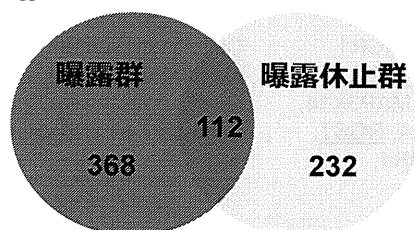


Fig.8. 非晶質ナノシリカ長期曝露・曝露から時間がたった際の影響評価. 非晶質ナノシリカに長期曝露した際に可逆的/不可逆的に変化する影響を評価する目的で、3日ごとの継代をはさみながら、A549細胞を125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のnSP10含有培地で30日間培養した（曝露）群、 nSP10含有培地で15日間培養した後、非含有培地で15日間培養した（曝露休止）群、非含有培地で30日間培養した（未処置）群における影響評価を試みた。（a）各群の模式図、(b)30日間培養した際のnSP10の慢性曝露が細胞増殖に与える影響を評価する目的で、3日ごとの細胞継代時における細胞数を計測した。

a

	曝露群	曝露休止
All	783	709
Upregulated	480	344
Downregulated	303	365

b Upregulated genes



c Downregulated genes

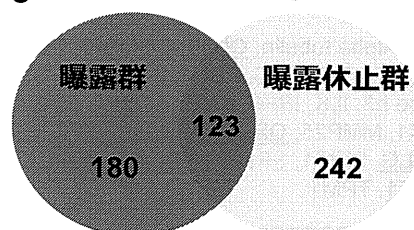


Fig.9. 非晶質ナノシリカ長期曝露時の遺伝子変動の網羅的解析 非晶質ナノシリカに長期曝露した際の可逆的/不可逆的な遺伝子変動に関して、マイクロアレイにより解析を試みた。(a) 曝露群、曝露休止群の遺伝子のうち、未処置群と比較して、2倍以上発現変動が認められた遺伝子を変動遺伝子とした。(b) 変動遺伝子のうち、2倍以上の発現上昇が認められた遺伝子、(c) 2倍以上の発現低下が認められた遺伝子をそれぞれ、グラフとした。

Network	Genes	Functions and diseases	Score ^a
1	AKT, ALOX12 , ANGPT1 , BCL11B , CCL19 , CD3, CD163 , DIO2 , ERK, ERK1/2, FGF21 , FLNA , GRP, IgG, IL21 , IL15RA , IL21R , KRT13 , LANCL2 , LTA, LTB , MAP3K8, miR-515-3p, NF-kB(complex), P38 MAPK, PTPRC , RORC , RUNX2 , SERPINA1 , SPAG11B , SPTB , TCF, TCL1A , TGFA , TJP2	Tissue Morphology, Lymphoid Tissue Structure and Development, Hematological System Development and Function	41
2	ACSL5, ADH4 , CD40, CDX2, CTNNB1, CXCL10, EGR1, FAM167A , FAS, HNF1A, HNMT , IFNA7 , IRF1, IRF3, IRF7, LAMA4 , MAPK1, MYRIP , NCALD , NXF5 , PDGF BB, POU5F1, PSG9 , PTGS2, RARA, RNF148 , S100G , SFTPB , SMARCA4, SRC, SRF, TAGLN, TCAF2, TLR4, TRPM8	Cellular Development, Hematological System Development and Function, Hematopoiesis	19
3	AHSP , Alpha tubulin, CD33 , COL6A3 , CXCL8, CXCR1, EPB41 , FAS, FASLG, FBN1, FBXL13 , FGFR2, GRHL3 , Histone h3, ILK, IRF6, KAT5, LTBP2 , MAP3K8, MAP3K14, MAPK1, MMP25, OR2M4 , Pkc(s), PPRC1, RELA, RGS1 , SELPLG , SIRT1, SPDEF, TGFA , TGFB1, TGFB1, TM6SF1 , TPM1	Cellular Movement, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking	17
4	ADGRF5 , ARFGEF2, CCND1, CHTOP, Cofilin, DYSF, ELF5 , ERG, ETV5, FMNL3 , FN1, Focal adhesion kinase, FOXC2 , FYN, GAS1 , ILK, ITGA4, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB7, MADCAM1 , PARVA, PDGFRA, PPP2R1A, PTPN11, RAC1, RUFY3 , SIGLEC5 , SIKE1, SPTBN5 , SRC (family), STRIP1, TNK2 , TRAF3IP3	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Embryonic Development, Tissue Development	15
5	AASS , ADORA1, BMP2, CH17-360D5. 1/NPY4R, ESR1, ESRRA, ETV6 , FAAP20 , FAM186A , FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCL, FANCM, Gsk3, GSK3B, HAMP, HDAC7 , HDAC9, ILK, NCOR1, NCOR2, NFKB1, PARVB , PPY , RARA, RPRM, RPS6KB1, SYTL5 , TRIM41 , TXK , WWOX, ZMYM6 , ZNF24	Cardiovascular Disease, Developmental Disorder, Hematological Disease	15

The rest of the genes either did not show any significant change or were not detected from array; ^aA score > 5 was significant. (Changed genes in bold face)

Table 1. 非晶質ナノシリカ長期曝露時の曝露群・曝露休止群で共通して変動していた235遺伝子のネットワーク解析結果 非晶質ナノシリカに長期曝露した際に曝露群・曝露休止群で共に発現変動していた235遺伝子を基に、ネットワーク解析を行い、関係の深い経路と関連遺伝子の絞り込みを行った。その結果、上記の5つの経路、それらを構成する下線を引いた70個の遺伝子に分類することができた。

Gene Symbol	Gene Name	Protein Class	Fold change	
			曝露群	曝露休止
TGFA	Transforming growth factor alpha	growth factor	6.80	3.67
RUNX2	Runt-related transcription factor 2	transcription factor	5.29	2.62
FGF21	Fibroblast growth factor 21	growth factor	5.23	7.93
IL21	Interleukin-21	type I cytokine	4.81	4.50
IL21R	Interleukin-21 receptor	type I cytokine receptor	4.81	4.50
PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	protein phosphatase	4.70	2.40
KRT13	Keratin, type I cytoskeletal 13	structural protein	2.89	2.14
DIO2	Deiodinase, iodothyronine, type II	iodothyronine deiodinase family	2.50	4.14
ANGPT1	Angiopoietin-1	signaling molecule	2.27	5.20
RORC	RAR-related orphan receptor C	nuclear hormone receptor	-2.42	-2.52
CD163	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	serine protease	-2.73	-3.90
FLNA	Filamin-A	non-motor actin binding protein	-3.20	-5.84
CCL19	C-C motif chemokine 19	chemokine	-3.25	-2.55
TCL1A	T-Cell Leukemia/Lymphoma 1A	development of T cell leukemia	-6.10	-7.24
LTB	Lymphotoxin-beta	tumor necrosis factor family	-17.8	-15.8

