

Figure 12. ナノシリカの事前反復投与がナノシリカ誘導性の急性毒性に与える影響評価. マウスに nSP50 (12.5 mg/mL) を週 1 回、計 4 週にわたって耳介部皮内へ事前投与した。最終投与の 1 週間後、nSP50 を尾静脈より投与した (80 mg/kg)。投与 4 時間後に血液を回収し、(a) 白血球数、(b) リンパ球数、(c) 単球数、(d) 顆粒球数、(e) 赤血球数、(f) 血小板数を測定した。Data are reported as means \pm SEMs (n = 7).

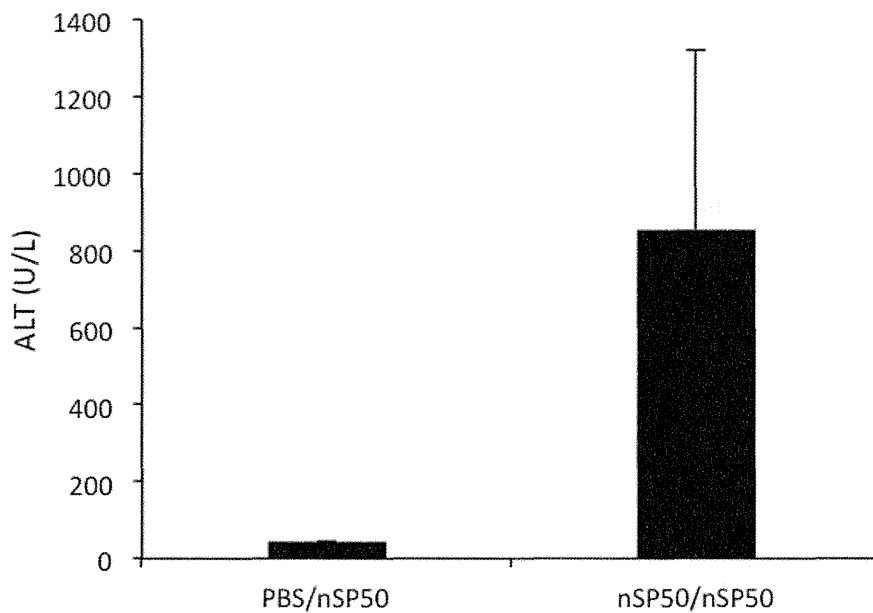


Figure 13. ナノシリカの事前反復投与がナノシリカ誘導性の急性毒性に与える影響評価. マウスに nSP50 (12.5 mg/mL) を週 1 回、計 4 週にわたって耳介部皮内へ事前投与した。最終投与の 1 週間後、nSP50 を尾静脈より投与した (80 mg/kg)。投与 4 時間後に血液を回収し、血液生化学検査を実施し血中 ALT 量を測定した。Data are reported as means \pm SEMs (n = 7).

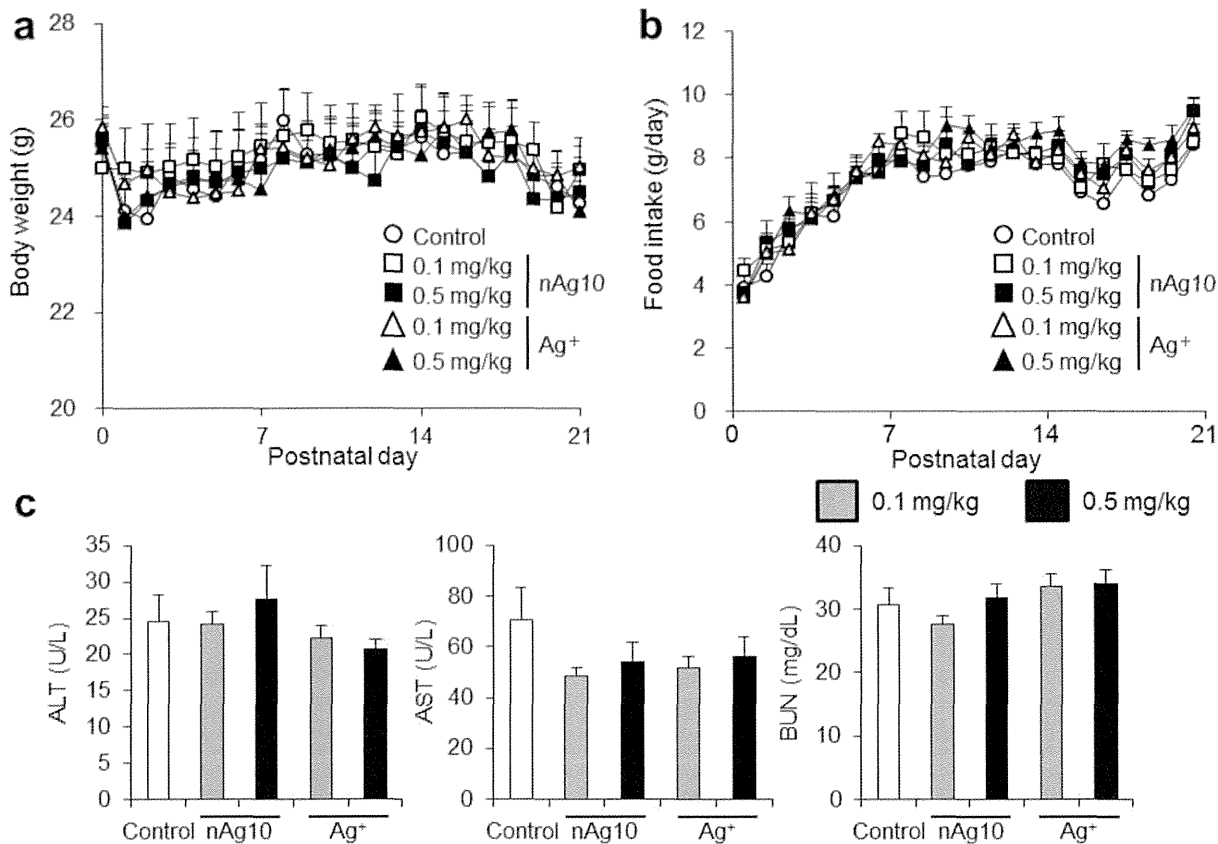


Figure 14. 母体への連日経口投与による母体への影響評価. 授乳期マウスに nAg10 (0.1、0.5 mg/kg)、AgNO₃ (0.1、0.5 mg/kg Ag⁺)、水を出産日 (PND0) から離乳 (PND20) まで 21 日間連日経口投与し、母乳育仔させた。母体重量および摂餌量は PND0 から PND21 まで測定した。PND21 に離乳させ、母体から採血した。母体について生化学検査を実施した。Data are reported as means ± SEMs (a,b: n = 4-10; c: n = 8-10).

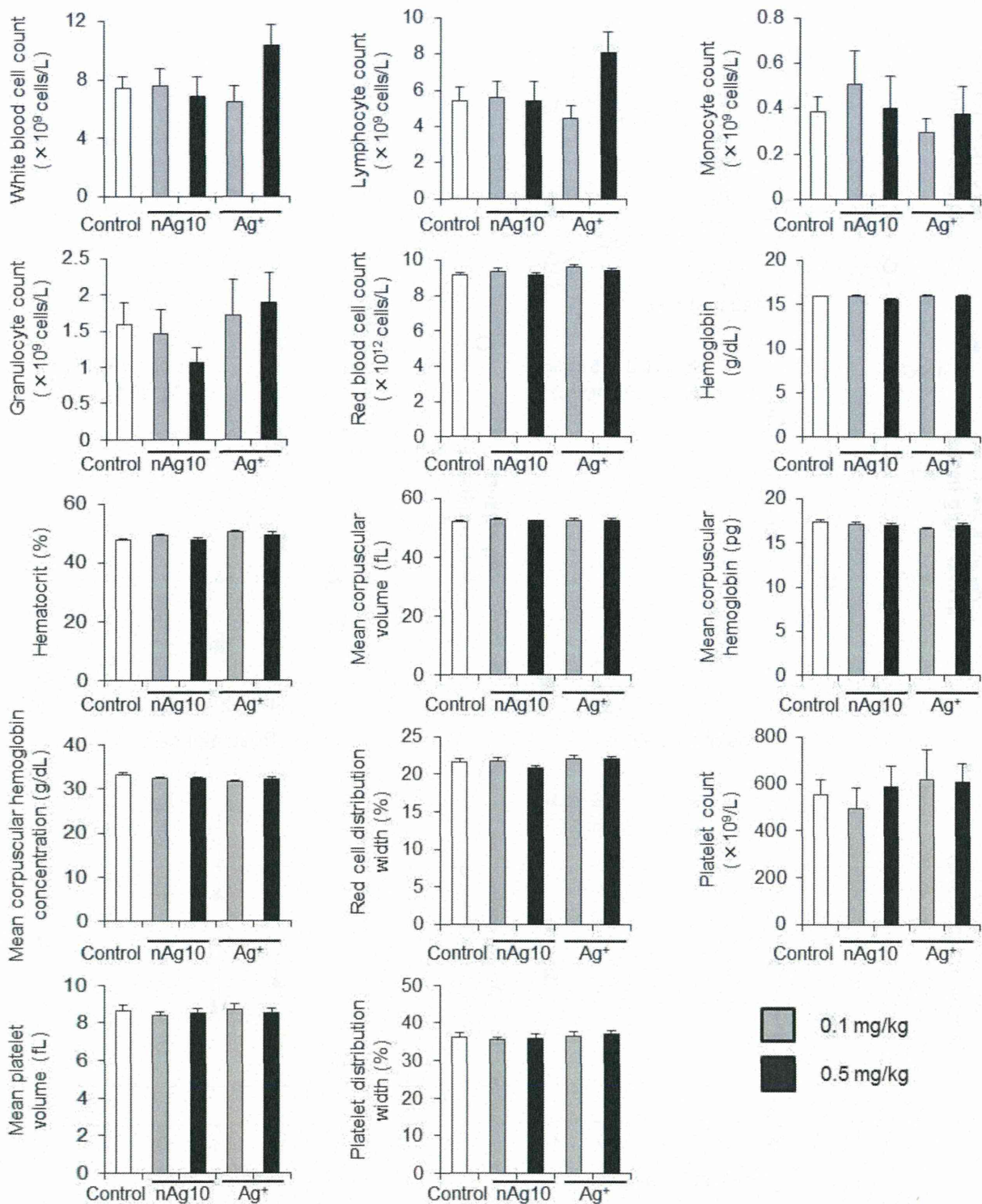


Figure 15. 母体への連日経口投与による母体への影響評価。授乳期マウスに nAg10 (0.1、0.5 mg/kg)、AgNO₃ (0.1、0.5 mg/kg Ag⁺)、水を出産日 (PND0) から離乳 (PND20) まで 21 日間連日経口投与し、母乳育児させた。PND21 に離乳させ、母体から採血した。母体について血球検査を実施した。Data are reported as means \pm SEMs (n = 8-10).

