

**厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書（平成26年度）**

**ナノ銀の腹腔内投与による急性毒性について**

研究代表者： 小川 久美子 （国立医薬品食品衛生研究所 病理部）  
研究分担者： 西川 秋佳 （国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）  
研究分担者： 曹 永暁 （国立医薬品食品衛生研究所 病理部）  
研究協力者： 最上 知子 （国立医薬品食品衛生研究所 生化学部）  
研究協力者： 安達 玲子 （国立医薬品食品衛生研究所 生化学部）

**研究要旨：**

ナノ銀（AgNP）の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び90日間反復投与毒性試験等において、肝臓や腎臓に軽度の変化が示されているものの、十分な評価は行われていない。AgNPのサイズによる毒性の違いに関連する情報はさらに少ない。昨年度我々は抗原性試験を行うためマウスに直径10 nm、60 nm及び100 nmのAgNPを腹腔内投与したところ抗原の有無にかかわらず、AgNP 10 nmを投与した全動物のみにおいて24時間内の死亡又は瀕死例が認められた。27年度の本研究では、雌性BALB/c系マウスを用いて、様々なサイズのAgNPの急性毒性について、各サイズのAgNP（直径10 nm、60 nm及び100 nm）を腹腔内投与（0.2 mg/マウス）1、3及び6時間後に剖検を行い、影響について検討した。投与5時間後より、AgNP 10 nm群で立毛及び活動低下が、投与6時間後にはAgNP 10 nm群及びAgNP 100 nm群で有意な体温の低下が認められた。投与6時間後のAgNP 10 nm群において、解剖時、肝臓及び脾臓のうっ血がみられ、血清生化学的検索では、総タンパク、アルブミン、総コレステロール、トリグリセリド及びグルコースの有意な減少、並びに無機リン、アスパラギン酸トランスアミナーゼ及び総ビリルビンの有意な増加が認められ、アラントトランスアミナーゼについても有意差はないものの増加傾向を示した。総活性酸素種（ROS）/活性窒素種（RNS）フリーラジカルの産生量において、AgNP 100 nmの投与1時間及び6時間群の肝臓組織中で有意な上昇が認められ、AgNP 10 nmの投与6時間群の血清中に上昇傾向がみられた。病理組織学的には、AgNP 10 nmの投与6時間群でのみ、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死、脾臓のうっ血、胸腺皮質の単細胞壊死及び肺胞壁の細胞増加が有意な高頻度に認められた。AgNP 60 nmの投与1時間及び3時間群並びにAgNP 100 nmの投与1時間群で肝細胞の細胞分裂像が5例中5例で認められた。胸腺周囲リンパ節の褐色～黒色色素の沈着、腸間膜の肉芽腫及び褐色～黒色色素の沈着はいずれのAgNP投与群でも高頻度に認められた。被験物質による肝細胞障害又は循環器不全が死亡原因と関連している可能性が示唆された。今回の検討においては、投与後の時間によって特定の大きさの被験物質でのみ見られた所見があり、類似した大きさのナノ銀の静脈投与によっては毒性の報告がないことから、機序については更に詳細な検討が必要であると考えられた。

キーワード：ナノ銀、急性毒性、マウス

**A. 研究目的**

ナノ銀（AgNP）の毒性については、げっ歯類を用いた経口投与による単回及び90日間反復投与毒性試験等において、肝臓や腎臓に軽度の変化が示されているものの、十分な評価は行われていない（Bergin IL et. al., Int J Biomed Nanosci Nanotechnol. 2013;3. doi: 10.1504/IJBNN.2013.054515.）。AgNPのサイズによる毒性の違いについて、細胞を用いた検討では可能性が指摘されているが（Park MVDZ et.

al., Biomaterials. 2011;32 (9810-9817)）動物を用いた検討での報告はない。

昨年度我々は抗原性試験を行うためマウスに直径10 nm、60 nm及び100 nmのAgNPを0.2 mg/300 µl/マウスの用量で腹腔内投与したところ卵白アルブミン（OVA）抗原の有無にかかわらず、AgNP 10 nmを投与した全動物で24時間内の死亡又は瀕死例が認められた。本研究では、雌性BALB/c系マウスを用いて、様々なサイズのAgNPの急性毒性について、各サイズのAgNP

(直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm) を腹腔内投与 (0.2 mg/マウス) 1、3 及び 6 時間後に剖検を行い、AgNP の影響について検討した。

## B . 研究方法

AgNP は nanoComposix 社の銀ナノ粒子 (直径 10 nm (AGCB10)、60 nm (AGCB60) 及び 100 nm (AGCB100)、濃度 1 mg/ml) を用いることとした。AgNP を 0.2 mg/300  $\mu$ l/マウスとなるようクエン酸バッファーに加えて投与する前に調製した。

