

酸化チタン等の経皮／経口暴露による免疫毒性の解析

研究分担者：安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長
研究協力者：為広 紀正 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 主任研究官
研究協力者：曹 永晩 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては、その特性による予想外の健康影響の可能性が指摘されている。酸化チタンや酸化亜鉛は、日焼け止め製品等の化粧品類へ配合されており、かつ着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装にも使用されている。本研究班の目的は、食品・食品容器包装用途に用いられ、経口及び経皮から暴露されるナノマテリアルについて、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積することである。29 年度においては、ナノ酸化チタン、ナノ酸化亜鉛について、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果、及び、抗原経皮感作に与える影響について検討した。30 年度においては、引き続きナノ酸化亜鉛が抗原経皮感作に与える影響について検討するとともに、29 年度腹腔内投与時に急性毒性が見られたことから、ナノ酸化亜鉛の腹腔内投与（i.p.）による急性毒性に関する検討を行った。さらに、抗原経皮感作-経口惹起実験系の確立を目指し、抗原経口投与（p.o.）によるアレルギー反応惹起実験系に関する検討を実施した。抗原経皮感作時の増強効果については、今回用いた酸化亜鉛（粒子径 80 nm）では効果は見られなかった。先行研究における結果と考え合わせ、ナノマテリアルの経皮感作増強効果は粒子径により異なり、粒子径が小さいナノマテリアルの方が経皮感作増強効果が大きいことが示唆された。また、酸化亜鉛に関しては、酸化チタンと異なり急性毒性が見られ、肝臓、腎臓、及び胸腺やリンパ節に影響を与える可能性が示された。経口惹起実験系については、抗原の i.p.感作後に p.o.追加免疫を行うことにより、最終的に p.o.によりアレルギー反応を惹起することが可能であることが示された。今後は経皮感作-経口惹起の動物モデル実験系を確立し、ナノマテリアルの経皮／経口暴露が免疫応答に与える影響について検討を進める。

A. 研究目的

近年幅広く利用されているナノマテリアルについては、更なる応用が期待されている一方で、その特性による予想外の健康影響の可能性が指摘されている。酸化チタンや酸化亜鉛は多くの日焼け止め製品に配合されており、ヒト皮膚と接触する頻度が非常に高い。その経皮曝露

の影響に関しては、これまでに皮膚透過性試験や皮膚感作性試験等が行われているが、いずれも明らかな作用は認められていない。一方で、最近、タンパク質が皮膚から取り込まれ抗原となる経皮感作経路が食物アレルギー発症の重要な要因として注目されている。そこで、研究分担者である安達らは、平成 26-28 年度の先行

研究（厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業）において、動物モデルを用いた検討により、数種の酸化チタン等のナノマテリアルが抗原経皮感作を増強することを示し、また、培養細胞を用いた *in vitro* 実験系により、これらのナノマテリアルが、アジュバント物質の活性発現において重要であるマクロファージのインフラマソーム活性化・炎症性サイトカインの産生を誘導することを示してきた。

本研究班の目的は、食品・食品容器包装用途に用いられ、経口及び経皮から暴露されるナノマテリアルについて、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積することであり、本分担研究では、化粧品等への配合とともに、着色あるいは遮光性・抗菌性を付与する目的で食品・容器包装に使用されるナノ酸化チタン、及びナノ酸化亜鉛が、経皮的アレルギー感作時やその後の経口惹起に与える影響について検討する。29年度においては、ナノ酸化チタン、ナノ酸化亜鉛について、抗原腹腔内投与時のアジュバント効果、及び、抗原経皮感作に与える影響について検討した。30年度においては、引き続きナノ酸化亜鉛が抗原経皮感作に与える影響について検討するとともに、29年度腹腔内投与時に急性毒性が見られたことから、ナノ酸化亜鉛の腹腔内投与による急性毒性に関する検討を行った。さらに、抗原経皮感作-経口惹起実験系の確立を目指し、抗原経口投与によるアレルギー反応惹起実験系に関する検討を実施した。

B. 研究方法

試料及び試薬

被験物質としては、

酸化亜鉛 A（粒子径 25 nm）

酸化亜鉛 B（粒子径 35 nm）

酸化亜鉛 C（粒子径 80 nm）

（全て表面未処理）

を使用した。

抗原タンパク質としては、卵アレルギーであ

る卵白アルブミン（OVA; Sigma A5503）及びオボムコイド（OM; Sigma T2011）を用いた。その他の試薬は特級グレードのものを用いた。

酸化亜鉛ナノマテリアルの懸濁液調製

酸化亜鉛は、それぞれ 50 mg/mL の濃度で PBS に懸濁し、2.5 分間の超音波処理の後にポルテックスミキサーにより攪拌するというサイクルを 4 回繰り返し、最後に 25G 注射針付きのシリンジを用いて攪拌し均一化した。

抗原の経皮感作に及ぼす酸化亜鉛ナノマテリアルの影響に関する検討（【実験 1】）

動物は、7 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー（株）より購入し、MF 飼料（オリエンタル酵母工業（株））を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。また、各群の実験条件を Table 1 に示す。8 週齢時に背面片側を剃毛し（Day 0）、翌日より 3 日間、OVA 溶液（1 μ g/50 μ L）、あるいは OVA 及び酸化亜鉛（12.5 ng-1.25 mg）の混合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 μ L の抗原液を浸潤させて貼付した。パッチの上から不織布製のジャケットを装着してパッチを保護した。3 日間貼付後にパッチを外し（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、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。アナフィラキシー反応の惹起は、Day 25 に OVA 1 mg/100 μ L を腹腔内投与（i.p.）して行った。i.p.後 30 分間、マウスの直腸温を測定した。また、アナフィラキシー症状を観察し、Table 2 の基準に従ってスコアリングを行った。惹起 30 分後に麻酔下で採血し、血清中ヒスタミンの濃度を Histamine EIA Kit(SPI-BIO)にて測定した。

