

図 26-1. 培養細胞に nSP300 を 30 mg/ml 処置  
細胞質内にナノシリカが侵入している

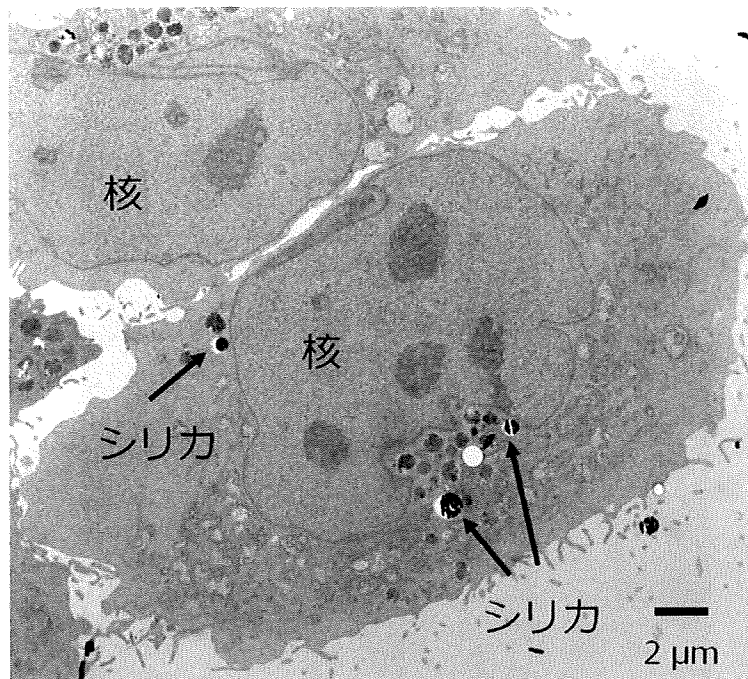


図 26-2. 培養細胞に mSP1000 を 30 mg/ml 処置  
細胞質内にナノシリカが侵入している

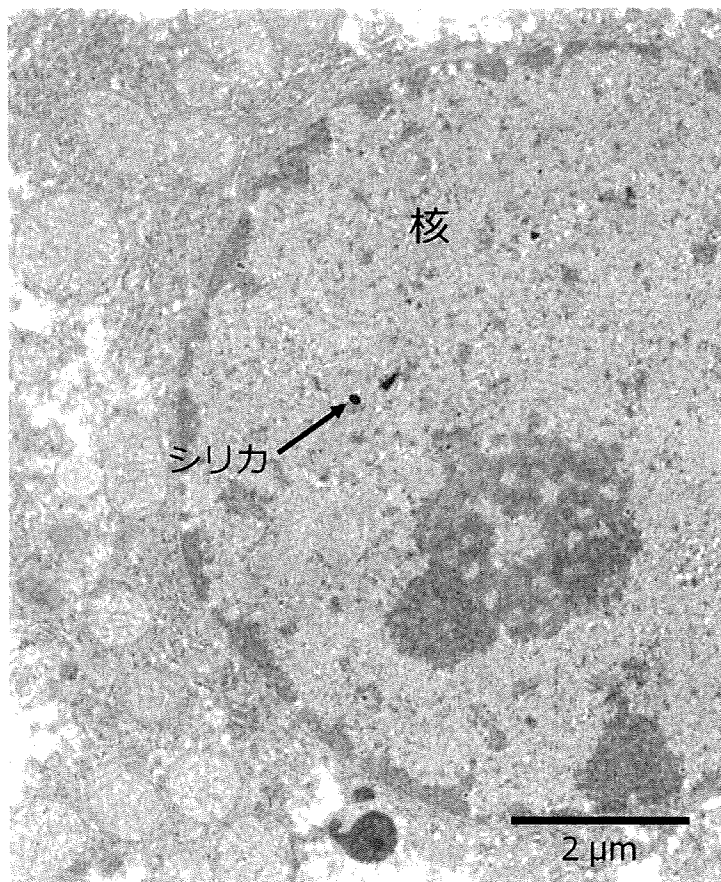


図 27. マウスに nSP70 を 10 mg/kg 投与、無染色  
肝細胞核内にナノシリカが侵入している

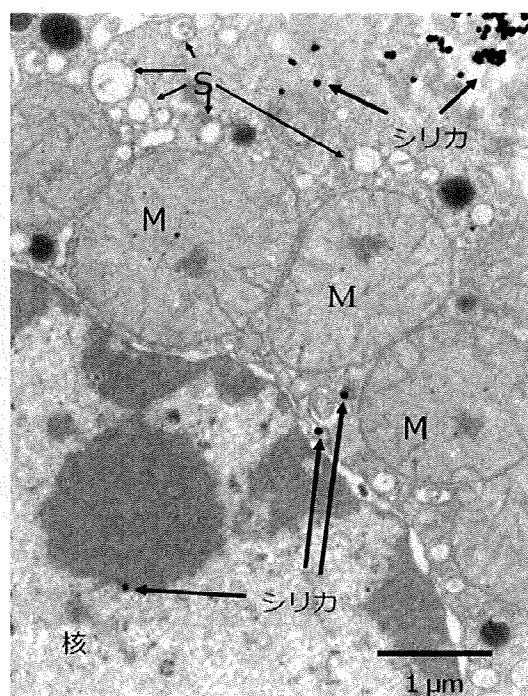


図 28. マウスに nSP70 を 100 mg/kg 投与、無染色  
肝細胞と核小体にナノシリカが侵入している。ミトコンドリア(M)内に沈着物、細胞質に小管状物質(S)の増生が観察される

