

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29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。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暴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、皮膚からも暴露される。AgNPの経皮経口複合暴露による、免疫毒性の有無について、特にアジュバント作用に関する評価方法を確立するため、実験1)においてコレラ菌由来毒素（コレラトキシン、CT）並びにそのBサブユニット（CTB）を卵白アルブミン（OVA）と混合物にし、経皮暴露した。その後、抗原であるOVAを腹腔内投与し、アジュバント作用の有無を検討した。実験2)においては、ヒトで皮膚感作性を示す小麦タンパク加水分解物（HWP）について、OVAと同等の低濃度暴露による抗原作用の有無を検討した。実験1)については、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を示したが、CT及びCTB投与による影響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ースコアの有意な増加・増加傾向が認められたが、CT及びCTB投与による影響は認められなかった。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IL-2、IL-4、IL-5及びIFN- γ 分泌については、CT及びCTB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、0.5時間処理HWPはヒトで皮膚感作性を持つ物質と同様のSDS-PAGEパターンを示した。HWP 5.4、27及び135 μ g群で、血中のHWP特異的なIgG1及びIgEがVehicle群と比較して有意に増加を示した。一方、Vehicle群と比較してHWP 27及び135 μ g群で惹起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ースコアの有意な増加・増加傾向が認められた。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IL-2、IL-4、IL-5及びIFN- γ 分泌については、HWP投与による有意な変化は見られなかった。以上の結果から、今回の条件においては、皮膚感作性試験の陽性アジュバント物質として検討したCT及びCTBについては明らかなアジュバント効果を示さなかった。前年度、CTを用いた検討では明らかなアジュバント作用を認めており、今後、再現性及び濃度依存性など更なる検討が必要であると考えられた。また、HWPの経皮暴露後、HWPを腹腔内投与する実験において、HWPはOVAと同程度の低濃度でも十分な抗原性を示し、皮膚感作性試験の有望な抗原であることが明らかとなった。AgNPの経皮経口複合暴露によるアジュバント作用に関する評価方法

を確立するための重要な知見を得たと考えられた。

キーワード：ナノ銀、経皮感作性、小麦タンパク加水分解物、コレラトキシン、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 の経皮暴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暴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、皮膚からも暴露される。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、経口暴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暴露された後に、経口暴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、他のアレルギー暴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。

平成 24 年から、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暴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。

コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) が産生するコレラ菌由来毒素 (コレラトキシン、CT) は、分子量約 84 kDa のオリゴマータンパク質で、腸管で作用し激しい下痢などにより脱水症状を引き起こす。CT はオリゴマータンパク質で、分子量約 27 kDa の A サブユニット (CTA) 1 分子、分子量約 11.6 kDa の B サブユニット (CTB) 5 分子からなる。毒性を示さない CTB は経皮免疫のアジュバントとして検討されている (Glenn GM et. al., *Nature.* 1998;391, 851-852, Olvera-Gomez I et. al., *PNAS.* 2012;109, 2072-2077)。

本研究では、AgNP の経皮経口複合暴露による、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、CT 並びに CTB を卵白アルブミン (OVA) と混合物にし、経皮暴露した。その後、抗原である OVA を腹腔内投与し、CTB の陽性アジュバントとしての有用性を検討した。また、ヒトで皮膚感作性を示す小麦タンパク加水分解物 (HWP) について、OVA と同等の低濃度暴露による抗原作用の有無を検討した。

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、コレラトキシン (CT) のような毒性を示さないコレラトキシン B サブユニット (CTB) のアジュバント効果を検討するため、OVA をアジュバントの陽性対照であるコレラトキシン (CT) 又はコレラトキシン B サブユニット (CTB) 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。

抗原懸濁液は OVA (Sigma A5503-1g)、CT (LBL 101B) 及び CTB (LBL 103B) を各々 2、1 及び 0.7 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。1 µg CT 中には約 0.7 µg の CTB が含まれている。

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 + CTB (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 5) 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、腋窩および鼠経リンパ節重量の測定を行った。病理組織学的検査は、脾臓、暴露皮膚局所、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)

グルテン (Sigma G5004) を 100 mg/mL となるよう 1M Tris (pH 11.4) に加えて懸濁し、終夜室温に静置してストック懸濁液を調製した。経皮感作にはストック懸濁液を PBS で 10 倍希釈し、pH を 8 付近に調整したものをを用いた。

グルテン加水分解物 (HWP) については、グルテンのストック懸濁液に 1M 塩酸を加えて pH を約 2 に調整し、100°C のヒートブロック上で、0.5 時間加熱した。その後、1.5M 水酸化ナトリウム水溶液中で中和して加水分解反応を停止させ、グルテン終濃度 10 mg/mL となるように PBS にて希釈した。分解 0 時間のサンプルは、1M 塩酸を予め中和した溶液中にグルテンストック懸濁液を加え、加熱は行わずに調製した。HWP は懸濁液の状態なので静置して上清を使用したため、BCA タンパク質アッセイにより上清のタンパク濃度測定を行うとともに SDS-PAGE により加水分解が進行したことを確認した。

動物実験において、Day 25 に行うアレルギー反応の惹起を感作抗原 270 µg を用いて腹腔内投与して行う以外は、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 HWP 0.22 µg 群、③ HWP 1.1 µg 群、④ HWP 5.4 µg 群、⑤ HWP 27 µg 群、⑥ HWP 135 µg 群 (Figure 2)。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エ

クセル統計 (BellCurve for Excel) 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、Dunnet 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、Dunnet 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経皮並びに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

実験 1)

