

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30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 （済生会宇都宮病院 病理診断科主任診療科長）
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)においてコレラトキシンBサブユニット（CTB）（1、5、25 µg）を卵白アルブミン（OVA）と混合物にし、経皮暴露（p.c.）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、アレルギー経皮感作経口惹起系の予備検討として、経皮感作（p.c.、OVA 500 mg × 3日/週 × 4回）後、経口投与（i.g.）による追加免疫（OVA 50 mg × 4回又は7回 [long] /週）、その後経口投与（OVA 100 mg × 1回）によるアレルギー症状惹起の有無を検討した。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群と比較して有意な増加を示し、IgG1がCTB群でOVA群と比較して有意な増加・増加傾向を示した。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、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及びIL-17分泌については、OVA + CTB 1 µg投与群でVehicle群と比較して有意な増加を示した。皮膚病変のスコアはすべてのCTB投与群で、Ki67陽性を示す濾胞の割合はすべてのOVA投与群でVehicle群と比較して有意に増加し、OVA + CTB 1 µg及びOVA + 5 µg投与群でOVA群と比較して有意に増加した。実験2)については、OVA p.c. ⇒ i.g. 群及びOVA p.c. ⇒ i.g. long 群でIgG1及びIgEが6及び7週で各時点のVehicle群と比較して有意な増加を示し、OVA i.p. ⇒ i.g. 群でIgG1が7週でVehicle群と比較して有意な増加を示した。惹起60分後の下痢スコアについては、OVA i.p. ⇒ i.g. 群及びOVA p.c. ⇒ i.g. long 群でVehicle群と比較して有意な高値を示したが、体温の有意な変化は認められなかった。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CTBについては弱いながらアジュバント効果を示した。また、アレルギー経皮感作経口惹起系の予備検討において、OVA p.c. ⇒ i.g. long 群はOVAの経皮投与後、経口投与によるアレルギー症状の惹起を示し、今回の条件での経皮感作経口惹起系は有効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、経皮感作経口惹起系、コレラトキシン B サブユニット、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 (i. g.)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 (p. c)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。また、Yamashitaらによって、被験物質をマウス腹腔内投与による感作後、強制経口投与によって惹起させるモデルの開発も試みられ、有用な結果を示している (Yamashita H et. al., Allergy. 2012;67, (201-209), Matsui T et. al., Int Arch Allergy Immunol. 2017;173, (71-83))。本研究では、上記のモデルを応用し、卵白アルブミン (OVA)の経皮感作後、OVAの腹腔内投与惹起による免疫毒性における、AgNPのアジュバント効果を検討することを目的としている。評価にはアジュバントの陽性対照が必要であるため、平成27年度からコレラトキシンを用いて検討している。

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。CTそのものも、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 (Holmgren J et al., Vaccine. 1993;11 (1179-1184))、経口ワクチンのアジュバントと

して期待されているが、強い毒性を有している。また、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)。

平成 29 年度の検討において、2、1 及び 0.7 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ /マウスの 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ため、本研究では、より高濃度の 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、アレルギー経皮感作経口惹起系の予備検討として、経皮感作後、経口投与による追加免疫、その後経口投与によるアレルギー症状の惹起有無を検討した。

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) 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 B サブユニット (CTB) のアジュバント陽性対照としての効果を検討するため、OVA をより高濃度の CTB と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) を 2 μg 、CTB (LBL 103B) を各々 1、5 及び 25 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ /マウスとなるようリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 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、① Vehicle 群、② OVA 群、③ OVA + CTB 1 μg 群、④ OVA + CTB 5 μg 、⑤ OVA + CTB 25 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 抗体並びに総 IgE 及び総 IgG 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 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 、IL-17 及び IL-13 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、腋窩及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)

経皮感作用の抗原懸濁液は OVA (Sigma A5503-1g) を 500 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ /マウスとなるよう PBS に加えて調製した。腹腔内感作用の抗原懸濁液は 500 μg OVA + 120 μg ALUM (Thermo Imject™ Alum Adjuvant) /0.2 mL /マウスとなるよう PBS に加えて調製した。経口追加感作及び惹起用の腹腔内感作用抗原懸濁液は OVA を 50 又は 500 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ /マウスとなるよう PBS に加

えて調製した。すべての懸濁液は投与する直前に調製した。

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、① PBS p.c. ⇒ i.g. (Vehicle)群、② OVA 腹腔内投与後強制経口投与 (OVA i.p. ⇒ i.g.)群、③ OVA 経皮投与後強制経口投与、追加免疫4回 (OVA p.c. ⇒ i.g.)群、④ OVA 経皮投与後強制経口投与、追加免疫7回 (OVA p.c. ⇒ i.g. long)群 (Figure 2)。

①、③及び④群は8週齢時に背面片側を剃毛し、実験1と同様に4週間経皮感作を行った。②群は実験4週目から2回(1回/1週)OVAの腹腔内投与による感作を行った。実験6週目から①、②及び③群は4回/1週、④群は7回/2週の追加免疫を行った。実験6、7及び8週目に、血中のOVA抗原特異的IgE、IgG1及びIgG2a抗体並びに総IgE及び総IgGをELISA法で測定した。①、②及び③群は実験8週に、④群は9週目に、感作抗原100mgを強制経口投与してアレルギー反応の惹起を行った。追加免疫及び惹起時、OVAの強制経口投与60分間のマウスの直腸内体温変化及び下痢症状の観察を行い、下痢症状についてはFigure 12の基準に従ってスコアリングした。サイトカインの測定は実験1と同様に行った。