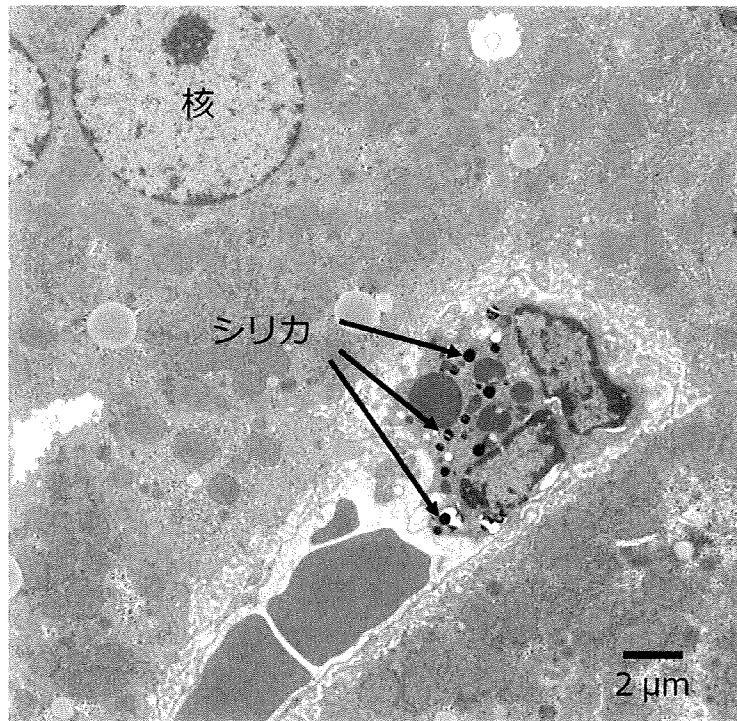


図 29-1. マウスに nSP300 を 10 mg/kg 投与  
ナノシリカはクッパー細胞に貪食されている

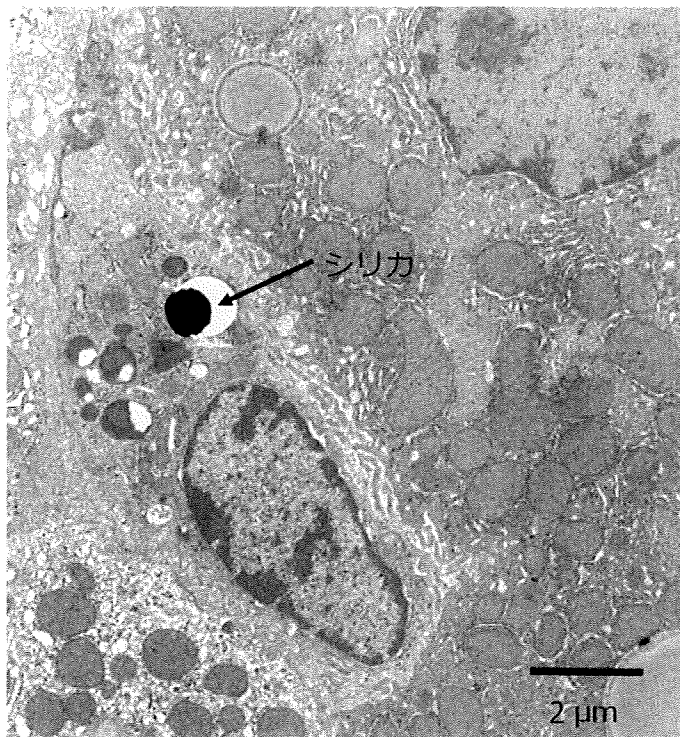


図 29-2. マウスに mSP1000 を 10 mg/kg 投与  
ナノシリカはクッパー細胞に貪食されている

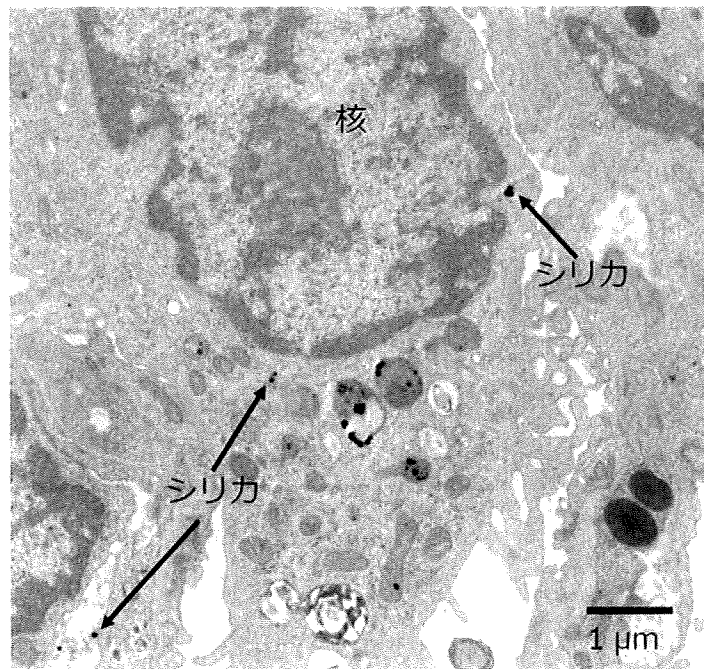


図 30-1. マウスに nSP70 を 100 mg/kg 投与、無染色  
ナノシリカは肺胞上皮 II 型細胞内に侵入している

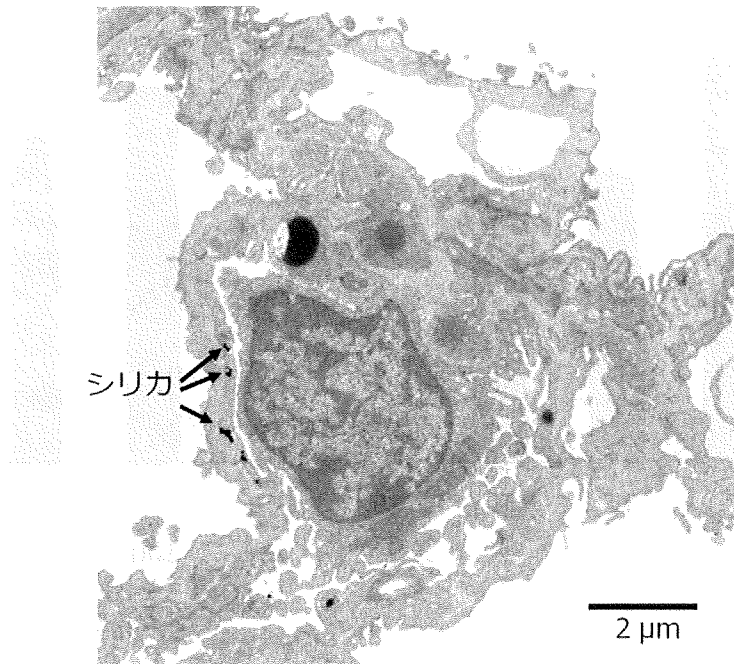


図 30-2. マウスに nSP70 を 100 mg/kg 投与、無染色  
ナノシリカは毛細血管内皮細胞内に侵入している

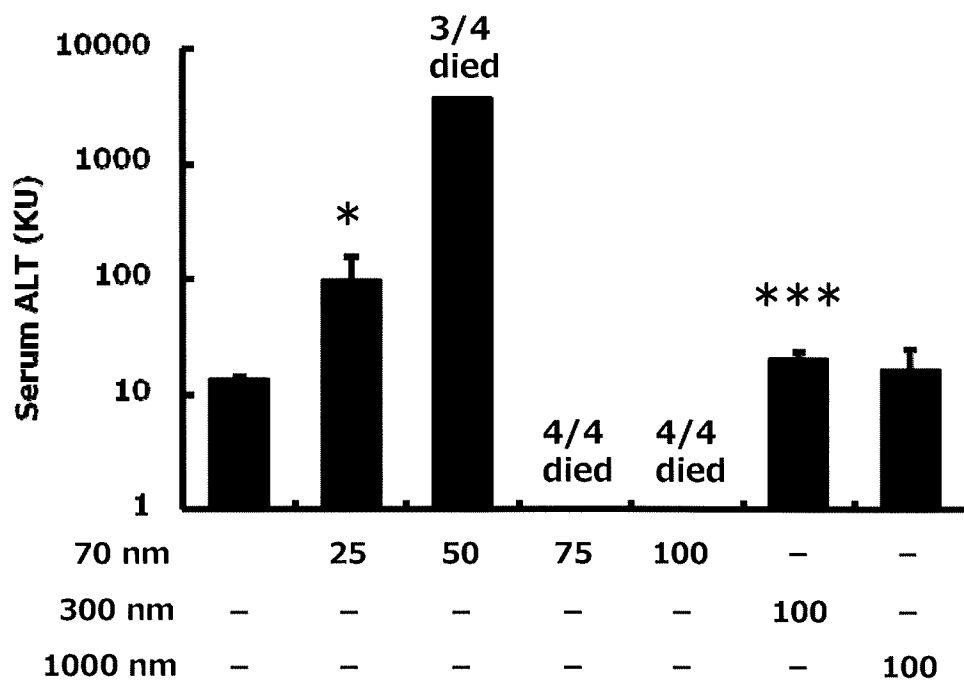


图 31. Acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica.

Mice were injected labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, Serum ALT level of mice was measured. Each point represents the mean  $\pm$ S.D.( n=4) \* :  $p < 0.05$  vs. Control \*\*\* :  $p < 0.005$  vs. Control

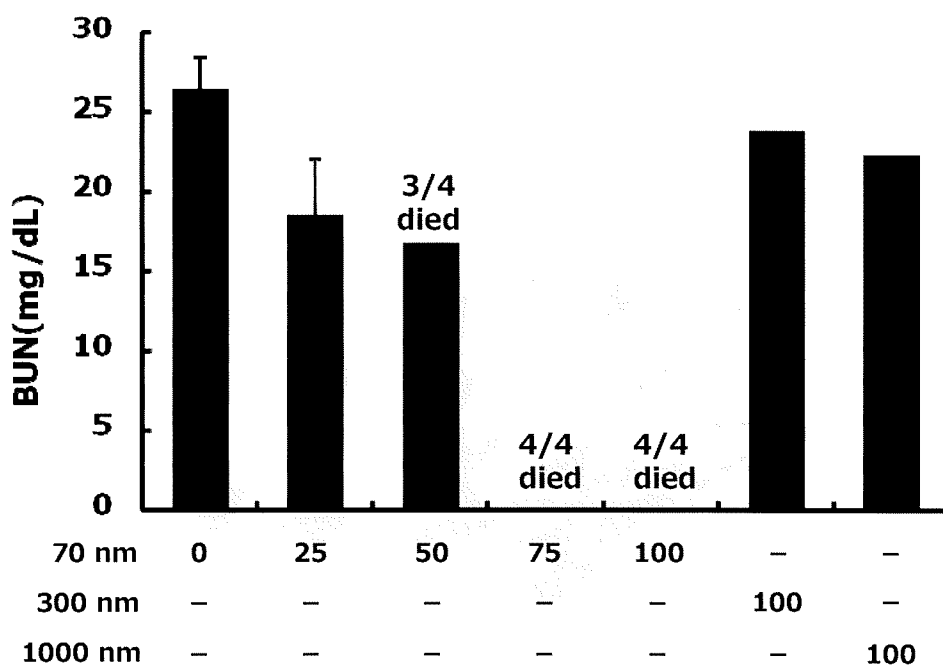


图 32. Acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica.

Mice were injected labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, Serum BUN level of mice was measured. Each point represents the mean  $\pm$ S.D.( n=4 )

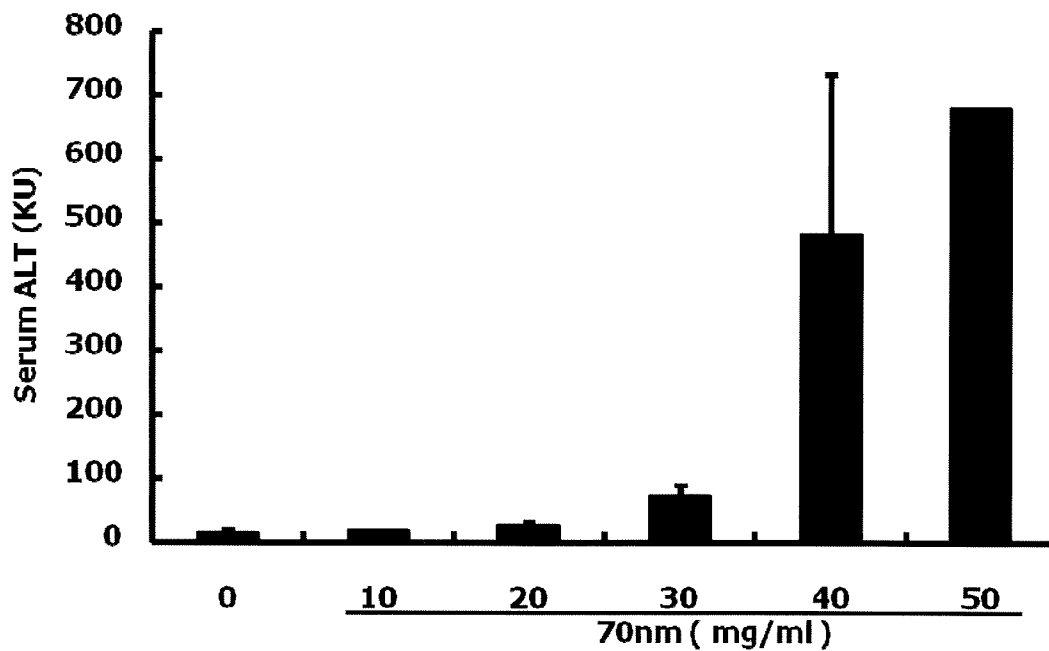


图 33. Dose dependency of acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica.

Mice were injected labeled 70 nm silica intravenously (0 to 50 mg/kg body weight). After 12 hours, Serum level in mice was measured. Each point represents the mean  $\pm$ S.D.( n=4 )

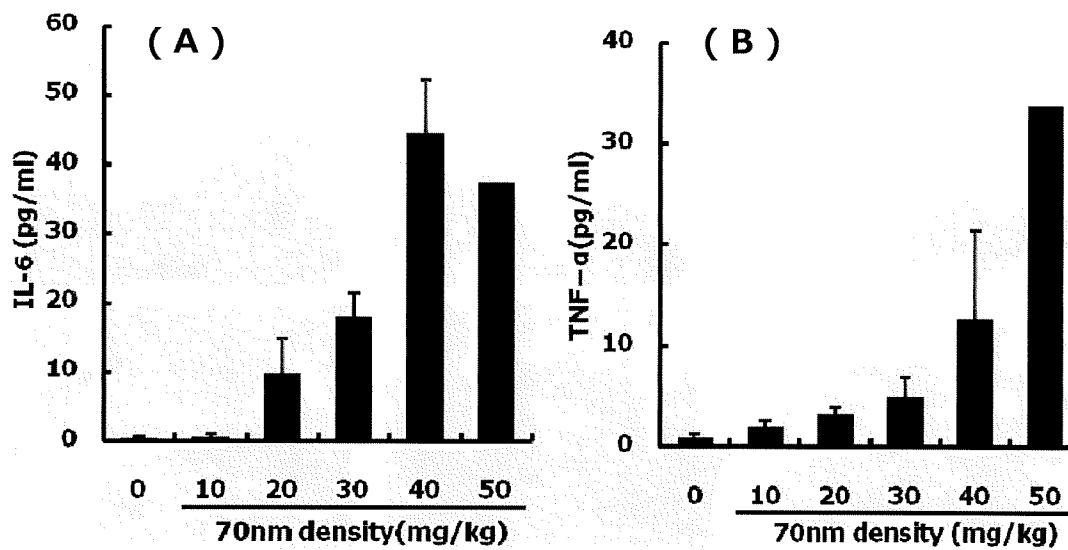


图 34. Dose dependency of acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica.