暴露期間中の体重及び解剖時の脾臓の相対重量について、群間の差は認められなかった (Figure 3)。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 及び IgE が Vehicle 群と比較して有意に増加を示したが、CT 及び CTB 投与による影響は認められなかった (Figure 4)。また、いずれの OVA 投与群でも IgG2a の有意な変化は認めなかった。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 群で統計学的に有意な体温の低下が認められ、OVA + CTB 群では惹起 5 分後から、体温の低下が示された (Figure 5)。30 分後に OVA 群、OVA + CT 群及び OVA + CTB 群では各々平均 3.2、4.4 及び 4.3 度の体温低下が認められた。体温が有意に低下した全ての OVA 処置群においては惹起 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 5)。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、全ての OVA 処置群でも平均 2.8~3.2 と統計学的に有意な高いスコア又は高い傾向のスコアであった (Figure 5)。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結果、IL-2 においては、OVA + CT 群で Vehicle 群と比べ有意な増加が認められた (Figure 6)。IL-4、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 (Figure 6)。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 7、Table 1)。OVA 群及び OVA + CTB 群で有意な増加はないものの、増加傾向を示した (Figure 7、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は認められなかった。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 処置群で有意な増加又は増加傾向が認められた (Figure 7)。

実験 2)

グルテンの酸加水分解物を 3 回作製し、BCA タンパク質アッセイにより、懸濁液上清の濃度を測定した結果、平均 2.7 mg/ml であった。加水分解 0.5 時間の SDS-PAGE のパターンは 100 kDa 以下に広くスメアなパターンを示し (Figure 8)、グルパール 19S と類似した (厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「医薬部外品・化粧品に含有される成分の安全性確保に関する研究」分担研究報告書 (平成 24 年度))。グルパール 19S とパターンが類似している 0.5 時間分解物を取り上げ、マウスに対する経皮感作能を検討した。

暴露期間中の体重について、群間の差は認められなかったが、解剖時の脾臓の相対重量にお

いて、HWP 5.4 µg 群で有意な増加が示された (Figure 9)。感作 4 週後のマウスにおいて、HWP 5.4、27 及び 135 µg 群で、血中の HWP 特異的な IgG1 及び IgE が Vehicle 群と比較して有意に増加を示し、HWP 27 及び 135 µg 群で、IgG2a が有意に増加した (Figure 10)。直腸内体温の変化については、惹起 20 分及び 30 分後、Vehicle 群と比較して HWP 27 µg 以上の群で統計学的に有意な体温の低下が認められた (Figure 11)。30 分後に HWP 5.4、27 及び 135 µg 群では各々平均 0.4、2.0 及び 2.8 度の体温低下が認められた (Figure 11)。体温が低下した HWP 5.4、27 及び 135 µg 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な上昇又は上昇傾向を示した (Figure 11)。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、全ての HWP 処置群でも平均 1.4 ~ 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 11)。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結果、何れのサイトカインにおいても、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 12)。皮膚病変のスコアリングを行った結果、HWP 5.4、27 及び 135 µg 群で Vehicle 群と比較して有意な増加が認められた (Figure 13、Table 2)。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 HWP 135 µg 群で有意な増加が認められた (Figure 13)。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 x 100 (%)) についても、Vehicle 群と比較して HWP 5.4、27 及び 135 µg 群で有意な増加が認められた (Figure 13)。

D. 考察

本研究では、AgNP の経皮経口複合暴露による、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、CT 並びに CTB を OVA と混合物にし、経皮暴露後、抗原である OVA を腹腔内投与し、CTB の陽性アジュバ

ントとしての有用性を検討した。実験 2) においては、ヒトで皮膚感作性を示す HWP について、OVA と同等の低濃度暴露による抗原作用の有無を検討した。その結果、今回の条件においては、陽性アジュバント物質として検討した CT 及び CTB については明らかなアジュバント効果を示さなかった。前年度、CT を用いた検討では明らかなアジュバント作用を認めており、今後、再現性及び濃度依存性など更なる検討が必要であると考えられた。また、HWP は OVA と同程度の低濃度でも十分な抗原性を示し、皮膚感作性試験の有望な抗原であることが明らかとなった。

26 年度に行った皮膚感作性試験のアジュバント陽性対照の検討において、Alum は明らかなアジュバント効果を示さなかった。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た。しかし、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た (Holmgren J et al., Vaccine. 1993;11 (1179-1184))。27 年度に CT の経皮感作性試験におけるアジュバント陽性対照物質として検討した結果、検討したすべての濃度 (0.1-10 µg) で OVA 特異的抗体の有意な増加が認められ、CT は有効な陽性対照アジュバントであることが明らかとなった。しかし、CT は毒物であり、購入・保管・使用・廃棄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 CTA と無毒な 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 (Stratmann T, Vaccine (Basel). 2015; 3 (579-596))、CTB を用いた検討を行った。しかし、今回の検討では CTB の明らかなアジュバント作用は認められなかった。更に、これまでの検討で明らかなアジュバント効果を示してきた CT もアジュバント作用を示さなかった。CTB については 1 µg CT と同じモル数に相当する、0.7 µg を投与したが、今までの検討で CT がアジュバント効果を示したのは

0.3 µg の CTA による影響が否定できない。今後はより高濃度での CTB の検討が必要であると考えられた。今回の実験で CT の明らかなアジュバント作用が見られなかったことについて、CT 群の OVA 抗原特異的 IgE 及び IgG1 値が OVA 群に比べ増加傾向はあったものの、有意な増加を示さなかったことから、OVA の濃度の最適化が必要と考えられた。

近年、大きな話題になったある特定の小麦タンパク加水分解物（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、当所生化学部で確立された本モデルを使用し、グルパール 19S による経皮感作性が証明された（Adachi R et al., Allergy, 2012; 67 (1392-1399)）。健康問題になっているグルパール 19S のような小麦タンパク加水分解物、HWP を用いて、OVA に代わる抗原物質としての有効性を検討した。小麦タンパク、グルテンの酸加水分解 0.5 時間の SDS-PAGE のパターンは 100 kDa 以下に広くスミアなパターンを示したが、酸加水分解 0 時間の SDS-PAGE のパターンより高分子の産生も認められた。一般的にペプチド結合の加水分解に関して、酸性条件では可逆反応であり、逆反応が進行する可能性があるため、一旦生成したペプチド鎖がまた別のペプチド鎖と結合し、鎖長の長い新たなアミノ酸配列が出現する可能性が考えられる。OVA の場合、2 µg という低濃度で抗原性を示すが、今回検討した HWP も 5.4 µg で抗原性を示し、経皮感作性試験の抗原としての有効性が認められた。更に、惹起時の抗原濃度が OVA を用いた実験の約 30%に過ぎなかったにも関わらず HWP 27 µg 以上の群で明らかなアナフィラキシー反応を示した。皮膚病変においても、HWP 5.4 µg 以上の群で有意に高いスコアを示した。以前検討したグルパール 19S に比べ、HWP は弱いながら皮膚毒性を有する可能性等が考えられる。皮膚毒性を示さず、かつ抗原性を維持する濃度の検索が必要と考えられた。