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、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* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 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、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)

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、IgG1がCTB群でOVA群と比較して有意な増加・増加傾向を示した(Figure 4)。また、いずれのCTB処置群でも、血中の総IgE及び総IgGがVehicle群と比較して有意な増加を示し、OVA + CTB 25 µg群でOVA群と比較して有意な増加を示した(Figure 5)。また、OVA + CTB 25 µg群でIgG2aの有意な高値が認められた。直腸内体温の変化については、惹起5分、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又は低下傾向が認められ、OVA + CTB 1 µg群及びOVA + CTB 25 µg群では惹起5分後から、OVA + CTB 5 µg群では惹起20分後から、体温の低下が示された(Figure 6)。30分後にOVA群、OVA + CTB 1 µg群、OVA + CTB 5 µg群及びOVA + CTB 25 µg群では各々平均1.6、3.1、2.6及び3.6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 + CTB 1 µg群及びOVA + CTB 25 µg群で惹起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、OVA + CTB 5 µg群では上昇傾向が見られた(Figure 6)。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 2.6~3.0 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 6)。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 及び IL-17 において、OVA + CTB 1 µg 群で、IL-5 において、OVA + CTB 25 µg 群で、Vehicle 群と比べ有意な増加が認められた (Figure 7)。IL-4、IFN-γ 及び IL-13 において、群間に有意な変化は見られなかった (Figure 7)。皮膚病変のスコアリングを行った結果、すべての CTB 投与群で Vehicle 群と比較して有意な増加が、OVA 群と比較して増加傾向が認められた (Figure 8、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 x 100 (%)) については、Vehicle 群と比較して全 OVA 処置群で、OVA 群と比較して OVA + CTB 5 µg 群及び OVA + CTB 25 µg 群で有意な増加が認められた (Figure 8)。

実験 2)

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 9)。実験 6 週目及び 7 週目のマウスにおいて、OVA p. c. ⇒i. g 群及び OVA p. c. ⇒i. g long 群で、血中の OVA 特異的な IgG1 及び IgE が各時点の Vehicle 群と比較して有意に増加を示し、実験 7 週目のマウスにおいて、OVA i. p. ⇒i. g 群で、IgG1 が有意に増加した (Figure 10)。また、実験 6 週目のマウスにおいて、OVA p. c. ⇒i. g 群で、Vehicle 群と比較して総 IgE 及び総 IgG の有意に増加を示し、実験 7 週目のマウスにおいて、OVA p. c. ⇒i. g 群及び OVA p. c. ⇒i. g long 群で総 IgE、OVA i. p. ⇒i. g 群で総 IgG の有意な高値が認められた (Figure 11)。直腸内体温の変化については、群間の差は認められなかった (Figure 12)。惹起後 60 分間、

下痢症状をスコアリングした結果、OVA i. p. ⇒i. g 群及び OVA p. c. ⇒i. g long 群で Vehicle 群と比較して有意な高値を示した (Figure 12)。OVA i. p. ⇒i. g 群は追加免疫 3 回目から、OVA p. c. ⇒i. g long 群は追加免疫 5 回目から明らかな下痢スコアの高値が認められた (Figure 12)。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-4 及び IL-5 において、OVA i. p. ⇒i. g 群及び OVA p. c. ⇒i. g long 群で、IL-5 において、OVA i. p. ⇒i. g 群で、Vehicle 群と比べ有意な増加が認められた (Figure 13)。IFN-γ、IL-2、IL-17 及び IL-13 において、群間に有意な変化は見られなかった (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、様々な濃度の 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、アレルゲン経皮感作経口惹起系の確立のため、経皮感作後、経口投与による追加免疫、その後経口投与によるアレルギー症状の惹起有無を検討した。その結果、今回の条件においては、経皮感作性試験における CTB の陽性アジュバントとしての有効性が明らかとなった。また、実験 2) において、OVA の経皮投与後、経口投与によるアレルギー症状の惹起を示し、今回の条件での経皮感作経口惹起系は有効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。29年度の検討では、1 µg CTと同じモル数に相当する、0.7 µg を投与したが、明らかなアジュバント作用は認められず、それまでの検討で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かった。今年度は、より高濃度での検討でCTBの陽性アジュバントとして有効性を検討した。CTB処置によってIgE値に変化はなかったが、濃度依存性はないもののIgG1値及び僅かに濃度依存性を示すIgG2a値の増加が認められ、総IgE及び総IgGの値がCTBの濃度依存的に増加したことから、CTB処置は、Th2細胞のみならず、Th1細胞による免疫にも関与している可能性が考えられた。更に、摘出した脾細胞をovaで再刺激したところ、サイトカインIL-2及びIL-17の分泌量が多いことから、CTB処置によってTh1細胞に加え、Th17細胞の関与も検討する必要があると考えられた。細胞毒性を示さないとされているCTBの処置による皮膚病変スコアの高値及びKi67陽性を示す濾胞の高い割合もTh2細胞以外の免疫毒性経路の活性が推測された。CTBの経皮処置によってTh1細胞からサイトカインINF-γの産生並びに処置した表皮や真皮における樹状細胞の集簇が報告されている (Anjuère F et al., J Immunol. 2003;170 (1586-1592))。

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、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))。今年度はこのモデルに改良を加え、OVAを抗原とした経皮感作経口惹起試験モデルの開発を試みた。Mutoら (Int Immunol.