Mice were injected labeled 70 nm silica intravenously (0 to 50 mg/kg body weight). After 12 hours, concentration of IL-6 (A), TNF- $\alpha$  (B) in mice was measured. Each point represents the mean  $\pm$ S.D.( n=4 )



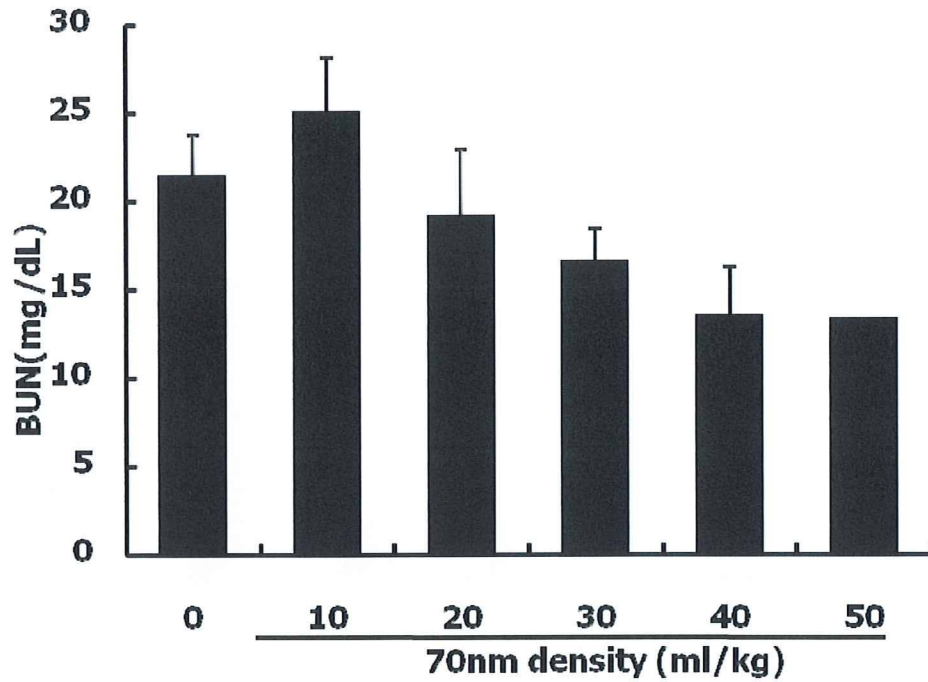


Fig 35. Dose dependency of acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Mice were injected labeled 70 nm silica intravenously (0 to 40 mg/kg body weight). After 12 hours, Serum BUN in mice was measured. Each point represents the mean  $\pm$ S.D.( n=4 )

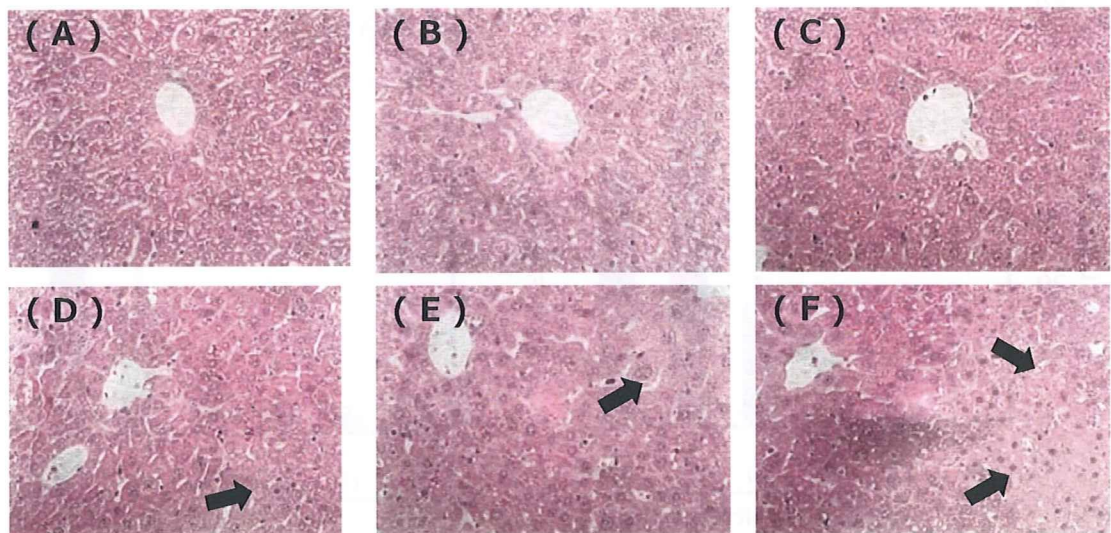
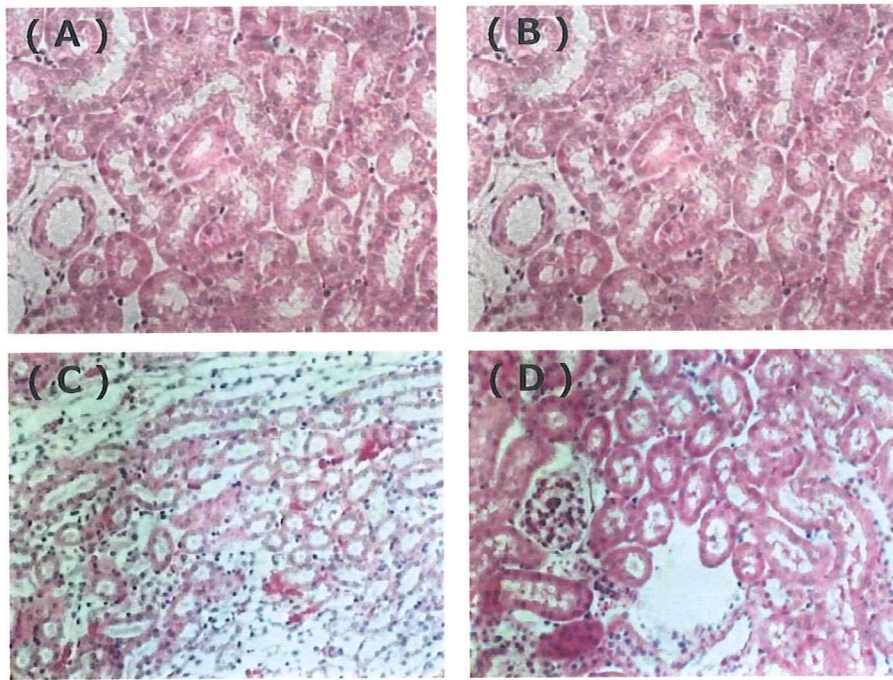
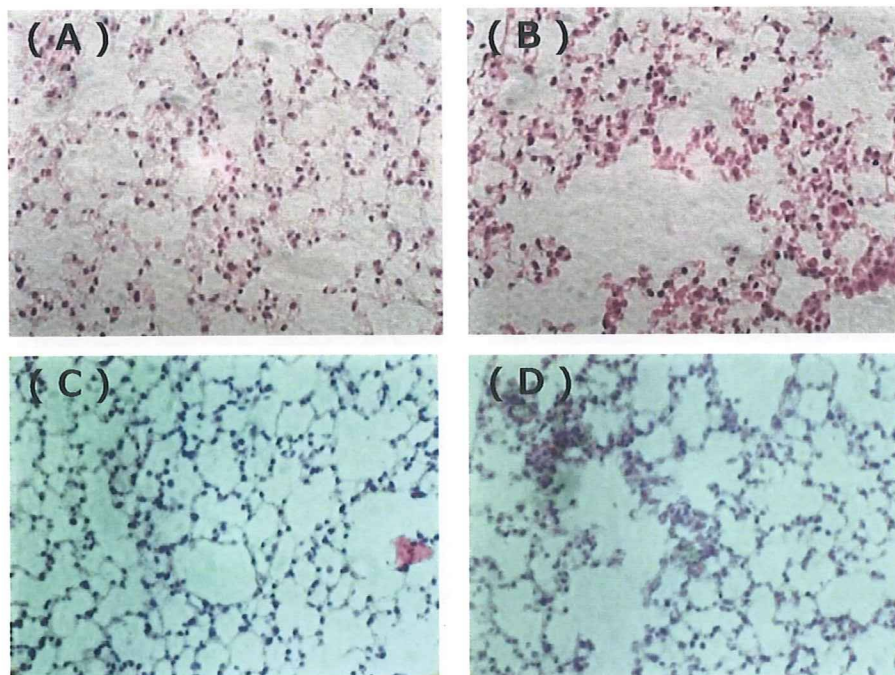


Fig 36. Dose dependency of acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Liver samples were obtained 12 hours after labeled 70 nm-silica intravenous injection from untreated (A), 70 nm-silica 10, 20, 30, 40, 50 mg/kg b.w. injected mice (B, C, D, E, F) . The arrows was a part becoming the liver injury. (x400)



**图 37. Acute kidney injury in mice treated with labeled nano-silica.**

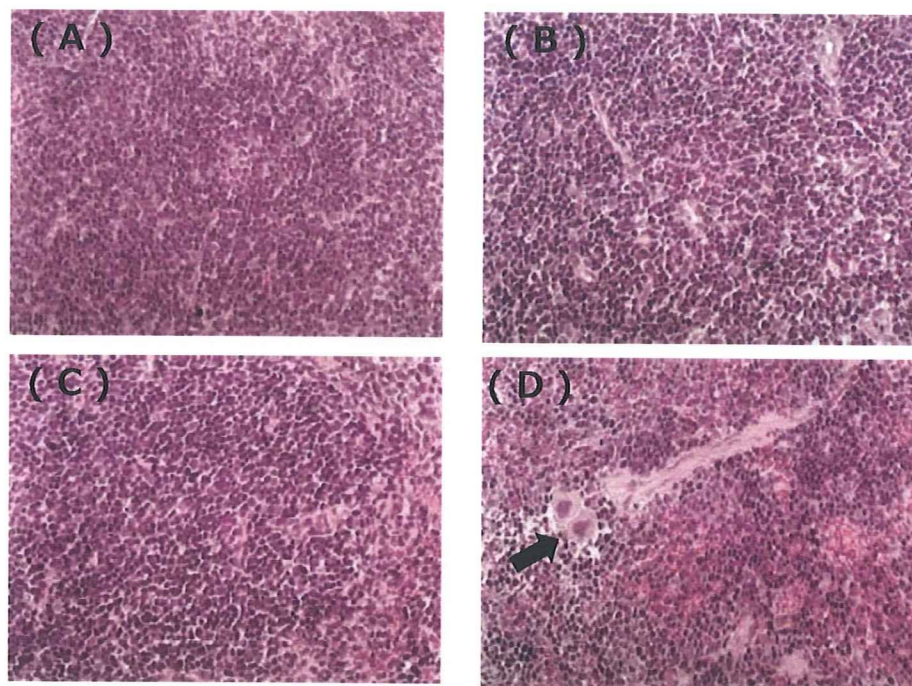
Kidney samples were obtained 24 hours after labeled nano-silica intravenous injection from untreated (A), 70 nm-silica 30 mg/kg b.w. (B), 300 nm-silica 100 mg/kg b.w. (C), 1000 nm-silica 100 mg/kg b.w. (D) injected mice. ( $\times 400$ )



