

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）

抗原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）
研究分担者： 曹 永晩 （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。本研究では、雌性BALB/c系マウスを用いて、様々なサイズのAgNPのアジュバント効果について、卵白アルブミン（OVA）及び既知のアジュバントであるAlum又は各サイズのAgNP（直径10nm、60nm及び100nm）を腹腔内に混合投与して検討した。OVAの有無にかかわらず10nm AgNPを腹腔内投与した動物で10匹中9匹の死亡例及び1匹の瀕死例が認められた。それらの動物では、腸間膜の肉芽腫及び褐色並びに黒色素の沈着、胸腺の細胞死、胸腺周囲リンパ節の褐色並びに黒色素の沈着及び濾胞細胞死増加、腸間膜リンパ節の出血及び細胞死、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、変性及び細胞死及びクッパー細胞の暗褐色色素沈着、脾臓のうっ血、白脾髄における細胞死が認められた。被験物質による肝細胞障害が死亡原因と関連している可能性が考えられるが、詳細は不明である。60nm及び100nm AgNP投与群でも腸間膜の肉芽腫の増加、腸間膜及び胸腺周囲リンパ節における褐色並びに黒色素の沈着が認められ、OVA+60nm AgNP群では脾臓の絶対及び相対重量が溶媒対照群（Vehicle）群に比べ有意に増加した。マウス血清中のOVA特異的抗体について、血中IgG1及びIgEはOVA群と比較してOVA+Alum群で有意に増加していたが、AgNP投与による有意な変化は認めず、IgG2aはOVA群と比較してOVA+AgNP群で有意な増加がみられた。OVA再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を調べたが、IL-4及びIL-5については、群間に有意な変化は見られなかったが、IL-2及びIFN- γ については、Vehicle群に比べOVA投与各群で有意な増加又は増加傾向が認められた。今回の検討においては、10nm AgNPを腹腔内投与した全動物で死亡及び瀕死例が認められた。特定の大きさの被験物質でのみ見られた現象であり、類似した大きさのナノ銀の静脈投与によっては毒性の報告がないことから、機序について詳細に検討する必要があると考えられた。また、60nm及び100nm AgNPについては、IgG2a増加を示すことから、細胞免疫への影響の可能性が示唆された。

キーワード：ナノ銀、抗原性、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-H et 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ゲン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、他のアレルゲン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。

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の確立に先立ち、様々なサイズのAgNPの抗原性におけるアジュバント効果について、卵白アルブミン(OVA)及び既知のアジュバントであるAlum又は各サイズのAgNP(AgNP、直径10 nm、60 nm及び100 nm)を混合して腹腔内投与した雌性BALB/c系マウスを用いて、検討を行った。

B. 研究方法

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0.02、2及び0.2 mg/300 µl/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、6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(オリエンタル酵母工業株式会社)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、溶媒対照群(Vehicle)群、OVA群、OVA + Alum群、OVA + 10 nm AgNP、OVA + 60 nm AgNP、OVA + 100 nm AgNP、10 nm AgNP、60 nm AgNP、100 nm AgNP。7週齢(Day 0)及び10週齢時(Day 14)に2回抗原懸濁液を腹腔内投与(300 µl/マウス)し、Day 15に解剖した(Figure 1)。

全身状態観察、体重、肝臓、腎臓及び脾臓重量の測定を行った。肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節、胃、小腸、大腸、胸腺、心臓、肺及び膵臓についてはホルマリン固定後、パラフィン包埋切片、HE標本作製し、病理組織学的検討を行った。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。

全血を採取し、OVA抗原特異的IgE、IgG1及

びIgG2a抗体をELISA法で測定した。解剖時に採取した脾臓細胞は再懸濁後、OVA抗原(最終濃度10 µg/ml)を添加、37°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- γ の濃度を、BD OptEIA ELISA Setsを用いて測定した。

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

OVA + 60 nm AgNP群の1匹のデータは投与ミスによりすべての結果より削除した。

OVAの有無にかかわらず10 nm AgNPを腹腔内投与した動物でDay 0の投与1日後に10匹中9匹の死亡例が認められた。また、瀕死例の1匹はDay 14の投与9時間後までに活動低下、痙攣及び異常呼吸が認められ、切迫屠殺を行った。60又は100 nm AgNPを投与したいずれの動物でも同様の症状は認められなかった。

実験期間を通して体重における群間の有意な変化は認められなかった(Figure 2)。臓器重量において、OVA + 60 nm AgNP群では脾臓の絶対及び相対重量がVehicle群に比べ有意

