

Table A-H29-1 各実験群の感作検体及び共存物質

実験1 抗原の腹腔内投与による感作に及ぼす酸化チタン及び酸化亜鉛の影響(1群5匹 x 9群)

群名	感作検体	共存物質
V	PBS	—
OVA	OVA (20 µg)	—
OVA-ALUM	OVA (20 µg)	Alum (2 mg)
OVA-ZnOA_L	OVA (20 µg)	酸化亜鉛A (2 mg)
OVA-ZnOA_H	OVA (20 µg)	酸化亜鉛A (10 mg)
OVA-ZnOB_L	OVA (20 µg)	酸化亜鉛B (2 mg)
OVA-ZnOB_H	OVA (20 µg)	酸化亜鉛B (10 mg)
OVA-TiO2D_L	OVA (20 µg)	酸化チタンD (2 mg)
OVA-TiO2D_H	OVA (20 µg)	酸化チタンD (10 mg)

【実験 B1】

※酸化亜鉛A(粒子径:25nm)、酸化亜鉛B(粒子径:35nm)、酸化チタンD(アナターズ型、粒子径:15nm)

実験2 抗原の経皮感作に及ぼす酸化チタンの影響(1群5匹 x 8群)

群名	感作検体	共存物質
V	PBS	—
OVA1	OVA 1 µg	—
OVA1 TiO2 1.25mg	OVA 1 µg	酸化チタン 1.25 mg
OVA1 TiO2 125µg	OVA 1 µg	酸化チタン 125 µg
OVA1 TiO2 12.5µg	OVA 1 µg	酸化チタン 12.5 µg
OVA1 TiO2 1.25µg	OVA 1 µg	酸化チタン 1.25 µg
OVA1 TiO2 125ng	OVA 1 µg	酸化チタン 125 ng
OVA1 TiO2 12.5ng	OVA 1 µg	酸化チタン 12.5 ng

【実験 B2】

※酸化チタンB(ルチル型、粒子径:35nm)

実験3 抗原の経皮感作に及ぼす酸化亜鉛の影響(1群5匹 x 8群)

群名	感作検体	共存物質
V	PBS	—
OVA2	OVA 2 µg	—
OVA2 ZnO 1.25mg	OVA 2 µg	酸化亜鉛 1.25 mg
OVA2 ZnO 125µg	OVA 2 µg	酸化亜鉛 125 µg
OVA2 ZnO 12.5µg	OVA 2 µg	酸化亜鉛 12.5 µg
OVA2 ZnO 1.25µg	OVA 2 µg	酸化亜鉛 1.25 µg
OVA2 ZnO 125ng	OVA 2 µg	酸化亜鉛 125 ng
OVA2 ZnO 12.5ng	OVA 2 µg	酸化亜鉛 12.5 ng

【実験 B3】

※酸化亜鉛B(粒子径:35nm)

Table A-H30-1 各実験群の感作検体及び共存物質

実験4 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 B4】

実験5 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: 25 nm)、B(35 nm)、C(80 nm)

【実験 B5】

実験6 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 B6】

Table A-H29-2 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

【実験 B1-B3】

Table A-H30-2 下痢症状スコアリングの基準

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。

【実験 B4-B6】

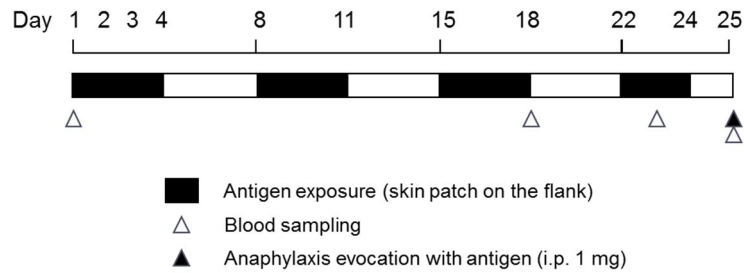


Figure A-H29-1 経皮感作試験スケジュール

【実験 B1-B3】

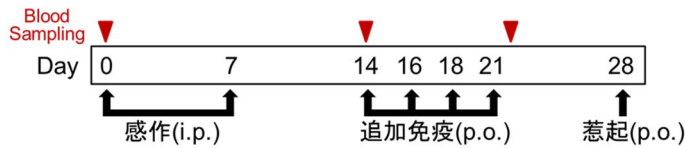
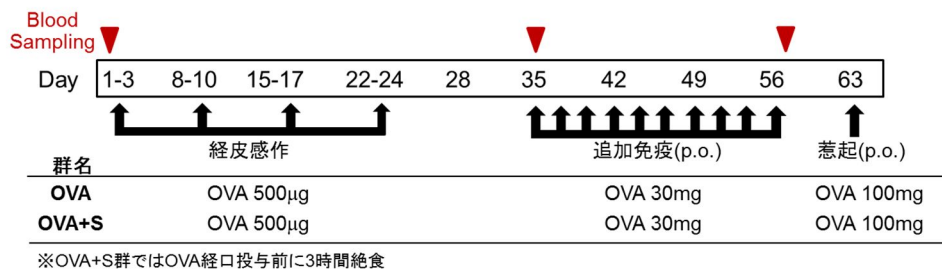


Figure A-H30-1 経口惹起試験のスケジュール

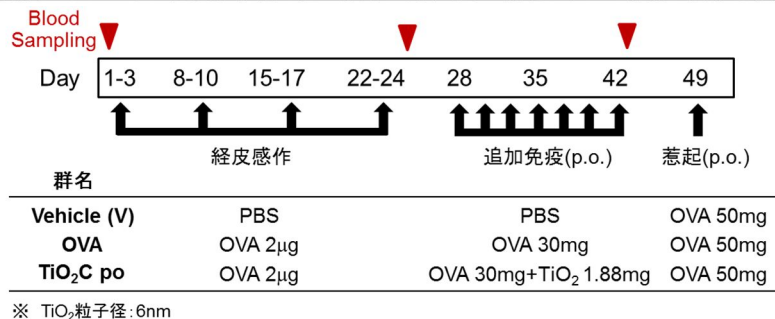
【実験 B4-B6】

実験7 経皮感作-経口惹起実験系に関する検討(1群3匹 x 2群)



【実験 B7】

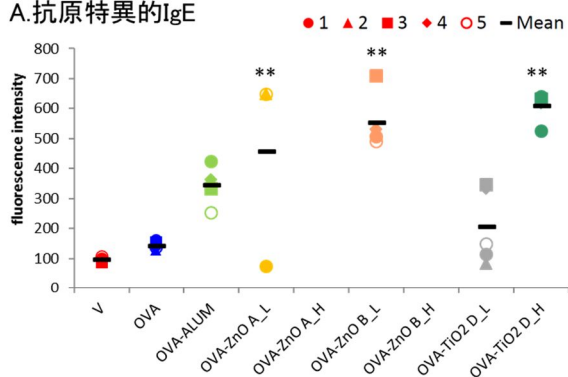
実験8 アレルゲン経皮感作後の経口投与に対するナノ酸化チタンの影響に関する検討(1群3匹 x 3群)



