

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)
「食品用途となるナノマテリアルの暴露による毒性評価に関する研究」
分担研究報告書 (令和元年度)

分担研究課題名: 経皮経口感作性試験におけるナノ銀のアジュバント作用について

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 部長
研究分担者: 曹 永暁 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長
研究分担者: 西川 秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 客員研究員

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。我々は、昨年度までにAgNPの経皮経口複合暴露による免疫毒性について、特にアジュバント作用の有無を検討するため、卵白アルブミン(OVA)を感作物質として用いる評価系を確立してきた。本年度は、その系を用いて、AgNPの経皮経口暴露によるアジュバント作用を検討した。感作のため、卵白アルブミン (OVA; 2 µg)単独またはOVAとAgNP(直径10nm 49 µg)を混合して、週3日間4週間にわたり剃毛部にパッチを貼付することで経皮暴露 (p.c.)した。続いて、OVA (30 mg)単独またはOVAとAgNP(直径10nm 50 µg)を混合して強制経口投与 (i.g.)による追加免疫 (7回/2週)で感作を増強させた。その後、OVA (50 mg)の単回経口投与によるアレルギー症状惹起を行い、60分後に屠殺剖検した。追加免疫中およびアレルギー惹起後の症状観察、血清中OVA特異抗体量および各種サイトカインパラメータ等を検討し、AgNPによるアジュバント作用を評価した。実験期間中、体重に群間の差は見られなかった。下痢スコア及び直腸温については、OVA投与群ではVehicle群に比べ、経口による追加免疫を経ることにOVA投与後の下痢スコアの上昇傾向及び直腸温の低下の増強並びに持続時間の延長が認められたが、経皮及び経口暴露時にAgNPを同時暴露させた群では、その程度が減弱される傾向が見られた。また、惹起後の下痢スコア及び直腸温の変動についても同様の傾向が見られた。剖検時、体重、絶対及び相対脾臓重量、腋窩及び鼠径リンパ節重量並びに大腸の長さには、群間の差異は認めなかった。OVA特異抗体の測定では、皮膚感作を終了した4週時点ではOVA単独群でIgE及びIgG1の有意な増加が見られ、経口AgNP追加群でもIgEの有意な増加が見られた。経口追加免疫翌日では全てのOVA投与群でIgE及びIgG1の有意な増加が見られ、経口AgNP追加群及び経皮及び経口AgNP追加群ではIgG2aの有意な増加も見られた。また、経口追加免疫翌日のOVA非特異的抗体の測定では、全てのOVA投与群でIgE、IgG及びIgAが有意に増加、あるいは増加傾向を示した。惹起60分後の血清サイトカイン測定では、全てのOVA投与群で単球遊走因子(MCP-1)及びIL-13の有意な増加並びに経皮及び経口AgNP追加群ではIL-6の有意な増加が見られ、経口AgNP追加群ではOVA単独群よりMCP-1が有意に高値を示した。血清ヒスタミン濃度はい

れも背景値程度であった。一方、脾臓細胞における 72 時間抗原再暴露による IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 及び INF- γ 分泌については、経口 AgNP 追加群で僅かに IL-4 及び IL-13 の増加が見られたが、OVA 単独群との差異は見られなかった。以上の結果から、OVA の経皮経口感作及び OVA の経口暴露によってアレルギー惹起が誘発される条件下において、直径 10 nm の AgNP の皮膚および経口追加暴露は明らかなアジュバント作用を示さないことが明らかとなった。

キーワード: ナノ銀、経皮経口感作、経口惹起系、アジュバント作用、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、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 年頃から、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 (茶のしづく石鹸: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評価系の開発も試みられ、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))。

さらに、この系を発展させ、マウスを用いて経皮感作後、経口投与による追加免疫、その後経口投与によりアレルギー症状を惹起するプロトコールによる免疫毒性の評価系を検討してきた。特に AgNP のアジュバント作用の有無を検討するため、卵白アルブミン (OVA)を感作物質として用いる評価系を確立してきた。昨年度の検討において、本評価系では、皮膚感作性の陽性アジュバント物質としてコレラ菌 (*Vibrio cholerae*)が産生するコレラ菌由来毒素 (コレラトキシン、CT)の B サブユニットである CTB については OVA と同時の皮膚暴露によって OVA 特異的抗体 (IgG1 及び IgG2a)産生が OVA 単独群よりも有意に増加することから、皮膚感作のアジュバント作用が評価可能であることを示した。

本年度は、この OVA をアレルギーとする系を用

いて、AgNPの経皮経口暴露によるアジュバント作用を検討した。

B. 研究方法

動物実験は Adachi ら (Allergy. 2012;67 (1392-1399)) の方法を応用して実施した。

感作のため、卵白アルブミン (OVA; 2 µg) 単独または OVA と AgNP (直径 10nm 49 µg) を混合して、週 3 日間 4 週間にわたり剃毛部にパッチを貼付することで経皮暴露 (p.c.) した。続いて、OVA (30 mg) 単独または OVA と AgNP (直径 10nm 50 µg) を混合して強制経口投与 (i.g.) による追加免疫 (7 回/2 週) で感作を増強させた。その後、OVA (50 mg) の単回経口投与によるアレルギー症状惹起を行い、60 分後に屠殺剖検した。

抗原には OVA (Sigma A5503) を用い、AgNP にはこれまでの検討において最も毒性を持つと考えられた直径 10 nm の AgNP (nanoComposix AGCB10) を用いた。皮膚暴露では OVA は 2 µg、AgNP は 49 µg/50 µL/mouse とし、経口追加免疫では OVA は 30 mg、AgNP は 50 µg/0.2 ml/mouse となるように AgNP の溶媒である 2 mM クエン酸ナトリウム水溶液 (Citrates) を vehicle として投与直前に調製した。経口惹起時は全動物に OVA を 50 mg/0.2 ml/mouse となるよう注射用水 (大塚製薬) を Vehicle として投与直前に調製した。

