

図4. ナノ銀・ナノシリカによる精子内活性酸素種の増加. 11週齢の雄性ICRマウスから精子を採取。Brinster's BMOC-3 Mediumで30分前培養。CellROX® Green Reagentを精子に30分間前処置.その後、ナノマテリアルを5分間曝露し、4%パラフォルムアルデヒドで精子を固定。共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 -D(OLYMPUS)を用い精子内の活性酸素種の変化を観察した。

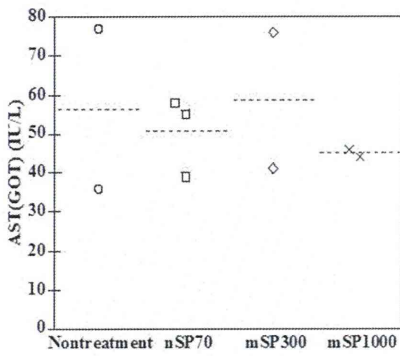
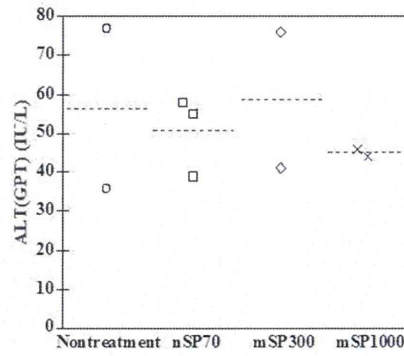
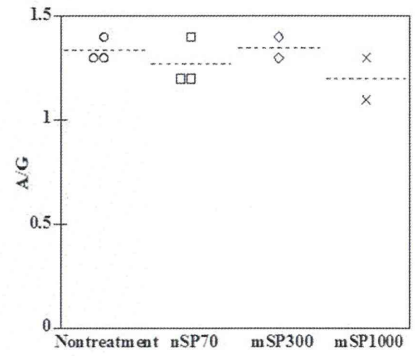
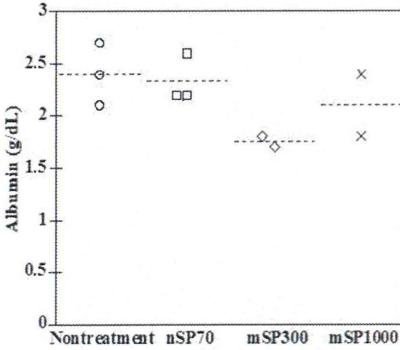
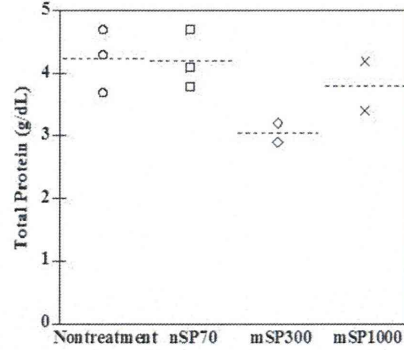
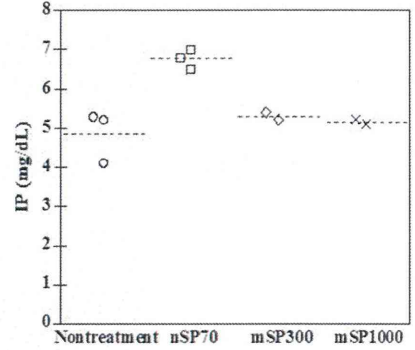
AST(GOT)**ALT(GPT)****A/G****Albumin****Total protein****Inorganic phosphorus**

図5. ナノシリカ経口投与マウスの血液生化学検査。粒子径の異なる各ナノシリカを20 mg/kgを週に2回、3週間、ICRマウスへ連続投与した。最終投与24時間後に、血液を回収し血液生化学検査のサンプルとした。血液生化学検査は、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルブミンとグロブリン比 (A/G)、アルブミン (ALB)、総タンパク (Total Protein)、無機リン (IP) を実施した。

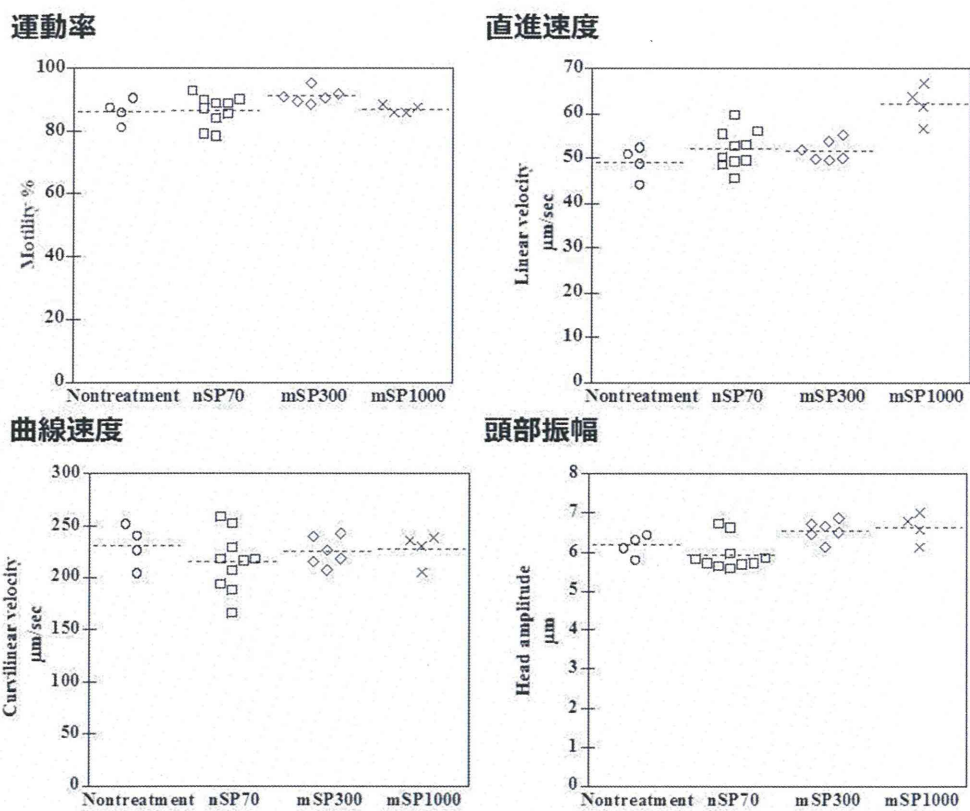


図6. ナノシリカ経口投与マウスの精子の運動性評価。粒子径の異なる各ナノシリカを20 mg/kgを週に2回、3週間、ICRマウスへ連続投与した。最終投与24時間後に、精巢上体を回収し精子のサンプルを調整した。これら精子は、SEMEN ANALYSIS SLIDE (Cell Vision) へ移し、SMASを用いて運動性を測定。SMASによる測定は、運動率、直進速度、曲線速度、頭部振動を評価。

