

投与した結果、両粒子ともに各臓器および細胞内への侵入性および局在性はほぼ同様の傾向を示した。鼻粘膜では嗅細胞内、支持細胞内に粒子の侵入が観察された(写真 9-A、9-B)。嗅球では糸球体層から分子層の神経細胞の神経線維内およびミトコンドリア内に粒子の侵入が観察された(写真 9-C、9-D)。大脳皮質ではグリア細胞内、神経網内、前シナプスおよび後シナプス内に粒子の侵入が観察された(写真 10-A、10-B)。大脳髄質ではグリア細胞内、ミエリン内、後シナプス内に粒子の侵入が観察された(写真 10-C、10-D)。海馬では神経細胞樹状突起内、希突起膠細胞内、神経網内に粒子の侵入が観察された(写真 11-A~D)。小脳では神経膠細胞内、無髄神経線維内に粒子の侵入が観察された(写真 12-A~C)。下垂体では前葉の塩基好性細胞内に粒子の侵入が観察された(写真 12-D)。

以上の結果は表 2 にまとめた。

#### 実験 3：経鼻投与実験②の結果

NM の nSP30 と nSP70 の鼻腔からの各臓器および各細胞への浸透性について検討した。

nSP30 投与群の肺では円柱上皮細胞内、肺胞上皮 II 型細胞内および肺胞中隔の間質内に粒子の侵入が観察された(写真 13-A、13-B)。肝ではクッパー細胞に貪食された粒子は観察されなかったが、肝細胞および肝細胞核内に侵入した粒子が観察された(写真 13-C)。脾臓ではリンパ球内、脾洞細網線維内に侵入した粒子が観察された(写真 13-D)。

nSP70 投与群の肺では肺胞上皮 I 型および II 型細胞内に粒子の侵入が観察された(写真 14-A、14-B)。肝臓ではクッパー細胞に貪食された粒子は観察されなかったが、肝細胞および核内に侵入した粒子が観察された(写真 14-C)。脾臓では好中球およびリンパ球内に侵入した粒子が観察さ

れた(写真 14-A)。

以上の結果は表 2 にまとめた。

#### 実験 4：強制経口投与実験の結果

NM の nSP70 と nSP300 の経口からの強制投与による消化器系の臓器および各細胞への侵入性について検討した。

nSP70 投与群の胃では主細胞、壁細胞および壁細胞のミトコンドリア内に粒子の侵入が観察された(写真 15-A)。小腸では吸収上皮細胞内に(写真 15-B)、大腸では杯細胞、吸収上皮細胞および粘膜筋板内に粒子の侵入が観察された(写真 15-C)。肝では肝細胞内に粒子の侵入が観察された(写真 15-D)。

nSP300 投与群の胃では前胃の粘膜固有層の細胞内に(写真 16-A)、小腸および大腸では吸収上皮細胞内に(写真 15-B、15-C)、肝では肝細胞内に粒子の侵入が観察された(写真 15-D)。

以上の結果は表 3 にまとめた。

#### 実験 5：血液精巣関門通過性の実験の結果

NM のマウス尾静脈内投与による血液精巣関門(BTB)に関する実験では nSP70 が精細管内の支持細胞であるセルトリ細胞内(写真 17-A)、生殖細胞である精母細胞(写真 17-B、17-C)、精母細胞核(写真 18-A、18-B)および精子細胞内に観察された(写真 19-A、19-B)。このように nSP70 はセルトリ細胞の密着結合、すなわち BTB を通過し、生殖系の細胞内に侵入することが明らかとなった。

#### D. 考 察

実験 1 では NM の nSP70 と QD の経皮投与における皮膚から各臓器あるいは各細胞への侵入性、さらにはアセトン/ジエチルエーテルの処置あるいは無処置による NM の皮膚からの浸透性の

差異について検討した。

nSP70 および QD はアセトン/ジエチルエーテルの処置、無処置にかかわらず皮膚組織から肝臓および肝細胞内、リンパ節およびリンパ球内、大脳神経細胞内、海馬神経細胞内へと全身性に多臓器に侵入することが判明した。これは粒子が皮膚の表皮から真皮に到達し、ここで血管内あるいはリンパ管内に侵入し、全身性に広がるものと考えられる。しかし、ここで重要なことは粒子が神経細胞内にまで侵入することである。昨年度は70nm のナノシリカの静脈内単回投与による実験で BBB を通過することを明らかにしたが、毛細血管内あるいはグリア細胞内では粒子の侵入は認められていなかった。しかし、今回の実験では NM を 4 週間で計 20 回の反復投与した結果、皮膚からの経路で粒子が脳神経細胞まで侵入したことが判明した。しかし脳内へ侵入した粒子がどのような動態を示すのか、今のところ不明であるが、脳神経系の機能障害を与えるかも知れないことも考えられる。特に QD は肝細胞でゴルギ装置やミトコンドリア・クリステ内に、大脳皮質では前シナプスおよび後シナプス内に侵入し、nSP70 と比較して局在性が異なり、より強い細胞傷害性が懸念される。また、アセトン/ジエチルエーテルによる皮膚透過性を促進させる効果は今回の実験から、細胞内への侵入性等を比較して弱いものと思われた。今回の経皮投与実験は4週間の比較的短い投与期間であったが、今後13週間あるいは26週間の亜慢性毒性実験が望まれ、各臓器や細胞内での局在性、特に蓄積性および細胞毒性についてより詳細に検討する必要があると思われる。

実験2ではNMのnSP50およびnSP70の経鼻投与による鼻腔から脳神経系の細胞への侵入性について検討し、nSP50とnSP70の細胞内への侵入性はほぼ同様の傾向を示し、粒子径の大きさ

による差は認められなかった。

NM を 5 日間連続経鼻投与した結果、鼻粘膜の嗅細胞、嗅球の神経細胞および神経線維内、大脳皮質のグリア細胞および神経細胞、大脳髄質のグリア細胞、海馬の神経細胞、希突起膠細胞および神経網、小脳の神経膠細胞、下垂体の前葉細胞に NM の侵入が観察された。これは NM が主に鼻粘膜の嗅細胞を介して嗅覚神経に沿って海馬に侵入し、さらに他の脳神経細胞に拡張・侵入することを示唆する結果であった。このような結果についてはマウスに粒子径 80 nm および 155 nm の二酸化チタンを鼻からスプレーにより 1 日おきに最長 30 日間吸入させ、吸入 10 日後で両 NM が嗅覚神経に沿って脳に達することが報告されている (参考文献 1)。また、30 日間吸入で特に 80 nm の二酸化チタンは海馬で他の部位と比べて突出して最大蓄積が見られたと報告している。その他ラットでも粒子径 30 nm の酸化マンガンを鼻腔から一日 6 時間で 12 日間噴霧吸入させた結果、NM が嗅覚神経に沿って脳に達するということが報告されている (参考文献 2)。以上の報告と我々の結果と一致する点があり、今回の実験では NM が循環系ではなく嗅覚神経に沿って中枢神経系内に侵入する可能性が高いことを示唆する結果であった。今年度の実験 1 の経皮投与や昨年度の静脈内投与によって NM が毛細血管内皮細胞の BBB を通過して脳内に侵入することを証明された経路だけではなく、全く異なる経路でも短時間で脳神経内に侵入することは NM の製造に直接関わる労働者やその製品を使用する者たちへの安全性に対する懸念を提起するものである。

実験3ではNMのnSP30およびnSP70の経鼻投与により、投与経路から直接侵入し易い臓器の肺、投与経路から離れている臓器の脾臓および肝臓の細胞への侵入性について検討した。

nSP30 および nSP70 の両方ともに肺、脾およ

び肝の細胞内に侵入が認められた。しかし、粒子径の小さいnSP30はnSP70と比較して肺および脾臓では侵入性が広範囲に観察され、局在性の差異が認められた。一方、肝では両者の侵入性の差異は特に認められなかった。

NMの肺への侵入の可能性は、鼻腔から空気とともに気道、気管支に沿って肺胞腔に達し、肺胞上皮細胞内に侵入あるいは取り込まれるものと考えられる。

NMの脾臓への侵入の可能性は、鼻腔には上気道粘膜経路で侵入する抗原に対する粘膜免疫の成立を果たしている鼻腔・咽頭粘膜付随リンパ組織(NALT)が存在しており、NMがNALT内あるいはリンパ球に侵入し、その後リンパ液中を移動し循環して脾臓へ侵入するものと考えられる。

NMの肝への侵入の可能性は、嗅粘膜の構造は嗅上皮と基底膜を境として粘膜固有層からなり、固有層には細い動脈と静脈が存在し、NMは動脈あるいは静脈内に直接侵入して全身性に広がり、肝臓まで侵入するものと考えられた。

実験4ではNMのnSP70とnSP300の強制経口投与による消化器系の臓器および各細胞への侵入性について比較検討した。

nSP70とnSP300はどちらも胃、小腸、大腸および肝臓の組織や細胞内に侵入したが、nSP70はnSP300と比較してどの細胞内にも侵入量が大きく認められた。しかし、NMとしては比較的大きな粒子のnSP300でも肝細胞内まで侵入することが判明した。NMの各組織・細胞内への侵入は胃・小腸・大腸の消化管の細胞内へ直接侵入する粒子、消化管から最終消化物とともに門脈から肝臓に運ばれて肝細胞内に侵入する粒子、また油とともに乳び管から大循環に入り、全身性に拡がる経路が考えられる。

以上のようにNMは皮膚、鼻腔、消化管のいずれから入っても全身性に拡がり、諸臓器から細胞

内に侵入することが判明した。

実験5ではNMが血液精巣関門(BTB)を通過するかどうかを検討した。

精巣には、支持細胞として精子形成において重要な役割を担っているセルトリ細胞が存在しており、生殖細胞に栄養やホルモンを供給するほか、BTBを形成し、有害物質などに対して透過を制限し、精細管の内部環境が恒常に保たれていると考えられている。今回の実験ではnSP70はBTBを通過し、支持細胞であるセルトリ細胞、生殖細胞の精母細胞、精子細胞および精子内に侵入することが明らかとなった。従って、生殖細胞への影響について考えられることは精子の減少や精子形成に異常を来すことである。精巣は次世代をつくるための重要な器官であることから、今後、NMの精巣毒性に関する中・長期の研究が必要不可欠であると思われる。

## E. 結論

ナノシリカを中心にマウスを用いた経皮、経鼻および強制経口投与の動物実験で各種臓器について各細胞内への局在性・侵入性などの差異や特性について透過型電子顕微鏡で観察・検討した。また、BTBについてもnSP70を静脈内投与による通過性についても検討した。

nSP70およびQDは皮膚からリンパ球、肝臓、大脳皮質、海馬の各細胞内に侵入する。nSP50およびnSP70は鼻腔から鼻粘膜、嗅球、大脳、海馬、小脳、下垂体の各細胞内に侵入する。nSP300およびnSP70は肺、脾臓、肝臓の各細胞内に侵入する。nSP70およびnSP300は胃から小腸、大腸、肝臓の各細胞内に侵入する。以上のことが判明し、NMは皮膚、鼻腔、消化管のいずれから曝露されても全身性に拡がり、各細胞内に侵入し、生体の有害影響を引き起こす可能性が強く示唆された。また、nSP70は精巣のBBBを通過し、

生殖細胞内に侵入することも判明した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### ①論文発表

1)論文発表:当該研究事業の成果のみ記載：19 報

1. Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : In vitro nanotoxicological study of silica nanoparticles using dermal cell lines., *Toxicol. Lett.*, 189S: S179-180, 2009.

2. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas., *Toxicol. Lett.*, 189S: S181-182, 2009.

3. Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent intracellular distribution and genotoxicity of amorphous nanosilicas in human keratinocytes., *Toxicol. Lett.*, 189S: S183, 2009.

4. Nakazato Y., Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Differential acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas: The

role of surface physicochemical properties., *Toxicol. Lett.*, 189S: S183, 2009.

5. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells., *Pharmazie*, in press.

6. Nabeshi H., Yoshikawa T., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of Biological Influence of Nano-materials using Toxicokinetics and Toxicoproteomics., *Yakugaku Zasshi*, in press.

7. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : NanoTox studies of nanosilica for ensuring safety-1: "Well-dispersed" amorphous nanosilica produce systemic exposure after topical application and mutagenic activity in vitro., submitted.

8. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : NanoTox studies of nanosilica for ensuring safety-2: "Well-dispersed" amorphous nanosilicas induce fatal toxicity and consumptive coagulopathy after systemic exposure., submitted.



9. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Size-dependent genotoxicity and intracellular distribution of amorphous nanosilica particles., submitted.
10. Nabeshi H., Yoshikawa T., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Relative analysis of Nanotox and surface properties in mice., submitted.
11. Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Relative analysis of nanosilica-induced blood coagulation and surface properties., submitted.
12. Tochigi S., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Nasally administered nanosilica induce blood coagulation and liver injury., submitted.
13. Hirai T., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Co-administration of nanosilica and mite allergen induce rapid and severe atopic dermatitis in Nca/Nga mice., submitted.
14. Hirai T., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Augmentation of cross presentation on dendritic cells by co-treatment with nanosilica and antigen proteins., submitted.
15. Akase T., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Co-culture of nanosilica and RAW264.7 cells potentiate osteoclasts differentiation in vitro., submitted.
16. Kondo S., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Imazawa T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Nanosilicas efficiently penetrate Caco-2 monolayer: Potential gastrointestinal risk of nanosilicas., submitted.
17. Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Imazawa T., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. : Surface modification of silica particles suppresses its inflammatory effect by suppression of the ROS production and subsequent lysosomal rupture., submitted.
18. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Morishita Y., Yoshida T., Fujimura M., Kayamuro H., Nabeshi H., Yamashita T., Saito S., Nagano K., Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Imazawa T., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: NanoTox studies-3: Biodistribution of amorphous nanosilicas in pregnant mice and the potential risk on the fetal growth restriction., submitted.
19. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Morishita Y., Yoshida T., Fujimura M., Kayamuro H., Nabeshi H., Yamashita T., Saito S., Nagano K., Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Imazawa T., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Carbon nanotubes

elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape., submitted.

## ②学会発表

【国内学会発表】：当該研究事業の成果のみ記載

【シンポジウム・招待講演等】：2件

1. 今澤孝喜：電子顕微鏡によるナノマテリアルの形状観察および細胞内への取り込みについての予備的検討。第1回ナノマテリアルの安全性研究セミナー，大阪，2008年1月。

2. 今澤孝喜：電子顕微鏡によるナノマテリアルの主要臓器における各細胞内の局在性に関する研究。第二回ナノマテリアルの安全性研究セミナー，大阪，2009年6月。

【国内学会】：13件

1. 鍋師裕美，吉川友章，杉田敏樹，長野一也，向洋平，今澤孝喜，鎌田春彦，角田慎一，堤康央：ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての安全性評価(1)：トキシコプロテオーム解析。日本薬学会第128年会，横浜，2008年3月。

2. 吉川友章，鍋師裕美，杉田敏樹，長野一也，向洋平，今澤孝喜，鎌田春彦，角田慎一，堤康央：ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての安全性評価(2)：細胞内局在解析。日本薬学会第128年会，横浜，2008年3月。

3. 西森光，磯田勝広，近藤昌夫，今澤孝喜，角田慎一，堤康央，八木清仁：ナノシリカの急性肝毒性と粒子径の相関。日本薬学会第128年会，横浜，2008年3月。

4. 鍋師裕美，吉川友章，杉田敏樹，長野一也，鎌田春彦，今澤孝喜，角田慎一，堤康央：ナノシリカの体内動態と生体影響に関する基礎的検討。第35回日本トキシコロジー学会学術年会，渋谷区(東京)，2008年6月。

5. 今澤孝喜，西森光，角田慎一，吉川友章，鍋師裕美，磯田勝広，近藤昌夫，八木清仁，堤康央：ナノマテリアルの細胞内局在性および細胞毒性について電子顕微鏡による検討。第35回日本トキシコロジー学会，渋谷区(東京)，2008年6月。

6. 鍋師裕美，吉川友章，仲里泰太郎，松山恵吾，今澤孝喜，吉岡靖雄，阿部康弘，河合裕一，眞弓忠範，伊藤徳夫，角田慎一，堤康央：ナノシリカのin vitro安全性評価における血清蛋白質の作用の解析。第36回日本トキシコロジー学会学術年会，盛岡(岩手)，2009年7月。

7. 松山恵吾，吉川友章，鍋師裕美，仲里泰太郎，吉岡靖雄，今澤孝喜，阿部康弘，河合裕一，眞弓忠範，伊藤徳夫，角田慎一，堤康央：非結晶性ナノシリカの皮膚細胞に対する遺伝毒性作用。第36回日本トキシコロジー学会学術年会，盛岡(岩手)，2009年7月。

8. 仲里泰太郎，吉川友章，鍋師裕美，松山恵吾，吉岡靖雄，今澤孝喜，阿部康弘，河合裕一，眞弓忠範，伊藤徳夫，角田慎一，堤康央：非結晶性ナノシリカの表面物性と有害性発現との連関評価。第36回日本トキシコロジー学会学術年会，盛岡(岩手)，2009年7月。

9. 今澤孝喜，有森亮裕，磯部将彰，鍋師裕美，物部容子，角田慎一，堤康央：ナノマテリアルのマ

ウスにおける細胞内局在性に関する研究

第36回日本トキシコロジー学会学術年会, 盛岡(岩手), 2009年7月.

10. 角田慎一, 吉川友章, 鍋師裕美, 赤瀬貴憲, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 向洋平, 岡田直貴, 中川晋作, 堤康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-1 ナノマテリアルの経皮吸収性・体内動態と急性毒性・肝毒性., 第98回日本食品衛生学会学術講演会, 函館(北海道), 2009年10月.

11. 阿部康弘, 吉川友章, 鍋師裕美, 松山恵吾, 近藤小百合, 長野一也, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-3 ナノマテリアルの細胞内動態と遺伝毒性., 第98回日本食品衛生学会学術講演会, 函館(北海道), 2009年10月.

12. 吉岡靖雄, 森重智弘, 吉田徳幸, 稲倉裕, 藤村真穂, 鍋師裕美, 阿部康弘, 長野一也, 吉川友章, 今澤孝喜, 角田慎一, 向洋平, 岡田直貴, 堤康央, 中川晋作: ナノマテリアルの安全確保に向けて-4 ナノマテリアルの動態特性と免疫毒性., 第98回日本食品衛生学会学術講演会, 函館(北海道), 2009年10月.

13. 鍋師裕美, 吉川友章, 仲里泰太郎, 栃木彩恵子, 長野一也, 阿部康弘, 吉岡靖雄, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤康央: ナノマテリアルの安全確保に向けて-6 表面修飾ナノシリカの安全性評価と安全なナノマテリアルの開発支援., 第98回日本食品衛生学会学術講演会, 函館(北海道), 2009年10月.

【国際学会発表】: 7件

1. Nabeshi H., Yoshikawa T., Nakazato Y., Matsuyama K., Arimori A., Isobe M., Imazawa T., Abe Y., Kamada H., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Influence of physicochemical property of nano-silicas on in vivo biological behavior (1)., 第37回日本環境変異原学会, 宜野湾(沖縄), 2008年12月.

2. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Imazawa T., Abe Y., Kamada H., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent biological behavior of nano-silicas., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore (U.S.A.), 15-19 March, 2009.

3. Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Matsuyama K., Arimori A., Isobe M., Imazawa T., Abe Y., Kamada H., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Influence of physicochemical properties of nano-silica particles on in vivo toxicity., Society of Toxicology 48th Annual Meeting & ToxExpo, Baltimore (U.S.A.), 15-19 March, 2009.

4. Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : In vitro nanotoxicological study of silica nanoparticles using dermal cell lines., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.

5. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y.,

Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.

6. Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent intracellular distribution and genotoxicity of amorphous nanosilicas in human keratinocytes., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.

7. Nakazato Y., Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K, Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Differential acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas: The role of surface physicochemical properties., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### ①特許取得

該当なし

##### ②実用新案登録

該当なし

##### ③その他

該当なし

#### I. 研究協力者

物部 容子 (独) 医薬基盤研究所生物資源研究部  
共用機器実験室 技術補助員

#### 参考文献

1. Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z, Chen C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Toxicology*, 254(1-2), 82-90, 2008.

2. Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdörster G. Translocation of Inhaled Ultrafine Manganese Oxide Particles to the Central Nervous System. *Environmental Health Perspectives*, 114, 8, 1172-1178, 2006

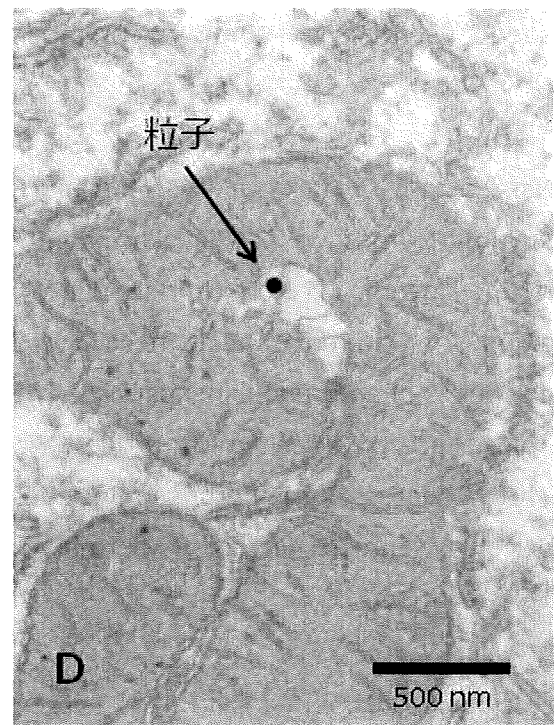
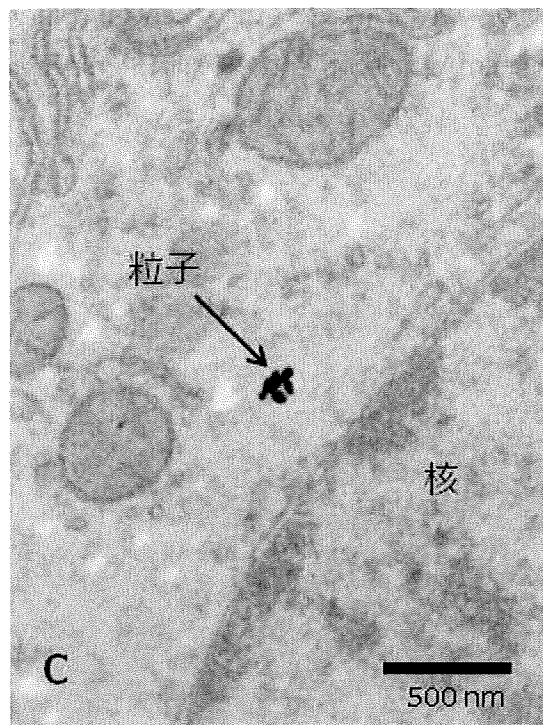
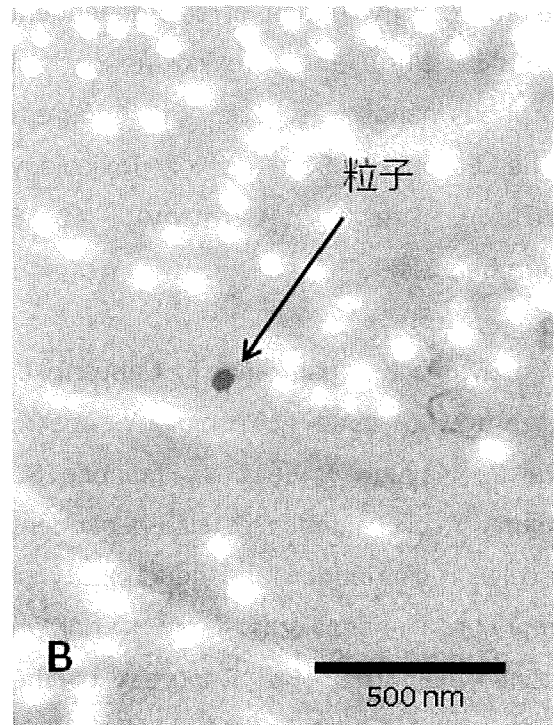
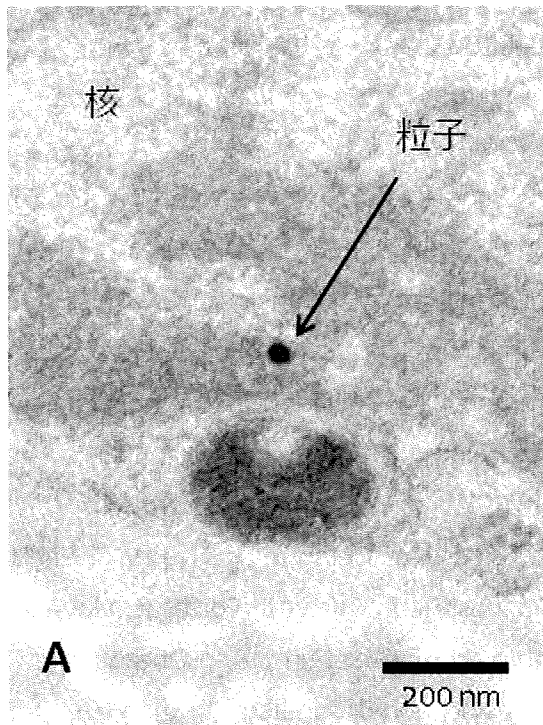


写真1 実験1のアセトン/ジエチルエーテル無処置でnSP70を経皮投与  
 A: 皮膚組織の角化細胞核内に粒子が観察される  
 B: 皮膚組織の膠原線維内に粒子が観察される  
 C: 肝細胞内に数個の粒子が観察される  
 D: 肝細胞のミトコンドリア内に粒子が観察される  
 全て無染色で観察



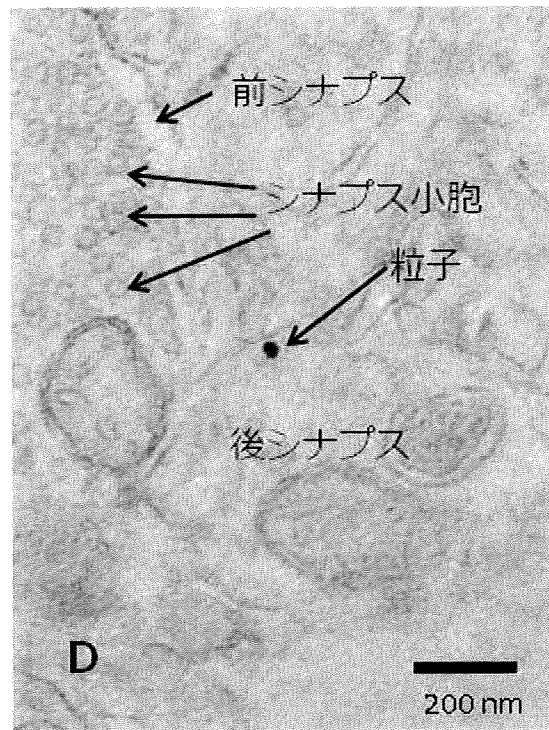
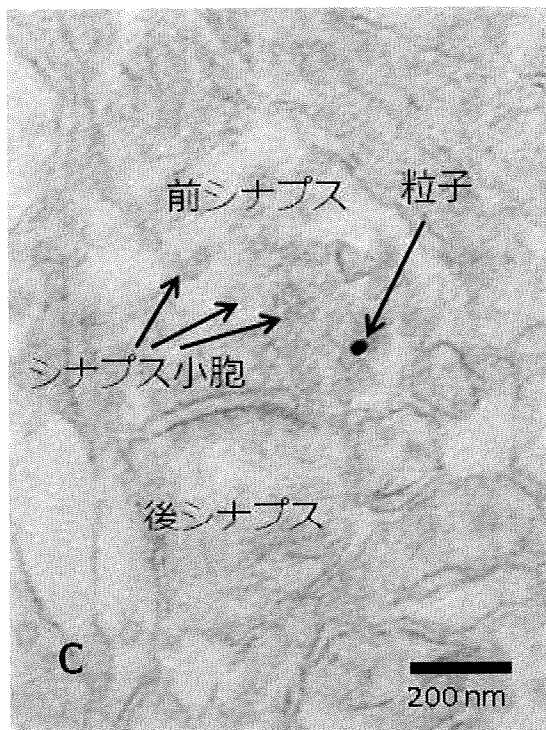
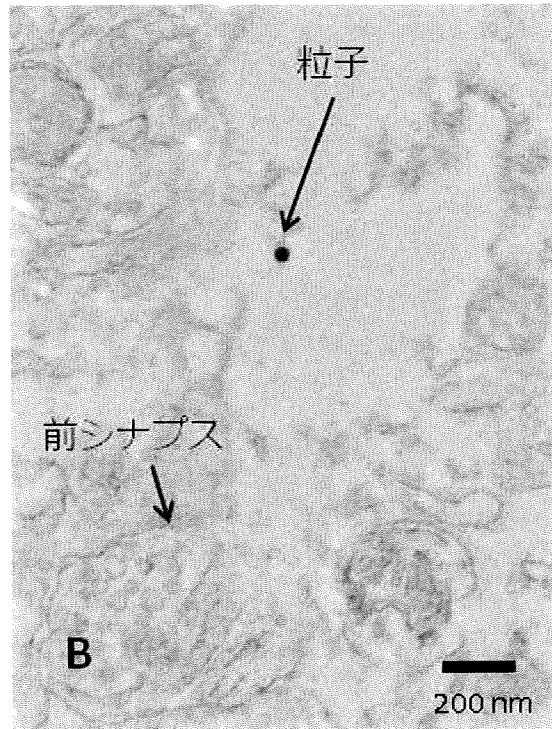
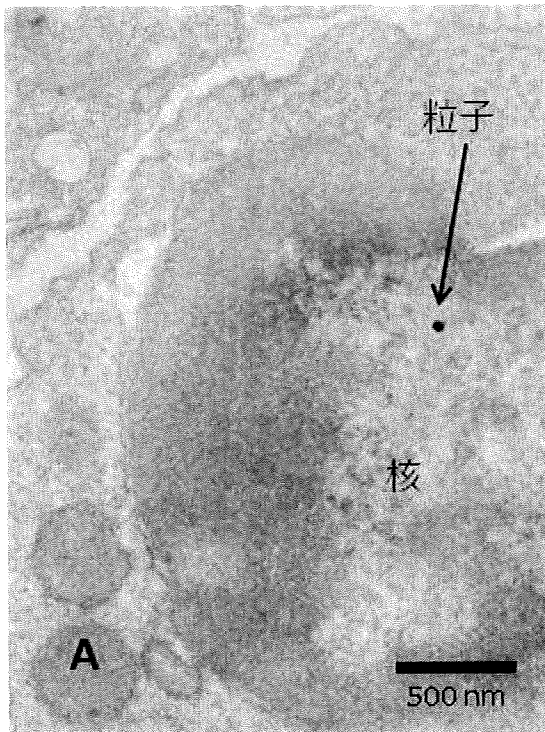