に増加し、OVA 群に比べ脾臓の絶対重量の増加が認められた (Table 1)。

死亡及び瀕死例の肉眼病変としては、肝臓の斑な暗赤色変色及び腹腔内黒色粒子状物質が散在性に認められた (Figure 3a)。病理組織学的解析を行ったところ (Table 2)、腸間膜の肉芽腫 (瀕死例のみ確認、死亡例からは広範な腸間膜のサンプリングができず確認できなかった) 及び褐色並びに黒色素の沈着 (Figure 4a)、胸腺の細胞死 (Figure 4b)、胸腺周囲リンパ節の褐色並びに黒色素の沈着及び濾胞細胞死増加 (Figure 4c)、腸間膜リンパ節の出血及び細胞死 (Figure 4d)、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、変性及び細胞死 (Figure 4e) 及びクッパー細胞の暗褐色色素沈着、脾臓のうっ血、白脾髄における細胞死 (Figure 4f) が認められた。

Day 15 の解剖時において、OVA の有無にかかわらず 60 nm 及び 100 nm AgNP 投与群でも肉眼的に腹腔内黒色粒子状物質が散在性に認められた (Figure 3b)。病理組織学的には (Table 2)、腸間膜の肉芽腫、腸間膜及び胸腺周囲リンパ節における褐色並びに黒色素の沈着が認められた。腸間膜で認められた炎症細胞集簇の数は Vehicle 及び OVA 群と比較して OVA + Alum 又は OVA + AgNP 群で有意に増加していた (Figure 5a)。また、60 nm 及び 100 nm AgNP 投与群でも有意な増加又は増加傾向が認められた (Figure 5a)。OVA + Alum 群で認められる炎症細胞集簇には結晶物が認められた。しかし、何れの 60 nm 及び 100 nm AgNP 投与群においても 10 nm の死亡例、瀕死例に見られた肝臓、脾臓及び胸腺の AgNP による変化は認められなかった。腸間膜リンパ節における細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の数は OVA、Alum 及び AgNP の投与による群間の明らかな変化は認められなかった (Figure 5b)。

Figure 6 に Day 15 のマウス血清中の OVA 特異的抗体についての検討結果を示す。IgE、IgG1 及び IgG2a は Vehicle 群と比較して IgE の OVA 群を除くすべての OVA 群及び OVA + AgNP 群で有意に増加していた。また、IgE 及び IgG1 は OVA 群と比較して OVA + Alum 群では有意に増加していたが、OVA + AgNP 群では有意な変化は認められなかった。一方、IgG2a は OVA 群と比較して OVA + Alum 群で増加傾向が、OVA +

AgNP 群では有意な増加が認められた。

Figure 7 に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についての検討結果を示す。IL-4 はすべてのデータが検出限界以下だった。IL-5 においては、群間に有意な変化は見られなかった。IL-2 及び IFN- γ において、Vehicle 群に比べ、いずれの OVA 処置群でも有意な増加又は増加傾向が認められたが、OVA 群と比較して OVA + Alum 群及び OVA + AgNP 群では有意な変化は認められなかった。

D. 考察

雌性 BALB/c 系マウスを用いて、OVA 及び Alum 又は様々なサイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) を腹腔内に混合投与し、ナノ銀のアジュバント効果について OVA 特異的抗体価及び脾臓細胞におけるサイトカイン分泌を主体に検討を行った。

OVA の有無にかかわらず 10 nm AgNP を腹腔内投与した動物で前例が死亡又は瀕死に陥った。腸間膜の肉芽腫、腸間膜及び胸腺周囲リンパ節における褐色並びに黒色素の沈着は、AgNP のサイズに関わらず死亡例 (不十分なサンプリングにより肉芽腫は確認できなかった) 瀕死例及び計画解剖例で共通に認められたが、胸腺の細胞死、胸腺周囲リンパ節の濾胞細胞死増加、腸間膜リンパ節の出血及び細胞死、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、変性及び細胞死、及びクッパー細胞の暗褐色色素沈着、脾臓のうっ血、白脾髄における細胞死は 10 nm AgNP 投与群の死亡例及び瀕死例でのみ認められ、60 nm 及び 100 nm AgNP 投与群では認められなかったことから、AgNP のサイズが死をもたらした要因の一つと考えられる。しかし、同等の大きさのナノ銀の静脈投与では毒性を誘発したとの報告がない (Lee Y et. al., *Nanotoxicity*. 2013;7 (1120-1130))。10 nm AgNP 投与群で腸間膜リンパ節、胸腺及び胸腺周囲リンパ節に著しい病変が認められたことから、AgNP はリンパ管循環を介して大きな影響を及ぼした可能性が考えられた。リンパ系を除いては肝臓の病変が最も重篤であったことから、AgNP による肝細胞障害が死亡原因と関連している可能性が考えられるが、詳細はまだ不明であり、機序について詳しく検討する必要がある。

