

図 3. ナノシリカの皮内投与がアトピー様病態の発症・悪化に及ぼす影響-3 (投与局所における免疫応答特性の評価)

NC/Nga slc マウス (雄性 8 週齢) の耳介に、ヤケヒョウダニ抽出抗原 (Dp ; 125 μ g/ml)、シリカ (12.5 mg/ml)、Dp とシリカの混合溶液 (Dp ; 125 μ g/ml、シリカ ; 12.5 mg/ml) を 20 μ l/ear で両耳介に皮内投与した。最終投与 24 時間後に回収した耳介ホモジネートを用いて、IFN- γ 、Th2 IL-4、IL-5、IL-13 産生量 (A)、IL-18 (B)、TSLP (C) を ELISA にて定量した。Data are presented as mean \pm SE (n = 4-5; *P < 0.05 versus value for Dp-treated group by Williams' test.

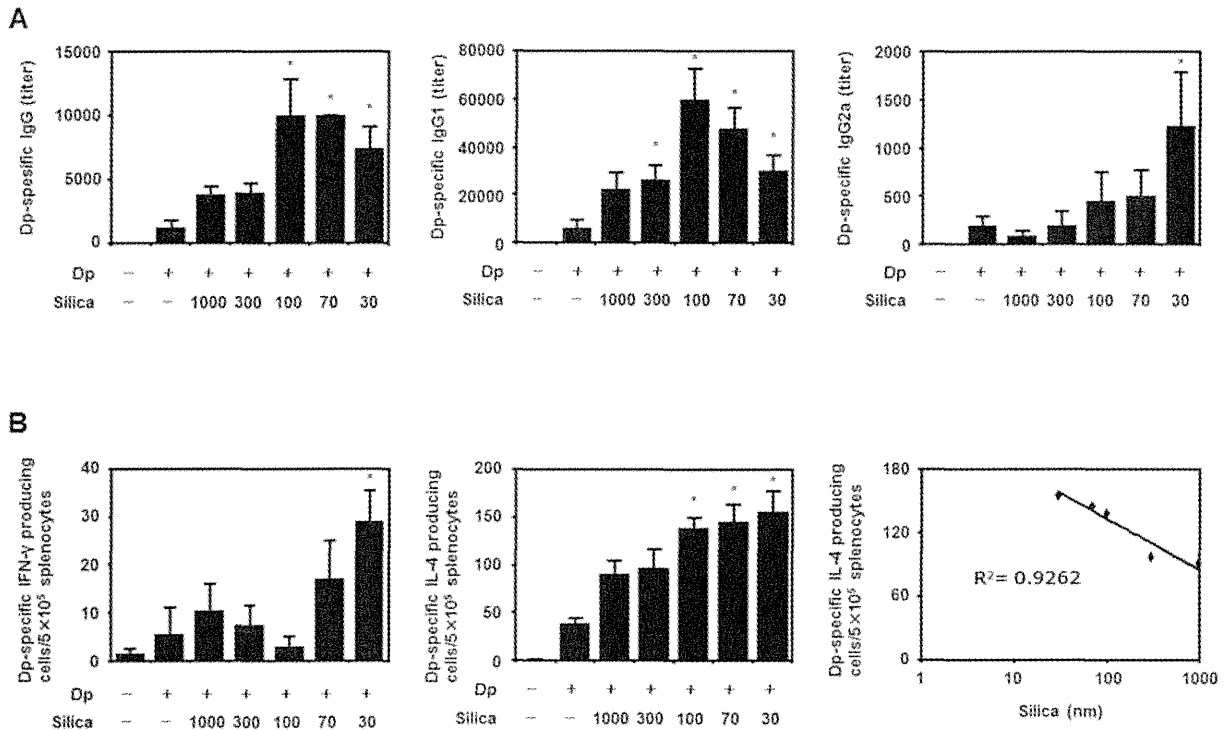


図 4. ナノシリカの皮内投与がアトピー様病態の発症・悪化に及ぼす影響-4 (抗原特異的免疫応答特性の評価)

NC/Nga slc マウス (雄性 8 週齢) の耳介に、ヤケヒョウダニ抽出抗原 (Dp ; 125 μ g/ml)、シリカ (12.5 mg/ml)、Dp とシリカの混合溶液 (Dp ; 125 μ g/ml、シリカ ; 12.5 mg/ml) を 20 μ l/ear で両耳介に皮内投与した。最終投与 24 時間後に回収した血液を用いて、Dp 特異的抗体産生 (A ; IgG、IgG1、IgG2a) を ELISA にて定量した。また、同時に回収した脾臓中の Dp 特異的 IFN- γ 産生細胞、あるいは IL-4 産生細胞を ELISPOT にて定量した (B)。Data are presented as mean \pm SE (n = 4-5; *P < 0.05 versus value for Dp-treated group by Williams' test).

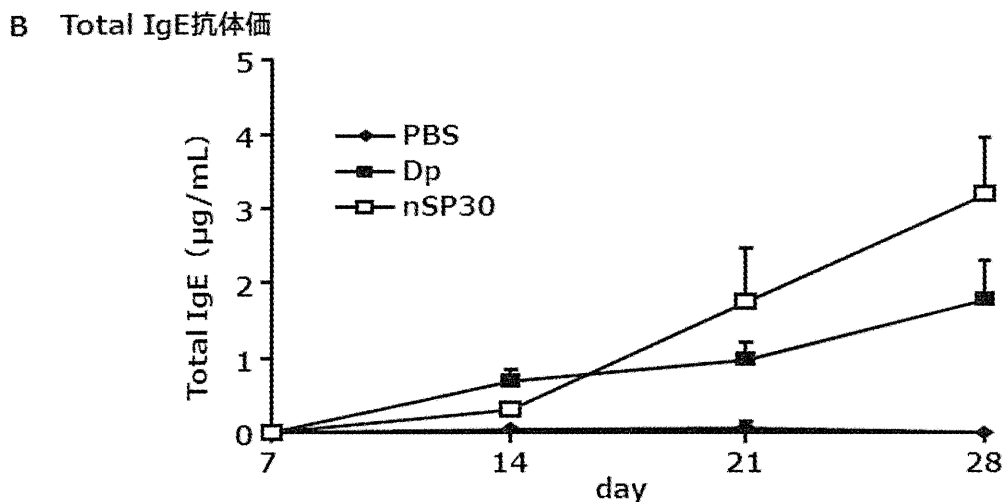
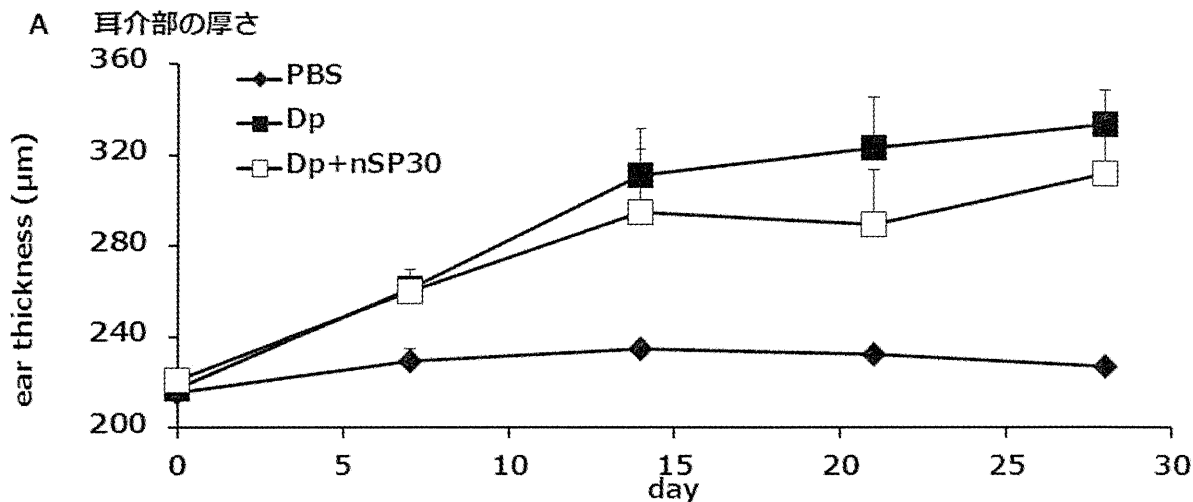
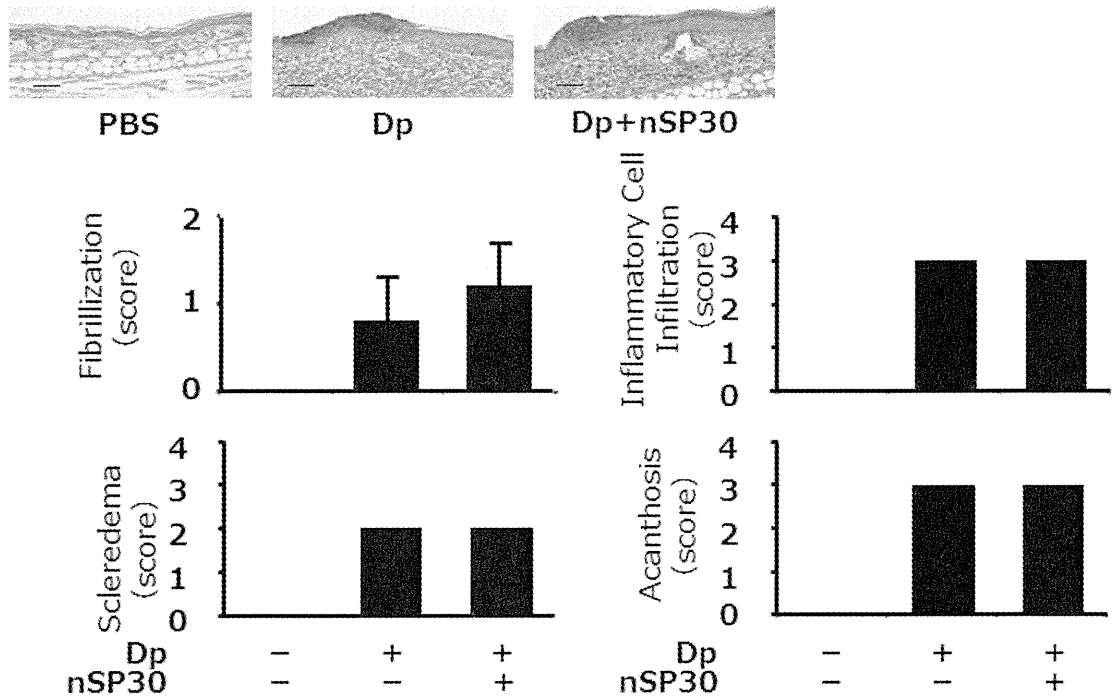