E. 結論

今回、経皮感作性試験におけるナノ銀のアジュバント効果を調べる本モデルの改善を目的に、新しい抗原物質及び陽性アジュバント物質について検討した。我々が実施した、HWP の経皮暴露後、HWP を腹腔内投与する実験において、HWP は OVA と同程度の低濃度でも十分な抗原性を示し、皮膚感作性試験の有望な抗原であることが明らかとなった。また、皮膚感作性試験の陽性アジュバント物質として検討した CT 及び CTB については明らかなアジュバント効果を示さなかった。今後、再現性及び濃度依存性など更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）

曹永暁, 水田保子, 赤木純一, 豊田武士, 小川久美子: 経皮暴露感作性試験におけるコレラトキシン及びコレラトキシンBサブユニットのアジュバント作用. 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2018. 1. 26)

Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K: Adjuvant effects of transcutaneously exposed cholera toxin and its B sub-unit. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2018. 3. 12)

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

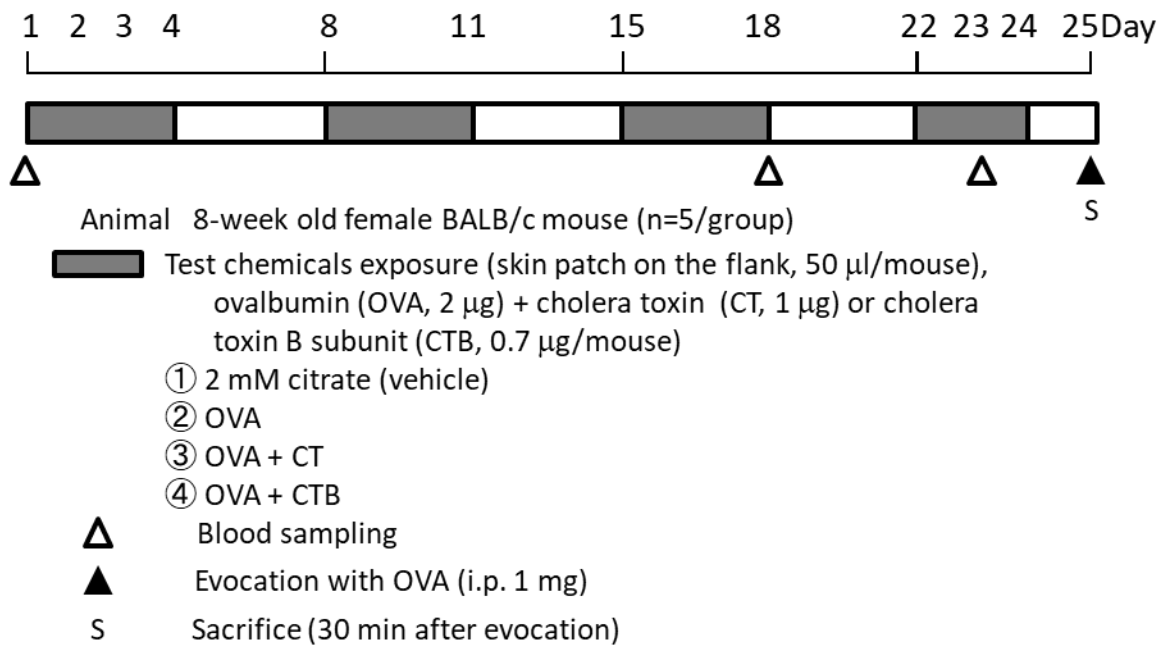


Figure 1. 実験デザイン (実験 1)

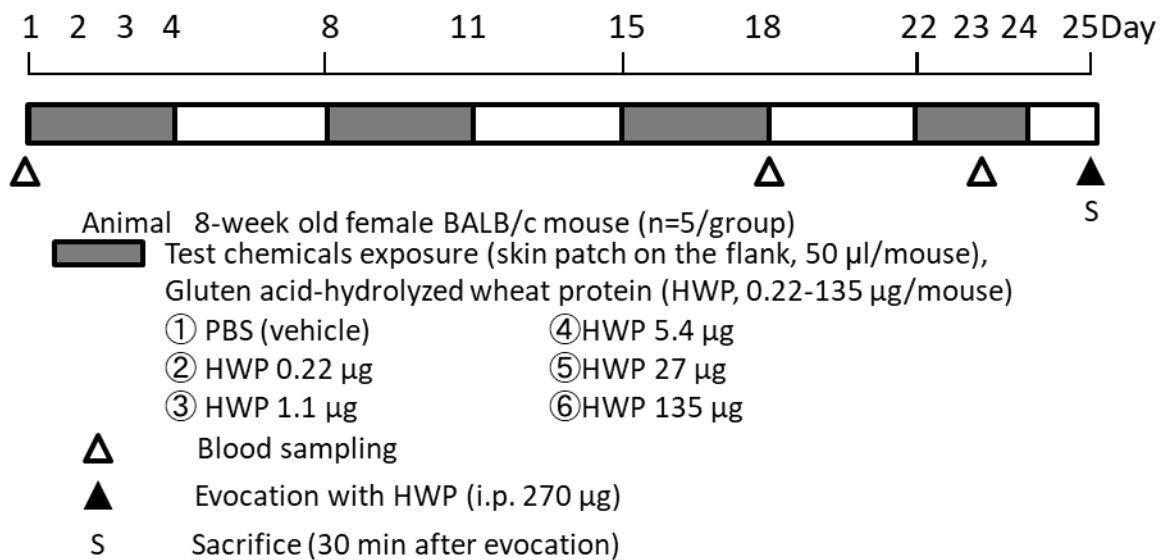


Figure 2. 実験デザイン (実験 2)