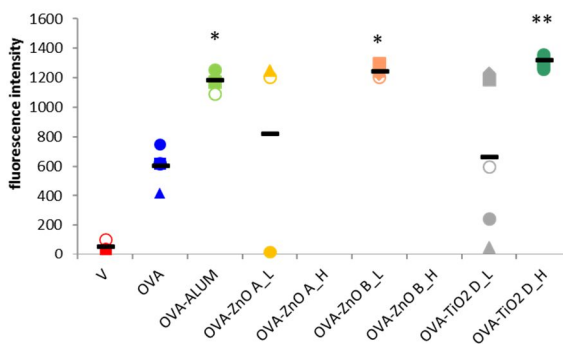
【実験 B8】

Figure A-R1-1 各実験群の設定および投与スケジュール

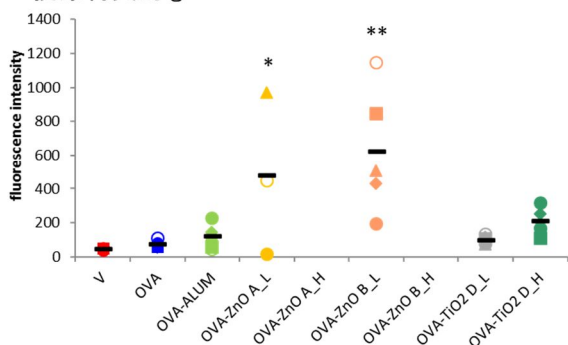
A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1



C. 抗原特異的IgG2a

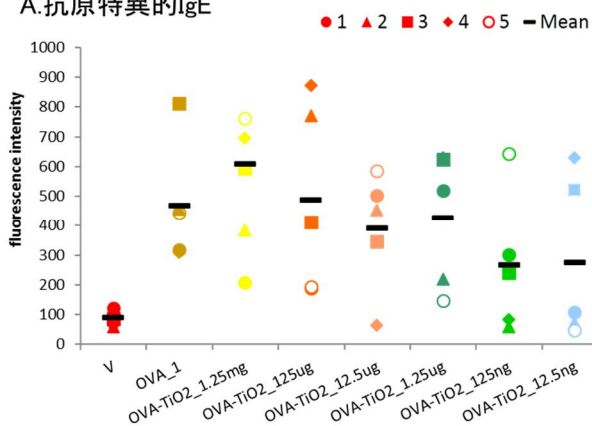


【実験 B1】

Figure A-H29-2 抗原の腹腔内投与による感作における抗原特異的抗体産生 (【実験1】)

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。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett's test vs. OVA group.

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

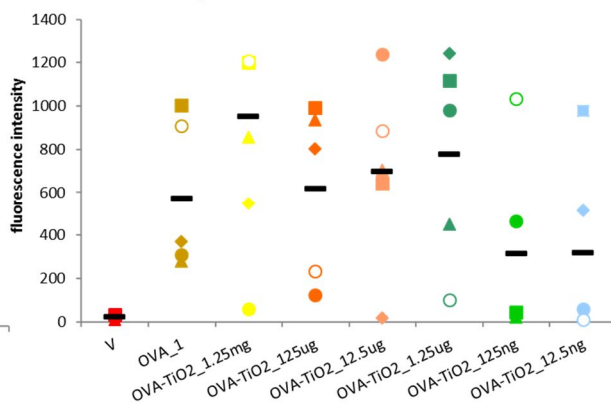
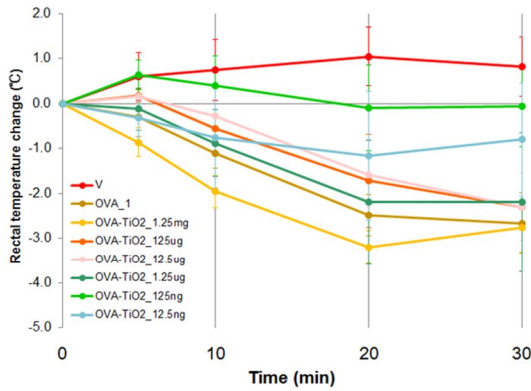


Figure A-H29-3 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生 (【実験2】酸化チタンB)

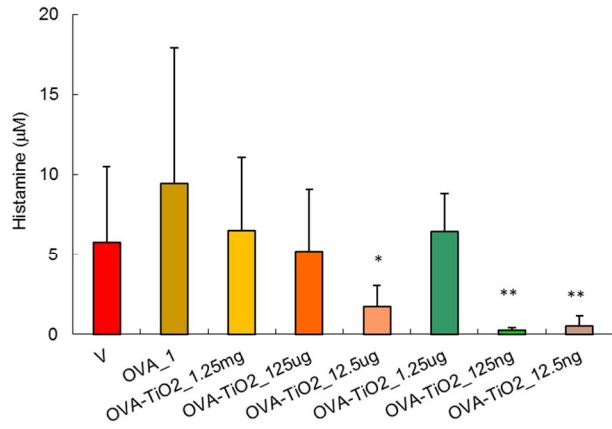
各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
OVA群と酸化チタン共存群との間で有意差は見られなかった。

【実験 B2】

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

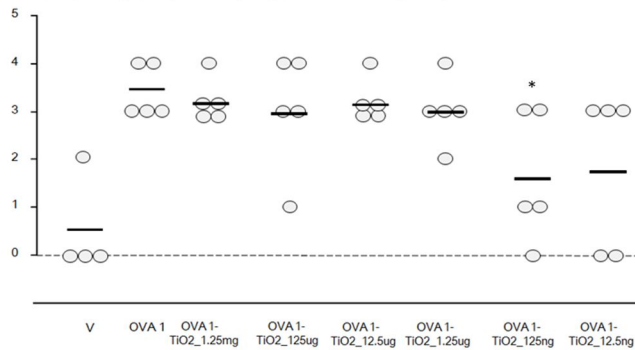
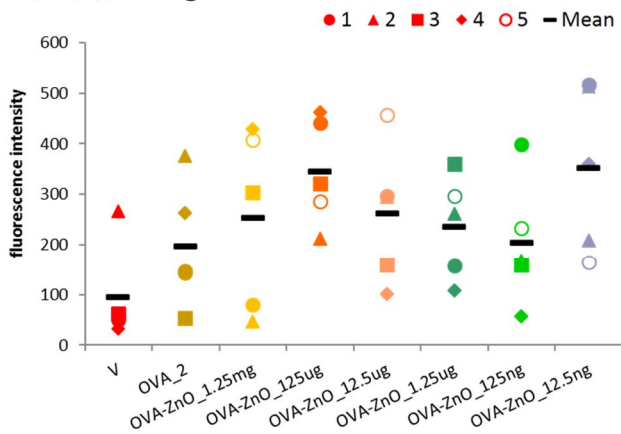


Figure A-H29-4 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験2】酸化チタンB)
 A, B: 各群のデータをMean±S.D.で示す。C: ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
 *p<0.05, **p<0.01 by Dunnett's test vs. OVA group.