図 5. ナノシリカの経皮投与がアトピー性皮膚炎に与える影響評価

NC/Nga slc マウス（雌性 6 週齢）の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ヤケヒョウダニ抽出抗原 (Dp; 1 mg/ml)、Dp とシリカの混合溶液 (Dp; 1 mg/ml、シリカ; 12.5 mg/ml) をそれぞれ 20 μ l/ear、80 μ l/back で週 3 回、4 週間塗布した。その際、経過的に耳介部の厚さ (A)、及び total IgE の抗体価を測定した。

A ヘマトキシリン・エオジン染色



B トルイジンブルー染色

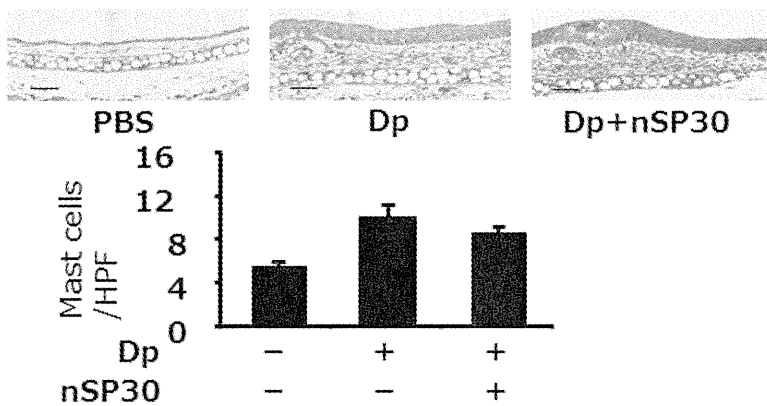
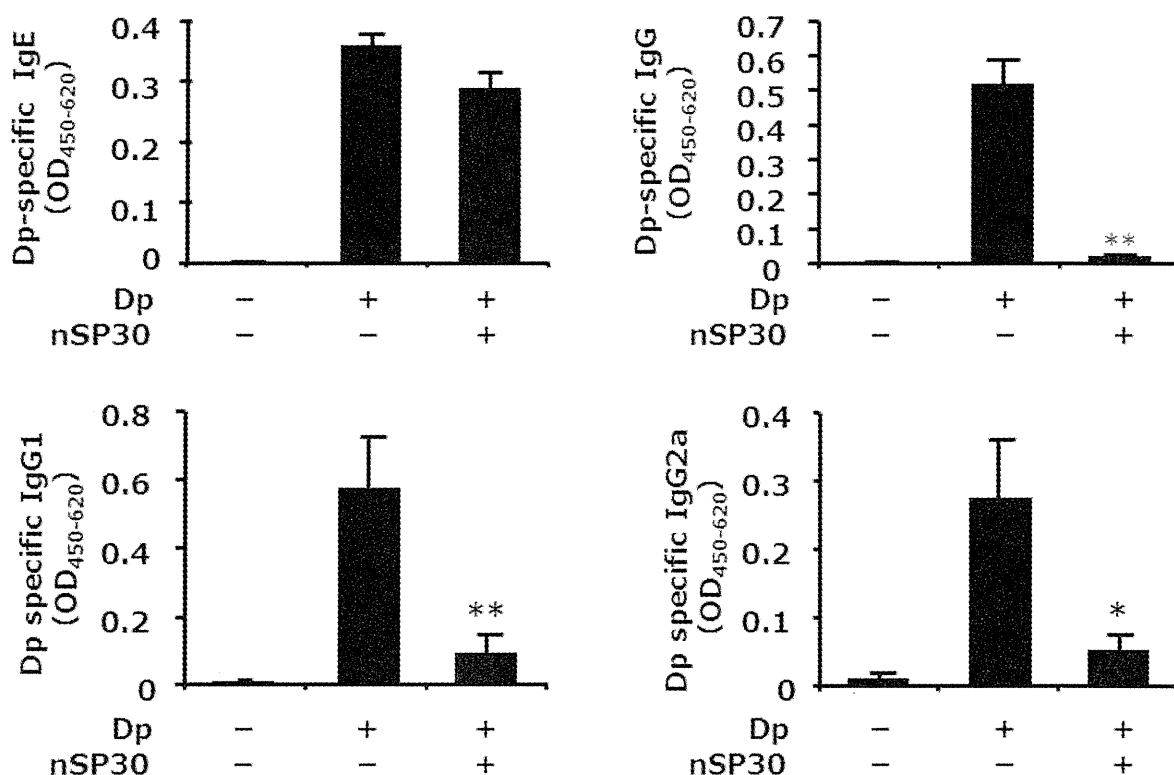


図 6. ナノシリカの経皮塗布がアトピー性皮膚炎に与える影響評価 (病理学的解析)

NC/Nga slc マウス (雌性 6 週齢) の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ヤケヒョウダニ抽出抗原 (Dp; 1 mg/ml)、Dp とシリカの混合溶液 (Dp; 1 mg/ml、シリカ; 12.5 mg/ml) をそれぞれ 20 μ l/ear、80 μ l/back で週 3 回、4 週間塗布した。最終投与から 24 時間後に解剖し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (A)、トルイジンブルー染色 (B) により耳介部の病理学的解析を実施した。

A 抗原特異的抗体価



B 抗原特異的IgG (力価)

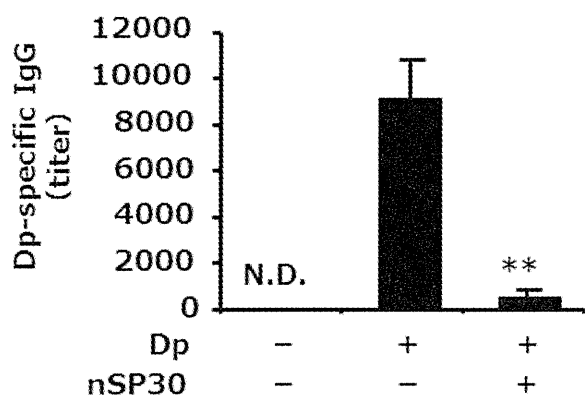
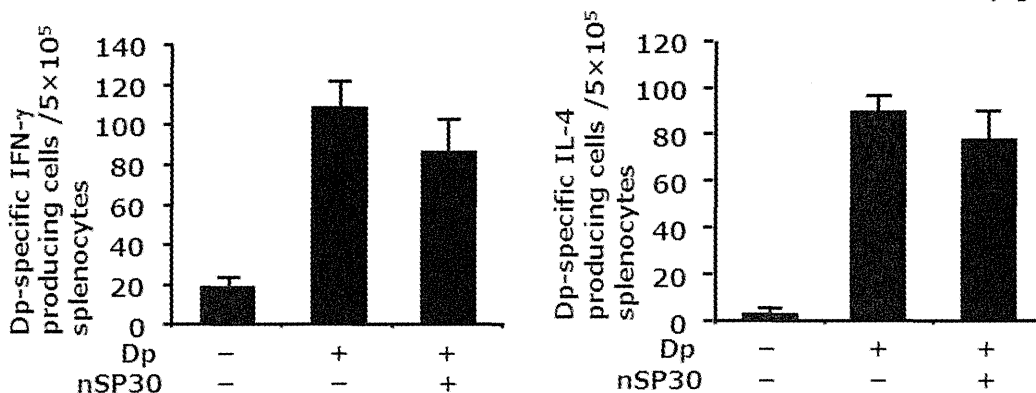