Table 2. 経路1に関連しており、発現変動が高い発現変動が認められた15遺伝子

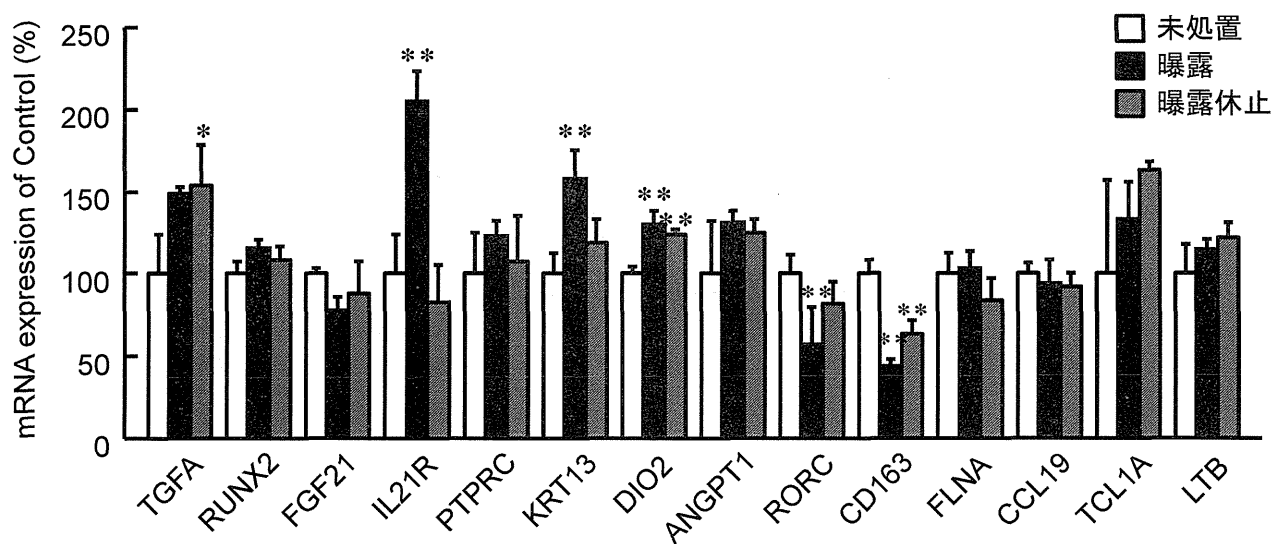


Fig.10. RT-PCRを用いた変動遺伝子の半定量的解析 マイクロアレイにより、長期曝露による変動の可能性のある遺伝子のうち、特に関連の深い15遺伝子に関して、RT-PCRを用い、発現変動に関して、半定量的に解析した。

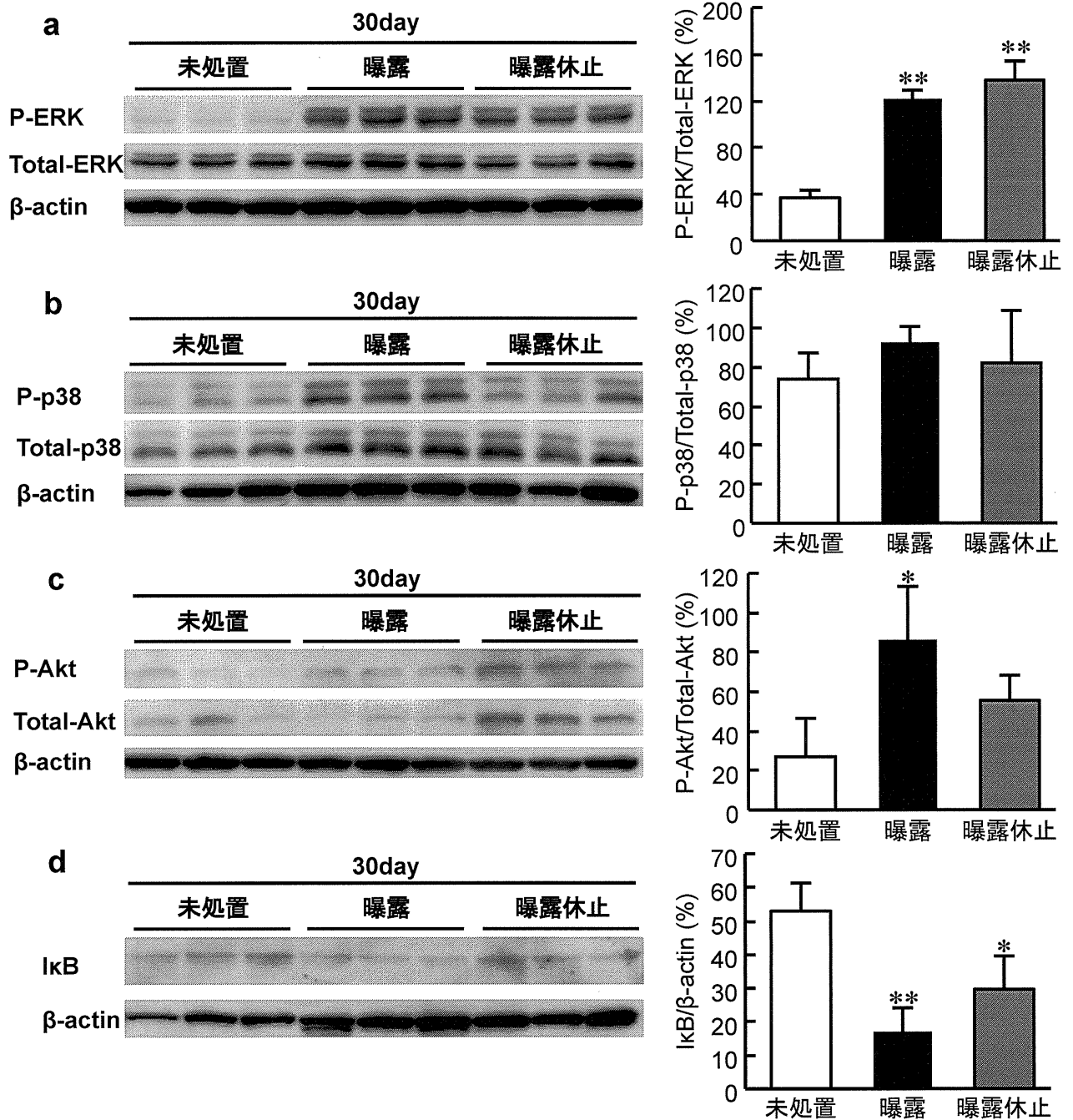


Fig.11. Western blottingによるERK、p38、Akt、NF κ Bの活性の変動解析 RT-PCRにより、変動が認められた遺伝子と同じ経路に存在する蛋白質の活性化をwestern blottingにより、解析した。(a-c) ERK、Akt、p38の活性化をリン酸化蛋白質の割合を指標に評価した。(d)NF- κ Bの活性化をIkBの分解を指標に評価した。