AgNP の毒性は AgNP の大きさのみならず

(Park MVDZ et. al., Biomaterials. 2011;32 (9810-9817))、化学成分、電荷、コーティング、凝集性及び動物実験での投与経路によって影響を受ける可能性がある。最近の報告では質量の単位より表面積や粒子の数といった単位を使ったほうが AgNP の毒性を比較する際により正確であると報告されている (Huk et al., Particle and Fibre Toxicology. 2014;11, <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/11/1/65>)。本試験で用いられた 10、60 及び 100 nm AgNP の表面積及び粒子の数は各々 57.4、9.4、6.5 m²/g 及び 2.4E+14、9.1E+11、1.7E+11 particle/mL であり、いずれについても 10 nm AgNP が他のサイズの AgNP より著しく大きな値を示している。

臓器重量において、OVA + 60 nm AgNP 群で脾臓の絶対及び相対重量が Vehicle 群に比べ有意に増加した。病理組織学的に群間のあきらかな変化が見られないことから、偶発的な変化と考えられたが、更なる詳細な検討が必要と考えられた。

マウス血清中の OVA 特異的抗体について、血中 IgG1、IgE 及び IgG2a の値を検討した。IgG1 及び IgE は Th2 細胞が、IgG2a は Th1 細胞が産生することが知られている。また、Alum は Th2 細胞による液性免疫を促すアジュバントの陽性対照物質としてよく用いられている。検討の結果、OVA 群に比べ、OVA + Alum 群では OVA 特異的 IgG1 及び IgE 抗体価について有意に上昇し、Alum のアジュバント効果が確認できたが、OVA + AgNP 群で有意な上昇は認められず、AgNP による明らかなアジュバント作用は示されなかった。OVA 特異的 IgG2a 抗体価については OVA 群に比べて OVA + AgNP 群で有意な上昇は認められ、下記の通り AgNP による IL-2 及び IFN- γ の明らかな変化はみられてないものの、AgNP が Th1 細胞による細胞性免疫に対して影響を及ぼした可能性がのこり、今後の検討が必要と考えられた。

抗原である OVA の再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2 及び IFN- γ の分泌を調べた。IL-4 及び IL-5 は Th2 細胞が、IL-2 及び IFN- γ は Th1 細胞が産生することが知られている。IL-4 全サンプルが検出限界以下であり、IL-5 においては群間に有意な変化は見られなかったことから、Th2 細胞

に対する明らかな影響は証明されなかった。Alum のアジュバント効果は主に Th2 細胞に及ぼしていることが知られており、IgG1 の有意な増加も見られているため、測定の指摘条件の検討が求められる。

また、IL-2 については OVA 投与群で有意に増加しており、OVA による Th1 細胞への影響が示唆された。IFN- γ については、有意差はないものの OVA 群と比べ、OVA + Alum 群又は OVA + AgNP 群で増加傾向がみられ、Alum 及び AgNP の Th1 細胞に対する影響については今後の検討が必要と考えられた。

E. 結論

我々が実施した、OVA 及び様々なサイズのナノ銀を用いた抗原性試験の結果、腹腔内投与した 60 nm 及び 100 nm AgNP は BALB/c マウスに対して Th2 細胞を介した液性免疫の亢進は示さないが、Th1 細胞を介した細胞性免疫を亢進させる可能性が示唆された。一方、OVA の投与にかかわらず 10 nm AgNP 群において、全例死亡又は瀕死が認められたことから、AgNP のサイズによる毒性の現れ方に違いがある可能性が示され、機序について詳細な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

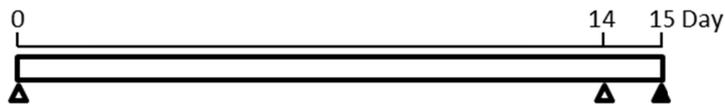
2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)
なし

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

▲ Antigen exposure (i.p., 300 μ l/mouse)