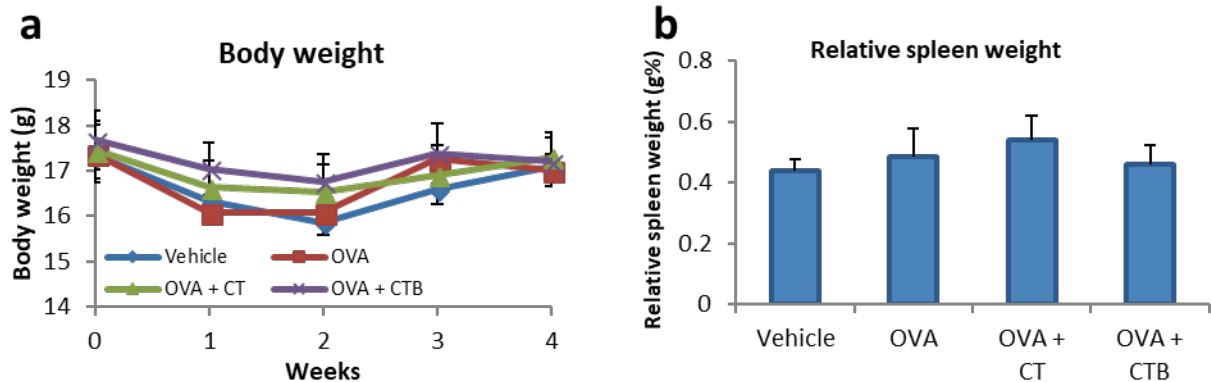


Figure 3. 体重 (a)及び相対脾臓重量 (b) (実験 1)

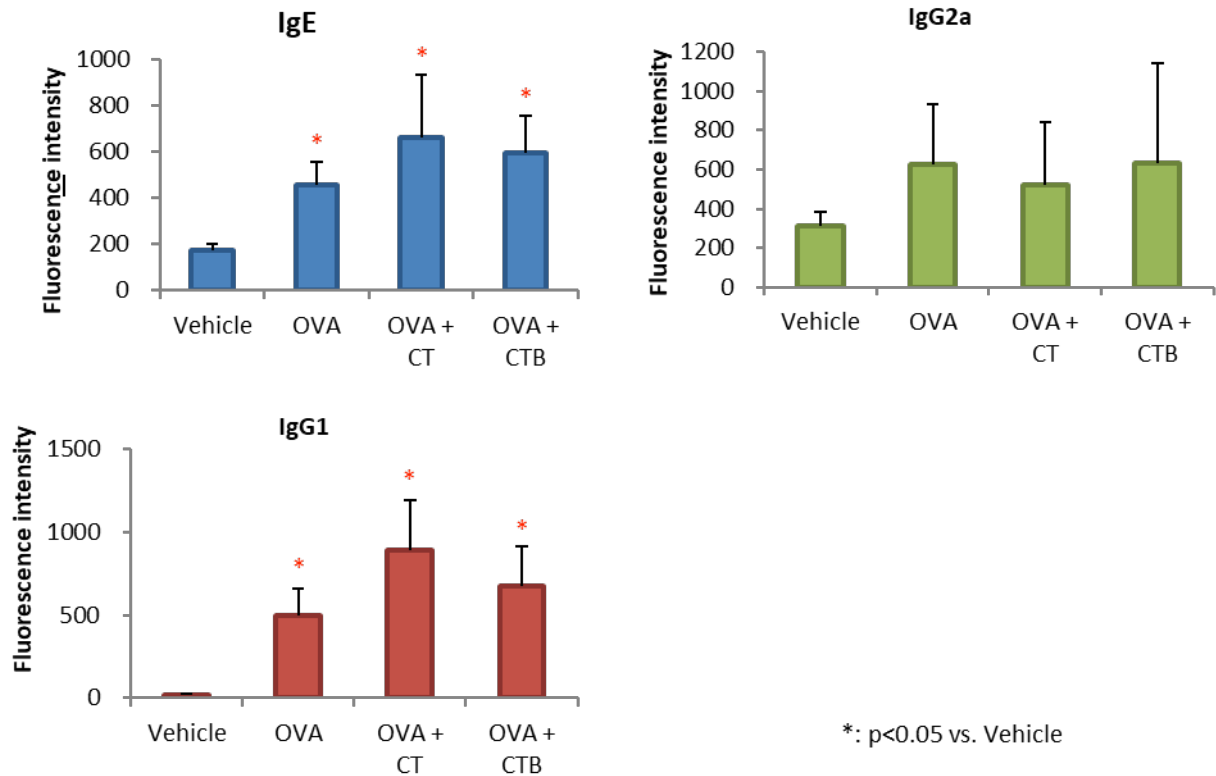
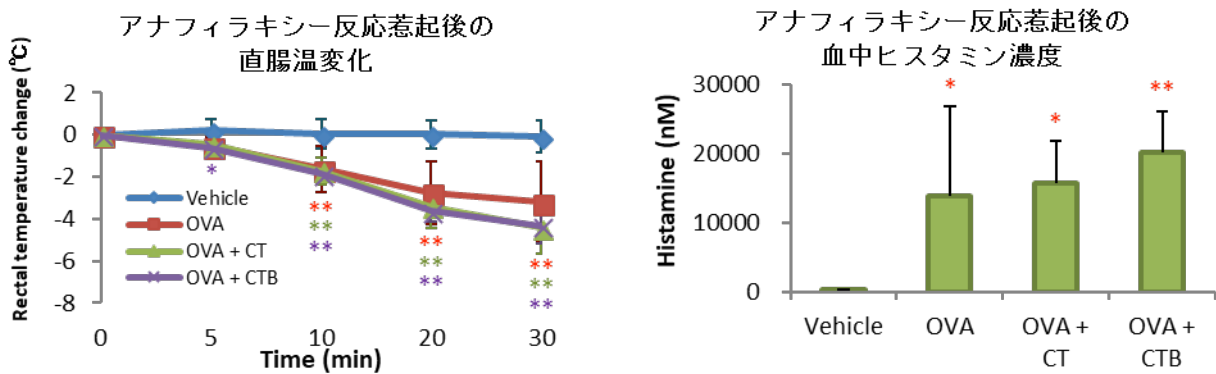