写真2 実験1のアセトン/ジエチルエーテル無処置でnSP70を経皮投与  
 A: リンパ球核内に粒子が観察される  
 B: 大脳皮質神経網内に粒子が観察される  
 C: 海馬の前シナプス内に粒子がシナプス小胞と共に観察される  
 D: 海馬の後シナプス内に粒子が観察される  
 全て無染色で観察

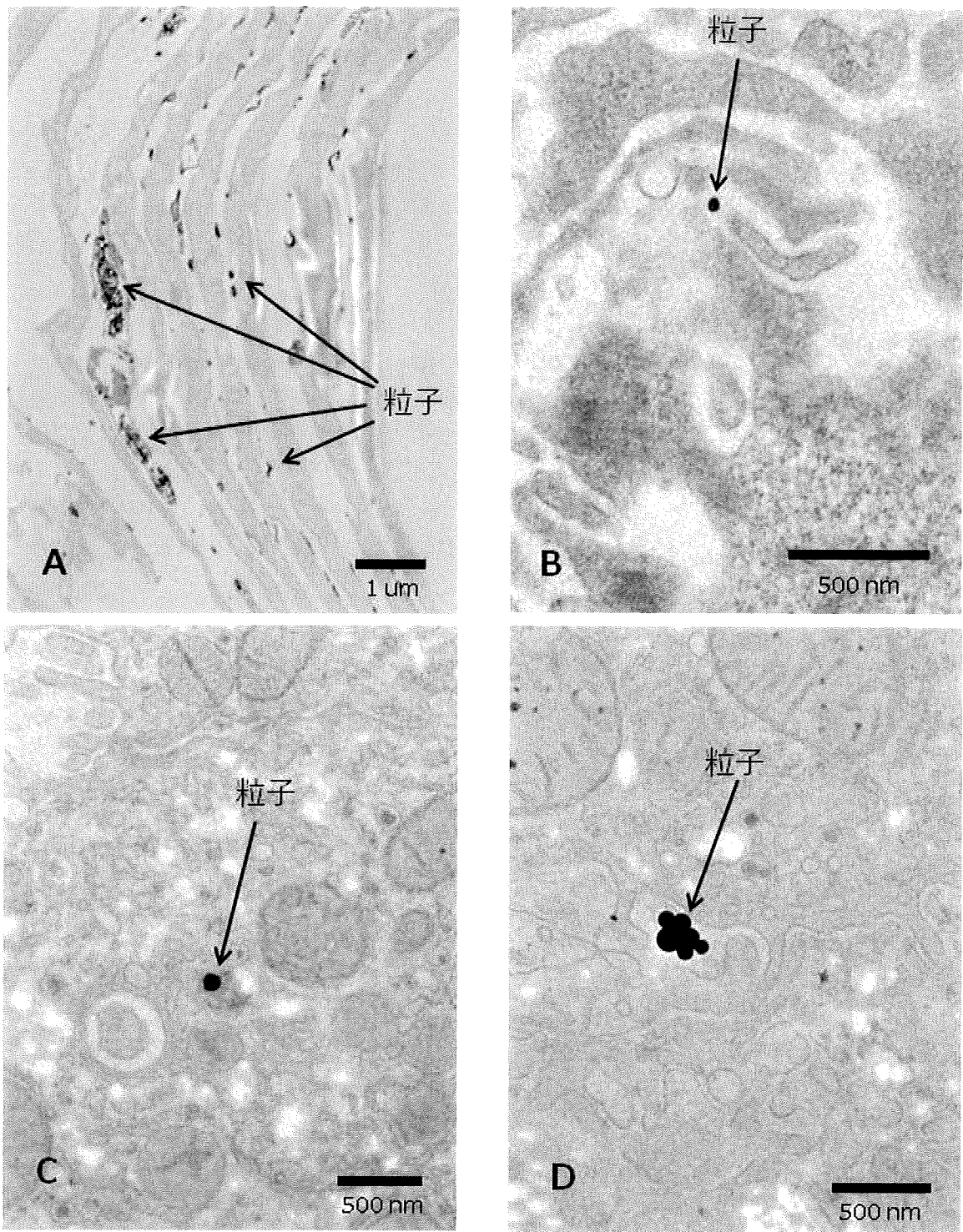


写真3 実験1のアセトン/ジエチルエーテル処置でnSP70を経皮投与

- A: 皮膚組織の表層に多数の粒子が観察される
  - B: 皮膚組織の角化細胞内に粒子が観察される
  - C: 肝細胞内に粒子が観察される
  - D: 肝のディッセ腔内に数個の凝集した粒子が観察される
- 全て無染色で観察



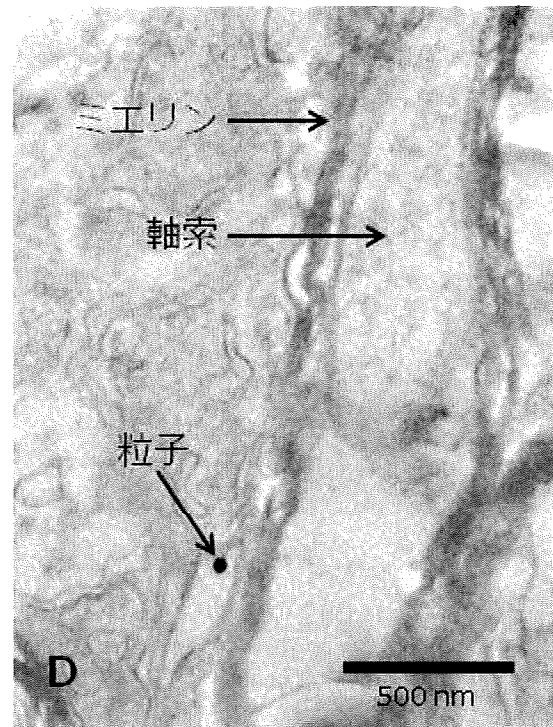
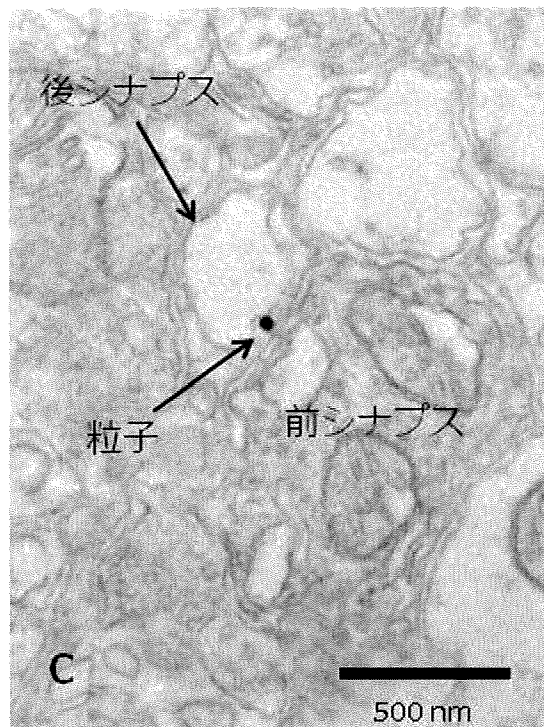
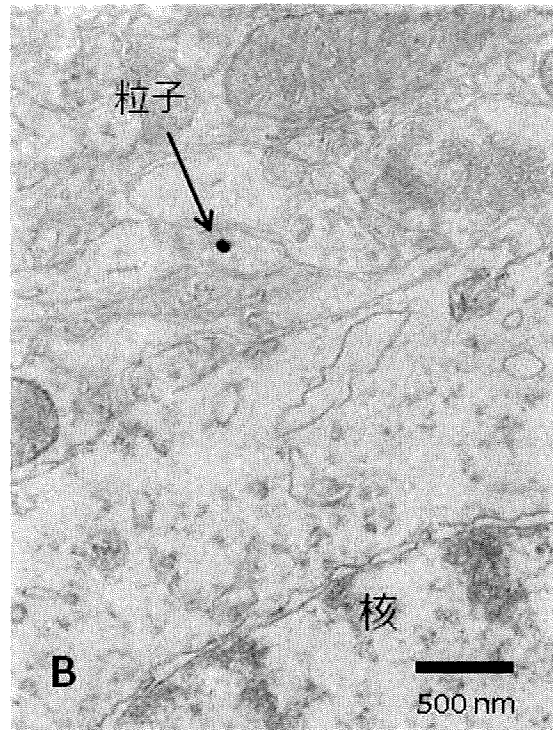
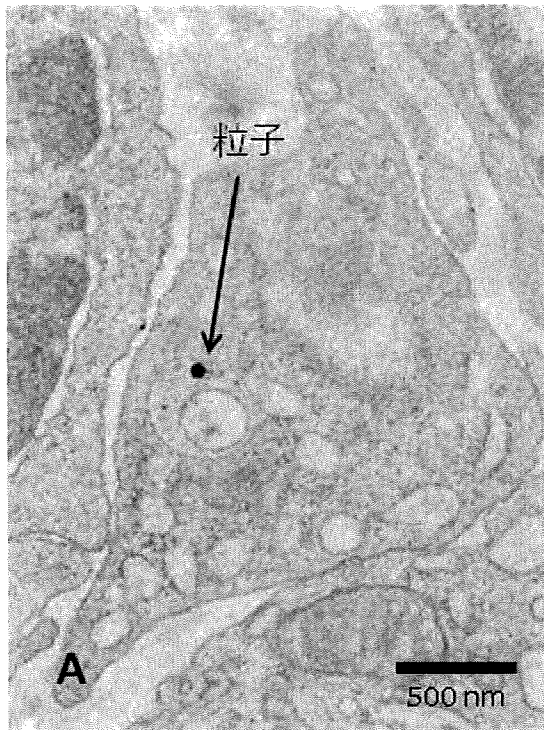