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、SPF 環境下にて 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 p.c. → Vehicle i.g. 群、② OVA p.c. → OVA i.g. 群、③ OVA p.c. → OVA + AgNP i.g. 群、④ OVA + AgNP p.c. → OVA + AgNP i.g. 群、⑤ AgNP p.c. → AgNP i.g. 群 (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 クール感作させた。強制経口投与による追加免疫は Day 28 より隔日に合計 7 回/2 週行った。Day 0, Day 25, Day 43 にマウスの浅側頭静脈よりランセット (animal lancet 4 mm, MEDIpoin) を用いて 50 µl 採血し、血中の OVA 抗原特異的 IgE、IgG1 及び IgG2a 抗体を ELISA 法で測定した。総 IgE、総 IgG 及び総 IgA 抗体については追加免疫後の 7w (Day 43) のみ測定した。強制経口投与によるアレルギー反応の惹起は Day 49 に実施した。追加免疫及び惹起時、OVA 強制経口投与 60 分間までのマウスの直腸温変化及び下痢症状の観察を 15 分ごとに行い、下痢症状については基準に従ってスコアリング (0: 正常、1: 軟便、2: 下痢、3: 水溶性下痢) した。惹起 60 分後にイソフルラン深麻酔下で全血を採取し、血清中ヒスタミンを Histamine EIA Kit (Bertin Bioreagent) で、単球遊走因子 (MCP-1)、IL-13 及び IL-6 濃度を Mouse Quantikine ELISA Kit (bio-technique) 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 100 µg/ml) を添加、37°C 72 時間培養し、培地中のサイトカイン IL-4、IL-5、IL-2、IL-17、IL-13 及び IFN-γ の濃度を、mouse Quantikine ELISA Kit (bio-technique) にて測定した。

更に、体重、脾臓重量、腋窩及び鼠経リンパ節重量並びに大腸長の計測を行った。

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及び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深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

実験期間中の体重、剖検時の体重、絶対及び相対脾臓重量、腋窩及び鼠径リンパ節重量並びに大腸の長さには、群間の差異は認めなかった (Figure 2)。

経口追加免疫時の下痢スコアについては、OVA 投与群では Vehicle 群に比べ、回数を経ることに OVA 投与 60 分後の下痢スコアの上昇傾向が見られ、7 回目では OVA p.c.→OVA i.g. 群及び OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群において有意な高値を示した。経口追加免疫時の直腸温も同様に回数を経る毎に低下の増強並びに持続時間の延長傾向が見られ、OVA p.c.→OVA i.g. 群においては 2、3 回目は投与後 15 分時点のみ有意な 1°C 以下の低下を示したが、4 回目以降は 6 回目の 60 分後を除き、投与後 15 分から 60 分まで有意な低値を示し、5 回目以降は 45 分及び 60 分後に 3°C 以上の低下を示した。OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群及び OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g. 群においても有意な低下が見られたが、その持続時間及び低下の程度は OVA p.c.→OVA i.g. 群よりも軽度であり、特に OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では、変動が减弱している傾向が見られた (Figure 3)。惹起後においては、下痢スコアは全ての OVA 投与群で有意な高値を示した。直腸温の変動は全ての OVA

投与群において惹起の 15 分後には有意に低下したが、OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では、45 分及び 60 分後には回復傾向を示し、有意差はみられなかった (Figure 4)。

OVA 特異抗体の測定では、皮膚感作を終了した 4 週 (Day 25) 時点では OVA p.c.→OVA i.g. 群で IgE 及び IgG1 の有意な増加が見られ、OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群でも IgE の有意な増加が見られた。7 週の経口追加免疫翌日 (Day 43) では全ての OVA 投与群で IgE 及び IgG1 の有意な増加が見られ、OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群及び OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では IgG2a の有意な増加も見られた (Figure 5)。また、経口追加免疫翌日 (Day 43) の OVA 非特異的抗体の測定では、全ての OVA 投与群で IgE 及び IgA の有意な増加がみられ、IgG は増加傾向を示し OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では有意であった (Figure 6)。惹起 60 分後の血清サイトカイン測定では、全ての OVA 投与群で単球遊走因子 (MCP-1) 及び IL-13 の有意な増加がみられ、IL-6 は増加傾向を示し OVA + AgNP p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では有意であった。MCP-1 については、OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では OVA p.c.→OVA i.g. 群よりも有意に高値を示した。血清ヒスタミン濃度は背景値程度であった (Figure 7)。一方、脾臓細胞における 72 時間抗原再暴露による IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 及び INF- γ 分泌については、OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群で僅かに IL-4 及び IL-13 の増加が見られたが、OVA p.c.→OVA i.g. 群との差異は見られなかった (Figure 8)。

また、OVA の投与をせず AgNP のみを経皮経口暴露した群においては、これまでの背景値の範囲であり毒性学的意義のないと考えられる血清ヒスタミン値の高値以外には、いずれの検討も Vehicle 群と差異は認めなかった。

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ことを目的と

し、特にアジュバント作用についての評価に主眼を置いた。前年度までの検討により、OVA の経皮及び経口暴露で感作を成立させた後、OVA の経口暴露によってアレルギー反応を惹起させる評価系を確立し、コレラトキシン B サブユニットを追加で皮膚暴露するとアジュバント作用が検出できることを示してきた。本年度は確立された評価系を用いて AgNP の追加暴露でアジュバント作用が見られるか検討した。

今回の検討において、マウスへの OVA の皮膚暴露後、経口暴露によって血清中 OVA 特異抗体価及び MCP-1、IL-13、が有意に増加するとともに、下痢や体温低下などの生体反応も経時的に増強するなど、経皮経口複合暴露によるアレルギー反応の成立が確認された。10 nm の AgNP を経皮または経皮及び経口で追加暴露してもほぼ全てのパラメータにおいて明らかな増強作用は見られなかった。血清 MCP-1 については OVA p.c.→OVA + AgNP i.g. 群では OVA p.c.→OVA i.g. 群よりも有意に高値を示したが、他のパラメータでは変動は見られず、その意義は不明である。むしろ、経口追加免疫において、下痢スコア及び直腸温低下の程度や持続時間については、AgNP 追加投与群では減弱化傾向を示していると考えられた。

また、AgNP 単独の経皮経口暴露では総 IgE、IgG 及び IgA 並びに各種サイトカインの変動はなく、本投与系においては免疫毒性は示唆されなかった。

E. 結論

これまでに検討してきた OVA の経皮経口複合暴露によるアジュバント作用の評価系を用いて AgNP のアジュバント作用を検討した。OVA による免疫反応の成立が確認され、評価系としての有用性が確認されるとともに、AgNP については本系において経皮経口複合暴露によるアジュバント作用は認めなかった。

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, 赤木純一, 井手鉄哉, 安達玲子, 為広紀正, 木村美恵, 近藤一成, 小川久美子: 経皮感作及び経口惹起によるマウス食物アレルギーモデルの開発.