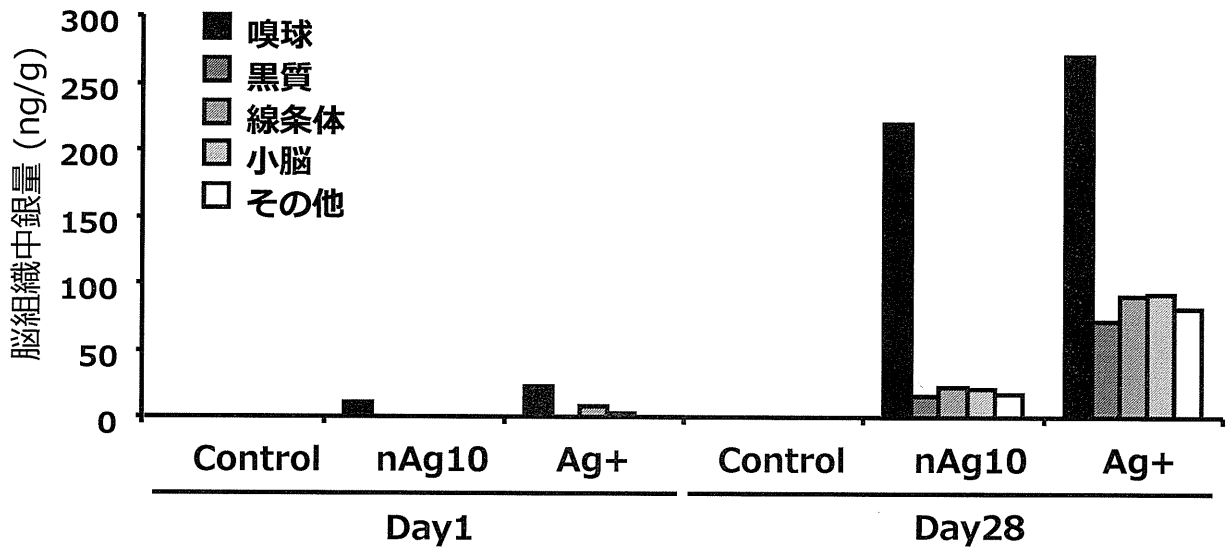


Fig.12. nAg10経鼻曝露時の各脳領域中の銀量の推移

C57BL/6マウスに、nAg10を5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で最大28日まで連日経鼻投与した。最終投与の24時間後に、各脳領域を摘出し、各群ごとにプール後、ICP-MSにより組織中の銀量を測定した。

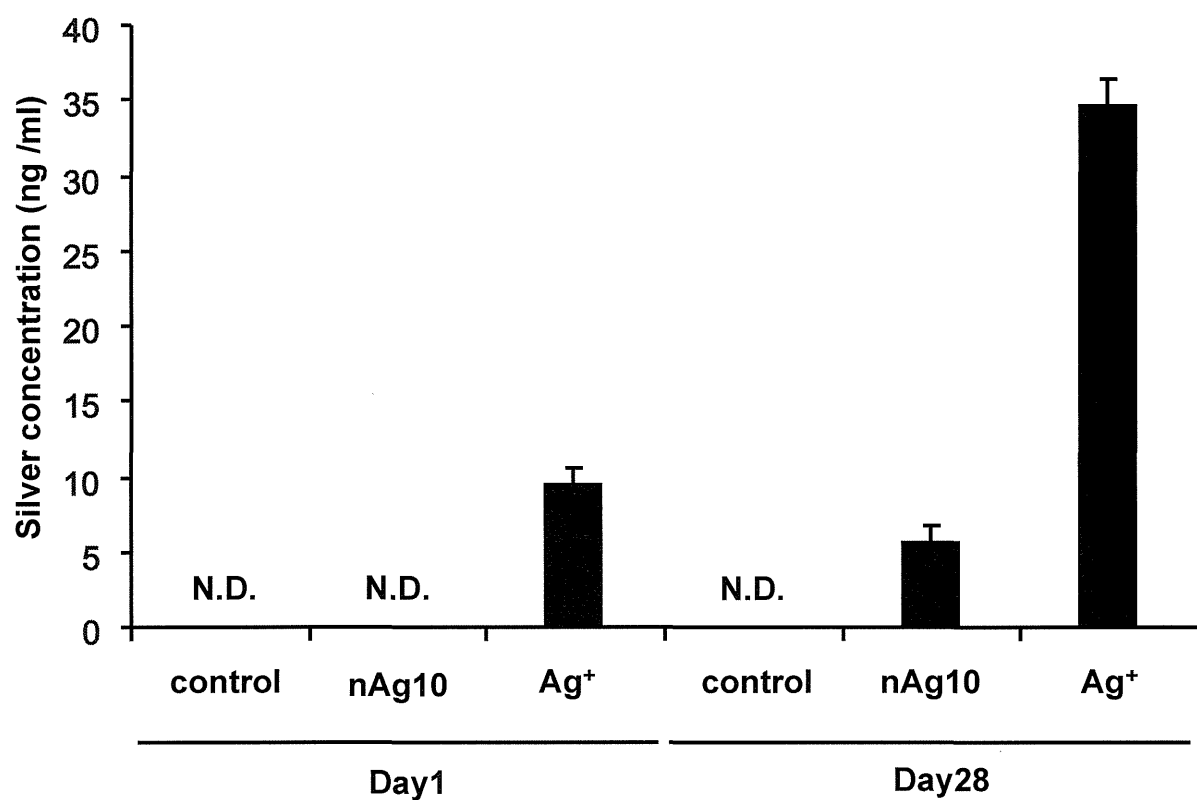


Fig.13. nAg10の経鼻投与後の血中への移行性. C57BL6/Jマウス（8週齢、雄性）にnAg10を最大28日まで連日経鼻投与した。最終投与24時間後に、血中における銀量を誘導結合プラズマ質量分析（ICP-MS）により定量解析した。Data are expressed as the mean \pm S.E. (n = 8). Silver content below the detection limit were expressed as Not detected (N.D.).

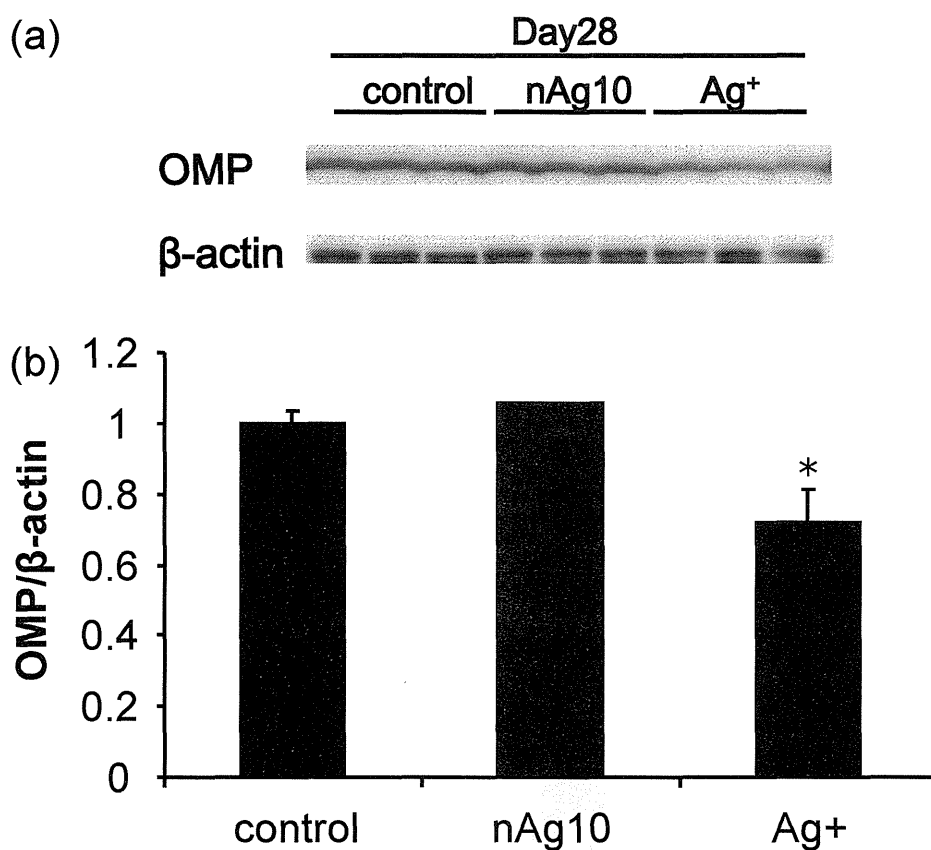


Fig.14. Western Blotによる嗅球中の神経マーカーOMPの発現評価. マウスに nAg10またはAg⁺を最大28日まで連日経鼻投与し、最終投与24時間後に、嗅球を抽出した。(a) 嗅球中におけるOMPの発現をウェスタンブロットにより解析した。(b) Image Jを用い、OMP、および、β-Actinのバンド強度を解析し、OMPのバンド強度をβ-Actinのバンド強度で標準化することで、OMPの発現量を半定量化した。Data are expressed as the mean ± SEMs (n = 3)