**图 38. Acute lung injury in mice treated with labeled nano-silica.**

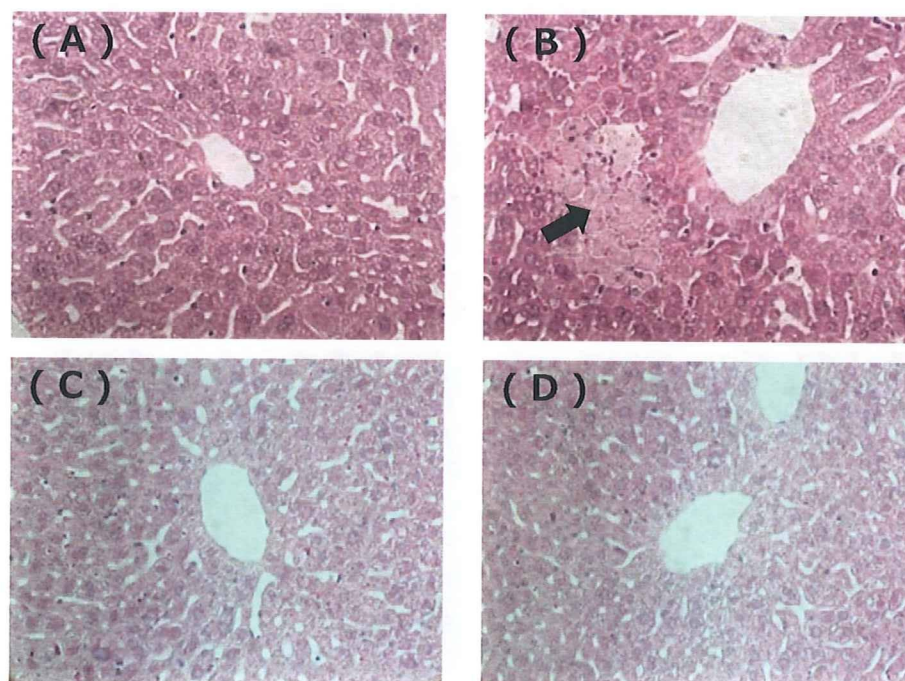
Lung samples were obtained 24 hours after labeled nano-silica intravenous injection from untreated (A), 70 nm-silica 30 mg/kg b.w. (B), 300 nm-silica 100 mg/kg b.w. (C), 1000 nm-silica 100 mg/kg b.w. (D) injected mice. ( $\times 400$ )





**图 39. Acute spleen injury in mice treated with labeled nano-silica.**

Spleen samples were obtained 24 hours after labeled nano-silica intravenous injection from untreated (A), 70 nm-silica 30 mg/kg b.w. (B), 300 nm-silica 100 mg/kg b.w. (C), 1000 nm-silica 100 mg/kg b.w. (D) injected mice. The arrow was blood megakaryocyte.(×400)



**图 40. Acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica.**

Liver samples were obtained 24 hours after labeled nano-silica intravenous injection from untreated (A), 70 nm-silica 30 mg/kg b.w. (B), 300 nm-silica 100 mg/kg b.w. (C), 1000 nm-silica 100 mg/kg b.w. (D) injected mice. The arrows was a part becoming the liver injury. (×400)

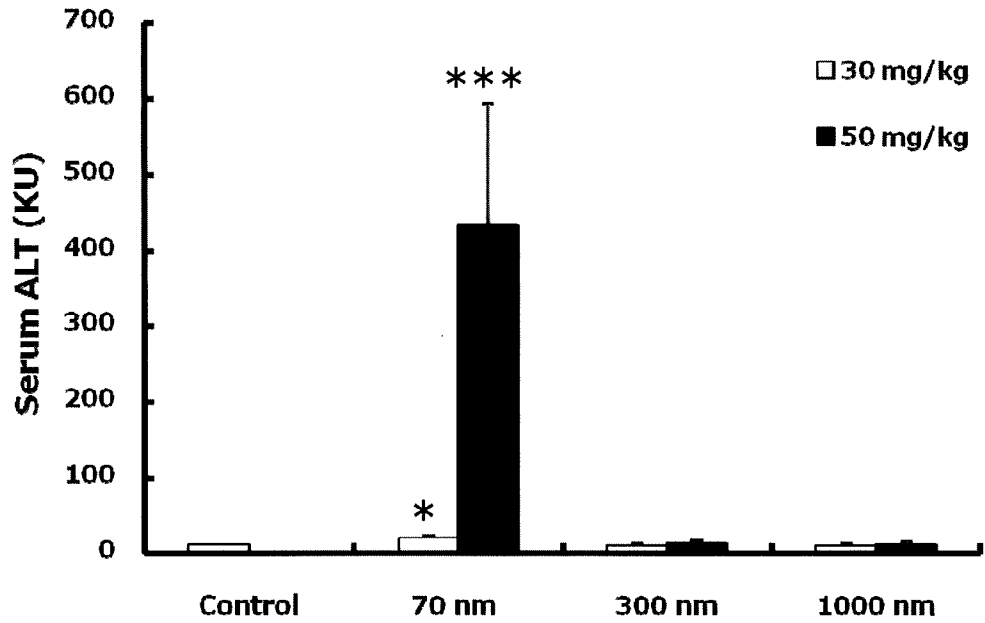


图 41. Acute liver injury in mice treated with non-labeled nano-silica.

Mice were injected none-labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, SerumALT level of mice was measured. Each point represents the mean  $\pm$ S.D.( n=4 ). \* $p < 0.05$  vs. Control . \*\*\* $p < 0.005$  vs. Control .

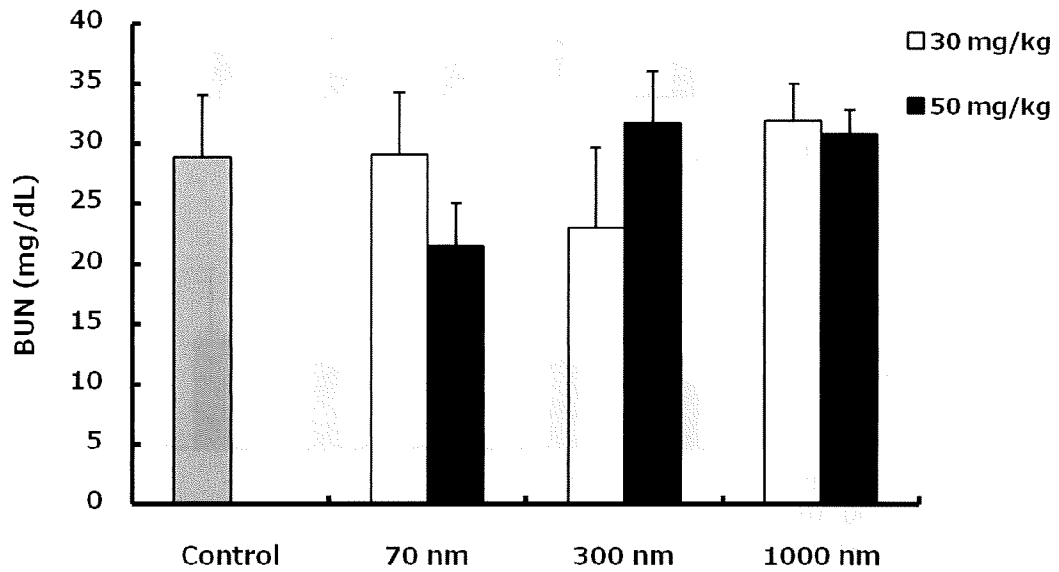


图 42. Acute liver injury in mice treated with non-labeled nano-silica.

Mice were injected none-labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, Serum BUN level of mice was measured. Each point represents the mean  $\pm$ S.D.( n=4 ).

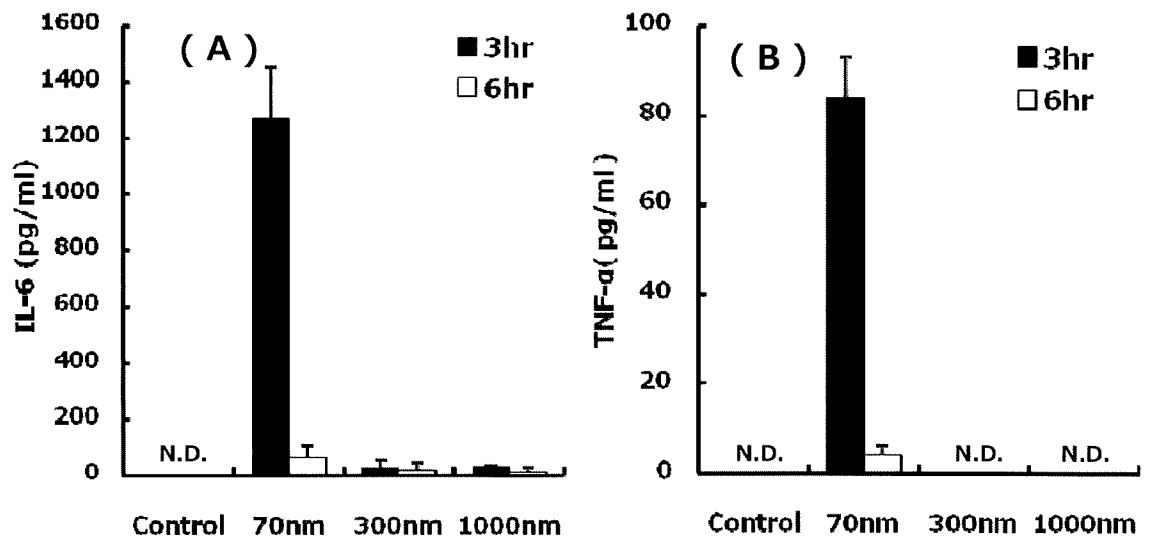


图 43. Acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Mice were injected labeled nano-silica intravenously. After 3, 6 hours, Serum IL-6 (A) and TNF- $\alpha$  concentration (B) of mice was measured. Each point represents the mean  $\pm$ S.D.( n=4 ).