- ① 2 mM citrate (vehicle)
- ② OVA (20 μ g)
- ③ OVA + Alum (2 mg)
- ④ OVA + 10 nm AgNP (0.2 mg)
- ⑤ OVA + 60 nm AgNP (0.2 mg)
- ⑥ OVA + 100 nm AgNP (0.2 mg)
- ⑦ 10 nm AgNP (0.2 mg)
- ⑧ 60 nm AgNP (0.2 mg)
- ⑨ 100 nm AgNP (0.2 mg)

▲ Sacrifice

Figure 1. 実験デザイン

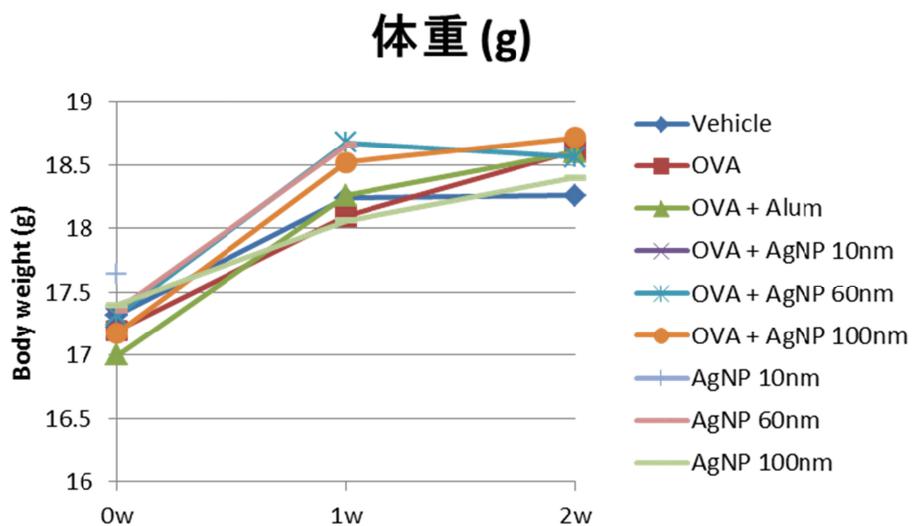


Figure 2. 体重

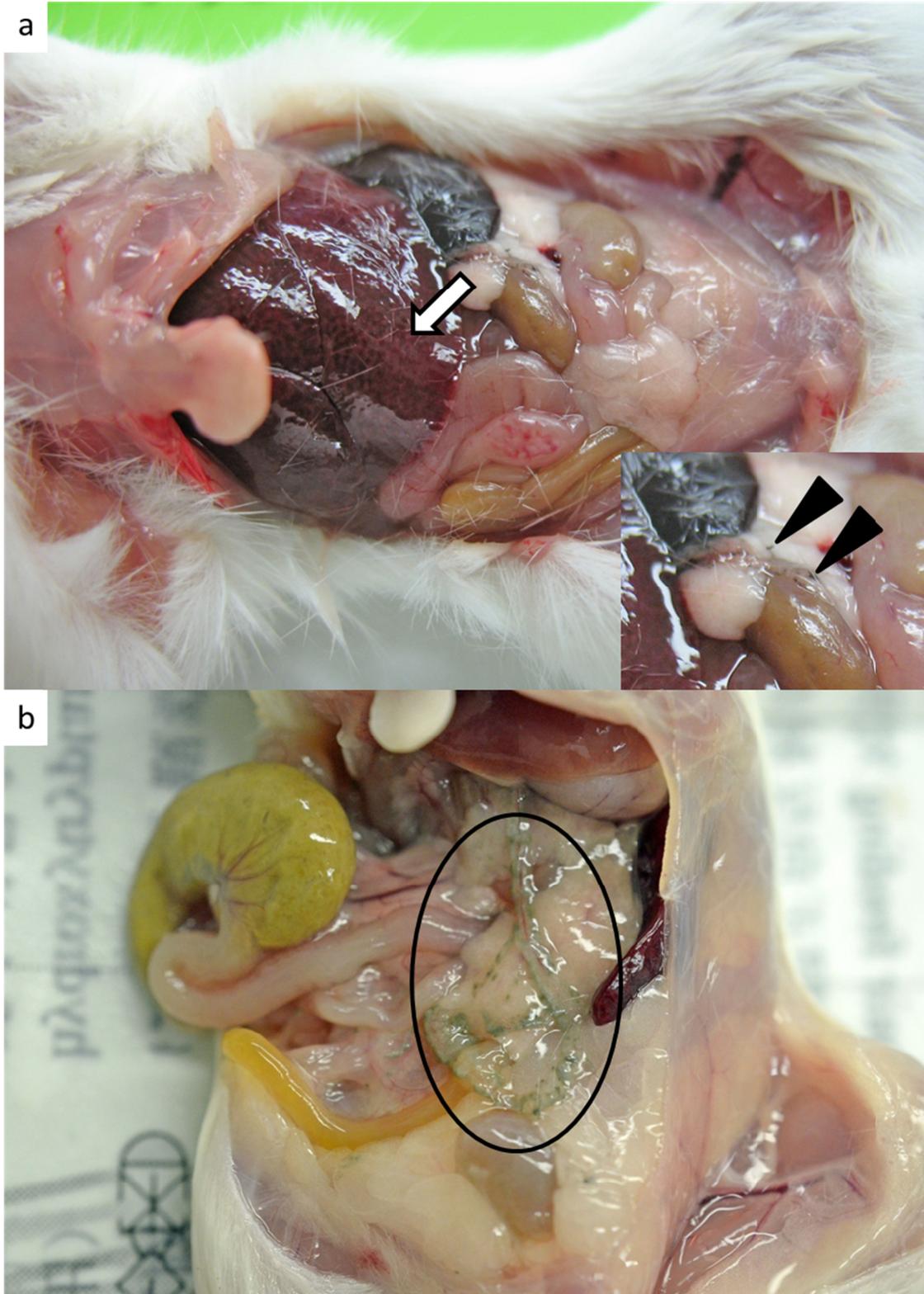


Figure 3. OVA + AgNP 10 nm群(a, 死亡例) 及びOVA + AgNP 100 nm群 (b, 計画解剖例)の肉眼写真。死亡例の肝臓の斑な暗赤色変色(矢印) 及びいずれの群も腹腔内黒色粒子状物質の散在(矢頭又は円内)が認められる。

