	4/1/0
OVA	5	2/2/1	1/2/2	4/1/0	2/3/0
OVA + ALUM	5	4/1/0	1/2/2	3/0/2	2/2/1
OVA + AgNP 10 nm	5	0/3/2	0/2/3	2/2/1	0/4/1
OVA + AgNP 60 nm	5	2/1/2	0/2/3	2/3/0	0/5/0
OVA + AgNP 100 nm	5	4/1/0	1/1/3	4/1/0	1/4/0

Scoring +=1, ++=2, +++=3