【実験 2】酸化亜鉛ナノマテリアルの腹腔内投与による急性毒性に関する検討

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー（株）より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業（株）)を給餌した。1 群の匹数は 5 匹とした。各群の実験条件を Table 1 に示す。実験は 7 週齢時に行った。酸化亜鉛 A、B、C それぞれ 10 mg を生理食塩水 300 μ L に懸濁し、腹腔内投与 (i.p.) した。投与前、投与後 3 時間後及び 6 時間後に直腸温の測定、及び全身状態の観察を行った。体重測定及び採血の後解剖し、各臓器を摘出した。血液は遠心して血清を採取し、血液生化学検査を行った。検査項目は、TP：総タンパク、ALB：アルブミン、A/G：アルブミン/グロブリン比、BUN：尿素窒素、CRE：クレアチニン、Na、K、Cl、Ca、IP：無機リン、AST：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ALT：アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP：アルカリホスファターゼ、 γ -GT： γ -グルタミルトランスフェラーゼ、T-CHO：総コレステロール、TG：中性脂肪、T-BIL：総ビリルビン、GLU：グルコースの 18 項目である。また、摘出した肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節、胸腺、心臓及び肺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。病理組織学的所見の発生頻度については、Fischer's exact test による検定を実施し、いずれの検定も $p < 0.05$ を有意とした。なお、図表中には * 又は # $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ で有意差の程度を記した。

【実験 3】経口惹起実験系に関する検討

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシー（株）より購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業（株）)を給餌した。予備検討として実施したので、1 群の匹数は 3 匹とし、また対照群は設定しなかった。各群の実験条件を Table 1 に示す。また、実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。7 週齢時に、OVA ある

いは OM 1 μ g と水酸化アルミニウムゲル (Imject Alum (ThermoFisher #77161)) との混合懸濁液を腹腔内投与 (i.p.) し (Day 0)、7 日後 (Day 7) に再度投与して感作を行った。その後、Day 14, 16, 18, 21 に抗原 30 mg を経口投与 (p.o.) し、追加免疫を行った。この時、絶食ありの群では、投与前 4 時間絶食させた。Day 0, 14, 22 には部分採血し、血清中の抗原特異的 IgE、IgG1、及び IgG2a 抗体を ELISA 法により測定した。Day 28 に OVA 100 mg あるいは OM 90 mg を経口投与し、アレルギー反応を惹起した。追加免疫及び惹起時の経口投与後 1 時間は、マウスの直腸温測定、及び下痢症状の観察を行い、下痢症状については Table 2 の基準に従ってスコアリングした。

統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、Vehicle 群/OVA 群を基準とした Dunnett の検定、あるいは Tukey-Kramer の検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。図中には、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、# $p < 0.05$ 、## $p < 0.01$ で有意差の程度を示した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理審査委員会の承認を得て行った。マウスへの検体の投与、採血等においては、動物の苦痛を最小限に留めるように努め、動物飼育・管理に当たっては研究所の動物施設利用規定に従った。

C. 研究結果

【実験 1】抗原の経皮感作に及ぼす酸化亜鉛ナノマテリアルの影響に関する検討

酸化亜鉛 A、B については 29 年度までに検討してきた。30 年度は酸化亜鉛 C についての検討を行った。

Fig. 2 に血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。IgE 及び IgG1 は Th2 細胞優位

な免疫応答（アレルギーを含む）の際に産生される抗体であり、一方、IgG2a は Th1 細胞優位な免疫応答の際に産生される抗体である。OVA 群では IgE、IgG1 の産生が見られた。酸化亜鉛 C を共存させた群では、OVA 群と比較して抗体産生の有意な増減は見られなかった。なお、IgG2a に関しては、全ての群において産生は見られなかった。

4 週間の経皮感作後に、抗原の i.p.によるアナフィラキシー（能動的全身性アナフィラキシー）反応の惹起を行った。惹起後 30 分間、直腸温の測定、及びアナフィラキシー症状のスコアリングを行った。また、惹起 30 分後の血清中のヒスタミン濃度を測定した。結果を Fig. 3 に示す。A は惹起後 30 分間の直腸内体温の変化を示している。30 分後、OVA 群では V 群と比較して直腸温が平均 2.7°C 低下していた。酸化亜鉛 C を共存させた群では、OVA 群と比較して体温低下の有意な増強は見られなかった。B には惹起 30 分後の血清中ヒスタミン濃度を示す。OVA 群では V 群と比較して血清中ヒスタミン濃度が増大する傾向が見られた。酸化亜鉛 C を共存させた群では、OVA 群と比較してヒスタミン濃度の有意な増大は見られなかった。C には惹起後 30 分間のアナフィラキシー症状のスコアリングの結果を示す。OVA 群では V 群と比較してスコアの有意な増大が見られた。酸化亜鉛 C を共存させた群では、OVA 群と比較してスコアの有意な増大は見られなかった。これらの結果から、酸化亜鉛 C は OVA 経皮感作を増強しないことが示された。

【実験 2】酸化亜鉛ナノマテリアルの腹腔内投与による急性毒性に関する検討

酸化亜鉛ナノマテリアルが免疫応答に及ぼす影響を検討するため、29 年度には、動物実験における最も基本的な感作方法として、OVA の i.p.による感作を実施し、その際にナノマテリアルを共存させることにより、そのアジュバント効果について検討した。（アジュバントと

は、抗原と一緒に投与され、その抗原性を増強するために用いられる物質である。）その結果酸化亜鉛による感作増強作用が認められたが、その際、酸化亜鉛 A, B どちらも、10 mg 投与群で投与翌日までに 5 匹全匹が死亡し、また、酸化亜鉛 A 2 mg 投与群では 1 次、2 次免疫のそれぞれ翌日に 1 匹ずつ死亡した。このように、酸化亜鉛の i.p.により急性毒性が見られ、その際粒子径による違いが見られたことから、30 年度においては、酸化亜鉛の急性毒性に関する検討を行った。酸化亜鉛 A, B, C を 10 mg/匹にて i.p.し、3 時間後及び 6 時間後に直腸温測定、採血、解剖による臓器採取を行った。Fig. 4 に直腸温測定結果を示す。酸化亜鉛投与群では経時的な体温低下が見られ、酸化亜鉛 A, B, C 投与群でそれぞれ 3 時間後には平均 5.8°C、7.8°C、4.7°C 低下、6 時間後には平均 9.5°C、11.0°C、10.0°C 低下したが、酸化亜鉛の粒子径による違いは見られなかった。Fig. 5 には、血液生化学検査において Vehicle 群との間に有意差があった項目の測定結果を示す。尿素窒素、ALT、グルコースは Vehicle 群と比較して増大しており、かつ酸化亜鉛 A, B では C と比較してより増大していた。一方ナトリウムは、Vehicle 群と比較して低下しており、かつ酸化亜鉛 A, B では C と比較してより低下していた。カリウム、無機リン、AST、ALP、総コレステロール、及び中性脂肪は Vehicle 群と比較して増大し、一方塩素は Vehicle 群と比較して低下していた。総タンパク、アルブミン、アルブミン/グロブリン比、クレアチン、Ca、総ビリルビンに関しては、Vehicle 群と酸化亜鉛投与群との間に有意差は見られなかった。なお、 γ -GT に関しては全ての検体で検出限界以下であった。

