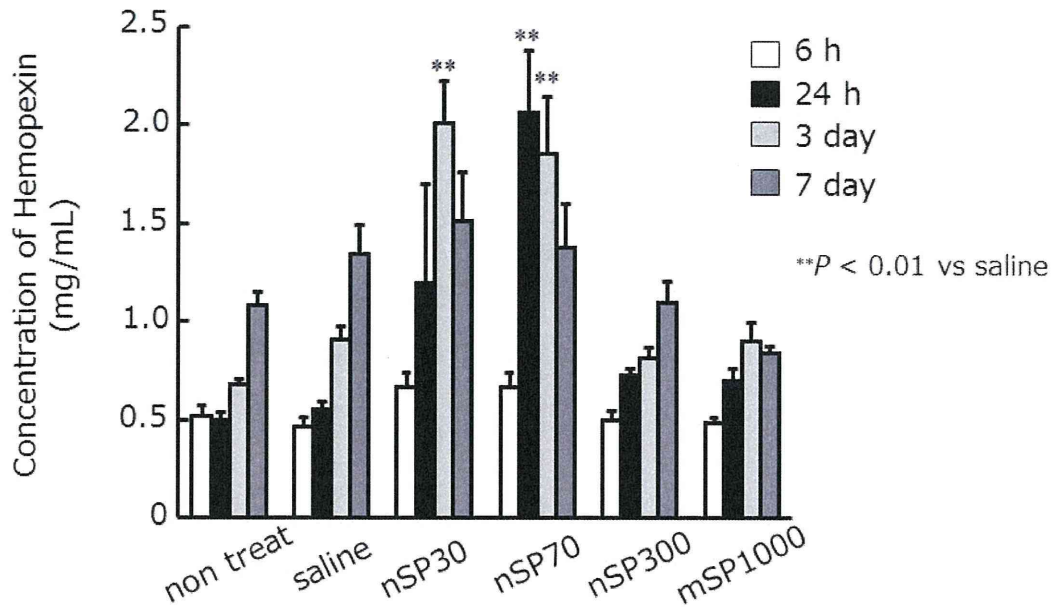
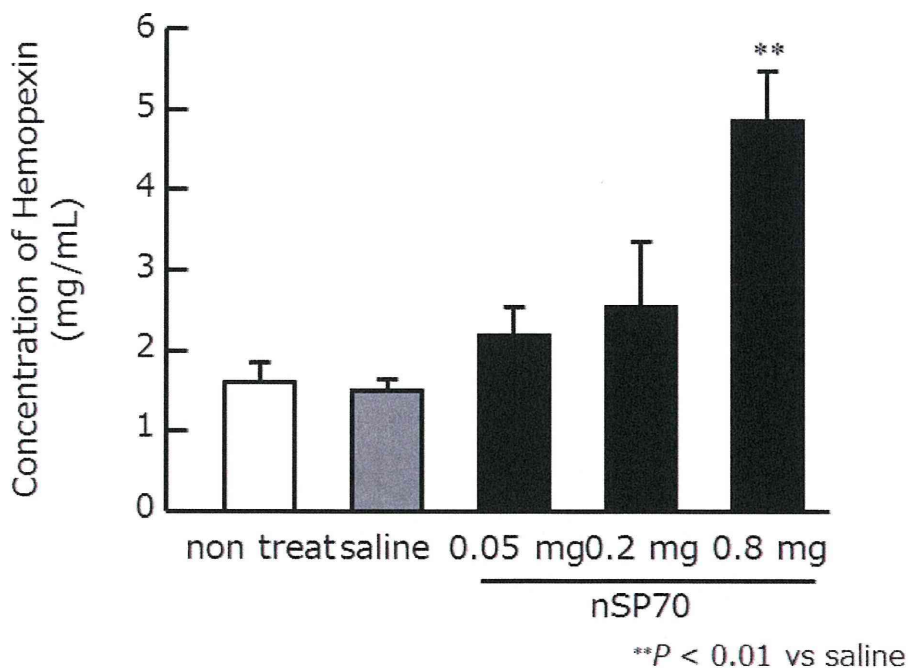


図 12. EST 法による催奇形性試験 (心筋分化を指標とした評価)。マウス胚性幹細胞 D3 株を種々の濃度の非晶質シリカ (nSP30, nSP30-C, nSP30-N, nSP70, nSP70-C, nSP70-N, nSP300, mSP1000) と共に培養し、心筋細胞へ分化させた。分化誘導開始日から 10 日目に分化の指標として拍動を光学顕微鏡下で観察し、拍動率を評価した。



**図 13. 血中 Hemopexin 量の経時的解析.** BALB/ c マウスに nSP70、nSP300、mSP1000 をそれぞれ 0.8 mg/mouse で、および nSP30 を 0.4 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 6 時間、24 時間、3 日、7 日における血中 hemopexin 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 by Bonferroni test)



**図 14. 血中 Hemopexin 量の投与量依存性の解析.** BALB/ c マウスに nSP70 を 0.05、0.2、0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 hemopexin 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 by Bonferroni test)

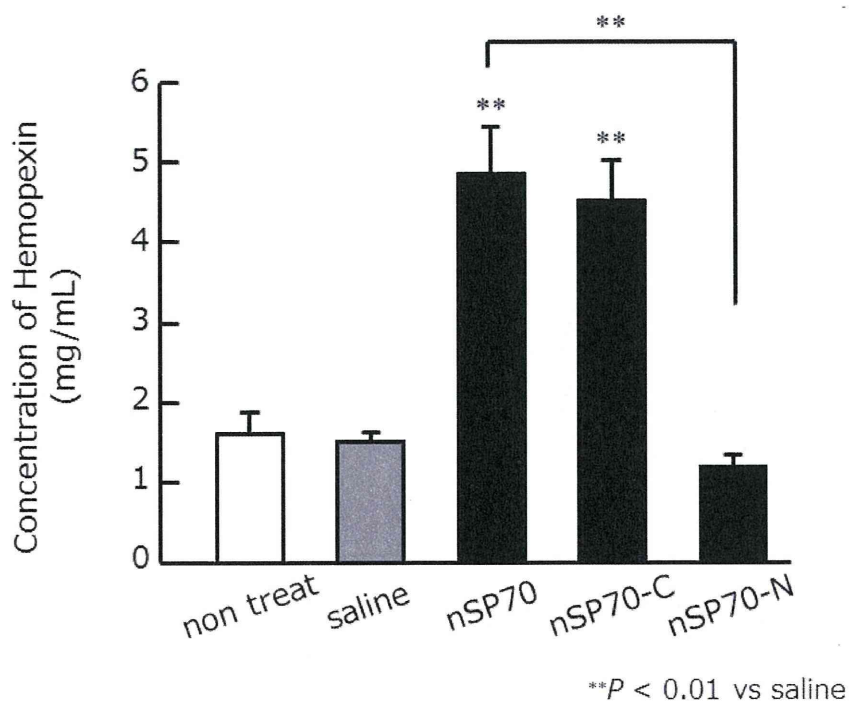


図 15. 表面修飾ナノシリカ投与による血中 Hemopexin 量の変化. BALB/ c マウスに nSP70、nSP70-C、nSP70-N を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 hemopexin 量を ELISA により測定した。Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n=5-6). \*\*p < 0.01 versus value for saline group or nSP70 group by Bonferroni test)