第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019.6.27)

Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Ide T, Toyoda T, Ogawa K : Effects of antioxidant and inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice.

IUTOX 15th International Congress of Toxicology (2019.7.16)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

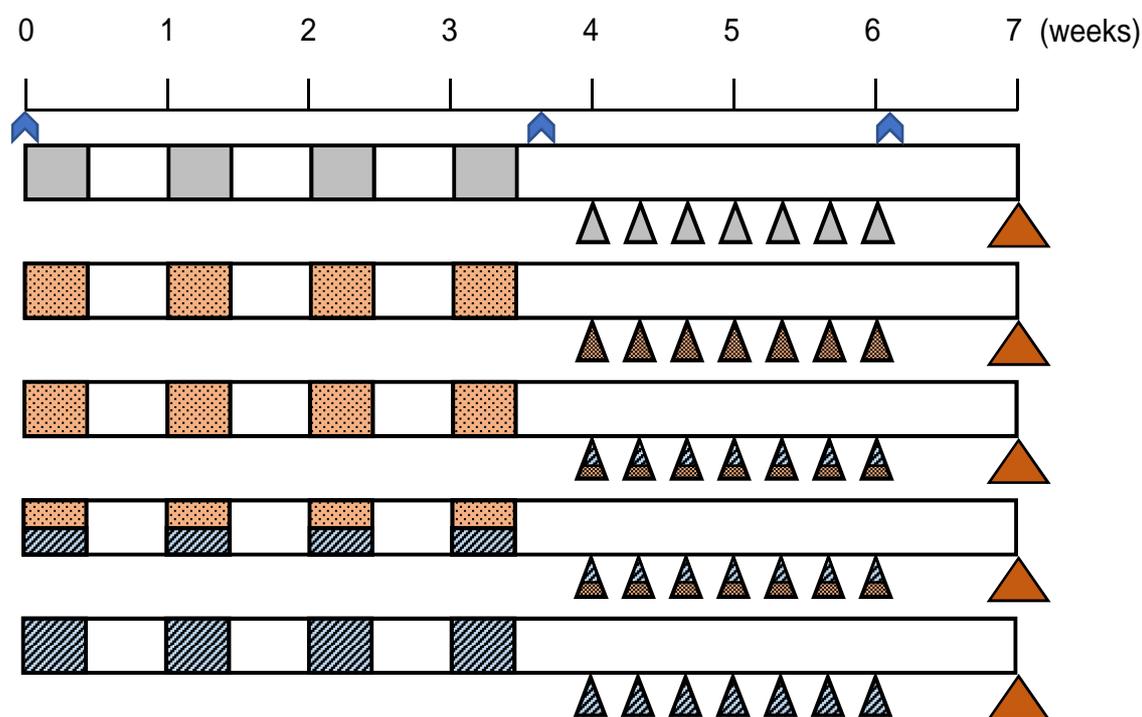
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

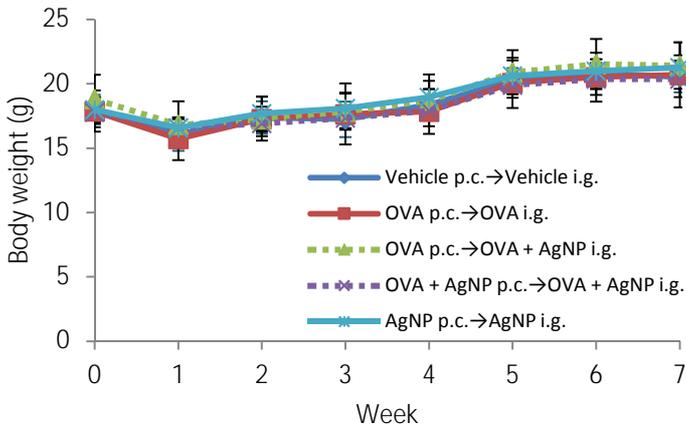


Animal : 8- week old female BALB/c mouse (n=5/group)

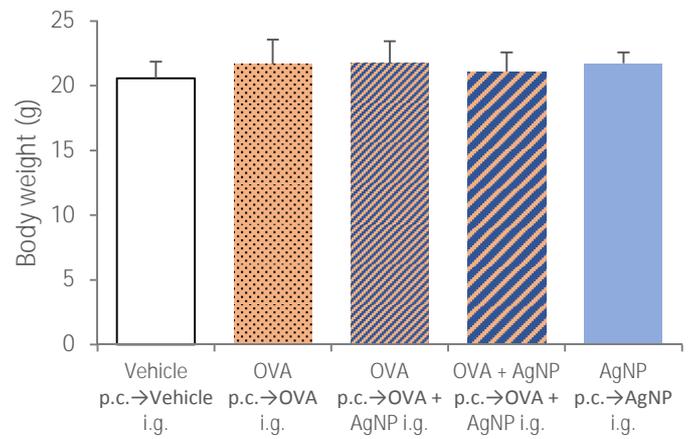
- : 2 mM Citrate percutaneous (p.c.) exposure with skin patch on the flank (50 μ L/mouse)
- : Ovalbumin (OVA 2 μ g) p.c.
- : AgNP (10 nm, 49 μ g) p.c.
- ▲ : 2 mM Citrate intragastric (i.g.) with gastric tube (0.2mL/mouse)
- ▲ : OVA (30 mg) in citrate i.g.
- ▲ : OVA (30 mg) + AgNP (10 nm, 50 μ g) i.g.
- ▲ : AgNP (10 nm, 50 μ g) i.g.
- ▲ : OVA (50 mg) in citrate i.g. with gastric tube (0.2mL/mouse)
- ▲ : Blood sampling