病理組織学的解析の結果を Table 3 及び Fig. 5 に示す。全てのナノ酸化亜鉛投与 3 時間及び 6 時間後、及び酸化亜鉛 A 投与 6 h 群で、それぞれ胸腺皮質及び髄質のアポトーシスが Vehicle 群と比較して有意な増加を示した。又、群間の有意な差は認められなかったが、ナノ酸

化亜鉛投与群でのみ胆嚢の浮腫並びに胸腺リンパ節の褐色色素及び無構造物質の沈着が認められた。一方、肝臓、腎臓及び脾臓においては、被験物質による明らかな所見は認められなかった。

【実験 3】経口惹起実験系に関する検討

今後抗原の経皮感作+経口惹起に対するナノマテリアルの影響について検討を進めていくにあたり、抗原 i.p.により感作したマウスに抗原を経口投与し、アレルギー反応を惹起できるかどうかについて検討した。

各群の実験条件を Table 1 に示す。また、実験全体のスケジュールを Fig. 1 に示す。抗原としては OVA 及び OM を用い、2 回の i.p.の後に p.o.にて 4 回の追加免疫を行い、その後、p.o.にてアレルギー反応を惹起した。Fig. 6 には血清中の抗原特異的 IgE、IgG1 の測定結果を示す。OVA では i.p.のみでも抗体産生が見られるが、p.o.追加免疫によって特に IgE 産生が増大した。OM では i.p.による抗体産生は OVA と比較して少なく、p.o.追加免疫の効果が明確に見られた。(なお、通常 Vehicle 群では、IgE、IgG1 の蛍光値はそれぞれ 100 及び 50 程度である。)

次に、p.o.追加免疫、及び p.o.惹起時の体温変化及び下痢症状スコアの結果を示す (Fig. 7, 8)。追加免疫 1、2 回目では体温低下、下痢症状ともほとんど見られなかったが、追加免疫 3、4 回目、及び p.o.惹起時には、OVA 投与群で体温が低下し、また、OVA 投与群、OM 投与群の両方で下痢症状が見られた。(なお、通常の Vehicle 群での体温変動は OM 投与群での変動とほぼ同様である。) これらの結果から、抗原の i.p.感作後に p.o.追加免疫を行うことにより、最終的に p.o.によりアレルギー反応を惹起することが可能であることが示された。

D. 考察

本研究班の目的は、食品・食品容器包装用途

に用いられ、経口及び経皮から暴露されるナノマテリアルについて、免疫毒性の面から安全性評価に資するデータを蓄積することである。本分担研究では、ナノ酸化チタンやナノ酸化亜鉛が、経皮的アレルギー感作時やその後の経口惹起に与える影響について検討を行う。29 年度においては、抗原 i.p.時のアジュバント効果、及び、抗原経皮感作に与える影響について検討した。30 年度においては、引き続きナノ酸化亜鉛が抗原経皮感作に与える影響について検討するとともに、29 年度の検討を受けてナノ酸化亜鉛の腹腔内投与による急性毒性に関する検討を行った。さらに、抗原経口投与によるアレルギー反応惹起実験系に関する検討を実施した。

酸化亜鉛 C について、抗原経皮感作に対する影響に関して検討した結果、経皮感作の増強効果は見られなかった。これまでの検討では、酸化チタン C (アナターゼ型、6 nm)、酸化チタン A (ルチル型、15 nm)、及び酸化チタン D (アナターゼ型、15 nm) の共存により経皮感作が増強されるが、酸化チタン B (ルチル型、35 nm) や酸化チタン E (アナターゼ型、30 nm) では増強されないこと、酸化チタン C が最も強い増強効果を示すことが明らかとなっている。また、酸化亜鉛の場合も、酸化亜鉛 A (25 nm) では経皮感作を増強する傾向が見られているが、酸化亜鉛 B (35 nm) ではこのような効果は見られない。本年度の検討において酸化亜鉛 C (80 nm) でも経皮感作増強効果が見られなかったことから、酸化亜鉛の場合も、酸化チタンと同様に、この増強効果が粒子径に依存している可能性が示唆された。

29 年度の検討において、酸化亜鉛の i.p.時に急性毒性が見られ、かつ、この毒性が粒子径に依存している(粒子径が小さい方が毒性が強い)傾向があったことから、30 年度は、酸化亜鉛の i.p.による急性毒性に関して検討した。マウス 1 匹当たり酸化亜鉛 10 mg を i.p.したところ、6 時間後には 10 度前後の体温低下が見られた。3 時間後の時点では酸化亜鉛 A、B と比較して酸

化亜鉛 C では体温低下の度合いが小さい傾向が見られたが、全体としては粒子径による明確な差は無かった。血液生化学検査の結果からは、腎機能の指標である尿素窒素や肝機能の指標である AST, ALT, ALP が酸化亜鉛投与により増大すること、かつ、尿素窒素及び ALT では、酸化亜鉛 A, B の方が酸化亜鉛 C と比較してより大きく増大していることが示された。従って、酸化亜鉛は肝臓や腎臓の機能に影響を与えていることが示唆された。また、病理組織学的解析において、酸化亜鉛投与群で認められた胸腺皮質及び髄質のアポトーシスは、被験物質による他のリンパ組織の萎縮などの明らかな免疫抑制作用が認められなかったことから、具体的なメカニズムは不明であるが、被験物質による物理的又は化学的刺激に起因した変化と考えられる。また、胸腺リンパ節では褐色色素及び無構造物質の沈着が認められたことから、腹腔内投与した被験物質はリンパ循環したと考えられた。