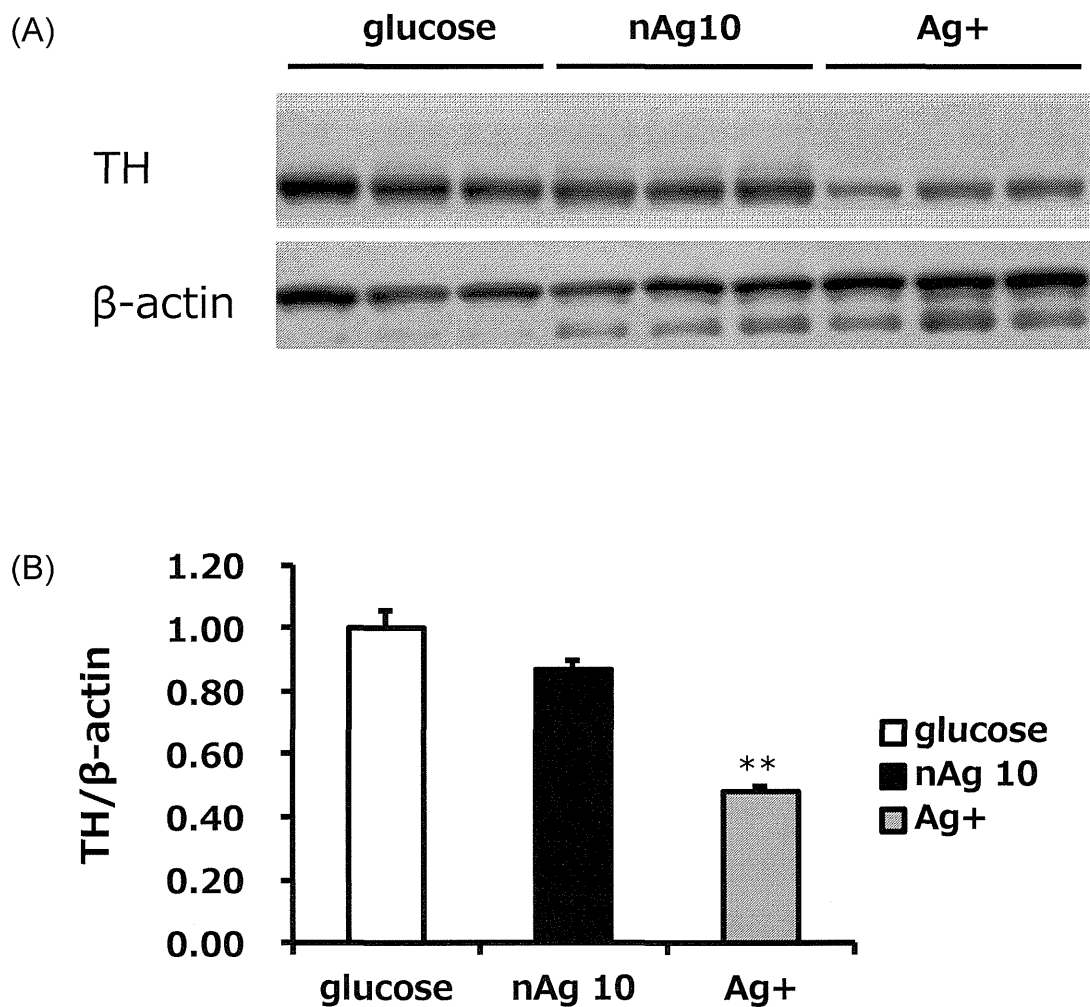


Fig.15. 嗅球のTyrosine hydroxylase (TH)の発現評価

(A) C57BL/6マウスに、nAg10を5 μ g/mouseで28日間連日経鼻投与した。最終投与の24時間後に、嗅球を摘出し、ホモジナイズした。回収したタンパク質溶液を用いてTHのWestern blottingを実施した。(B) Image Jを用い、Tyrosine hydroxylase、および、 β -Actinのバンド強度を解析し、Tyrosine hydroxylaseのバンド強度を β -Actinのバンド強度で標準化することで、Tyrosine hydroxylaseの発現量を半定量化した。Data are presented as mean \pm SEM (n=3) . **p < 0.01 versus value for glucose group

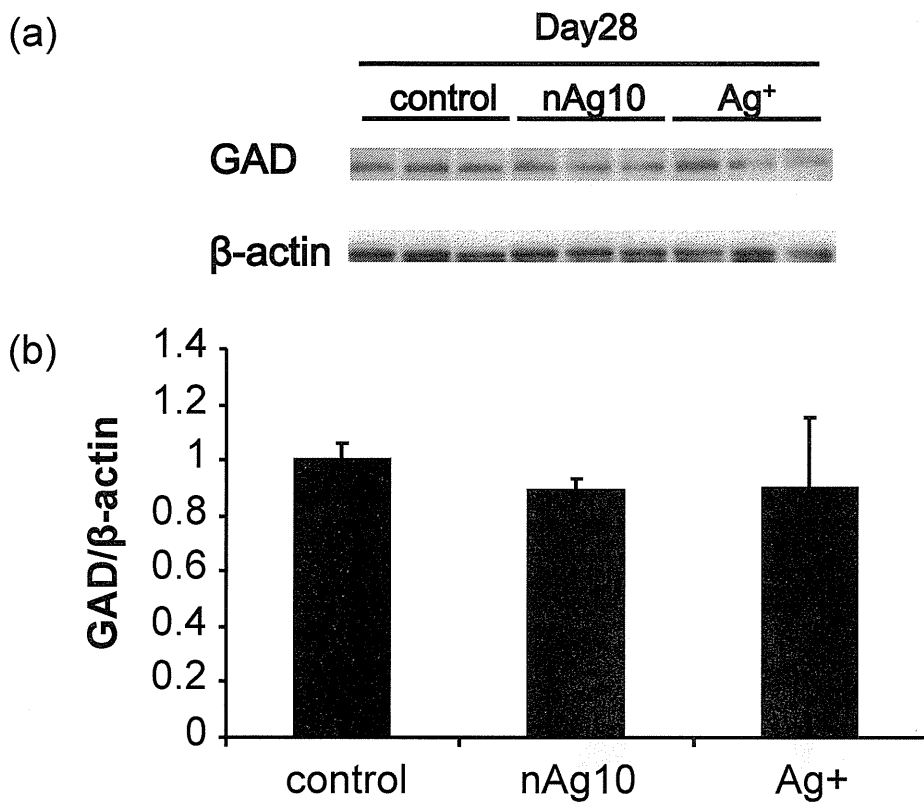


Fig.16. Western Blotによる嗅球中の神経マーカーGADの発現評価. マウスに nAg10またはAg+を最大28日まで連日経鼻投与し、最終投与24時間後に、嗅球を摘出した。(a) 嗅球中におけるGADの発現をウェスタンブロットにより解析した。(b) Image Jを用い、GAD、および、β-Actinのバンド強度を解析し、GADのバンド強度をβ-Actinのバンド強度で標準化することで、GADの発現量を半定量化した。Data are expressed as the mean ± SEMs (n = 3)