写真4 実験1のアセトン/ジエチルエーテル処置でnSP70を経皮投与  
 A: リンパ節の細網細胞内に粒子が観察される  
 B: 大脳皮質の神経網内に粒子が観察される  
 C: 海馬の後シナプス内に粒子が観察される  
 D: 海馬の希突起膠細胞内に粒子が観察される  
 全て無染色で観察



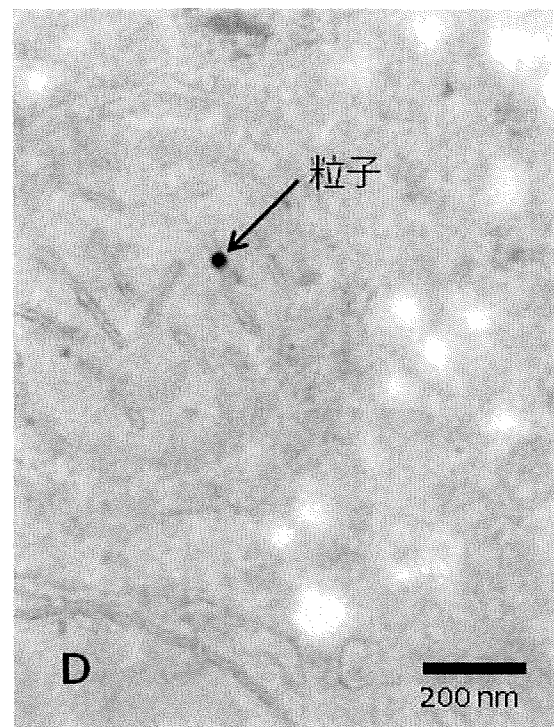
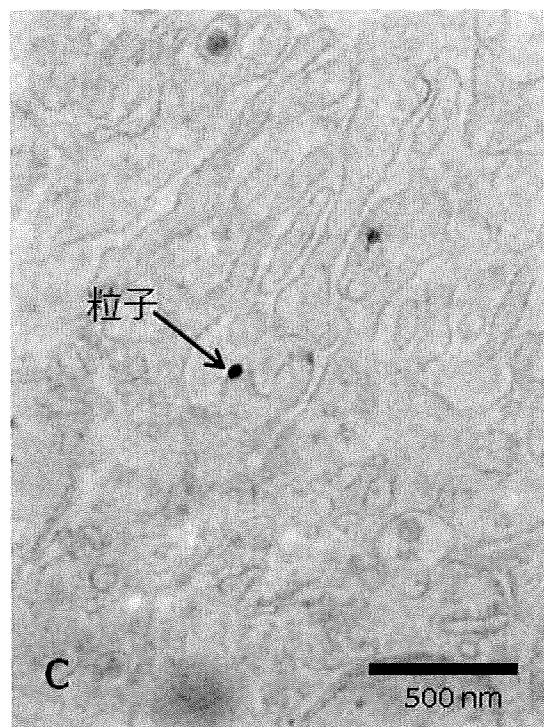
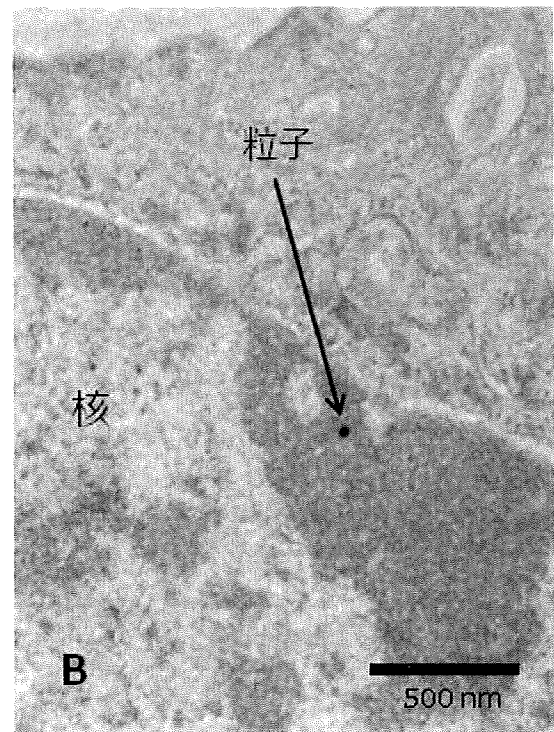
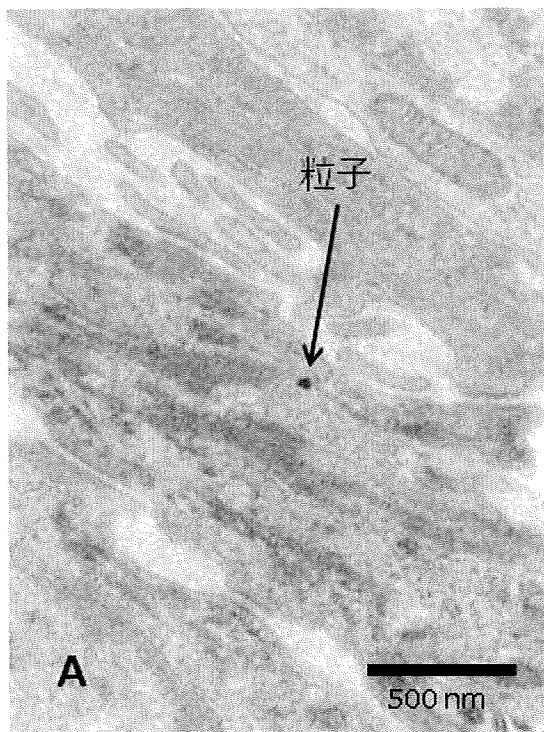


写真5 実験1のアセトン/ジエチルエーテル無処置でQDを経皮投与  
 A: 皮膚組織角化細胞内に粒子が観察される  
 B: 皮膚組織棘細胞核内に粒子が観察される  
 C: 肝細胞のゴルジ装置内に粒子が観察される  
 D: 肝細胞のミトコンドリアのクリステ内に粒子が観察される  
 全て無染色で観察

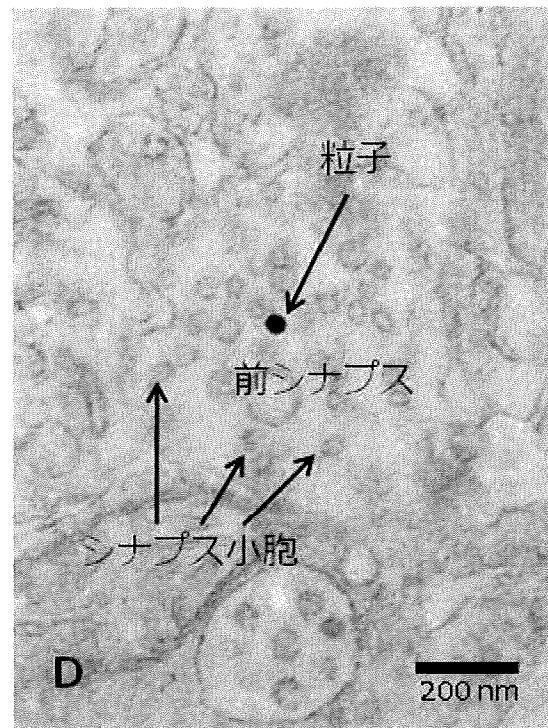
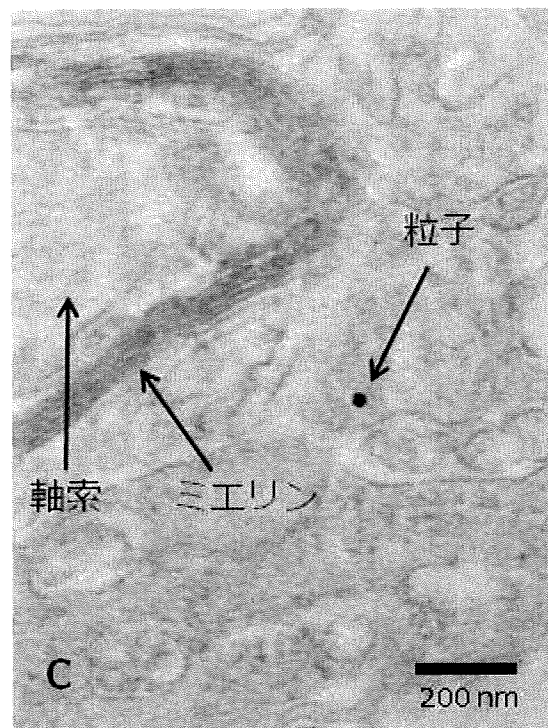
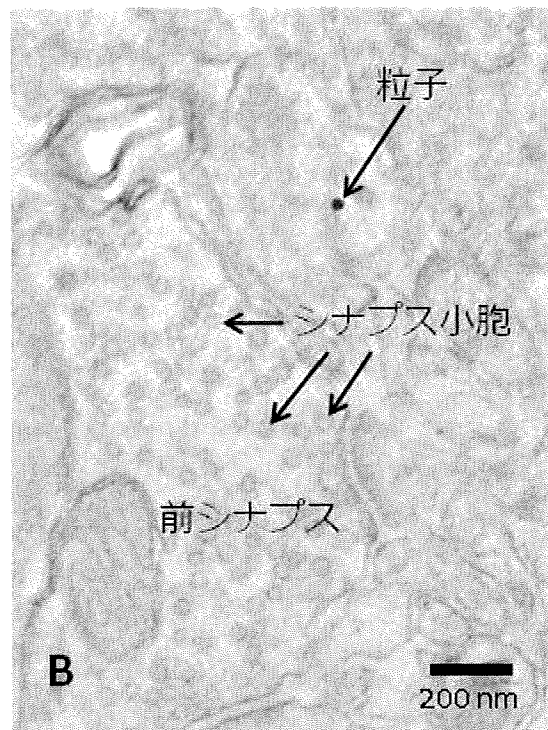
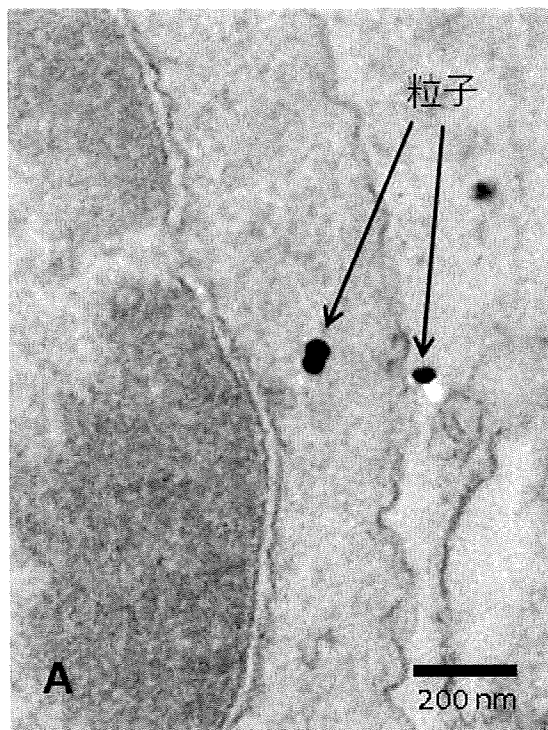