Figure 1. 実験プロトコール

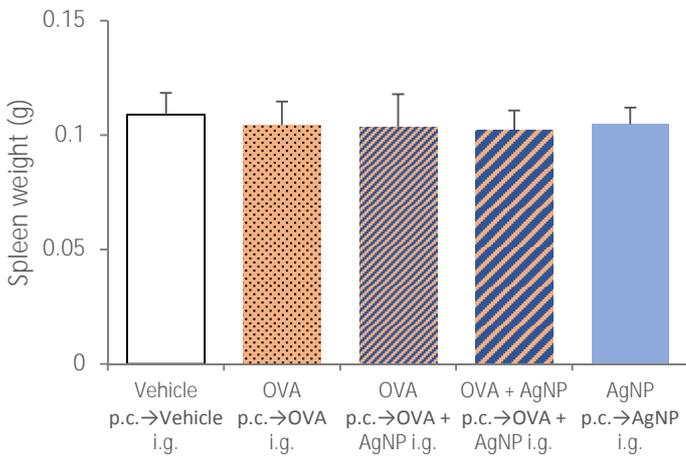
Sequential change of body weight



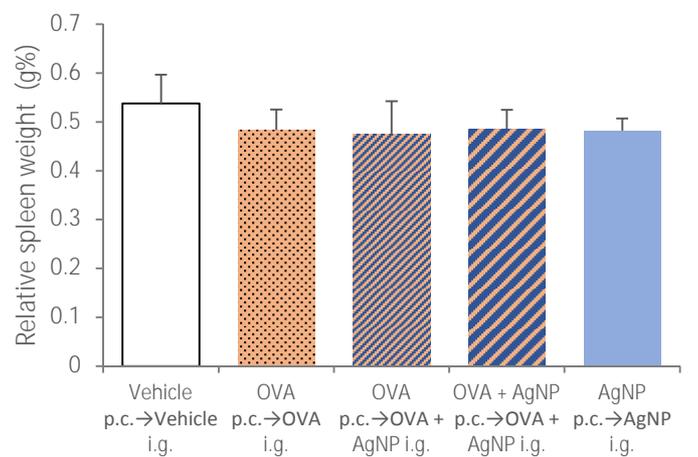
Body weight



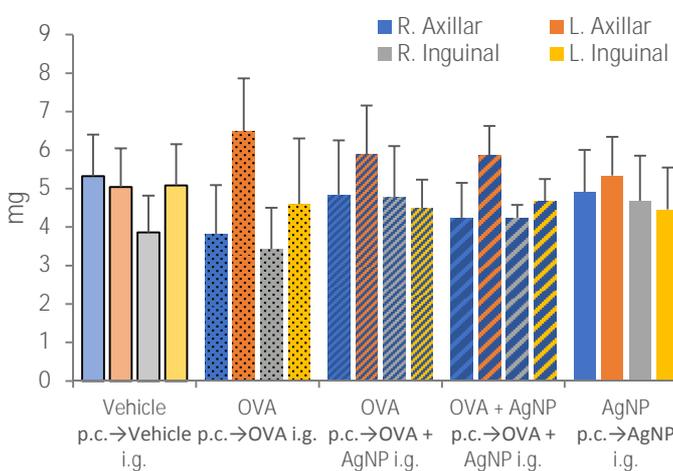
Spleen weight



Relative spleen weight



部位別のリンパ重量



Length of colon

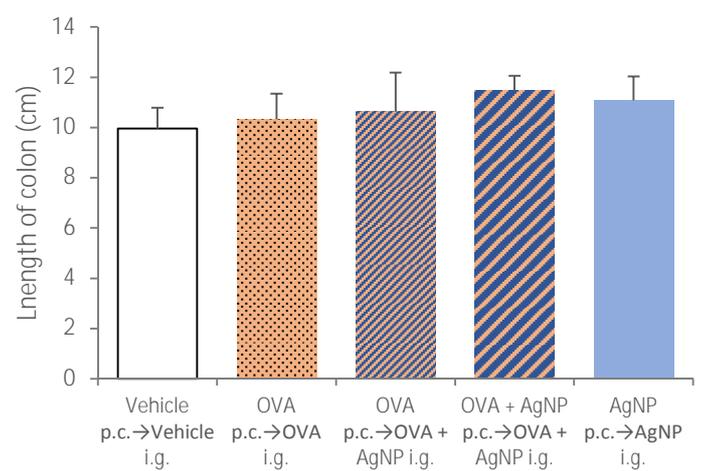
