

**厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
分担研究報告書(平成28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 永晩 (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： 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、経皮あるいは静脈内投与試験では脾臓への影響が報告されているものの、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の経皮曝露による、免疫毒性の有無について検討するため、実験1)において直径10 nm AgNP (濃度 0.1 µg、1 µg 及び 10 µg) と卵白アルブミン (OVA、2 µg) との混合物の経皮曝露後、抗原であるOVAを腹腔内投与し、AgNPのアジュバント作用の有無を調べる実験を実施し、実験2)においては各サイズのAgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm、濃度 49 µg) とOVA (100 µg) との混合物の経皮曝露後、皮膚の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞に及ぼす影響を調べた。実験1)については、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を示したが、投与群間の差は認められなかった。一方、Vehicle群と比較してOVA処置群では惹起30分後の体温の有意な低下・低下傾向及び血中ヒスタミン濃度並びにアナフィラキシスコアの有意な増加・増加傾向が認められた。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、IFN-γ及びIL-17A分泌については、AgNP投与による有意な変化は見られなかった。実験2)については、AgNP曝露による皮膚のランゲルハンス細胞内のバーベック顆粒における明らかな形態学的変化は認められなかった。以上の結果から、OVA+AgNPの経皮曝露後、OVAを腹腔内投与する本モデルにおいては、AgNPの明らかなアジュバント作用は認められなかった。また、AgNPは皮膚のランゲルハンス細胞に対して明らかな影響を及ぼさなかった。今後、AgNPの形状やコーティング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 (Bergin IL et. al., *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol.* 2013;3. doi: 10.1504/IJBNN.2013.054515.)、経皮あるいは静脈内投与試験では脾臓への影響が報告されている (Korani M et. al., *Int J Nanomedicine.* 2011;6, 855-862, Schäfer B et.al., *Arch Toxicol.* 2013;87, 2249-2262)) もの、十分な評価は行われていない。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。更に、AgNPの経皮曝露濃度による免疫毒性に及ぼす影響に関する報告も乏しい。

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。

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た。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、様々な濃度の AgNP 10 nm を卵白アルブミン (OVA) と混合物にし、経皮曝露した。その後、抗原である OVA を腹腔内投与し、AgNP のアジュバント作用の有無を調べる実験を実施した。

B. 研究方法

実験 1)

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

卵白アルブミン (OVA) と AgNP の経皮感作後、OVA の腹腔内投与惹起による免疫毒性に関して、AgNP のアジュバント効果及び AgNP の濃度による影響についても合わせて検討するため、OVA をアジュバントの陽性対照であるコレラトキシン (CT) 又は直径 10 nm AgNP (濃度 10 µg、1 µg 及び 0.1 µg) 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。

AgNP は nanoComposix 社の銀ナノ粒子 (直径 10 nm (AGCB10)、濃度 1 mg/ml) を用いることとした。抗原懸濁液は OVA 及び CT を各々 2 及び 1 µg/50 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。AgNP は濃度が 10 µg、1 µg 及び 0.1 µg /50 µL /マウスとなるように調整した。

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、① Vehicle 群、② OVA 群、③ OVA + CT 群、④ OVA + AgNP 10 nm 0.1 µg、⑤ OVA + AgNP 10 nm 1 µg、⑥ OVA + AgNP 10 nm 10 µg (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 µL の抗原懸濁液を浸潤させ剃毛部に貼付した。パッチの上からマウス用ジャケットを巻いてパッチを保護し、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。OVA の腹腔内投与 30 分間後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 (Figure 6) 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-BIO) 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 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、IFN-γ 及び IL-17A の濃度を、ELISA フローサイトメトリー法を用いて測定した。

更に、全身状態観察、体重、脾臓重量、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を検討した。

実験 2)

平成 26 年度の動物実験から得られた皮膚標本を用いて皮膚の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞の形態学的変化を電子顕微鏡を用いて検討した。