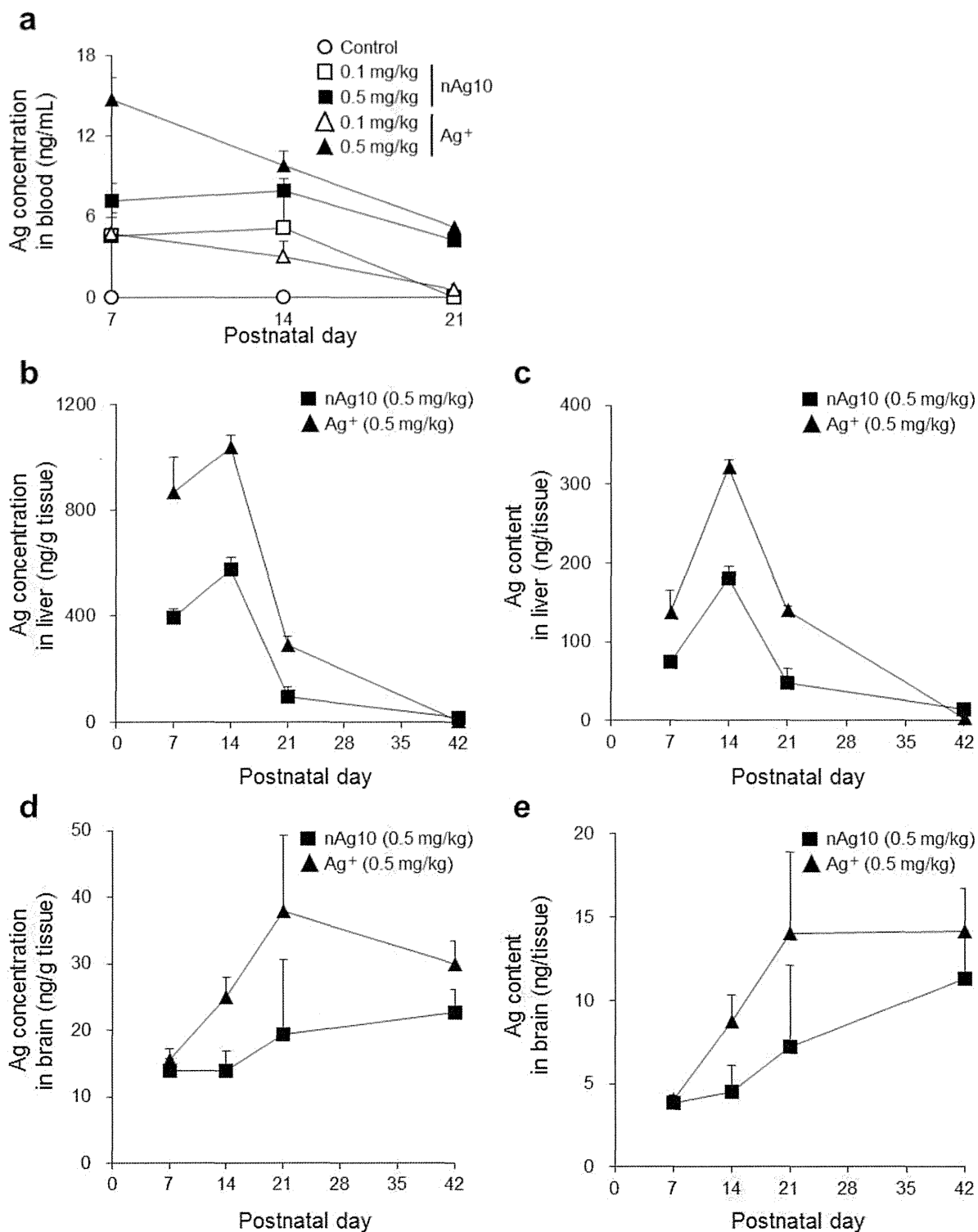


Figure 16. 母体への連日経口投与による母乳を介した乳幼仔への移行性評価。授乳期マウスに nAg10 (0.1, 0.5 mg/kg)、AgNO₃ (0.1, 0.5 mg/kg Ag⁺)、水を出産日 (PND0) から離乳 (PND20) まで 21 日間連日経口投与し、母乳育児させた。PND 7、14、21 に乳幼仔の血液を、PND 7、14、21、42 に乳幼仔の肝臓、脳を回収した。乳幼仔の血液、肝臓、脳中 Ag 濃度を ICP-MS により測定した。Data are reported as means ± SEMs (a: n = 3-11; b-e: n = 3-5).

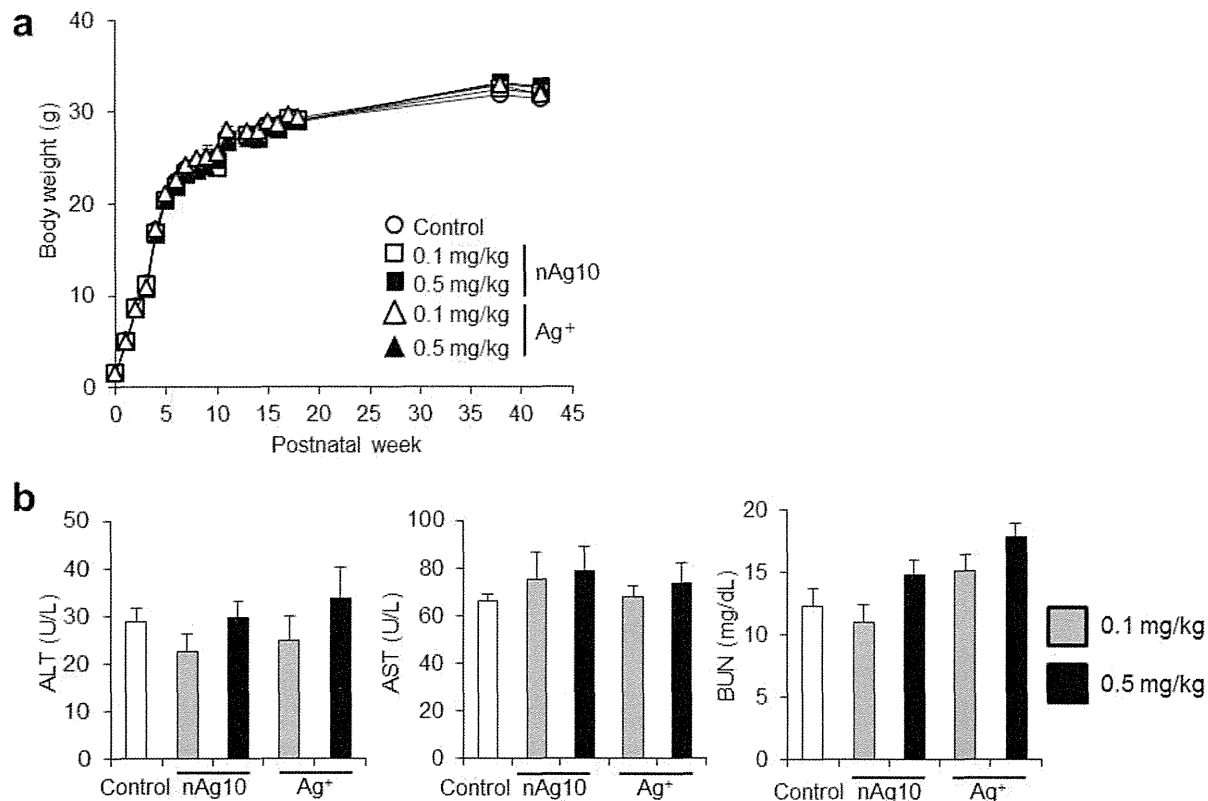


Figure 17. 母体への連日経口投与による母乳を介した乳幼仔への影響評価. 授乳期マウスに nAg10 (0.1、0.5 mg/kg)、AgNO₃ (0.1、0.5 mg/kg Ag⁺)、水を出産日 (PND0) から離乳 (PND20) まで 21 日間連日経口投与し、母乳育児させた。(a) 胎仔重量を出生後 42 週間経過的に測定した。(b) PND21 に乳幼仔の血液を回収し、生化学検査を実施した。Data are reported as means ± SEMs (a: n = 14–62; b: n = 5–19).