図 7. ナノシリカの経皮塗布が経皮抗原感作に与える影響評価

NC/Nga slc マウス (雌性 6 週齢) の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ヤケヒョウダニ抽出抗原 (Dp; 1 mg/ml)、Dp とシリカの混合溶液 (Dp; 1 mg/ml、シリカ; 12.5 mg/ml) をそれぞれ 20 μ l/ear、80 μ l/back で週 3 回、4 週間塗布した。最終投与から 24 時間後に解剖し、血中の抗原特異的抗体価を測定した (A)。さらに、脾臓中の抗原特異的 IFN- γ 、IL-4 産生細胞数を測定した (B)。Data are presented as mean \pm SE (**p < 0.01 *P < 0.05 vs. Dp alone group by Dunnett's test)

A 抗原特異的サイトカイン産生細胞数

**P<0.01
*P<0.05 vs. Dp group



B 抗原特異的サイトカイン産生T細胞頻度

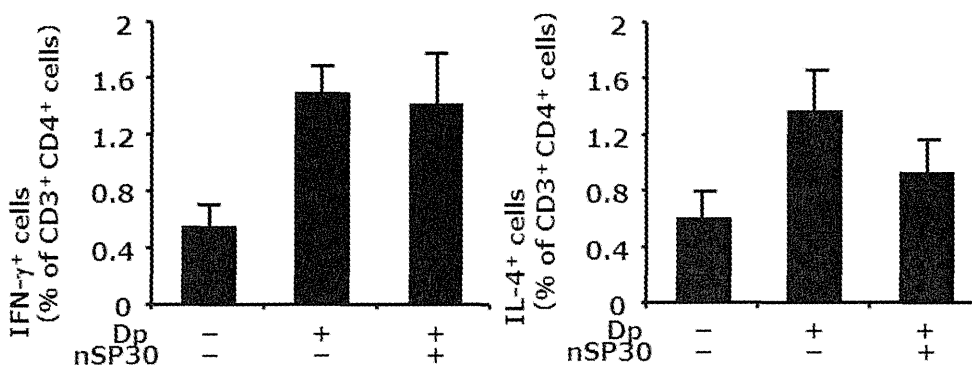


図 8. ナノシリカの経皮塗布が経皮抗原感作に与える影響評価 (抗体産生評価)

NC/Nga slc マウス (雌性 6 週齢) の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ヤケヒョウダニ抽出抗原 (Dp; 1 mg/ml)、Dp とシリカの混合溶液 (Dp; 1 mg/ml、シリカ; 12.5 mg/ml) をそれぞれ 20 μ l/ear、80 μ l/back で週 3 回、4 週間塗布した。最終投与から 24 時間後に解剖して脾臓細胞を回収し、Dp (100 μ g/mL)により再刺激した。24 時間後、脾臓中の抗原特異的 IFN- γ 、IL-4 産生細胞数を ELISPOT により (A)、脾臓中の抗原特異的 IFN- γ 、IL-4 産生 T 細胞の割合を FCM により (B) 測定した。

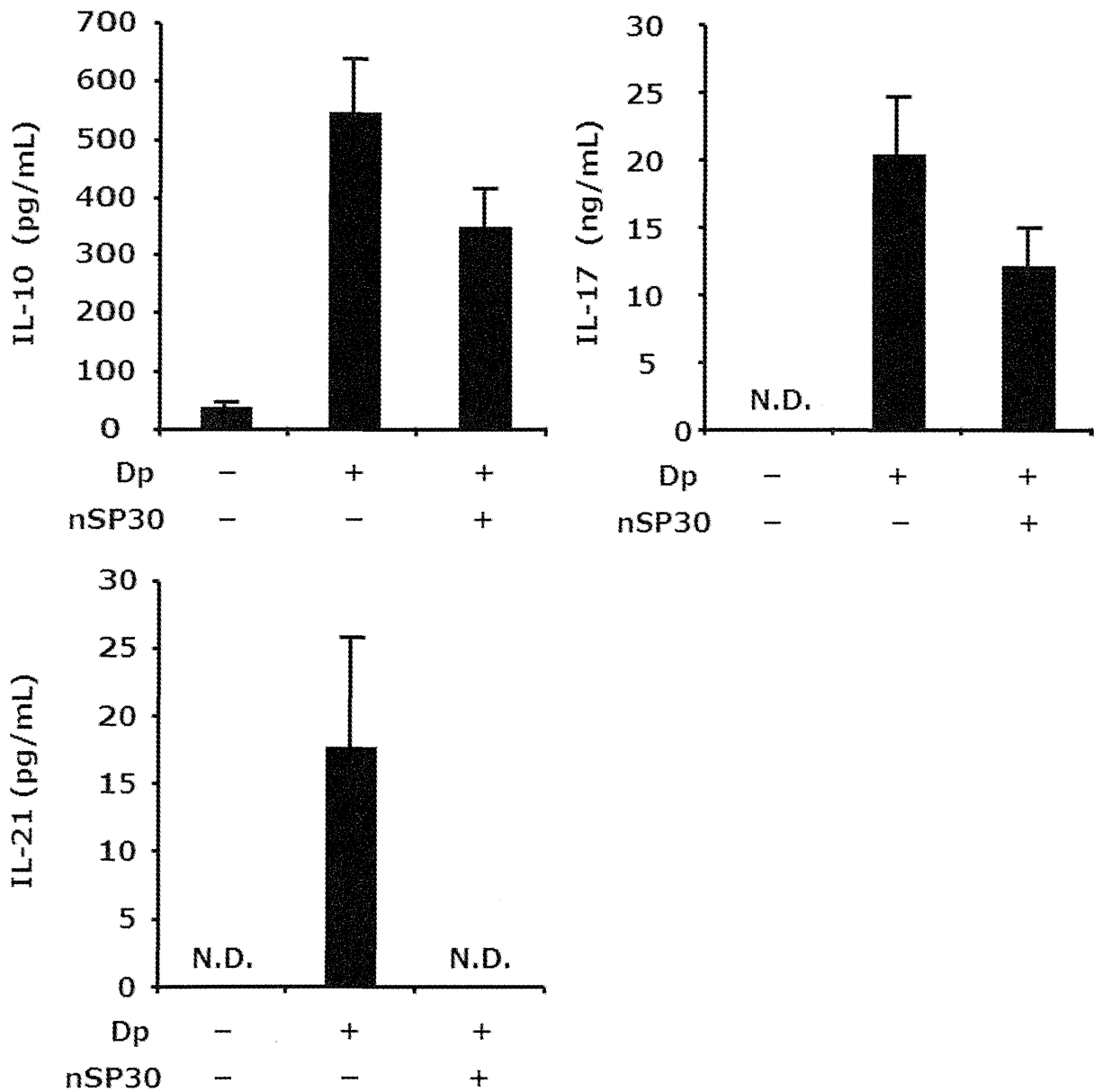


図9. ナノシリカの経皮投与が経皮抗原感作に与える影響評価（サイトカイン産生評価）

NC/Nga slc マウス（雌性 6 週齢）の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ヤケヒョウダニ抽出抗原（Dp；1 mg/ml）、Dp とシリカの混合溶液（Dp；1 mg/ml、シリカ；12.5 mg/ml）をそれぞれ 20 μ l/ear、80 μ l/back で週 3 回、4 週間塗布した。最終投与から 24 時間後に解剖して脾臓細胞を回収し、Dp（100 μ g/mL）により再刺激した。72 時間後に培養上清を回収し、培養上清中の各サイトカイン産生量を測定した。

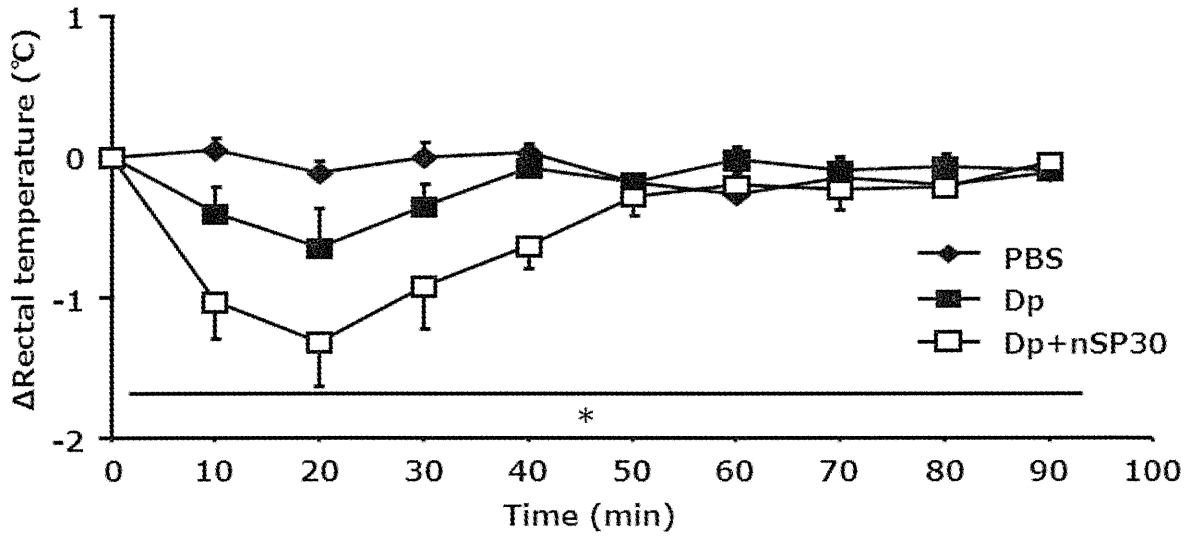


図 10. ナノシリカの経皮投与が経皮抗原感作に与える影響評価（アナフィラキシー応答）

NC/Nga slc マウス（雌性 6 週齢）の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ヤケヒョウダニ抽出抗原（Dp；1 mg/ml）、Dp とシリカの混合溶液（Dp；1 mg/ml、シリカ；12.5 mg/ml）をそれぞれ 20 μ l/ear、80 μ l/back で週 3 回、4 週間塗布した。最終投与から 7 日後に、Dp（15 μ g/mouse）を尾静脈内投与し、経時的な体温変化を指標としたアナフィラキシー試験を実施した。Data are presented as mean \pm SE (* p < 0.05 vs. Dp alone group by Dunnett's test)