動物実験は実験 1 と同様に実施した。

各群は以下の通りに構成した、① Vehicle 群、② OVA (100 µg) 群、③ OVA + AgNP 10 nm (49 µg) 群、④ OVA + AgNP 60 nm 群、⑤ OVA + AgNP 100 nm 群。

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、Dunnett 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 *又は# $p < 0.05$ 、**又は## $p < 0.01$ 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)

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。実験期間中の体重及び解剖時の脾臓相対重量は群間に明らかな差は認められなかった (Figure 2)。感作 4 週後のマウスにおいて、いずれの OVA 処置群でも、血中の OVA 特異的な IgG1、IgE 及び IgG2a が Vehicle 群と比較して有意に増加を示し、OVA+CT 群の IgG1、IgE 及び IgG2a が OVA 群と比較して有意に増加を示したが、AgNP 投与による影響は認められなかった (Figure 3)。直腸内体温の変化については、惹起 10 分、20 分及び 30 分後、Vehicle 群と比較して全 OVA 群、OVA+CT 群及び全ての OVA+AgNP 群で統計学的に有意な体温の低下又は低下傾向が認められた (Figure 4)。30 分後に OVA 群、OVA + CT 群、OVA + AgNP 10 nm 0.1 μg 群、OVA + AgNP 10 nm 1 μg 群及び OVA + AgNP 10 nm 10 μg 群では各々平均 3.1、3.2、2.5、1.3 及び 2.3 度の体温低下が認められた。体温が有意に低下した OVA 群、OVA + CT 群及び全ての OVA + AgNP 群においては惹起 30 分後の血中ヒスタミン濃度が統計学的に有意

に上昇していた (Figure 4)。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 + CT 及び何れの OVA+AgNP 群でも平均 2.4~3.0 と統計学的有意な高いスコア又は高い傾向のスコアであった (Figure 4)。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分泌を調べた結果、IL-5 及び IFN- γ において、群間に有意な変化は見られなかった。IL-4 においては、OVA + AgNP 10 nm 0.1 μg 群及び OVA + AgNP 10 nm 1 μg 群で、IL-2 においては、OVA + CT 群、OVA + AgNP 10 nm 0.1 μg 群及び OVA + AgNP 10 nm 1 μg 群で、IL-17A においては、Vehicle 群と比べ有意な増加が認められたが、殆どのデータが検量線下限以下であった (Figure 5)。OVA + CT 群で Vehicle 群及び OVA 群と比べても有意な増加が認められた (Figure 5)。

皮膚病変のスコアリングを行った結果、OVA+CT 群で Vehicle 群と比較して有意な増加が認められた (Figure 6、Table 1)。貼付部位近傍の左腋窩リンパ節の重量については 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。一方、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性を示す濾胞の割合 (Ki67 陽性 2 次濾胞の数/濾胞の数 $\times 100$ (%)) については、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で増加傾向が認められた (Figure 6)。

実験 2)

皮膚標本を電子顕微鏡で観察した結果、Vehicle 群と比較していずれの OVA 処置群でもランゲルハンス細胞及びバーベック顆粒の明らかな形態学的な変化は認められなかった (Figure 7)。

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、実験 1) においては、直径 10 nm AgNP (濃度 10 μg 、1 μg 及び 0.1 μg) と OVA (2 μg) との混合物の経皮感作後、抗原である OVA を腹腔内投与し、AgNP のアジュバント作用の有無を調べる実験を実施した。実験 2) においては各サイズの AgNP (直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm、濃度 49 μg) と OVA (100 μg) との混合物の経皮曝露後、皮膚の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞に及ぼす影響を調べた。その結果、本モデルにおいて、AgNP による明らかなアジュバント作用及びランゲルハンス細胞への影響