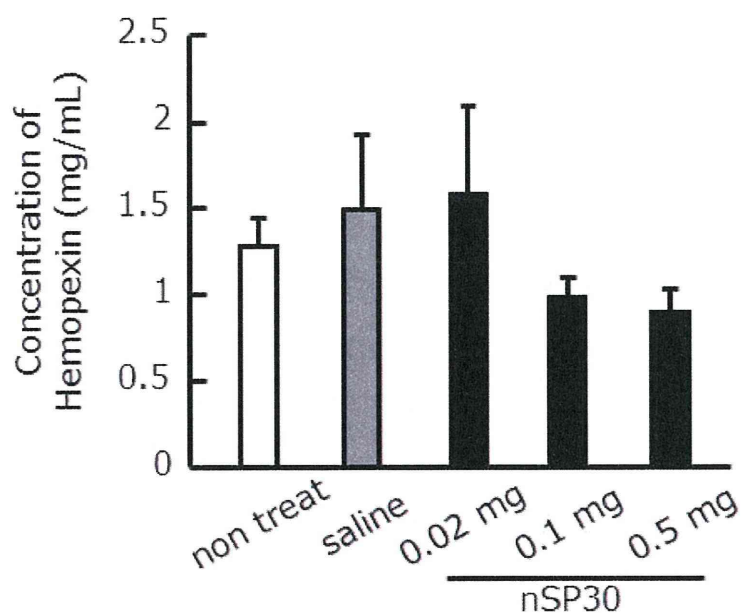
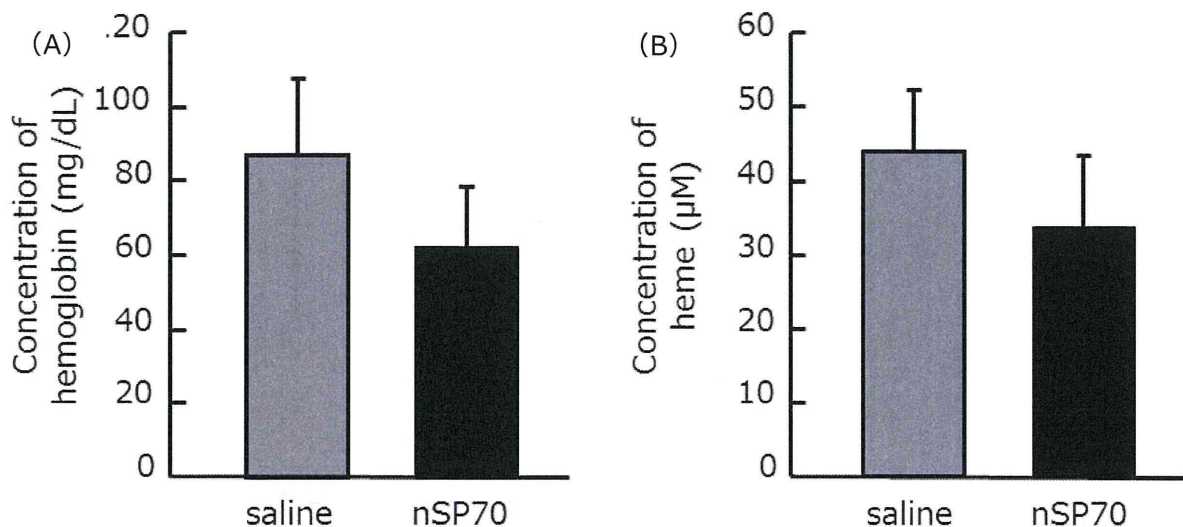
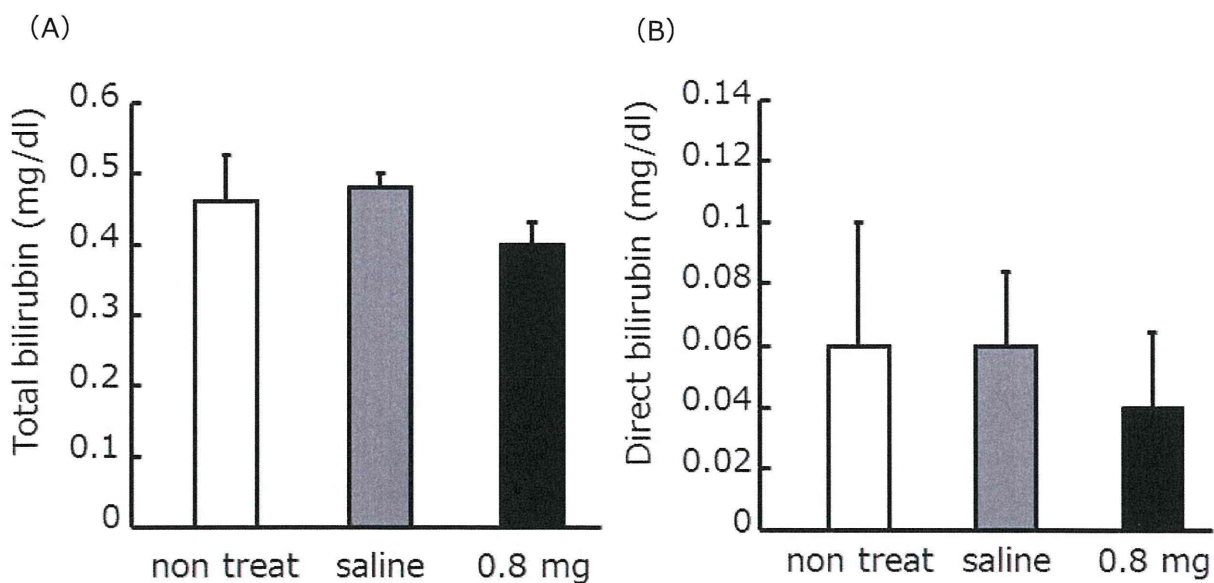


図 16. ナノシリカ経鼻曝露時の血中マーカーの変化. BALB/ c マウスに nSP30 を 0.02 mg/mouse、0.1 mg/mouse、0.5 mg/mouse で経鼻投与し、投与後 24 時間における血中 hemopexin 量を ELISA により測定した。Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n=5-6).



**図 17. 血中 Hemoglobin 量、Heme 量の解析.** BALB/ c マウスに nSP70 を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 24 時間における血中 hemoglobin (A)、heme (B) 量を測定した。Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n=5-6).



**図 18. ナノシリカ投与時の溶血検査.** BALB/ c マウスに nSP70 を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 5 時間における総ビリルビン (A)、直接ビリルビン (B) 量を測定した。Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n=5-6).

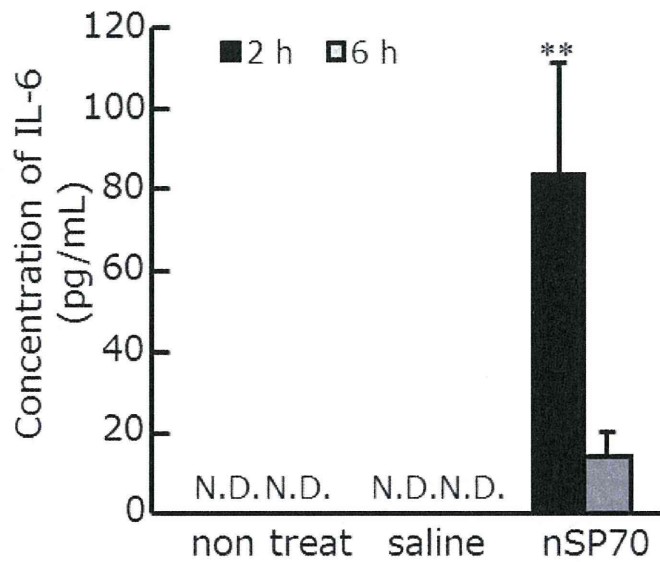
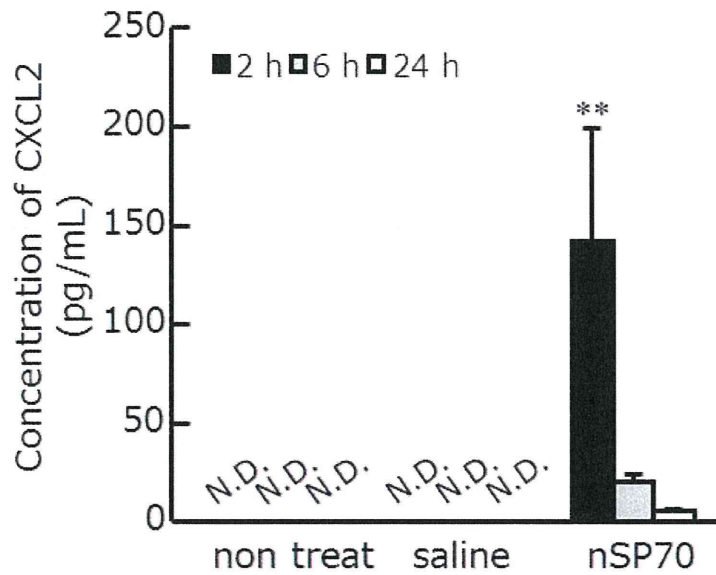


図 19. ナノシリカ投与時の血中 IL-6 量の測定. BALB/ c マウスに nSP70 を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 2、6 時間における血中 IL-6 量を ELISA により測定した。Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n=5-6). \*\*p < 0.01 versus value for saline group by Bonferroni test)



\*\*P < 0.01 vs saline

図 20. ナノシリカ投与時の血中 CXCL2 量の測定. BALB/ c マウスに nSP70 を 0.8 mg/mouse で尾静脈投与し、投与後 2、6、24 時間における血中 CXCL2 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 by Bonferroni test)