【実験 B2】

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

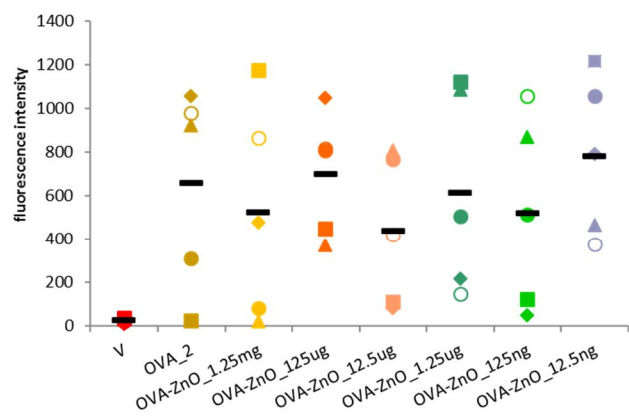
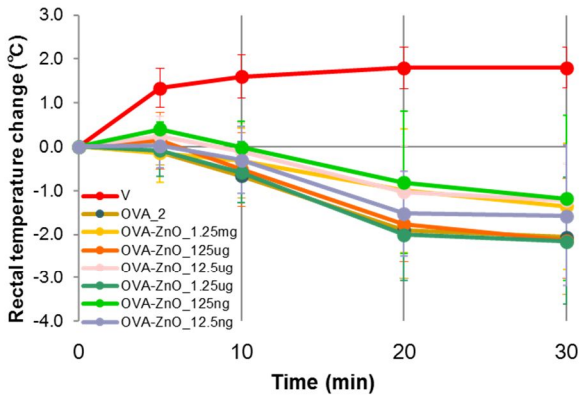


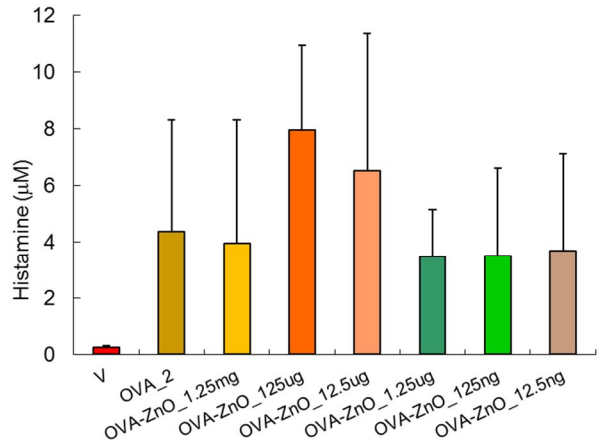
Figure A-H29-5 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験3】酸化亜鉛B)
 各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。
 OVA群と酸化チタン共存群との間で有意差は見られなかった。

【実験 B3】

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

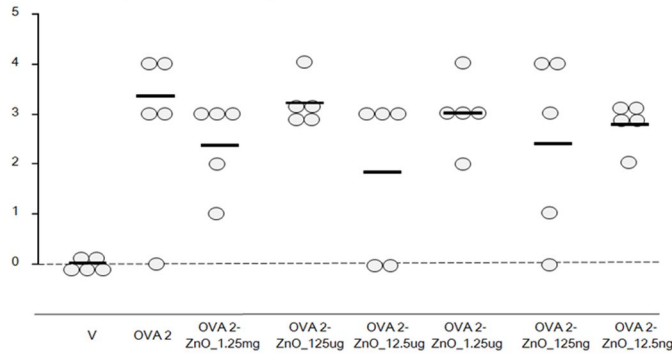
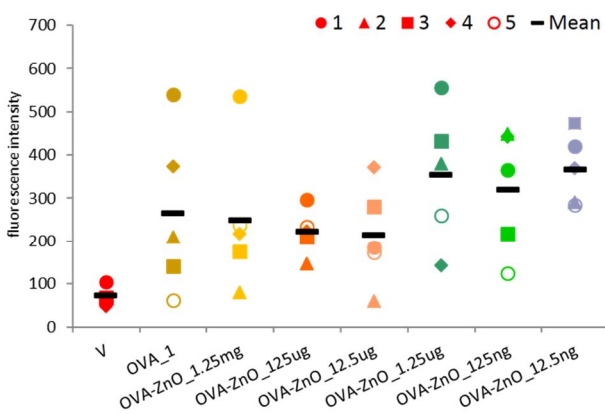


Figure A-H29-6 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験3】酸化亜鉛B)

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。

【実験 B3】

A. 抗原特異的IgE



B. 抗原特異的IgG1

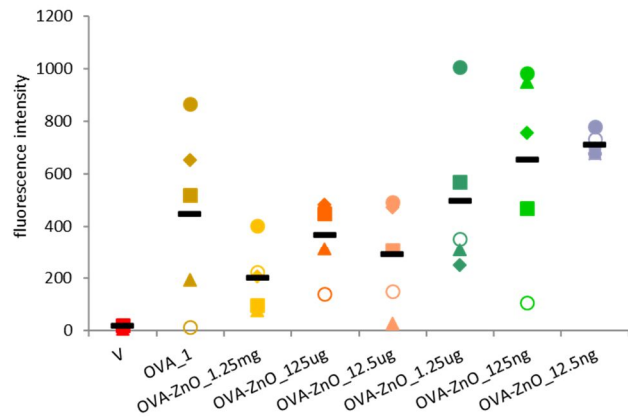
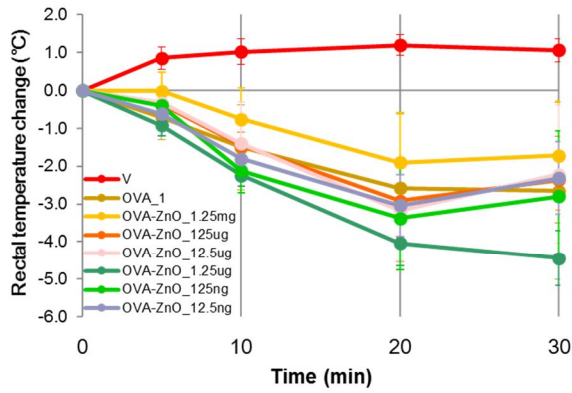


Figure A-H30-2 抗原の経皮感作における抗原特異的抗体産生(【実験4】酸化亜鉛C)

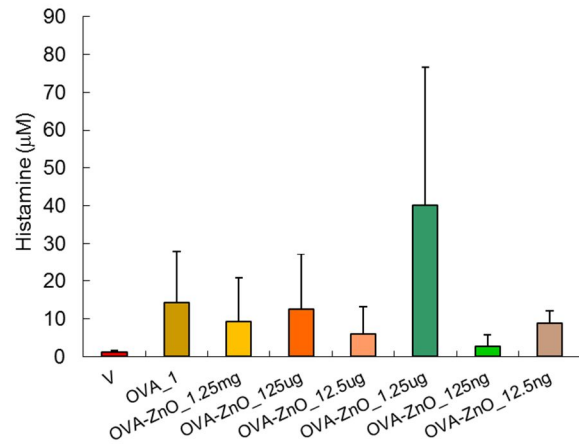
各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。OVA群と酸化亜鉛共存群との間で有意差は見られなかった。