は認めなかった。

26年度及び27年度の検討においては、異なるサイズのAgNPのアジュバント効果を調べたが、いずれのサイズのAgNPにおいても、明らかなアジュバント効果を示さなかった。28年度は濃度によるAgNPのアジュバント効果の有無について調べた。当所の研究により、他の金属ナノマテリアルは低濃度の方でより強いアジュバント効果を示す結果が得られている（所内他部の未公開データ）。アジュバントは必ずしも高濃度である必要はなく、抗原性を最大限発揮できる抗原との比があると推測される。しかし、我々が検討したナノ銀の濃度の範囲内では明らかなアジュバント作用は認められなかった。今後さらに広範な濃度での検討は必要であると考えられた。

ランゲルハンス細胞は骨髄由来の樹状細胞で、皮膚などの重層扁平上皮細胞に特有の抗原提示細胞である。トノフィラメントを欠き、デスモソームなどの細胞接着構造を持たず、遊走性である。電子顕微鏡で観察すると細胞質に線維成分は少なく、特異的な”テニスラケット状”の切断面を持つバーベック顆粒を持つ。バーベック顆粒はゴルジ装置由来とも細胞膜由来ともいわれており、細胞内の抗原輸送を担っている（あたらしい皮膚科学、清水 宏、中山書店）。ランゲルハンス細胞に有毒な物質はバーベック顆粒に形態学的異常を及ぼす報告もある（Kanerva L, Am J Dermatopathol. 1990 12 (51-62)）。ナノマテリアルによる影響についての報告は見当たらない。

26年度及び27年度の研究において、経皮曝露 OVA の濃度及び陽性対照アジュバントの改良に加え、経口投与する OVA の濃度を 5 mg から 100 mg に変更したモデルを用いて、サイズの異なる AgNP のアジュバント作用の有無を調べる実験を実施したところ、AgNP によるアジュバント作用は認めなかった。今年度はナノ銀のサイズではなく濃度に着目してアジュバント作用の有無を調べたが、以前と同様に、明らかなアジュバント作用は認めなかった。OVA の経皮感作後、OVA を腹腔内投与した動物においては、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及びアナフィラキシスコアリングの高値が認められ、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、本モデルの陽性対照物質である CT は毒物であり、使

用に制限が多いことから、無毒な陽性対照が望ましい。CT は有毒なサブユニット A (CTA) と無毒なサブユニット B (CTB) で構成されており、CTB は有望なアジュバントとして期待されていることから、今後、CTB を用いた検討が必要であると考えられた (Stratmann T, Vaccine (Basel). 2015; 3 (579-596))。

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経皮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。このモデルを用いた本研究の成果は、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 を腹腔内投与する本モデルにおいて、AgNP の皮膚感作については、明らかなアジュバント作用は認めなかった。また、AgNP は皮膚のランゲルハンス細胞に対して明らかな影響を及ぼさなかった。今後、AgNP の形状やコーティングなどさらなる検討が必要であると考えられた。

F. 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)

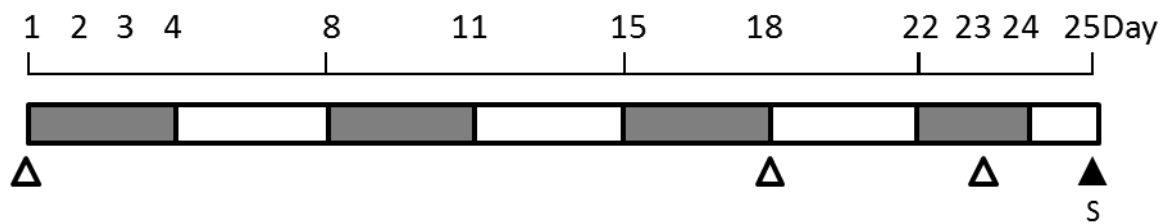
曹永晩, 水田保子, 豊田武士, 赤木純一, 曾根瑞季, 安達玲子, 木村美恵, 最上 (西巻) 知子, 小川久美子: マウス経皮曝露モデルにおけるコレラトキシンのアジュバント作用の検討. 第43回日本毒性学会学術年会 (2016年6月)