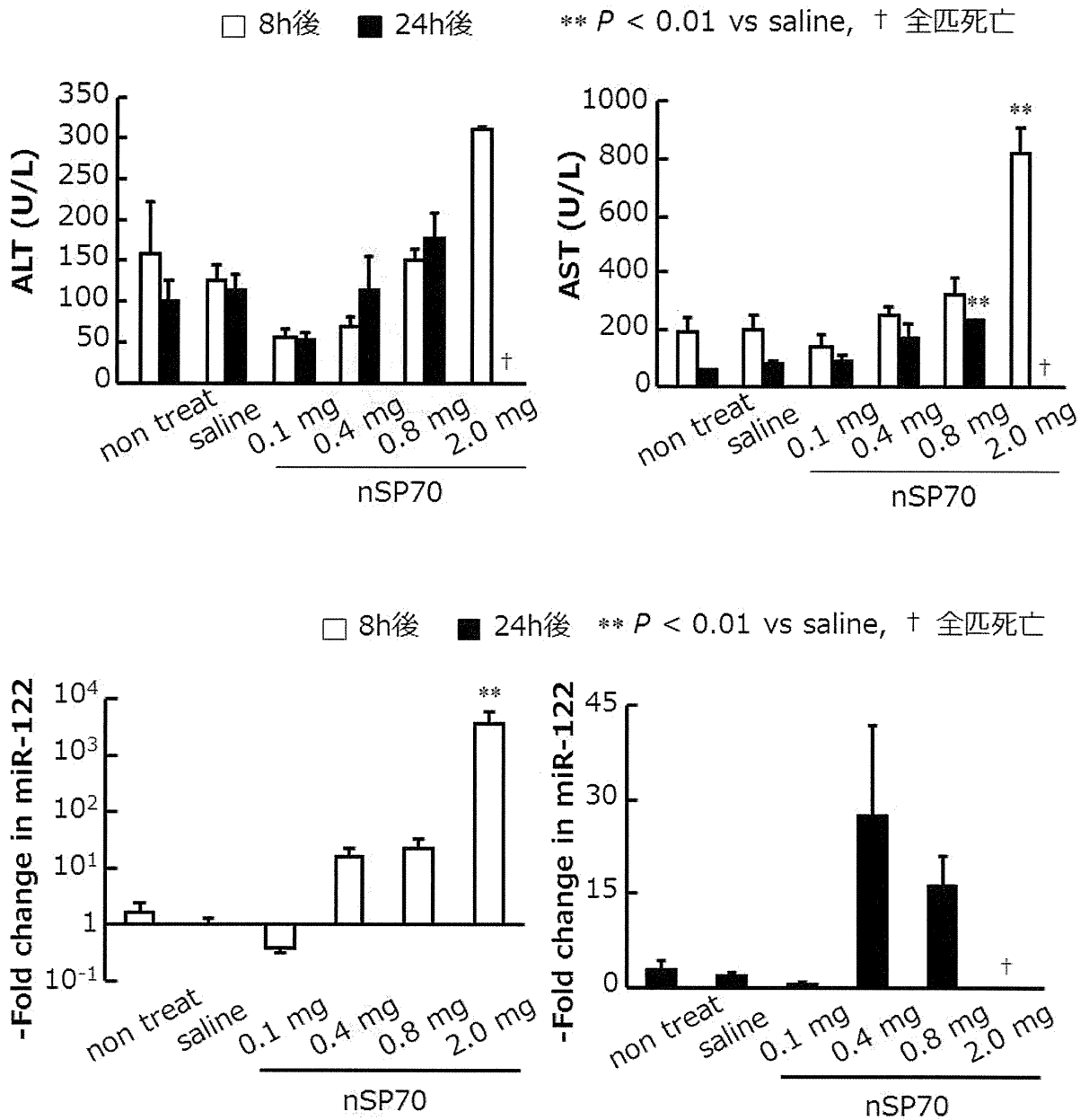


図 21. ナノシリカ曝露後の血中 ALT、AST、miR-122 の発現変動解析. nSP70 を 0.1 mg/mouse、0.4 mg/mouse、0.8 mg/mouse、2 mg/mouse で尾静脈投与し、投与 8 時間後、24 時間後における血中 ALT (A)・AST (B)・miR-122 (C、D) 量を測定した。

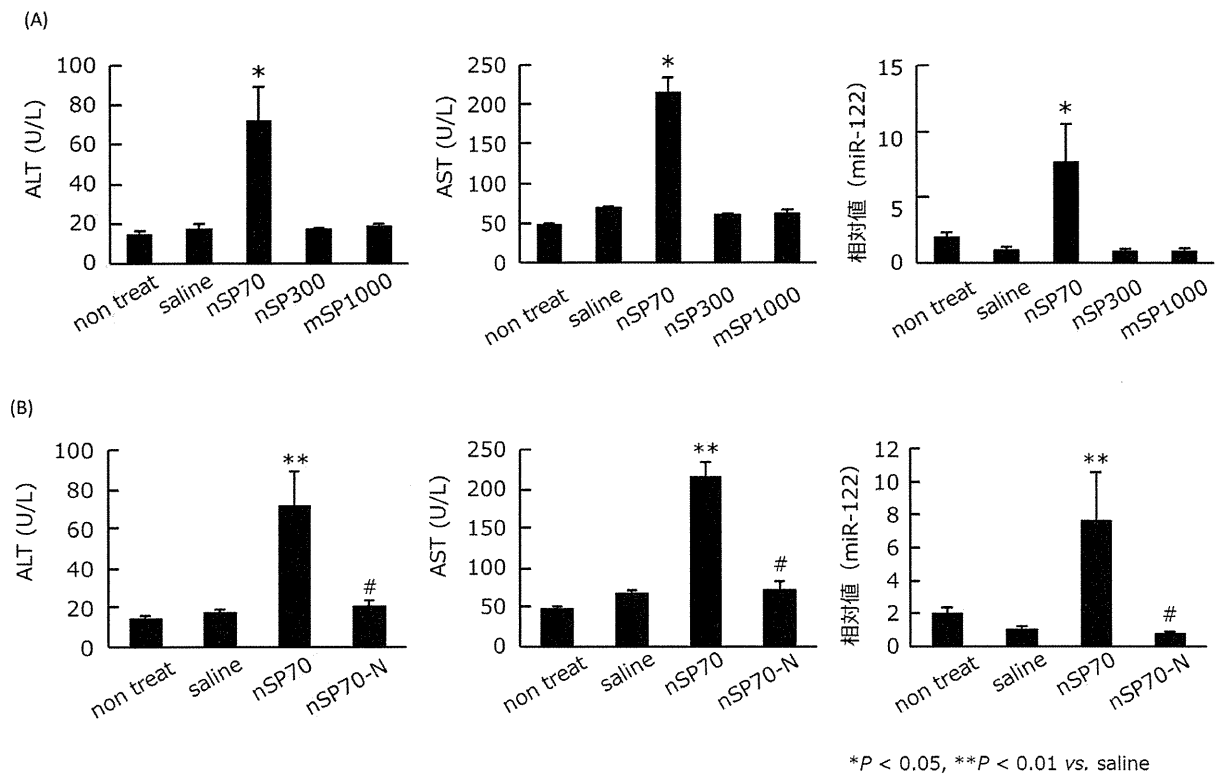
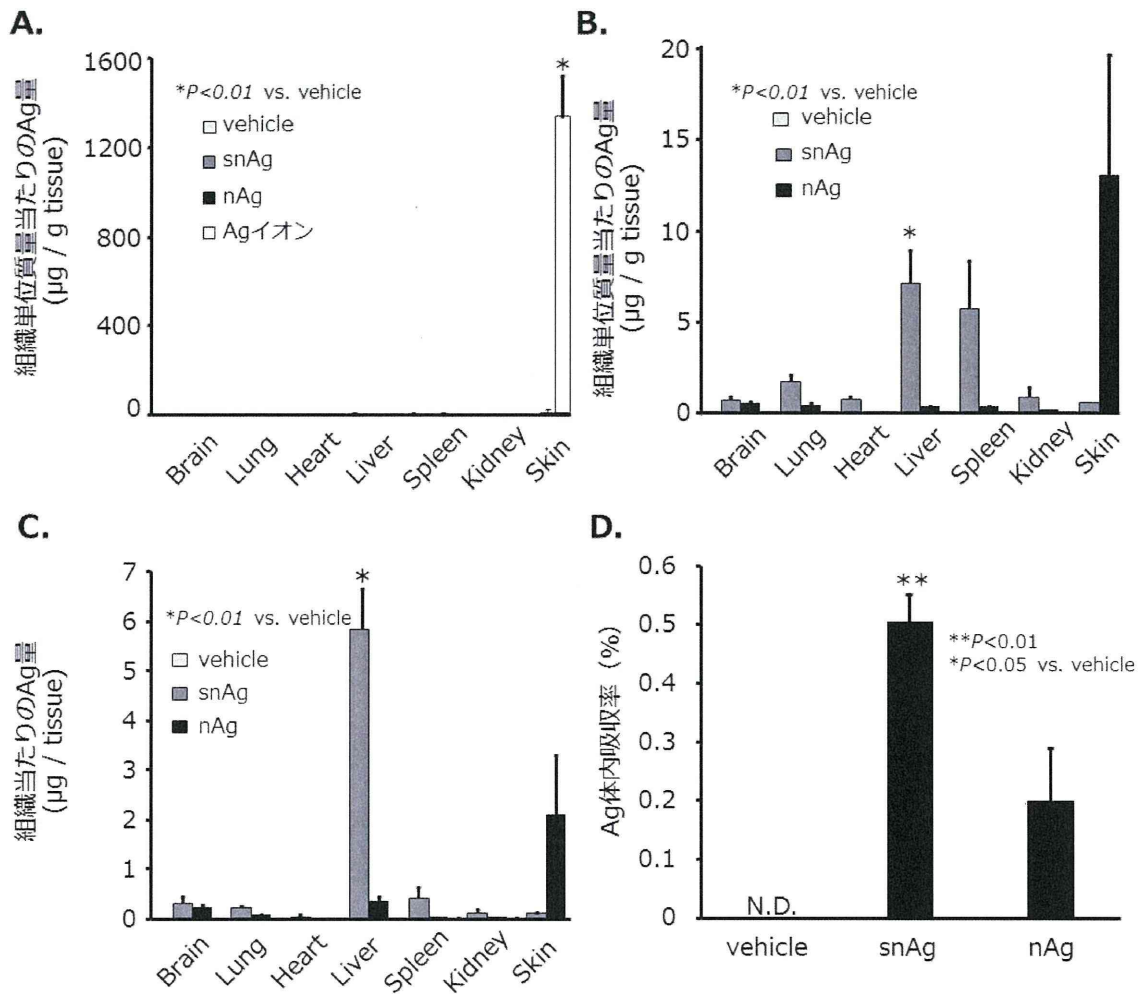
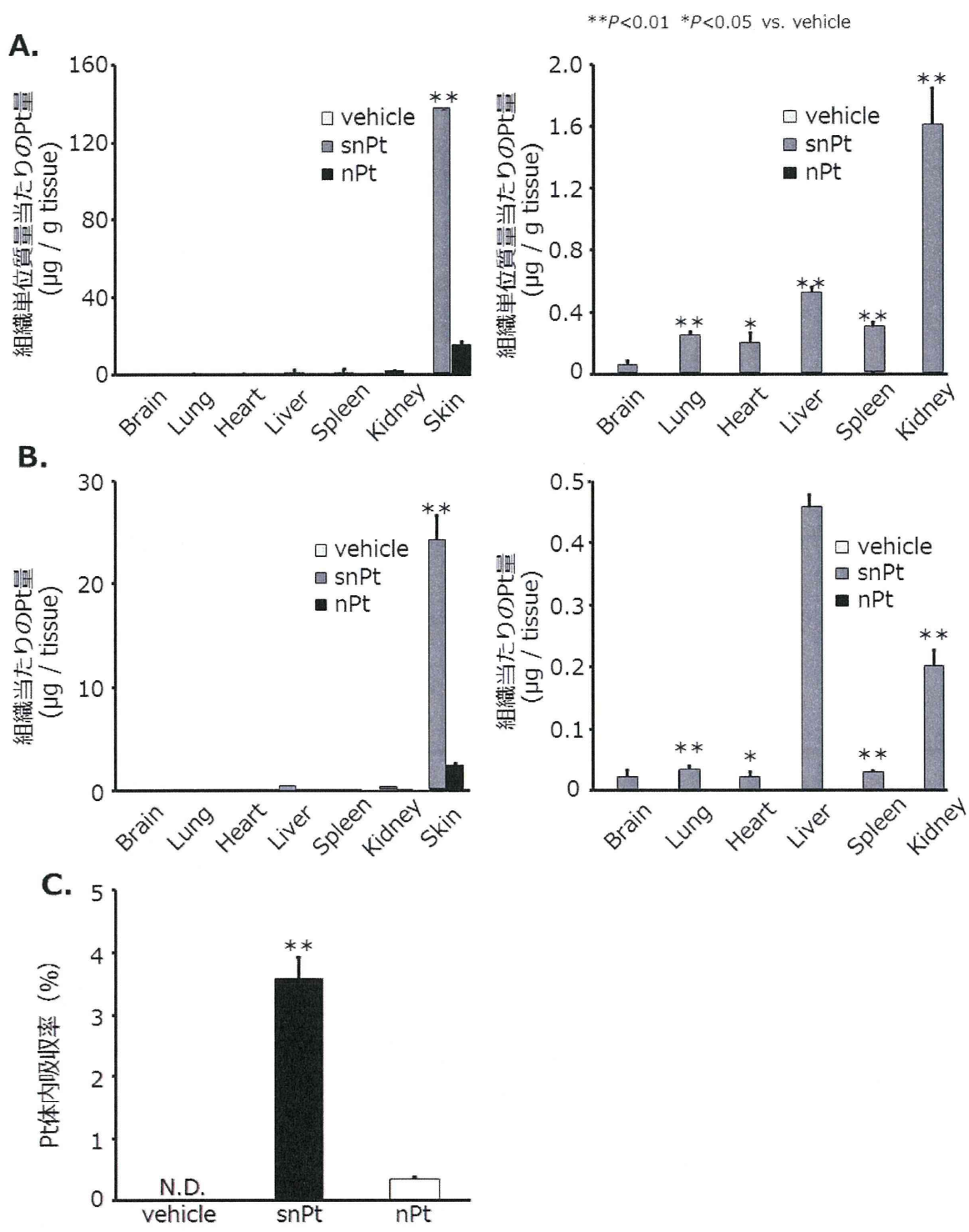