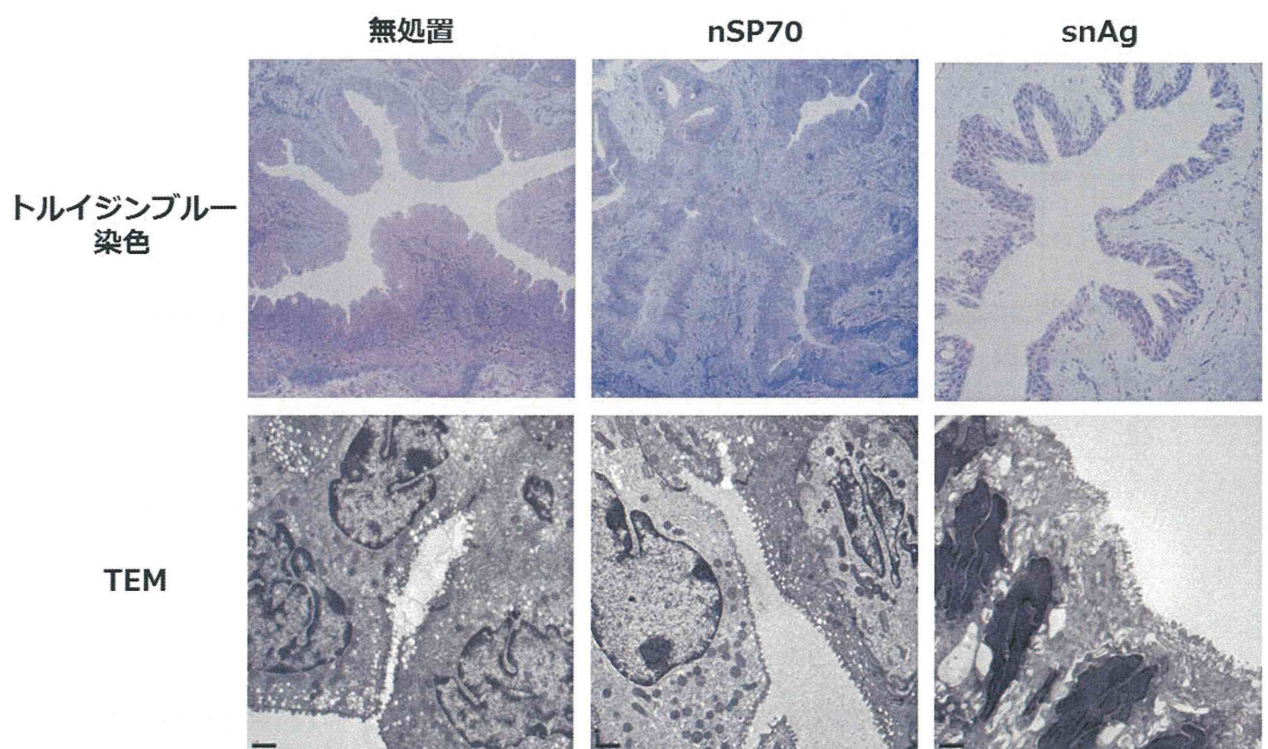


図7 尿道におけるナノマテリアルの影響評価。11週齢の雄性ICRマウスを開腹し、膀胱へnSP70またはナノ銀を投与、強制放尿後に尿管を摘出し、電顕用サンプルとして用いた。

ナノ銀およびサブナノ銀のラットにおける 28 日間反復経皮投与毒性に関する研究

研究分担者 桑形麻樹子 (財)食品薬品安全センター秦野研究所毒性部

研究要旨

ナノマテリアルの安全性に関する試験の一環として、OECD TG410 に準じてナノ銀(nAg)およびサブナノ銀(snAg)をラットに 28 日間反復経皮投与し生体への影響について評価した。雌雄の SD ラットに、溶媒(注射用水)、nAg (1~100 μ g/mL)あるいは snAg(100 μ g/mL)を 1 日 6 時間、4 週間にわたり経皮投与し、一般状態の変化、体重および摂餌量の推移を観察し、解剖前に尿検査を実施した。動物は投与 4 週に剖検し、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量、病理学検査（組織、電顕）を実施した。また、雄動物について、皮膚、肝臓、腎臓、脾臓、尿中の nAg あるいは snAg の含量を誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)にて解析した。また、陽性対照群として、AgNO₃(100 μ g/mL)群を設定し、同様に評価をした。

その結果、一般状態、体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学検査、尿検査、器官重量には nAg および snAg 投与による影響は認められなかった。陽性対照として設定した AgNO₃ 群では摂餌量の減少を伴った体重増加抑制がみられた。病理組織学検査の結果、被験物質投与による影響と考えられる変化はなく、皮膚の電顕観察では、真皮と毛包境界部に微細顆粒物質が snAg 群で対照群と比較して多く観察された。この変化は雌で顕著だった。ICP-MS の結果、皮膚にのみ銀が検出された (AgNO₃ 群>nAg 群>snAg 群)。

以上の結果から、皮膚に nAg、snAg は残留していたが、全身へ移行することはなく、snAg、nAg の 100 μ g/mL までの経皮投与により一般毒性学的影響は認められないことが明らかになった。

A. 研究目的

ナノマテリアルの安全性に関する試験の一環として、OECD 化学物質毒性試験法ガイドライン 410 に準拠し、ナノマテリアルを雌雄ラットに 28 日間反復経皮投与した際の生体への影響について評価した。

研究方法

1. 被験物質および投与方法

被験物質は大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野から提供されたサブナノ銀懸濁液 (snAg, 商品名: AGS-WP001C, Lot no.: 10070501、製品濃度: 10 mg/mL [ICP-MS 測定値: 14.8 mg/mL]、Polytech & Net GmbH 社)、ナノ銀懸濁液 (nAg, 商品名: AGS-WP001、Lot no.: 110122301、製

品濃度: 10 mg/mL [ICP-MS 測定値: 10.4 mg/mL]、Polytech & Net GmbH 社) および硝酸銀水溶液 (AgNO₃, CAS No. 28-1305-5, Lot no. Q8064、0.1 mol/L 硝酸銀水溶液 [製品濃度: 10.8 mg/mL]、Sigma-Aldrich 社) を用いた。

投与用量は、大阪大学にて先行して実施したサブナノ銀の一週間経皮投与の結果とナノ銀の 13 週間経皮投与の結果 (Korani M. et al., Inter J Nanomed, 2011) を基に設定した。すなわち、マウスに 300 μ g/mL のサブナノ銀を耳介に一週間塗布した結果、顕著な皮膚病変が観察された。一方、100~10000 μ g/mL のナノ銀をモルモットに 13 週間 (5 日/週) 塗布した結果、全ての群で皮膚病変が認められたがマウスの変化よりも軽度

であった。したがって本試験では、顕著な皮膚病変が予想される 100 μ g/mL をサブナノ銀群の高用量に設定し、10 および 1 μ g/mL 投与群を設けた。使用したナノマテリアルの電顕像、投与用量、群構成は図 1 および図 2 に示す。

被験物質の調製は、ボルテックスミキサー (KMC-1300V、Vision Scientific.Co.LTD.) で 30 秒、続いて超音波スターラー (USS-1、日本精機製作所)を用いて 5 分間攪拌させた後に秤量し、段階希釈して投与に用いた。調製は用時調製とした。

投与は、化粧品、塗装、剥離した物質として経皮的に吸収された場合の毒性を検討するために背部に閉塞貼付した(経皮投与)。3x3 cm のリント布に被験物質を滴下した後、皮膚にリント布を貼付し、プラスチックラップを巻いて被覆固定した。その上に粘着フォームパット(伸縮性粘着包帯)を巻き、固定した。

投与回数は 1 日 6 時間、週 5 日(土、日は休薬)として、雄は投与 29 日(投与初日=投与 1 日)、雌は投与 30 日に解剖した。毎日、投与時間終了後には、貼付領域を被験物質の媒体(注射用水)を用いて清塗した。

なお、投与前日に、背部をバリカンにて剪毛した。

2. 動物および飼育条件

動物は 5 週齢の雌雄 SD 系ラットを購入し、温度(21.0~25.0 $^{\circ}$ C)および湿度(40.0~75%)、換気回数(約 15 回/時間)、明暗サイクル(7 時~19 時まで点灯)が統御された飼育室に金属製金網床ケージにて個別に飼育し、固型飼料(CE-2、日本クレア株)および水道水を自由に摂取させた。1 週間の検疫・馴化期間の後、1 群雌雄各 5 匹になるように検疫終了時の体重を基に群分けした。投与開始時週齢は 6 週齢である。