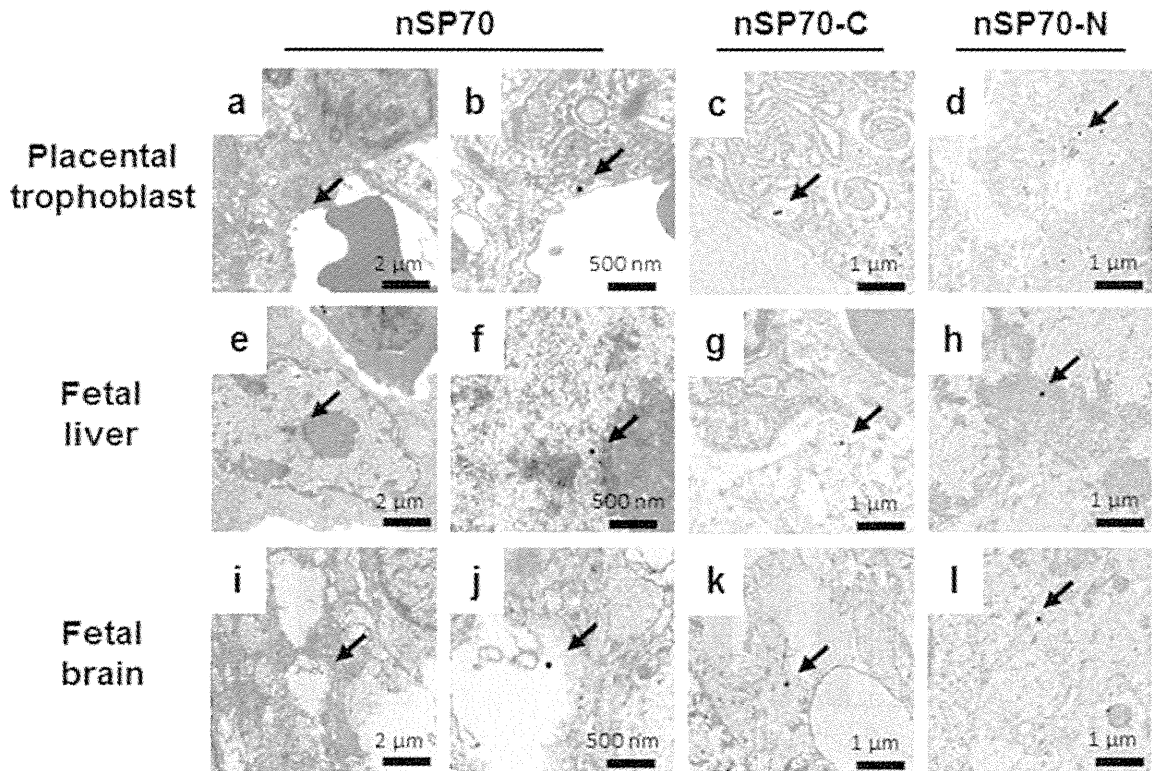


図 11. 非晶質シリカの体内動態評価.

妊娠 16 日目の BALB/c マウスに nSP70 (a, b, e, f, i, j)、nSP70-C (c, g, k) および nSP70-N (d, h, l) を、0.8 mg/匹で尾静脈内より 2 日間連続で投与した。最終投与から 24 時間後に胎盤 (a-d)、胎仔肝臓 (e-h)、胎仔脳 (i-l) を回収した。これら組織から超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡により各種ナノマテリアルの局在を解析した。

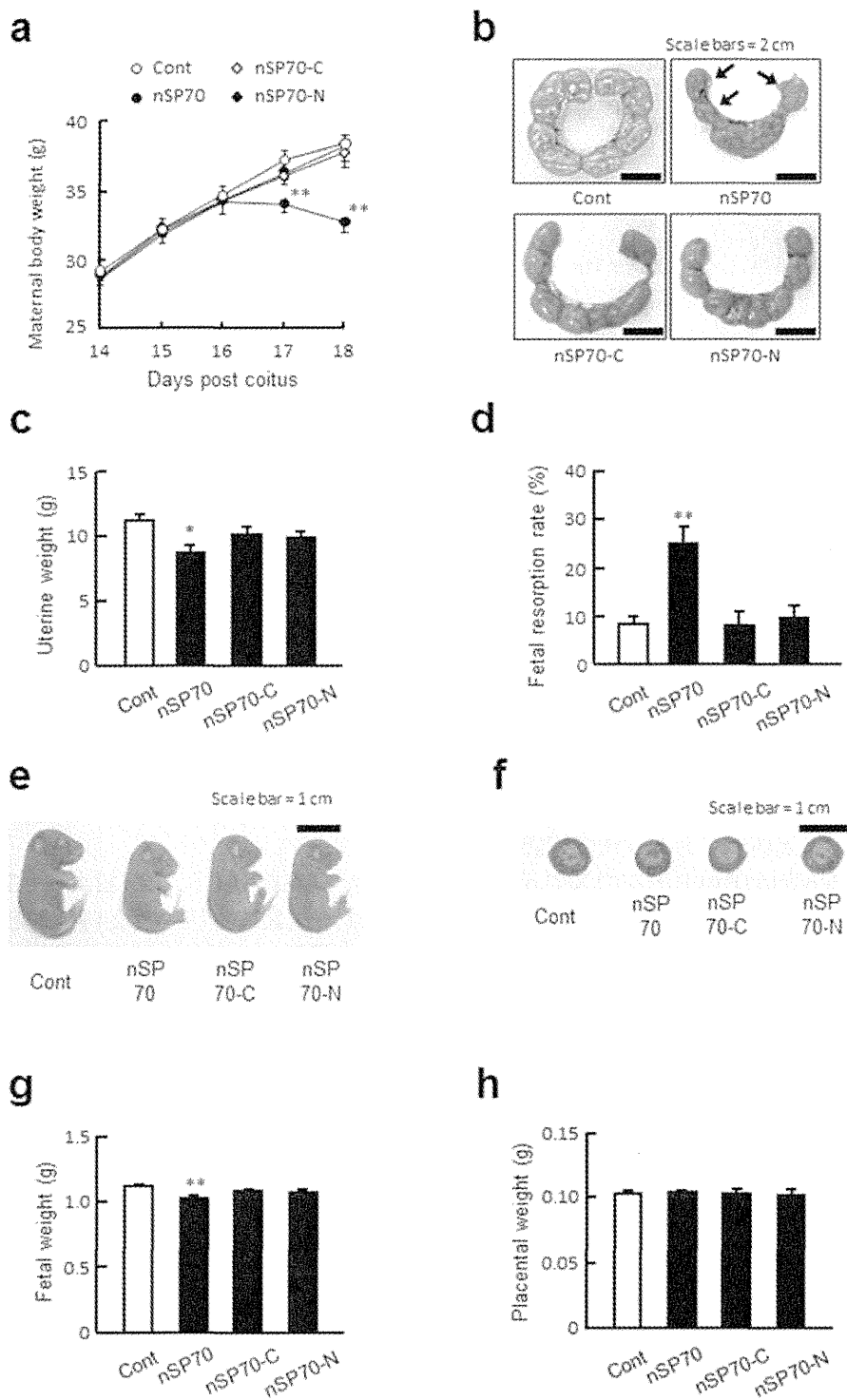


図 12. 表面修飾による胎仔毒性の回避。

妊娠 16 日目の BALB/c マウスに nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 0.8 mg/匹で尾静脈内より 2 日間連続で投与した。母体体重は妊娠 14 日目より経日的に測定した (a)。最終投与から 24 時間後に子宮 (b)・胎仔 (e)・胎盤 (f) を回収し、子宮重量 (c)、胎仔吸収率 (d)、胎仔重量 (g)、胎盤重量 (h) を測定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus value for control by ANOVA