図 22. 各粒子径のナノシリカ (A) 及び表面修飾ナノシリカ (B) 曝露後の血中 ALT、AST、miR-122 の発現変動解析. nSP70、nSP70-N、0.8 mg/mouse で尾静脈内投与し、投与 8 時間後における血中 ALT・AST・miR-122 量を測定した。Data are presented as mean  $\pm$  S.E. (n=4-5). \*\* $p < 0.01$  versus value for saline group, # $p < 0.01$  versus value for nSP70 group by ANOVA test.)



**図 23. nAg・snAg の 7 日間経皮曝露後の組織移行量測定(ICP-MS).** BALB/c マウス (雌性、6 週齢) の両耳介に nAg、snAg、またはコントロールとして硝酸銀溶液を 100 µg/Ag/ear で 7 日間連続塗布した。最終投与から 24 時間後に、耳介、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を用いて各サンプルの体内吸収性・組織移行量を評価した。A ; 銀イオンを含むグラフ、B ; 銀イオンを除いたグラフ(組織重量あたり)、C ; 銀イオンを除いたグラフ(組織あたり)、D ; 体内吸収率 Data are presented as means ± SE (n = 3; \*p <0.05, \*\*p <0.01 versus value for vehicle-treated group by Dunnett's test)





**図 24. nPt・snPt の 7 日間経皮曝露後の組織移行量測定(ICP-MS).** BALB/c マウス (雌性、6 週齢) の両耳介に nPt、snPt を 50 µg/Pt/ear で 7 日間連続塗布した。最終投与から 24 時間後に、耳介、脳、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を摘出し、誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)を用いて各サンプルの体内吸収性・組織移行量を評価した。A ; 各組織重量あたり、B ; 各組織あたり、C ; 体内吸収率のグラフ Data are presented as means ± SE (n = 3; \*p <0.05, \*\*p <0.01 versus value for vehicle-treated group by Dunnett's test)

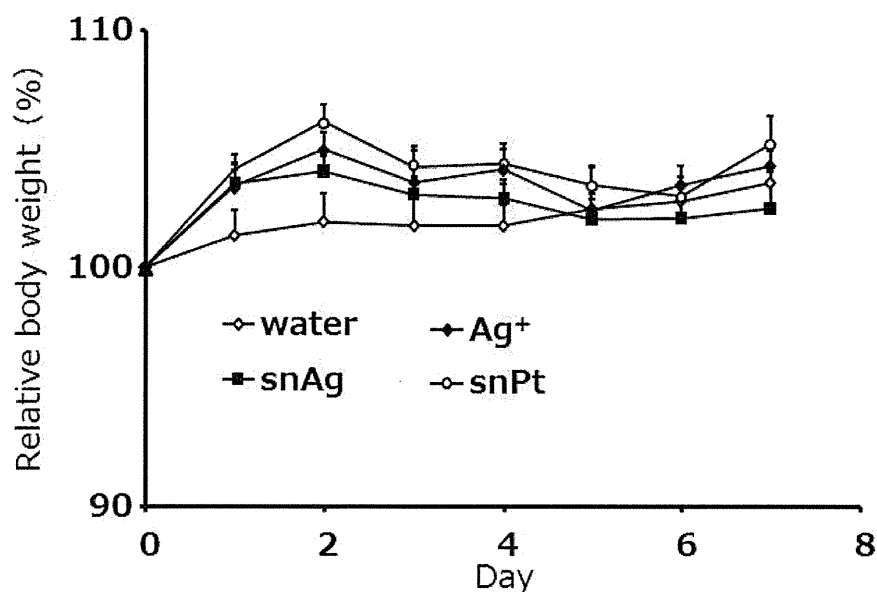
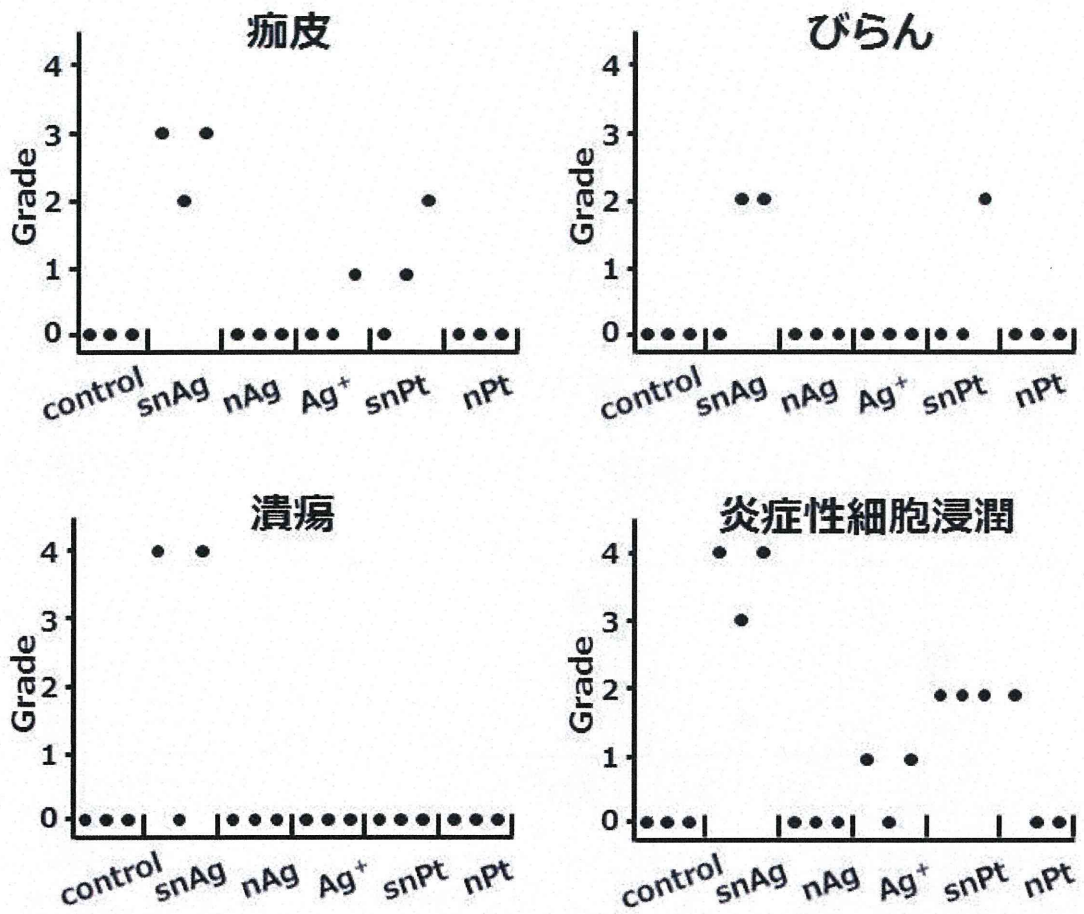


図 25. サブナノ銀・白金の 7 日間経皮曝露時の体重変化. BALB/c マウス (雌性、6 週齢) の両耳介に snAg、snPt、および硝酸銀溶液を 100  $\mu\text{g}/\text{body}$  で 7 日間連続塗布し、経日的に体重を測定した。 Data are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 5$ )

	総白血球数 ( $\times 10^9/\text{L}$ )	リンパ球数 ( $\times 10^9/\text{L}$ )	単球数 ( $\times 10^9/\text{L}$ )	顆粒球数 ( $\times 10^9/\text{L}$ )	赤血球数 ( $\times 10^{12}/\text{L}$ )	血小板数 ( $\times 10^9/\text{L}$ )
water	3.64 $\pm 0.8$	2.93 $\pm 0.67$	0.094 $\pm 0.03$	0.62 $\pm 0.15$	9.06 $\pm 0.37$	328.9 $\pm 77.1$
snAg	5.65 $\pm 1.2$	4.43 $\pm 0.97$	0.306 $\pm 0.09$	0.91 $\pm 0.31$	9.64 $\pm 0.15$	397.9 $\pm 44.5$
snPt	5.9 $\pm 0.5$	4.91 $\pm 0.41$	0.176 $\pm 0.06$	0.81 $\pm 0.11$	10.13 $\pm 0.07$	526.6 $\pm 23.8$

図 26. サブナノ銀・白金の 7 日間経皮曝露時の血球検査. BALB/c マウス (雌性、6 週齢) の両耳介に snAg、snPt、および硝酸銀溶液を 100  $\mu\text{g}/\text{body}$  で 7 日間連続塗布した。最終投与から 24 時間後の血液を回収し、血球数を測定した。 Data are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 5$ )

A.