2014;26(539-549))の報告を参考に経皮感作後、強制経口投与による惹起を試みたが、体温低下などアナフィラキシー反応は認められなかった。Yamashitaら及びMatsuiら (Allergy. 2012;67, (201-209), Int Arch Allergy Immunol. 2017;173, (71-83))が強制経口投与による惹起の前に、経口投与による追加免疫を実施することで効率よく経口惹起が可能であることを報告した。Adachiらのモデルから経皮感作の方法を、Yamashitaらのモデルから追加免疫及び経口惹起の方法を採用し、経皮感作経口惹起を行った結果、Yamashitaらの4回/1週の追加免疫を7回/2週に回数を増やしたモデルで有意なアナフィラキシー反応 (下痢)が認められた。明らかな体温の低下は認められなかったが、OVA i. p. ⇒i. g. 群及びOVA p. c. ⇒i. g. long群で惹起30分後に弱いながら体温低下が認められた。60分間の観察時間中のストレスによる正確な体温の変化が測定できなかった可能性が考えられ、改良を試みている。経皮感作後1週及び2週後の実験6週目及び7週目に経皮感作を行った群で各時点のVehicle群に比べIgE及びIgG1の高値が認められ、経皮感作終了後にOVA抗原特異的IgE及びIgG1が高濃度に維持できていることが分かった。追加免疫時の下痢スコアはOVA i. p. ⇒i. g. 群で何れの群より早い段階から高値を示し、経皮感作を行った群では5回目の投与から高値を示した。これらの結果から、血清中の抗体の量だけでなく抗原のばく露経路及び追加免疫の有無や回数が経口投与によるアナフィラキシー反応の誘導に関与

すると考えられた。

3. その他
なし

E. 結論

今回、経皮経口複合暴露による AgNP のアジュバント効果を調べる本モデルの改善を目的に、新しい陽性アジュバント物質及び経皮感作経口惹起モデルについて検討した。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 CTB については弱いながらアジュバント効果を示した。また、我々が実施した、OVA の経皮暴露後、強制経口投与する実験において、下痢の誘発が観察され、経皮感作経口惹起試験の有望なモデルであることが明らかとなった。今後、AgNP を用いてアジュバント作用の有無の検討を行う。

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, 赤木純一, 水田保子, 豊田武士, 小川久美子: コレラトキシン及びコレラトキシン B サブユニットの経皮曝露感作性試験におけるアジュバントとしての可能性. 第45回日本毒性学会学術年会 (2018. 7. 19)

Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Tamehiro N, Kimura Y, Adachi R, Ogawa K:

Dose-dependent sensitization effects of transcutaneously exposed acid-hydrolyzed wheat protein. 54th Congress of the European Societies of Toxicology (2018. 9. 4)

