

図 28 : 酸化チタンの催奇形性試験. 妊娠7-9日目のICR マウス (雌性、10 週齢) に、Saline または、TiO₂-R1 (4.5, 9 mg/mL)、TiO₂-R2 (4.5, 9 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 = 5; *p < 0.05 versus value for Saline group by Scedheffe test)

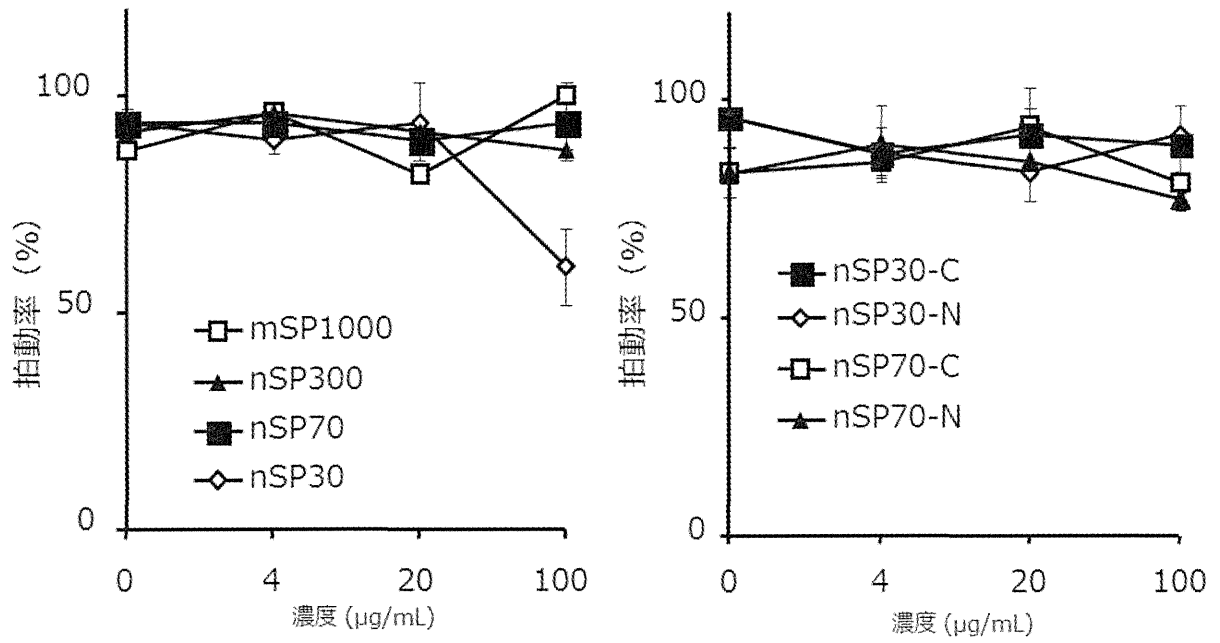


図 29. EST 法による催奇形性試験 (心筋分化を指標とした評価)。 マウス胚性幹細胞 D3 株を種々の濃度の非晶質シリカ (nSP30, nSP30-C, nSP30-N, nSP70, nSP70-C, nSP70-N, nSP300, mSP1000) と共に培養し、心筋細胞へ分化させた。分化誘導開始日から 10 日目に分化の指標として拍動を光学顕微鏡下で観察し、拍動率を評価した。

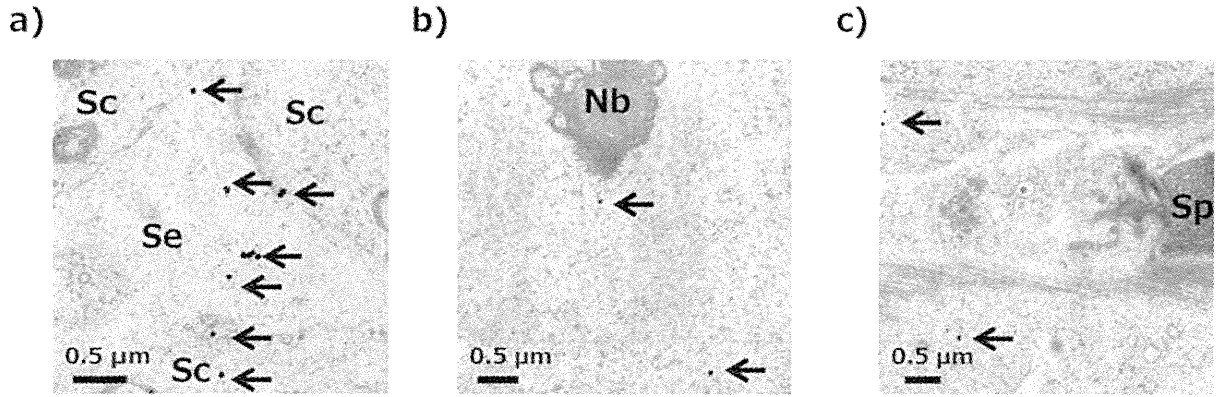


図 30. 透過型電子顕微鏡観察による非晶質ナノシリカの精巣移行性の検討

0.8 mg の nSP300、nSP70 もしくは生理食塩水を 2 日連続でマウスに尾静脈内投与し、最終投与 24 時間後の精巣を透過型電子顕微鏡により観察した。(a) nSP70 が精母細胞やセルトリ細胞内に認められた。(b) nSP70 が精母細胞の核内に認められた。(c) nSP70 が精子近傍に認められた。nSP300 投与群や生理食塩水投与群の精巣ではこれらの粒子は観察されなかった。Sc：精母細胞、Se：セルトリ細胞、Nb：核小体、Sp：精子。黒矢印は nSP70 を示す。