B.

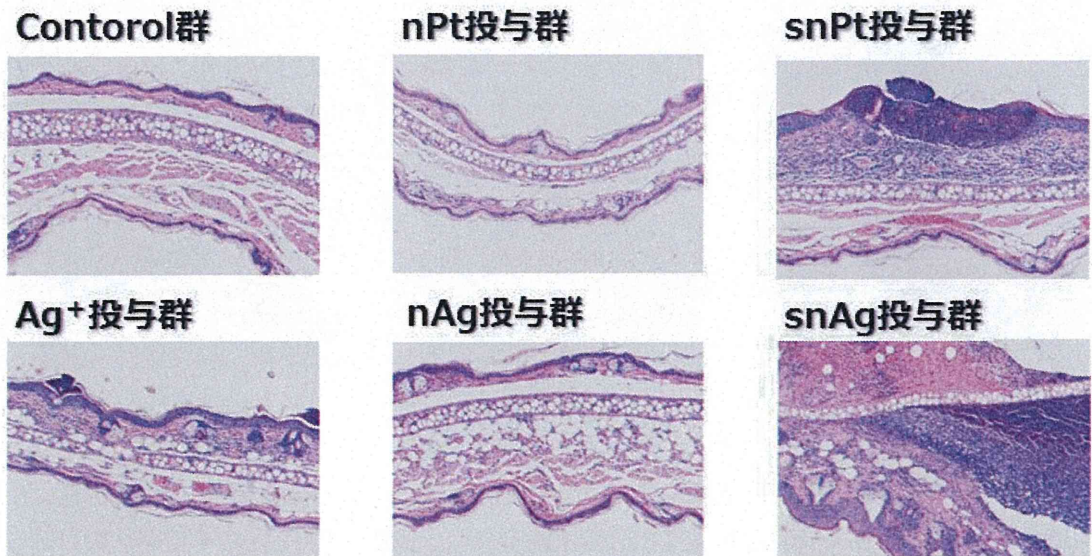
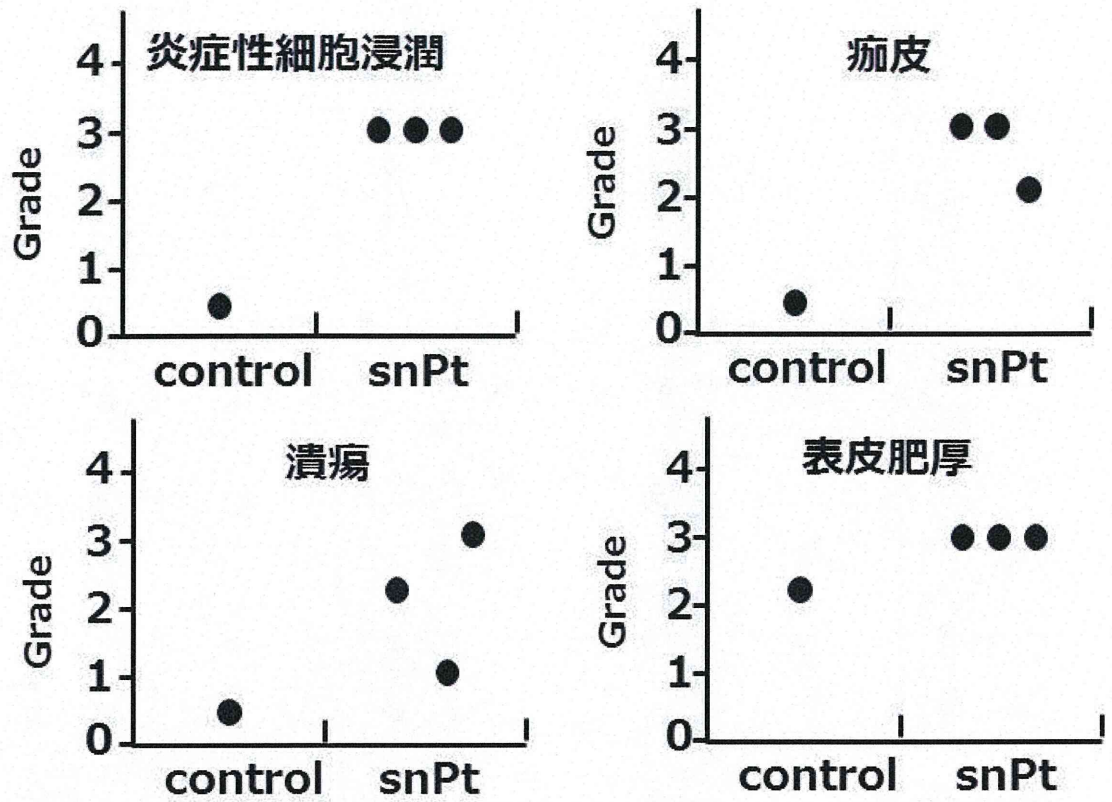


図 27. サブナノ銀の 7 日間経皮曝露後の病理解析(皮膚). BALB/c マウス (雌性、6 週齢) の両耳介に snAg、snPt、および硝酸銀溶液を 100  $\mu$ g/body で 7 日間連続塗布した。最終投与から 24 時間後の耳介を回収し、病理解析を実施した。A ; 病理所見スコアグラフ、B ; 組織写真 (n = 3)

A.



B.

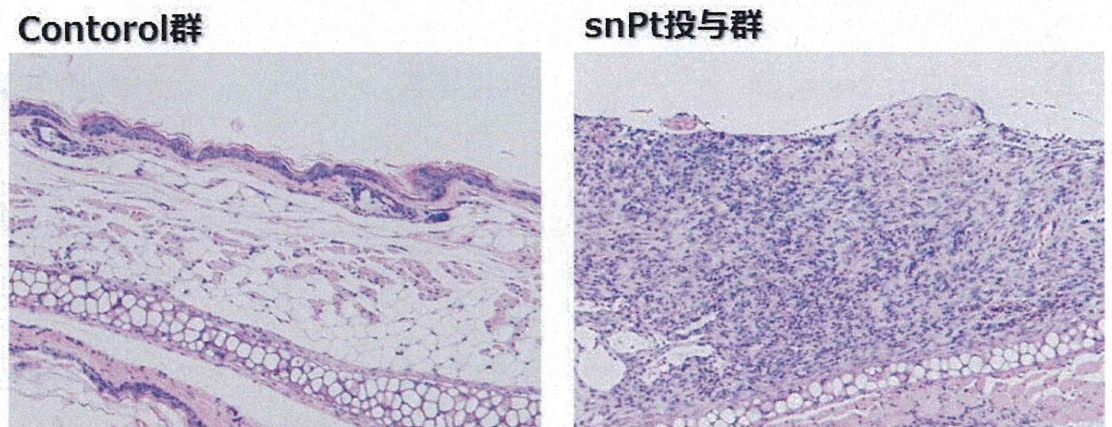


図 28. サブナノ銀の 28 日間経皮曝露後の病理解析(皮膚). BALB/c マウス (雌性、6 週齢) の両耳介に snPt を 100  $\mu\text{g}/\text{body}$  で 28 日間連続塗布した。最終投与から 24 時間後の耳介を回収し、病理解析を実施した。A ; 病理所見スコアグラフ、B ; 組織写真 (n = 3)