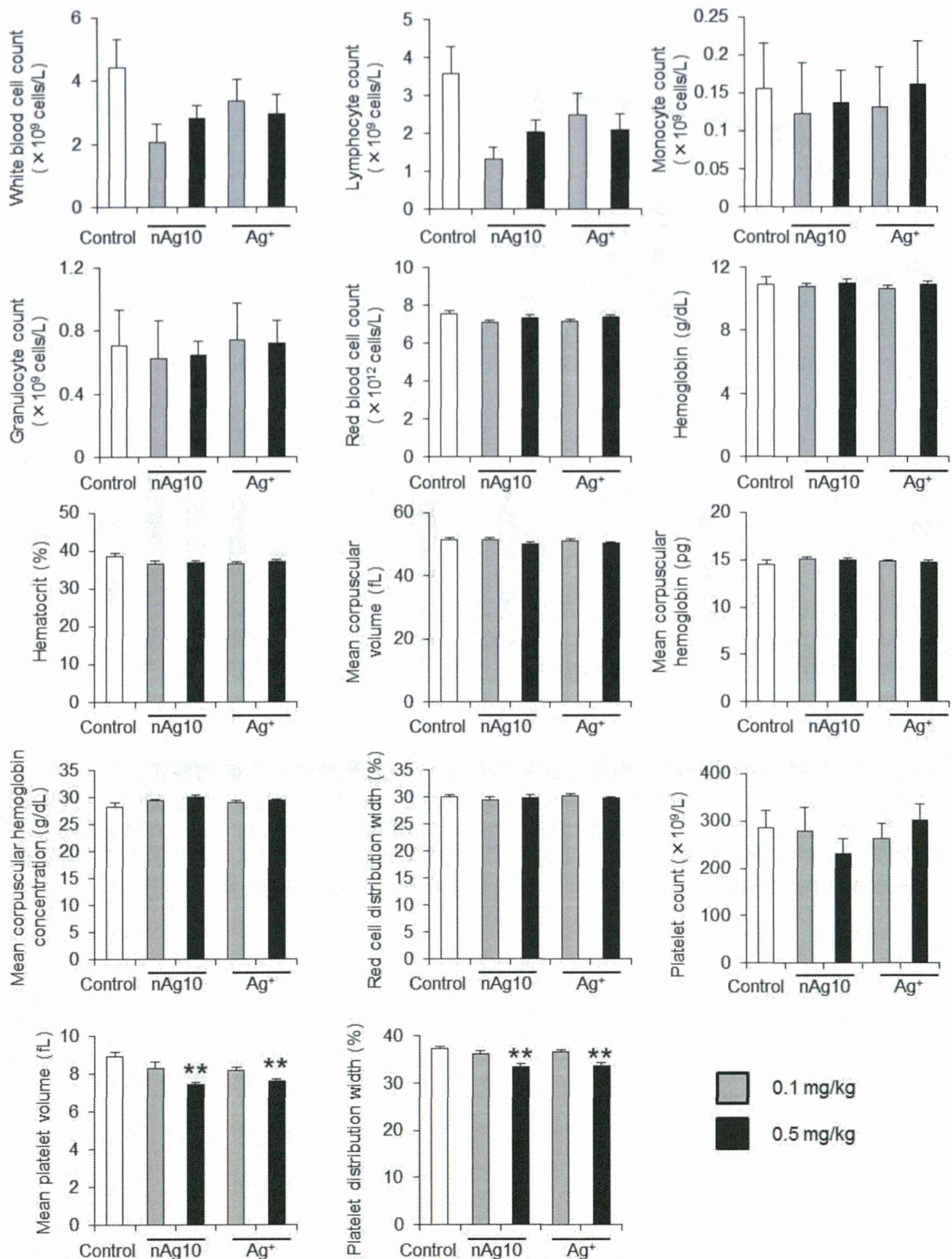


Figure 18. 母体への連日経口投与による母乳を介した乳幼仔への影響評価。授乳期マウスに nAg10 (0.1、0.5 mg/kg)、AgNO₃ (0.1、0.5 mg/kg Ag⁺)、水を出産日 (出産後日数 (PND0) から離乳 (PND20) まで 21 日間連日経口投与し、母乳育児させた。PND21 に乳幼仔 (雌) の血液を回収し、血液検査を実施した。Data are reported as means \pm SEMs (a: n = 14-62; b: n = 5-19).

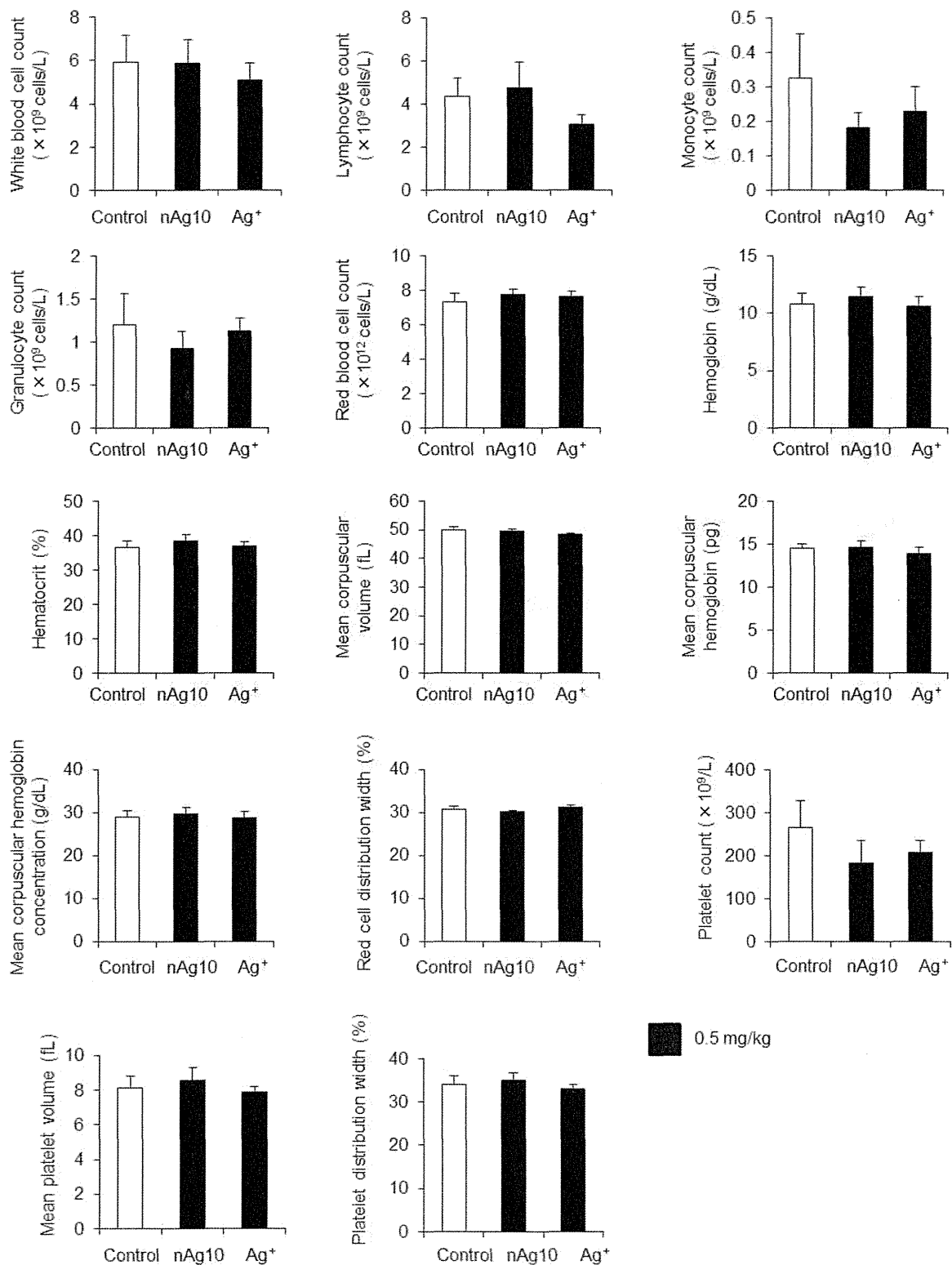


Figure 19. 母体への連日経口投与による母乳を介した乳幼仔への影響評価。授乳期マウスに nAg10 (0.1、0.5 mg/kg)、AgNO₃ (0.1、0.5 mg/kg Ag⁺)、水を出産日 (出産後日数 (PND0) から離乳 (PND20) まで 21 日間連日経口投与し、母乳育児させた。PND21 に乳幼仔 (雄) の血液を回収し、血液検査を実施した。Data are reported as means \pm SEMs (a: n = 14–62; b: n = 5–19).

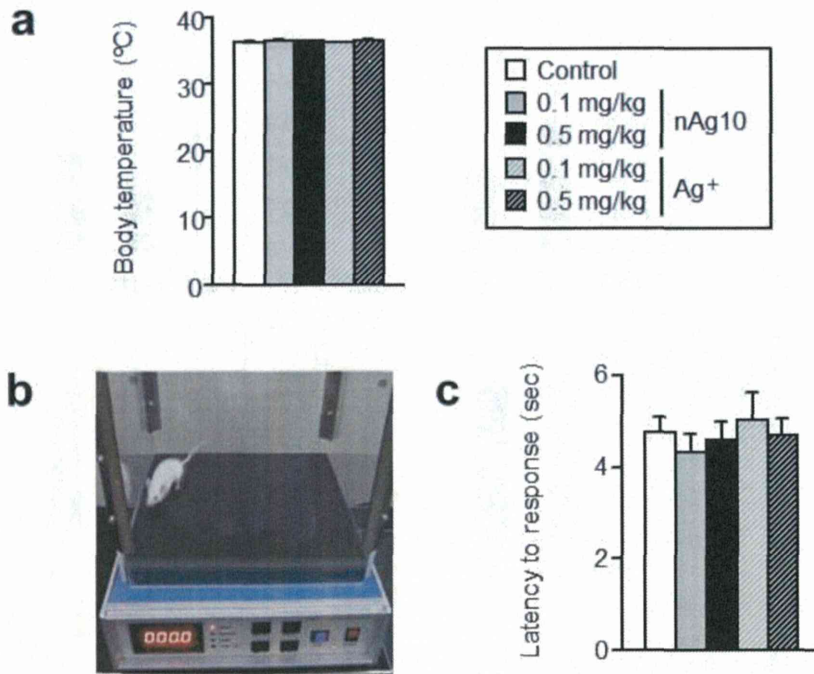


Figure 20. 体温、体毛の状態、基礎的な反射、感覚機能の評価。 体温は、マウスの肛門から直腸へ、小動物用直腸温測定用温度プローブを入れて測定した。また、ひげおよび体毛の状態を、有無、長さ、毛並み等に注目し観察した。基礎的な反射について、Righting Reflex（正立反射）は、マウスを仰向けにした際に元の姿勢に戻れば、反応有りとした。Reaching は、マウスの尾を持って逆さに吊るし、マウスの顔を机の角に近づけた際に、マウスが手を机に伸ばせば、反応有りとした。Key Jangling はマウスの近くで鍵束を振って音を立てた際、マウスが音に対して反応する（逃避する等）一方で、痙攣反応が起こらなければ異常無しとした。痛覚感受性の検討について、マウスを 55°C のプレート上を探索させ、熱に対する反応（前脚をこすり合わせる、足を舐める、後退りする、ジャンプする等）を示すまでの時間を記録した。Data are reported as means \pm SEMs (n = 14–20).