曹永晩, 赤木純一, 水田保子, 豊田武士, 小川久美子: BALB/cマウスにおけるナノ銀の腹腔内投与による急性毒性はサイズによって異なる. 第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2017年1月)

Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Ogawa K : Acute toxicity of intraperitoneally administered silver nanoparticles of varying sizes in mice. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2017.3 Baltimore, MD, USA)

G. 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 μ l/mouse), ovalbumin (OVA, 2 μ g) + cholera toxin (CT, 1 μ g) or silver nanoparticles (10 nm AgNP, 0.1, 1, 10 μ g/mouse)

- ① 2 mM citrate (vehicle)
- ② OVA
- ③ OVA + CT
- ④ OVA + AgNP 10 nm 0.1 μ g
- ⑤ OVA + AgNP 10 nm 1 μ g
- ⑥ OVA + AgNP 10 nm 10 μ g

Δ Blood sampling

\blacktriangle Evocation with OVA (i.p. 1 mg)

S Sacrifice (30 min after evocation)

Figure 1. 実験デザイン (実験 1)

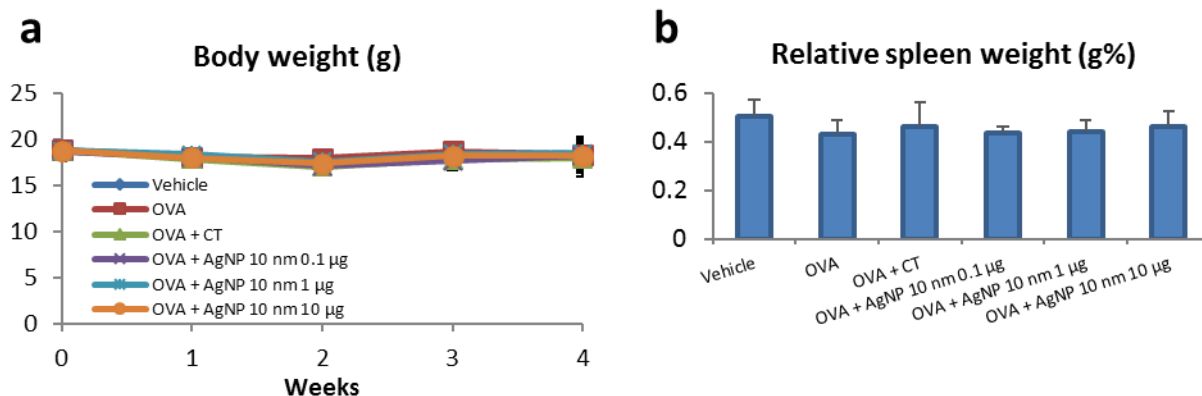


Figure 2. 体重 (a) 及び 相対脾臓重量 (b) (実験 1)