経皮感作-経口惹起実験系の確立を目指して行った経口惹起に関する予備検討においては、抗原の i.p.感作後に 4 回の経口追加免疫を実施することにより、最終的に抗原経口投与によりアレルギー反応を惹起することが可能であることが示された。今後、感作経路を経皮とし、かつ、より明確なアレルギー反応を惹起できるよう、実験系の最適化を進める。

近年のアレルギーに関する研究、また、最近のわが国における加水分解コムギタンパク質を含有する洗顔石鹸の事例等から示されるように、タンパク質が皮膚を透過して体内に取り込まれ抗原となる経皮感作経路が、現在、アレルギー発症の重要な要因として注目されている。本研究のこれまでの検討結果は、抗原タンパク質の経皮感作によるアレルギー発症において、酸化チタンや酸化亜鉛のようなナノマテリアルが共存することにより感作が増強される可能性を示しており、粒子径 30nm 未満程度のナノマテリアルを皮膚に適用する際には注

意が必要であると考えられる。また、抗原の i.p.感作時の検討及び急性毒性の検討から、酸化亜鉛の場合は、酸化チタンとは異なり、おそらく亜鉛に由来すると考えられる生体影響の可能性が示されており、やはり注意するべきであろう。

経口惹起に関する予備検討の結果を受け、今後は、経皮感作-経口惹起の動物モデル実験系を確立し、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について検討を進める予定である。

E. 結論

食品・食品容器包装用途、及び化粧品等の両方に用いられ、経口及び経皮にて暴露される可能性があるナノマテリアルである酸化亜鉛について、抗原経皮感作に与える影響、及び i.p.投与時の急性毒性について検討した。今回用いた酸化亜鉛 (80 nm) では抗原経皮感作時の増強効果は見られなかった。先行研究における結果と考え合わせ、ナノマテリアルの経皮感作増強効果は粒子径により異なり、粒子径が小さいナノマテリアルの方が経皮感作増強効果が大きいことが示唆された。また、酸化亜鉛に関しては、酸化チタンと異なり急性毒性が見られ、肝臓、腎臓、及び胸腺やリンパ節に影響を与える可能性が示された。今後は経皮感作-経口惹起の動物モデル実験系を確立し、ナノマテリアルの経皮/経口暴露が免疫応答に与える影響について検討を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koizumi D, Shirota K, Oda H, Adachi R, Sakai, S, Akiyama H, Nishimaki-Mogami T, Teshima R. Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using a Nonpoisonous Extraction System for the Determination of Crustacean Protein in

Processed Foods.

J AOAC Int 101, 798-804, 2018

2. 学会発表

- 1) Miyazaki A, Watanabe S, Hirao T, Kokutani R, Minegishi Y, Ogata K, Nagatomi Y, Tamehiro N, Sakai S, Adachi R. Specific Detection of Food Allergens (Wheat, Buckwheat, and Peanut) by Real-Time PCR Methods Using the Reference Plasmids
132nd AOAC Annual Meeting & Exposition
(2018年8月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1 各実験群の感作検体及び共存物質

実験1 抗原の経皮感作に及ぼす酸化亜鉛ナノマテリアルの影響(1群5匹 x 8群)

群名	感作検体	共存物質
V	PBS	—
OVA1	OVA 1 µg	—
OVA1 ZnO 1.25mg	OVA 1 µg	酸化亜鉛 1.25 mg
OVA1 ZnO 125µg	OVA 1 µg	酸化亜鉛 125 µg
OVA1 ZnO 12.5µg	OVA 1 µg	酸化亜鉛 12.5 µg
OVA1 ZnO 1.25µg	OVA 1 µg	酸化亜鉛 1.25 µg
OVA1 ZnO 125ng	OVA 1 µg	酸化亜鉛 125 ng
OVA1 ZnO 12.5ng	OVA 1 µg	酸化亜鉛 12.5 ng

※酸化亜鉛C(粒子径: 80 nm)

実験2 酸化亜鉛ナノマテリアルの腹腔内投与による急性毒性に関する検討(1群5匹 x 8群)

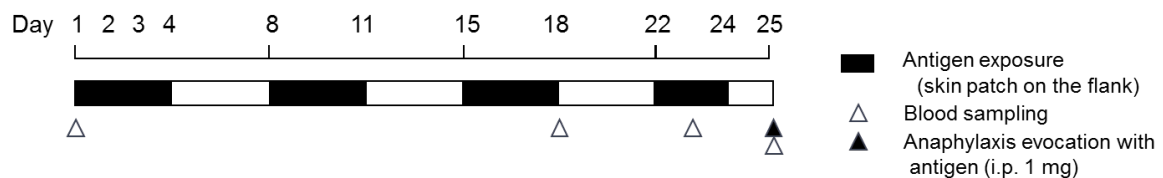
群名	投与物質	解剖時間
V-3h	Saline	3時間後
V-6h	Saline	6時間後
ZnO-A_3h	酸化亜鉛A (10 mg)	3時間後
ZnO-A_6h	酸化亜鉛A (10 mg)	6時間後
ZnO-B_3h	酸化亜鉛B (10 mg)	3時間後
ZnO-B_6h	酸化亜鉛B (10 mg)	6時間後
ZnO-C_3h	酸化亜鉛C (10 mg)	3時間後
ZnO-C_6h	酸化亜鉛C (10 mg)	6時間後

※酸化亜鉛A(粒子径: 25nm)、B(35nm)、C(80nm)

実験3 経口惹起実験系に関する検討(1群3匹 x 4群)

群名	検体	感作(i.p.)	追加免疫(p.o.)	惹起(p.o.)	p.o.前絶食
OVA	OVA	1 µg+Alum	30 mg	100 mg	なし
OVA+S	OVA	1 µg+Alum	30 mg	100 mg	あり
OM	OM	1 µg+Alum	30 mg	90 mg	なし
OM+S	OM	1 µg+Alum	30 mg	90 mg	あり