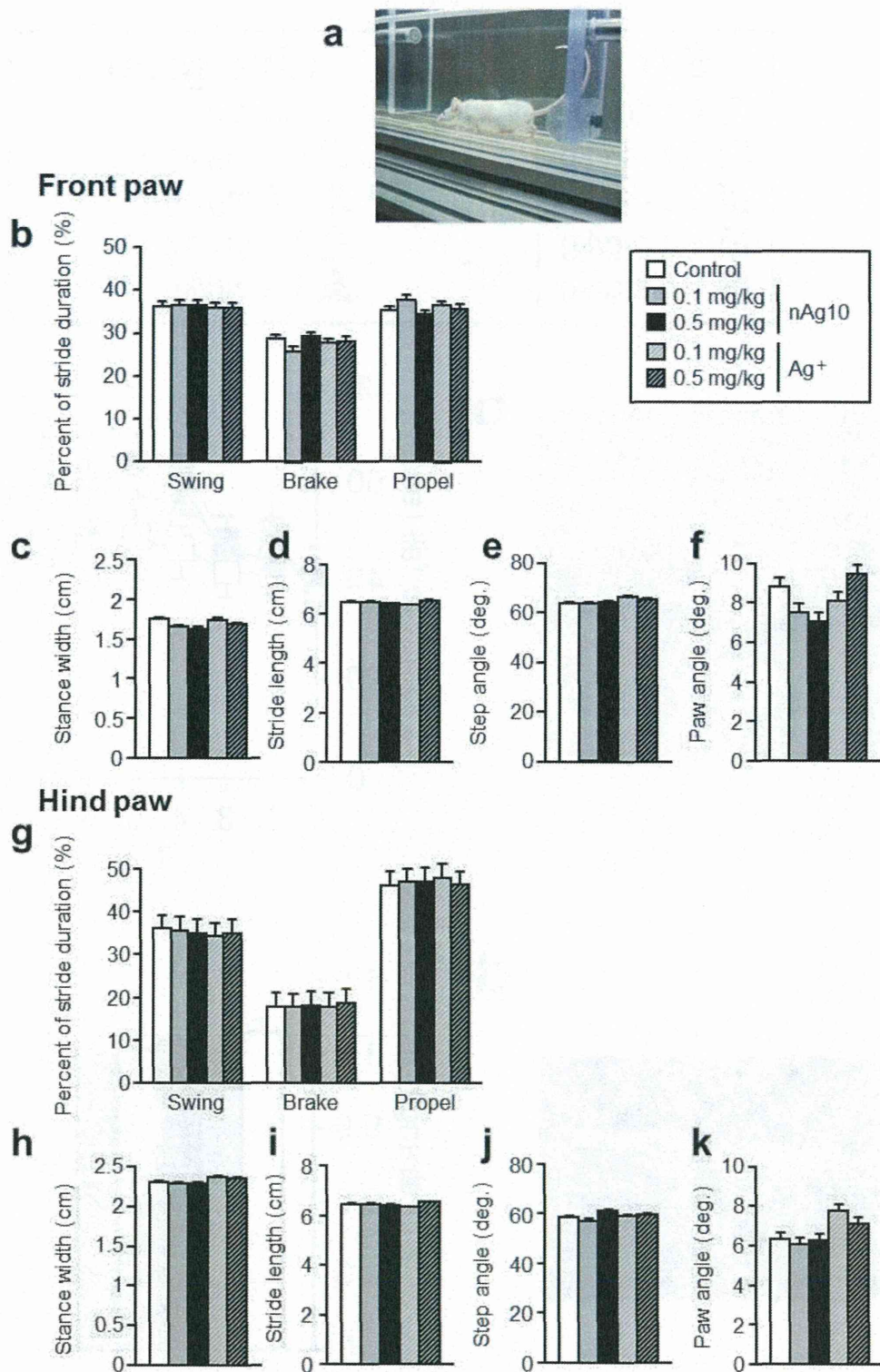


Figure 21. 歩行機能の解析. DigiGait 小動物用歩行解析システムを用い、マウスをベルト部分が透明のトレッドミルに乗せた後、ベルトを 24 cm/sec の速さに加速させ、マウスが歩行する様子をベルト下部に設置したカメラで撮影した。撮画像から各足底の位置及び面積の経時変化を解析し、歩幅 (Stride Length)、立脚位置間の幅 (Stance Width)、制動時間 (Brake Stride、かかとがベルトに着き始めてから、足底面積が最大になるまでの時間)、推進時間 (Propel Stride、ベルトからかかとが離れ始めた時から、つま先がベルトから離れるまでの時間)、遊脚時間 (Swing Stride、足がベルトから離れている時間)、つま先とかかとを結ぶ直線と進行方向のなす角度 (Paw Angle)、対角線上の足を結ぶ直線と進行方向のなす角度 (Step Angle) を算出した。解析にはマウスが 3 秒間以上トレッドミルを走り続けた際の撮画像を使用した。Data are reported as means \pm SEMs ($n = 14-20$).

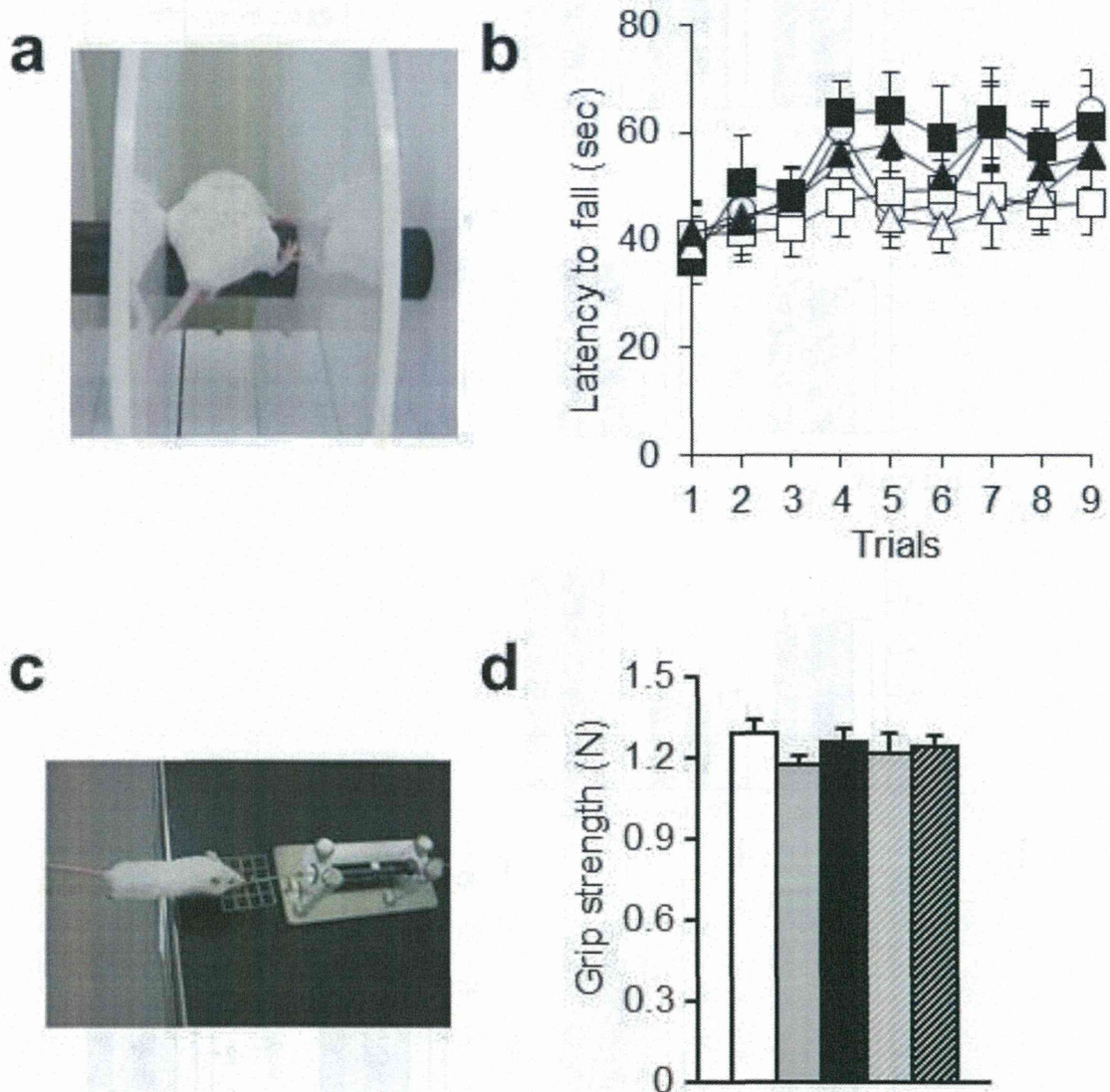
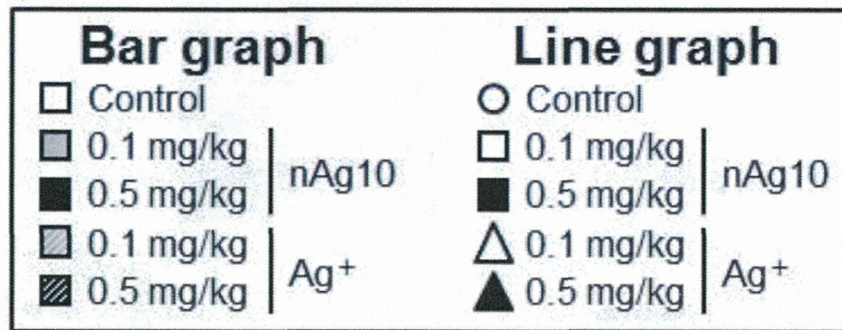