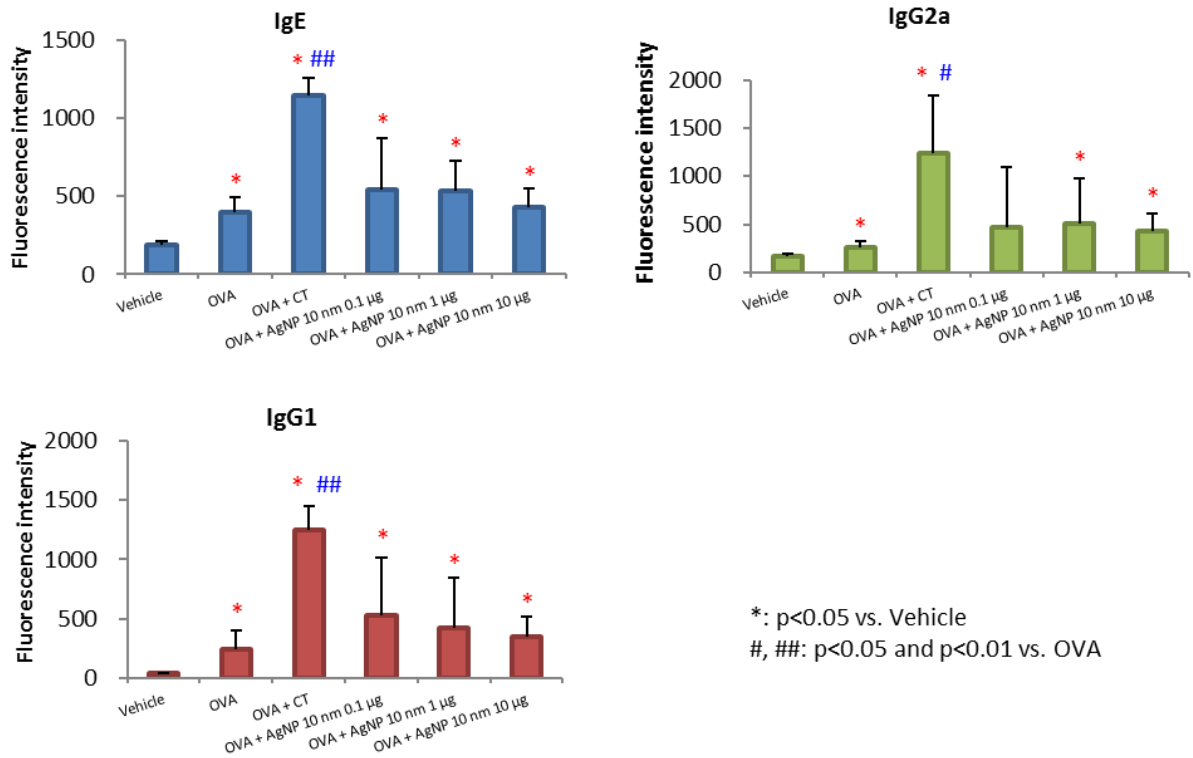
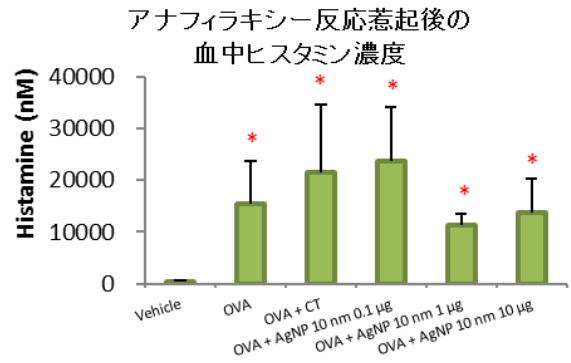
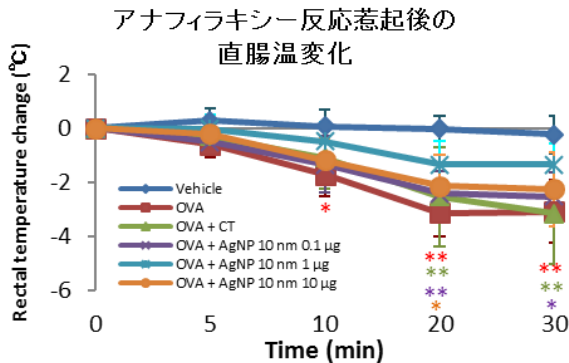
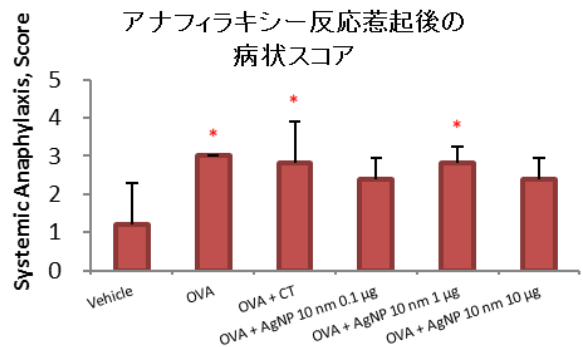