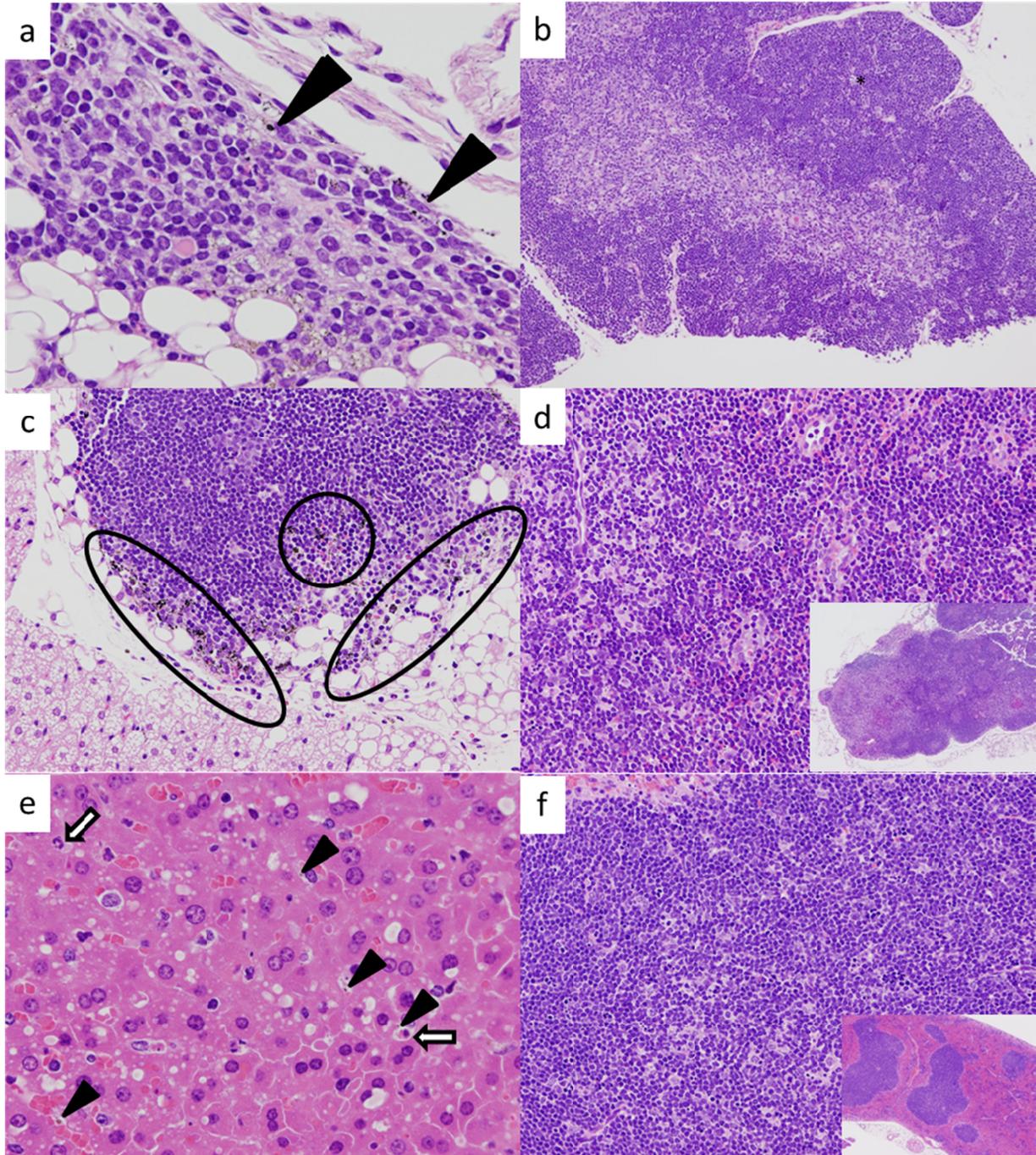


Figure 4. OVA + AgNP 10 nm群 (a, 瀕死死亡例) の病理組織写真。(a) 腸間膜の肉芽腫、褐色並びに黒色色素の沈着(矢頭)、(b)胸腺の細胞死、(c)胸腺周囲リンパ節の褐色並びに黒色色素の沈着(円内)、濾胞細胞死増加、(d)腸間膜リンパ節の出血及び細胞死、(e)肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及びクッパー細胞の暗褐色色素沈着(矢頭)、肝細胞の変性及び細胞死(矢印)、(f)脾臓のうっ血及び白脾髄における細胞死が認められた。

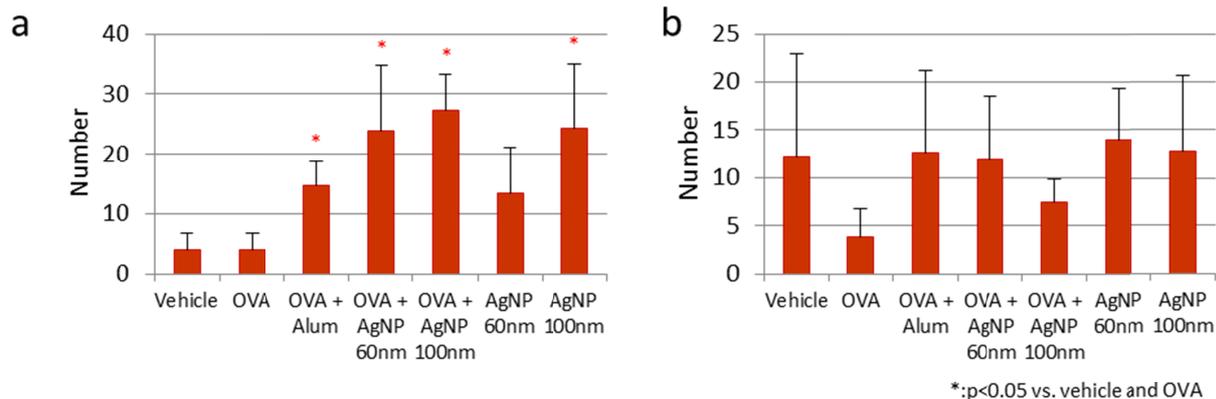


Figure 5. 腸間膜で認められた炎症細胞集簇の数(a)及び腸間膜リンパ節における細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の数(b)