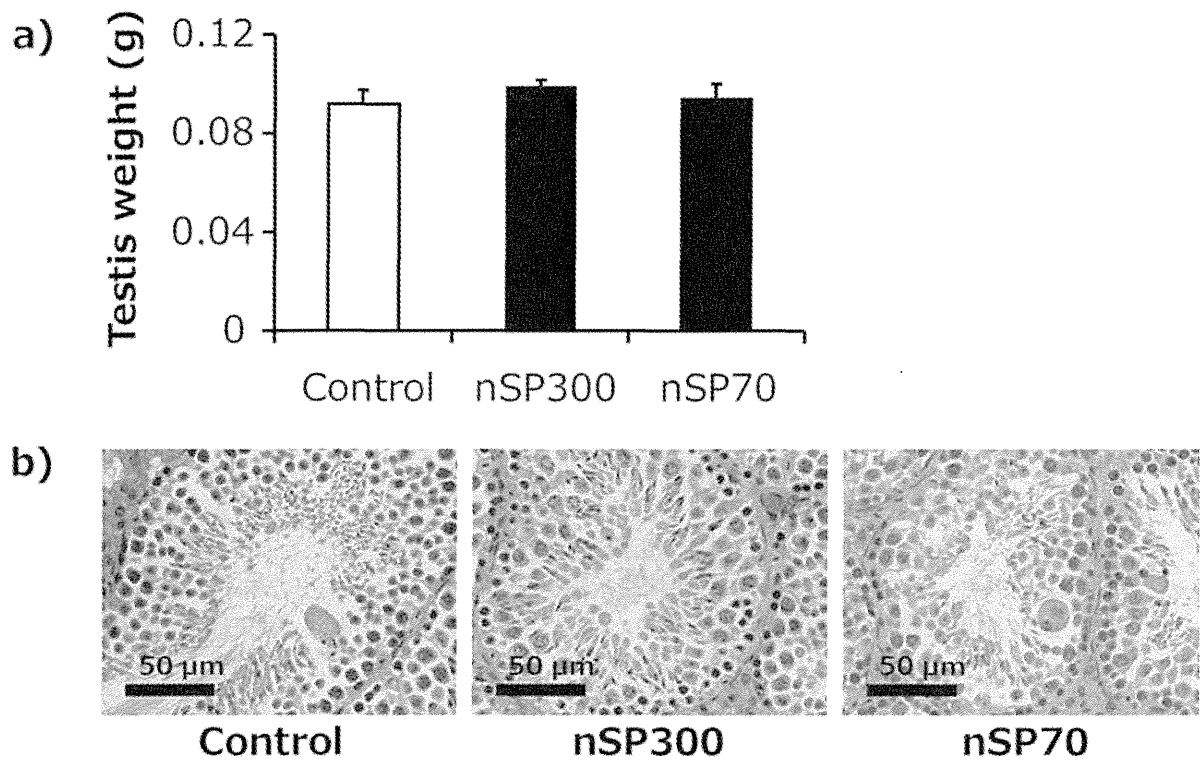


図 31. 非晶質ナノシリカの精巣傷害性の検討

0.8 mg の nSP300、nSP70 もしくは生理食塩水を 2 日連続でマウスに尾静脈内投与し、最終投与 24 時間後の精巣の重量を測定すると共に、病理組織学的に解析した。(a) 対照群と比較して、非晶質ナノシリカ投与群の精巣重量に差は認められなかった。(b) 対照群と比較して、非晶質ナノシリカ投与群の精巣の組織所見に差は認められなかった。

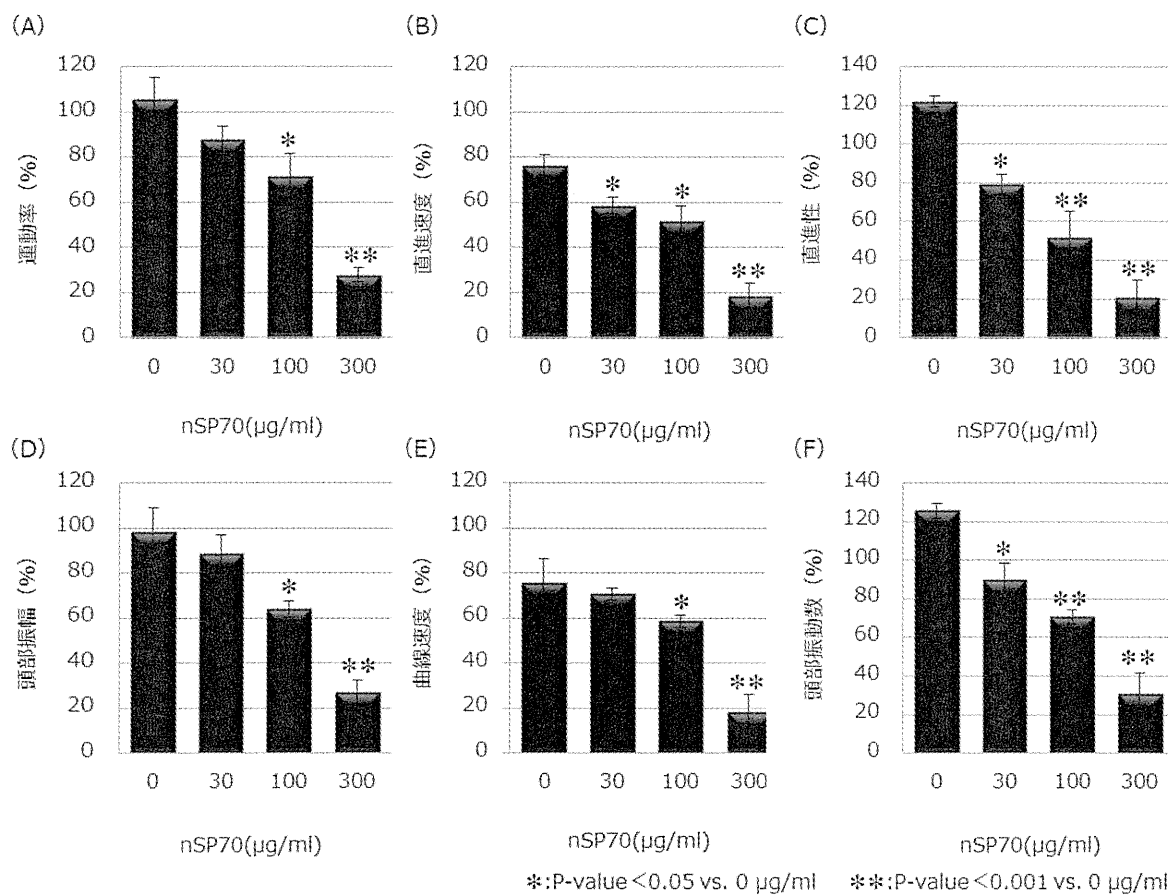


図 32 ナノシリカによる精子の運動性低下. nSP70処置前の培養細胞および30・100・300 µg/mLのnSP70処置後の培養細胞を SEMEN ANALYSIS SLIDE (Cell Vision) へ移し、SMASを用いて測定。SMASによる測定は、WHOの基準に則した6項目 ((A) 運動率、(B) 直進速度、(C) 直進性、(D) 頭部振幅、(E) 曲線速度、(F) 頭部振動数) を評価。

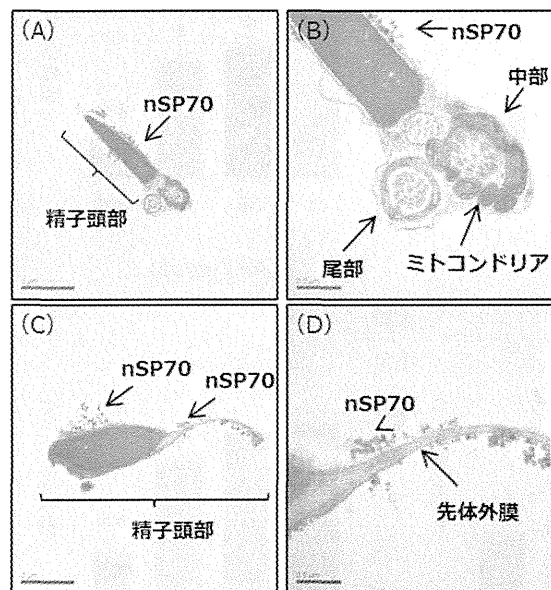


図 33 ナノシリカの精子頭部への結合. 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のnSP70を培養精子へ処置 (10分)。透過型電子顕微鏡を用い、精子頭部、中部 (ミトコンドリア)、尾部への取り込みを観察。15万倍 (A, C) および50万倍、(B, D) の透過型電子顕微鏡画像。

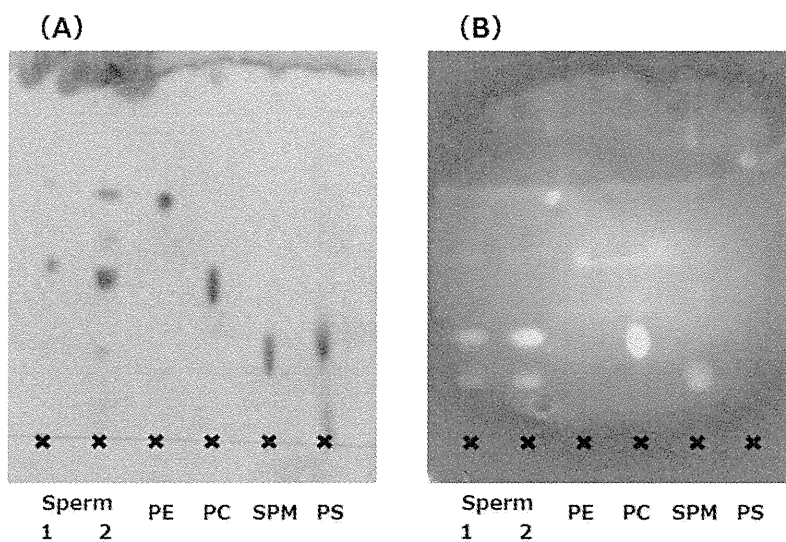


図 34 精子由来リン脂質へのナノシリカの結合。 11週齢の雄性ICRマウスから精子を採取。BMOC-3 Mediumで30分前培養し、運動精子を回収した。クロロホルム:メタノール:水 (65:25:4) でリン脂質を抽出し、TLCアルミプレートへスポット及び展開した。また精子由来リン脂質と共に、標準品のエタノールアミン (Sigma)、フォスファチジルコリン (Sigma)、ホスファチジルセリン (Sigma)、スフィンゴミエリン(Enzo Life Sciences) をスポットし、展開した。展開したTLCプレートはドライヤーで乾かし、Aka "Magic"を吹きかけ、95℃で熱し写真撮影 (A)、もしくは、蛍光標識されたnSP70と反応させ、INDIGO2 (BERTHOLD) を用いて蛍光を測定した (B)。