Figure 3. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 1)



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



*, **: p<0.05, p<0.01 vs. Vehicle

Figure 4. アナフィラキシー反応惹起の反応 (実験 1)

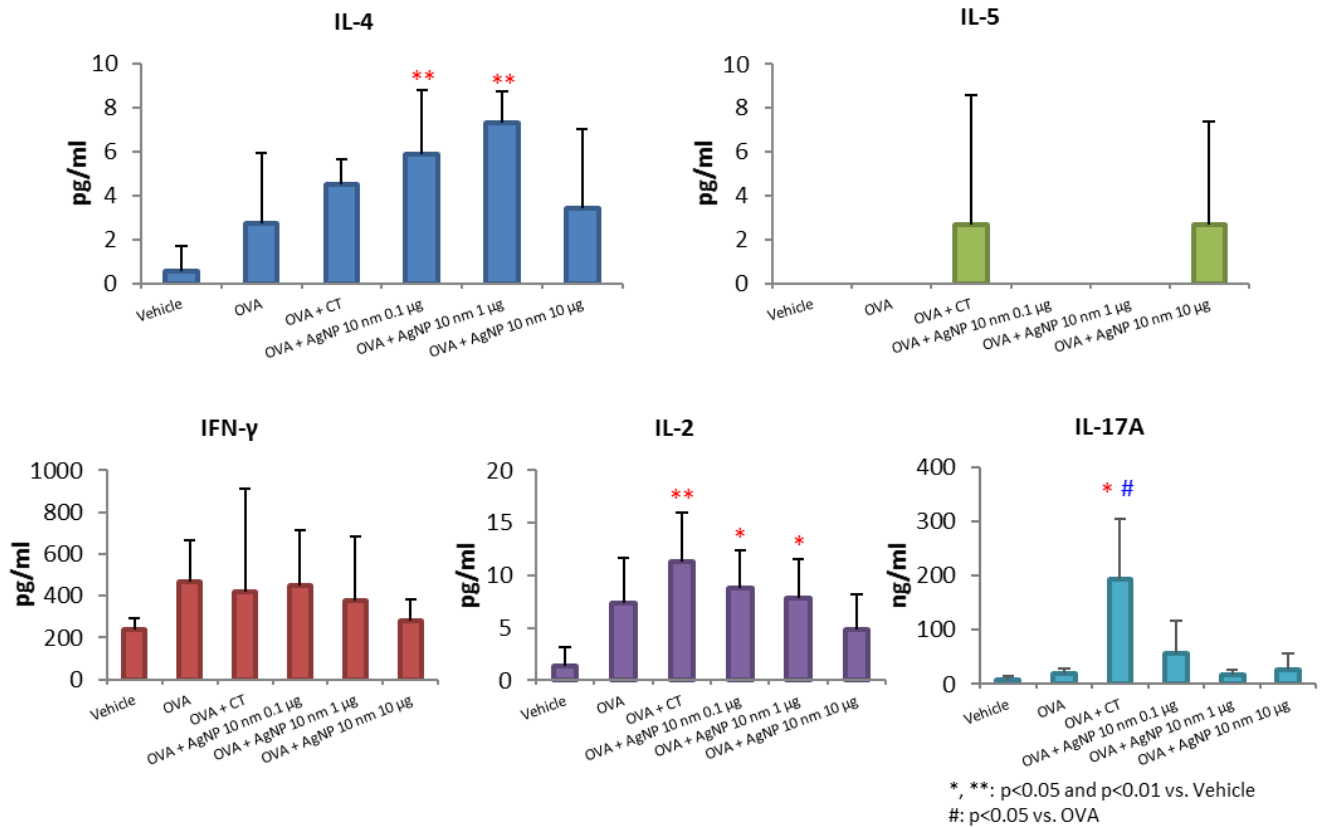


Figure 5. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 1)