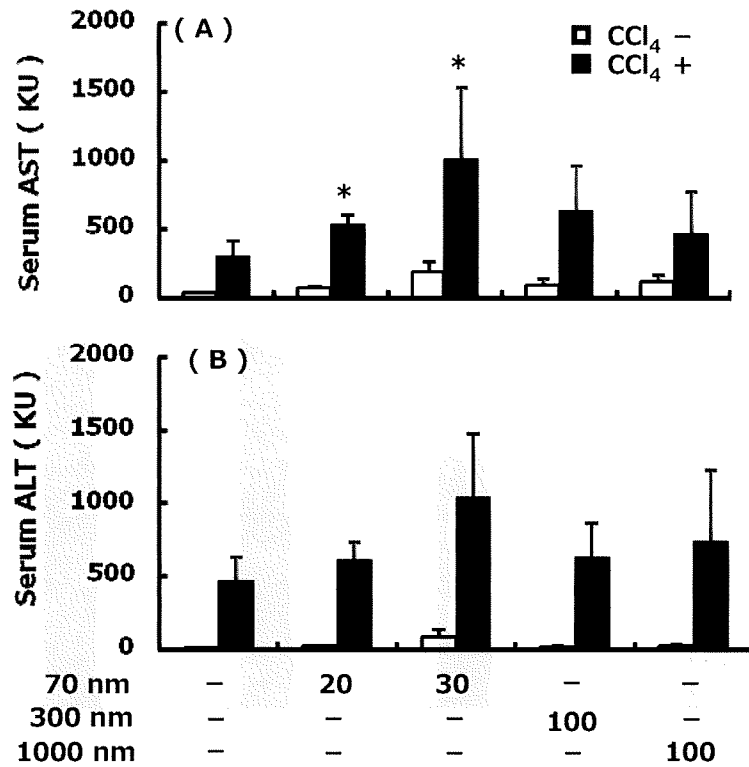


图 44. Acute liver injury in mice treated with CCl<sub>4</sub> and labeled nano-silica. Mice were injected CCl<sub>4</sub> intraperitoneally and labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, serum AST(A) and ALT (B) level of mice was measured. Each point represents the mean  $\pm$ S.D.( n=4 ). : \* $p < 0.05$  vs. only CCl<sub>4</sub>

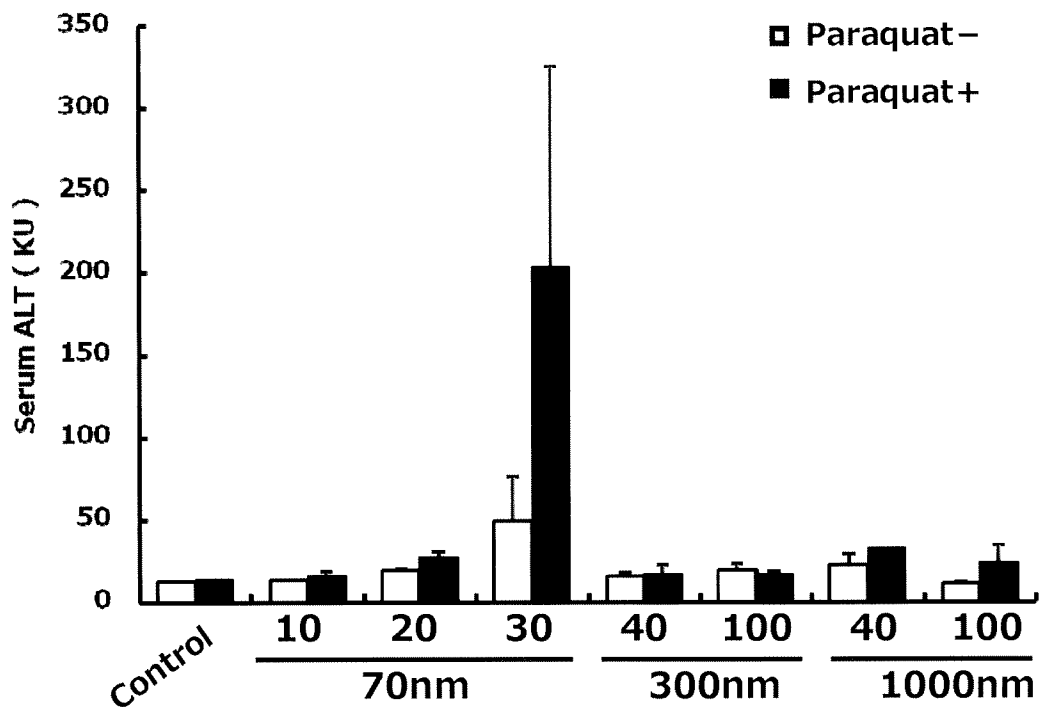


Figure 45. Acute liver injury in mice treated with paraquat and labeled nano-silica.

Mice were injected paraquat intraperitoneally and labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, serum ALT level of mice was measured. Each point represents the mean  $\pm$ S.D. (n=4).

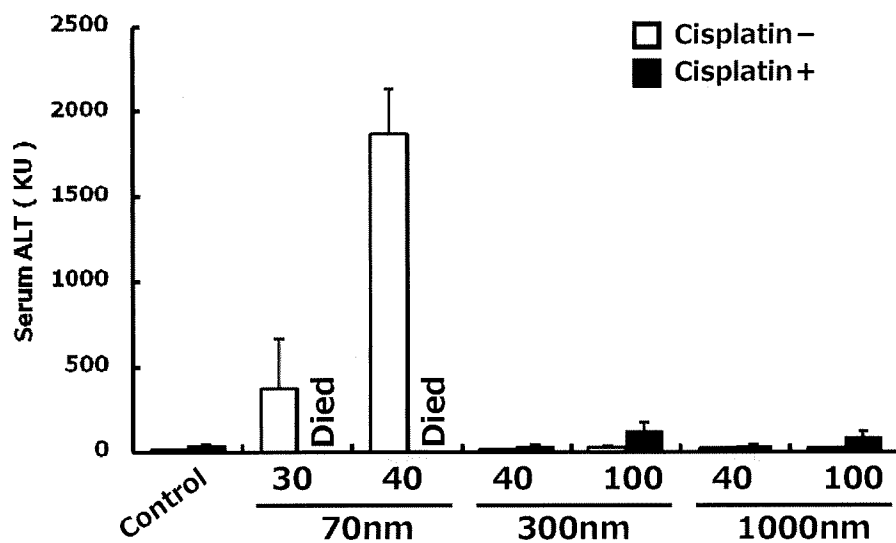


Figure 46. Acute liver injury in mice treated with cisplatin and labeled nano-silica.

Mice were injected cisplatin intraperitoneally and labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, serum ALT level of mice was measured. Each point represents the mean  $\pm$ S.D. (n=4).



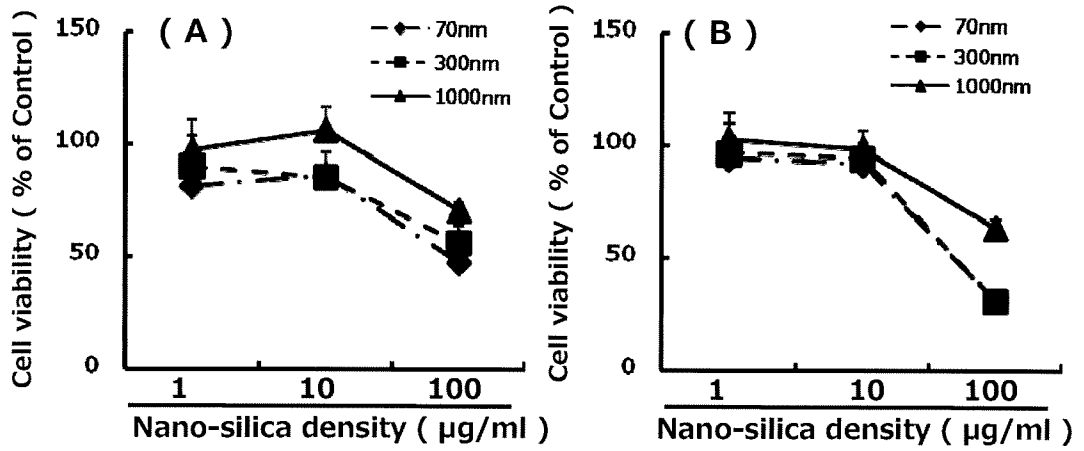


图 47. Cell injury in mouse hepatocytes treated with labeled nano-silica.

Murine hepatocytes were exposed to labeled nano-silica. After 24 (A) and 48 (B) hours, cell viability was measured.

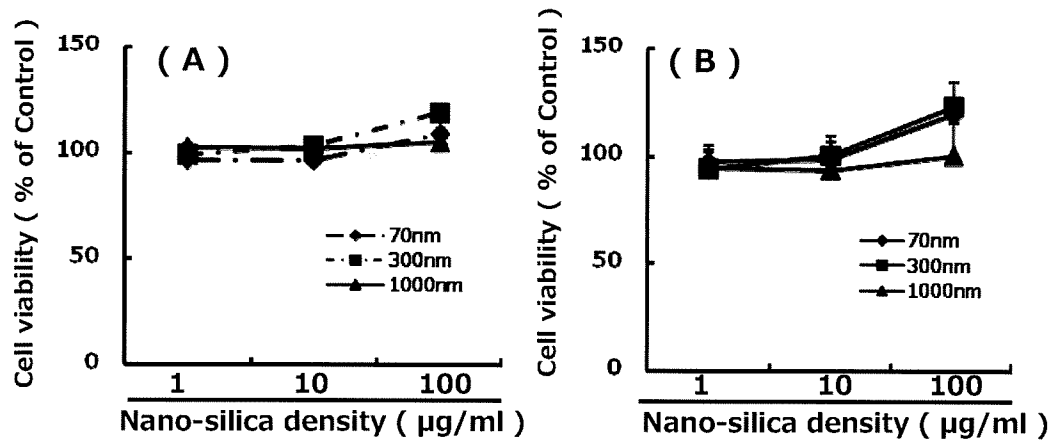
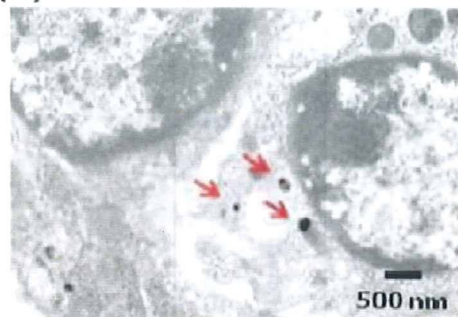


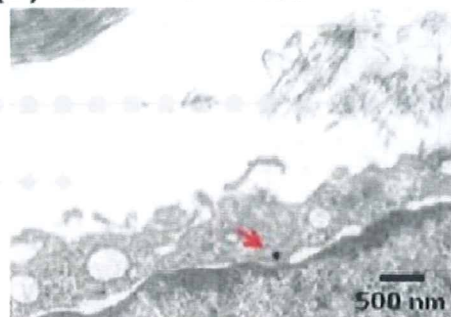
图 48. Cell injury in Caco2 cells treated with labeled nano-silica.

Caco2 cells were exposed to labeled nano-silica. After 24 (A) and 72 (B) hours, cell viability was measured.