Figure 22. 協調運動機能、筋力の評価. 加速型ローターロッドを使用した。マウスに回転するロッド（直径 3 cm）上を歩行させ、ロッドから落下するまでの時間を測定した。ロッドの速度は初速 4 rpm で開始し、5 分間で 40 rpm まで徐々に加速させた。1 日に 3 試行ずつ、3 日に渡り試行した。また、握力測定器により前肢の握力を測定した。マウスの尾を持って持ち上げた状態で測定器の取手を握らせた。マウスにばねばかりを引かせ、取手を離れた際の目盛を、マウスの前肢の握力として記録した。各マウスにつき 3 回テストを実行し、測定された最大値を記録した。Data are reported as means \pm SEMs ($n = 14-20$).

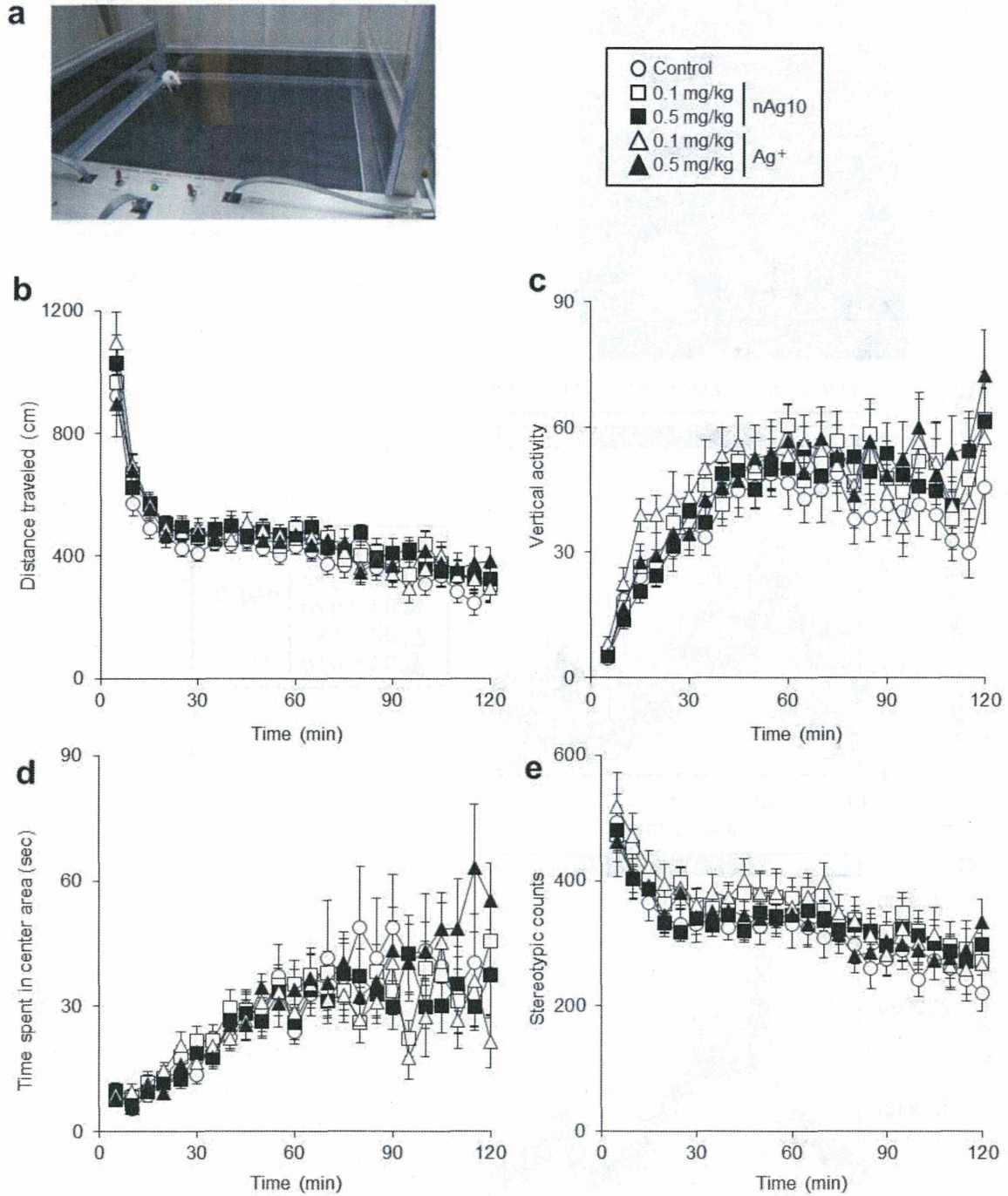


Figure 23. オープンフィールドテスト. 新奇環境下での自発運動量の測定には、オープンフィールド装置を用いた。マウスをフィールド（40×40×30 cm）で 120 分間自由に行動させた。総移動距離、垂直運動の回数、フィールド中央部での滞在時間、及びステレオタイプ行動の回数を VersaMax system により記録した。Data are reported as means \pm SEMs (n = 14–20).

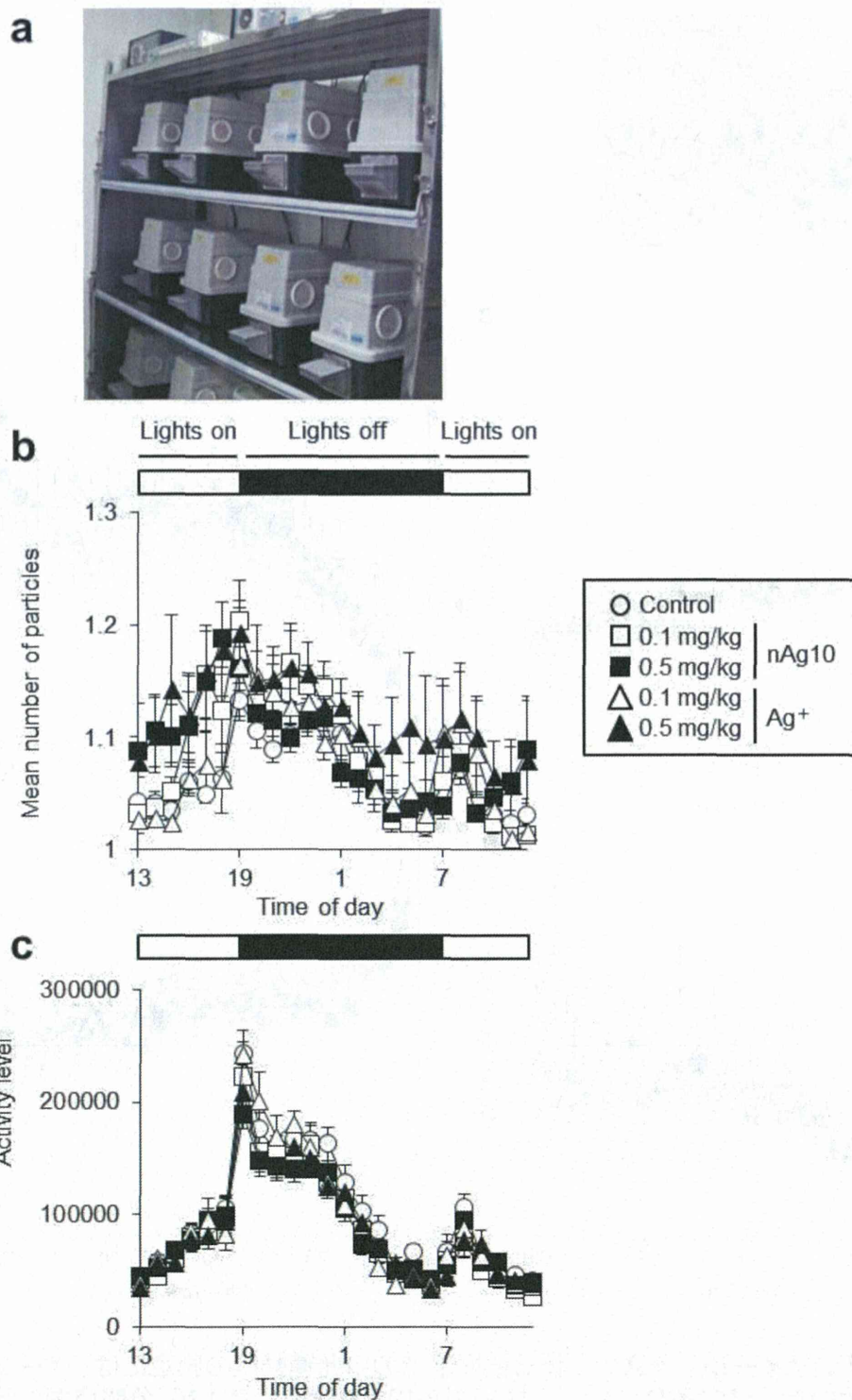


Figure 24. ホームケージ解析. 通常飼育環境下での自発運動量をホームケージ解析により評価した。2 匹のマウスを解析用ケージ(29 × 18 × 12 cm)で 1 週間飼育した際の行動をカメラにより記録した。2 匹のマウスの接触頻度 (接触していれば 1、していなければ 2 と評価)、及び自発運動量を解析した。データの取得と解析には Image HA ソフトウェアを使用した。解析ケージに入れる 2 匹のマウスは、1) 群が同じ、2) 同じケージにいたことがない、3) 体重の差が 10%以内、であることを満たしていることを条件とした。接触頻度と自発運動量は、解析 3 日目正午から 6 日目正午までの 3 日間分のデータについて、時刻ごとの平均値をプロットし、グラフ化した。Data are reported as means ± SEMs (n = 7-10 pairs).