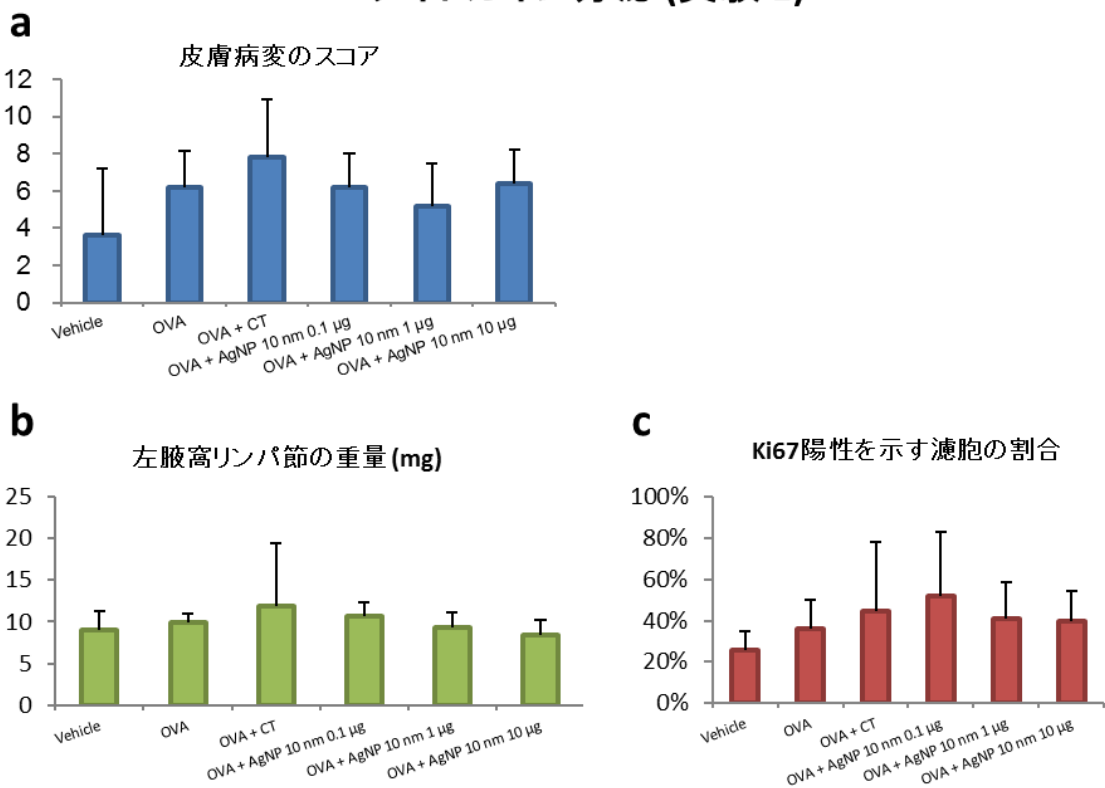


Figure 6. 皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)及び細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の割合 (c) (実験 1)