【実験 B4】

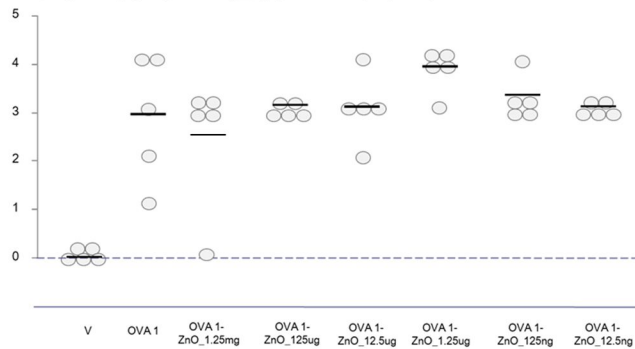
A. 惹起後の体温変動



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



【実験 B4】

Figure A-H30-3 OVA経皮感作マウスのアナフィラキシー反応惹起(【実験4】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。

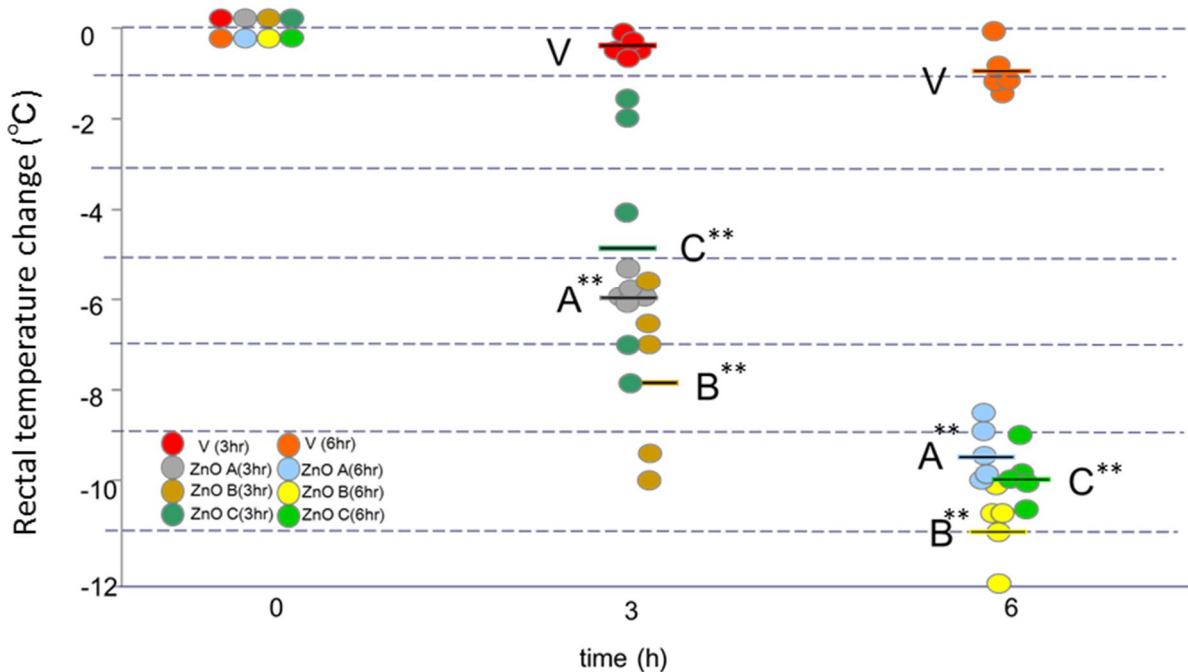


Figure A-H30-4 酸化亜鉛腹腔内投与後の体温変化(【実験5】)

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.

【実験 B5】

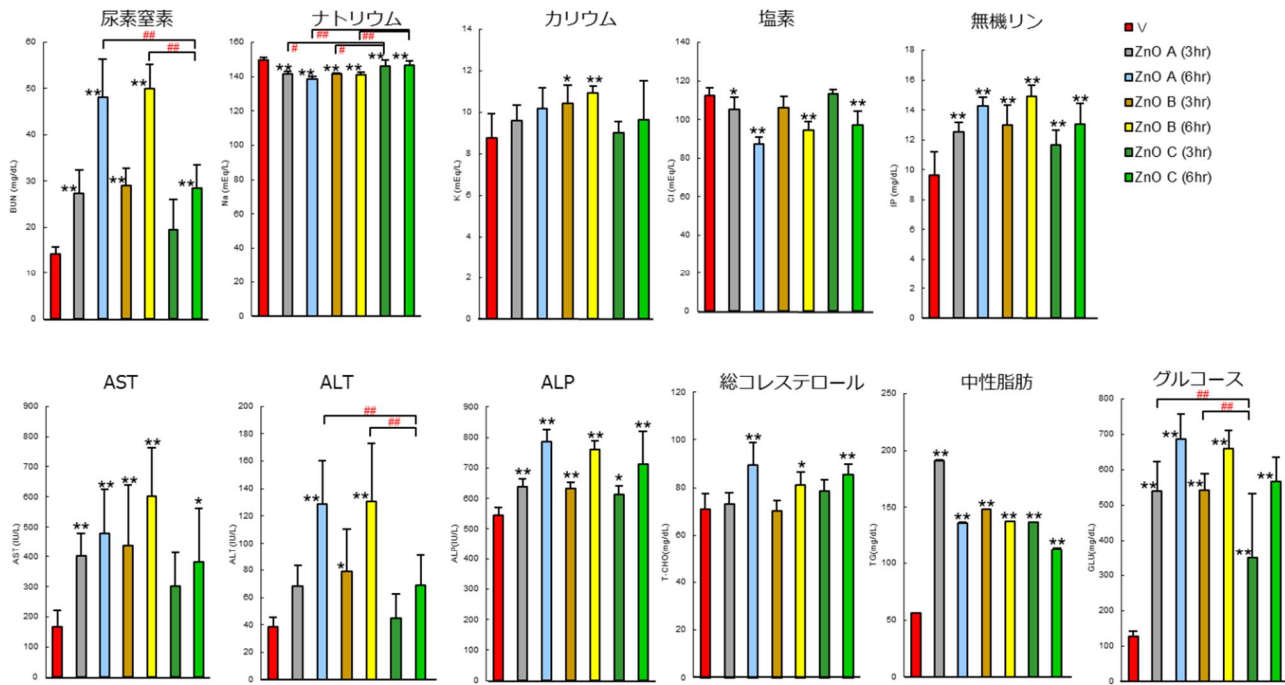


Figure A-H30-5-1 血液生化学検査の結果(【実験5】)

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.