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

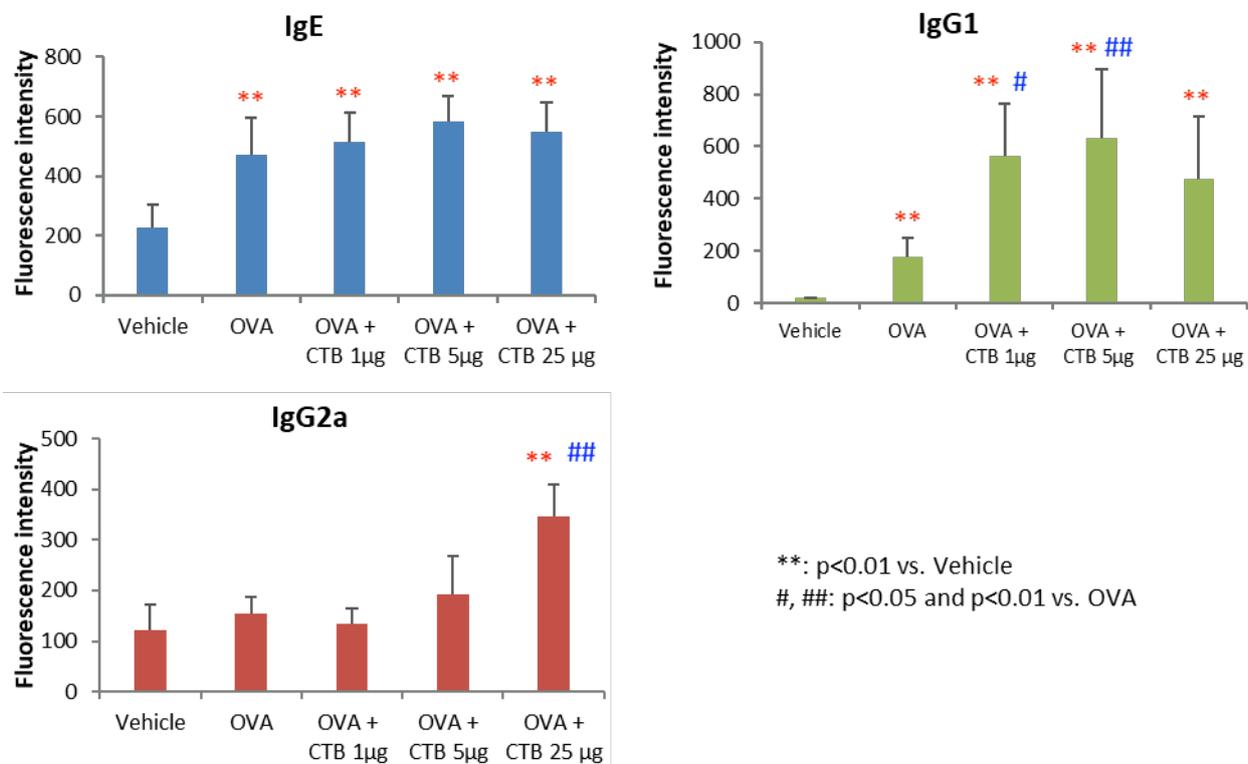


Figure 4. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 1)

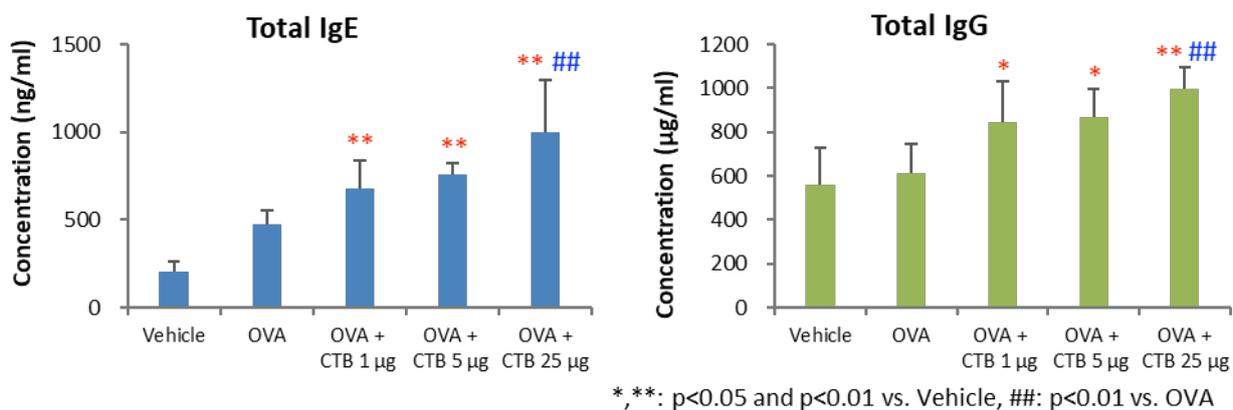
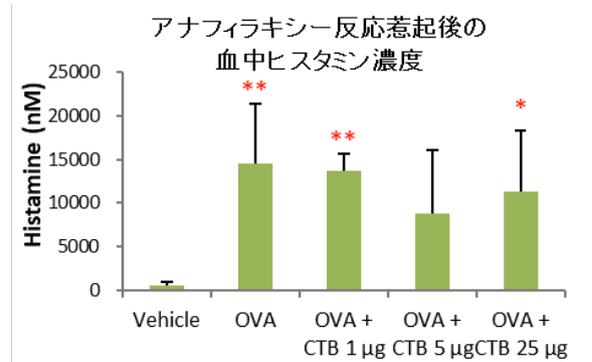
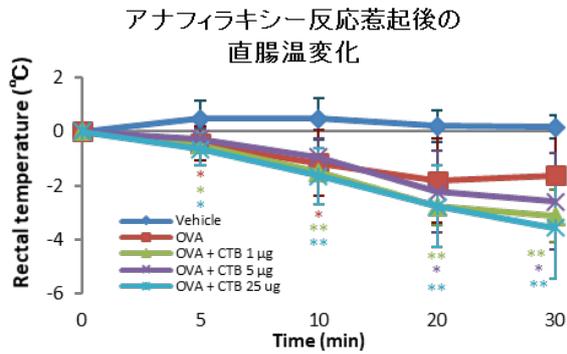


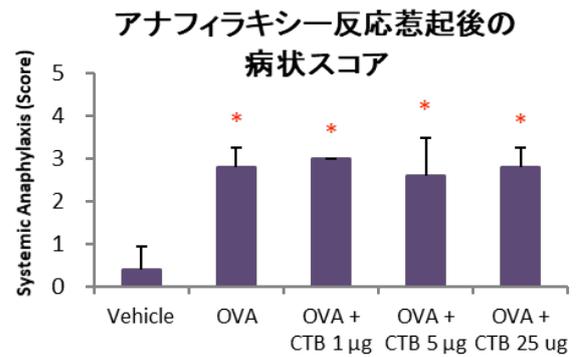
Figure 5. 血清中の総IgE及び総IgG抗体産生 (実験 1)