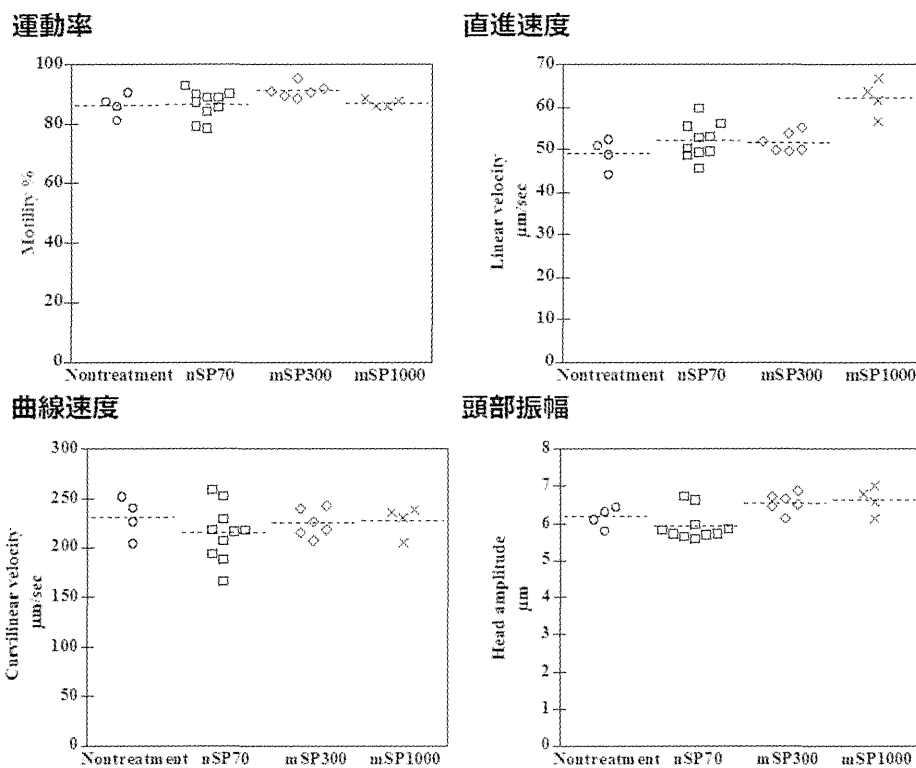


図 35 ナノシリカ経口投与とマウスの精子の運動性評価。粒子径の異なる各ナノシリカを20 mg/kgを週に2回、3週間、ICRマウスへ連続投与した。最終投与24時間後に、精巢上体を回収し精子のサンプルを調整した。これら精子は、SEMEN ANALYSIS SLIDE (Cell Vision) へ移し、SMASを用いて運動性を測定。SMASによる測定は、運動率、直進速度、曲線速度、頭部振動を評価。

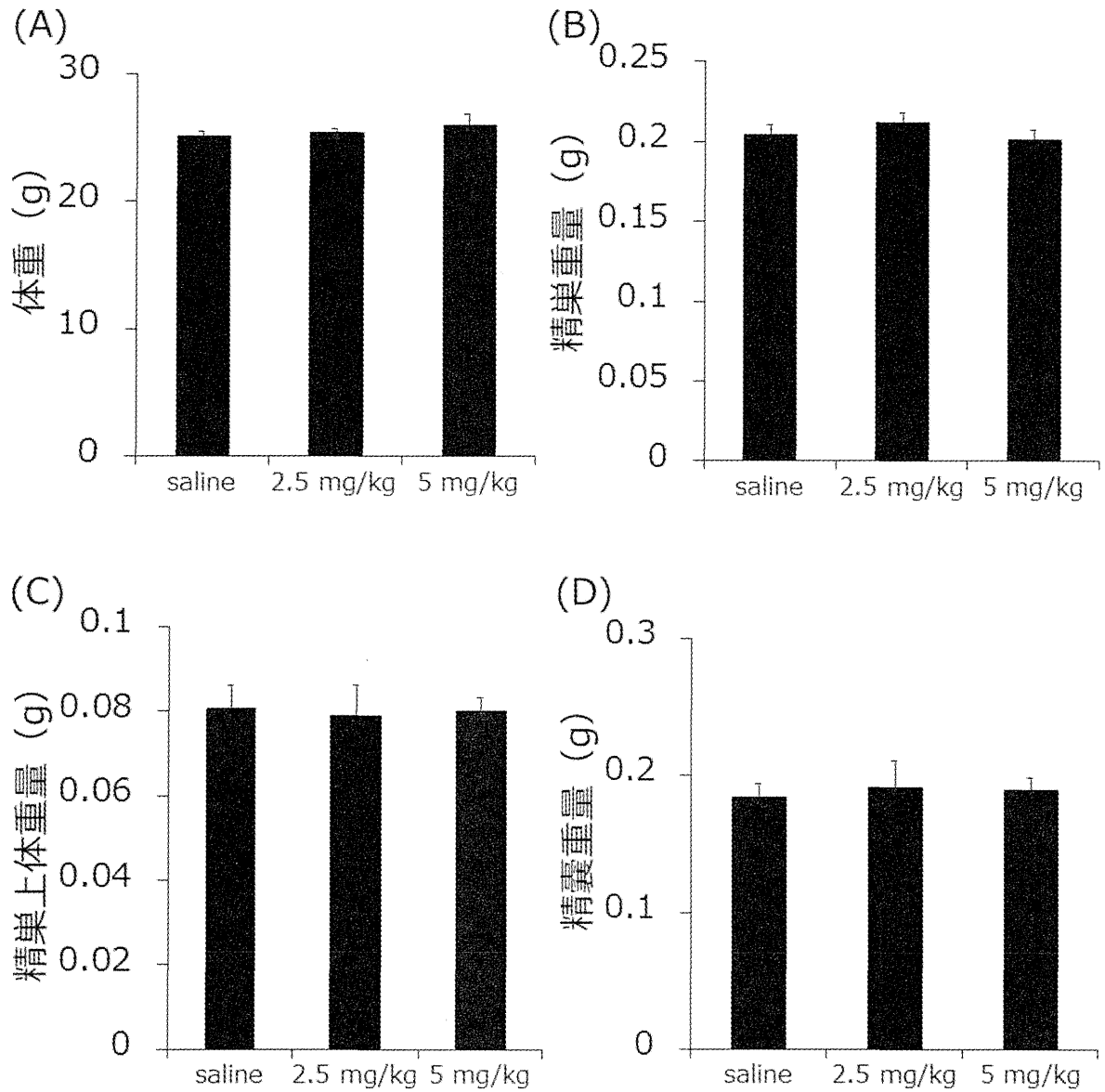
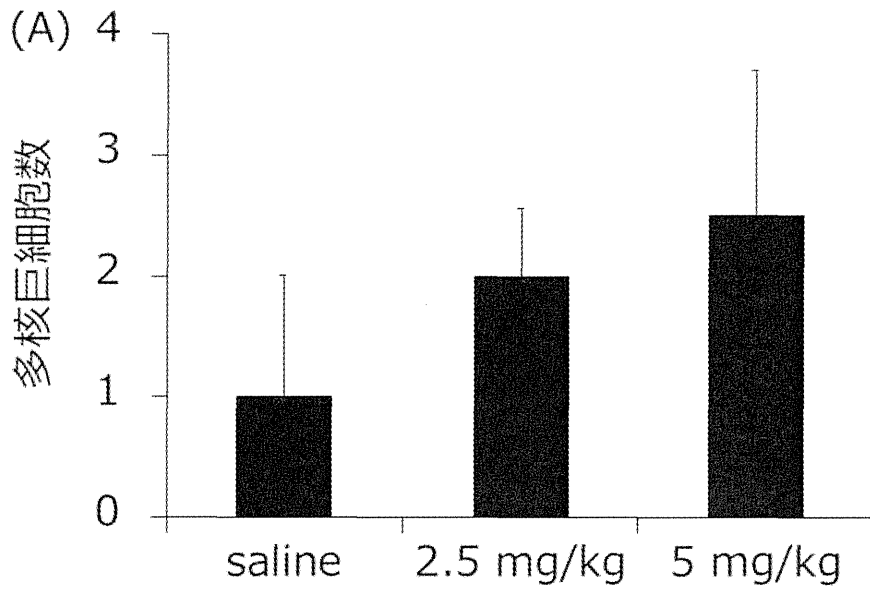