3. 観察項目

全例について、投与期間中は毎日、投与前および投与後(除去後)に一般状態を観察した。体重は投与 1 日、8、15、22、28 日および解剖日(雄は

28 日、雌は 29 日)に、摂餌量は投与 1-2、8-9、15-16、22-23 日に測定した。投与 23 日(雄)、投与 24 日(雌)に動物を代謝ケージに移して新鮮尿を採取した。尿量を測定後、尿中ナトリウムイオン濃度(Na)、カリウムイオン濃度(K)、塩素イオン濃度(Cl)を測定した。また、尿検査試験紙を用いて、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンを検査した。

剖検前に 18-24 時間絶食させた後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下にて、腹部下行大静脈から採血した。EDTA 2K を抗凝固剤として採取した血液を用いて、血液自動分析装置 XT-2000iV(シスメックス)にて、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、白血球分類、網状赤血球比率、血小板数(PLT)、ヘマトクリット値(Ht)、血色素量(Hb)、平均赤血球容積(MCV; Ht \times 1000/RBC)、平均赤血球血色素量(MCH; Hb \times 1000/RBC)、平均赤血球血色素濃度(MCHC; Hb \times 100/Ht)を測定し、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血した血液から得た血漿を用いて、活性化部分トロンボプラスチン時間(AAGT)、プロトロンビン時間(AG)を測定した(血液学的検査)。

さらに、ヘパリンを抗凝固剤として採血した血液から得た血漿にて、自動分析装置 JCA-BM6010(日本電子)にて、総蛋白濃度(TP)、アルブミン濃度(ALB)、A/G 比; ALB/(TP-ALB)、グルコース濃度、総コレステロール濃度、トリグリセライド濃度、リン脂質濃度、クレアチニン濃度、尿素窒素濃度(BUN)、カルシウム濃度(Ca)、無機リン濃度、総ビリルビン濃度、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性(ALT)、アルカリフォスファターゼ活性(ALP)、 γ グルタミルトランスペプチターゼ(γ -GTP)、乳酸脱水素酵素(LDH)を、全自動電解質分析装置 EA05(エイアンドティー)にて、ナトリウムイオン濃度(Na)、カリウムイオン濃度(K)、塩素イオン濃度(Cl)を測定した(血液生化学的検査)。

剖検時には器官、組織の肉眼的観察を実施する

とともに、脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣(雄)、卵巣(雌)の組織重量を測定した。各群雌雄 2 例を選択し、皮膚投与部位、肝臓および腎臓を、透過型電子顕微鏡を用いて nAg および snAg の局在を観察した。また、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)用に肝臓、腎臓、脾臓、皮膚(貼付部)をサンプリングした。これらのうち、電顕検査を実施した各群雄 2 例について、ICP-MS 分析を実施し組織中の被験物質の存在を確認した(日本食品分析センターにて実施)。

また、皮膚(貼付部)、胸腺、心臓、肺・気管支、肝臓、下顎リンパ節、腎臓、脾臓、腸間膜リンパ節、精巣および精巣上体(雄)、卵巣、子宮および腔(雌)について、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的に観察した。

4. データの解析法

データは各被験物質投与群について溶媒対照群との間で有意差検定を行った。体重、摂餌量、器官重量、血液学的検査、血液生化学的検査値は、まず、各群について F 検定を行い、等分散の場合は Student の t 検定を、不等分散の場合は Aspen-Welch の t 検定を実施した。病理組織学検査については、グレード分けしたデータは Mann-Whitney の U 検定を、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定を行った。なお、有意水準は対照群を繰り返し用いることによる第 1 種の過誤を防ぐためにボンフェルヌイの補正を加え、有意水準は 2%とした。

C. 研究結果(次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

一般状態の変化として、対照群を含む各 snAg 群、nAg 群および AgNO₃ 群で、雌雄ともに投与第 2 週以降解剖時まで、貼付部皮膚にごく軽度な痂皮形成が観察された(表 1、表 2)。AgNO₃ 群では痂皮形成が観察される動物数が他群と比較してやや多かったが、皮膚病変の程度は対照群や snAg 群、nAg 群と比較して差はなかった(図 3、図 4)。体重および摂餌量は、各 snAg 群および nAg 群は対照群と同様に推移したが、AgNO₃ 群

は投与 8 日以降(投与開始日=投与 1 日)体重増加抑制が観察され、投与 15 日以降は対照群と比較して摂餌量の減少も観察された(表 3、表 4、表 5、表 6)。

血液学的検査の結果(表 7、表 8)、nAg 群の Ht 値が雌雄ともに対照群と比較して僅かであるが高値を示し有意差がみられた。しかし、RBC、Ht 値に顕著な変動はなく、一般状態では脱水症状等観察されていないことから、nAg 投与による変化ではないと判断した。また、AgNO₃ 群では、雄で ATPP 時間の延長が観察された。同群の雌では白血球分類に有意差がみられたが、白血球数に差がみられていないことから偶発的な変化と考えられた。その他の赤血球系および白血球系の指標には、snAg, nAg, AgNO₃ 投与による変化は認められなかった。

血液生化学検査の結果(表 9、表 10)、雄では 10 µg/mL の snAg 群において K 濃度、100 µg/mL の snAg 群において Ca 濃度、AgNO₃ 群において Na 濃度に有意差がみられたが、その変動は僅かであること、尿検査および腎臓の病理組織学検査に投与による影響は認められていないことから、snAg 投与による変化ではないと判断した。また、雌では snAg 群、nAg 群、AgNO₃ 群の無機リン濃度が僅かに高値を示し有意差がみられた。無機リンは Ca とともに骨の重要な構成成分であり、また、細胞膜構成成分であるリン脂質や、エネルギー代謝を担う ATP の成分でもある。上皮小体機能異常、腎疾患時に血中濃度が上昇する。しかし、病理組織学検査や尿検査から、上記障害を示唆する変化は認められず、変動幅もわずかであったことから Ag 投与による変化ではないと判断した。その他、肝機能および腎機能指標には異常はなかった。

尿検査の結果、雄では snAg, nAg および AgNO₃ 投与による影響は認められなかった(表 11)。雌では 1µg/mL の snAg 群において Na 濃度の高値がみられたが、用量依存的な変化ではなかったことから、snAg 投与による変化ではない

と判断した。その他、nAg および AgNO₃ 群には変化は認められなかった (表 12)。

器官重量(表 13、表 14)では、雌雄ともに snAg、nAg、AgNO₃ 投与による影響は認められなかった。

解剖時の貼付部以外の肉眼所見として(表 15、表 16)、雄では、10 µg/mL の snAg 群において副腎の大型化、対照群に脾臓の大型化が各 1 例観察されたが病理組織学検査では異常は観察されなかった。雌には肉眼的異常は観察されなかった。

病理組織学検査の結果(表 17、表 18)、雌雄ともに観察した組織には対照群を含めて組織学的変化が観察された。しかし、その所見には、被験物質投与により頻度や程度が強くなる傾向は認められなかった。

貼付部位である皮膚の病理組織学変化として(図 5、図 6)、ごく軽度な痂皮形成、表皮(有棘細胞層)の浮腫、扁平上皮層の過形成、粘膜固有層に炎症細胞浸潤が雌雄とも対照群を含めた各群に観察された。しかし、対照群と比較して程度および頻度に差はなかった。

皮膚、肝臓、腎臓で実施した電顕観察の結果(図 7)、細胞内の高電子密度を示す顆粒状分子と被験物質との識別が困難であった。皮膚では真皮と毛包境界部に微細顆粒物質が snAg 群で観察された。この顆粒物質は雌で多かった。

皮膚、肝臓、腎臓、脾臓、尿で実施した ICP-MS の結果(図 8)、snAg 群、nAg 群および AgNO₃ 群ともに貼付部位である皮膚に Ag が検出された。その他の組織では検出限界(0.05ppm 以下)であった。