写真6 実験1のアセトン/ジエチルエーテル無処置でQDを経皮投与

- A: リンパ球内に数個の粒子が観察される
  - B: 大脳皮質神経網内に粒子が観察される
  - C: 海馬の希突起膠細胞内に粒子が観察される
  - D: 海馬の前シナプス内に粒子が観察される
- 全て無染色で観察



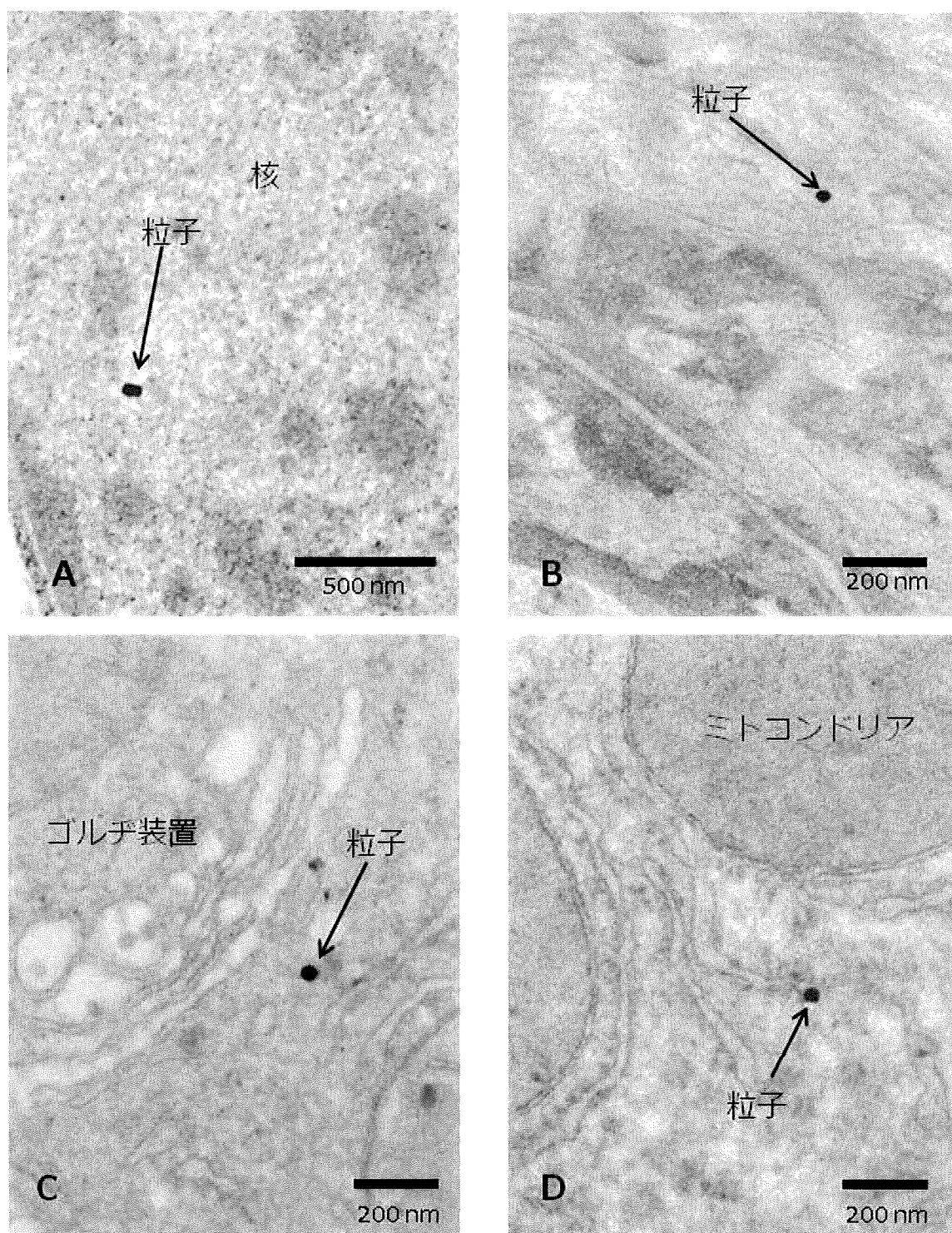


写真7 実験1のアセトン/ジエチルエーテル処置でQDを経皮投与

A: 皮膚組織の角化細胞核内に粒子が観察される

B: 皮膚組織の角化細胞内に粒子が観察される

C: 肝細胞内に粒子が観察される

D: 肝細胞の小胞体内に粒子が観察される

全て無染色で観察

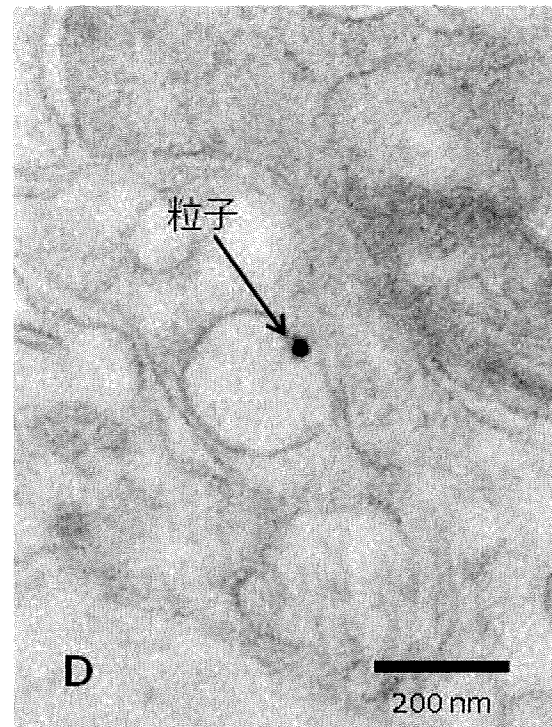
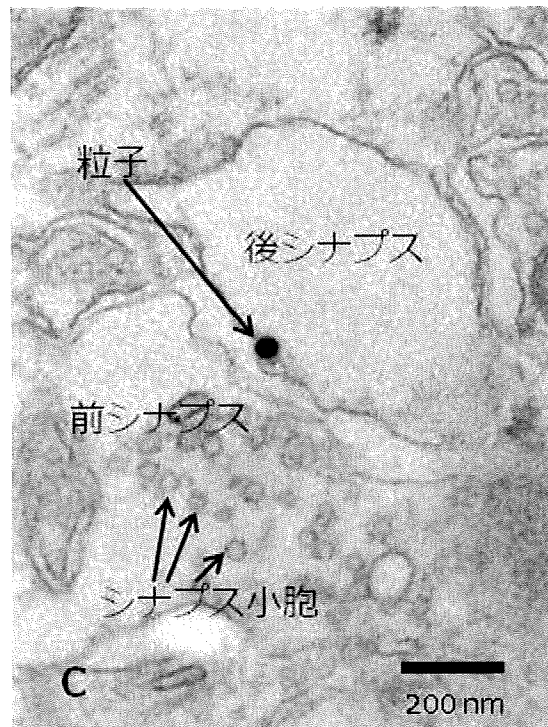
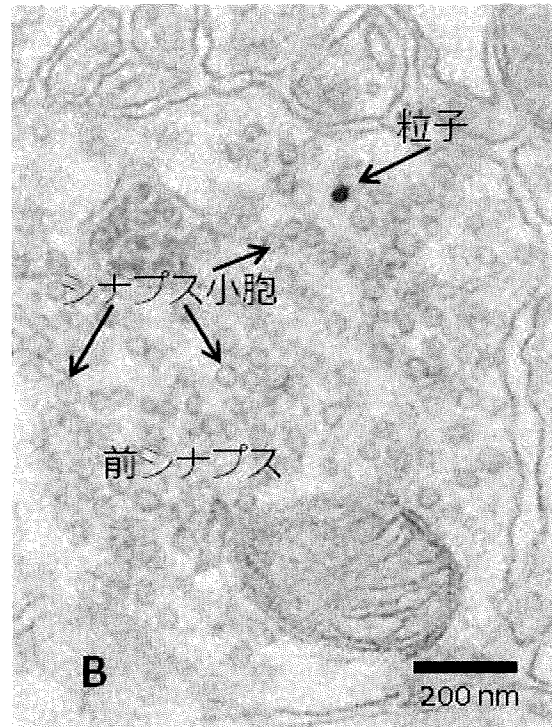
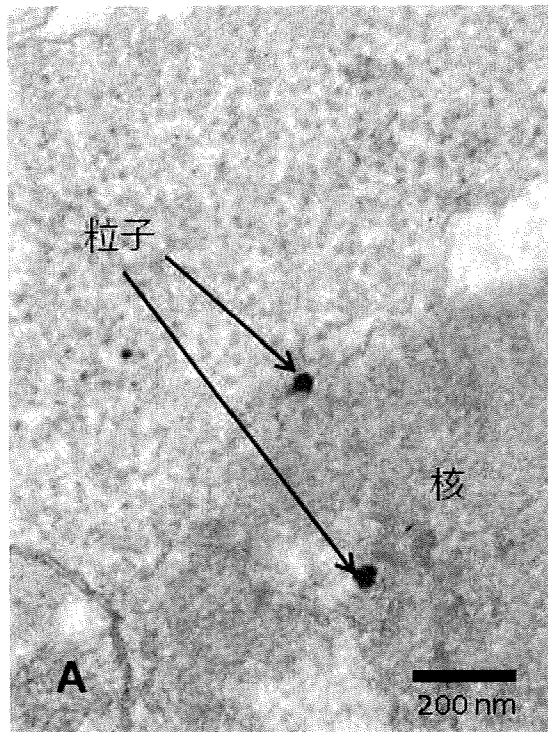