図 36. nSP30 を曝露した雄マウスの体重、精巣重量、精巣上体重量、精嚢重量. 10 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP30 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与 24 時間後に体重を測定すると共に (A)、精巣重量 (B)、精巣上体重量 (C)、精嚢重量 (D) を評価した。Data are presented as mean \pm SE (n = 4-5)



(B)

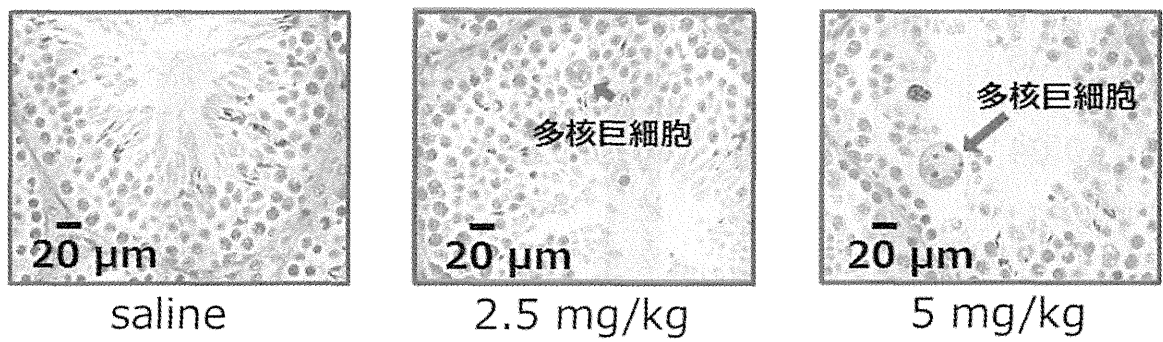


図 37. nSP30 を曝露した雄マウスの精巢の病理所見. 10 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP30 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与 24 時間後に精巢を回収し、多核巨細胞数を評価した (A、B)。Data are presented as mean ± SE (n = 4-5)

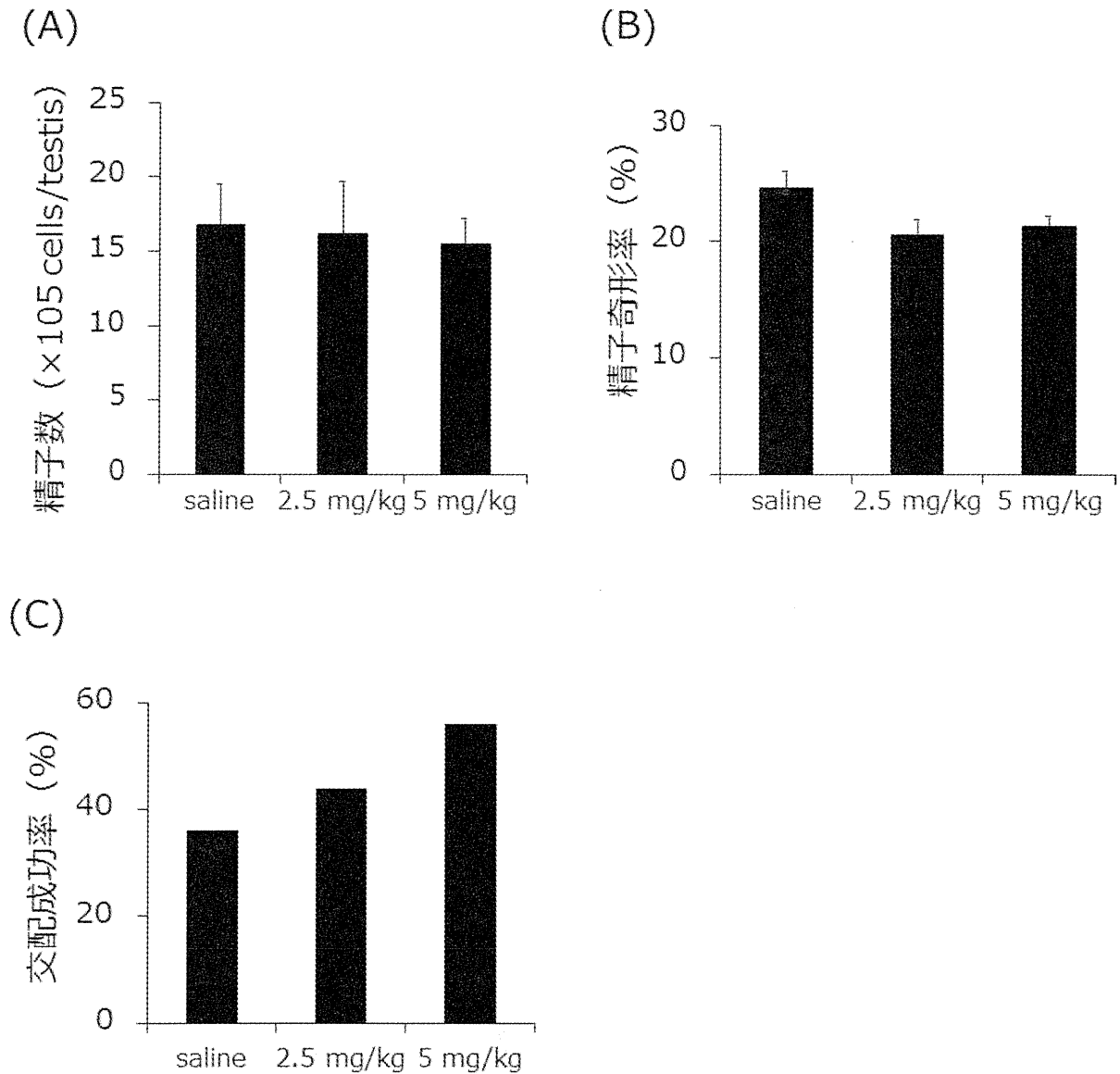


図 38. nSP30 を曝露した雄マウスの精子量、精子奇形率、交配成功率. 10 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP30 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与 24 時間後に精巣中の精子量 (A)、精子の奇形率 (B) を評価すると共に、最終投与日から 4 日間、無処置の雌マウスと同居させた際の交配成功率 (妊娠した雌マウスの数/交配させたマウスのペア数) を算出した (C)。Data are presented as mean \pm SE (n = 4-5, A-B)。