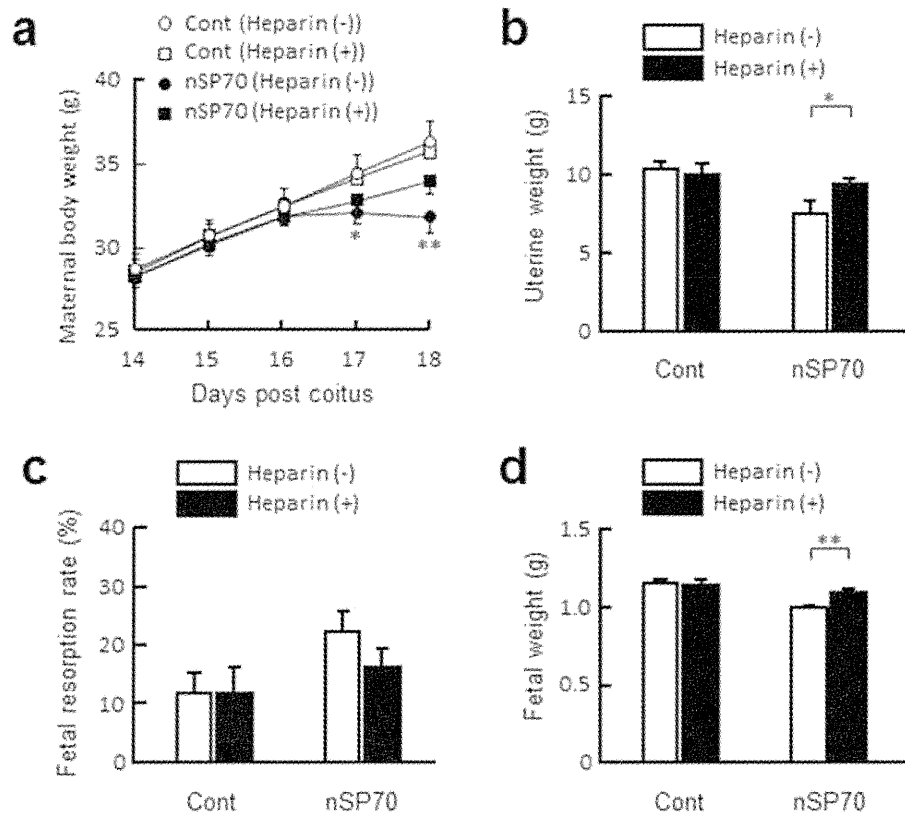


図 13. ヘパリン投与による胎仔毒性への影響評価。

妊娠 16 日目の BALB/c マウスに nSP70 を 0.8 mg/匹で尾静脈内より 2 日間連続で投与した。また、nSP70 投与前後 3 時間にヘパリンを 10 IU/匹で腹腔内投与した。母体体重は経日的に測定した (a)。最終投与から 24 時間後に子宮を回収し、子宮重量 (b)、胎仔吸収率 (c)、胎仔重量 (d) を測定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by Student's *t*-tests (b,d) and ANOVA (a)

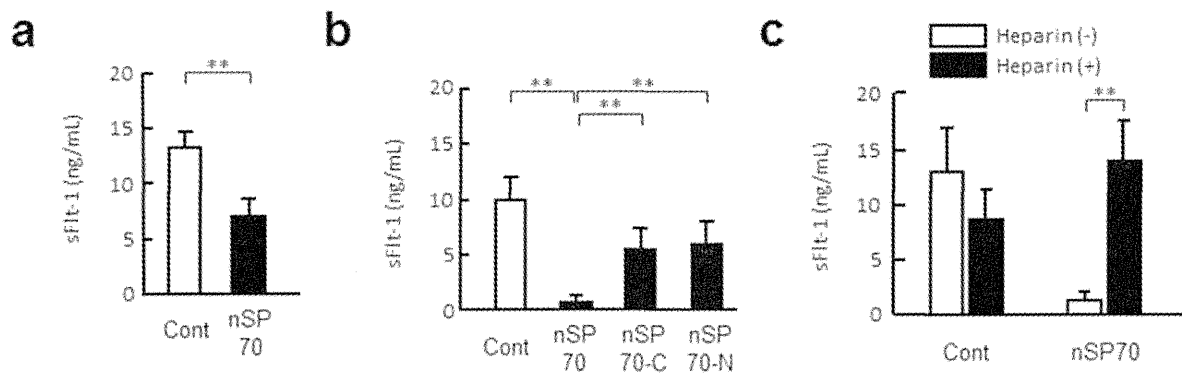


図 14. ナノマテリアル投与による血漿中 sFlt-1 量の変化.

妊娠 16 日目の BALB/c マウスに nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 0.8 mg/匹で尾静脈内より 2 日間連続で投与した。また、nSP70 投与前後 3 時間にヘパリンを 10 IU/匹で腹腔内投与した。最終投与から 24 時間後に心臓より血液を回収し、sFlt-1 濃度を ELISA により測定した。** $P < 0.01$ by Student's *t*-tests (a,c) and ANOVA (b)

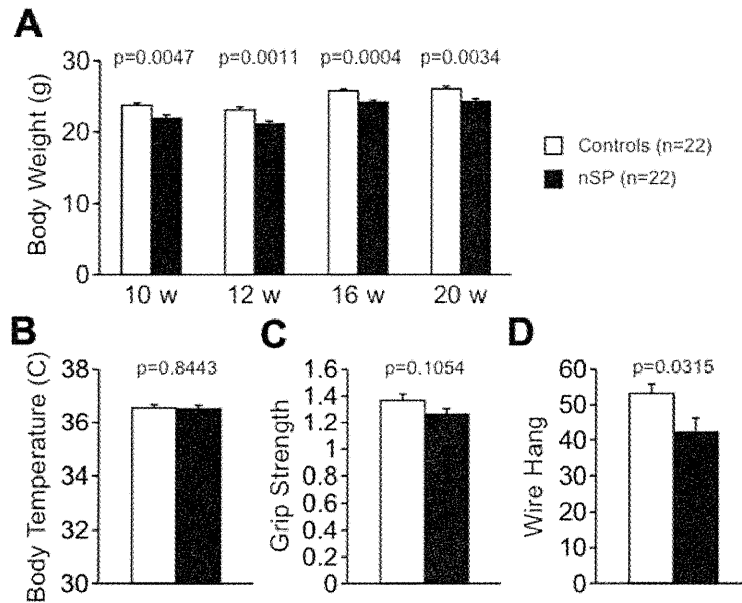


図 15 一般的健康状態および神経学的スクリーニング。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔が10、12、16、20週齢時に体重 (A) を、また10週齢時には直腸温 (B)、握力 (C)、筋力 (D) を測定した。nSPに暴露された経験がある仔は、成長後の体重が有意に減少し、筋力が有意に低下していた。

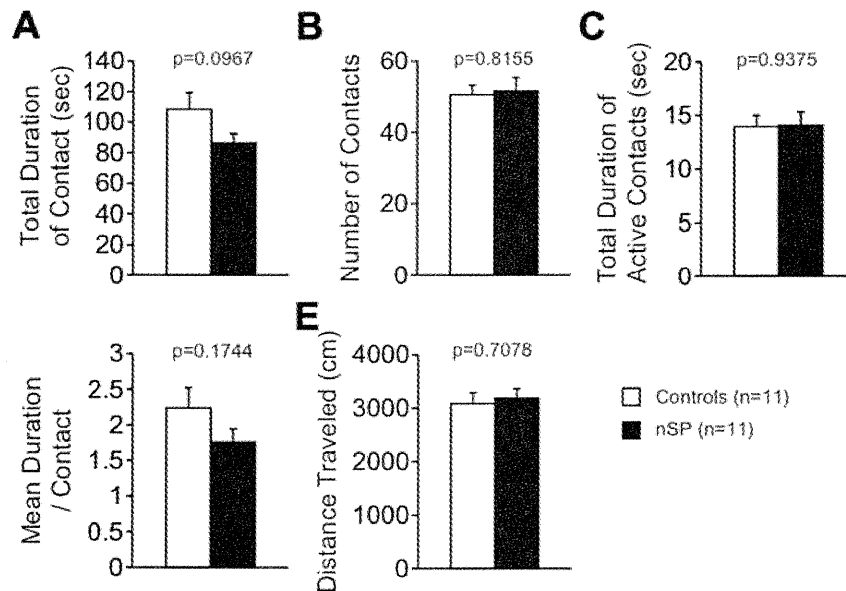


図 16 新奇環境場面における社会的行動の低下。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、別ケージで飼育され同群に割り当てられた同程度の体重の他個体と新奇環境場面で接触させ、その時に示した社会的行動 (A: 総接触時間 (秒)、B: 総接触頻度、C: 1回の接触における平均接触時間 (秒)、D: 活発な活動に基づく総接触時間 (秒)、E: 総移動距離 (cm)) を10分間記録した。nSPに暴露された経験がある仔は、統計的に有意ではなかったが、成長後の新奇環境場面における社会的行動が低下していた。