実験1 抗原の経皮感作に及ぼす酸化亜鉛の影響



実験3 経口惹起実験系に関する検討

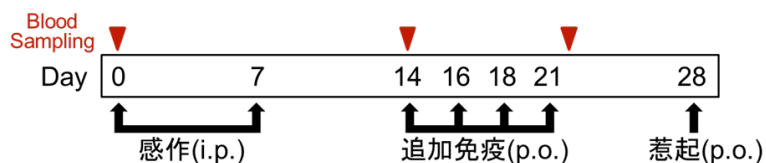


Figure 1 各試験のスケジュール

Table 2 症状スコアリングの基準

アナフィラキシー症状

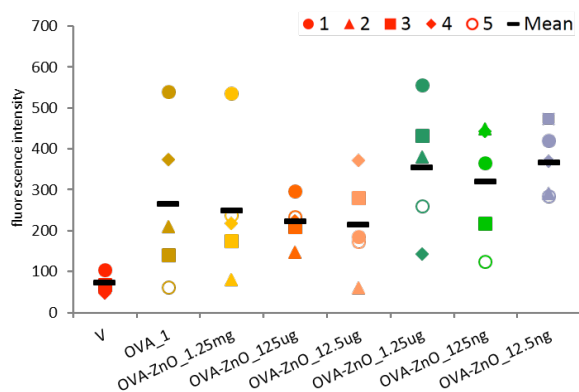
Score 0	症状なし
1	口、耳、鼻、頭などを掻く、後ろ足で耳の穴を掻く
2	活動低下、呼吸が速くなる、眼・鼻・口の周囲の腫脹、立毛
3	1分以上動かない、うつぶせで横たわる、ゼーゼーと息を切らす、呼吸困難、口の周囲や尾のチアノーゼ、一過性の痙攣
4	ひげに触れても反応しない、刺激に対する反応の低下・無反応、意識消失、震え、痙攣
5	死亡

下痢症状

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

※Allergy 67, 201-9 (2012). スコア2以上を下痢とする。

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

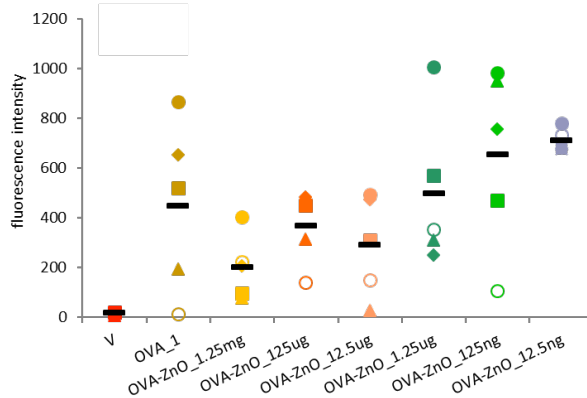
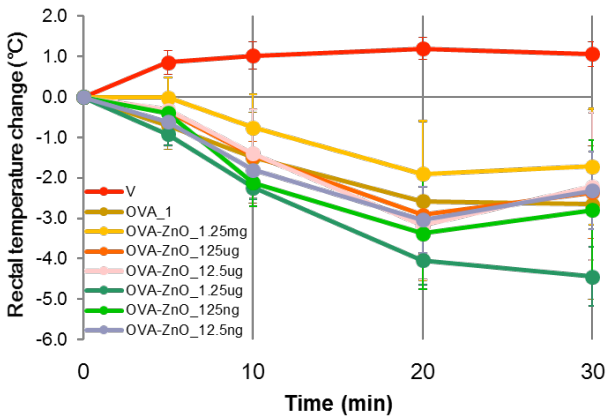


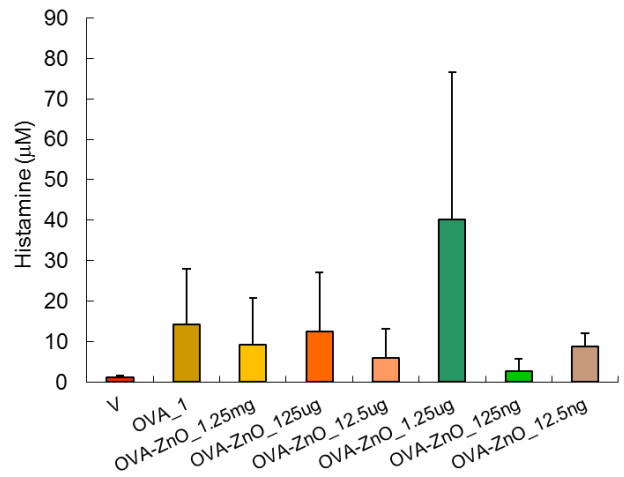
Figure 2 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験1】酸化亜鉛C)

各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。OVA群と酸化亜鉛共存群との間で有意差は見られなかった。

A. 惹起後の体温変動



B. 惹起30分後の血清中ヒスタミン濃度



C. アナフィラキシー症状のスコアリング

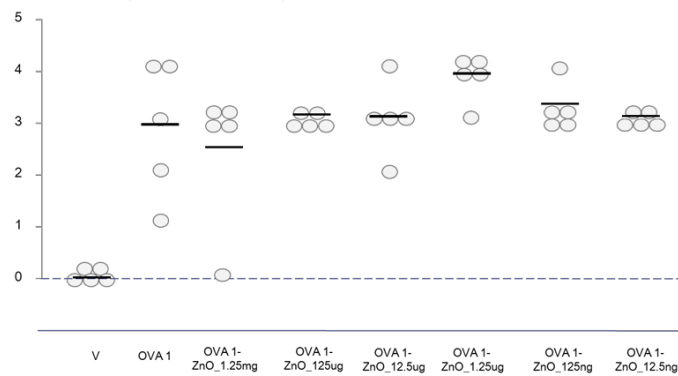


Figure 3 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験1】酸化亜鉛C)

A, B: 各群のデータをMean±S.D.で示す。C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。OVA群と酸化亜鉛共存群との間で有意差は見られなかった。