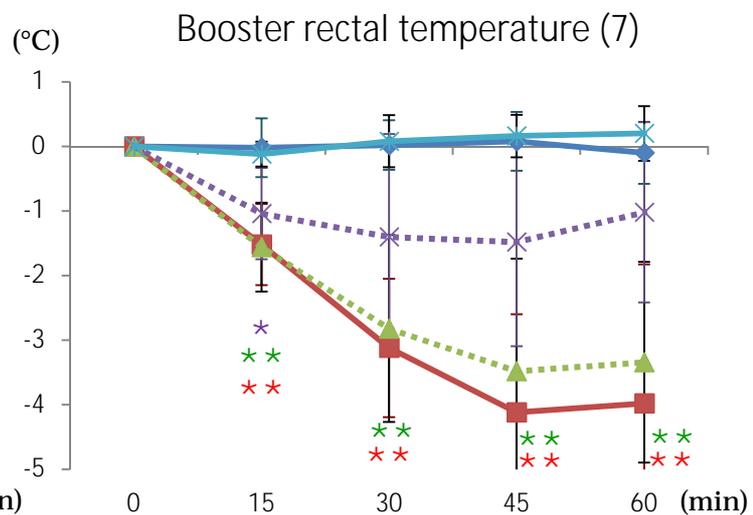
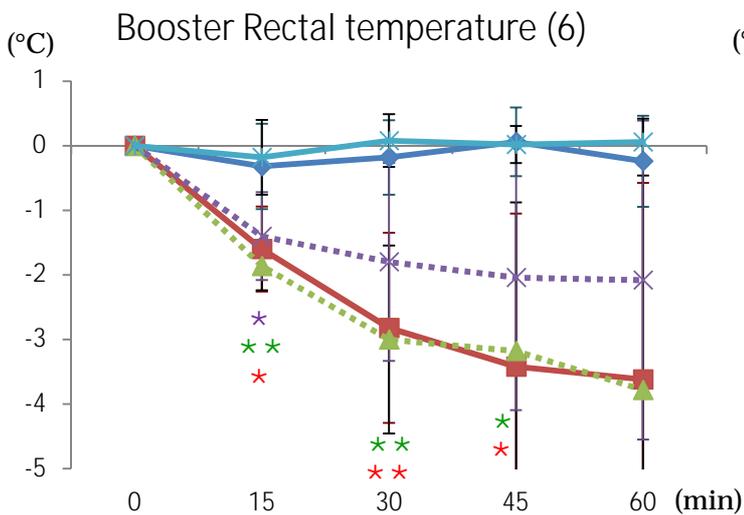
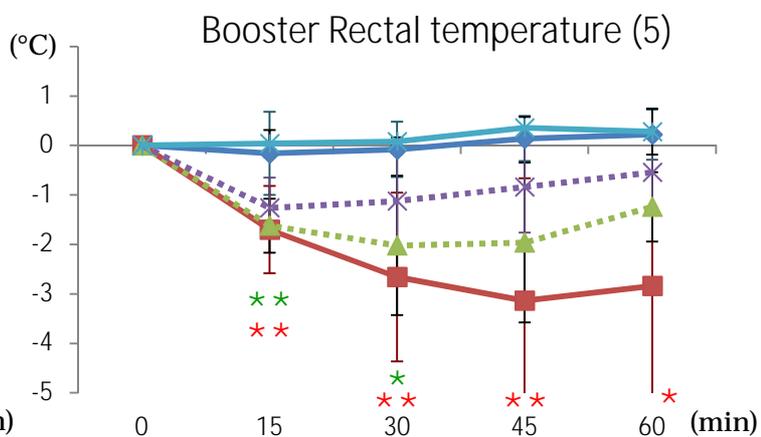
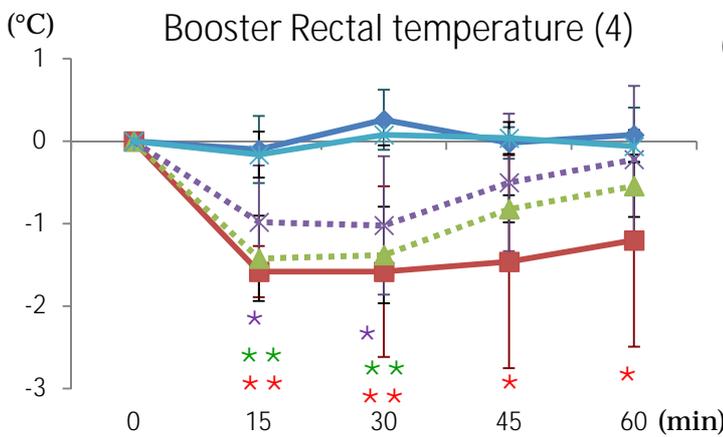
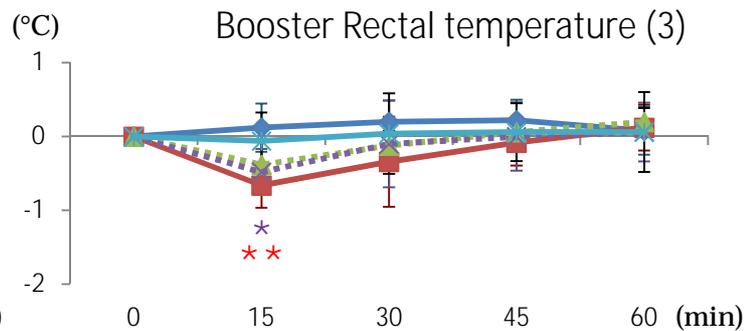
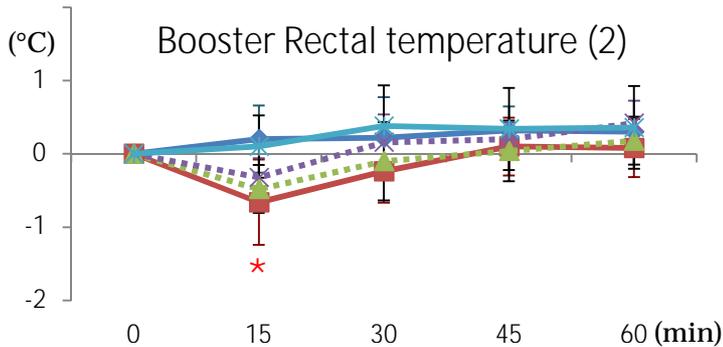
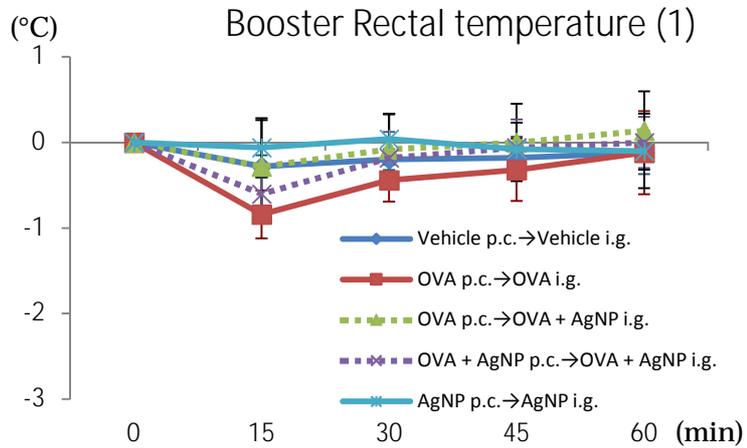
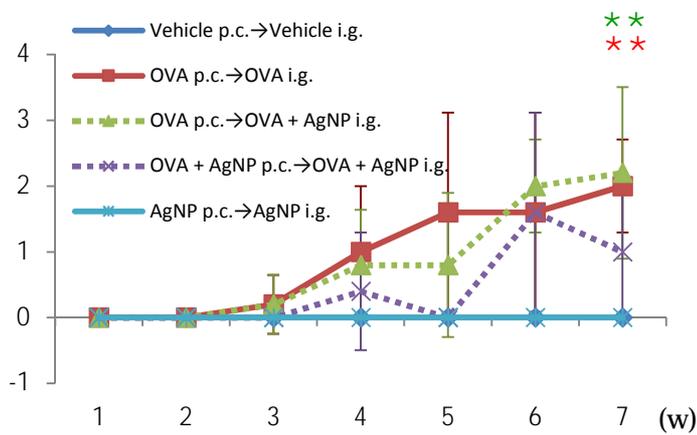