【実験 B5】

【実験 B5】

Table A-H30-3 Histopathological findings for Balb/C mice

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

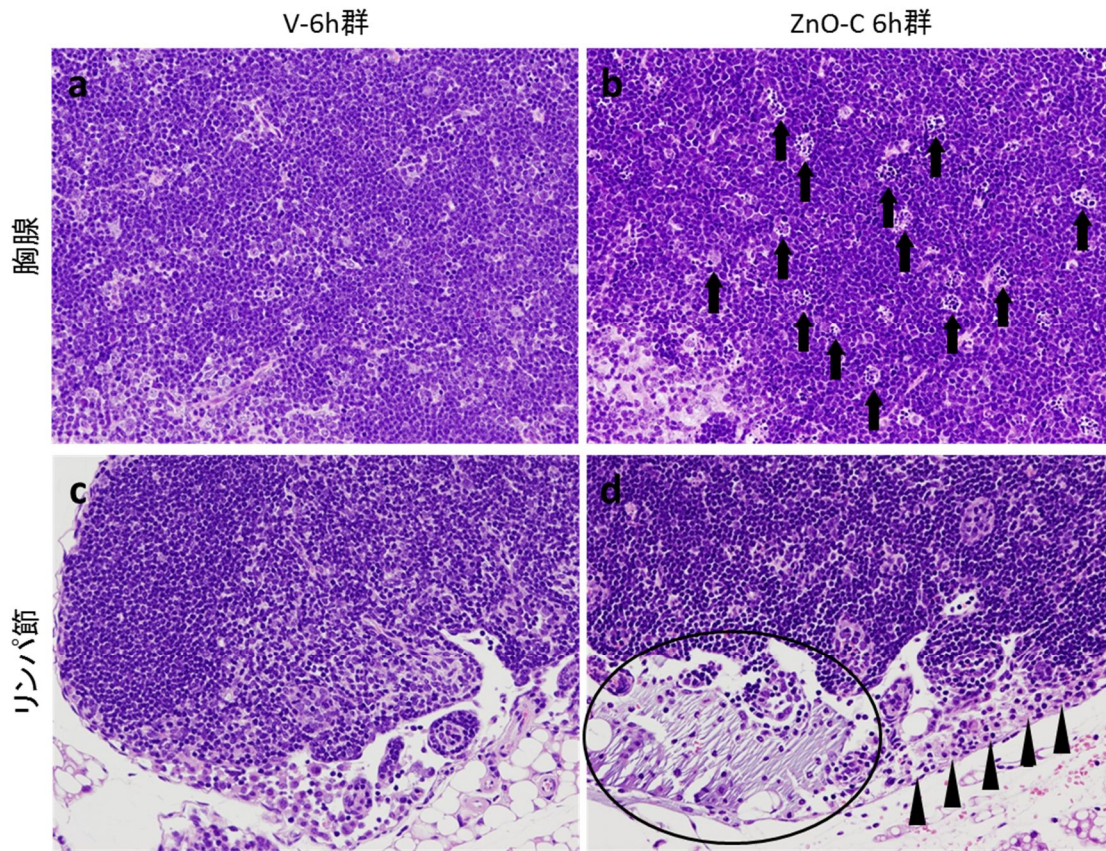
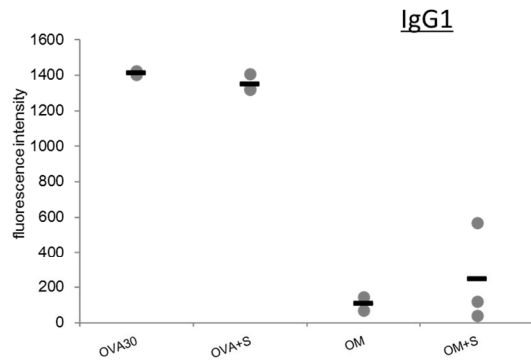
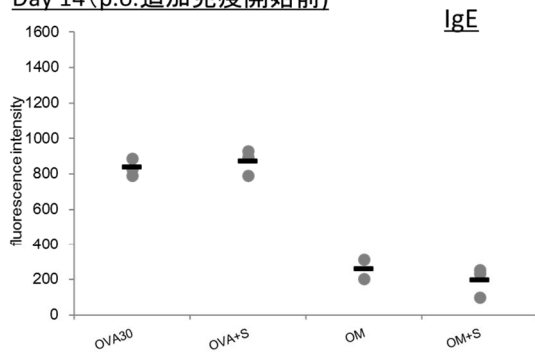


Figure A-H30-5-2 病理組織像(【実験5])

【実験 B5】

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)



Day 22 (p.o.追加免疫終了翌日)

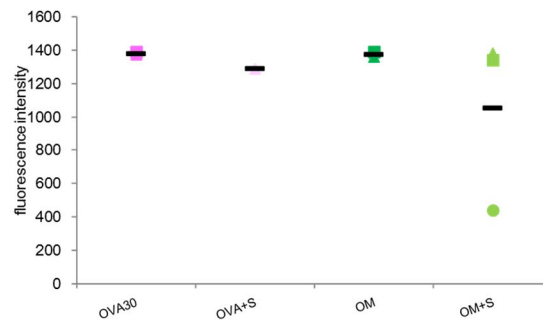
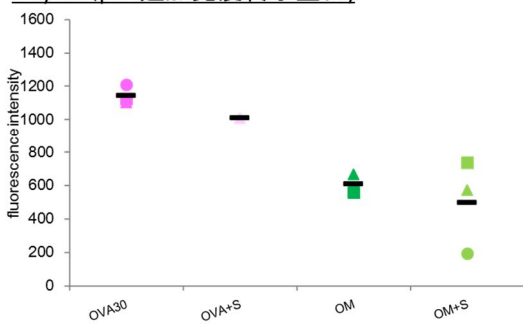
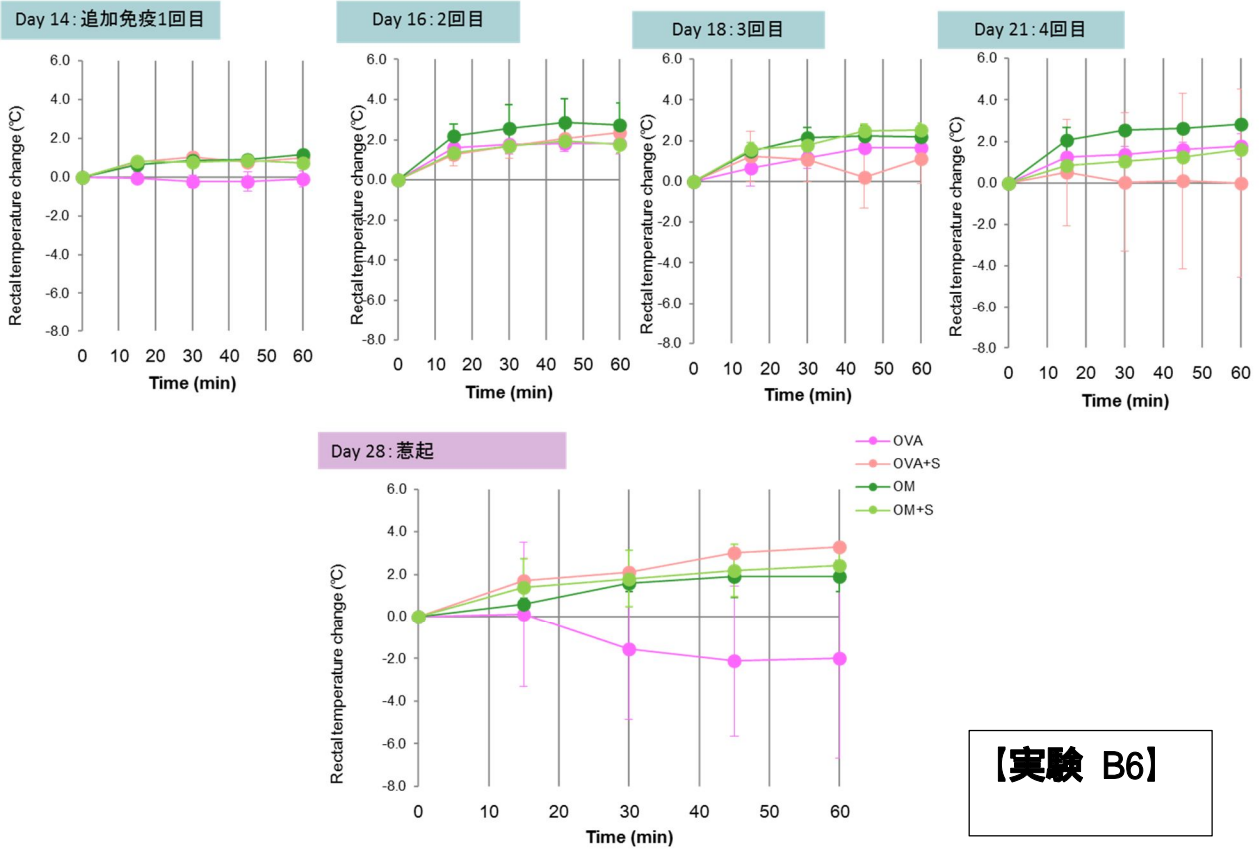