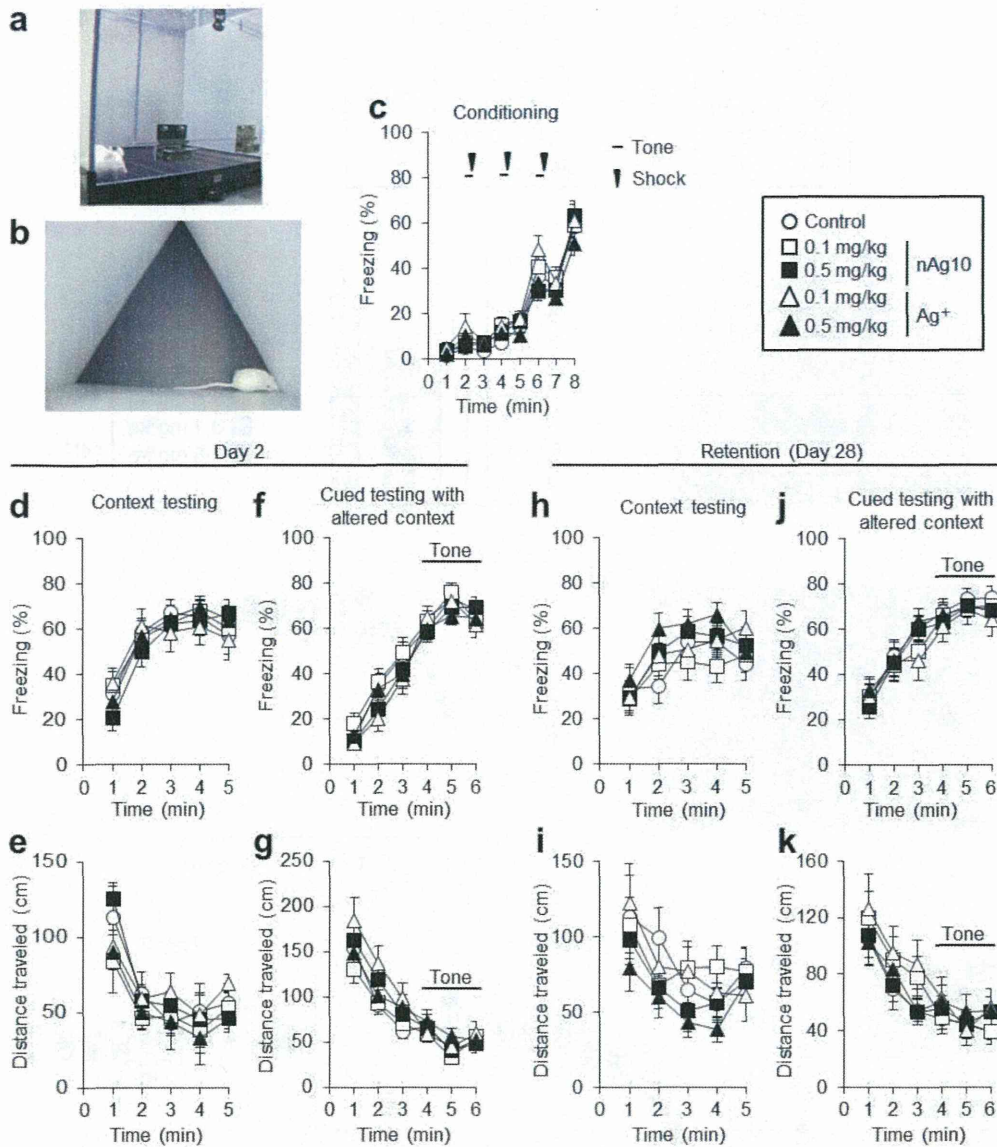


Figure 25. 記憶機能の検討. マウスに特定の刺激（条件刺激）と恐怖を関連付けさせた（条件付け）。これは、マウスをテストチャンバー（Figure 24a、26×34×29 cm、O'Hara & Co.）に入れ、2分間自由に探索させた後、55dBの白色雑音を条件刺激として30秒間提示し、最後の2秒間に床に電気刺激（0.3 mA）を無条件刺激（恐怖刺激）として与えることで行った。上記の条件刺激+無条件刺激は2分間隔で計3回提示した。文脈記憶能力が高いほど、後日、条件刺激を与えた際に、マウスがより大きな恐怖を感じると思われる。条件付けでは、マウスのすくみ（Freezing）時間を指標に、マウスが恐怖状態にあることを確認した。文脈記憶の検討は、空間情報と恐怖の関連付けを指標とするもの（試行1）と、音刺激と恐怖の関連付けを指標とするもの（試行2）、2つを実施した。試行1では条件付けから24時間後に、マウスを条件付けと同じテストチャンバーに5分間入れ自由行動させた際の、マウスのすくみ時間の割合、及び移動距離を測定した。試行2では、試行1終了後に、条件付けに用いたものとは異なるチャンバー（Figure. 24b、35×35×40 cm）を用いて実施した。マウスをチャンバーに入れ3分間自由に探索させた後、条件刺激として用いた55 dBの白色雑音を3分間提示した際の、マウスのすくみ時間の割合、及び移動距離を測定した。また、条件付けから32日後に、試行1、試行2を再度実施し、文脈記憶の保持能力を検討した。マウスの行動はカメラにより記録し、データの取得と解析にはImage FZソフトウェアを使用した。なお、すくみ反応の検出は画像解析により実施した。1秒あたり1枚の割合で取得する画像に関して、マウスが動いた領域（画素）が、閾値より小さく、2秒以上続いたとき、すくみ反応と判断した。すくみ反応を判断する閾値は、人間による観測と一致するように決定した。Data are reported as means ± SEMs (n = 14–20).