E. 結論

以上の結果から、100µg/mL までの snAg あるいは nAg の経皮投与により、ナノマテリアルは皮膚に残留していることが明らかになり、一般毒性学的変化は認められなかった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

①論文発表

該当なし。

【総説・その他】

該当なし。

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 0 件】

【国内学会発表：合計 2 件】

桑形麻樹子、他 13 名、吉岡靖雄、堤康央：サブナノ白金およびナノ白金の経皮投与による毒性学的影響、第 39 回日本毒性学会学術年会 (2012 年 7 月、仙台、P-140)

熊谷文明、他 4 名、吉岡靖雄、堤康央、桑形麻樹子：粒子径の異なるナノ白金のラット経皮投与による皮膚病変の違い、第 29 回日本毒性病理学会 (2013 年 2 月、つくば、P-68)

【国際学会発表：合計 0 件】

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。

その他

該当なし。

研究協力者

斉藤義明、熊谷文明(財団法人食品薬品安全センター)

試験従事者

丸茂秀樹、臼見憲司、熊谷文明、斉藤義明、野口聡、千坂亜希子、関剛之、松本亜紀、瀬沼美華、加藤博康、古谷真美、田面喜之、三枝克彦、稻田浩子、堀内伸二

Table 1. General conditions of male rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of males and general conditions	Days of administration																											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Control group (Distilled water)	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	9	8	8	8	4	4	8	7	6	6	6	3	3	8	8	8
	Skin, Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	1	1	2	3	4	4	4	2	2	2	2
	Skin, Bite wound	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2group (snAg 1 µg/mL)	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	9	7	6	8	4	4	10	8	8	8	8	4	4	10	10	10
	Skin, Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	2	1	1	0	2	2	2	2	1	1	0	0	0
	Skin, Bite wound	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3group (snAg 10 µg/mL)	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	9	7	5	5	4	4	10	10	10	10	10	5	5	10	10	10
	Skin, Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	5	5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Skin, Bite wound	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4group (snAg 100 µg/mL)	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	10	8	6	4	4	8	8	10	10	10	10	5	5	10	10	10
	Skin, Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Skin, Bite wound	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
5group (nAg 100 µg/mL)	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	10	10	9	6	3	3	10	10	10	10	10	5	5	10	9	9
	Skin, Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	Skin, Bite wound	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6group (AgNO ₃ 100 µg/mL)	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	8	6	5	5	4	4	9	10	9	8	10	5	5	10	10	9
	Skin, Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	5	5	1	1	1	0	1	2	0	0	0	0	0	1
	Skin, Bite wound	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表1 一般状態(雄)

対照群を含むsnAg各投与群、nAg群およびAgNO₃群ともに、投与第2週目以降にごく軽度の痂皮が観察された。程度および頻度には対照群と差はなかった。なお、100 µg/mLのsnAg群では、投与20日に胸部に咬傷が観察された。

Table 2. General conditions of female rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of females and general conditions	Days of administration																											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Control group (Distilled water)	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	9	7	7	9	9	8	8	9	10	9	9	9	7	8	8	
	Skin Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	3	1	2	2	2	2	1	0	1	2	2	3	2
2group (snAg 1 ug/mL)	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	9	7	7	8	4	4	3	8	9	10	10	5	5	10	9	8
	Skin Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	3	2	1	1	2	2	1	0	0	0	0	1	2
3group (snAg 10 ug/mL)	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	10	9	8	8	4	4	6	8	8	8	8	4	4	7	6	8
	Skin Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	1	1	4	2	2	2	2	1	1	3	4	2
4group (snAg 100 ug/mL)	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	10	9	7	5	3	3	9	9	8	8	8	3	3	7	6	7
	Skin Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	5	2	2	1	1	2	2	2	2	2	3	4	3
5group (nAg 100 ug/mL)	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	9	10	10	10	10	9	4	4	9	10	10
	Skin Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
6group (AgNO3 100 ug/mL)	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	General appearance, No abnormality	10	10	5	5	10	10	10	10	10	5	5	10	10	9	8	9	5	5	10	7	6	6	6	3	4	8	4	6
	Skin Crust formation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	3	4	4	4	2	1	2	6	4

表2 一般状態(雌)

対照群を含むsnAg各投与群、nAg群およびAgNO₃群ともに、投与第2週目以降にごく軽度の痂皮が観察された。程度および頻度には各群間で差はなかった。

Table 3. Body weights of male rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Control group (Distilled water)	2 group (snAg 1 ug/mL)	3 group (snAg 10 ug/mL)	4 group (snAg 100 ug/mL)	5 group (nAg 100 ug/mL)	6 group (AgNO ₃ 100 ug/mL)
Number of males	5	5	5	5	5	5
Days of administration						
1	209.6 = 4.3	207.9 = 6.9	208.4 = 6.2	211.2 = 4.8	209.9 = 4.4	208.1 = 4.5
8	268.4 = 4.1	259.4 = 8.9	255.6 = 17.4	263.4 = 9.0	266.7 = 1.2	257.5 = 5.8 *
15	322.7 = 10.8	309.5 = 11.5	300.8 = 16.5	315.3 = 9.2	314.6 = 6.5	301.0 = 8.4 *
22	360.5 = 15.0	349.6 = 16.2	333.8 = 15.8	347.3 = 13.6	348.1 = 10.9	326.0 = 9.2 *
28	390.8 = 21.8	379.1 = 18.5	363.4 = 17.3	373.8 = 19.3	374.5 = 13.1	349.8 = 6.6 *

Each value shows mean (g) = S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.02).

Figures in parentheses indicate number of males.

表3 体重(雄)

AgNO₃群では投与8日以降の体重が対照群と比較して低値に推移した。
snAg各投与群およびnAg群の体重推移には対照群と差はなかった。

Table 4. Body weights of female rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Control group (Distilled water)	2 group (snAg 1 ug/mL)	3 group (snAg 10 ug/mL)	4 group (snAg 100 ug/mL)	5 group (nAg 100 ug/mL)	6 group (AgNO ₃ 100 ug/mL)
Number of females	5	5	5	5	5	5
Days of administration						
1	165.2 = 11.0	163.7 = 5.5	165.5 = 9.3	165.5 = 7.2	165.4 = 9.3	167.6 = 7.0
8	185.4 = 7.4	182.4 = 9.0	187.5 = 14.7	185.9 = 11.3	188.4 = 18.9	189.2 = 9.9
15	205.0 = 6.5	201.9 = 15.9	203.6 = 18.5	206.4 = 14.6	203.4 = 20.2	205.7 = 16.4
22	216.6 = 8.6	218.5 = 17.8	215.8 = 25.2	221.9 = 12.2	213.0 = 27.4	222.2 = 18.8
28	229.1 = 12.5	227.3 = 21.3	220.7 = 22.6	230.3 = 13.9	220.7 = 28.9	230.0 = 18.7

Each value shows mean (g) = S.D.

Figures in parentheses indicate number of females.

表4 体重(雌)

snAg各投与群、nAg群、AgNO₃群ともに対照群と同様に推移した。

Table 5 Food consumption of male rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Control group (Distilled water)	2 group (snAg 1 ug/mL)	3 group (snAg 10 ug/mL)	4 group (snAg 100 ug/mL)	5 group (nAg 100 ug/mL)	6 group (AgNO ₃ 100 ug/mL)
Number of females	5	5	5	5	5	5
Days of administration						
1	24.8 = 1.2	23.4 = 1.3	23.1 = 2.6	25.4 = 2.6	24.2 = 2.4	24.5 = 1.9
8	29.2 = 2.0	27.6 = 2.4	26.6 = 2.3	29.0 = 2.9	29.2 = 1.4	27.8 = 2.9
15	31.6 = 2.1	30.9 = 2.8	28.7 = 2.6	29.1 = 2.9	29.9 = 1.7	27.6 = 1.1*
22	31.9 = 1.9	30.4 = 2.7	28.8 = 2.7	29.5 = 1.9	31.8 = 2.3	28.8 = 0.9*

Each value shows mean (g) = S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.02).