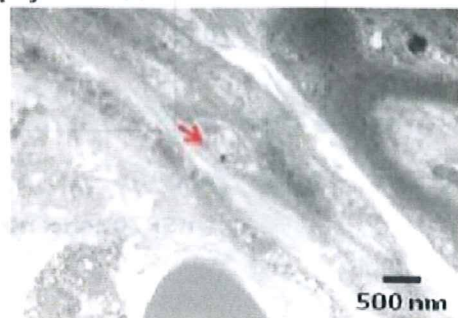
(A) 皮膚角化細胞



(B) 表皮ランゲルハンス細胞



(C) 真皮層



(D) 頸部リンパ節



図 49. ナノシリカの皮膚透過性評価

終濃度 10%の化粧/医薬品用エステル油剤 (ミリスチン酸イソプロピル: IPM) を含む溶液で nSP70 を懸濁し, この nSP70 懸濁液を 2 mg/head (10  $\mu$ l) で BABL/c マウスの耳介に 3 日間連続投与した. 最終投与 24 時間後にマウス耳介及び頸部リンパ節を回収した. これらの組織から超薄切片を作製し, 透過型電子顕微鏡観察により表皮層 (角化細胞; A, ランゲルハンス細胞; B), 真皮層 (C), 頸部リンパ節 (D) における nSP70 の局在を解析した.

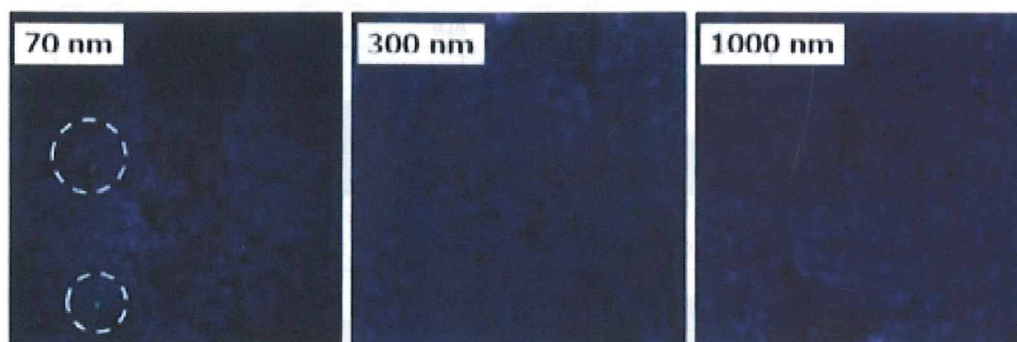


図 50. シリカの *in vivo* 皮膚透過性評価

ICR マウス (雌性, 6 週齢) の耳介皮膚に, アミノフルオレセイン標識 nSP70, nSP300, nSP1000 を 125  $\mu$ g/ear/day で 24 時間間隔, 3 日間連続塗布した. 最終塗布から 24 時間後に摘出したマウス耳介より表皮シートを作成し, 細胞核を DAPI 染色した後に各ナノシリカの局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した (緑: ナノシリカ, 青: 核).

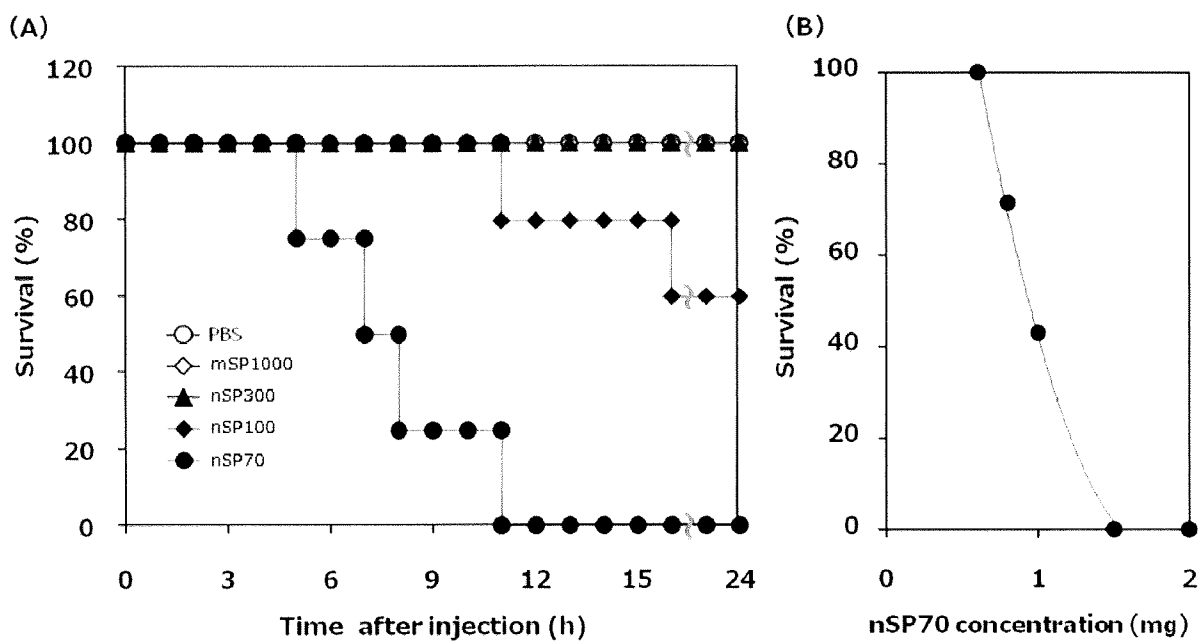


図 51. ナノシリカの粒子径依存的な急性毒性.

A) 粒子径依存性: 各シリカを 2 mg/head で BALB/c マウスの尾静脈内より投与し、生存率を経時的に評価した。(B) nSP70 濃度依存性: 種々濃度の nSP70 を BALB/c マウスの尾静脈内より投与してから 24 時間後の生存率を指標に nSP70 依存的な急性毒性の濃度依存性を確認した。

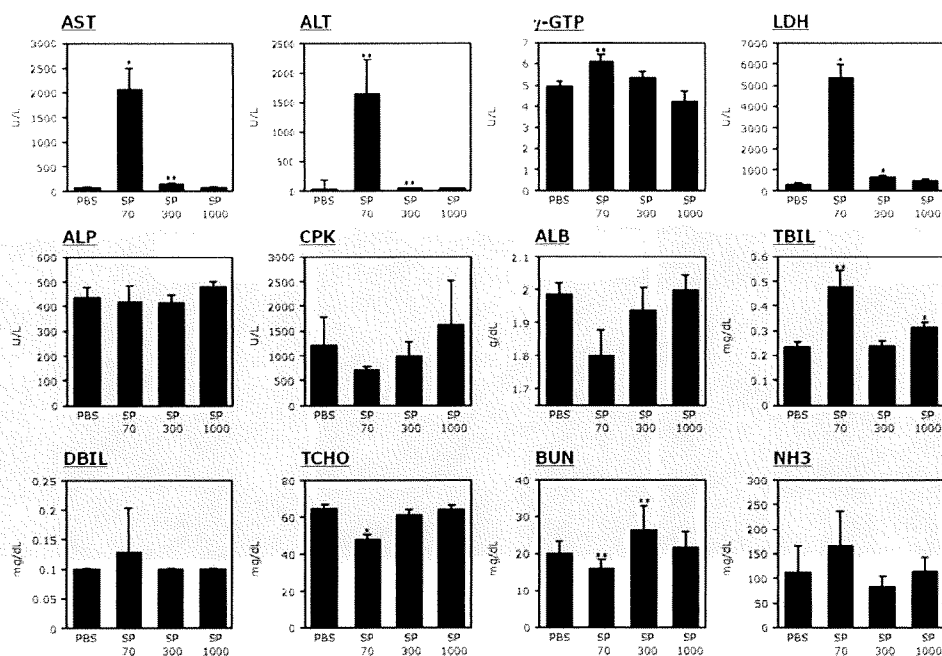


図 52. ナノシリカ投与マウスの血液生化学検査-1.

粒子径の異なる各シリカを 2 mg/head で BALB/c マウスの尾静脈内より投与した。6 時間後に眼底から回収した血液を用いて血液生化学検査 (アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、γ-グルタミルトランスアミドラーゼ (γ-GTP)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、総ビリルビン (TBIL)、尿素窒素 (BUN)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、クレアチンフォスホキナーゼ (CPK)、アルブミン (ALB)、直接ビリルビン (DBIL)、総コレステロール (TCHO)、アンモニア (NH3)) を実施した。

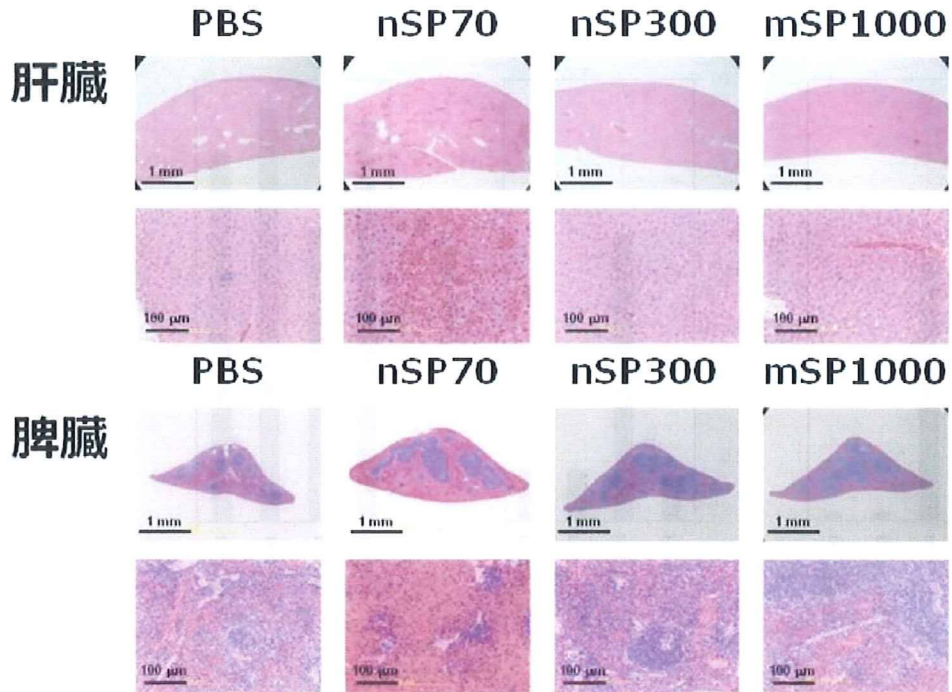


図 53. 肝臓および脾臓の病理組織学的検査。

粒子径の異なる各シリカを 2 mg/head で BALB/c マウスの尾静脈内より投与した。投与 6 時間後に回収した肝臓および脾臓を病理組織学的検査に供した。