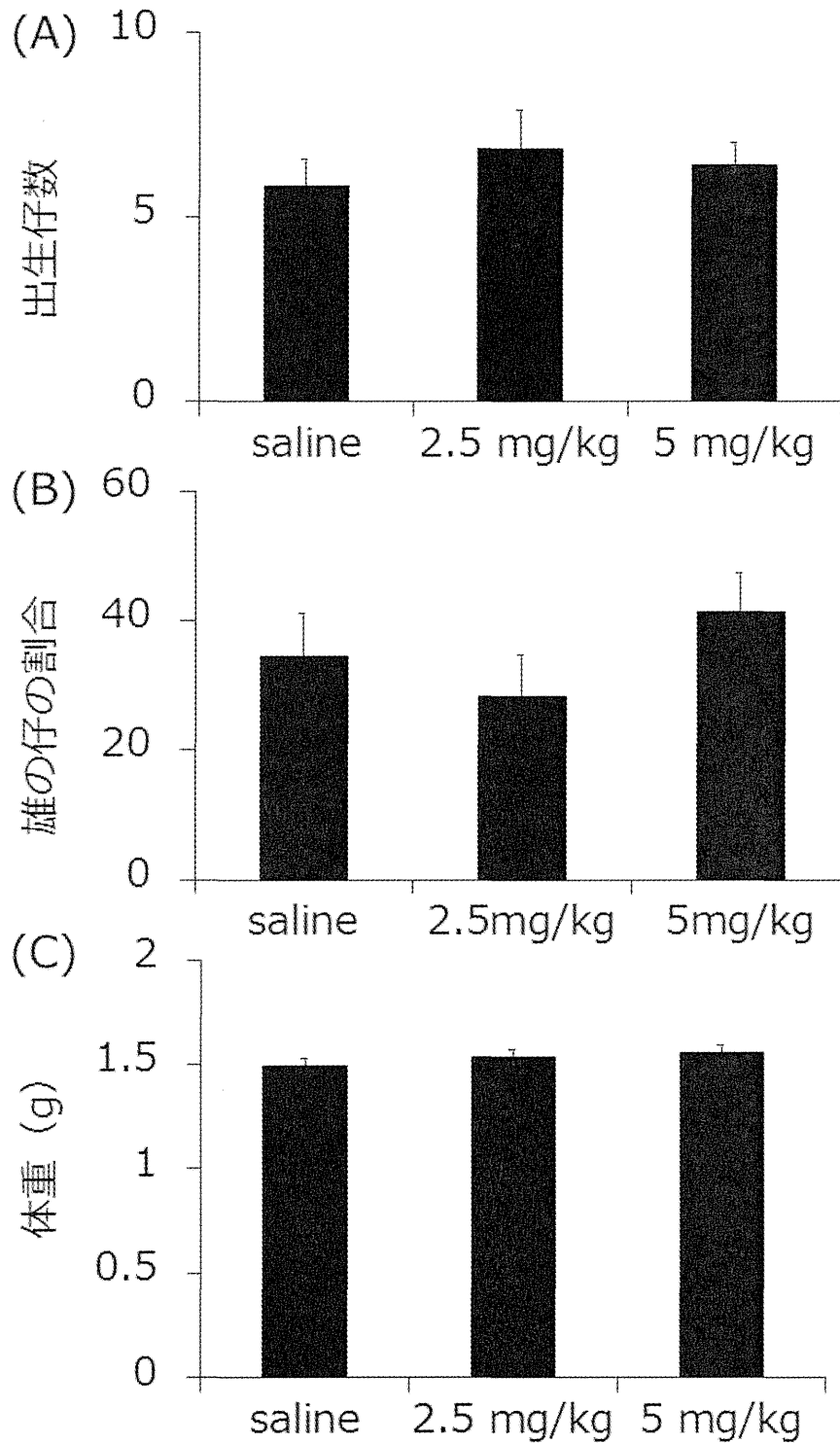


図 39. nSP30 を曝露した雄親の仔の出生仔数、雌雄比、出生時体重. 10 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP30 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与日の夜から、9 週齢の雌性 BALB/c マウスと交配させた。出生仔数 (A)、出生仔の雌雄比 (B)、出生仔の出生時体重 (C) を評価した。Data are presented as mean \pm SE (n = 41-77)

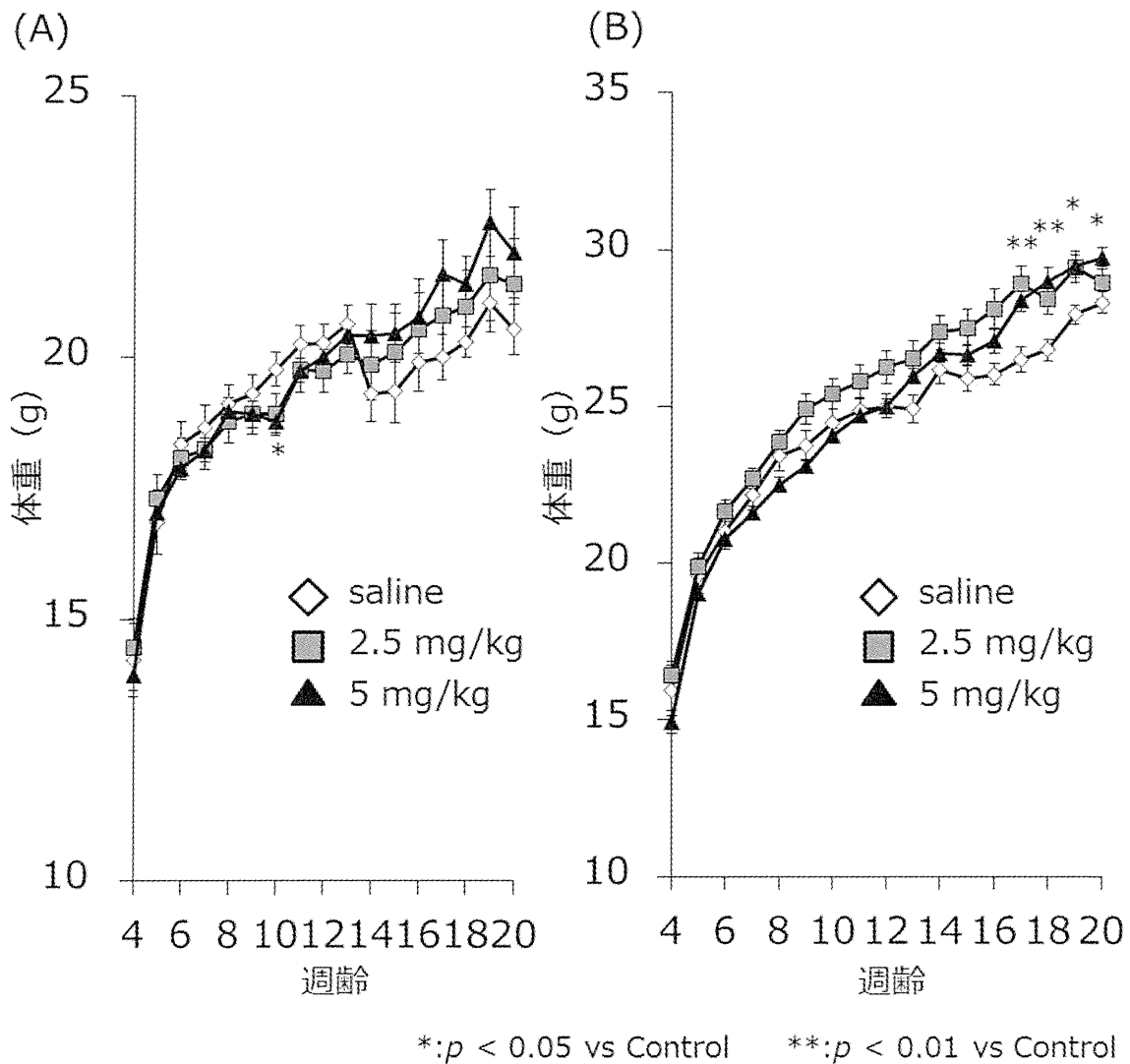
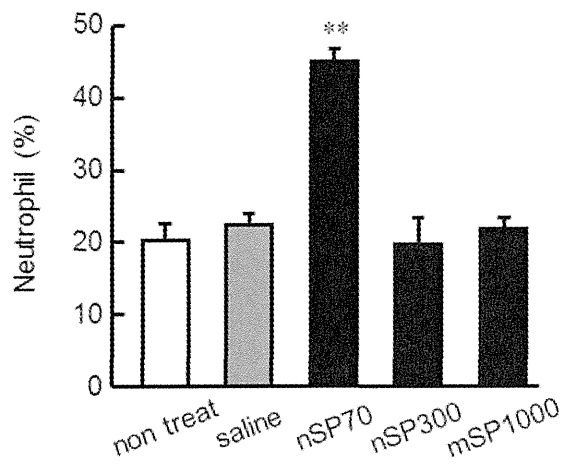