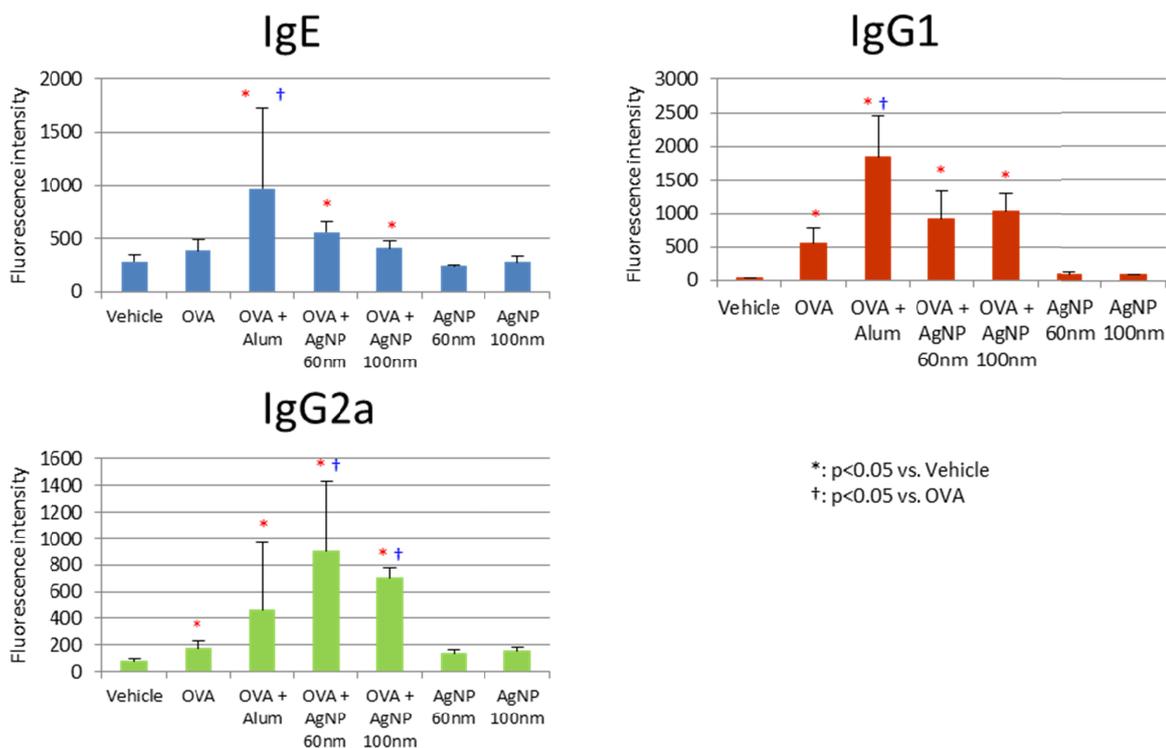


Figure 6. 血清中のOVA特異的抗体産生

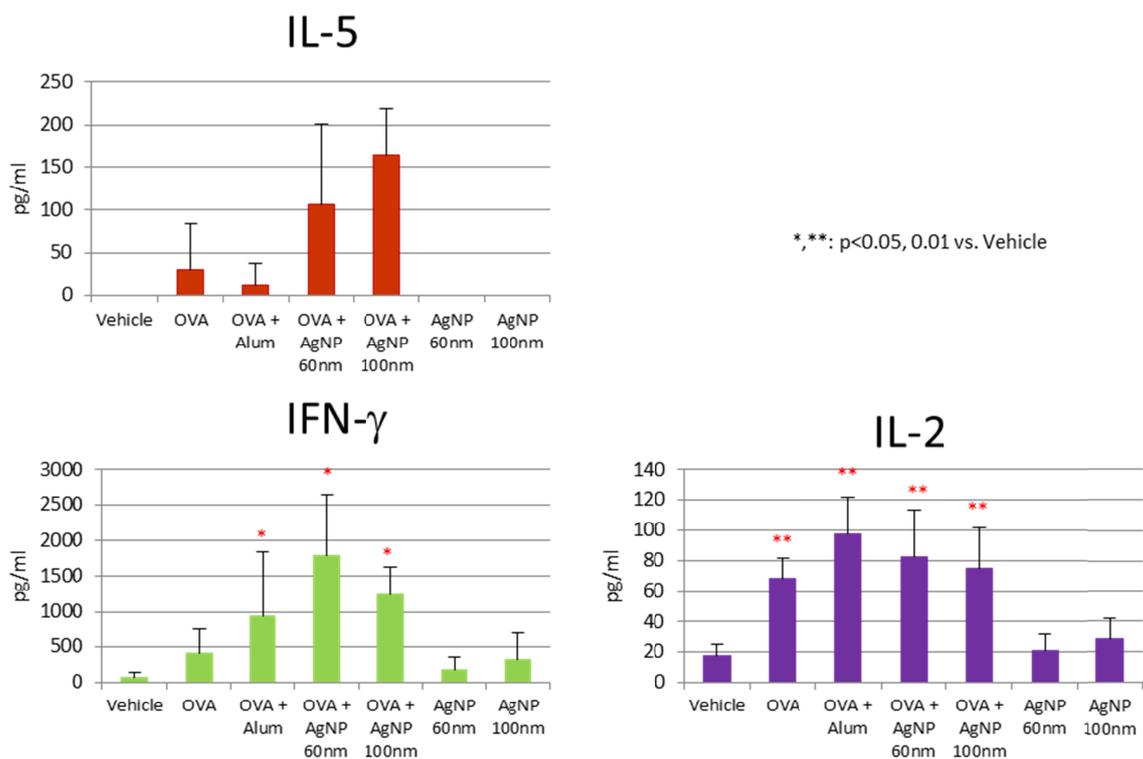


Figure 7. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌

Table 1. 体重および臓器重量

Group	Vehicle	OVA	OVA + Alum	OVA + AgNP 60nm	OVA + AgNP 100nm	AgNP 60nm	AgNP 100nm
No. of animals	5	5	5	4	5	5	5
Body weight (g)	18.1 ± 1.2	17.9 ± 1.3	18.1 ± 1.4	18.5 ± 1.6	18.3 ± 0.7	18.4 ± 1.2	18.2 ± 1.0
Absolute							
Liver (g)	0.89 ± 0.13	0.83 ± 0.08	0.89 ± 0.15	0.88 ± 0.05	0.85 ± 0.07	0.90 ± 0.14	0.86 ± 0.04
Kidneys (g)	0.21 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02
Spleen (g)	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.00*, †	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Relative							
Liver (g%)	4.95 ± 0.64	4.63 ± 0.34	4.89 ± 0.45	4.78 ± 0.42	4.68 ± 0.47	4.85 ± 0.50	4.73 ± 0.17
Kidneys (g%)	1.18 ± 0.10	1.22 ± 0.06	1.16 ± 0.05	1.15 ± 0.12	1.18 ± 0.01	1.19 ± 0.07	1.20 ± 0.06
Spleen (g%)	0.55 ± 0.09	0.58 ± 0.03	0.59 ± 0.02	0.65 ± 0.05*	0.58 ± 0.06	0.53 ± 0.06	0.55 ± 0.06

Each value represents the mean ± S.D.

*: Significantly different from vehicle group at p<0.05.

†: Significantly different from OVA group at p<0.05.

Table 2. 病理組織学的解析

Organ and lesions	Treatment	Vehicle	OVA	OVA + Alum	OVA + AgNP 10 nm	OVA + AgNP 60 nm	OVA + AgNP 100 nm	AgNP 10 nm	AgNP 60 nm	AgNP 100 nm
	No. of animals	5	5	5	5 ^a	4	5	5 ^b	5	5
Liver										