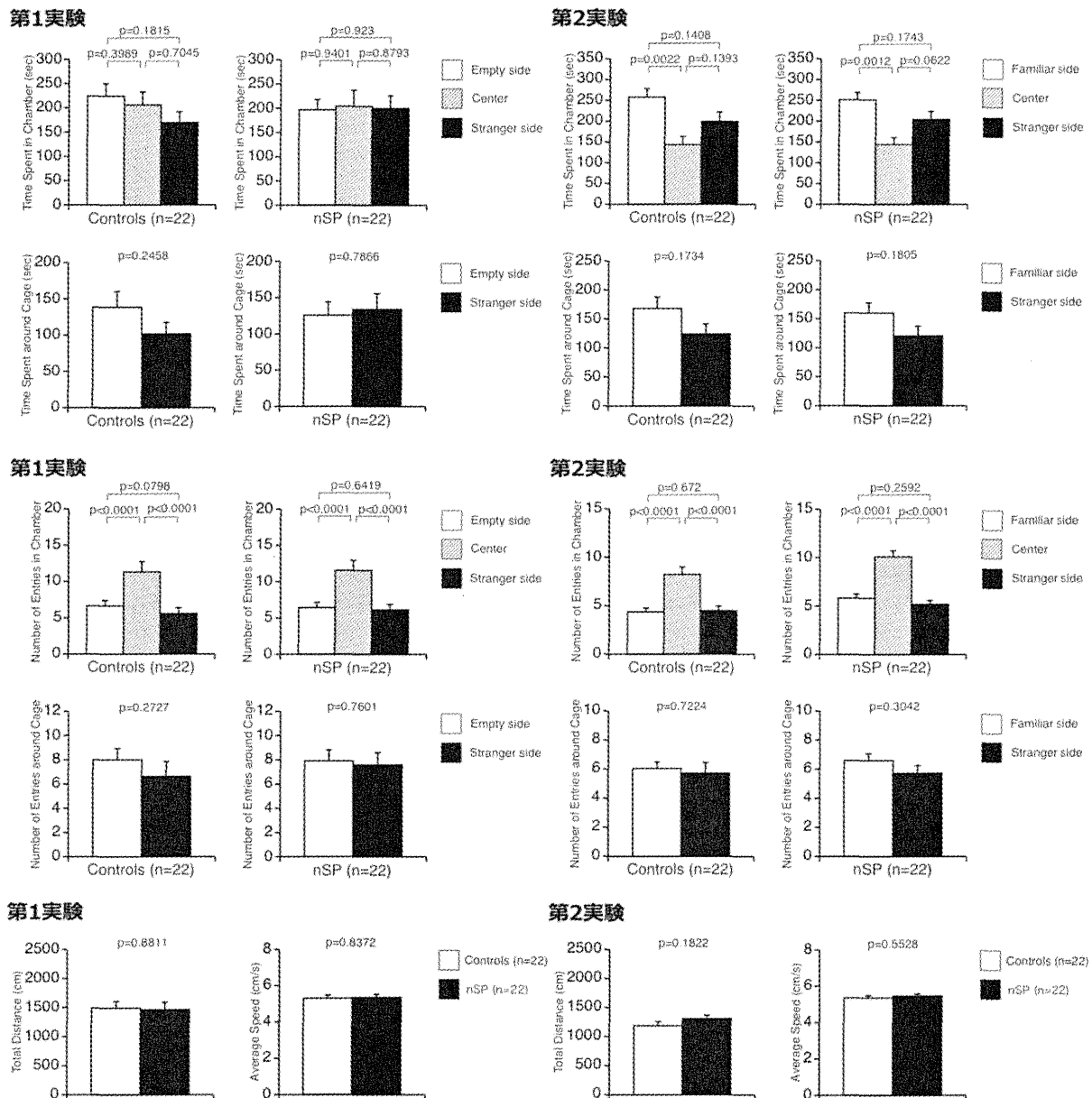


図 17 社会的な新奇刺激に対する選好性。 生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、縦に連なった3つの部屋から構成される装置中央の部屋に入れ、10分間行動を記録した。この時、両側の部屋の一つには空のカゴを、もう一つにはC57BL/6J系雄マウスが入ったカゴを置いた（第1実験）。終了後、被験体を装置から取り出し、空のカゴには新しいC57BL/6J系雄マウスを入れ、先程から置いていたC57BL/6J系雄マウスが入ったカゴはそのままにした。再び被験体を装置中央の部屋に入れ、10分間行動を記録した（第2実験）。第1および第2実験で新奇なあるいは見慣れた個体がいる部屋あるいはカゴの近接領域に滞在した時間（秒）および進入した頻度、ならびに移動距離（cm）、平均移動速度（cm/秒）を測定し、社会的な新奇刺激に対する選好性を評価したが、nSP暴露による影響は認められなかった。

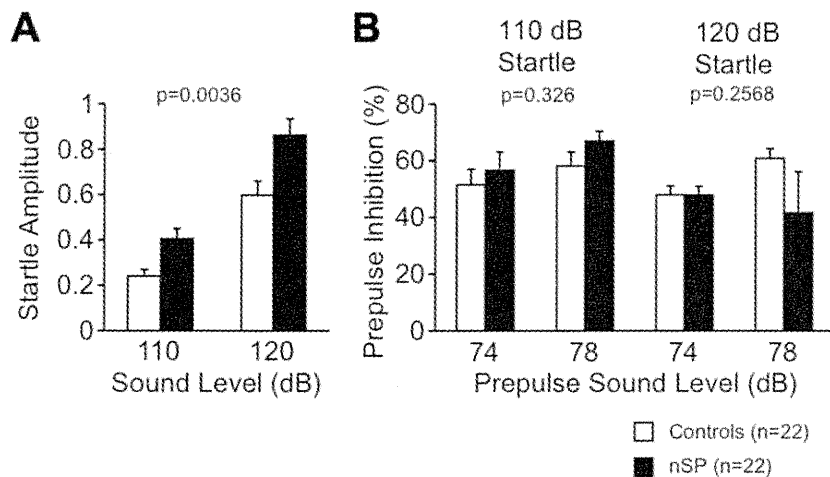


図 18 聴覚性驚愕反応の亢進。 生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔が成体期に、大きな音（110dBおよび120dB）に対して示す驚愕反応（A）を測定した。同時に、大きな音の前に少しだけ小さな音（74dBあるいは78dB）を提示し、直前の小さな音によって大きな音に対する驚愕反応が抑制される現象であるプレパルス抑制（率）を調べた（B）。nSPに暴露された経験がある仔は、成長後の聴覚性驚愕反応が有意に亢進していた。

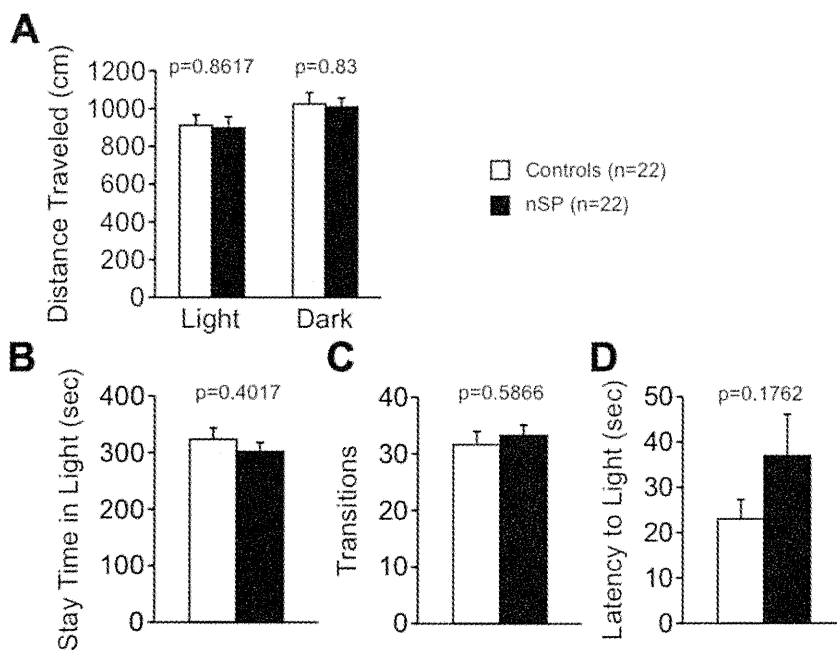


図 19 明暗選択箱における不安様行動。 生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、明るい箱と暗い箱から構成される装置のうち暗い方の箱に入れ、10分間行動を記録した。その際に示した総移動距離（cm）（A）、明るい箱での滞在時間（秒）（B）、2部屋間の往来回数（C）、暗い箱から明るい箱に入るまでの潜時（秒）（D）を不安様行動の指標として解析した。nSP暴露による成長後の不安様行動への影響は認められなかった。