Figure A-H30-6 抗原i.p.感作及びp.o.追加免疫による抗体産生(【実験6])

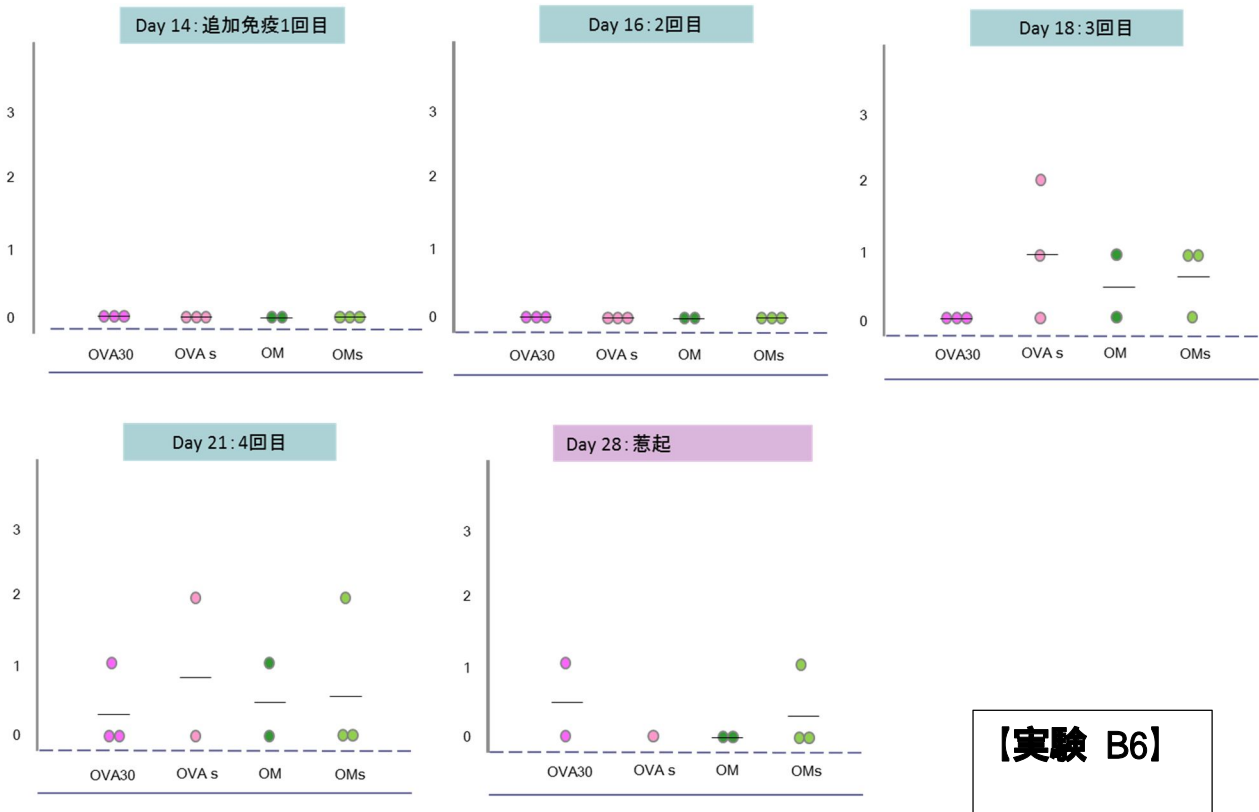
各群の処理抗原についてはTable 1に示す。ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

【実験 B6】



【実験 B6】

Figure A-H30-7 p.o.追加免疫及びp.o.惹起後1時間の体温変化(【実験6】)
各群のデータをMean±S.D.で示す。



【実験 B6】

Figure A-H30-8 p.o.追加免疫及びp.o.惹起後1時間の下病症状スコアリング(【実験6】)
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。