写真8 実験1のアセトン/ジエチルエーテル処置でQDを経皮投与  
 A: リンパ球核内に粒子が観察される  
 B: 大脳皮質前シナプス内にシナプス小胞と共に粒子が観察される  
 C: 海馬の後シナプス内に粒子が観察される  
 D: 海馬の神経網内に粒子が観察される  
 全て無染色で観察



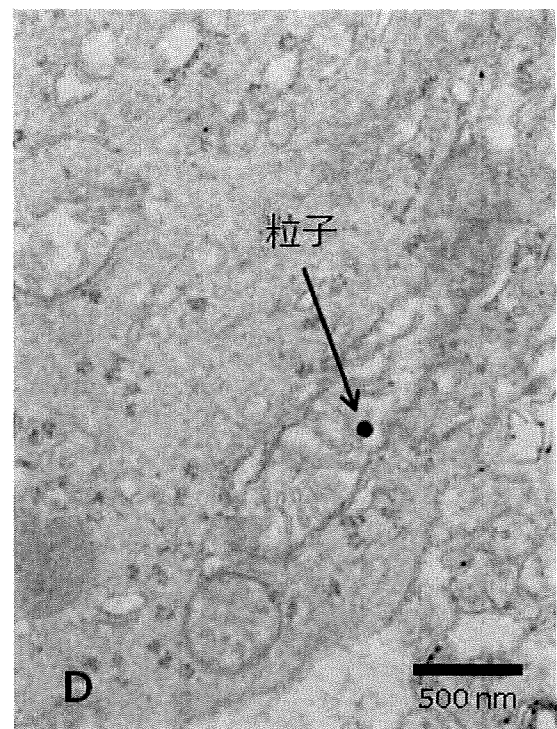
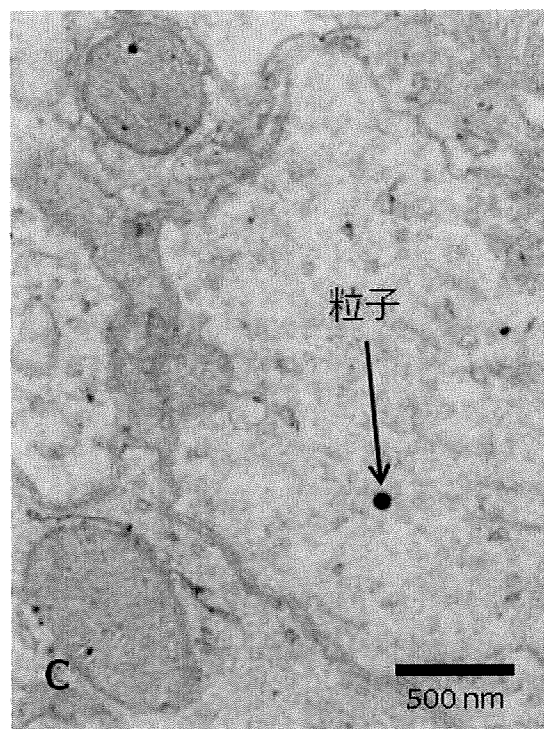
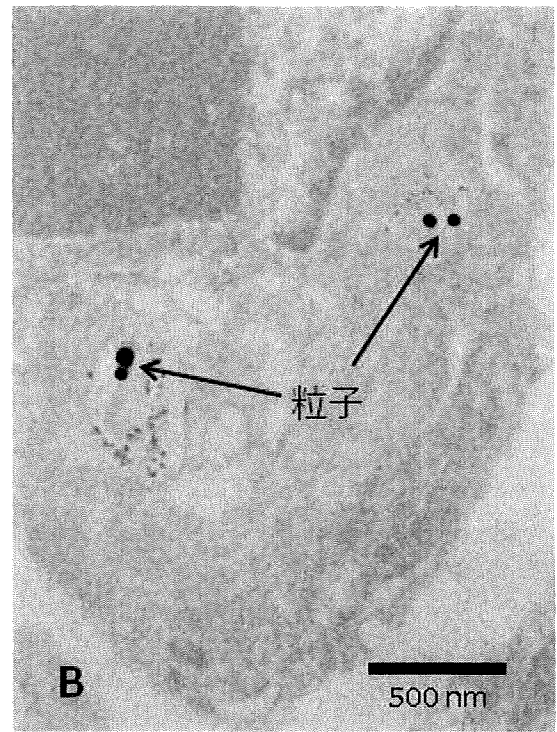
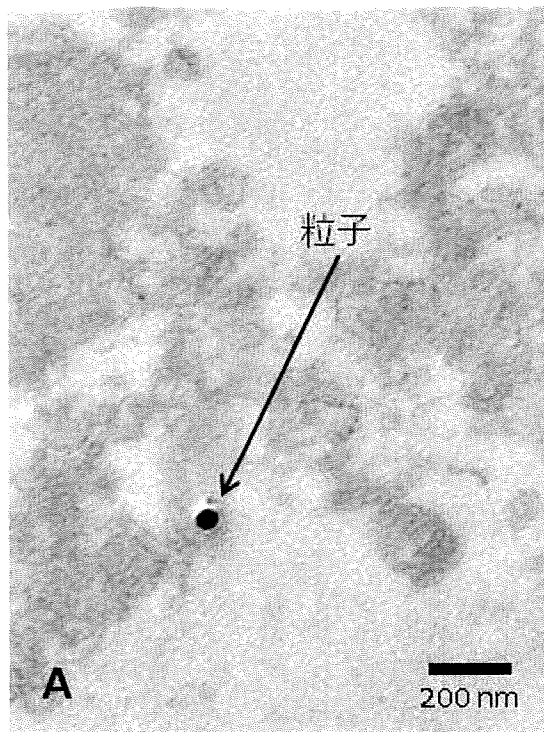


写真9 実験2のnSP50あるいはnSP70を経鼻投与

A: nSP50を投与した鼻粘膜の支持細胞内に粒子が観察される

B: nSP70を投与した鼻粘膜の嗅細胞に粒子が観察される

C: nSP70を投与した嗅球の神経線維内に粒子が観察される

D: nSP70を投与した嗅球の神経細胞のミトコンドリア内に粒子が観察される

全て無染色で観察

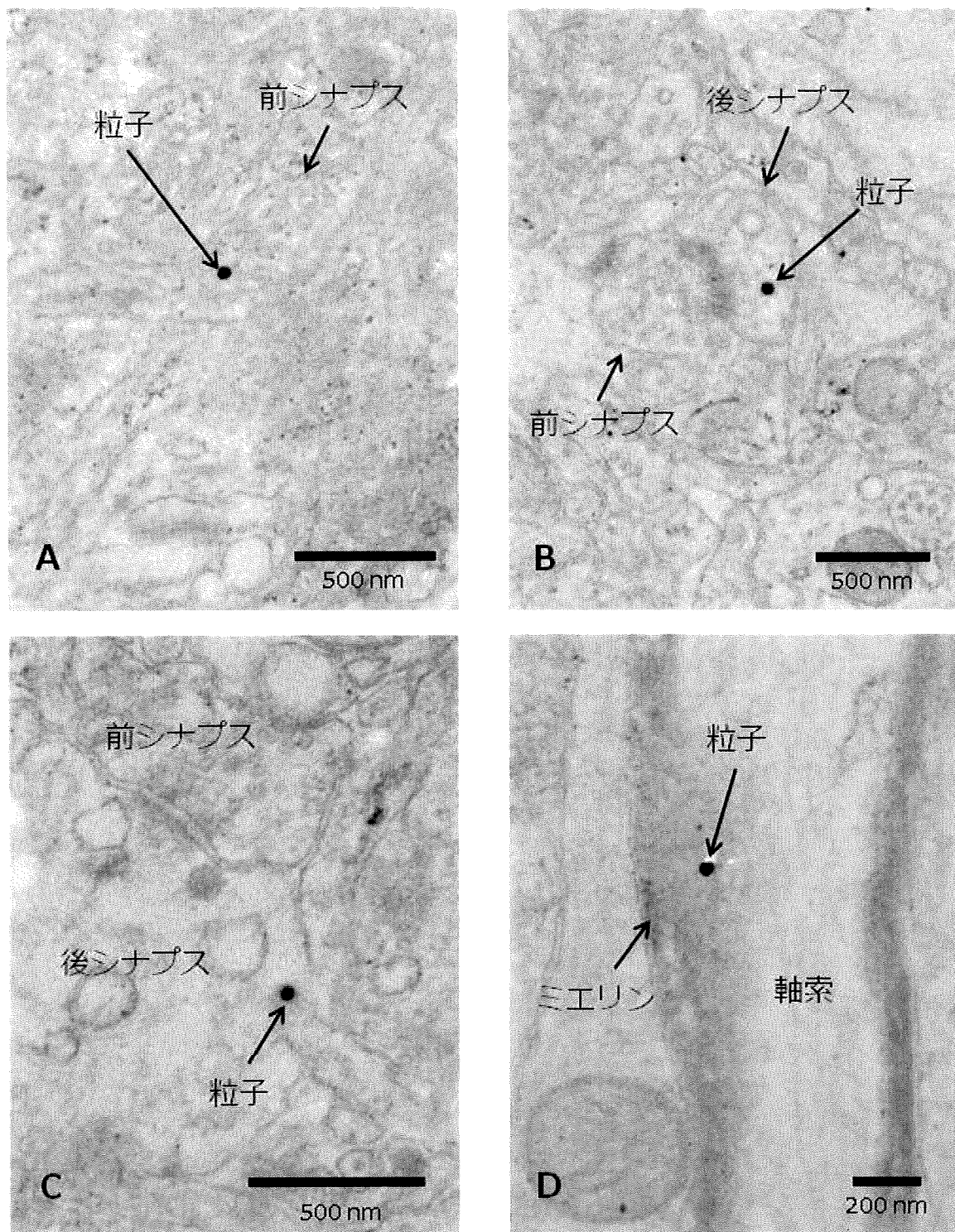


写真10 実験2のnSP50あるいはnSP70を経鼻投与

- A: nSP50を投与した大脳皮質の前シナプス内に粒子が観察される
  - B: nSP70を投与した大脳皮質の後シナプス内に粒子が観察される
  - C: nSP50を投与した大脳髄質の後シナプス内に粒子が観察される
  - D: nSP70を投与した大脳髄質のミエリン内に粒子が観察される
- 全て無染色で観察