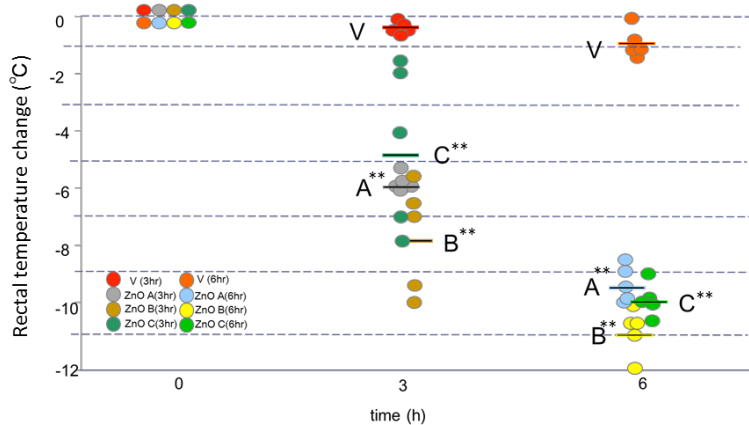


Figure 4 酸化亜鉛腹腔内投与後の体温変化(【実験2])

ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
**p<0.01 by Dunnett's test vs. V group.

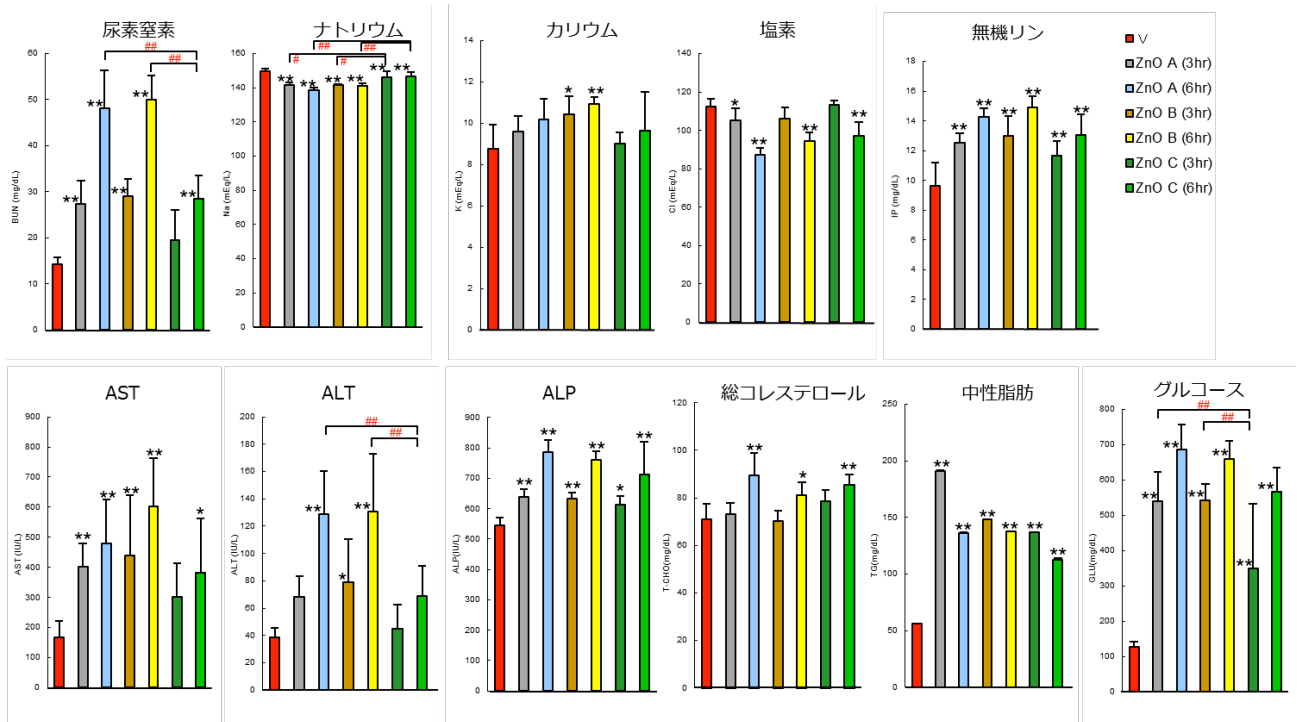


Figure 5 血液生化学検査の結果(【実験2】)

V群と酸化亜鉛投与群との比較において有意差が見られた項目を示す。

*p<0.05, **p<0.01 by Dunnett's test vs. V group.

#p<0.05, ##p<0.01 by Tukey-Kramer's test.

Table 3 Histopathological findings for Balb/C mice

Organ and lesions		Treatment	V-3 h	V-6 h	ZnO-A 3 h	ZnO-A 6 h	ZnO-B 3 h	ZnO-B 6 h	ZnO-C 3 h	ZnO-C 6 h
		No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5
胸腺	アポトーシス(皮質)		0	0	5 **	5 **	5 **	5 **	5 **	5 **
	アポトーシス(髄質)		0	0	0	4 *	1	1	0	2
胸腺(胸腔)リンパ節 褐色色素沈着			0 ^b	0 ^a	0 ^d	1 ^d	1 ^b	1 ^c	1 ^d	3 ^a
	無構造物質の沈着		0 ^b	0 ^a	0 ^d	0 ^d	1 ^b	0 ^c	0 ^d	3 ^a
胆嚢	浮腫(粘膜下)		0	0 ^a	2 ^b	2	2 ^a	0 ^b	3	1
	浮腫(漿膜下)		0	0 ^a	0 ^b	0	1 ^a	0 ^b	0	0

*, **: Significantly different from the V-3 h group at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively. a; n=4, b; n=3, c; n=2, d; n=1.