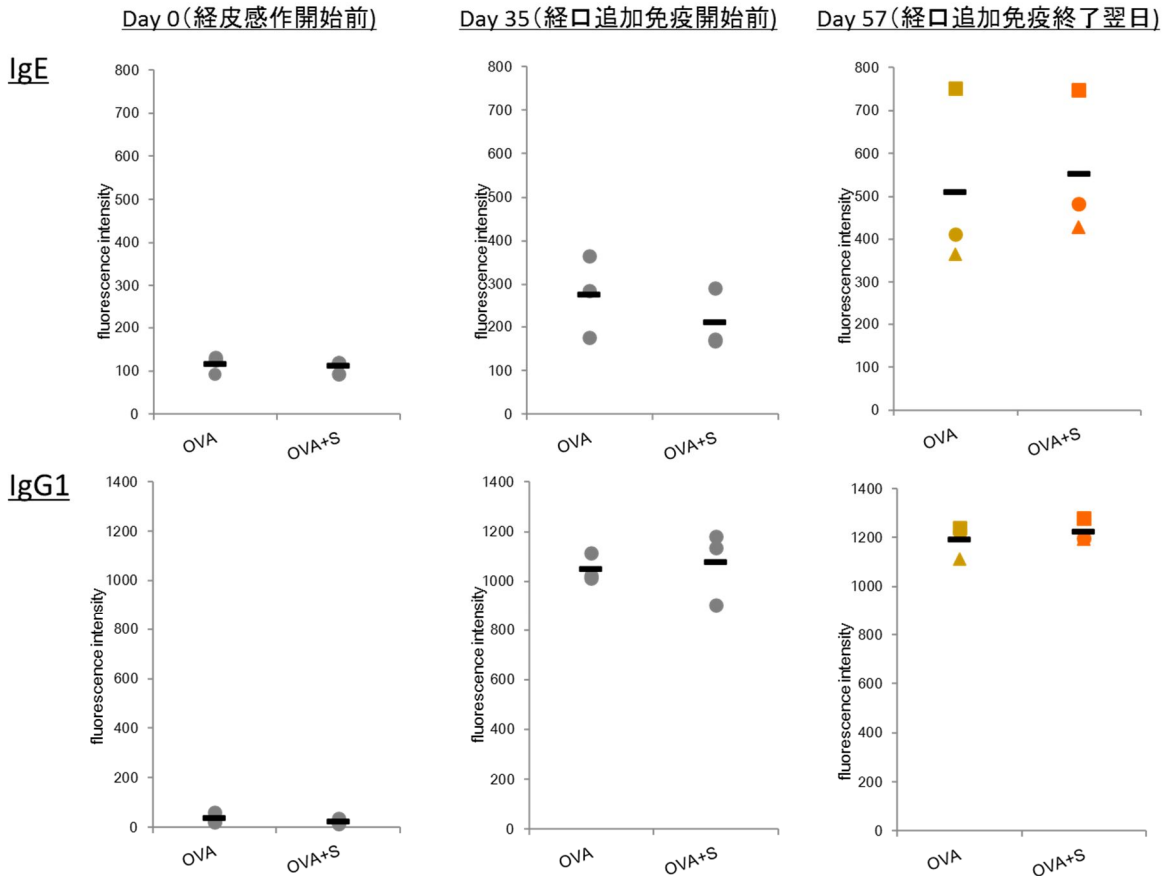


Figure A-R1-2 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生 (【実験7】) **【実験 B7】**
 ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。

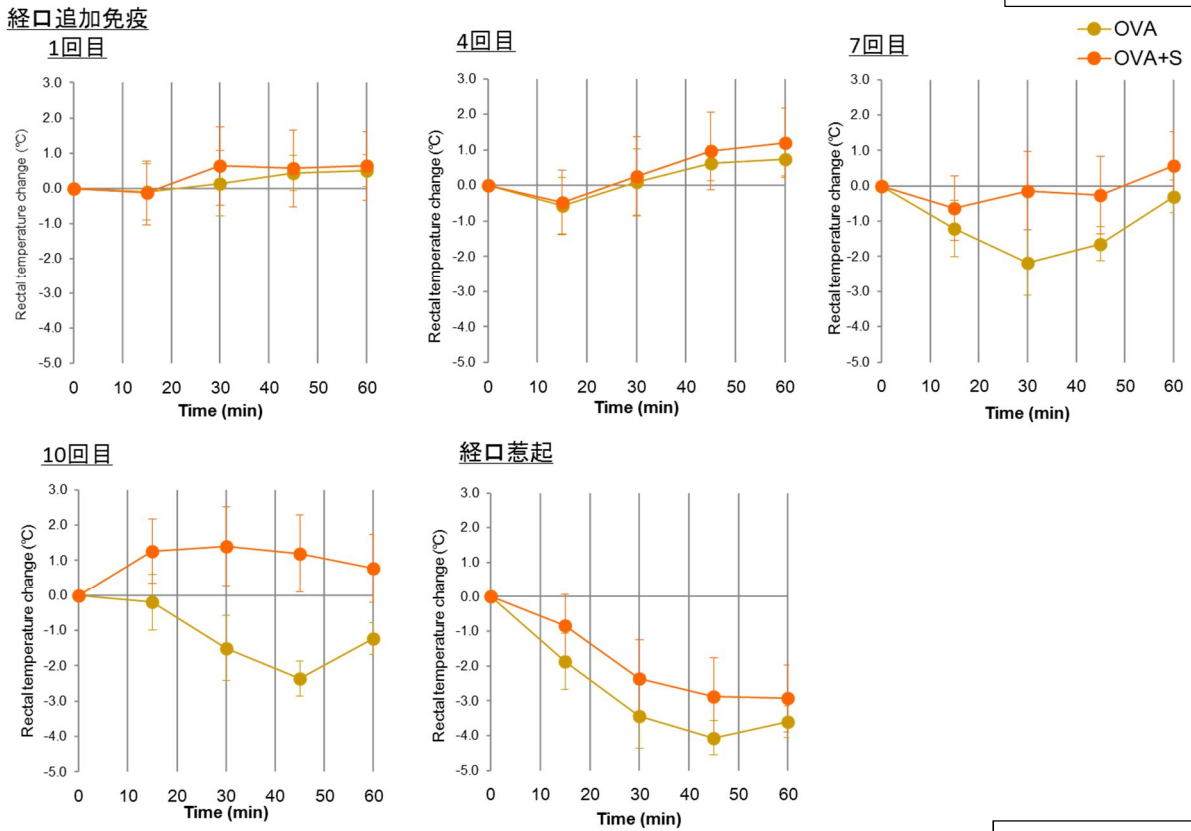
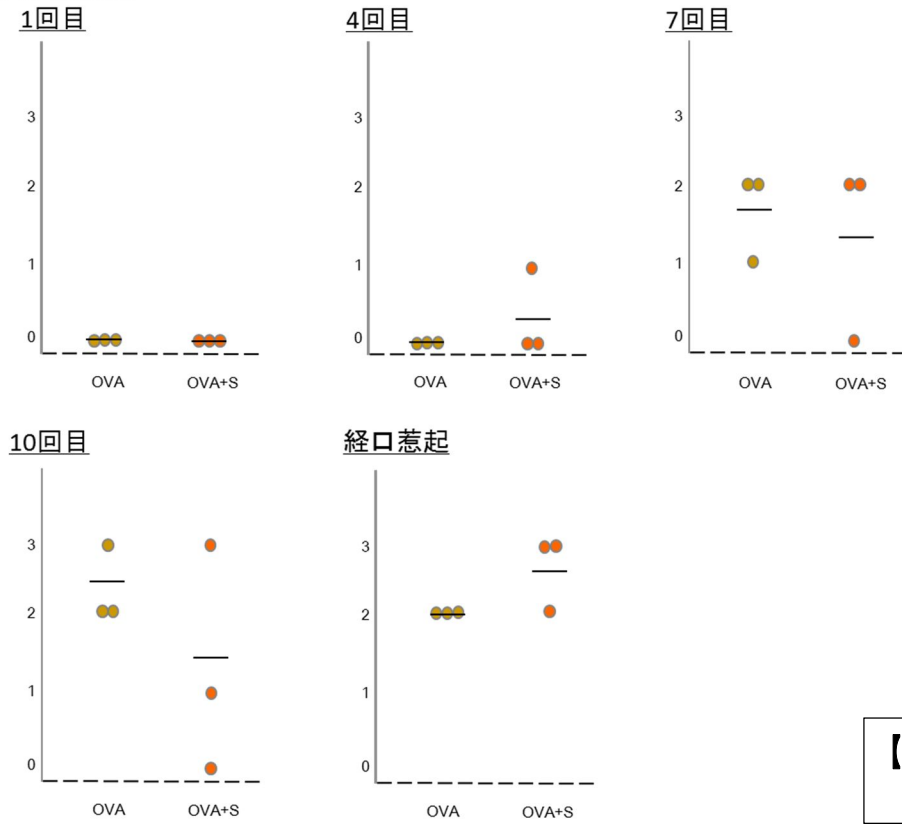