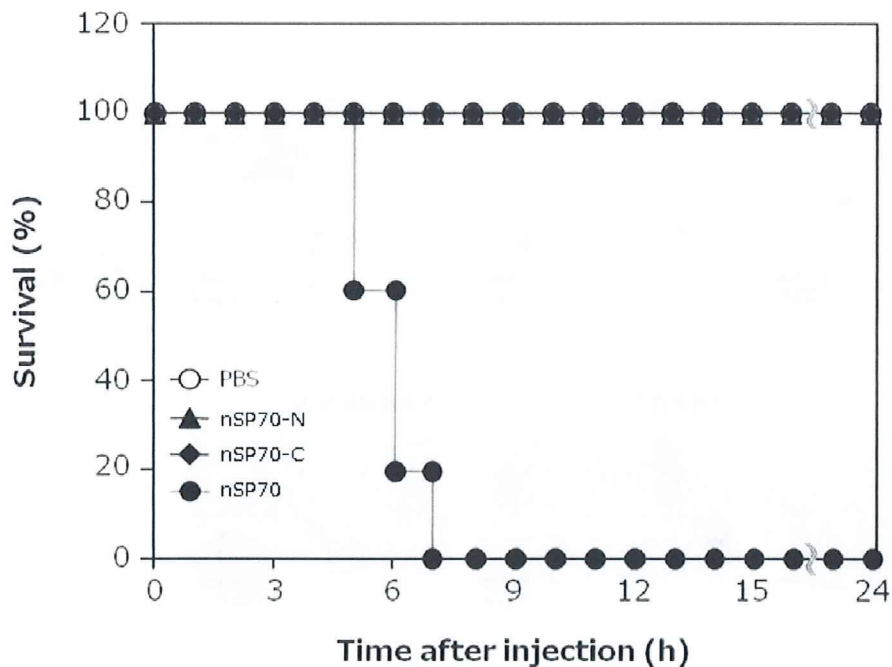


図 54. nSP70 の急性毒性発現における粒子表面性状の影響。

nSP70 (表面未修飾)、粒子表面をカルボキシル基あるいはアミノ基で修飾した直径 70 nm のナノシリカ (nSP70-C, nSP70-N) を 2 mg/head で BALB/c マウスの尾静脈内より投与し、経時的に生存率を評価した。



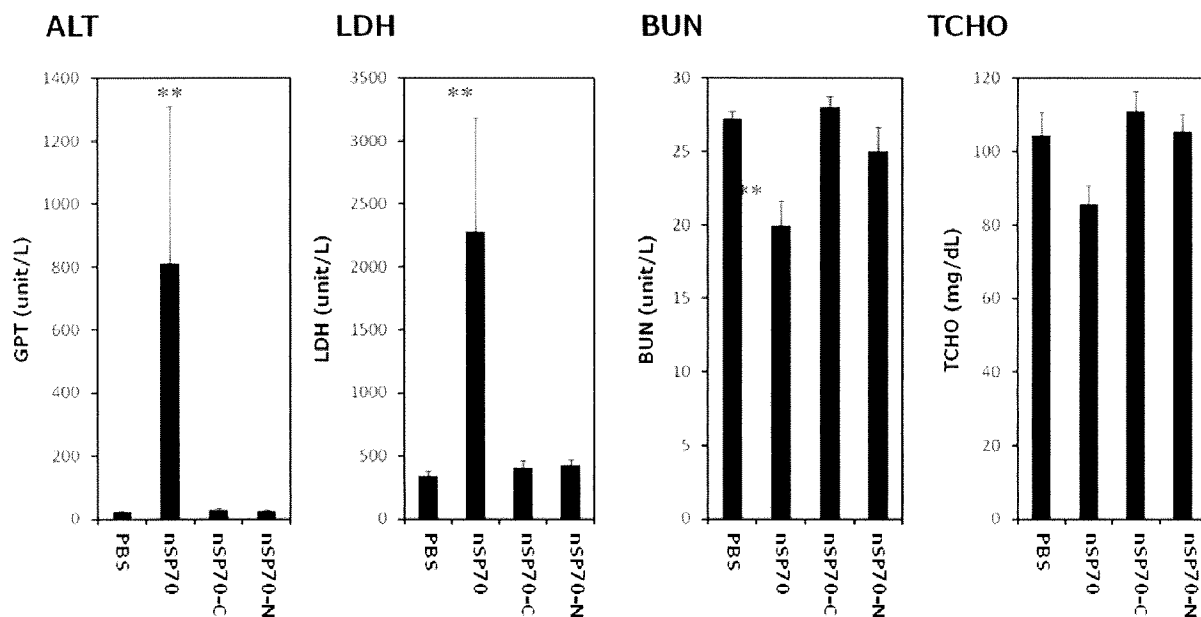
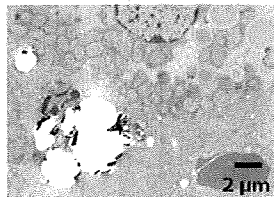


図 55. 血液生化学検査-2.

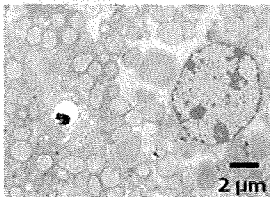
nSP70 (表面未修飾)、粒子表面をカルボキシル基あるいはアミノ基で修飾した直径 70 nm のナノシリカ (nSP70-C, nSP70-N) を 2 mg/head で BALB/c マウスの尾静脈内より投与した。6 時間後に眼底から回収した血液を用いて血液生化学検査 (アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、尿素窒素 (BUN)、総コレステロール (TCHO)) を実施した。

### mSP1000

クッパー細胞

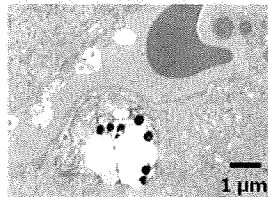


肝実質細胞

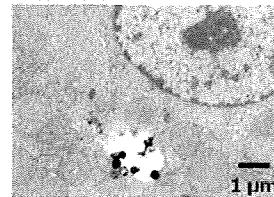


### nSP300

クッパー細胞

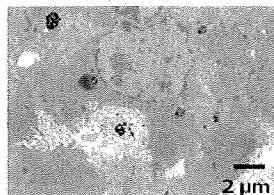


肝実質細胞

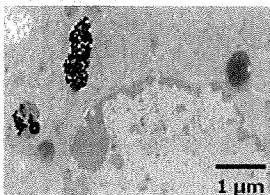


### nSP70

クッパー細胞



肝実質細胞



肝実質細胞核内

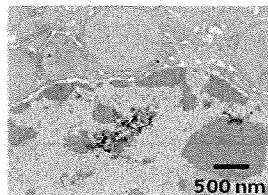


図 56. 粒子径の異なるナノシリカの肝組織内動態.

粒子径の異なる種々のナノシリカを 2 mg/head で BALB/c マウスの尾静脈内より投与した。投与 6 時間後に回収した肝臓から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察によりナノシリカの局在を解析した。

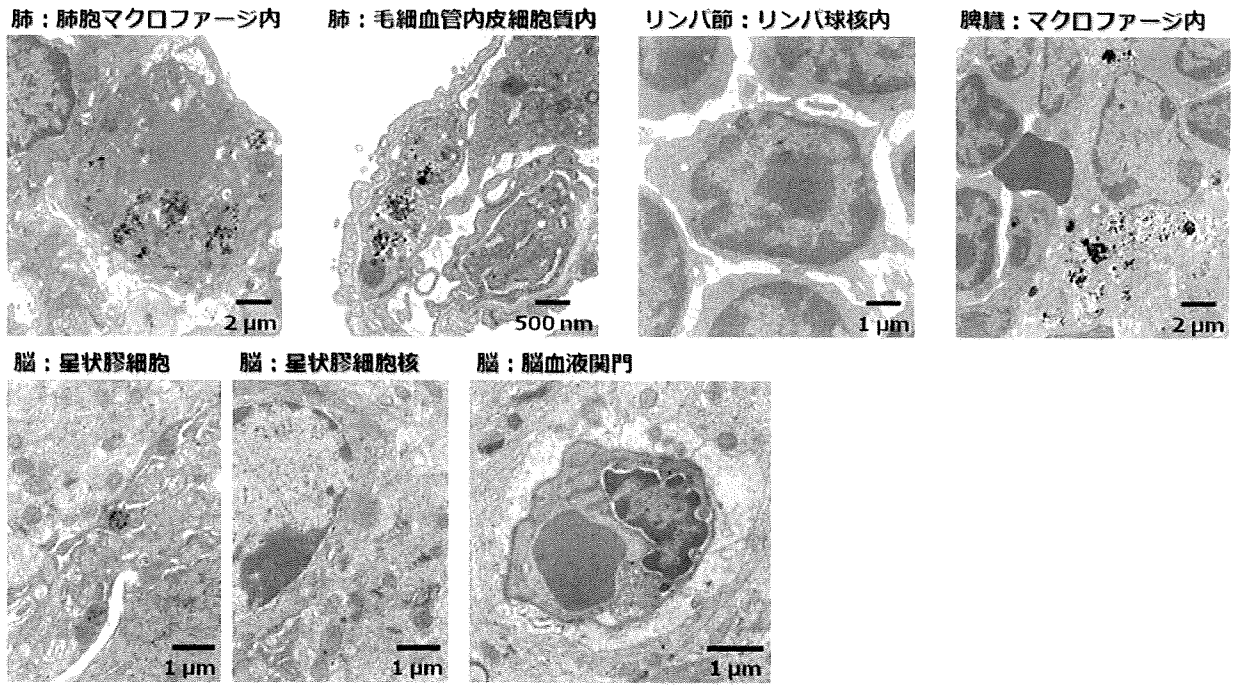


図 57. nSP70 の生体内動態. nSP70 を 2 mg/head で BALB/c マウスの尾静脈内より投与した。投与 6 時間後に回収した肝臓、リンパ節、脾臓、脳から超薄切片を作製し、電子顕微鏡観察により SP70 の局在を解析した。