Figure 2. 体重変化・脾臓重量・リンパ節重量・大腸長

Booster時の下痢スコア推移



** , * : p<0.01, 0.05 vs. Vehicle p.c.→Vehicle i.g.

Figure 3. 追加免疫時下痢スコア・直腸温の経時変化

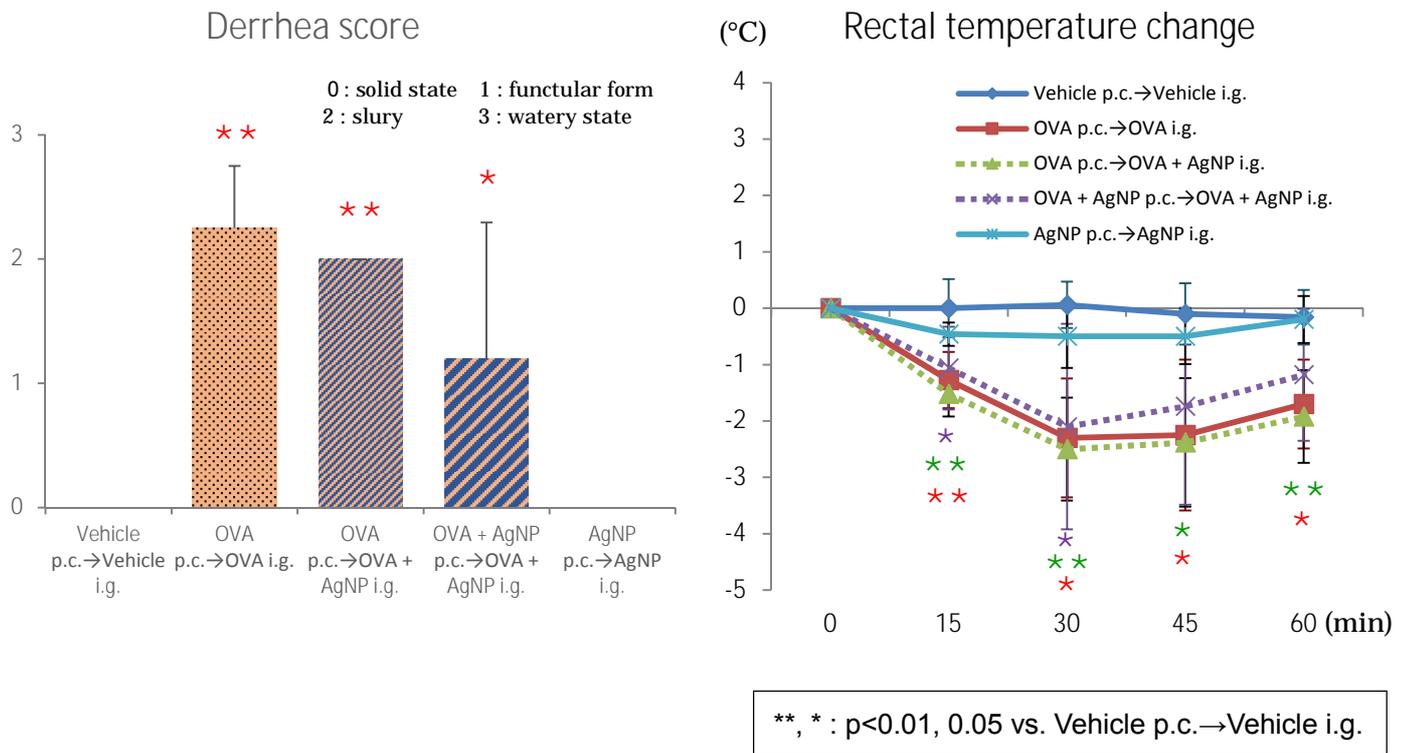


Figure 4. 惹起後下痢スコア・直腸温の経時変化