Figure 4. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 1)



アナフィラキシー症状のスコアリング

- Score 0 症状なし
- 1 □、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

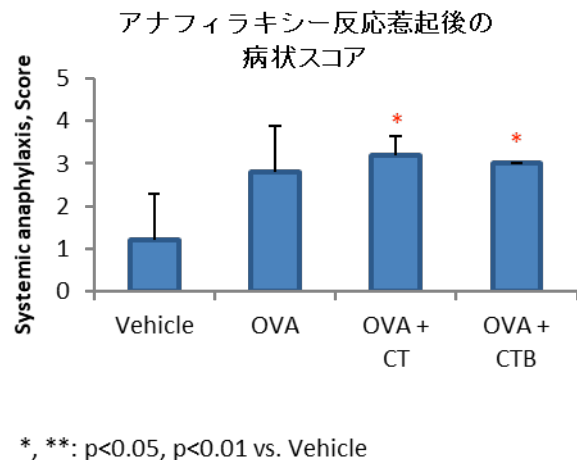


Figure 5. アナフィラキシー反応惹起の反応 (実験 1)

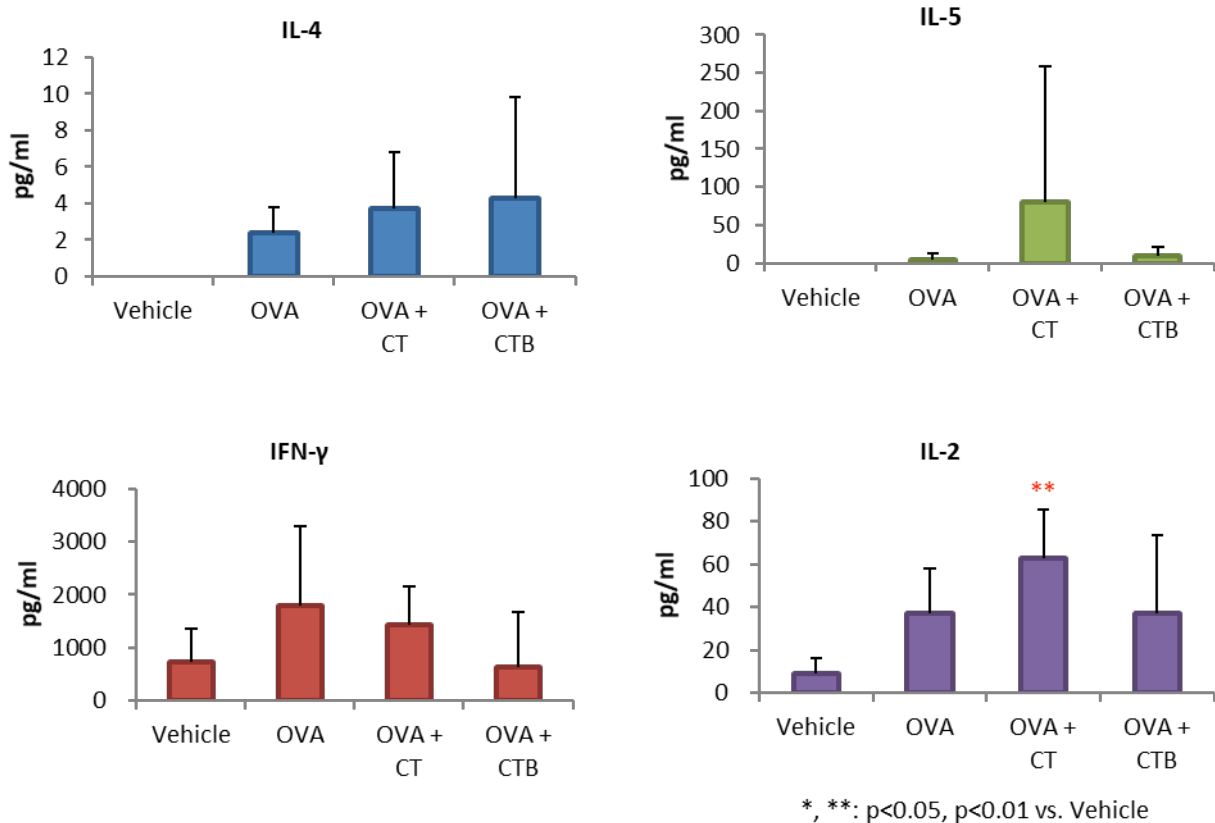


Figure 6. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 1)