Figures in parentheses indicate number of males.

表5 摂餌量(雄)

AgNO₃ 群の摂餌量が投与15日以降、対照群と比較して減少した。snAg各投与群およびnAg群の摂餌量には差はなかった。

Table 6 Food consumption of female rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Control group (Distilled water)	2 group (snAg 1 ug/mL)	3 group (snAg 10 ug/mL)	4 group (snAg 100 ug/mL)	5 group (nAg 100 ug/mL)	6 group (AgNO ₃ 100 ug/mL)
Number of females	5	5	5	5	5	5
Days of administration						
1	16.1 = 2.3	16.2 = 2.7	17.4 = 3.1	16.8 = 2.1	18.0 = 1.9	17.8 = 2.1
8	20.2 = 2.4	19.0 = 3.4	19.1 = 3.1	19.3 = 2.9	19.1 = 2.1	19.8 = 1.9
15	20.1 = 2.2	18.5 = 4.8	20.5 = 4.0	20.0 = 2.2	19.2 = 2.8	20.3 = 2.8
22	20.7 = 2.9	23.3 = 3.8	22.6 = 2.2	19.8 = 1.8	19.7 = 3.9	20.8 = 2.9

Each value shows mean (g) = S.D.

Figures in parentheses indicate number of females.

表6 摂餌量(雌)

雌の摂餌量にはsnAg、nAg、AgNO₃投与による影響は見られなかった。

Table 7 Hematological findings of male rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of animals	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	PT (sec)	APTT (sec)
Distilled water (control)	5	784 ±36	14.9 ±0.5	43.8 ±1.3	55.9 ±1.1	19.1 ±0.4	34.1 ±0.2	105.2 ±11.4	19.5 ±3.9	24.4 ±2.5
nAg 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	793 ±23	15.4 ±0.4	44.7 ±1.0	56.4 ±2.1	19.4 ±0.8	34.4 ±0.5	114.2 ±7.5	18.7 ±3.5	25.9 ±2.2
nAg 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	794 ±24	15.1 ±0.3	44.2 ±1.2	55.6 ±1.4	19.1 ±0.4	34.3 ±0.4	119.3 ±12.1	22.0 ±4.4	26.2 ±1.6
nAg 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	813 ±36	15.5 ±0.5	45.1 ±1.1	55.5 ±1.9	19.0 ±0.6	34.3 ±0.4	120.1 ±7.9	19.9 ±1.5	28.0 ±2.0
nAg 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	809 ±34	15.6 ±0.6	46.0 ±1.1	56.9 ±2.1	19.2 ±0.6	33.8 ±0.6	111.6 ±15.2	18.5 ±5.5	26.4 ±4.0
AgNO ₃ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	820 ±44	15.6 ±0.7	46.0 ±1.7	56.1 ±1.9	19.0 ±0.4	33.9 ±0.4	111.9 ±11.4	21.9 ±5.5	30.6* ±2.2

Group	Number of animals	WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)	Reticulocyte (%)
Distilled water (control)	5	86.1 ±26.2	17.5 ±4.6	1.2 ±0.2	0.0 ±0.0	3.7 ±0.7	77.6 ±4.9	3.32 ±0.59
nAg 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	74.6 ±11.4	21.2 ±5.5	1.2 ±0.4	0.0 ±0.0	4.3 ±0.6	73.2 ±5.5	3.48 ±0.28
nAg 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	74.8 ±4.2	20.2 ±4.1	1.2 ±0.6	0.0 ±0.0	3.7 ±1.0	74.9 ±4.2	2.95 ±0.46
nAg 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	99.5 ±18.5	17.1 ±1.9	1.5 ±0.5	0.0 ±0.0	3.2 ±0.6	78.2 ±2.1	3.14 ±0.47
nAg 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	87.8 ±9.6	14.5 ±5.7	1.4 ±0.4	0.1 ±0.1	3.2 ±0.4	80.9 ±5.5	3.04 ±0.13
AgNO ₃	5	91.8 ±22.2	14.7 ±4.5	1.1 ±0.5	0.0 ±0.0	2.9 ±0.8	81.3 ±4.6	2.87 ±0.21

Each value shows mean ± SD

*, Significantly different from the control group (P < 0.02).

表7 血液学検査(雄)

nAg群でヘマトクリット値が有意に増加したが、僅かな変化であったことから毒性ではないと判断した。AgNO₃群ではATPP時間の延長傾向がみられた。

Table 8 Hematological findings of female rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of animals	RBC ($\times 10^7/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet ($\times 10^7/\mu\text{L}$)	PT (sec)	APTT (sec)
Distilled water (control)	5	770 ±33	14.7 ±0.7	42.1 ±1.7	54.7 ±0.8	19.1 ±0.3	34.9 ±0.6	114.3 ±11.0	12.3 ±0.8	20.9 ±2.4
nAg 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	764 ±20	14.6 ±0.7	41.9 ±1.7	54.9 ±1.4	19.1 ±0.6	34.8 ±0.3	103.1 ±14.6	11.9 ±0.6	20.8 ±1.7
nAg 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	796 ±32	15.1 ±0.6	43.3 ±1.8	54.5 ±2.4	19.0 ±0.6	34.8 ±0.5	106.6 ±5.6	12.5 ±0.5	21.3 ±2.0
nAg 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	770 ±32	15.0 ±0.7	43.0 ±1.6	55.8 ±1.7	19.5 ±0.6	34.9 ±0.6	107.8 ±15.5	11.7 ±0.6	20.2 ±1.0
nAg 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	806 ±24	15.2 ±0.3	43.7 [*] ±0.9	54.3 ±2.0	18.9 ±0.6	34.8 ±0.4	121.6 ±3.6	12.1 ±0.6	21.0 ±1.6
AgNO ₃	5	782 ±31	15.1 ±0.8	43.5 ±2.2	55.6 ±1.7	19.3 ±0.5	34.8 ±0.4	112.5 ±12.0	12.4 ±0.4	22.1 ±1.9

Group	Number of animals	WBC ($\times 100/\mu\text{L}$)	Neutrophil (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)	Monocyte (%)	Lymphocyte (%)	Reticulocyte (%)
Distilled water (control)	5	66.2 ±14.1	14.6 ±4.9	1.7 ±0.5	0.0 ±0.1	2.7 ±0.9	81.0 ±4.7	2.90 ±0.43
nAg 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	63.0 ±16.2	12.8 ±3.1	2.0 ±1.0	0.0 ±0.0	3.3 ±0.7	82.0 ±4.4	2.84 ±0.52
nAg 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	56.8 ±10.6	12.8 ±2.6	1.9 ±0.4	0.0 ±0.0	2.8 ±0.5	82.5 ±2.6	2.51 ±0.52
nAg 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	69.0 ±16.8	14.6 ±6.1	1.6 ±0.5	0.0 ±0.0	2.2 ±0.6	81.5 ±6.2	2.86 ±0.58
nAg 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5	76.7 ±12.3	14.0 ±4.4	1.3 ±0.4	0.0 ±0.0	2.0 ±0.4	82.7 ±4.1	2.49 ±0.51
AgNO ₃	5	74.5 ±34.1	13.4 ±2.5	1.0 [*] ±0.4	0.0 ±0.1	1.9 ±0.6	81.6 ±2.0	2.57 ±0.18

Each value shows mean ± S.D.

^{*}, Significantly different from the control group (P<0.02).