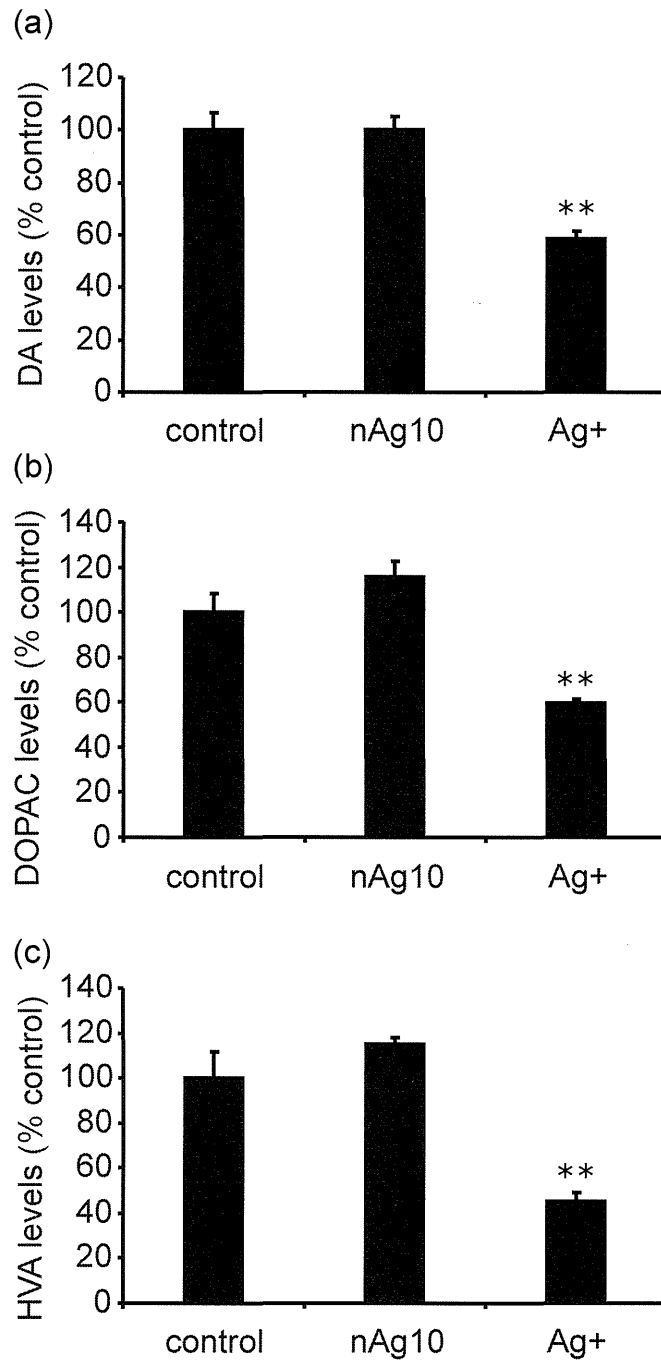


Fig.17. HPLCによる神経伝達物質の測定. マウスにnAg10またはAg+を最大28日まで連日経鼻投与し、最終投与24時間後に嗅球を摘出した。嗅球中の (a) ドパミン (DA)、 (b) DOPAC、 (c) HVA量をHPLC-ECDにより解析した。Data are expressed as the mean \pm SEMs (n = 4)

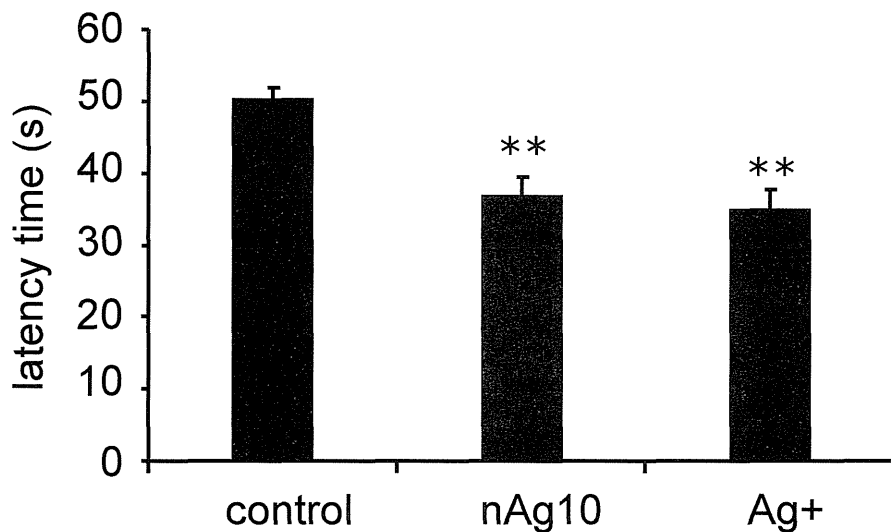


Fig.18. 嗅覚試験 (buried food test) . 試験の3日前から、マウスを飼育しているケージ内にクッキーを設置した。試験の18-24時間前の時点で、ケージから餌とクッキーを取り除いた。試験開始の30分前に飼育室から実験室に移し、20分間馴化させた。20分後、試験用のケージ (testing cage) にマウスを移し、5分間ケージ内で馴化させた。5分後にtemporary holding cageにマウスを移した後に、クッキーをtesting cage内の床敷きの表面から1.5 cm程度のところに隠した。マウスをtemporary holding cageからtesting cageに再び戻し、マウスがクッキーを発見するまでの時間を最大900秒まで測定した。 Data were presented as means \pm SEMs (n = 8)