動物は、6 週齢の雌性 BALB/c マウスを日本エスエルシーより購入し、MF 飼料(オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌した。1 週間の馴化後、1 群の匹数は 5 匹とし、各群は以下の通りに構成した、溶媒対照 (Vehicle) 6 時間群、10 nm AgNP 1 時間群、10 nm AgNP 3 時間群、10 nm AgNP 6 時間群、60 nm AgNP 1 時間群、60 nm AgNP 3 時間群、60 nm AgNP 6 時間群、100 nm AgNP 1 時間群、100 nm AgNP 3 時間群及び 100 nm AgNP 6 時間群。腹腔内投与 (300  $\mu$ l/マウス) し、1、3 及び 6 時間後、2 時間の絶食後、深麻酔下で腹大動脈から採血後、放血及び放血し、解剖した (Figure 1)。

全身状態観察を行い、解剖前の体重及び投与 1、3 及び 6 時間後の体温を測定した。肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節、胃、小腸、大腸、胸腺、心臓、肺及び膵臓についてはホルマリン固定後、パラフィン包埋切片、HE 標本作製し、病理組織学的検討を行った。

全血を採取し、総タンパク (TP)、アルブミン (ALB)、アルブミン/グロブリン比 (A/G)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、ナトリウム (Na)、カリウム (K)、クロール (Cl)、カルシウム (Ca)、無機リン (IP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナーゼ (ALT)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、 $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GTP)、総コレステロール (TC)、トリグリセリド (TG)、総ビリルビン (BIL)、グルコース (Glucose) の各項目を測定した。

血清及び肝臓ライセートのトータル活性酸素種 (ROS)/活性窒素種 (RNS) フリーラジカルの測定は、1 時間及び 3 時間群は 3 例、6 時間群は 5 例のサンプルから、OxiSelect™ In Vitro

ROS/RNS Assay Kit (Green Fluorescence) (CELL BIOLABS, INC. San Diego, CA) を用いて測定した。

## 統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エクセル統計 2012 for Windows ソフトウェアを用いて、各群の分散比を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett 法により有意差検定を行った。不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行い、群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Steel 法により多重検定を行った。病理組織学的所見の発生頻度については、Fischer's exact test による検定を実施し、いずれの検定も  $p < 0.05$  を有意とした。なお、図中には \*  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  で有意差の程度を記した。

## (倫理面への配慮)

投与実験は熟練者による腹腔内投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

## C . 研究結果

60 nm AgNP 3 時間群の 1 匹のデータは投与ミスによりすべての結果より削除した。

投与 5 時間後より、AgNP 10 nm 群で立毛及び活動低下がみられた。投与 6 時間後には AgNP 10 nm 群及び AgNP 100 nm 群で有意な体温の低下が認められ、各々平均 2.2 及び 0.8 度低下した (Figure 2)。

血清生化学的検索 (Table 1) では、投与 6 時間後の AgNP 10 nm 群において、Vehicle 群に比べ、TP、ALB、TC、TG 及び Glucose の有意な減少、並びに IP、AST 及び BIL の有意な増加が認められ、ALT においても有意差はないものの増加傾向を示した。全ての 1 時間群で BUN 及び Na の低下が見られ、AgNP 10 nm 及び AgNP 60 nm の 3 時間群でも BUN の有意な低下が認められた。

全ての3時間群でIPの有意な増加を認め、AgNP 10 nm 及びAgNP 100 nmの3時間群及びAgNP 60nmの6時間群でTGの有意な減少、AgNP 10 nm 3時間群及びAgNP 60 nm 1時間群でGlucoseの増加が認められた。AgNP 60 nmの6時間群ではGlucoseの有意な減少が認められた。

トータル活性酸素種 (ROS)/活性窒素種 (RNS) フリーラジカルの産生量において、AgNP 100 nmの投与1時間及び6時間群の肝臓組織中で有意な上昇が認められ、血清中の産生量については、AgNP 10 nmの投与6時間群の血清中に上昇傾向がみられた (Figure 3)。

解剖時の肉眼的観察では、投与6時間後のAgNP 10 nm群において、肝臓及び脾臓が暗赤色に変色しており、うっ血が示唆された (Figure 4)。病理組織学的解析を行ったところ、AgNP 10 nmの投与6時間群で肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死、脾臓のうっ血、胸腺皮質の単細胞壊死及び肺胞壁の細胞増加がVehicle群及び他の投与群に比べ有意な高頻度で認められた (Figure 5、Table 2)。また、肝臓のクッパー細胞の暗褐色色素沈着も高頻度に認められた。AgNP 60 nm 1時間及び3時間群並びにAgNP 100 nm 1時間群で肝細胞の細胞分裂像が5例中5例で認められた。胆嚢の浮腫がAgNP 60 nm 6時間群を除くいずれのAgNP投与群でも認められ、特にAgNP 60 nm 1時間及び3時間群並びにAgNP 10 nm 6時間群で有意な高頻度を示した。胸腺周囲リンパ節の褐色～黒色色素の沈着、腸間膜の肉芽腫及び褐色並びに黒色色素の沈着はいずれのAgNP投与群でも高頻度に認められた。

#### D. 考察

昨年度の研究で、OVAの有無にかかわらず10 nm AgNPを腹腔内投与した動物で全例が死亡又は瀕死に陥った。その死因を明らかにするため、雌性BALB/c系マウスを用いて、様々なサイズのAgNP (直径10 nm、60 nm及び100 nm)を腹腔内に投与し、ナノ銀による急性毒性について血清生化学的解析及び病理組織学的解析を主体に検討を行った。