表8 血液学検査(雌)

nAg群でヘマトクリット値が有意に増加したが、僅かな変化であったことから毒性ではないと判断した。

Table 9 Biochemical findings of male rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Phospholipid (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)	ALP (U/L)
Distilled water (control)	5	5.2 ±0.1	3.4 ±0.1	41 ±9	29 ±13	72 ±9	129 ±12	14 ±2	0.4 ±0.0	0.04 ±0.01	624 ±233
snAg 1 µg/mL	5	5.2 ±0.2	3.4 ±0.1	37 ±7	32 ±16	71 ±10	130 ±9	14 ±2	0.4 ±0.0	0.05 ±0.02	569 ±73
snAg 10 µg/mL	5	5.0 ±0.2	3.4 ±0.2	40 ±8	31 ±18	71 ±10	132 ±8	14 ±2	0.4 ±0.0	0.04 ±0.01	529 ±116
snAg 100 µg/mL	5	5.4 ±0.1	3.5 ±0.0	43 ±12	27 ±9	76 ±10	129 ±8	14 ±1	0.4 ±0.0	0.04 ±0.01	623 ±126
nAg 100 µg/mL	5	5.3 ±0.2	3.5 ±0.2	42 ±7	38 ±12	76 ±9	126 ±9	14 ±2	0.4 ±0.0	0.04 ±0.00	592 ±135
AgNO ₃	5	5.2 ±0.1	3.5 ±0.1	38 ±11	19 ±8	67 ±10	127 ±13	12 ±1	0.4 ±0.0	0.04 ±0.01	569 ±81

Group	Number of animals	AST (U/L)	ALT (U/L)	γ-GTP (U/L)	LDH (U/L)	Ca (mEq/L)	Inorganic phosphorus (mEq/L)	A/G	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
Distilled water (control)	5	71 ±3	31 ±2	0 ±0	123 ±89	9.3 ±0.1	7.4 ±0.5	1.95 ±0.10	144.8 ±0.9	3.98 ±0.17	105.3 ±0.7
snAg 1 µg/mL	5	69 ±11	33 ±5	0 ±1	100 ±95	9.4 ±0.3	7.2 ±0.4	1.97 ±0.08	143.6 ±0.7	3.90 ±0.11	104.6 ±1.2
snAg 10 µg/mL	5	66 ±6	28 ±3	1 ±0	84 ±46	9.3 ±0.3	7.4 ±0.5	2.07 ±0.16	144.0 ±0.6	3.69 * ±0.13	103.8 ±1.8
snAg 100 µg/mL	5	73 ±10	30 ±3	0 ±1	116 ±96	9.7 * ±0.1	8.0 ±0.3	1.91 ±0.09	143.6 ±1.3	3.99 ±0.13	104.5 ±1.2
nAg 100 µg/mL	5	65 ±6	28 ±4	0 ±0	71 ±52	9.7 ±0.4	8.6 ±0.4	1.97 ±0.10	145.2 ±0.9	3.74 ±0.08	104.2 ±0.5
AgNO ₃	5	68 ±4	31 ±2	0 ±0	98 ±58	9.6 ±0.2	7.9 ±0.3	2.00 ±0.19	147.3 * ±0.3	3.73 ±0.21	106.4 ±0.9

Each value shows mean ± SD.

*, Significantly different from the control group (P<0.02).

表9 血液生化学検査(雄)

snAg群およびAgNO₃群の電解質、nAg群の無機質に変動がみられたが、僅かな変化であること、尿検査および腎臓の病理組織学検査に投与による影響はなかったことから、毒性と判断しなかった。

Table 10 Biochemical findings of female rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of animals	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Phospholipid (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Total bilirubin (mg/dL)	ALP (U/L)
Distilled water (control)	5	5.2 ±0.3	3.6 ±0.2	44 ±11	7 ±2	83 ±16	122 ±7	16 ±1	0.5 ±0.0	0.06 ±0.02	483 ±94
snAg 1 µg/mL	5	5.5 ±0.4	3.6 ±0.2	39 ±15	7 ±0	78 ±22	111 ±11	17 ±1	0.5 ±0.0	0.05 ±0.01	434 ±100
nAg 10 µg/mL	5	5.3 ±0.3	3.6 ±0.2	44 ±12	7 ±2	80 ±18	122 ±9	15 ±1	0.4 ±0.0	0.06 ±0.01	380 ±56
nAg 100 µg/mL	5	5.4 ±0.2	3.7 ±0.1	49 ±11	8 ±4	95 ±17	132 ±10	16 ±4	0.4 ±0.0	0.07 ±0.02	381 ±141
nAg 1000 µg/mL	5	5.2 ±0.5	3.5 ±0.5	46 ±8	8 ±2	85 ±12	126 ±9	14 ±2	0.4 * ±0.0	0.05 ±0.01	328 ±41
AgNO ₃	5	5.4 ±0.3	3.7 ±0.1	51 ±10	12 ±10	95 ±14	136 ±16	15 ±2	0.4 ±0.0	0.06 ±0.01	431 ±89

Group	Number of animals	AST (U/L)	ALT (U/L)	γ-GTP (U/L)	LDH (U/L)	Ca (mg/dL)	Inorganic phosphorus (mg/dL)	AG (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
Distilled water (control)	5	69 ±4	28 ±5	0 ±0	53 ±11	9.1 ±0.3	5.6 ±0.5	2.20 ±0.18	143.7 ±1.0	3.57 ±0.26	103.6 ±0.6
snAg 1 µg/mL	5	77 ±6	27 ±5	1 ±1	68 ±39	9.4 ±0.2	6.5 ±0.6	1.90 ±0.18	144.4 ±0.3	3.49 ±0.18	103.6 ±1.0
nAg 10 µg/mL	5	79 ±20	36 ±23	0 ±0	64 ±36	9.4 ±0.4	6.7 * ±0.2	2.10 ±0.17	144.1 ±1.4	3.51 ±0.17	103.1 ±1.5
nAg 100 µg/mL	5	97 ±69	41 ±29	0 ±1	79 ±44	9.5 ±0.4	6.7 * ±0.6	2.20 ±0.12	144.6 ±1.4	3.43 ±0.11	103.6 ±1.4
nAg 1000 µg/mL	5	66 ±5	23 ±2	0 ±1	56 ±19	9.3 ±0.5	7.6 * ±1.0	2.17 ±0.24	149.0 ±1.4	3.30 ±0.31	104.3 ±1.7
AgNO ₃	5	63 ±6	26 ±4	0 ±0	59 ±7	9.3 ±0.4	6.9 * ±0.4	2.19 ±0.16	144.2 ±1.6	3.37 ±0.19	106.1 ±1.5

Each value shows mean±S.D.

* Significantly different from the control group (P<0.02)

表10 血液生化学検査(雌)

10µg/mL以上のsnAg群、nAg群およびAgNO₃群において無機リン濃度の増加がみられたが、僅かな変化であること、他の検査項目から総合的に判断し、投与による変化ではないと判断した。

Table 11. Urine findings of male rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days.

Group	Number of animals	pH					protein			glucose		ketone body			Bilirubin	occult blood			urobilinogen			creatinine (mg/dL)	Urine volume (mL/day)	Electrolyte (mEq/L)			
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	-	=	1+	2+	-	1+	-	=	1+	-	-	±	2+	=	1+			2+	Na	K	Cl
Drilled water (control)	5	0	0	5	0	0	0	1	4	0	5	0	2	3	0	5	4	1	0	2	2	0	73.4 =20.3	3.7 =1.0	0.25 =0.09	0.57 =0.21	0.36 =0.14
snAg 1 µg/mL	5	0	2	2	0	1	0	1	4	0	5	0	2	0	0	5	5	0	0	3	2	0	60.7 =16.6	4.0 =1.5	0.32 =0.15	0.56 =0.18	0.36 =0.20
nAg 10 µg/mL	5	0	2	3	0	0	0	0	5	0	5	0	0	3	0	5	5	0	0	2	0	1	76.4 =11.1	3.5 =1.3	0.26 =0.13	0.50 =0.14	0.33 =0.14
nAg 100 µg/mL	5	0	1	1	2	1	0	1	4	0	5	0	1	4	0	5	5	0	0	3	3	0	82.2 =51.3	3.1 =1.4	0.28 =0.09	0.48 =0.13	0.31 =0.13
nAg 100 µg/mL	5	0	2	2	1	0	0	1	4	0	5	0	1	2	2	5	4	0	1	1	3	0	74.6 =21.4	3.4 =1.2	0.27 =0.14	0.51 =0.15	0.37 =0.15
AgNO ₃	5	0	1	3	1	0	0	1	4	0	5	0	2	1	2	5	4	1	0	3	3	0	66.9 =23.7	3.9 =1.3	0.25 =0.07	0.55 =0.06	0.32 =0.07

Each value shows mean±S.D.
Not significantly different from the control.