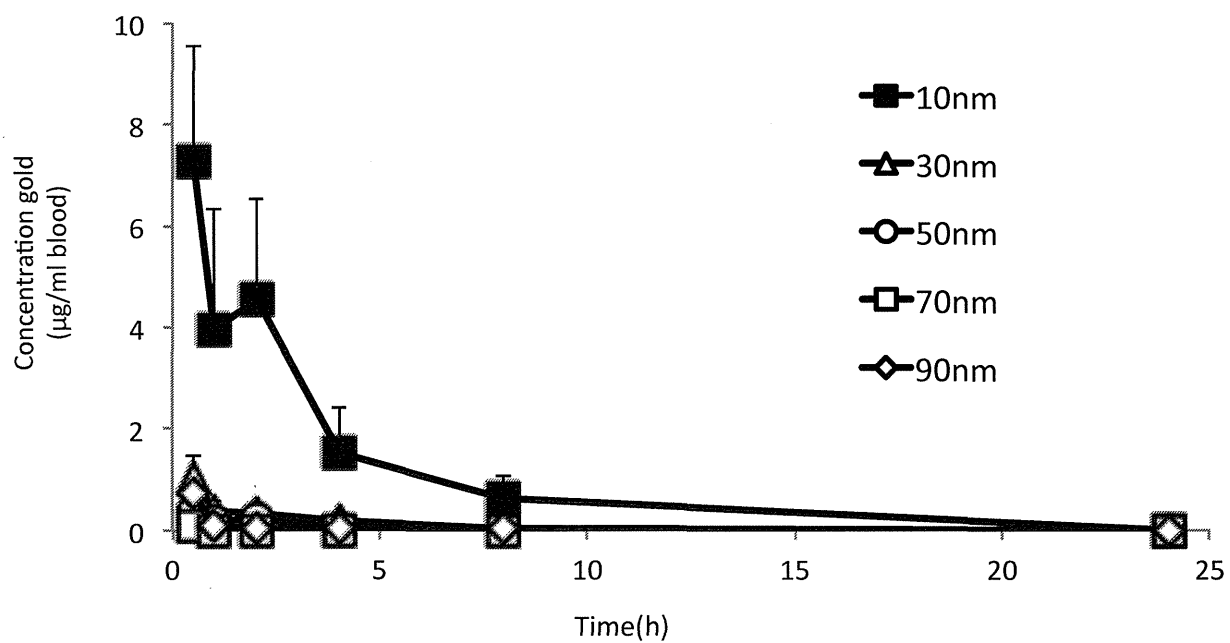


Fig.19. 金ナノ粒子の動態評価. BALB/cマウス (♂、6週齢) に nAu10、nAu30、nAu50、nAu70、nAu90を4 mg/kgで尾静脈より投与し、経時的に血液を回収した。血中金濃度をICP-MSを用いて測定した。Data are presented as mean \pm SEMs

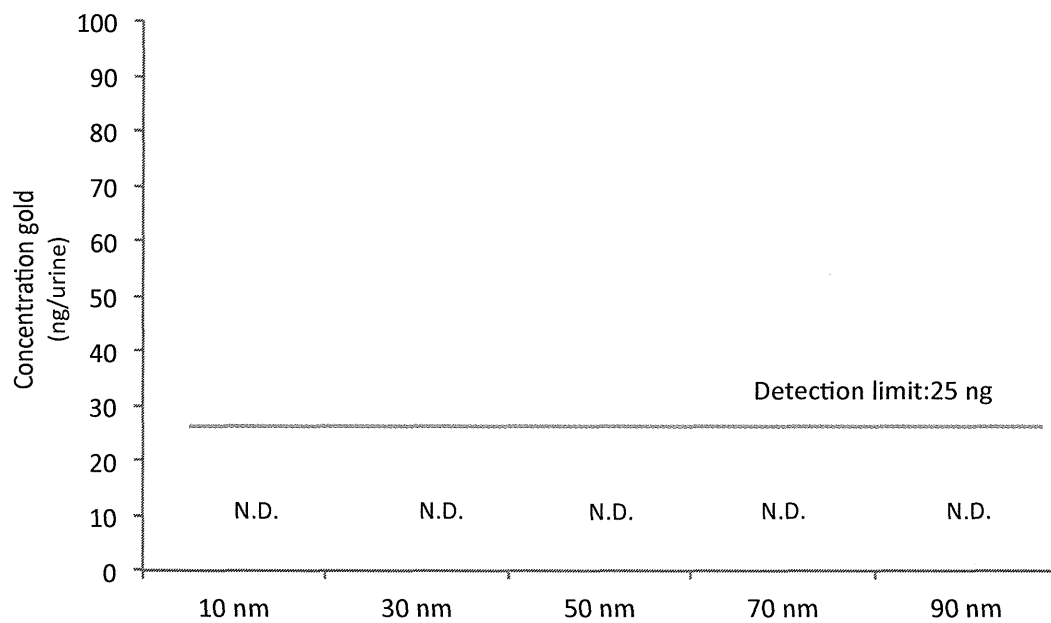


Fig.20. 金ナノ粒子の腎排泄評価. BALB/cマウス (♂、6週齢) に nAu10、nAu30、nAu50、nAu70、nAu90を4 mg/kgで尾静脈より投与し、投与直後から24時間後までの尿を回収した。尿中金量をICP-MSを用いて測定した。

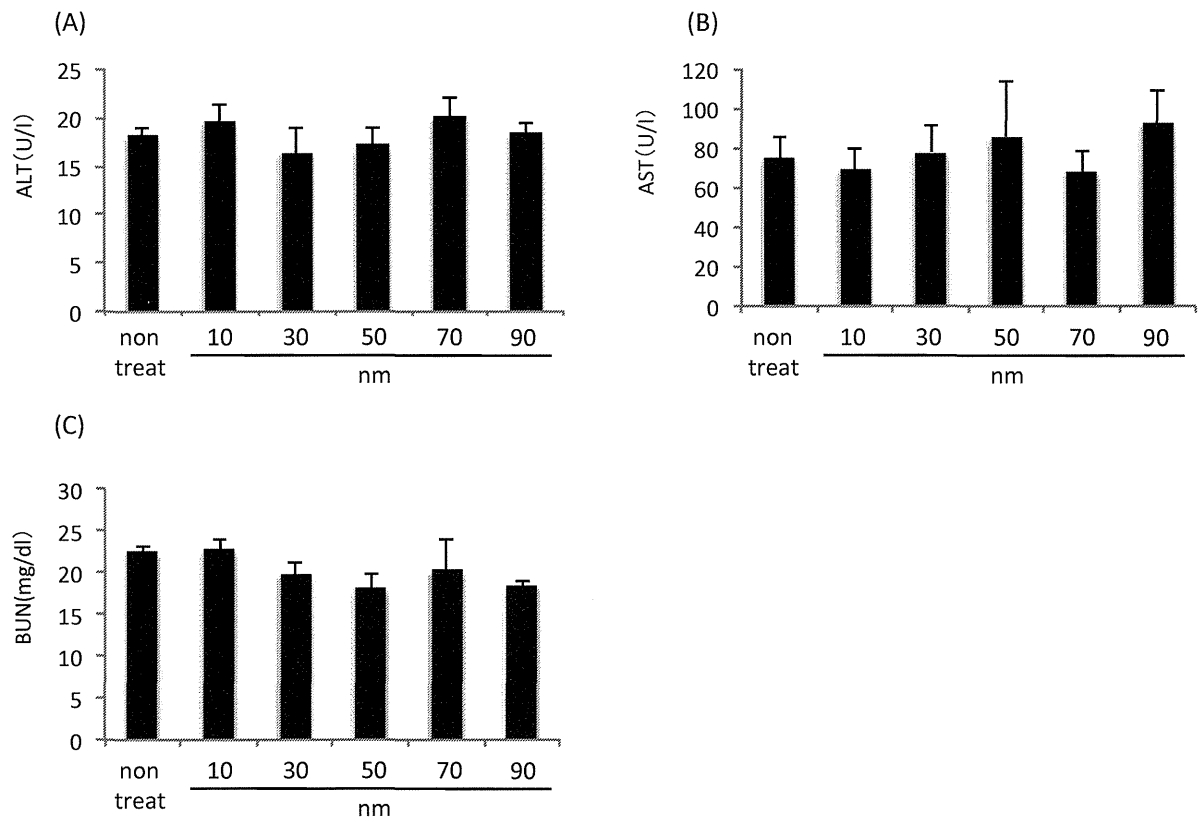


Fig.21. 金ナノ粒子投与による肝障害、腎障害評価. BALB/cマウス (♂, 6週齢) に nAu10、nAu30、nAu50、nAu70、nAu90を4 mg/kgで尾静脈より投与し、投与後24時間における血液を回収した。肝障害マーカーである (A) ALT、(B) AST、腎障害マーカーである (C) BUNを生化学検査により解析した。Data are presented as mean \pm SEMs