Figure A-R1-3 抗原経口投与後の体温低下 (【実験7】)

【実験 B7】

経口追加免疫



【実験 B7】

Figure A-R1-4 抗原経口投与後60分間の下痢症状スコアリング(【実験7])
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。

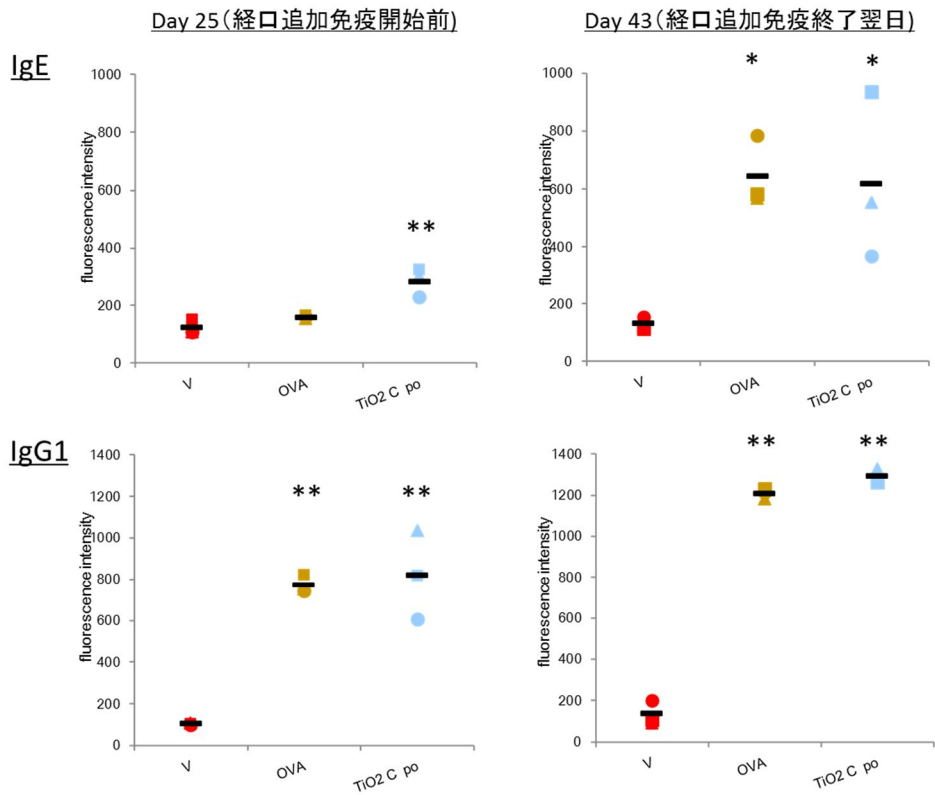
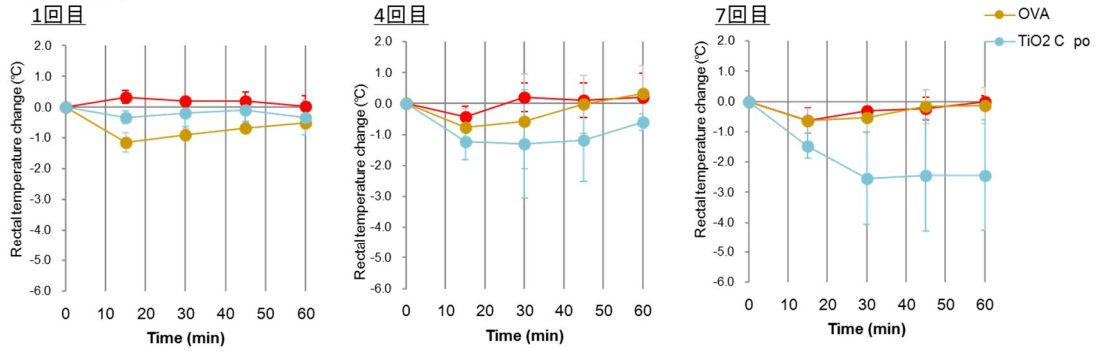


Figure A-R1-5 抗原経皮感作及び経口追加免疫による抗体産生(【実験8])
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。*p<0.05, **p<0.01 vs V group.

【実験 B8】

経口追加免疫



経口惹起

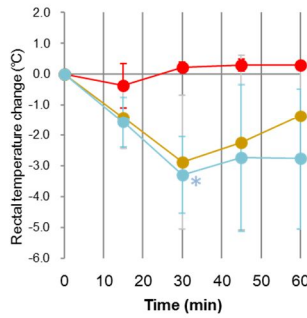
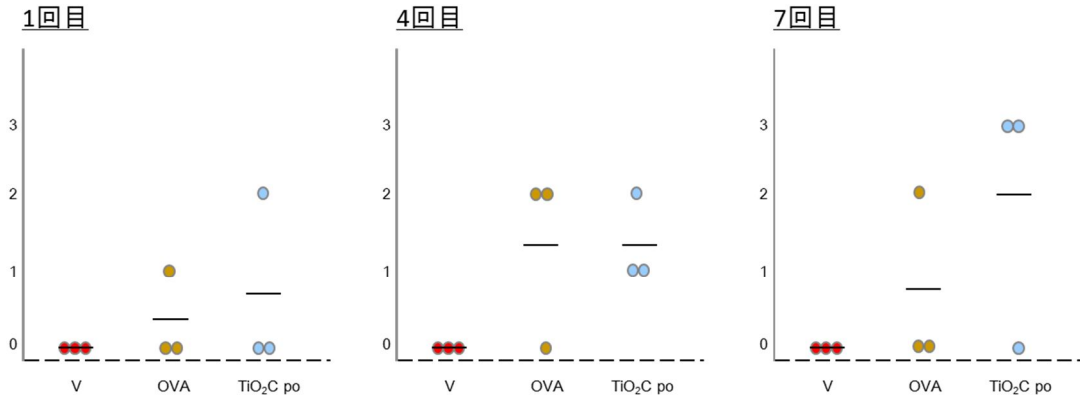


Figure A-R1-6 抗原経口投与後の体温低下(【実験8】)
* $p < 0.05$ vs V group.

【実験 B8】

経口追加免疫



経口惹起

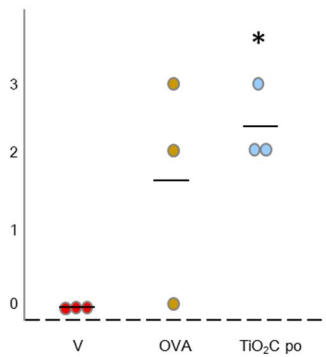


Figure A-R1-7 抗原経口投与後60分間の下病症状スコアリング(【実験8】)
ドットはマウス各個体のデータを、バーは各群の平均値を示す。* $p < 0.05$ vs V group.

【実験 B8】