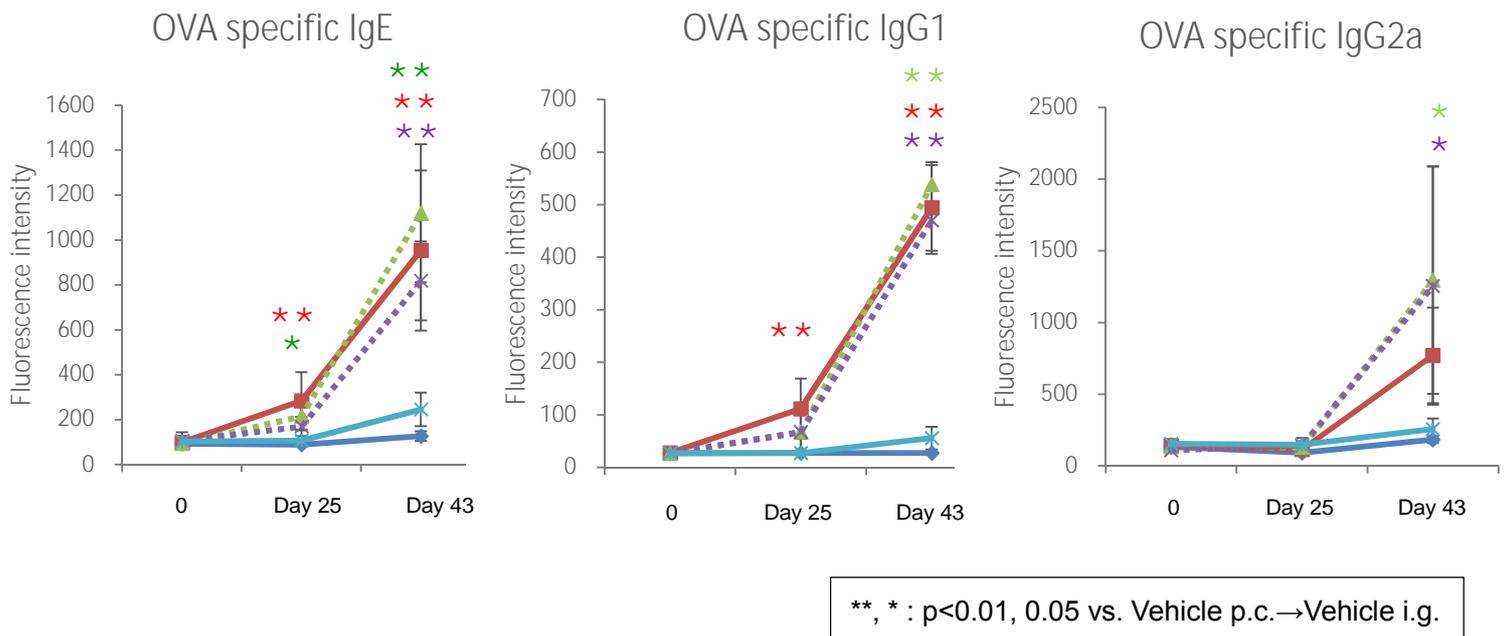
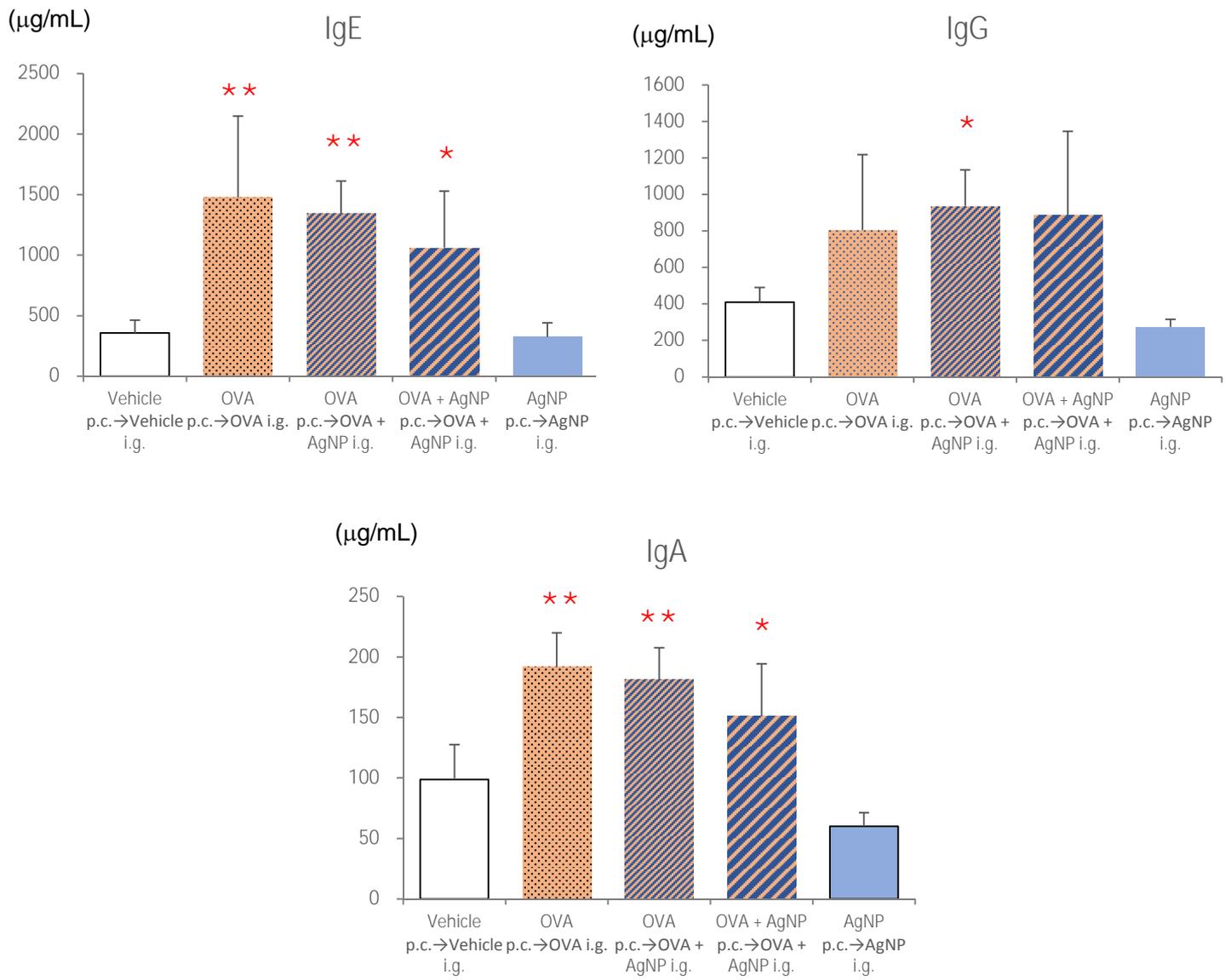
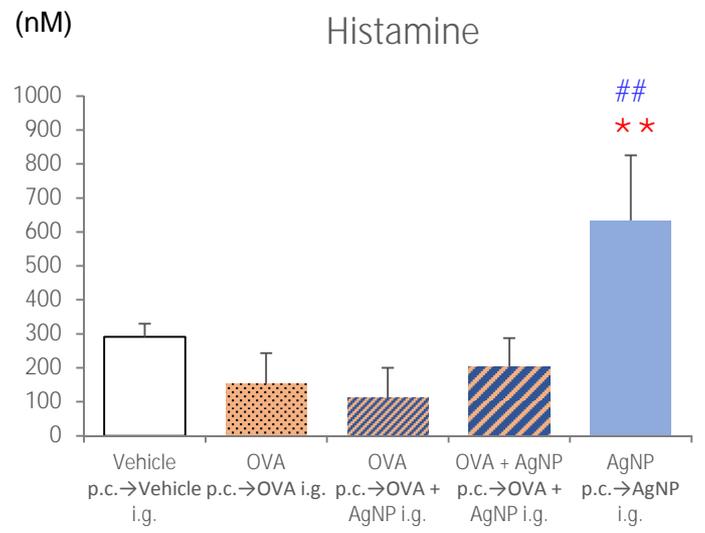
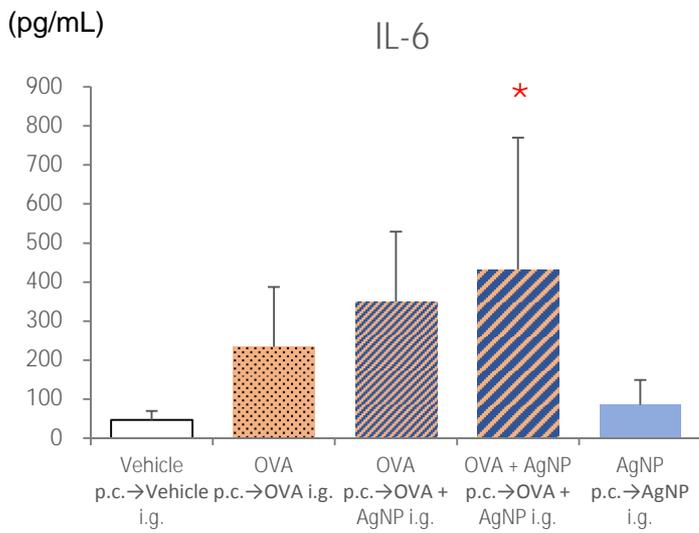
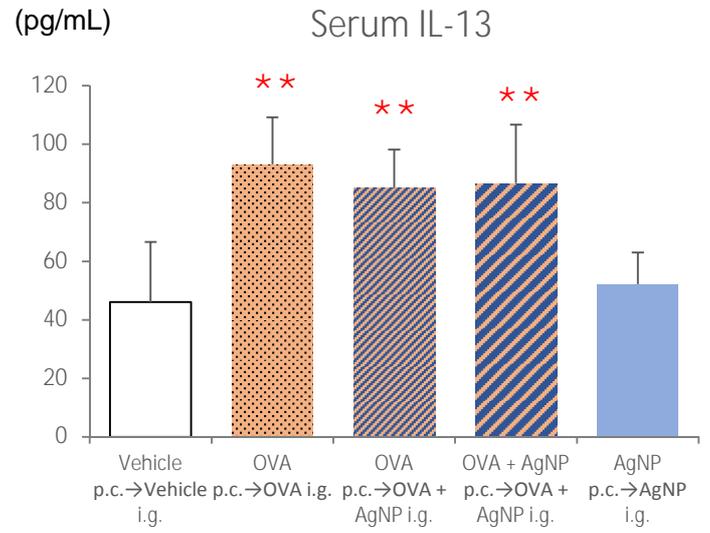
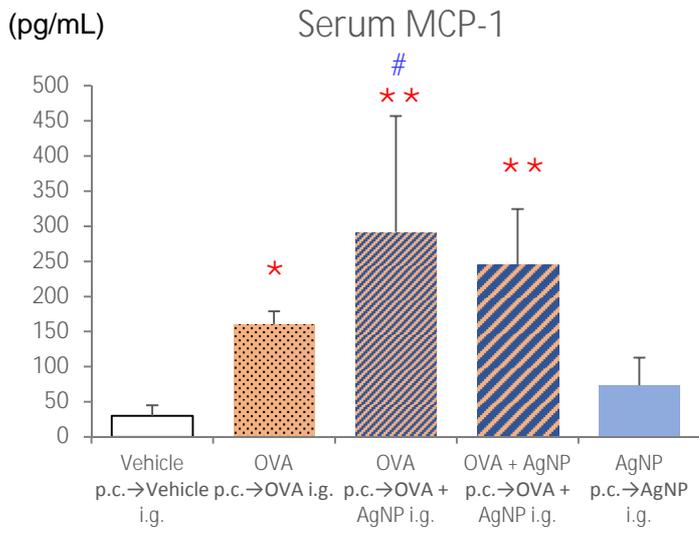