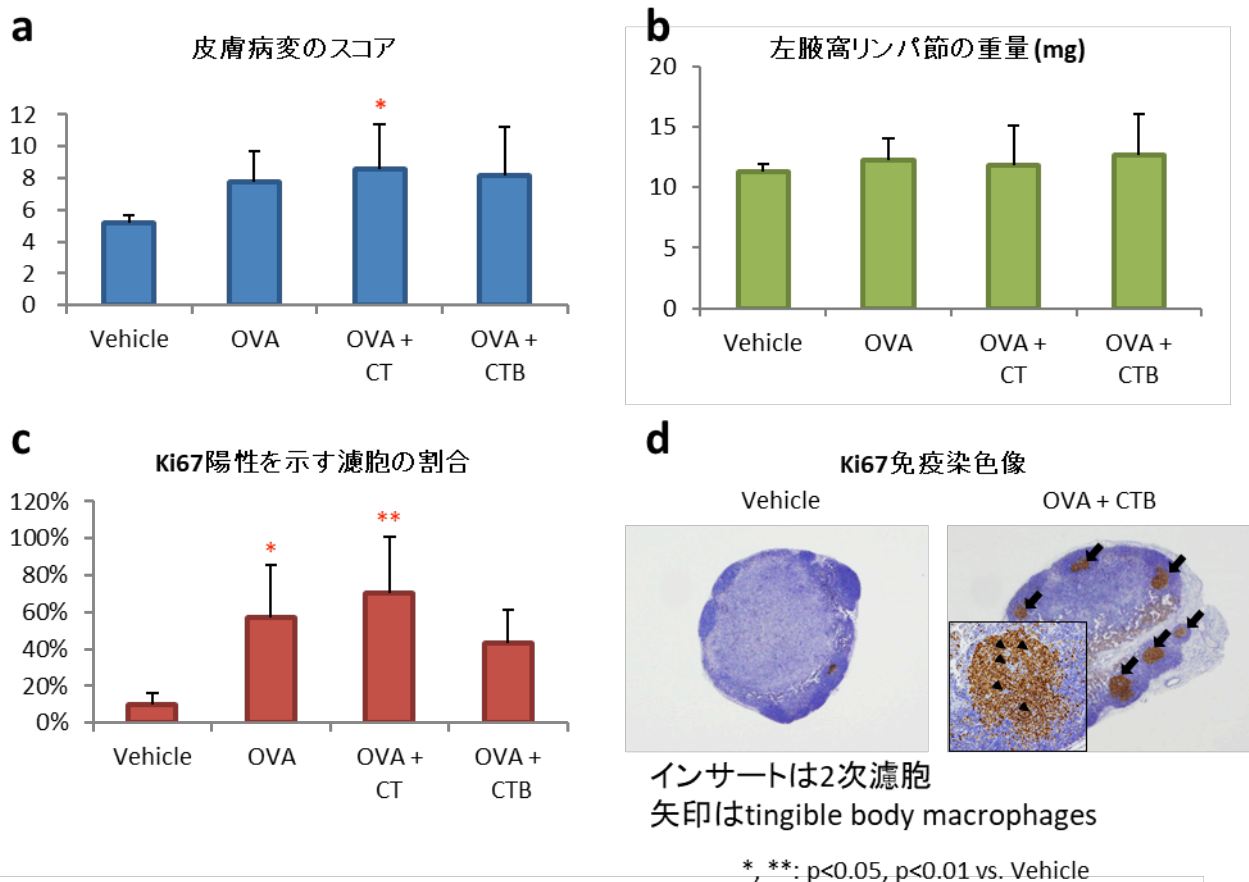


Figure 7. 皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)、細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の割合 (c) 及びKi67免疫染色像 (d) (実験 1)

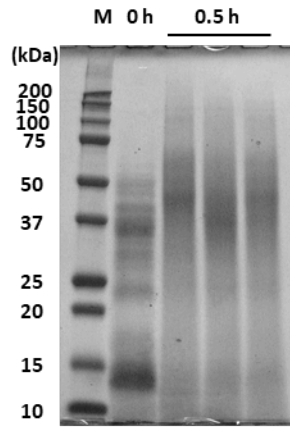


Figure 8. グルテン酸加水分解物の電気泳動像 (実験 2)

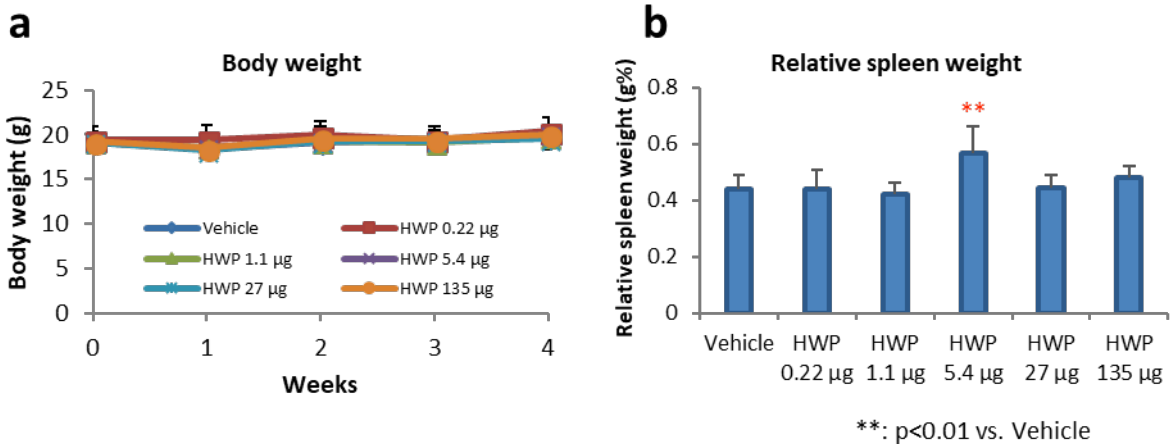


Figure 9. 体重 (a)及び相対脾臓重量 (b) (実験 2)