図 40. nSP30 を曝露した雄親の仔の体重推移. 10 週齢の雄性 BALB/ c マウスに、nSP30 を 2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与日の夜から、9 週齢の雌性 BALB/ c マウスと交配させた。出生後の体重を継続的に測定し、実測値 (A)、対照群を 100% とした時の割合 (B) で評価した。Data are presented as mean \pm SE (n = 21-31; *p < 0.05, **p < 0.01 versus value for control group by one-way ANOVA followed by Scheffe's post hoc test)

(A)



(B)

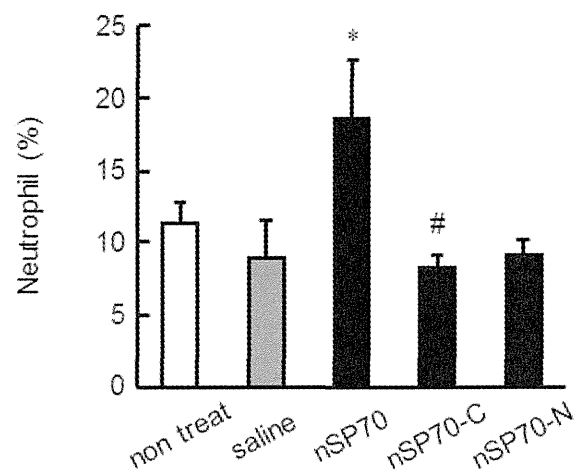


図 41. 末梢血好中球画分の割合変動解析

(A) BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における末梢血好中球画分の割合を Flow cytometry により解析した。(B) BALB/c マウスに nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における末梢血好中球画分の割合を Flow cytometry により解析した。Data are presented as mean \pm SEM (n=5-6). **p <0.01 versus value for saline group or #p <0.05 versus value for nSP70-treated group by Bonferroni test

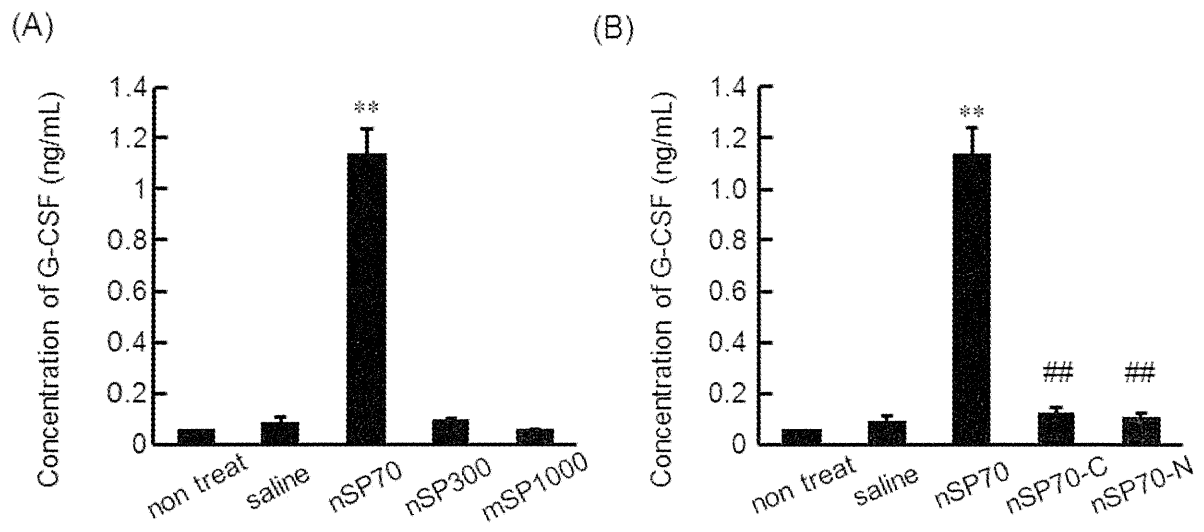


図 42. 血中 G-CSF 量の定量的解析

(A) BALB/c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 G-CSF 量を ELISA により測定した。(B) BALB/c マウスに nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 G-CSF 量を ELISA により測定した。Data are presented as mean \pm SEM (n=5-6). **p < 0.01 versus value for saline group or ##p < 0.01, #p < 0.05 versus value for nSP70-treated group by Bonferroni test