Figure 5. 血清中 OVA 特異抗体の経時的変化



** , * : p<0.01, 0.05 vs. Vehicle p.c.→Vehicle i.g.

Figure 6. 血清中非特異抗体量



** , * : p<0.01, 0.05 vs. Vehicle p.c.→Vehicle i.g.
##, # : p<0.01, 0.05 vs. OVA p.c.→OVA i.g.

Figure 7. 血清中サイトカイン濃度

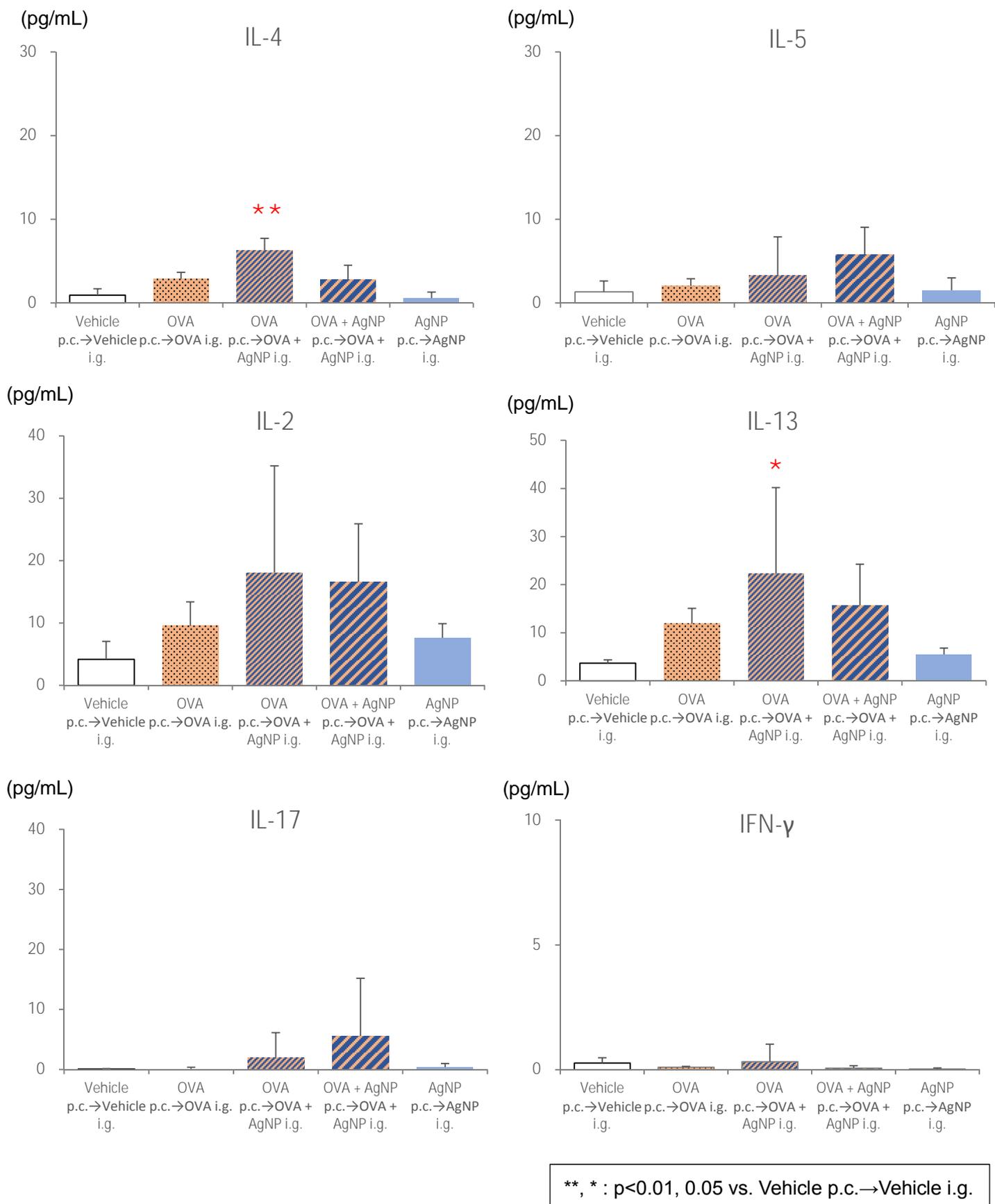


Figure 8. 脾臓細胞再抗原暴露誘導サイトカイン濃度