アナフィラキシー症状のスコアリング

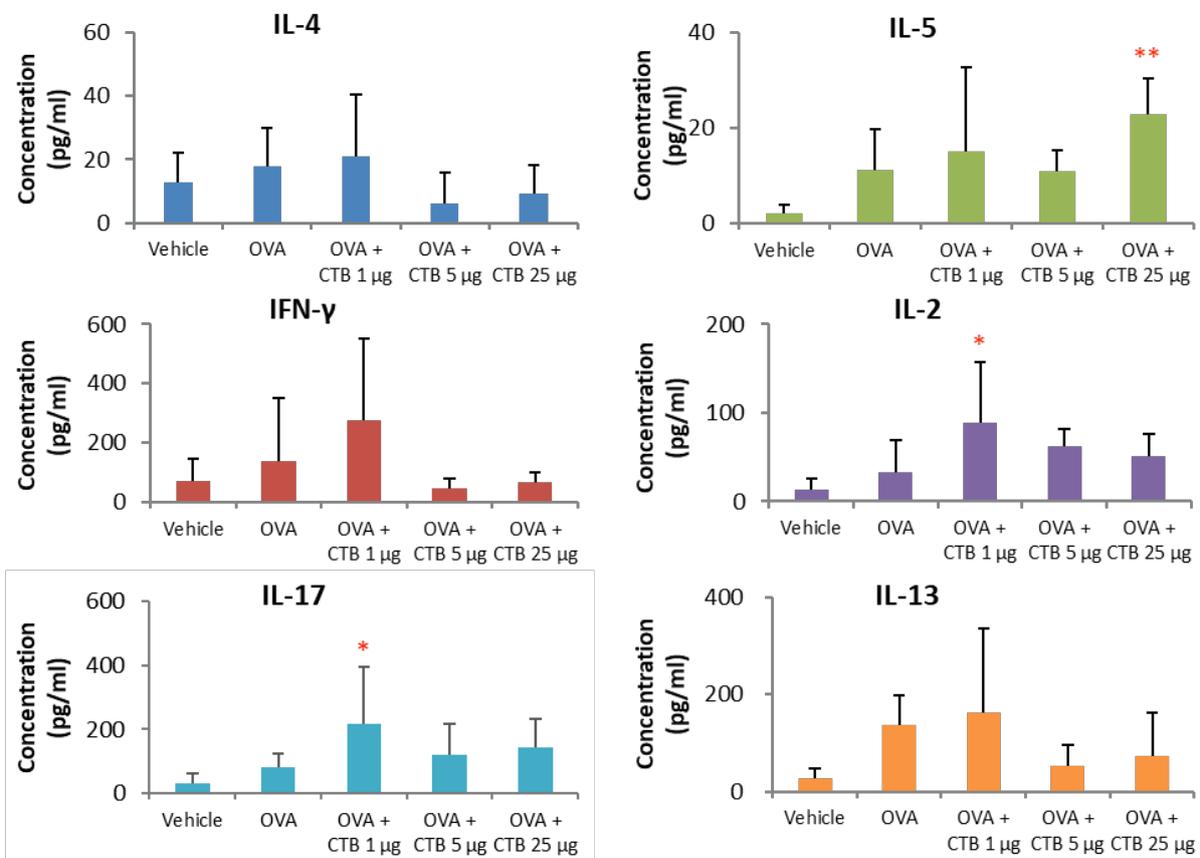
Score 0 症状なし

- 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



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

Figure 6. アナフィラキシー反応惹起の反応 (実験 1)



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

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 (実験 1)