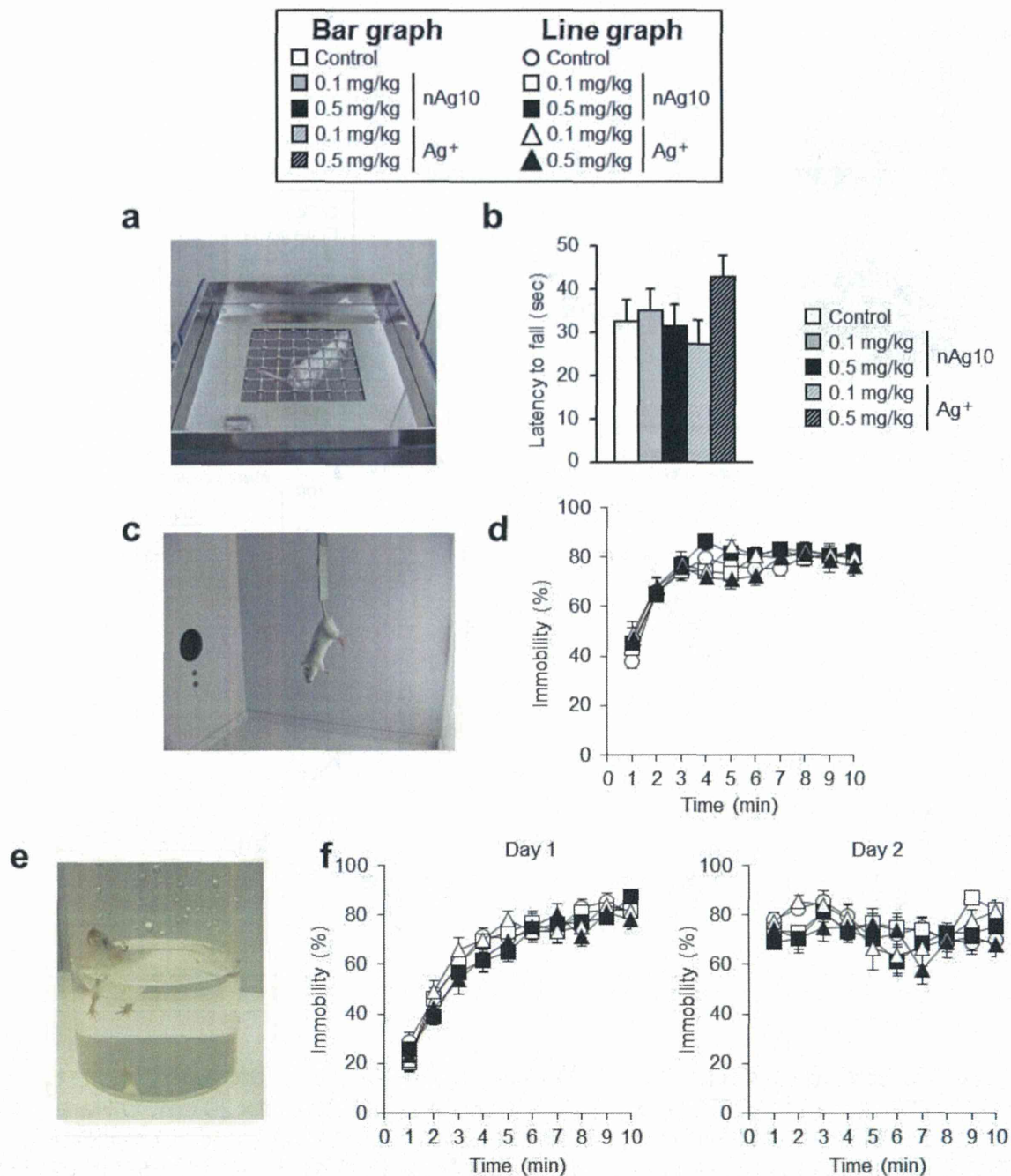


Figure 26. うつ様行動の検討. ワイヤハングテストは、ワイヤハングテスト装置を使用した。装置はチャンバー (21.5×22×23 cm) と天井についたワイヤの格子 (10×10 cm) から構成される。マウスを格子の上に配置し、ワイヤを握らせた後、格子を逆さにし、落下するまでの時間を記録した。落下するまでの時間は 60 秒を上限とした。尾懸垂テストでは、マウスの尾の先端からおよそ 1 cm を粘着テープで留め、床から 30 cm の高さにつら下げ、10 分間のマウスの不動率を測定した。マウスの行動はカメラにより記録し、データの取得と解析には Image TS ソフトウェアを使用した。ポーソルト強制水泳テストでは、円柱の容器 (高さ 20 cm×直径 10 cm) に次亜塩素酸水 (23-25 °C) を 8 cm の高さまで満たした。この容器中にマウスを入れ、10 分間のマウスの不動率を測定した。試行は 2 日連続で実施した。マウスの行動はカメラにより記録し、データの取得と解析には Image PS ソフトウェアを使用した。Data are reported as means ± SEMs (n = 14-20).

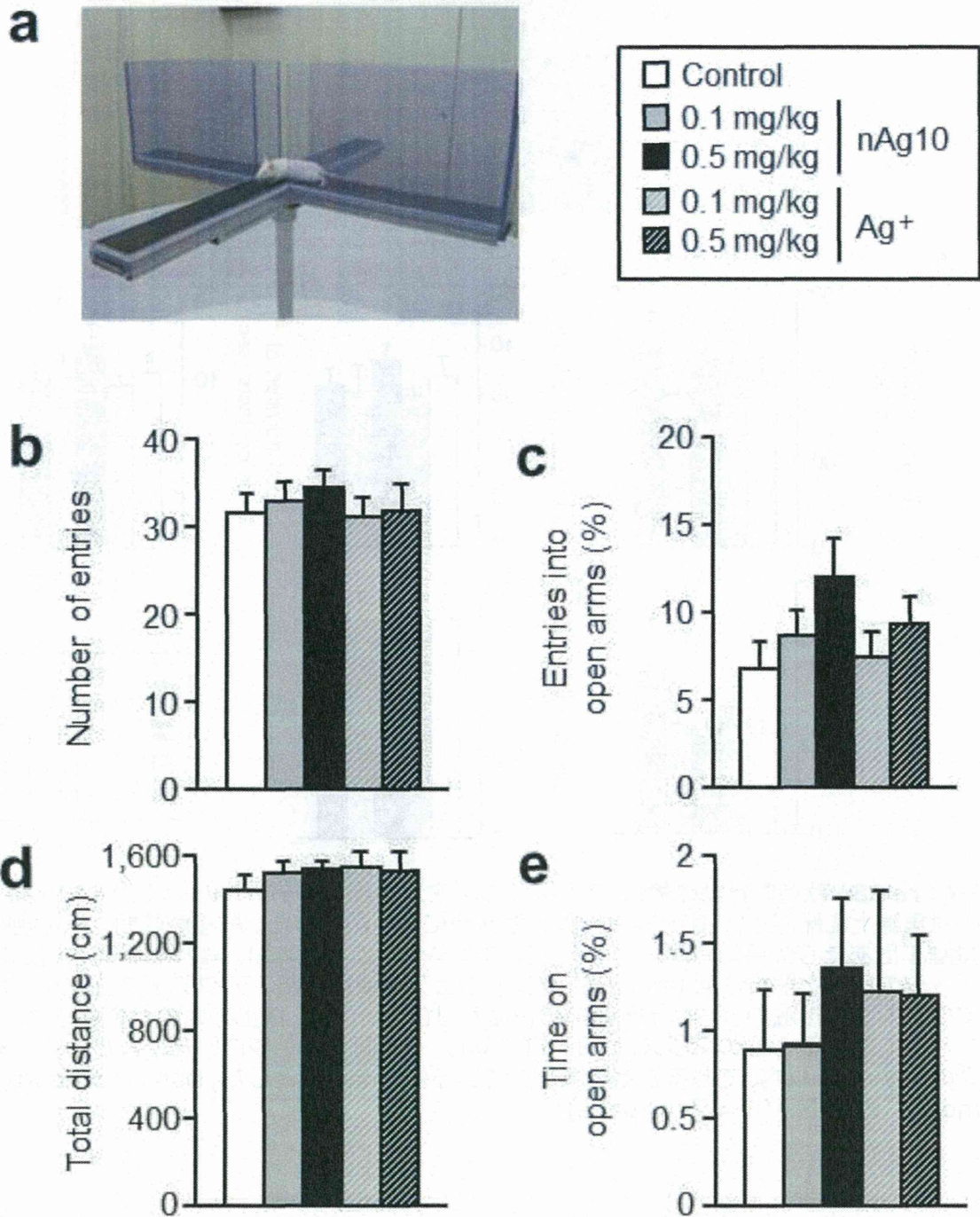


Figure 27. 不安様行動の検討. 高架式十字型迷路は、3 mm の高さの柵がある 2 本のオープンアーム (25×5 cm) と高さ 15 cm の透明な壁で囲まれたクローズドアームから成る装置を用いた。アームは床の上から 55 cm の高さに設置した。マウスを迷路の中央 (5×5 cm) に配置し、10 分間の行動を記録した。オープンアームへ進入した割合、オープンアームでの滞在時間、総進入回数、および総移動距離を測定した。マウスの行動はカメラにより記録し、データの取得と解析には Image EP ソフトウェアを使用した。Data are reported as means ± SEMs (n = 14-20).

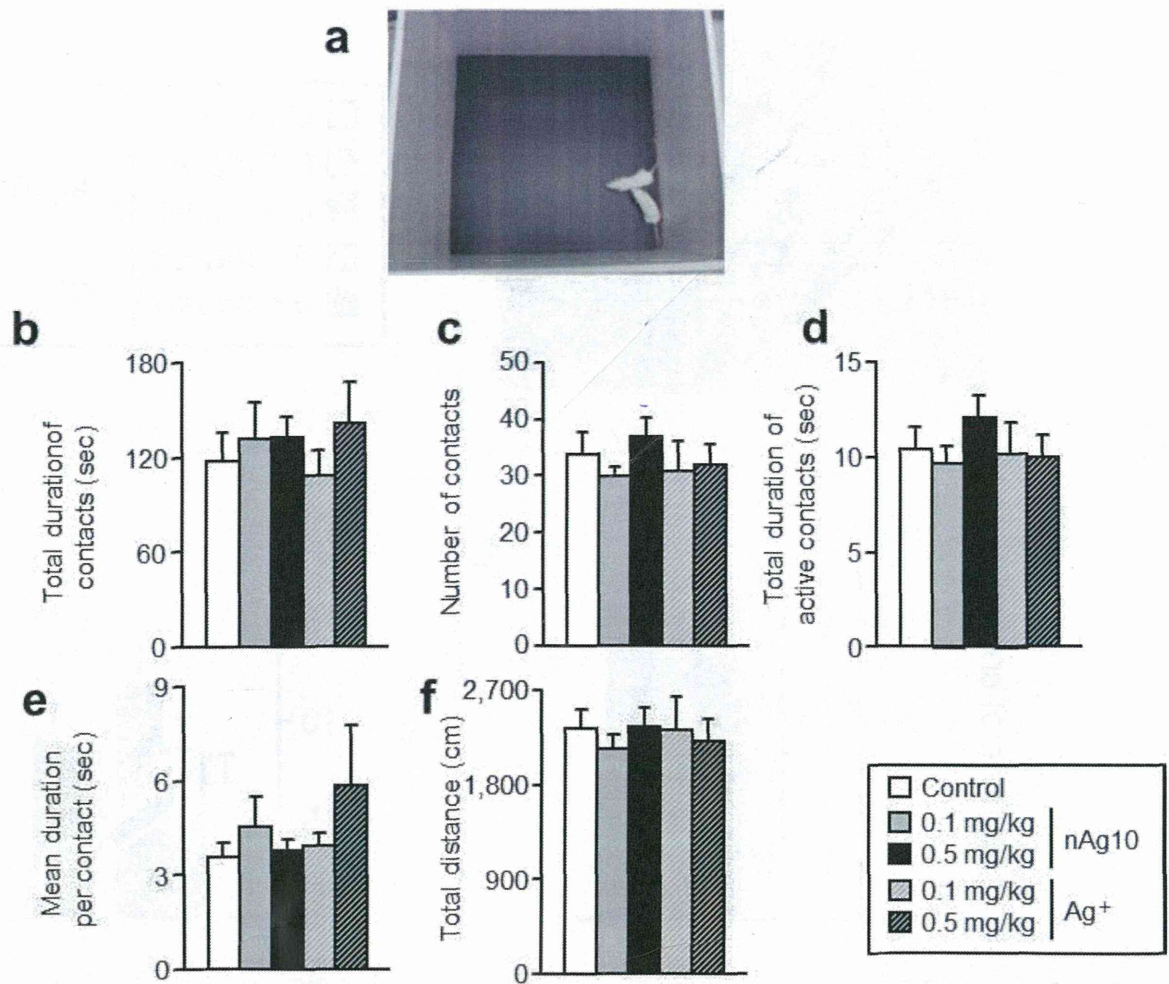


Figure 28. 社会的行動の検討. 2 匹のマウスを新奇環境のチャンバー (40×40×30 cm) の対角線上に配置し、10 分間の行動をカメラにより記録した。総接触時間、総接触回数、接触 1 回あたりの平均時間、アクティブコンタクトの合計時間、総移動距離を測定した。データの取得と解析には Image SI ソフトウェアを使用した。アクティブコンタクトは、マウス同士の接触のうち、接触直前の速度が 10 cm/sec 以上のものと定義した。チャンバーに入れる 2 匹のマウスは、1) 群が同じ、2) 同じケージにいたことがない、3) 体重の差が 10%以内、であることを満たしていることを条件とした。Data are reported as means ± SEMs (n = 7-10 pairs).