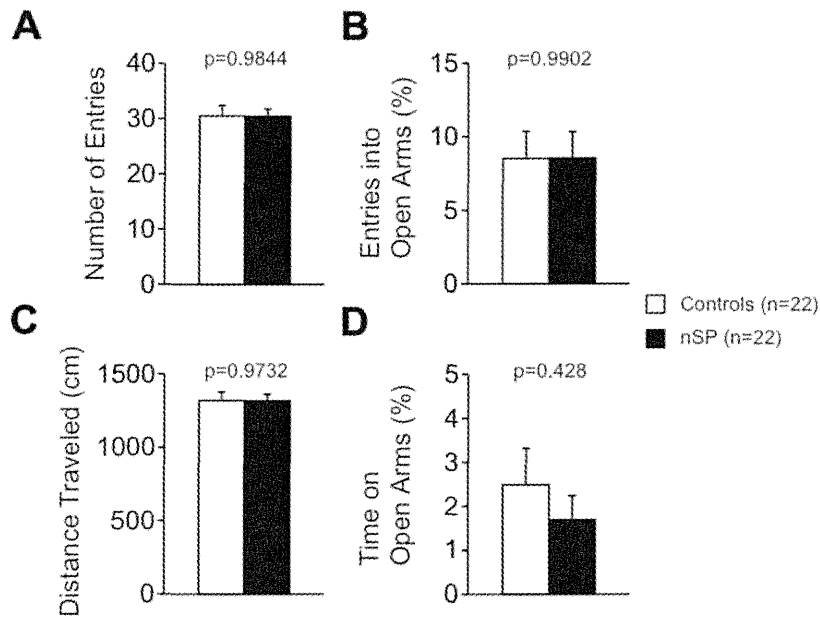


図 20 高架式十字迷路における不安様行動. 生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、壁のある2本のクローズドアームと壁のない2本のオープンアームから構成される高架式十字迷路装置の中央に置いた。被験体が10分間に示したアームへの総進入回数 (A)、アームへの総進入回数におけるオープンアームへの進入回数の割合 (B)、アームでの全滞在時間におけるオープンアームに滞在した時間の割合 (C)、総移動距離 (cm) (D) を不安様行動として解析した。nSP暴露による成長後の不安様行動への影響は認められなかった。

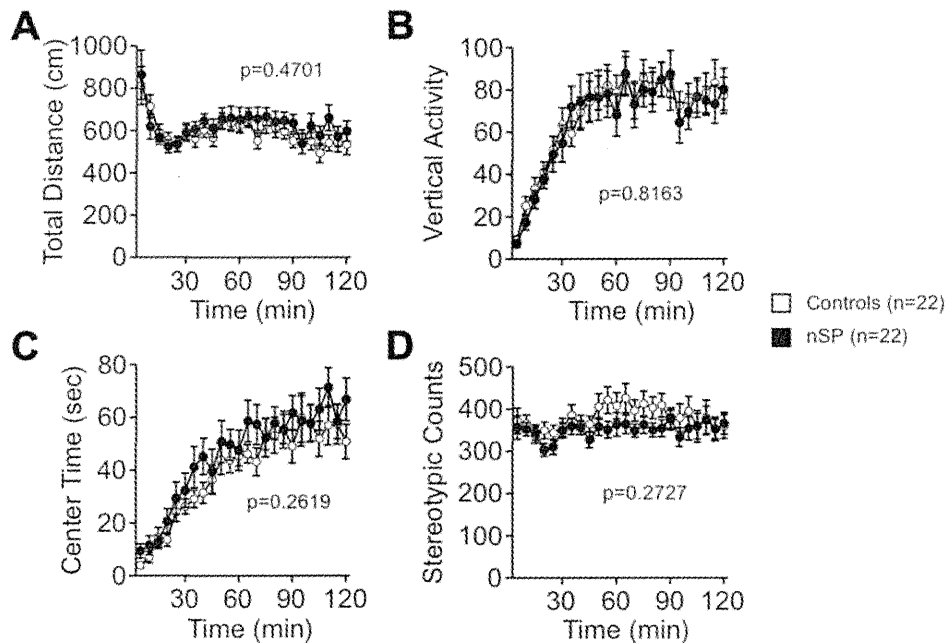


図 21 オープンフィールド活動性および情動性. 生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、オープンフィールド装置に入れ、活動性・情動性の指標として2時間にわたる総移動距離 (cm) (A)、立ち上がり回数 (B)、中央区画での滞在時間 (秒) (C)、常同的行動の回数 (D) を解析した。nSP暴露による成長後の活動性および情動性への影響は認められなかった。

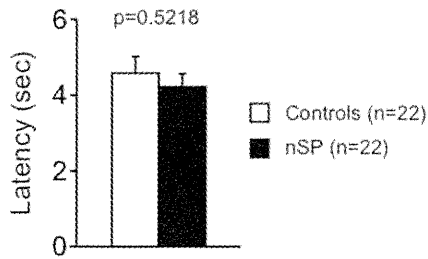


図 22 痛覚感受性。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、55℃に熱したホットプレート装置に乗せ、熱さに対する逃避行動を示すまでの潜時（秒）(A) から痛覚感受性を評価したが、nSP暴露による痛覚感受性への影響は認められなかった。

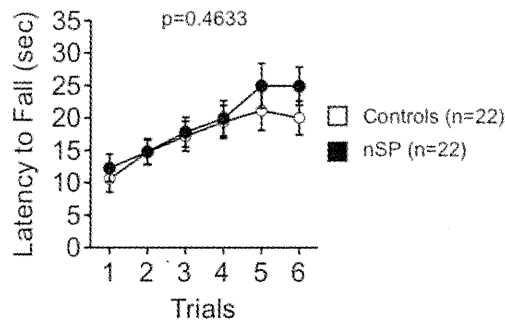


図 23 運動能力・運動学習能力。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、回転するロッド（棒）の上に乗せて、落ちるまでの時間（秒）を測定した。1日目および2日目にそれぞれ3試行実施し、運動能力ならびに上達の程度から運動学習能力を評価したが、nSP暴露による成長後の運動能力および運動学習能力への影響は認められなかった。

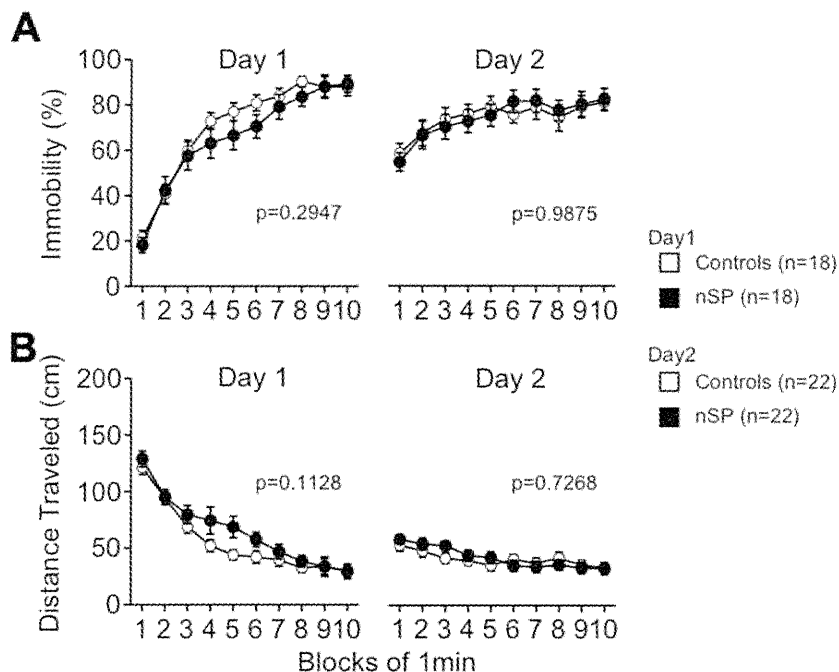


図 24 強制水泳場面におけるうつ様行動。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、水の入った円柱容器に10分間入れ、水に浮かんで動かない状態の不動時間（秒）(A) および移動距離（cm）(B) を記録した。不動状態をうつ様行動の指標とするが、nSP暴露によるうつ様行動への影響は認められなかった。