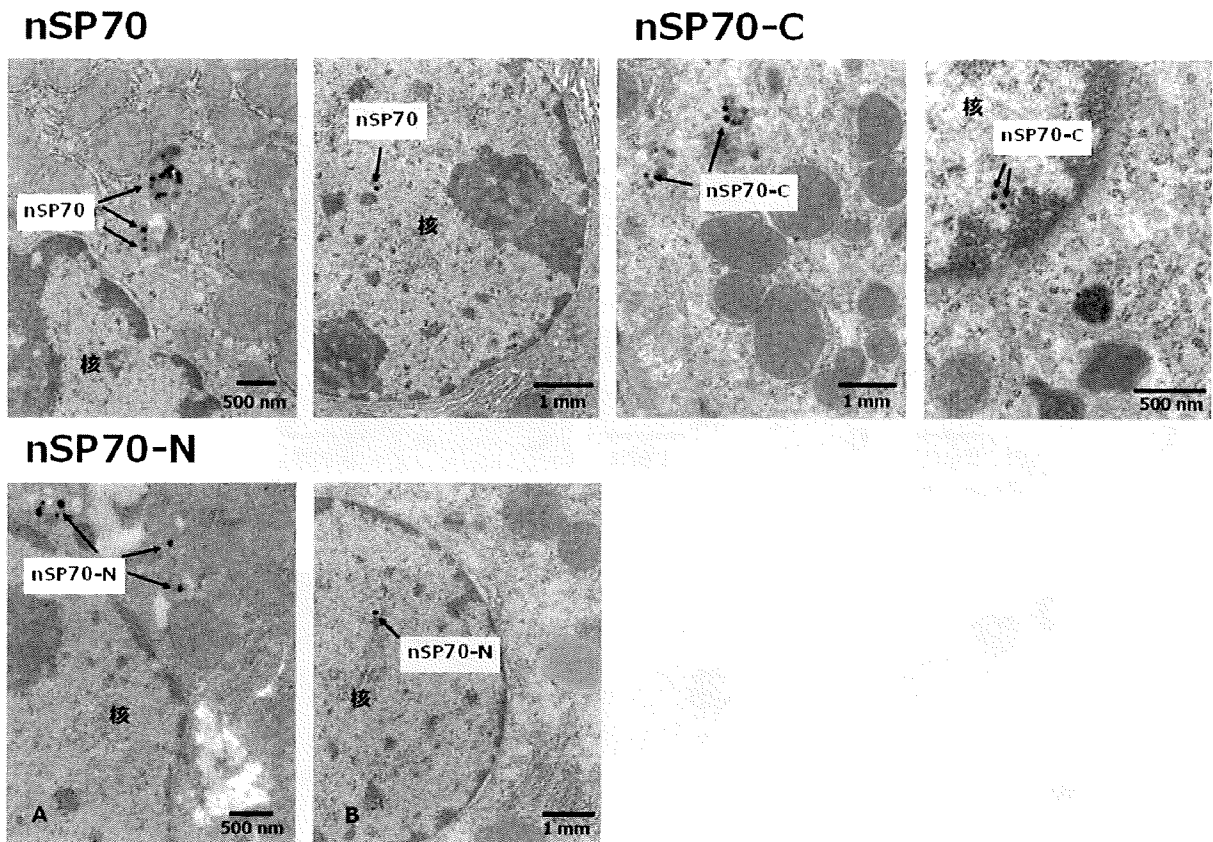


図 58. ナノシリカの肝実質細胞内局在. nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 2 mg/head で BALB/c マウスの尾静脈内より投与した。投与 6 時間後に回収した肝臓から超薄切片を作製し、電子顕微鏡観察により肝実質細胞内における各ナノシリカの局在を解析した。

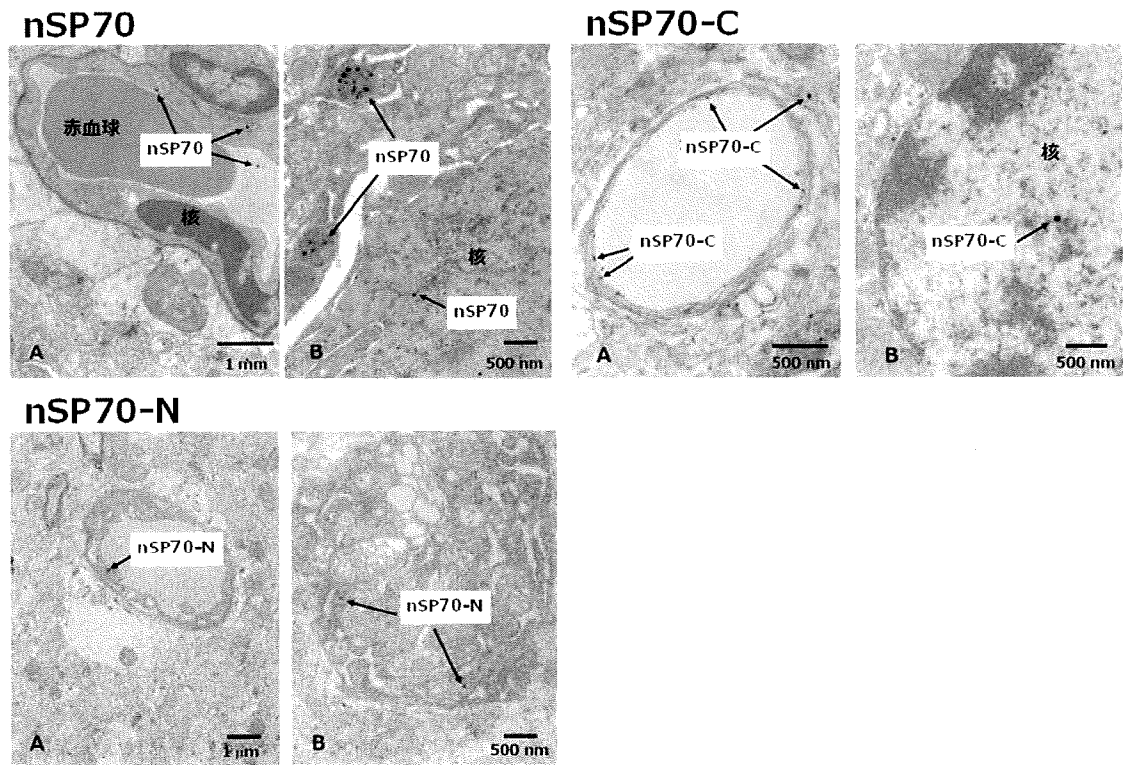


図 59. ナノシリカの脳内局在. nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 2 mg/head で BALB/c マウスの尾静脈内より投与した。投与 6 時間後に回収した肝臓から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察により脳内における各ナノシリカの局在を解析した。(A: 毛細血管周辺、B: アストロサイト周辺)

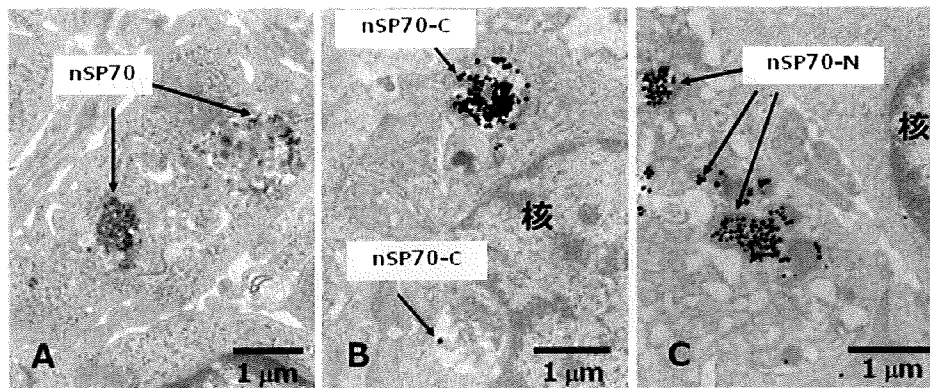


図 60. ナノシリカの肺組織内局在. nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 2 mg/head で BALB/c マウスの尾静脈内より投与した。投与 6 時間後に回収した肝臓から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察により肺組織内における各ナノシリカの局在を解析した。(A: nSP70、B: nSP70-C、C: nSP70-N)

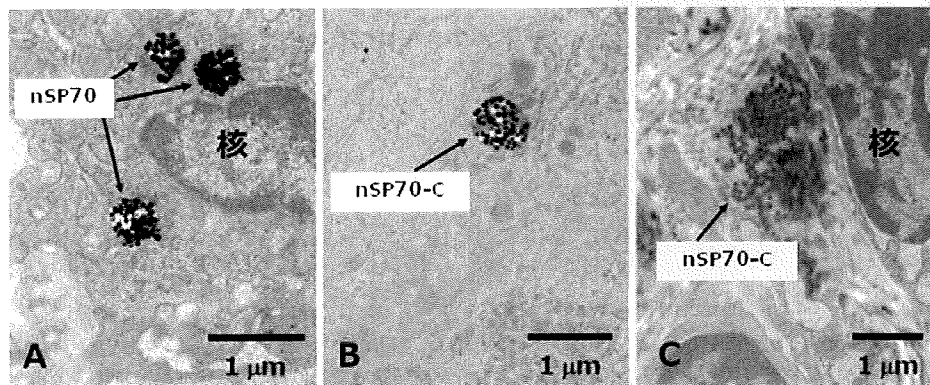


図 61. ナノシリカのリンパ節内局在. nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 2 mg/head で BALB/c マウスの尾静脈内より投与した。投与 6 時間後に回収した肝臓から超薄切切片を作製し、電子顕微鏡観察によりリンパ節内における各ナノシリカの局在を解析した。(A: nSP70、B: nSP70-C、C: nSP70-N)

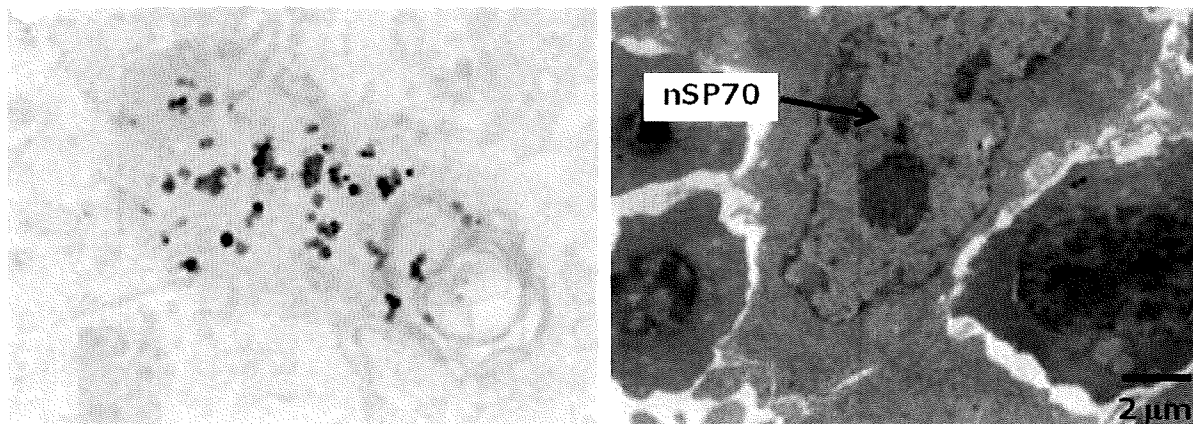


図 62. 電子顕微鏡を用いた、シリカの胎児・胎盤への移行性評価。シリカを妊娠マウスに投与後、胎盤および胎児を回収した。その後、電子顕微鏡を用いて、胎盤(A)および胎児(B)へのシリカの移行を評価した。