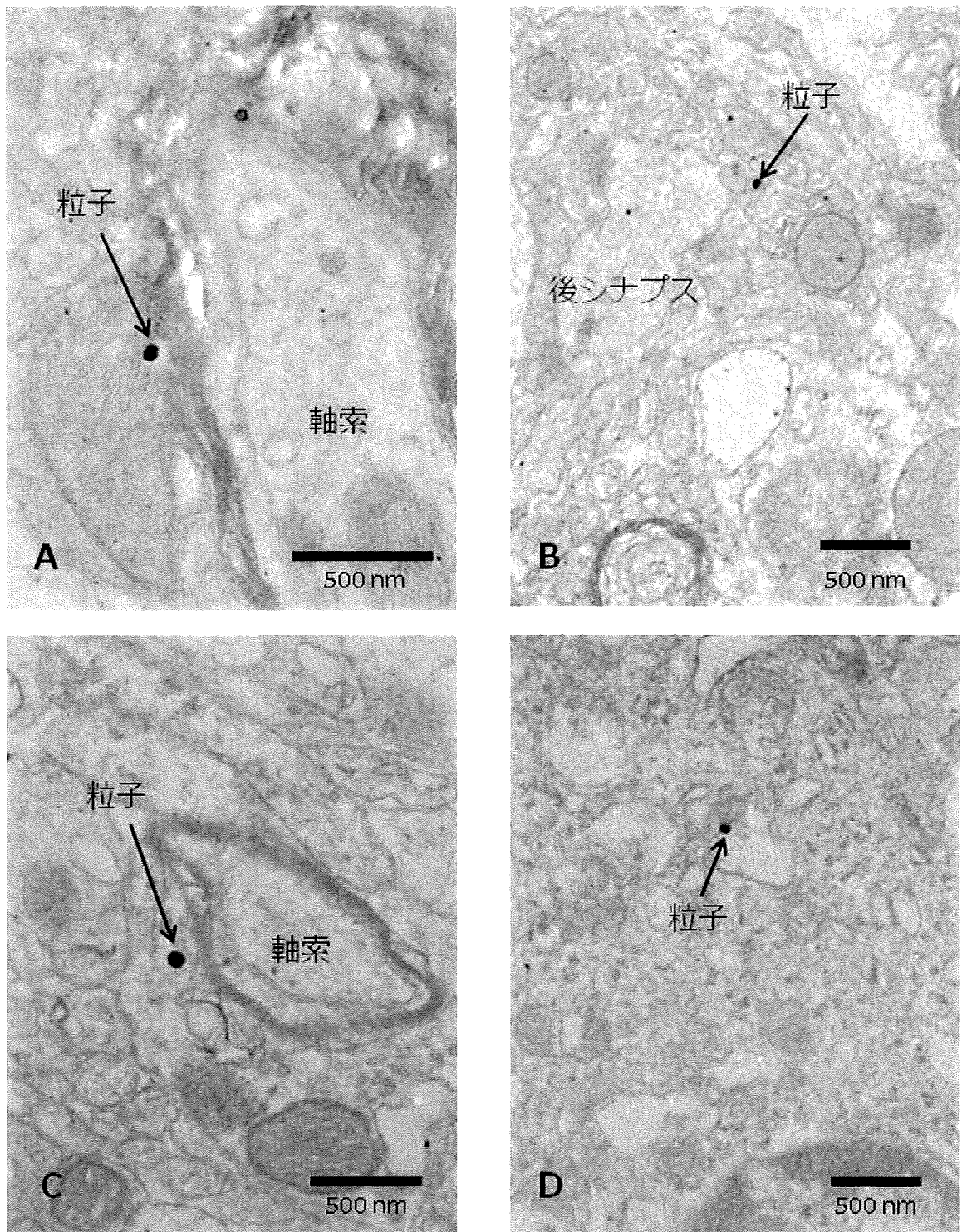


写真 1 1 実験 2 の nSP50 あるいは nSP70 を経鼻投与

- A: nSP50 を投与した海馬の希突起膠細胞のミトコンドリア内に粒子が観察される
  - B: nSP50 を投与した海馬神経網内に粒子が観察される
  - C: nSP70 を投与した海馬の希突起膠細胞内に粒子が観察される
  - D: nSP70 を投与した海馬の神経網内に粒子が観察される
- 全て無染色で観察

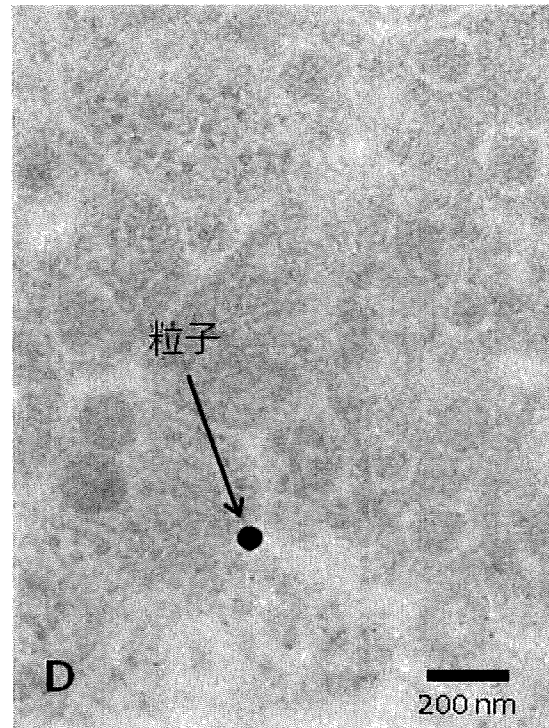
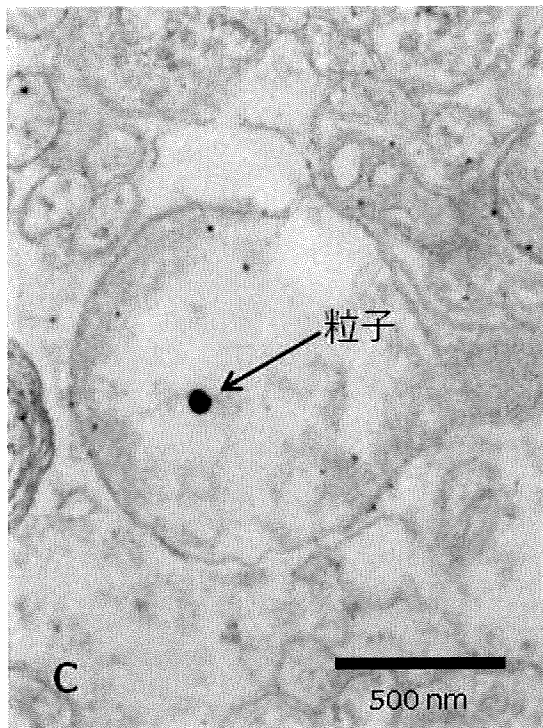
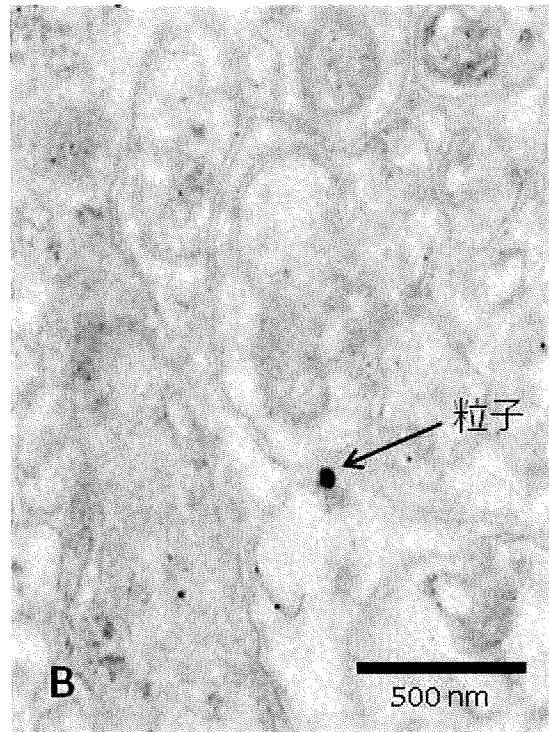
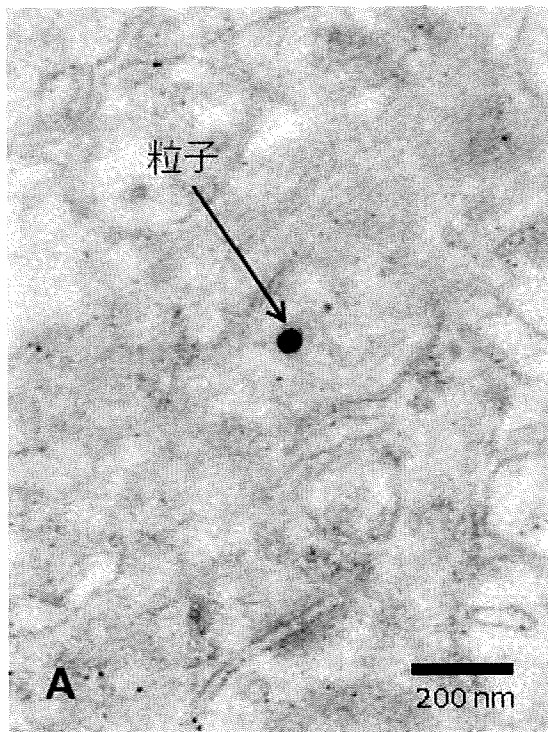


写真12 実験2のnSP50あるいはnSP70を経鼻投与

- A: nSP50を投与した小脳神経膠細胞内に粒子が観察される
  - B: nSP50を投与した小脳の無髄神経線維に粒子が観察される
  - C: nSP70を投与した小脳神経膠細胞内に粒子が観察される
  - D: nSP70を投与した下垂体前葉細胞の塩基好性細胞内に粒子が観察される
- 全て無染色で観察