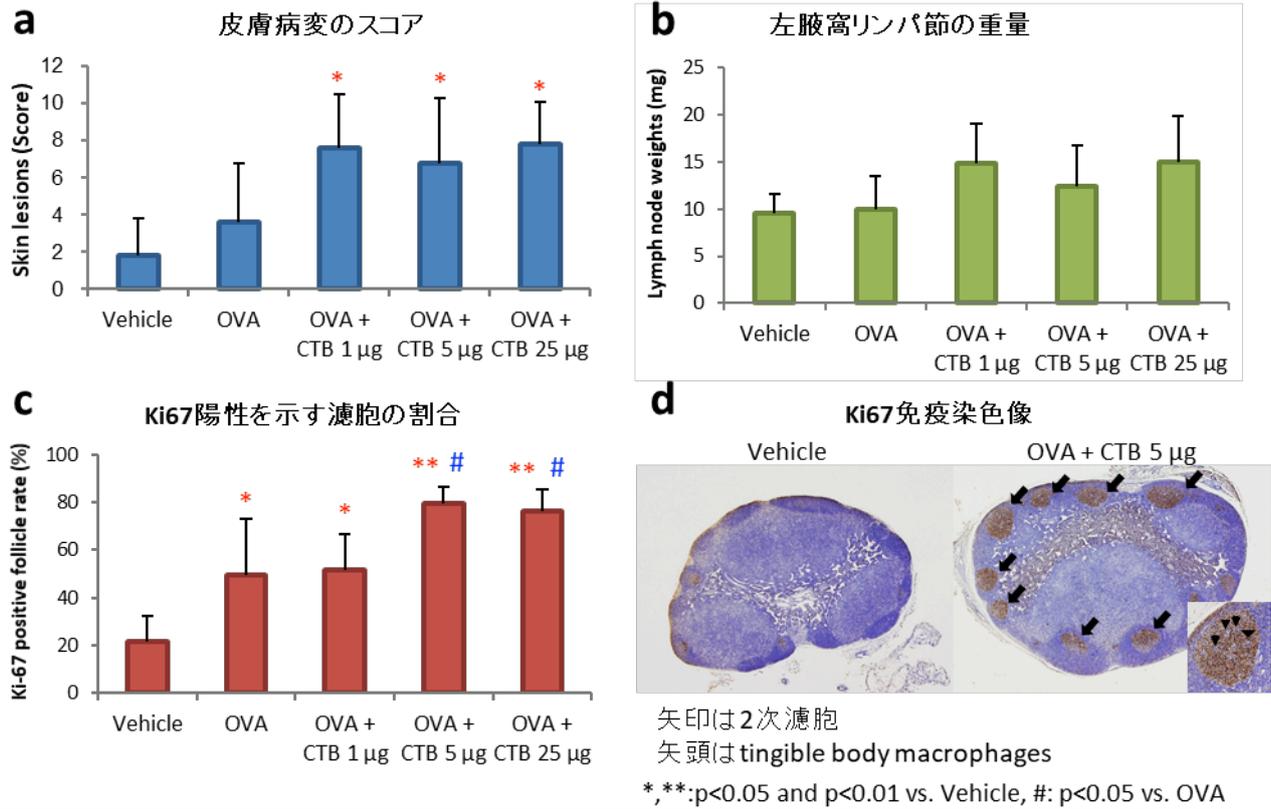


Figure 8. 皮膚病変のスコア (a)、左腋窩リンパ節の重量 (b)、細胞増殖マーカーである Ki67陽性を示す濾胞の割合 (c) 及び Ki67免疫染色像 (d) (実験 1)

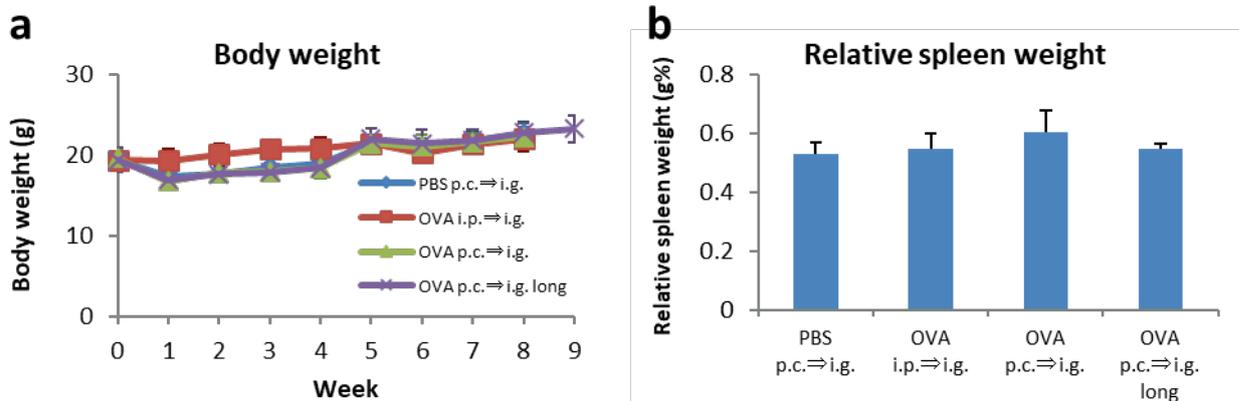


Figure 9. 体重 (a) 及び 相対脾臓重量 (b) (実験 2)