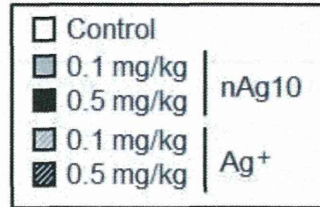
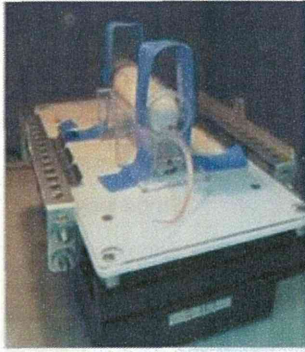
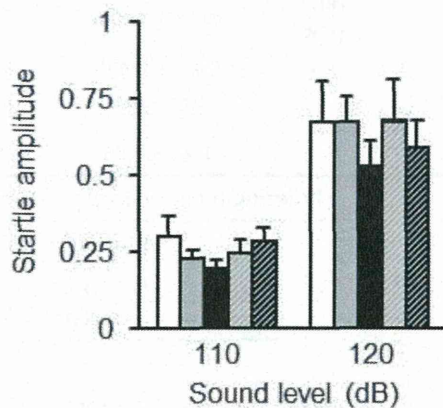
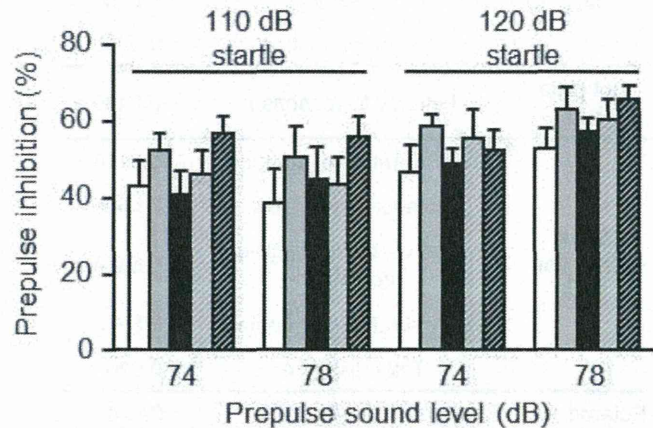
a**b****c**

Figure 29. 仔の聴覚性驚愕反応、プレパルス抑制の評価. 聴覚性驚愕反応、プレパルス抑制の測定には、驚愕反応測定システムを用いた。マウスをプレキシガラス製のシリンダーに入れ、10分間馴化させた後、測定を開始した。測定中のチャンバー内のバックグラウンドノイズは70 dBに設定した。驚愕反射を引き起こす刺激は白色雑音を用い、すべての試験において40ミリ秒間マウスに与え、600ミリ秒間の驚愕反射を記録した。試行は6つのセッション(2つの聴覚性驚愕反応と4つのプレパルス抑制)から構成された。驚愕刺激の強度は110および120 dBを用いた。プレパルスの強度は74および78 dBを用い、驚愕刺激の100ミリ秒前から提示した。プレパルスと驚愕刺激は、74-110、78-110、74-120、および78-120 dBの4つの組み合わせを使用した。1試行にこれら6つのセッションをランダムに提示した。また、各セッションの間隔は平均15秒(10-20秒の範囲)とした。驚愕刺激を与えた際のマウスの振幅を測定した。なお、プレパルスを与えた際の聴覚性驚愕反応の抑制率は、「 $100 \times \{(\text{プレパルスが無い際の聴覚性驚愕反応}) - (\text{プレパルスが有る際の聴覚性驚愕反応})\} / (\text{プレパルスの無い際の聴覚性驚愕反応})$ 」により算出した。Data are reported as means \pm SEMs ($n = 14-20$).

Test	Index	P value
Grip strength test	Grip strength	0.4857
Wire hang test	Latency to fall	0.2966
Open field test	Distance traveled	0.6003
	Vertical activity	0.6017
	Time spent in center area	0.8241
	Stereotypic counts	0.6507
Elevated plus maze test	Number of entries	0.8623
	Entries into open arms	0.2373
	Total distance	0.8397
	Time on open arms	0.8929
Hot plate test	Latency to response	0.8499
Social interaction test	Total duration of contacts	0.8116
	Number of contacts	0.6588
	Total duration of active contacts	0.6328
	Mean duration per contact	0.5605
	Total distance	0.9263
Rotarod test	Latency to fall	0.4668
Prepulse inhibition test	Startle amplitude	0.7664
	Prepulse Inhibition (followed by 110 dB pulse)	0.3783
	Prepulse Inhibition (followed by 120 dB pulse)	0.4053
Porsolt forced swim test	Immobility (day 1)	0.7311
	Immobility (day 2)	0.5175
	Distance traveled (day 1)	0.7555
	Distance traveled (day 2)	0.3378
Tail suspension test	Immobility	0.3930
Home cage monitoring	Mean number of particles	0.3566
	Activity level	0.4873

Test	Index	P value		
Gait analysis	Front paw	Swing/stride	0.8914	
		Brake/stride	0.2053	
		Propel/stride	0.1764	
		Stance width	0.1359	
		Stride length	0.5024	
	Hind paw	Step angle	0.7234	
		Paw angle	0.3579	
		Swing/stride	0.6763	
		Brake/stride	0.7684	
		Propel/stride	0.4108	
Fear conditioning test	Day 2	Context testing	Stance width	0.6761
			Stride length	0.4519
		Cued testing with altered context	Step angle	0.2981
			Paw angle	0.3508
			Freezing (conditioning)	0.3283
	Day 28	Context testing	Freezing	0.9674
			Distance traveled	0.6394
		Cued testing with altered context	Freezing (1-3 min)	0.4631
			Freezing (4-6 min)	0.9442
			Distance traveled (1-3 min)	0.2005
Day 28	Context testing	Distance traveled (4-6 min)	0.8872	
		Freezing	0.5465	
	Cued testing with altered context	Distance traveled	0.6087	
		Freezing (1-3 min)	0.9113	
		Freezing (4-6 min)	0.8943	
Day 28	Cued testing with altered context	Distance traveled (1-3 min)	0.6321	
		Distance traveled (4-6 min)	0.8303	

Figure 30. 行動試験の結果のまとめ.

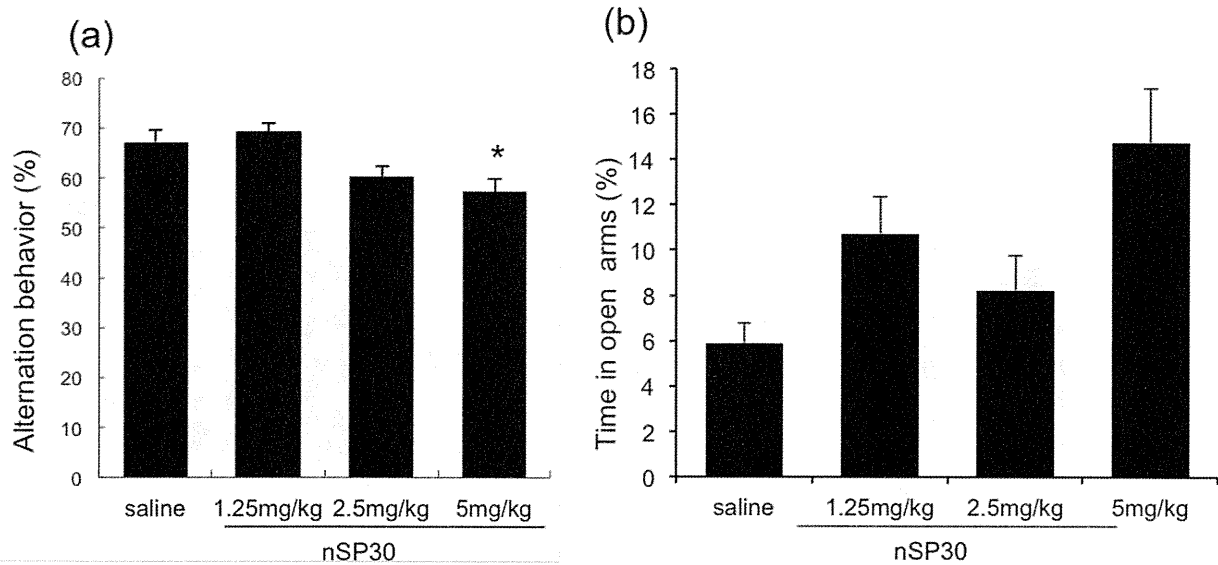


Figure 31. 雄親を介した次世代影響評価. マウスに、nSP30 を 1 日おきに 4 回、静脈内投与した。投与開始から 35 日後に、未処置のマウスと 4 日間交配させた後に、雌マウスに自然分娩させた。産まれてきた仔を 9 週齢まで飼育し、(a) Y-maze テスト、および (b) Elevated plus maze テストを実施した。Data are reported as means \pm SEMs.