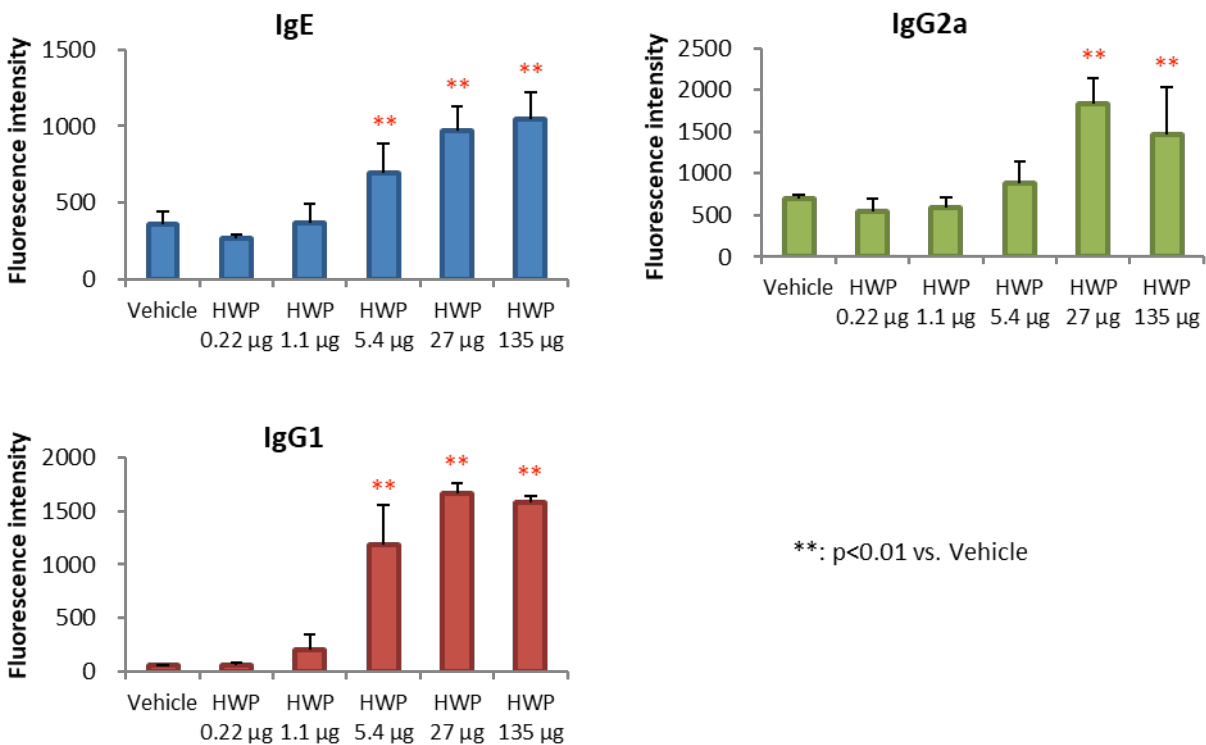
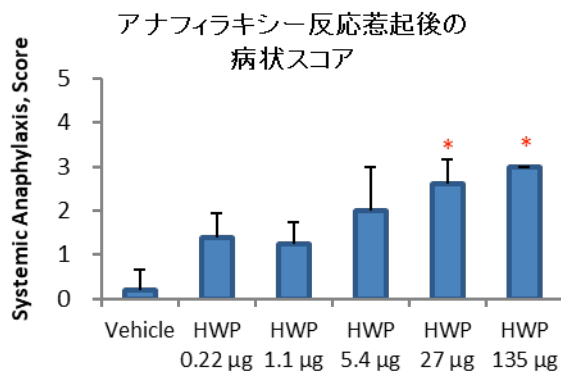
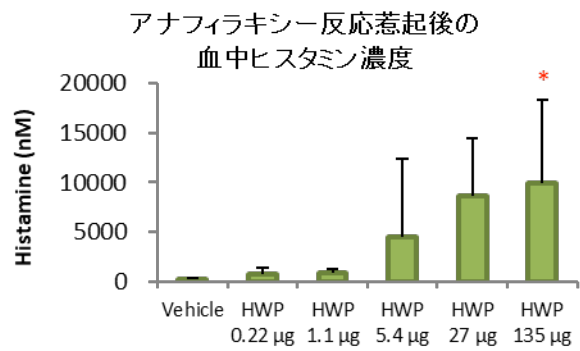
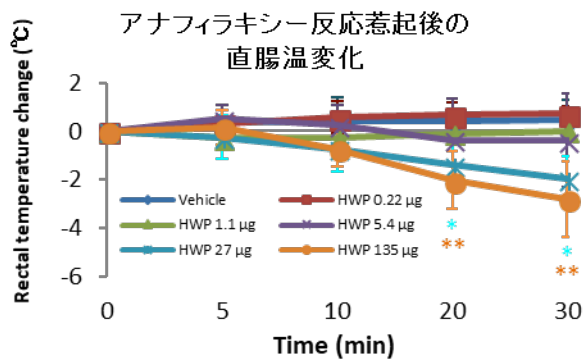


Figure 10. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 2)



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

Figure 11. アナフィラキシー反応惹起の反応 (実験 2)

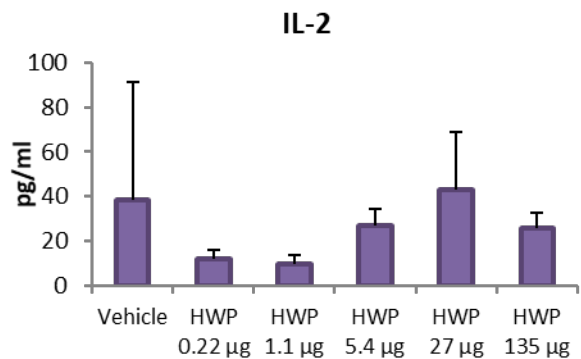
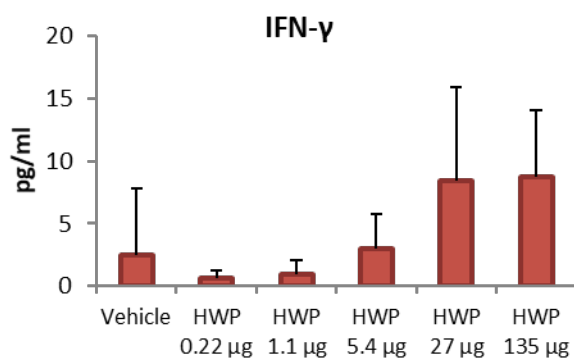
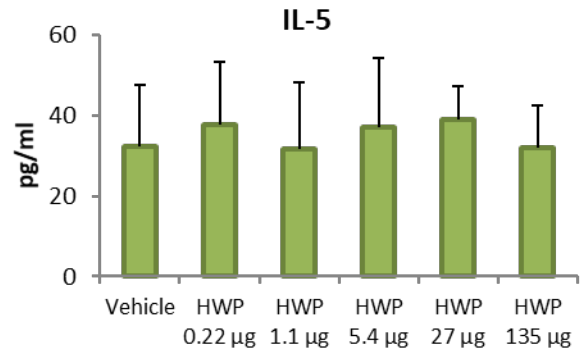
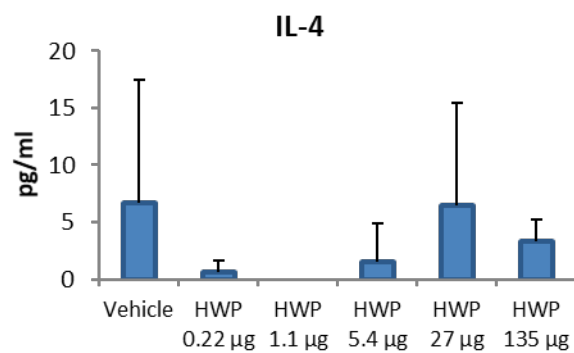