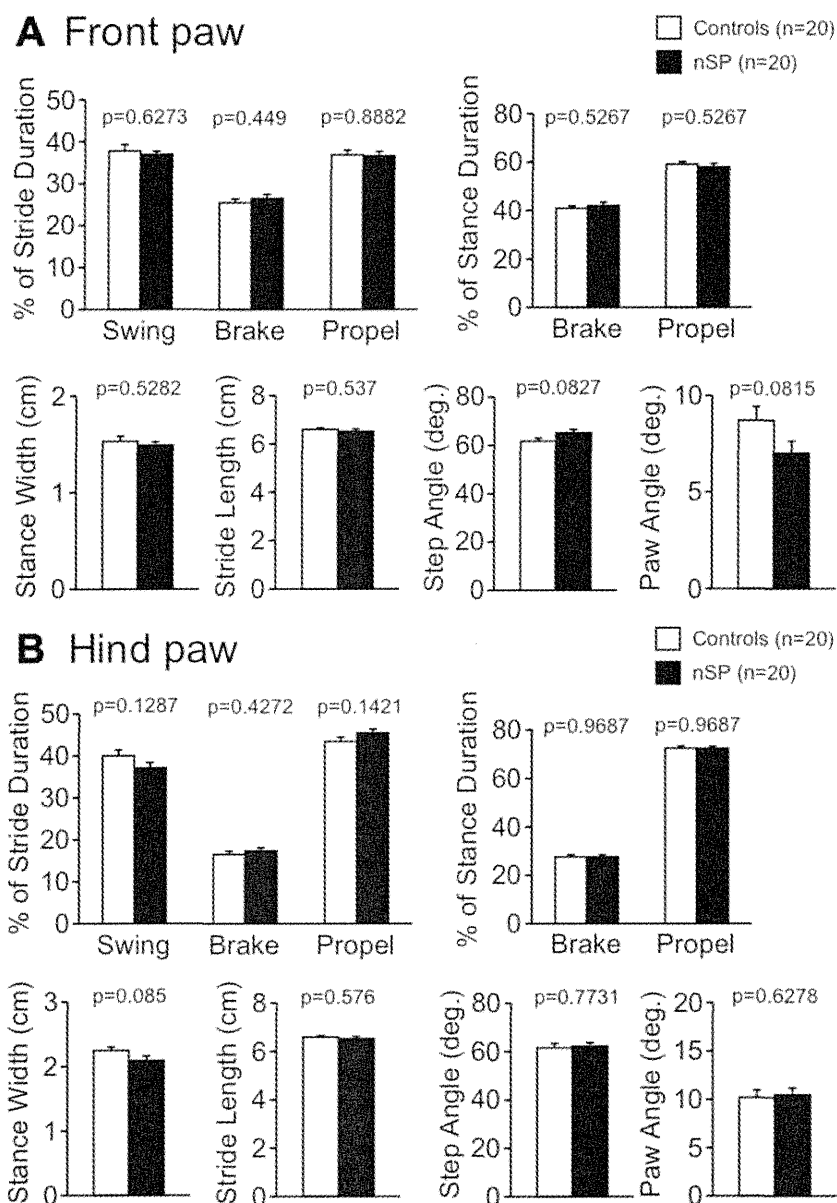


図 25 歩行機能。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、歩行解析装置に乗せ、ベルトコンベアーの上を走る様子を撮影し、前肢 (A) および後肢 (B) の歩行機能を解析したが、nSP暴露による成長後の歩行機能への影響は認められなかった。

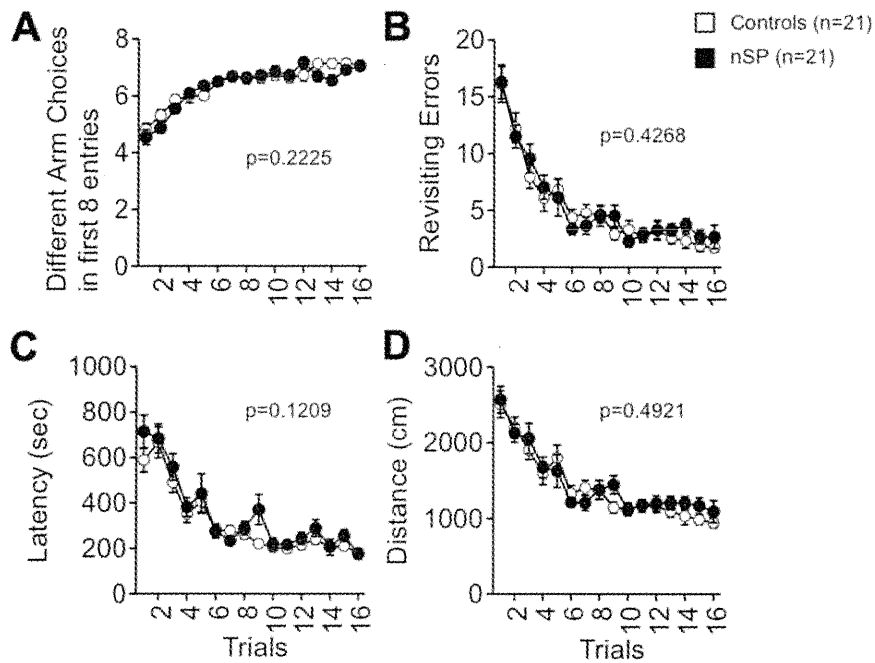


図 26 作業記憶機能. 生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、中央のプラットフォームとそこから8方向にのびた8本のアームから構成される8方向放射状迷路装置に入れ自由に探索させた。8本のアームの先端には報酬となるスクロースペレットを置いた。最初の8回のアームへの進入回数のうち異なるアームを選択して入った回数（正選択数）（A）、一度入ったアームに再び入った回数（誤選択数）（B）、8本のアーム全てに進入しペレットを食べるまでに要した時間（秒）（C）および総移動距離（cm）（D）を測定した。正選択数あるいは誤選択数を作業記憶の指標とした。nSPに暴露された経験がある仔の成長後の作業記憶に障害などは確認されなかった。

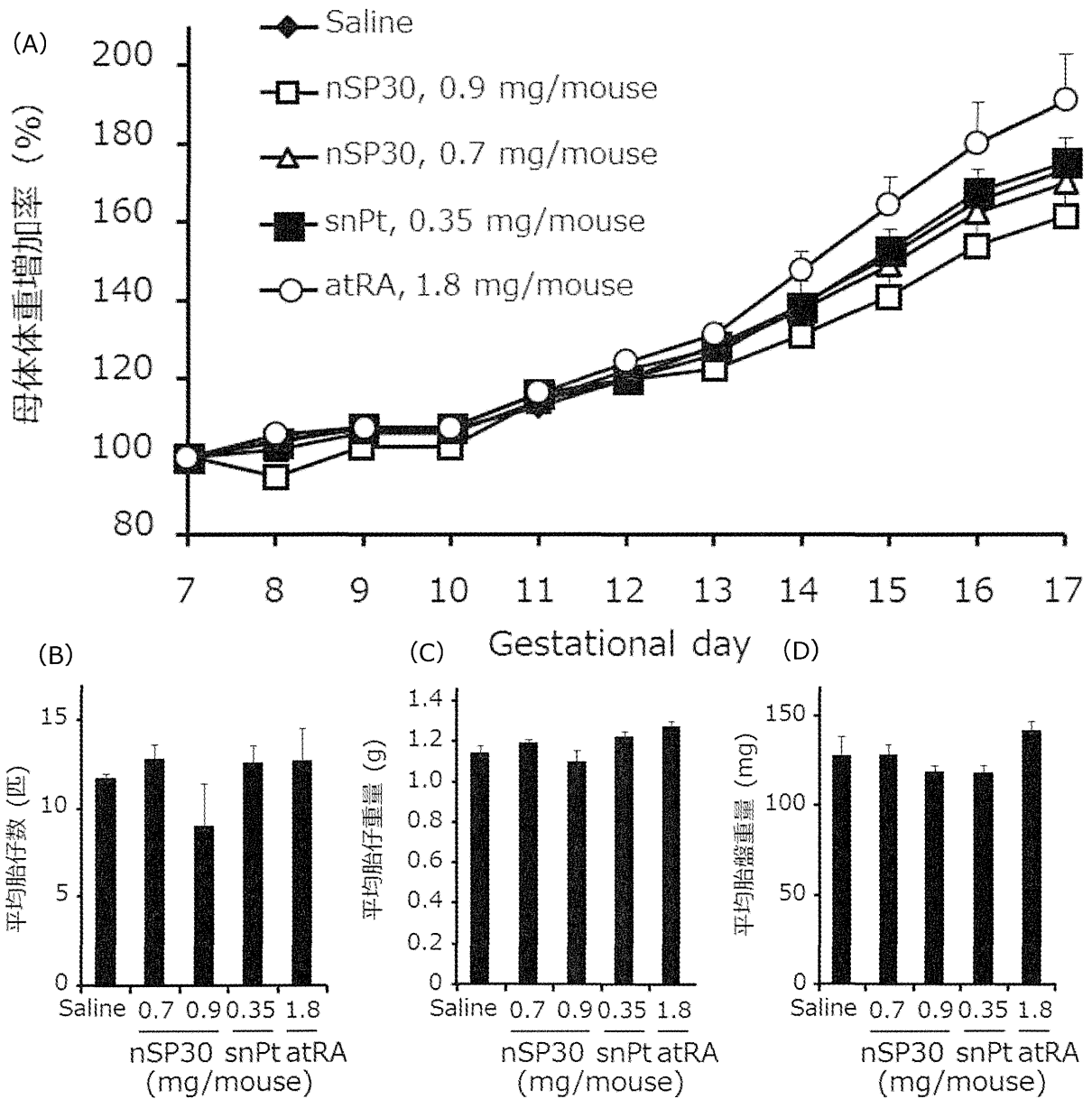


図 27 : snPt、nSP30 の催奇形性試験。 妊娠 7-9 日目の ICR マウス (雌性、10 週齢) に、Saline または、nSP30 (7, 9 mg/mL)、snPt (3.5 mg/mL) を 100 μ L/mouse で 3 日間連続尾静脈投与した。All-trans Retinoic Acid (atRA) 群は、妊娠 8 日目の ICR マウス (雌性、10 週齢) に、atRA (9 mg/mL) を 200 μ L/mouse で腹腔内投与した。母体体重の増加率 (A) を経日的に測定するとともに、妊娠 17 日目に解剖し、胎仔数 (B)、胎仔重量 (C)、胎盤重量 (D) を測定した。Data are presented as means \pm S.E (n = 3-8; *p < 0.05 versus value for Saline group by Sceheffe test)