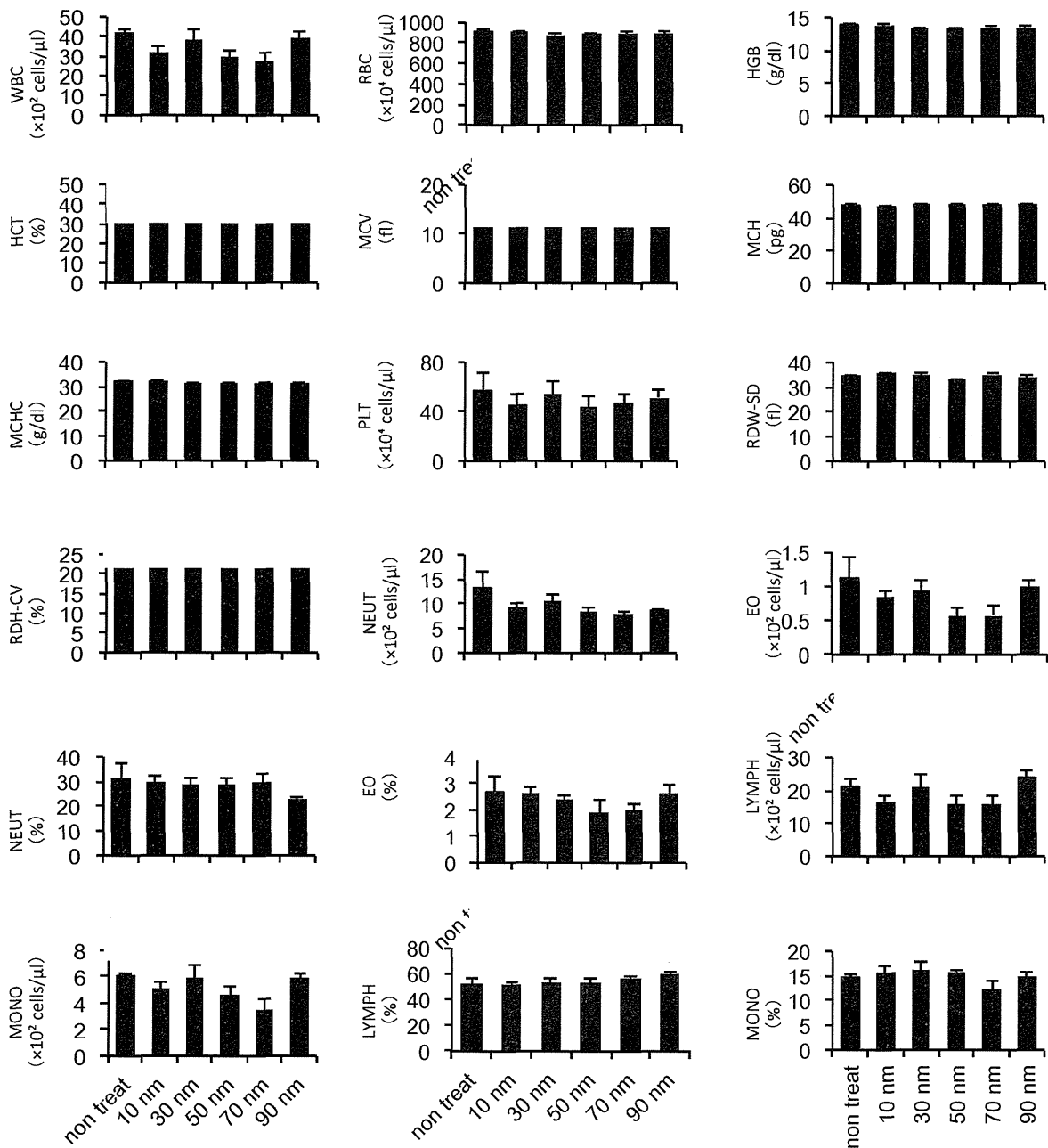


Fig.22. 金ナノ粒子投与後の血球検査. BALB/cマウス (♂, 6週齢) に nAu10、nAu30、nAu50、nAu70、nAu90を4 mg/kgで尾静脈より投与し、投与後24時間における血液を回収し、血球検査を行った。 Data are presented as mean \pm SEMs (n = 5) * P <0.05 vs. non treat group

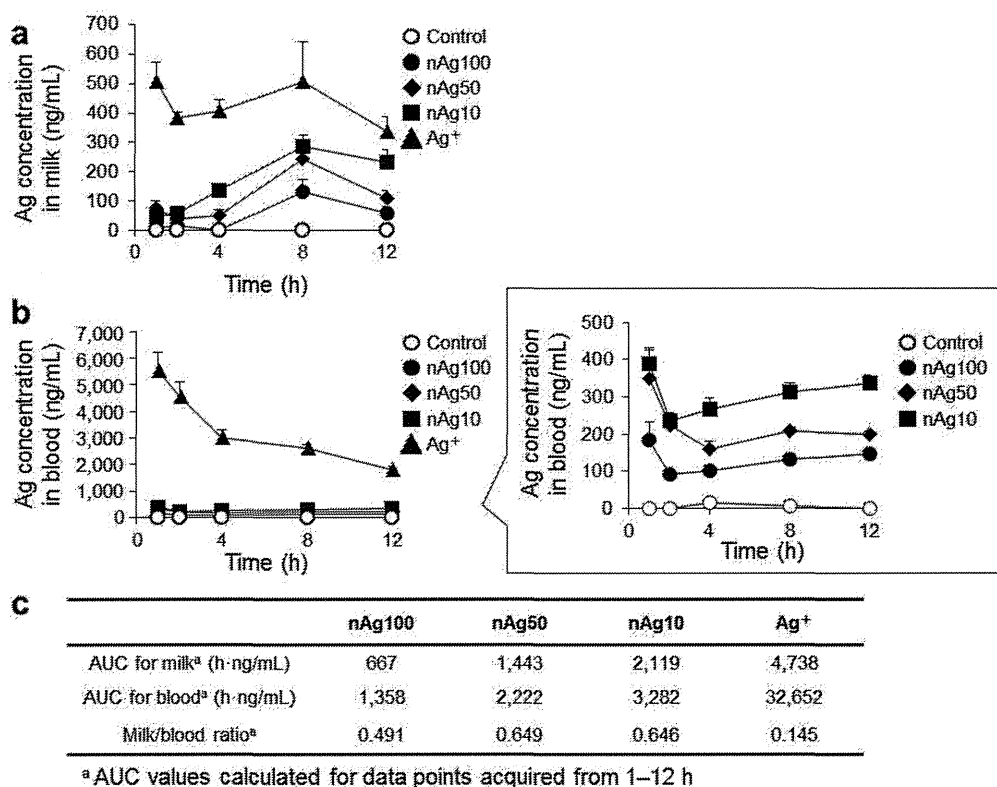


Fig.23. 尾静脈投与後のナノ銀粒子の母乳への移行性評価. 授乳期マウスにナノ銀粒子 (1.5 mg/kg)、銀イオン(1.5 mg/kg)、対照として5%グルコース溶液、マウス血清アルブミンを含むPBS (pH 7.4) を尾静脈内投与した。(a) 母乳中、(b) 血中における銀量をICP-MSにより測定した。(c) 母乳、血中における曲線下面積 (AUC) は、台形法により算出した。M/P比は、母乳中AUCを血中AUCで除して算出した。Data are reported as means \pm SEMs ($n = 4-7$ for control group; $n = 8-11$ for others).