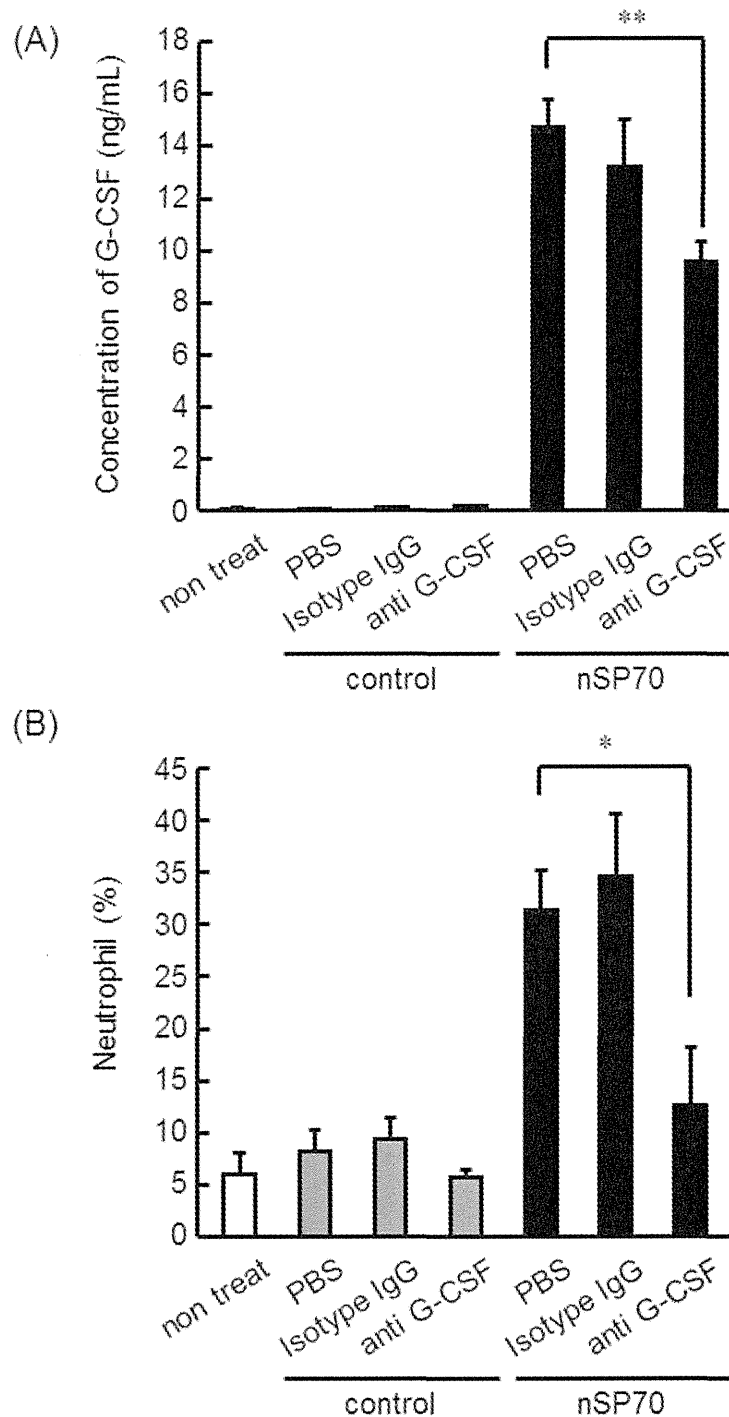


図 43. 抗 G-CSF 抗体処置時の末梢血好中球画分の割合解析

BALB/c マウスに G-CSF の中和抗体である抗 G-CSF 抗体を 30 μ g/mouse で腹腔内に投与した。中和抗体前処置から 4 時間後に、saline で 20 mg/mL に調整した nSP70 を 100 μ l ずつ (2.0 mg/mouse) 尾静脈投与した。投与後 5 時間において血液を回収し、(A) ELISA により血中 G-CSF 量を、(B) Flow cytometry により末梢血中の好中球画分を解析した。Data are presented as mean \pm SEM (n=5-6). **p < 0.01 versus value for saline group

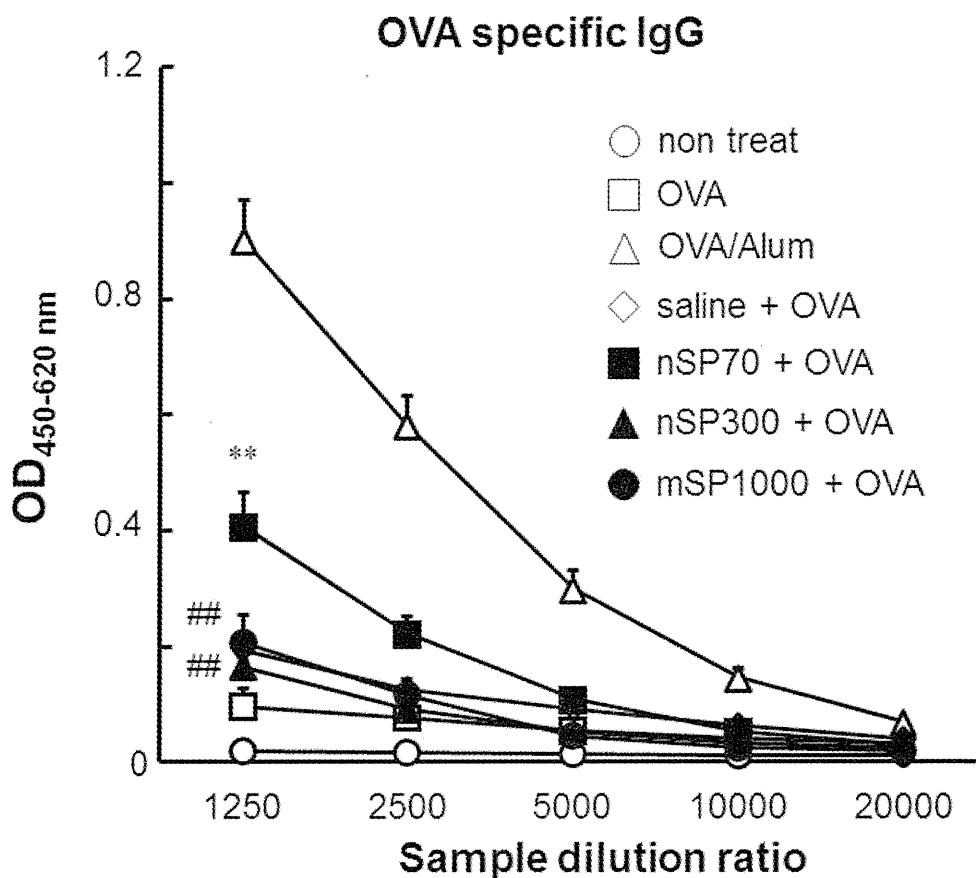


図 44. 非晶質ナノシリカの免疫応答に対する影響評価

BALB/ c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ尾静脈より投与し (0.8 mg/mouse)、投与 24 時間後に外来性抗原のモデルとしてニワトリ卵白アルブミン (OVA) を腹腔内に投与した (50 μ g/mouse)。最終投与 2 週間後に血液を回収し、OVA 特異的 IgG 価を ELISA により測定した。Data are presented as mean \pm SEM (n=5-6). **p < 0.01, *p < 0.05 versus value for saline group or ##p < 0.01, #p < 0.05 versus value for nSP70-treated group by Bonferroni test