表11 尿検査(雄)

雄には、snAg、nAg、AgNO₃投与による影響は見られなかった。

Table 12. Urine findings of female rats in the repeated dose toxicity of nanomaterials by transcutaneous administration for 28 days

Group	Number of animals	pH					protein				glucose		ketone body		Bilirubin			occult blood		urobilinogen		creatinine (mg/dL)	Urine volume (mL/24hr)	Electrolyte (mEq/L)		
		≤5.0	6.5	7.0	7.5	≥8.0	-	=	1+	2+	-	1+	-	=	1+	-	1+	2+	=	1+	Na			K	Cl	
Distilled water (control)	5	0	3	2	0	0	0	4	1	0	3	0	4	1	0	3	3	0	0	3	0	56.9 =2.0	1.5 =0.5	0.03 =0.02	0.20 =0.09	0.09 =0.05
snAg 1 µg/mL	5	1	3	0	0	1	0	2	3	0	3	0	2	3	0	3	3	0	0	4	1	70.5 =24.6	2.9 =0.7	0.22 *	0.24 =0.1	0.24 =0.1
snAg 10 µg/mL	5	0	3	0	0	0	0	2	3	0	3	0	2	3	0	3	3	0	0	2	3	73.0 =22.3	2.9 =1.9	0.14	0.27 =0.1	0.16 =0.1
snAg 100 µg/mL	5	0	3	2	0	0	0	3	2	0	3	0	2	2	1	3	4	0	1	4	1	73.2 =27.3	2.6 =1.1	0.13	0.27 =0.1	0.14 =0.1
snAg 100 µg/mL	5	1	4	0	0	0	0	2	3	0	3	0	3	2	0	3	3	0	0	3	2	77.4 =26.9	2.6 =1.4	0.13	0.26 =0.1	0.16 =0.1
AgNO ₃	5	0	3	1	1	0	1	1	3	0	3	0	2	3	0	3	3	0	0	2	3	66.4 =23.6	2.9 =1.6	0.13	0.29 =0.1	0.17 =0.1

Each value shows mean±SD

*. Significantly different from the control group (P<0.02)

表12 尿検査(雌)

1 µg/mLのsnAg群のNa濃度が高値を示したが、用量依存的な変化ではないこと、snAg群の血液生化学検査および腎臓の病理組織学検査では被験物質投与による影響は見られていないことから偶発的な変化と判断した。

Table 13 Organ weights of male rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 20 days

Group	Control group		2group		3group		4group		5group		6group	
	Distilled water		(nAg 1 ug/mL)		(nAg 10 ug/mL)		(nAg 100 ug/mL)		(nAg 100 ug/mL)		(Ag ₂ VO ₃ 100 ug/mL)	
Number of males	5		5		5		5		5		5	
Body weight	(g)	357.7 = 18.8	343.0 = 15.8	328.6 = 13.2	336.2 = 18.5	341.2 = 13.9	320.8 = 7.6 *					
Brain	(mg)	1894.3 = 56.0	1892.1 = 59.8	1920.8 = 55.5	1859.5 = 62.2	1916.8 = 51.5	1879.8 = 29.7					
	(mg/g)	5.311 = 0.344	5.522 = 0.204	5.851 = 0.229	5.350 = 0.444	5.629 = 0.347	5.864 = 0.212					
Thymus	(mg)	531.5 = 171.1	466.7 = 57.4	410.8 = 75.8	484.2 = 59.4	469.4 = 85.0	492.8 = 80.0					
	(mg/g)	1.472 = 0.428	1.365 = 0.165	1.266 = 0.257	1.442 = 0.172	1.374 = 0.231	1.534 = 0.224					
Heart	(mg)	1320.8 = 244.0	1214.2 = 97.3	1170.1 = 92.0	1190.9 = 113.9	1144.3 = 80.5	1162.8 = 56.6					
	(mg/g)	3.673 = 0.499	3.538 = 0.172	3.558 = 0.179	3.347 = 0.343	3.353 = 0.162	3.628 = 0.231					
Liver	(mg)	11304.4 = 1084.4	10871.2 = 888.3	10203.3 = 453.4	10261.6 = 374.0	10016.9 = 1080.2	9561.0 = 380.0 *					
	(mg/g)	31.545 = 1.627	31.674 = 1.590	31.072 = 1.366	30.559 = 0.999	29.340 = 1.650	29.812 = 1.201					
Kidney (R)	(mg)	1394.3 = 141.2	1392.6 = 110.2	1288.0 = 68.4	1352.8 = 115.3	1322.3 = 83.5	1316.8 = 97.0					
	(mg/g)	3.891 = 0.223	4.058 = 0.205	3.922 = 0.191	4.026 = 0.292	3.879 = 0.258	4.107 = 0.323					
Kidney (L)	(mg)	1368.1 = 159.2	1333.4 = 99.2	1303.4 = 81.4	1361.9 = 97.7	1272.9 = 128.9	1269.3 = 64.7					
	(mg/g)	3.815 = 0.258	3.885 = 0.153	3.968 = 0.224	4.056 = 0.275	3.730 = 0.325	3.939 = 0.237					
Kidneys	(mg)	2762.4 = 297.8	2726.0 = 191.4	2591.4 = 146.6	2714.7 = 205.2	2595.2 = 206.2	2588.0 = 161.0					
	(mg/g)	7.705 = 0.466	7.943 = 0.262	7.890 = 0.404	8.081 = 0.538	7.609 = 0.546	8.066 = 0.556					
Spleen	(mg)	772.4 = 213.3	658.8 = 80.9	629.0 = 16.8	656.3 = 64.3	690.1 = 72.2	647.7 = 65.9					
	(mg/g)	2.147 = 0.502	1.869 = 0.278	1.917 = 0.102	1.955 = 0.165	2.030 = 0.279	2.018 = 0.187					
Testis (R)	(mg)	1546.9 = 105.2	1633.1 = 121.9	1611.9 = 153.4	1499.7 = 173.5	1553.4 = 74.1	1548.0 = 36.0					
	(mg/g)	4.327 = 0.258	4.764 = 0.316	4.917 = 0.515	4.482 = 0.647	4.560 = 0.162	4.828 = 0.179					
Testis (L)	(mg)	1550.3 = 112.2	1623.1 = 140.7	1613.5 = 129.0	1493.6 = 164.6	1577.3 = 101.3	1539.9 = 56.3					
	(mg/g)	4.339 = 0.306	4.734 = 0.361	4.920 = 0.480	4.463 = 0.616	4.624 = 0.242	4.801 = 0.129					
Testes	(mg)	3097.3 = 216.4	3256.2 = 258.5	3225.4 = 262.6	2993.3 = 337.7	3132.7 = 171.9	3087.9 = 81.0					
	(mg/g)	8.666 = 0.562	9.498 = 0.662	9.837 = 0.991	8.946 = 1.262	9.185 = 0.392	9.629 = 0.273					
Epididymis (R)	(mg)	415.5 = 21.2	417.8 = 37.1	412.3 = 44.9	382.8 = 20.8	409.6 = 42.0	397.8 = 21.7					
	(mg/g)	1.161 = 0.020	1.217 = 0.073	1.256 = 0.128	1.144 = 0.120	1.199 = 0.094	1.239 = 0.046					
Epididymis (L)	(mg)	427.9 = 38.7	418.2 = 31.7	397.2 = 33.0	378.0 = 14.3	402.8 = 37.0	393.1 = 22.0					
	(mg/g)	1.196 = 0.077	1.219 = 0.065	1.209 = 0.088	1.128 = 0.101	1.180 = 0.074	1.225 = 0.053					
Epididymides	(mg)	843.5 = 56.7	836.0 = 68.6	809.8 = 77.7	760.8 = 32.4	3132.7 = 171.9	790.9 = 42.9					
	(mg/g)	2.357 = 0.086	2.437 = 0.137	2.464 = 0.215	2.272 = 0.218	9.185 = 0.592	2.465 = 0.096					
Adrenal gland (R)	(mg)	26.6 = 2.3	28.8 = 4.0	28.1 = 8.1	28.9 = 3.5	28.1 = 2.7	27.6 = 2.7					
	(mg/g)	0.075 = 0.010	0.084 = 0.008	0.086 = 0.025	0.086 = 0.010	0.082 = 0.006	0.084 = 0.010					
Adrenal gland (L)	(mg)	27.7 = 0.6	31.5 = 5.7	29.1 = 9.0	30.6 = 3.5	30.5 = 5.7	30.2 = 2.7					
	(mg/g)	0.078 = 0.005	0.092 = 0.013	0.088 = 0.028	0.091 = 0.010	0.089 = 0.015	0.094 = 0.010					
Adrenal glands	(mg)	54.3 = 2.6	60.3 = 9.6	57.1 = 17.1	59.5 = 6.9	58.6 = 8.3	57.9 = 5.4					
	(mg/g)	0.152 = 0.015	0.175 = 0.021	0.174 = 0.053	0.177 = 0.019	0.172 = 0.022	0.181 = 0.021					