Vacuolation, hepatocyte		0	0	0	5	0	0	4	0	0
Granular degeneration, hepatocyte		0	0	0	1	0	0	0	0	0
Congestion, intermediate zone		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Dark brown pigment deposition, Kupffer cell		0	0	0	5	0	0	4	0	0
Spleen										
Cell infiltration, red pulp, neutrophil		0	0	0	2	0	0	1	0	0
Congestion, red pulp		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Apoptosis, white pulp		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Dark brown pigment deposition, white pulp		0	0	0	1	0	0	0	0	0
macrophage proliferation		0	0	0	0	0	0	1	0	0
Mesenterium										
Granuloma		0	5	5	1	4	5	0 ^g	5	5
Crystal		0	5	0	0	0	0	0	0	0
Dark brown pigment deposition		0	0	0	5	4	5	5	5	5
Mesenteric lymph nodes										
Apoptosis, cortex		0	0	0	4	0	0	3	0	0
Apoptosis, paracortex		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Apoptosis, medulla		0	0	0	2	0	0	2	0	0
Hemorrhage		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Thymus										
Apoptosis, cortex		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Apoptosis, medulla		0	0	0	5	0	0	5	0	0
Thymus lymph nodes										
Dark brown pigment deposition		0 ^e	0	0 ^c	3 ^e	2 ^f	2 ^d	1 ^c	4 ⁱ	2 ^d
Apoptosis		0 ^e	0	0 ^c	3 ^e	1 ^f	2 ^d	1 ^c	3 ⁱ	1 ^d

a; 1 moribund and 4 dead cases, b; 5 dead cases, c; No. of sample is 1, d; No. of sample is 2, e; No. of sample is 3, f; No. of sample is 4, g; No. of sample is 0.