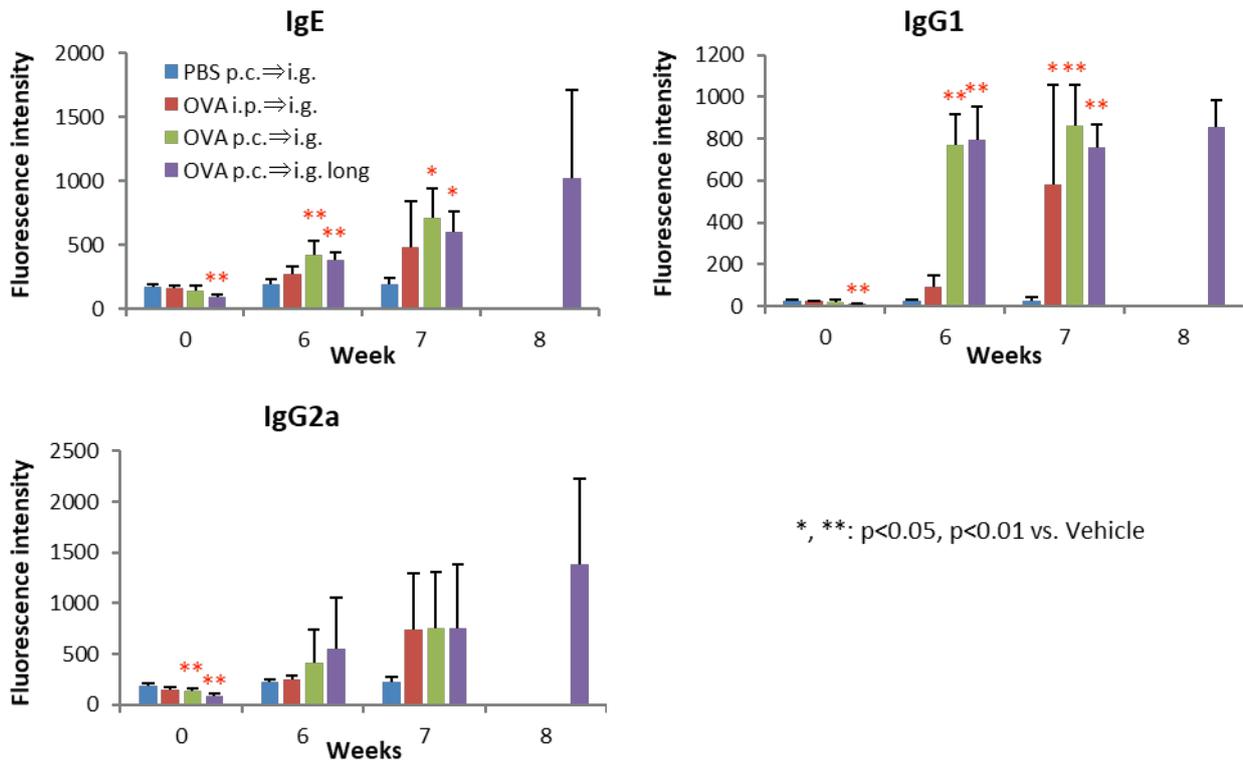


Figure 10. 血清中のOVA特異的抗体産生 (実験 2)

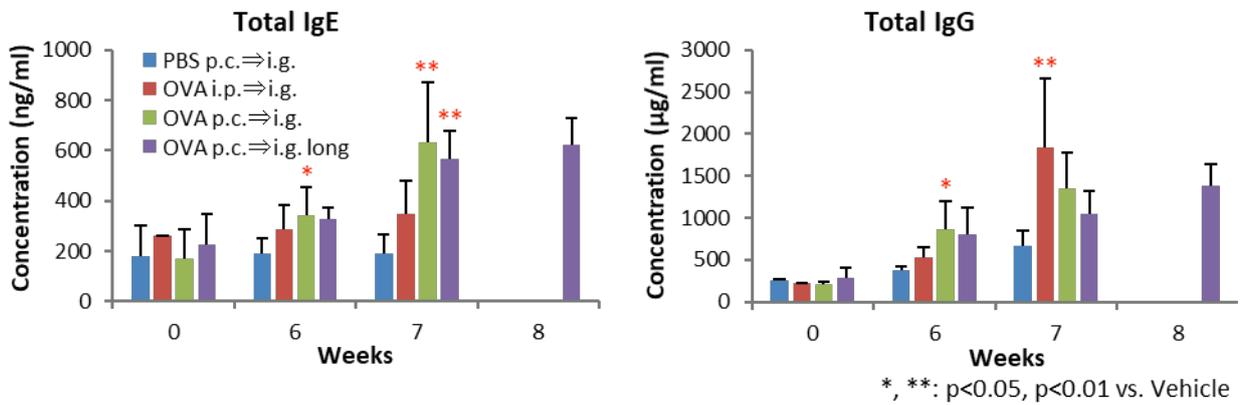
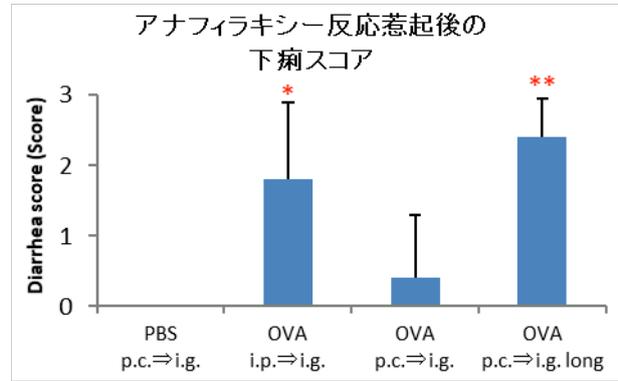
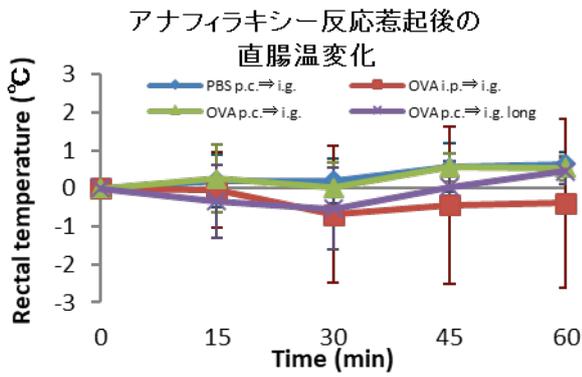