Each value shows mean ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of males.

*, Significantly different from the control group (P<0.02).

表13 器官重量(雄)

雄の器官重量には被験物質投与による影響はみられていない。

Table 14 Organ weights of female rats in the repeated dose toxicity study of nanomaterials by transcutaneous administration for 20 days

Group		Control group		2group		3group		4group		5group		6group	
		Distilled water		(nAg 1 ug/mL)		(nAg 10 ug/mL)		(nAg 100 ug/mL)		(nAg 100 ug/mL)		(AgNO ₃ 100 ug/mL)	
Number of females		5		5		5		5		5		5	
Body weight	(g)	208.1	= 8.2	208.3	= 16.9	202.4	= 24.2	213.7	= 18.2	202.5	= 27.5	211.7	= 19.8
Brain	(mg)	1764.1	= 93.2	1776.4	= 42.4	1823.5	= 52.8	1782.9	= 61.0	1812.2	= 103.3	1774.6	= 48.4
	(mg/g)	8.445	= 0.482	8.577	= 0.770	9.103	= 0.996	8.380	= 0.612	9.030	= 0.772	8.442	= 0.825
Thyroid	(mg)	425.6	= 53.2	417.1	= 32.6	425.1	= 26.1	411.4	= 81.2	384.6	= 58.1	399.3	= 98.7
	(mg/g)	2.042	= 0.218	2.010	= 0.204	2.105	= 0.401	1.927	= 0.367	1.918	= 0.316	1.872	= 0.339
Heart	(mg)	838.2	= 81.4	870.2	= 87.6	802.5	= 111.2	789.0	= 73.7	771.9	= 105.0	784.7	= 80.8
	(mg/g)	4.040	= 0.510	4.174	= 0.155	3.961	= 0.204	3.692	= 0.176	3.813	= 0.090	3.704	= 0.074
Liver	(mg)	5902.4	= 195.1	5993.7	= 848.2	5834.0	= 308.0	6591.3	= 1258.3	5720.9	= 788.9	6044.1	= 688.8
	(mg/g)	28.388	= 1.284	28.700	= 2.206	28.782	= 1.225	30.658	= 3.445	28.287	= 1.570	28.522	= 1.029
Kidney (R)	(mg)	817.1	= 72.1	831.7	= 49.3	808.2	= 65.0	820.9	= 60.2	791.4	= 73.6	799.3	= 72.9
	(mg/g)	3.924	= 0.282	4.007	= 0.306	4.020	= 0.346	3.846	= 0.231	3.629	= 0.225	3.79	= 0.336
Kidney (L)	(mg)	792.1	= 60.7	815.7	= 41.2	798.8	= 53.5	830.7	= 44.5	783.8	= 69.3	799.9	= 77.1
	(mg/g)	3.808	= 0.296	3.927	= 0.208	3.979	= 0.381	3.902	= 0.287	3.893	= 0.234	3.782	= 0.186
Kidneys	(mg)	1609.1	= 129.5	1647.4	= 85.8	1607.0	= 115.5	1651.7	= 103.4	1575.2	= 142.4	1599.3	= 142.7
	(mg/g)	7.732	= 0.599	7.934	= 0.499	7.999	= 0.722	7.751	= 0.508	7.822	= 0.454	7.571	= 0.498
Spleen	(mg)	484.9	= 52.9	463.2	= 70.5	468.4	= 59.4	500.5	= 85.9	459.9	= 75.7	525.9	= 86.6
	(mg/g)	2.340	= 0.245	2.215	= 0.161	2.316	= 0.130	2.339	= 0.336	2.277	= 0.287	2.475	= 0.243
Ovary (R)	(mg)	45.5	= 8.0	51.7	= 4.4	42.2	= 8.0	41.6	= 5.9	44.1	= 8.8	40.2	= 5.2
	(mg/g)	0.218	= 0.035	0.250	= 0.037	0.208	= 0.029	0.195	= 0.023	0.219	= 0.042	0.19	= 0.02
Ovary (L)	(mg)	35.3	= 6.3	49.3	= 4.4	40.9	= 6.7	40.9	= 6.6	39.9	= 8.2	45.5	= 6.5
	(mg/g)	0.169	= 0.027	0.238	= 0.032	0.202	= 0.027	0.195	= 0.036	0.197	= 0.028	0.215	= 0.025
Ovaries	(mg)	80.8	= 13.4	101.0	= 8.2	83.0	= 11.1	82.5	= 7.7	84.0	= 16.3	85.7	= 9.6
	(mg/g)	0.388	= 0.057	0.489	= 0.067	0.411	= 0.029	0.388	= 0.043	0.416	= 0.068	0.406	= 0.033
Adrenal gland (R)	(mg)	30.9	= 8.1	34.2	= 7.0	31.0	= 4.2	30.9	= 2.9	30.9	= 2.3	31.4	= 4.9
	(mg/g)	0.149	= 0.039	0.164	= 0.026	0.154	= 0.021	0.145	= 0.011	0.154	= 0.019	0.149	= 0.021
Adrenal gland (L)	(mg)	30.6	= 6.9	35.2	= 6.4	30.6	= 5.7	32.2	= 3.6	32.2	= 5.1	32.7	= 7.4
	(mg/g)	0.148	= 0.034	0.169	= 0.026	0.153	= 0.020	0.151	= 0.012	0.160	= 0.023	0.155	= 0.031
Adrenal glands	(mg)	61.6	= 14.9	69.4	= 13.3	61.6	= 7.8	63.1	= 6.5	63.1	= 7.3	64.1	= 12.3
	(mg/g)	0.296	= 0.073	0.332	= 0.051	0.307	= 0.040	0.295	= 0.023	0.314	= 0.039	0.303	= 0.052

Each value shows mean ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of males.

Not significantly different from the control.

表14 器官重量(雌)

雄の器官重量には被験物質投与による影響はみられていない。