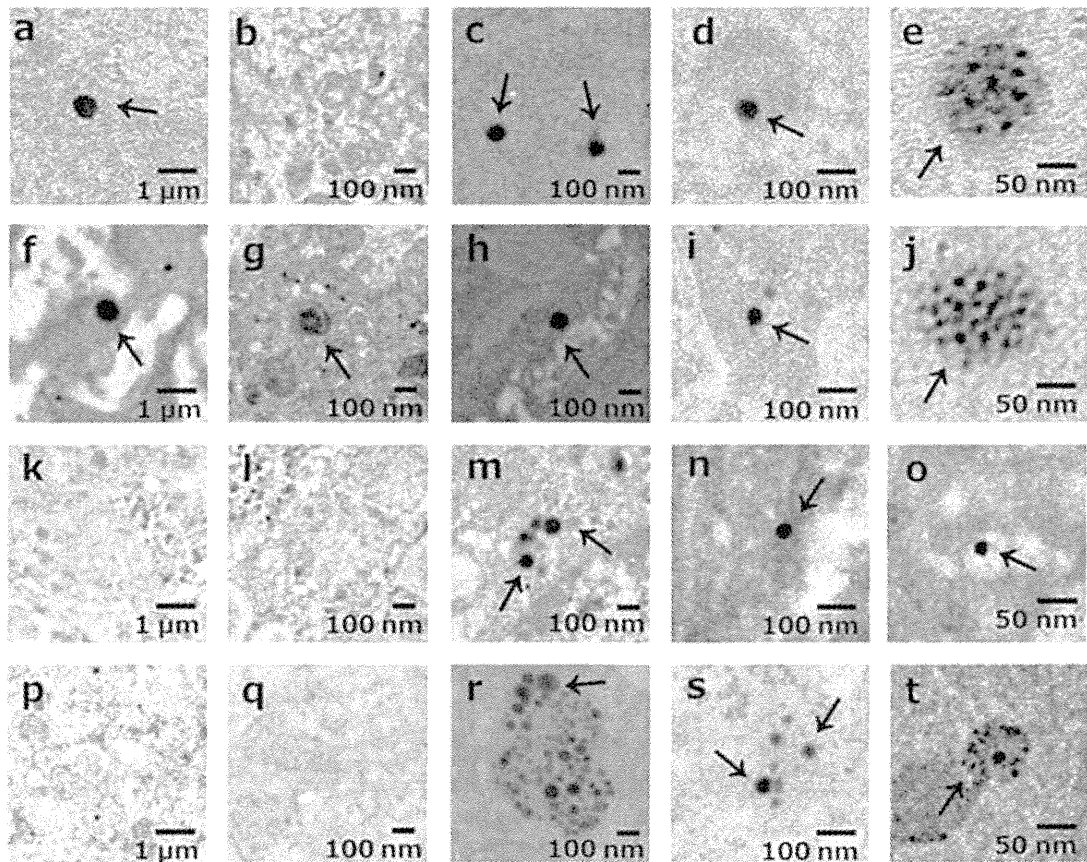


図 45. 非晶質ナノシリカの経鼻吸収性の評価

BALB/c マウスに超純水で各濃度に調整した mSP1000 (a, f, k, p)、nSP300 (b, g, l, q)、nSP100 (c, h, m, r)、nSP70 (d, i, n, s)、nSP30 (e, j, o, t) を 20 μ l/mouse (片鼻 10 μ l) で 7 日間連続経鼻投与した。最終投与 24 時間後に、鼻腔 (a-e)、肺 (f-j)、肝臓 (k-o)、脳 (p-t) を回収した。

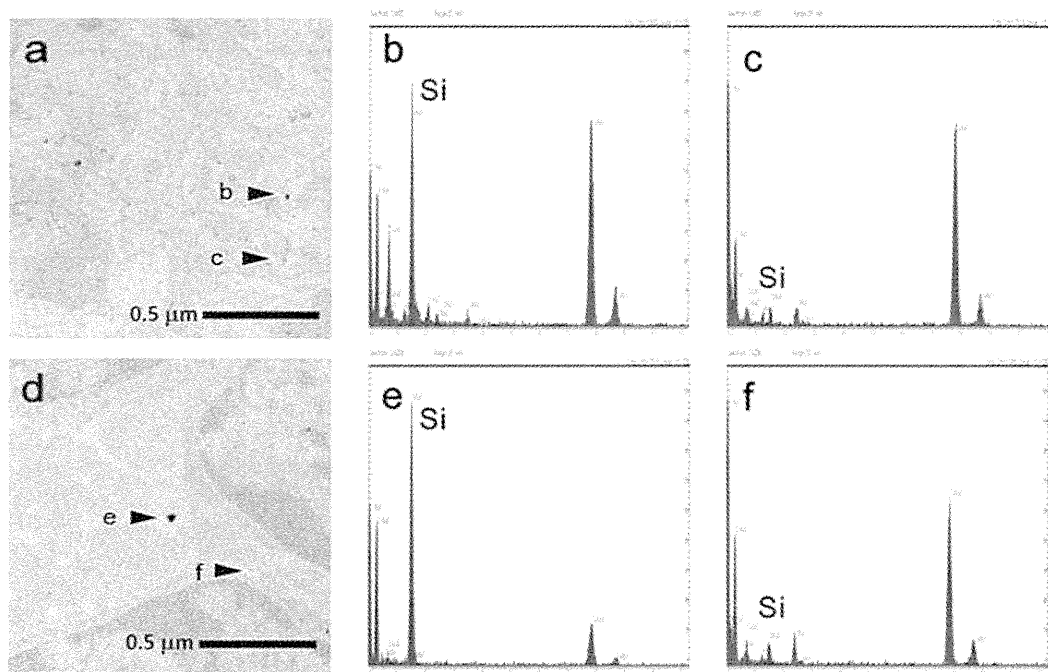


図 46. 鼻腔組織の TEM-EDX 解析

BALB/c マウスに超純水で各濃度に調整した nSP70 を 20 μl/mouse (片鼻 10 μl) で 28 日間連続経鼻投与した。最終投与 24 時間後に、脳 (a) および鼻腔 (d) を回収し、b、c、e、f のポイントを EDX 解析した。

Findings	control	mSP1000	nSP300	nSP100	nSP70	nSP30
Nasal cavity						
eosinophilic change	0	0	0	0	1	1
Brain						
microglial aggregation	0	0.33±0.58	0.33±0.58	0.33±0.58	2	1.67±0.58
Liver						
cell aggregation	0	0	0.33±0.58	0	1.67±0.58	1.67±0.58
rarefaction	3	3	3	3	3	3

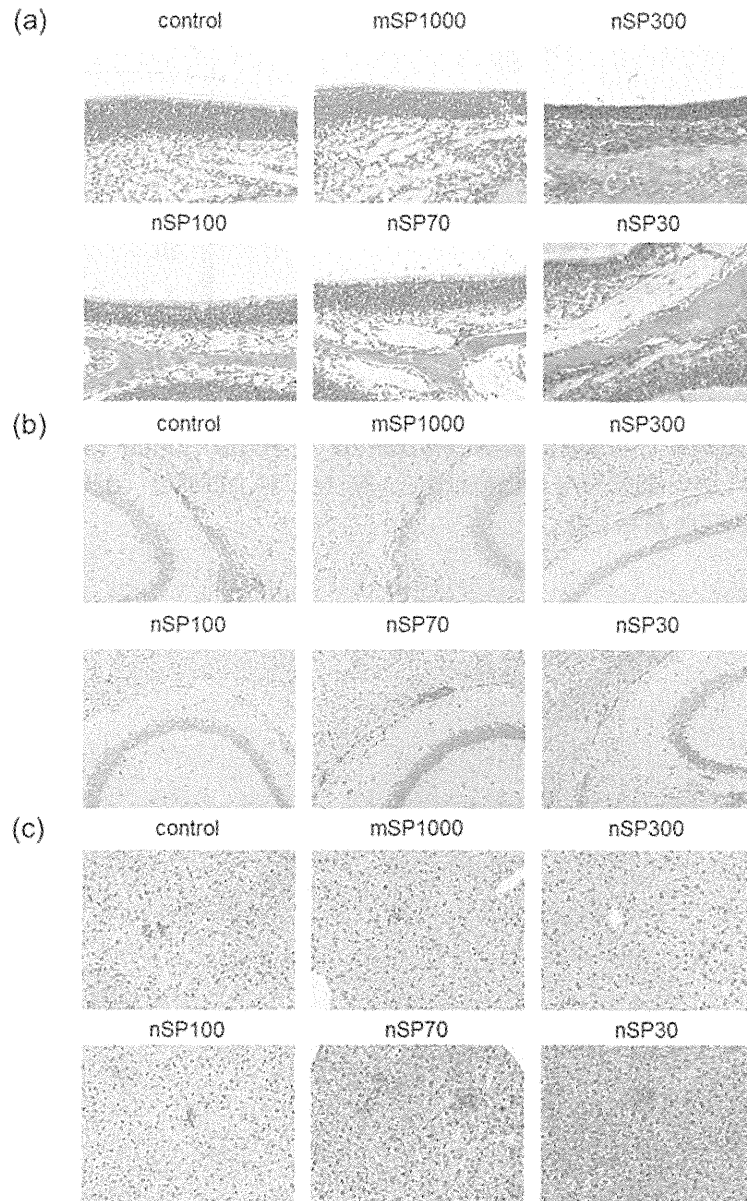


図 47. ナノシリカを7日間経鼻投与したマウスの鼻腔組織、脳、肝臓の病理解析

各シリカ(mSP1000、nSP300、nSP100、nSP70、nSP30)を20 µl/mouse (片鼻 10 µl)ずつ、あるいは蒸留水を7日間連続経鼻投与したマウスから鼻腔 (a)、脳 (b)、肝臓 (c)を回収し、HE染色した後に各組織を病理組織的に評価した。所見をスコア化し、表2にまとめた。