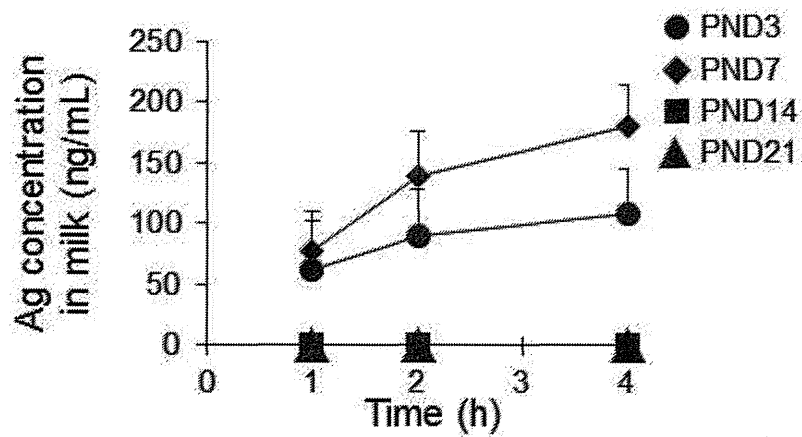


Fig.24. 出産後の母乳中におけるナノ銀粒子の移行性評価. nAg10 (1.5 mg/kg)、銀イオン (1.5 mg/kg)、対照として5%グルコース溶液、マウス血清アルブミンを含むPBS (pH 7.4) を出産後3日、7日、14日、もしくは21日に尾静脈内投与した。母乳中における銀量をICP-MSにより測定した。Data are reported as means \pm SEMs ($n = 2-5$).

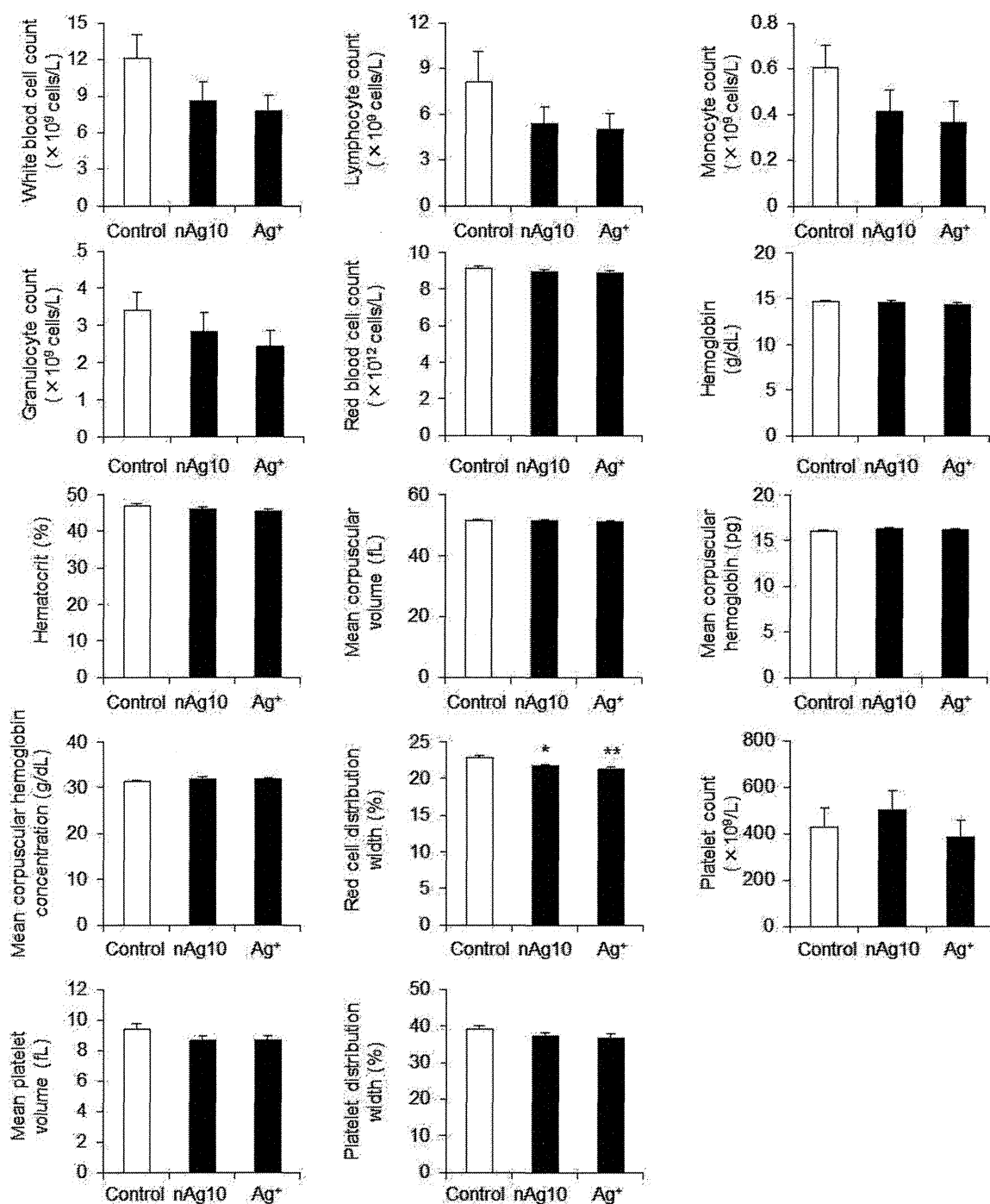


Fig.25. nAg10の経口投与による母体への影響評価. 授乳期マウスにナノ銀粒子 (10 mg/kg)、銀イオン(10 mg/kg)、対照として水を経口投与した。投与12時間後、血液を回収し、血球検査に供した。Data are reported as means \pm SEMs ($n = 8-9$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control group.

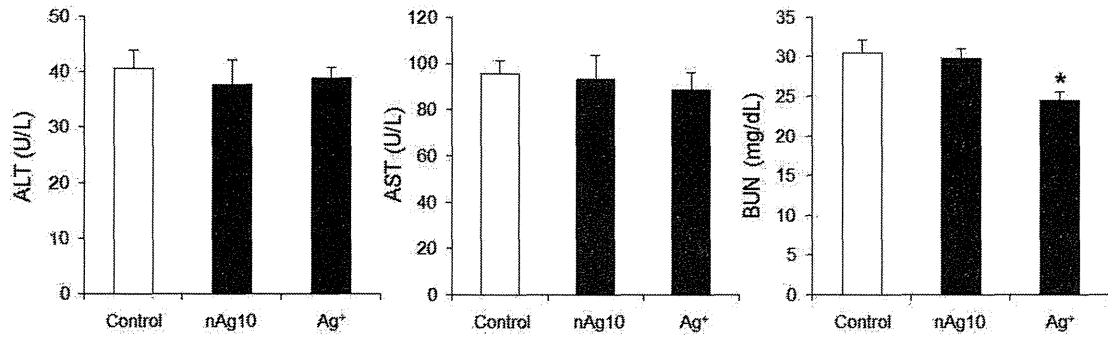


Fig.26. nAg10の経口投与による母体への影響評価. 授乳期マウスにナノ銀粒子 (10 mg/kg)、銀イオン(10 mg/kg)、対照として水を経口投与した。投与12時間後、血液を回収し、生化学検査に供した。Data are reported as means \pm SEMs ($n = 8-9$). * $P < 0.05$ vs. control group.