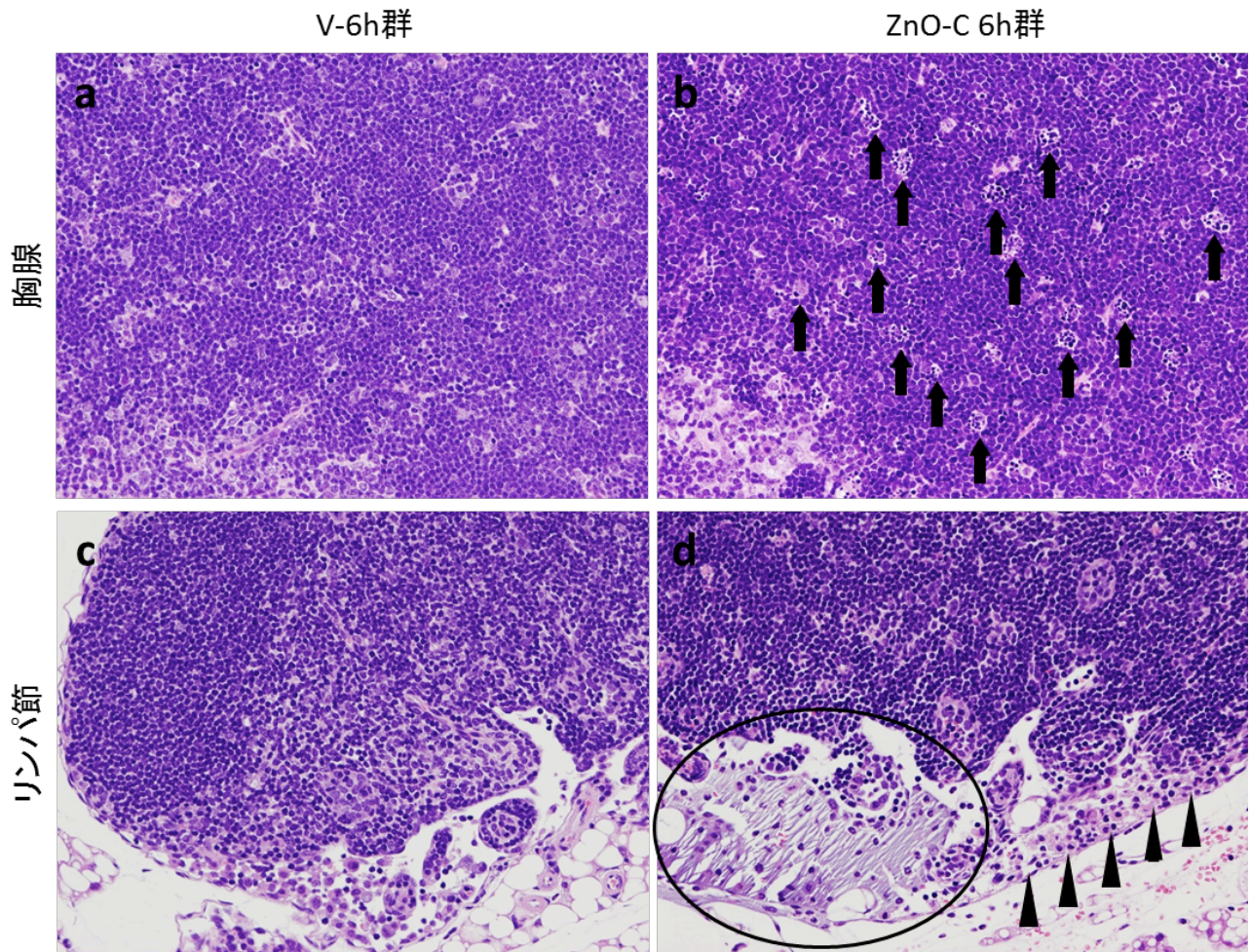
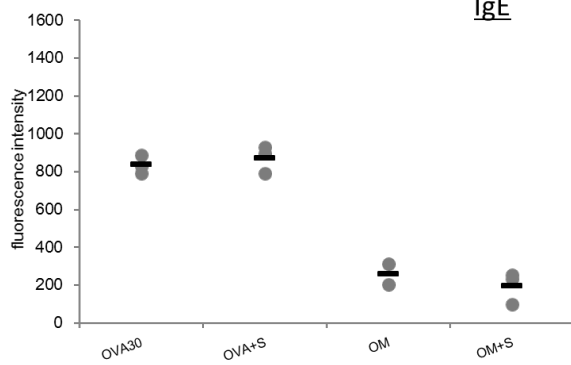


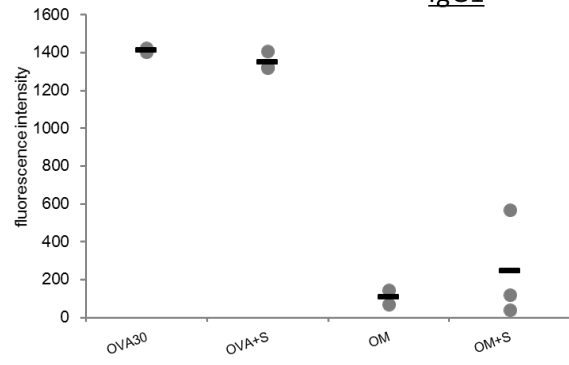
Figure 5 病理組織像【実験2】

a 正常胸腺 (V-6h 群)、b 胸腺皮質のアポトーシス (矢印、ZnO-C 6h 群)、
c 正常リンパ節 (V-6h 群)、d リンパ節の褐色色素 (矢頭) 及び無構造物質の沈着 (円内、ZnO-C 6h 群)

Day 14 (p.o.追加免疫開始前)



IgG1



Day 22 (p.o.追加免疫終了翌日)

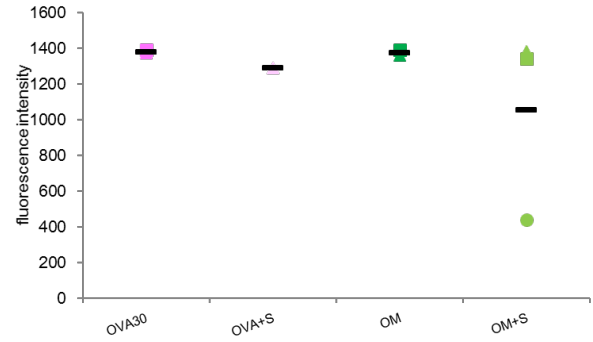
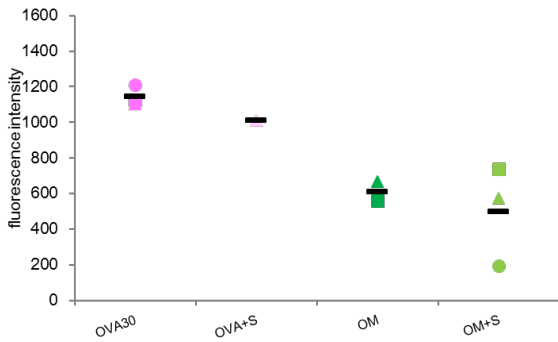
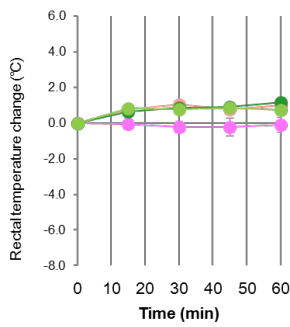
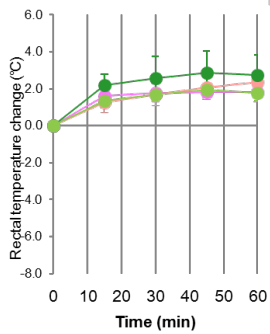