Figure 12. 抗原再暴露による感作脾臓細胞におけるサイトカイン分泌 (実験 2)

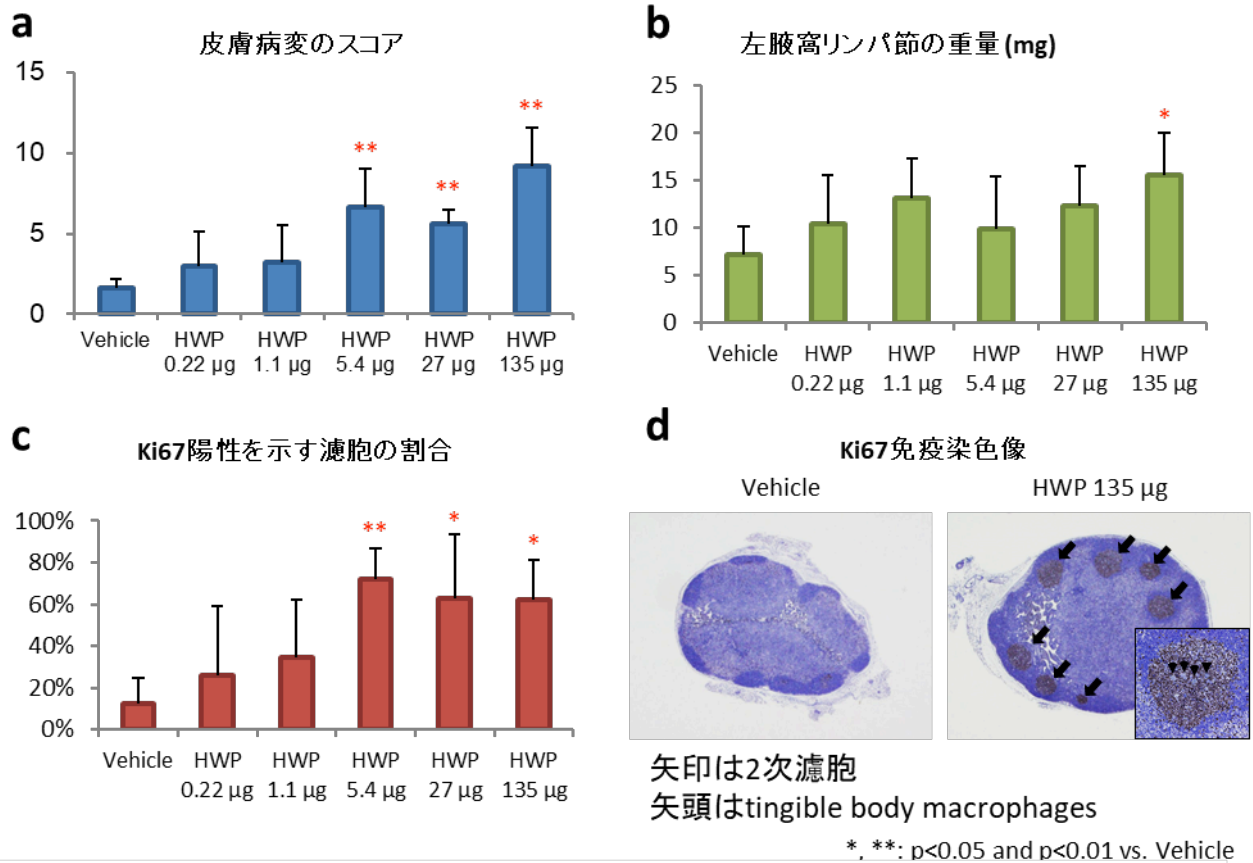


Figure 13.皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)、細胞増殖マーカーであるKi67陽性を示す濾胞の割合 (c)及びKi67免疫染色像 (d) (実験 2)

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	5/0/0	1/4/0	4/1/0	4/1/0
OVA	5	3/1/1	1/2/2	1/2/2	1/4/0
OVA + CT	5	1/1/2	3/1/1	0/1/4	0/3/2
OVA + CTB	5	2/0/3	2/0/3	1/3/1	2/2/1

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 集簇巢無し
++: 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 1-3箇所	11-20箇所	炎症細胞が真皮に浸潤 限局性集簇巢有り
+++: severe	7箇所以上	4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 (実験2)

Treatment	No. of animal	Skin			
		Acanthosis	Hyperkeratosis	Hydropic degeneration of the basal layer	Inflammatory cell infiltration
		+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++	+ / ++ / +++
Vehicle	5	4/0/0	0/1/0	1/0/0	1/0/0
HWP 0.22 µg	5	4/0/0	1/2/0	1/1/0	3/0/0
HWP 1.1 µg	4	3/1/0	2/1/0	1/1/0	4/0/0
HWP 5.4 µg	5	2/1/1	0/1/2	1/2/1	0/5/0
HWP 27 µg	5	3/2/0	4/1/0	3/2/0	2/3/0
HWP 135 µg	5	1/0/4	0/1/3	2/0/3	0/4/1