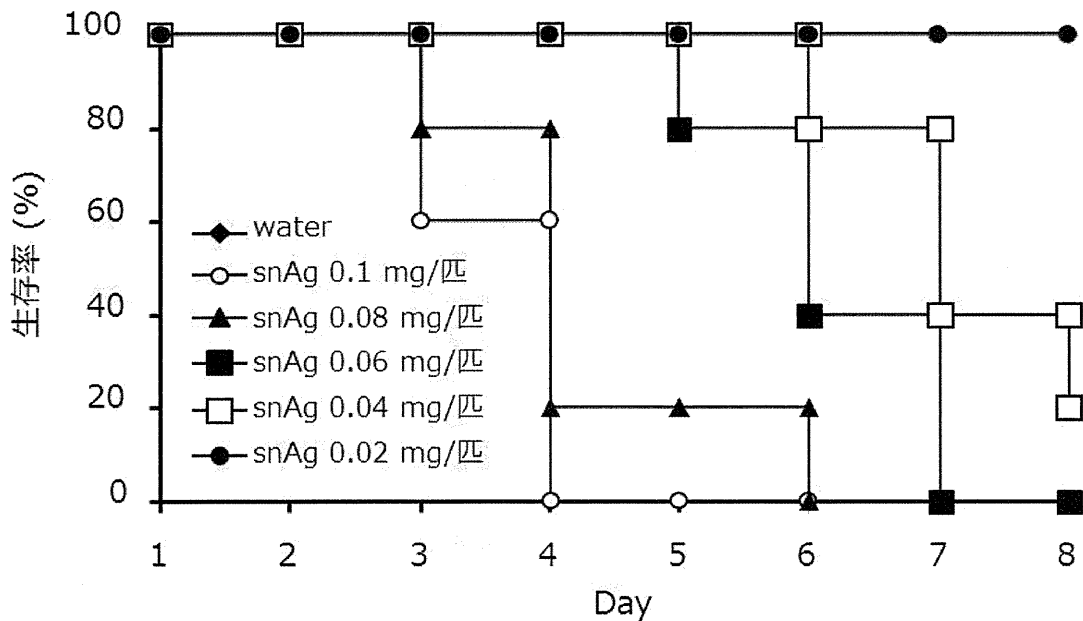


図 29. サブナノ銀 7 日間経鼻曝露時の生存率変化. BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snAg を 0.1 mg/body、0.08 mg/body、0.06 mg/body、0.04 mg/body、0.02 mg/body で 7 日間連続経鼻投与し、経日的に生存率を評価した。(n=5)

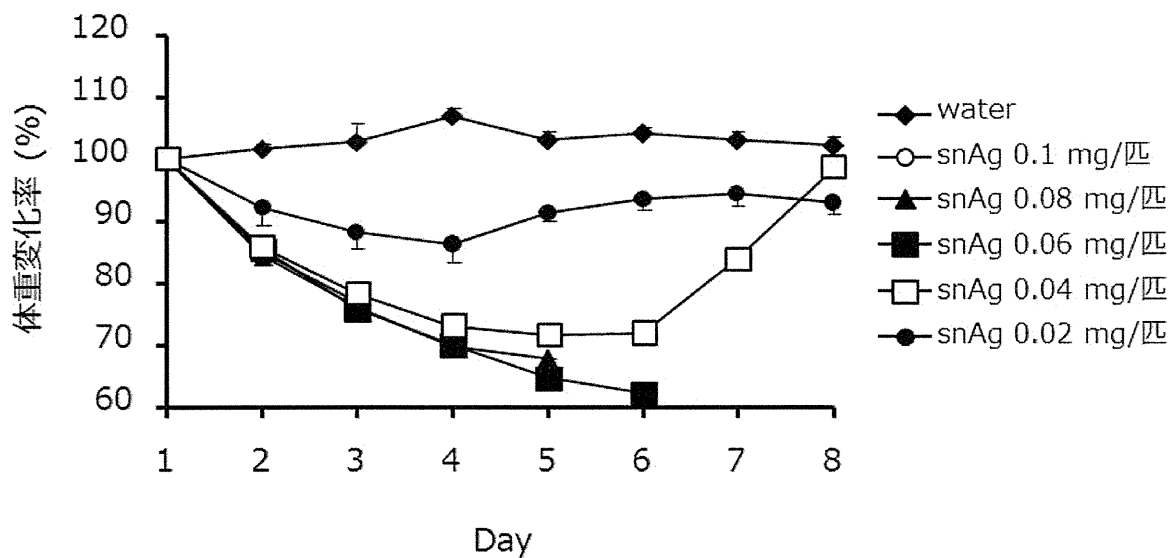


図 30. サブナノ銀 7 日間経鼻曝露時の体重変化. BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snAg を 0.1 mg/body、0.08 mg/body、0.06 mg/body、0.04 mg/body、0.02 mg/body で 7 日間連続経鼻投与し、経日的に体重を測定した。(n=5)

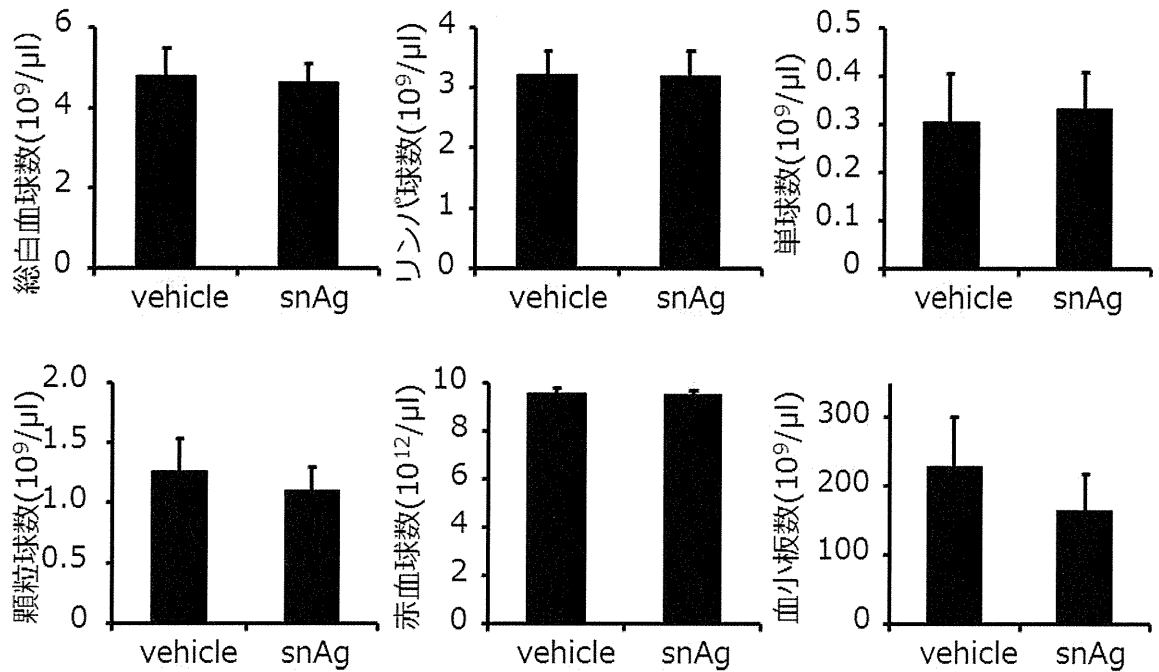
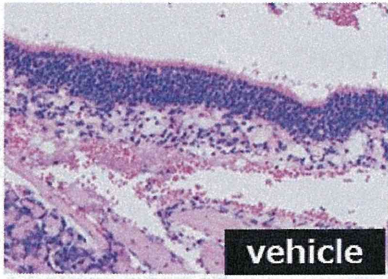


図 31. サブナノ銀(0.02 mg/匹)7 日間経鼻曝露後の血球成分の変化.

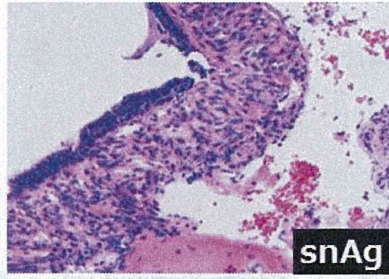
BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snAg を 0.1 mg/body、0.08 mg/body、0.06 mg/body、0.04 mg/body、0.02 mg/body で 7 日間連続経鼻投与した。最終投与 24 時間後に、心臓採血により血液を回収し、多項目自動血球計測装置 VetScan HM2 を用いて、総白血球数、リンパ球数、単球数、顆粒球数、赤血球数、血小板数を電気抵抗法により測定した。(n=5)

嗅上皮 炎症性細胞浸潤



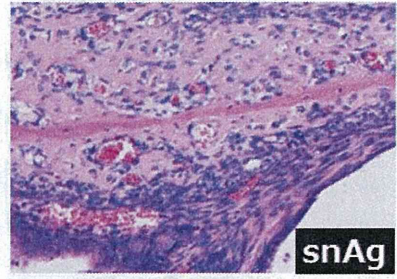
vehicle

嗅上皮 炎症性細胞浸潤  
粘膜固有層 線維化



snAg

鼻腔(骨) 増生  
粘膜固有層 線維化



snAg

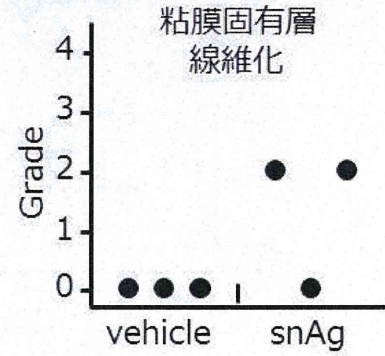
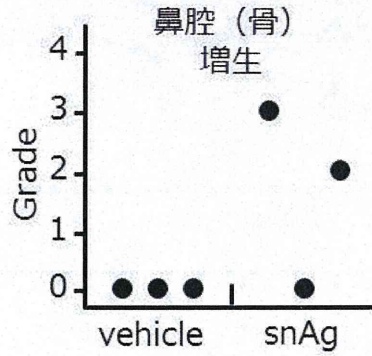
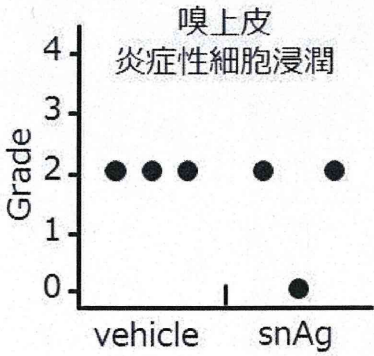


図 32. サブナノ銀(0.02 mg/匹)7日間経鼻曝露後の病理検査(鼻腔).

BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snAg を 0.1 mg/body、0.08 mg/body、0.06 mg/body、0.04 mg/body、0.02 mg/body で 7 日間連続経鼻投与した。最終投与 24 時間後に各組織を回収し、パラフィンブロックを作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色 (H.E.染色) を実施した。(n=3)

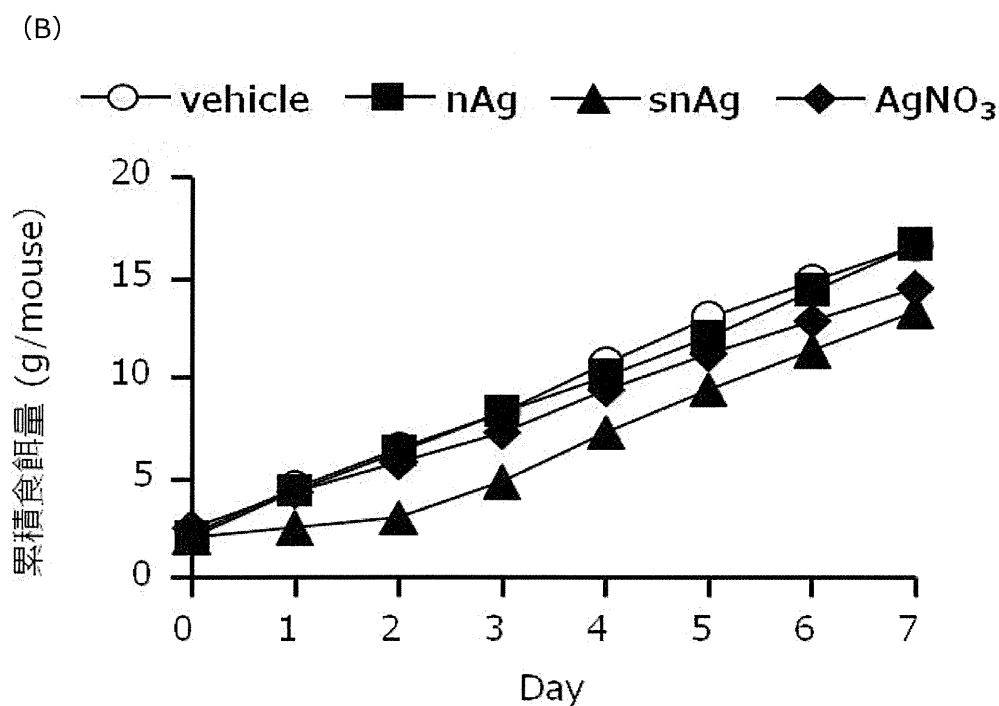
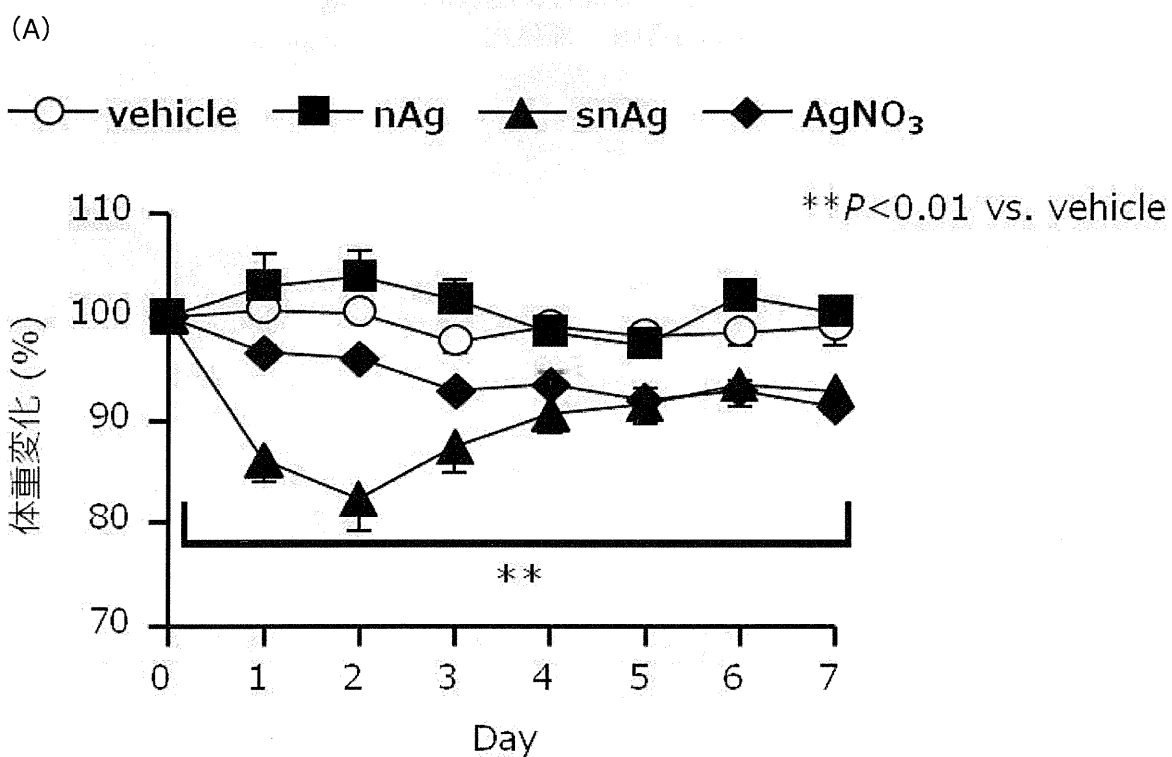


図 33. ナノ・サブナノ銀、銀イオン(1.2 mg Ag/kg)7日間経鼻曝露時の体重・食餌量変化.

BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snAg、nAg、コントロールとして硝酸銀水溶液をそれぞれ 1.2 mg Ag/kg で 7 日間連続経鼻投与した。また、BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snPt、nPt をそれぞれ 0.1 mg Pt/mouse で 7 日間連続経鼻投与した。その際、経日的に体重(A)、食餌量(B)、を測定した。Data are presented as means  $\pm$  SE (n = 5; \*\**p* < 0.01 versus value for vehicle-treated group by Dunnett's test) (n=5)



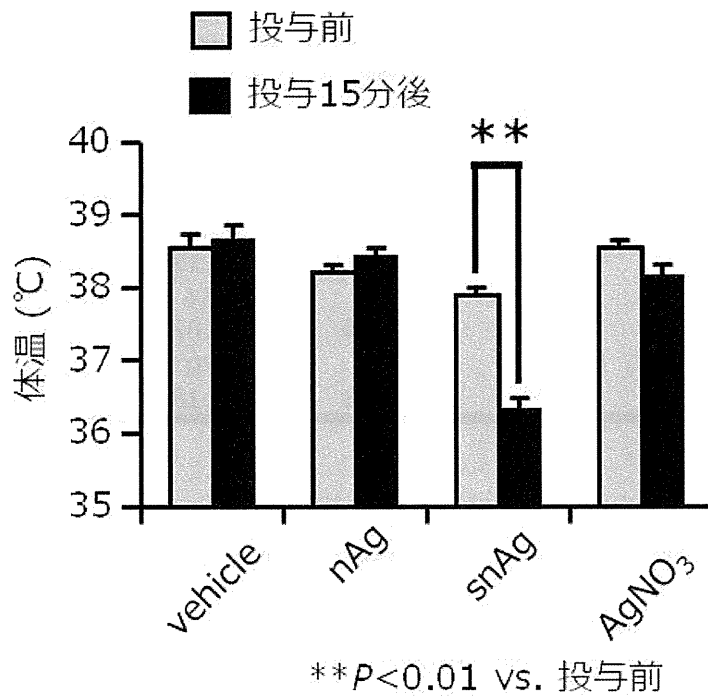


図 34. ナノ・サブナノ銀、銀イオン(1.2 mg Ag/kg)7 日間経鼻曝露時の体温変化(投与 1 日目). BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snAg、nAg、コントロールとして硝酸銀水溶液をそれぞれ 1.2 mg Ag/kg で 7 日間連続経鼻投与した。その際、投与 1 日目の投与前および投与 15 分後の体温を測定した。(n=5, \*\*p < 0.01 versus value for vehicle-treated group by Dunnett's test)

(A)

血球検査	総白血球数 ( $\times 10^9/L$ )	リンパ球数 ( $\times 10^9/L$ )	単球数 ( $\times 10^9/L$ )	顆粒球数 ( $\times 10^9/L$ )	赤血球数 ( $\times 10^{12}/L$ )	血小板数 ( $\times 10^9/L$ )
vehicle	3.67 $\pm 0.38$	3.08 $\pm 0.39$	0.18 $\pm 0.08$	0.41 $\pm 0.10$	10.28 $\pm 0.04$	551.6 $\pm 38.6$
nAg	4.59 $\pm 0.39$	3.80 $\pm 0.31$	0.10 $\pm 0.01$	0.68 $\pm 0.13$	10.38 $\pm 0.33$	699.5 $\pm 58.4$
snAg	2.85 $\pm 0.16$	2.13 $\pm 0.16$	0.12 $\pm 0.04$	0.61 $\pm 0.07$	10.57 $\pm 0.15$	729.8 $\pm 40.0$
AgNO <sub>3</sub>	4.46 $\pm 0.64$	3.44 $\pm 0.51$	0.32 $\pm 0.08$	0.70 $\pm 0.18$	10.51 $\pm 0.25$	518.4 $\pm 96.0$

(B)