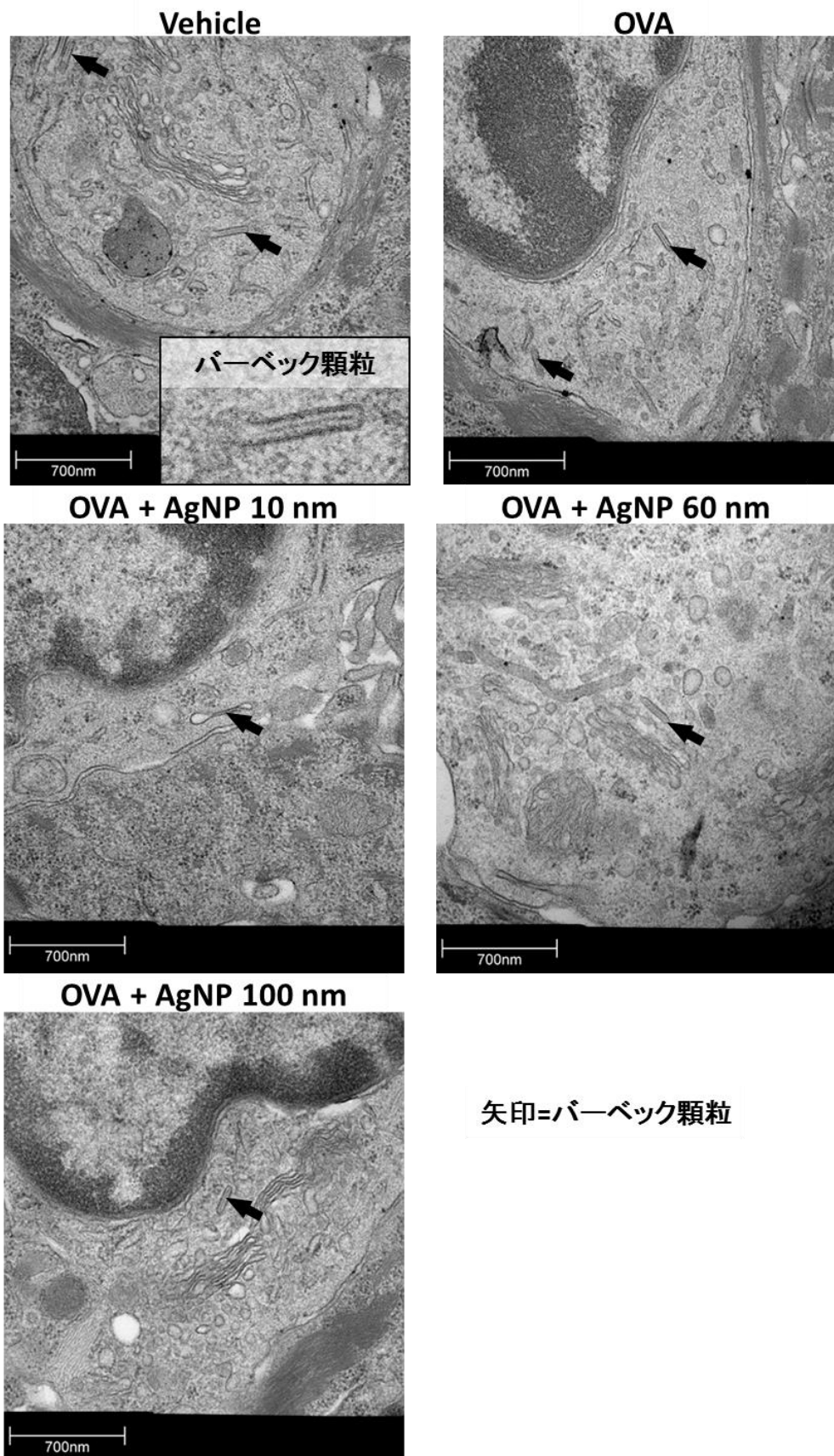


Figure 7. ランゲルハンス細胞バーベック顆粒の電子顕微鏡観察 (実験 2)

Table 1. 病理組織学的所見 (実験1)

Treatment	No. of animal	Skin			
		Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration
		+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++
Vehicle	5	3/0/1	0/0/2	1/1/0	1/1/0 3/0/1
OVA	5	1/3/1	2/1/1	4/1/0	2/3/0 1/3/1
OVA + CT 0.1 µg	5	0/3/2	2/0/3	1/2/1	2/3/0 0/3/2
OVA + CT 1 µg	5	1/2/2	1/3/1	4/0/0	4/1/0 1/2/2
OVA + CT 1 µg	5	2/1/1	1/3/0	4/0/0	2/3/0 2/1/1

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