Figure 6 抗原i.p.感作及びp.o.追加免疫による抗体産生(【実験3】)
各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

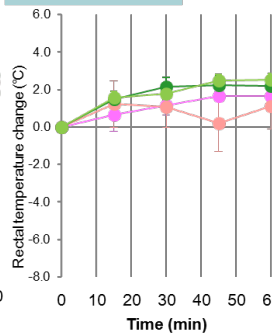
Day 14: 追加免疫1回目



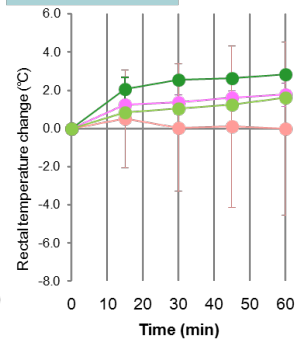
Day 16: 2回目



Day 18: 3回目



Day 21: 4回目



Day 28: 惹起

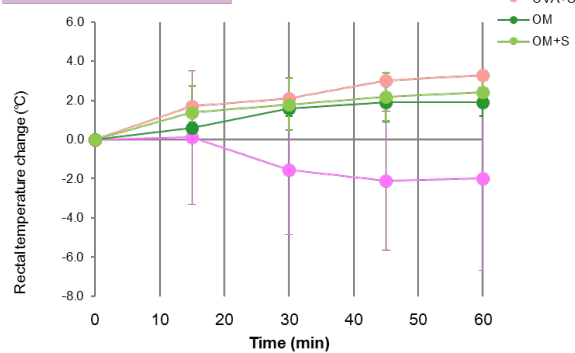


Figure 7 p.o.追加免疫及びp.o.惹起後1時間の体温変化(【実験3】)
各群のデータをMean±S.D.で示す。

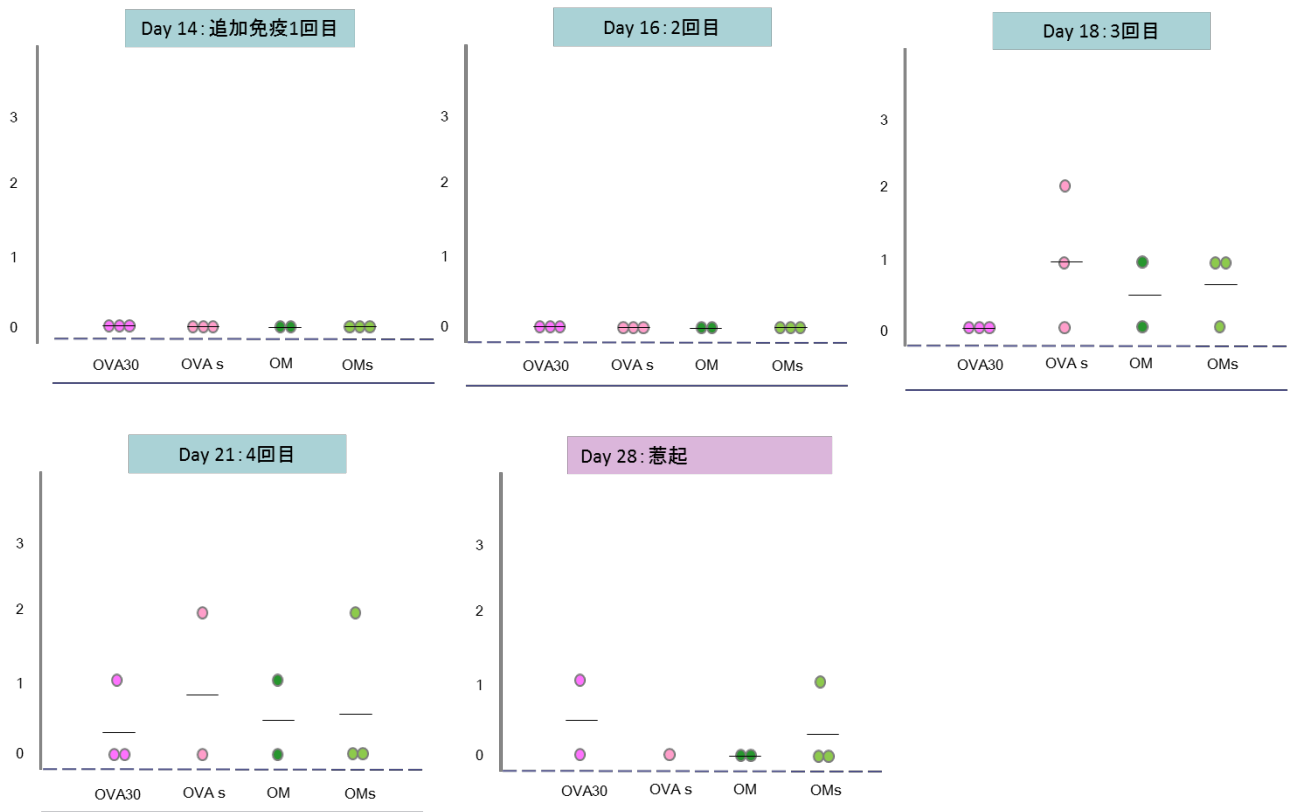


Figure 8 p.o.追加免疫及びp.o.惹起後1時間の下痢症状スコアリング(【実験3】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。