血液生化学検査	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	CPK (U/L)	ALB (g/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)
vehicle	27.8 $\pm 1.1$	54.4 $\pm 3.5$	17.5 $\pm 0.8$	217.4 $\pm 46.1$	2.0 $\pm 0.1$	149.8 $\pm 0.5$	6.4 $\pm 0.3$
nAg	26.3 $\pm 1.5$	53.5 $\pm 8.6$	15.1 $\pm 1.2$	189.3 $\pm 59.2$	2.2 $\pm 0.1$	148.3 $\pm 0.8$	6.8 $\pm 0.8$
snAg	31.0 $\pm 5.1$	56.7 $\pm 4.6$	14.4 $\pm 0.6$	178.5 $\pm 31.1$	2.2 $\pm 0.1$	148.3 $\pm 0.5$	6.6 $\pm 0.4$
AgNO <sub>3</sub>	26.8 $\pm 2.7$	74.8 $\pm 11.0$	15.1 $\pm 1.0$	323.6 $\pm 81.9$	2.1 $\pm 0.1$	148.8 $\pm 0.8$	5.6 $\pm 0.1$

図 35. ナノ・サブナノ銀、銀イオン(1.2 mg Ag/kg)7 日間経鼻曝露後の血球検査・血液生化学検査。BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snAg、nAg、コントロールとして硝酸銀水溶液をそれぞれ 1.2 mg Ag/kg で 7 日間連続経鼻投与した。最終投与から 24 時間後に血液を回収し、血球検査 (A) と血液生化学検査 (B) を行った。(n=5)

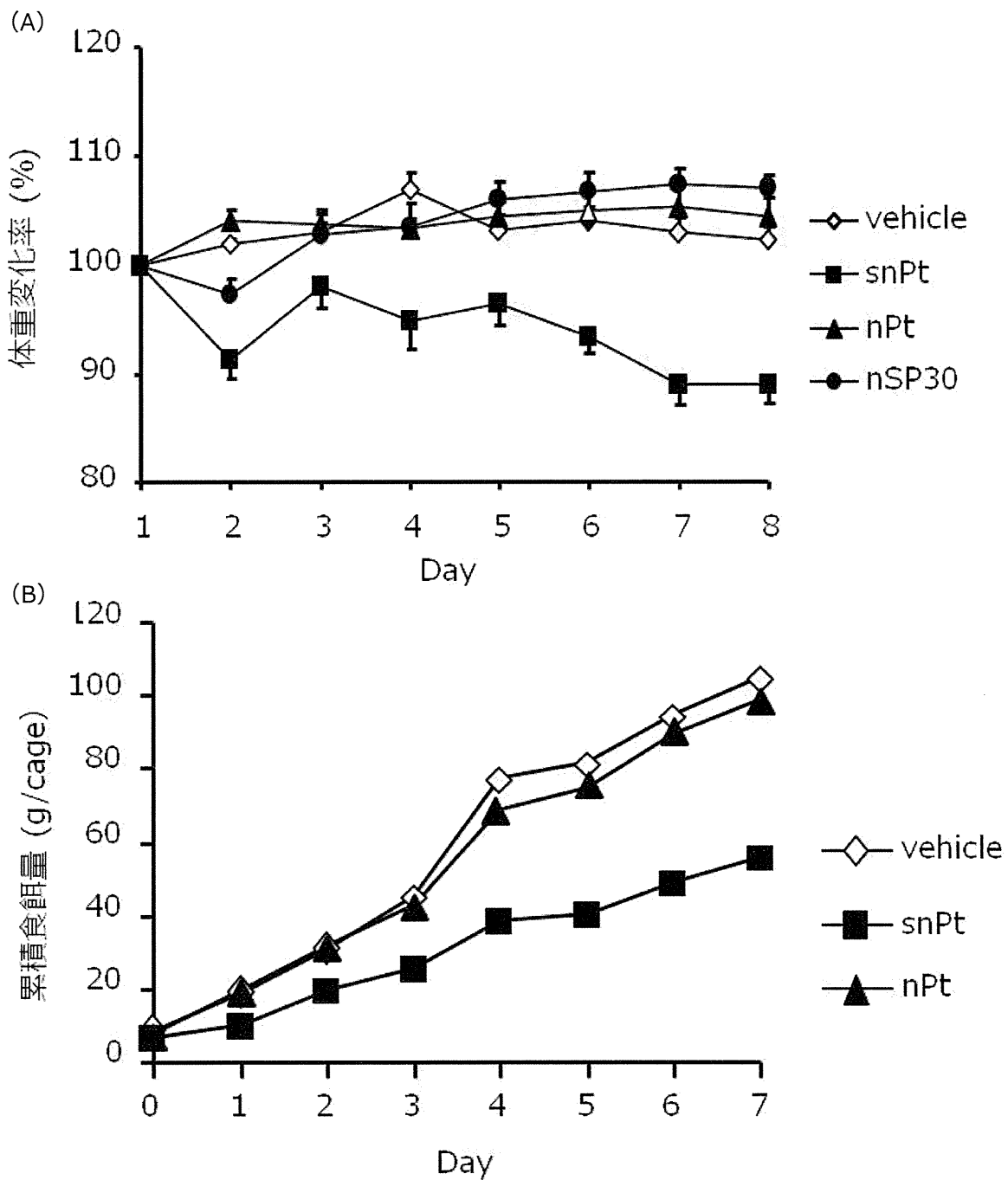
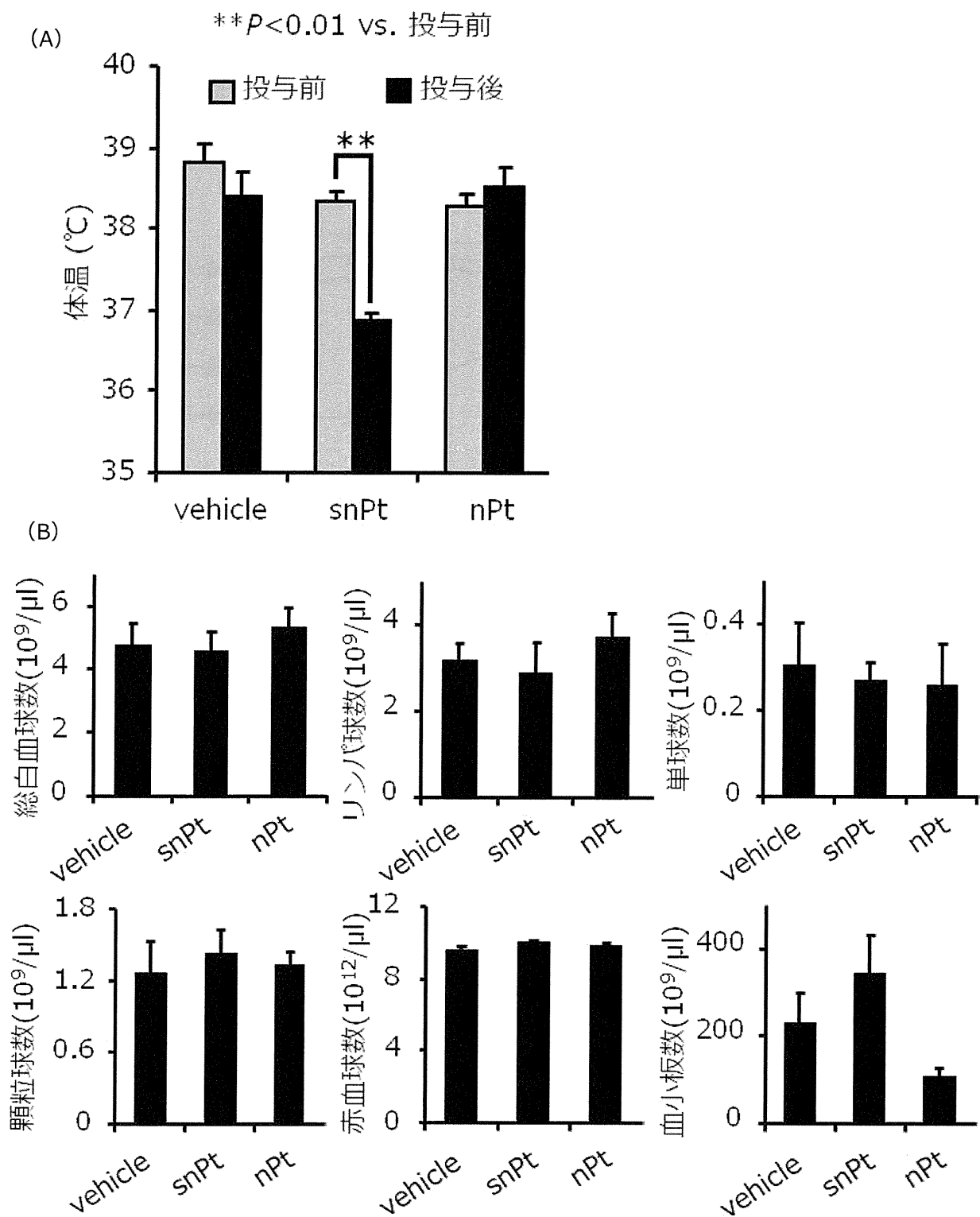


図 36. ナノ・サブナノ白金(0.1 mg /匹)7 日間経鼻曝露時の体重変化と摂餌量変化. BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snPt、nPt をそれぞれ 0.1 mg Pt/mouse で 7 日間連続経鼻投与した。その際、経日的に体重(A)、食餌量(B)、を測定した。(n=5)



**図 37. ナノ・サブナノ白金(0.1 mg /匹) 7日間経鼻曝露後の体温変化 (投与 6 日後)、血球成分の変化.** BALB/c マウス (6 週齢、雌性) に、snPt、nPt をそれぞれ 0.1 mg Pt/mouse で 7 日間連続経鼻投与した。投与 6 日目に、投与前と投与後で体温 (A) を測定した。Data are presented as means  $\pm$  S.E. (\*\*p < 0.01 versus 投与前 by Dunnet's test) また、最終投与から 24 時間後に血球検査 (B) を行った。(n=5)