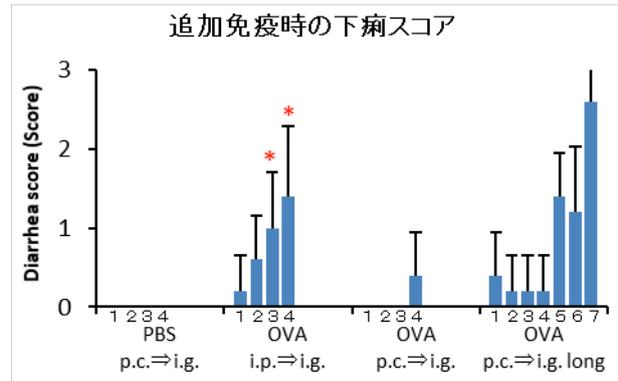
Figure 11. 血清中の総IgE及び総IgG抗体産生 (実験 2)



下痢症状のスコアリング

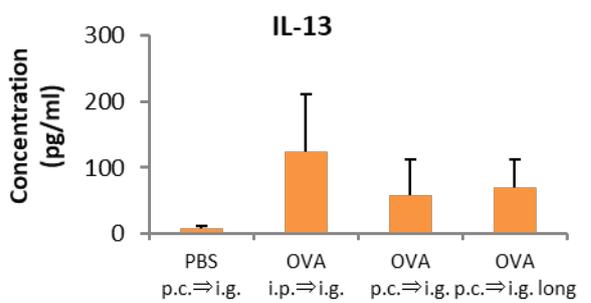
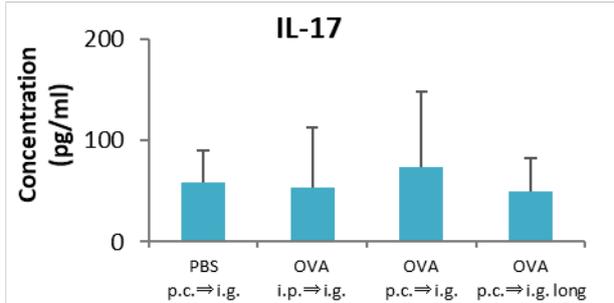
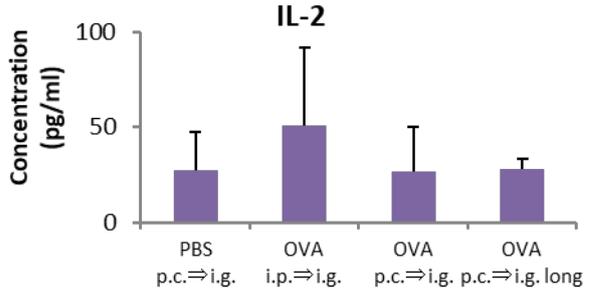
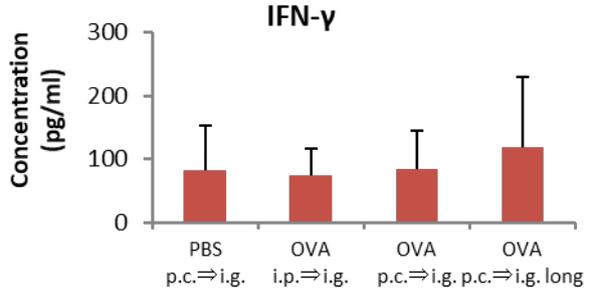
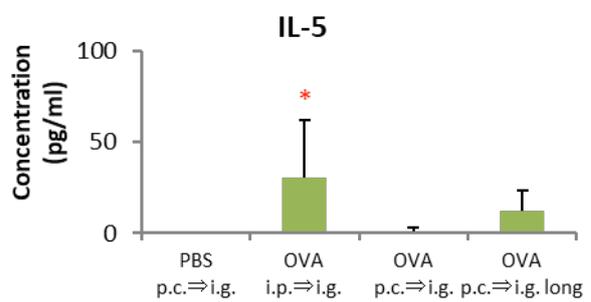
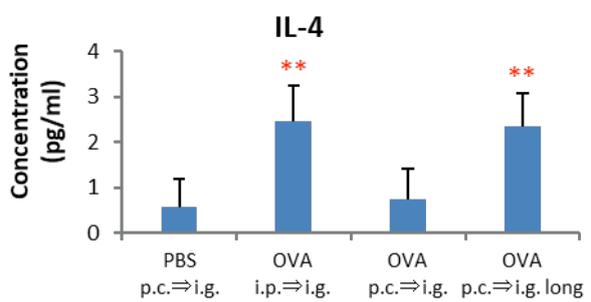
Score 0 solid state
 1 funicular form
 2 slurry
 3 watery state

Allergy. 2012;67 (201-9)



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

Figure 12. アナフィラキシー反応惹起の反応 (実験 2)



*, **: p<0.05, p<0.01 vs. PBS p.c.=>i.p.

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)

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	Erosion
		+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +
Vehicle	5	3/0/0	0/0/0	0/2/0	2/0/0	0/0/0
OVA	5	2/3/0	1/0/0	1/1/0	2/0/1	1/0/0
OVA + CTB 1 µg	5	1/2/2	2/2/0	1/0/3	3/2/0	1/0/1
OVA + CTB 5 µg	5	1/2/2	0/2/2	2/1/0	3/2/0	2/0/0
OVA + CTB 25 µg	5	0/2/3	0/3/1	0/3/1	3/2/0	1/0/0

Grading standard

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