腸間膜の肉芽腫、腸間膜及び胸腺周囲リンパ節における褐色～黒色色素の沈着は、AgNPのサイズに関わらず全てのAgNP投与群で共通に認められたが、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、

細胞質内封入体、単細胞壊死、脾臓のうっ血、胸腺皮質の単細胞壊死及び肺胞壁の細胞増加、並びにクッパー細胞の暗褐色色素沈着、脾臓のうっ血はAgNP 10 nmの投与6時間群でのみ認められ、60 nm及び100 nm AgNP投与群では認められなかったことから、AgNPのサイズが死をもたらした要因の一つと考えられる。しかし、同等の大きさのナノ銀の静脈投与では毒性を誘発したとの報告がない (Lee Y et. al., *Nanotoxicity*. 2013;7 (1120-1130))。AgNP 10 nm 6時間群で腸間膜リンパ節、胸腺及び胸腺周囲リンパ節に著しい病変が認められたことから、AgNPはリンパ管循環を介して大きな影響を及ぼした可能性が考えられた。リンパ系を除いては肝臓の病変が最も重篤で、ASTの著しい高値及びALTの増加傾向があったことから、AgNPによる肝細胞障害が死亡原因と関連している可能性が考えられる。

ヒト気管支上皮細胞にサイズの異なるAgNP (直径10、40及び75 nm)を添加して培養すると10 nm添加群でのみ細胞毒性がみられたが、ROSの産生及びDNA損傷の明らかな増加は認められなかった (Gluga AR et. al., *Particle and Fibre Toxicology*. 2014;11 (DOI:10.1186/1743-8977-11-11))。今回の結果からも肝細胞への毒性は明らかになったものの、その程度とROSの産生量は一致しなかった。有意差は認めなかったが、血清中のROSの産生量がAgNP 10 nm 6時間群で増加傾向がみられたことから、死因は肝臓に限らず、全身に及ぼす影響によるものの可能性も考えられ、肝臓及び脾臓にうっ血がみられ、肺胞壁の細胞増加及び胆嚢の浮腫などがみられることから、循環器系の異常による死亡の可能性も否定はできない。詳細はまだ不明であり、機序について詳しく検討する必要がある。

AgNPの毒性はAgNPの大きさのみならず (Park MVDZ et. al., *Biomaterials*. 2011;32 (9810-9817)) 表面化学成分、電荷、コーティングの有無、凝集性及び動物実験での投与経路によって影響を受ける可能性が示唆されている。最近の報告では質量の単位より表面積や粒子の数といった単位を使ったほうがAgNPの毒性を比較する際により正確であると報告されている (Huk et al., *Particle and Fibre Toxicology*.)

2014;11, <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/11/1/65> )。本試験で用いられた 10、60 及び 100 nm AgNP の表面積及び粒子の数は各々 55.1、9.4、5.3 m<sup>2</sup>/g 及び 2.2E+14、9.1E+11、1.7E+11 particles/mL であり、いずれについても 10 nm AgNP が他のサイズの AgNP より著しく大きな値を示している。

## E . 結論

AgNP 10 nm 6 時間群において、体温などの臨床症状、血清生化学的検査及び肝臓の肉眼及び病理組織学的検査で著しい変化が認められた。AgNP のサイズによる毒性の現れ方に違いがあることが明らかとなり、被験物質による肝細胞障害又は循環器不全が死亡原因と関連している可能性が示唆された。しかし、その詳細な機序を解明するにはさらなる検討が必要であると考えられた。

## F . 研究発表

1 . 論文発表  
なし

2 . 学会発表 ( 発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入 )

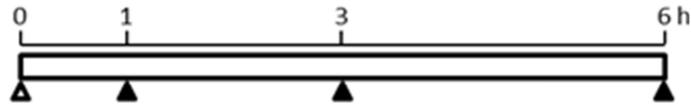
曹永晩、水田保子、豊田武士、赤木純一、平田直、安達玲子、木村美恵、最上(西巻)知子、小川久美子: ナノ銀の経皮曝露によるアジュバント作用のマウスモデル実験系を用いた検討 . 第42回日本毒性学会学術年会(2015年6月)

曹永晩、水田保子、豊田武士、赤木純一、平田直、曾根瑞季、安達玲子、木村美恵、最上(西巻)知子、小川久美子: 経皮曝露したナノ銀のアジュバント効果解析 . 第32回日本毒性病理学会総会及び学術集会(2016年1月)

Young-Man Cho, Yasuko Mizuta, Takeshi Toyoda, Jun-ichi Akagi, Tadashi Hirata, Reiko Adachi, Yoshie Kimura, Niahimaki-Mogami Tomoko, Kumiko Ogawa: Evaluation of the adjuvant effects of transcutaneously exposed silver nanoparticles with different size in mouse model. 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2016) (2016.3 New Orleans, LA, USA).

## G. 知的所有権の取得状況

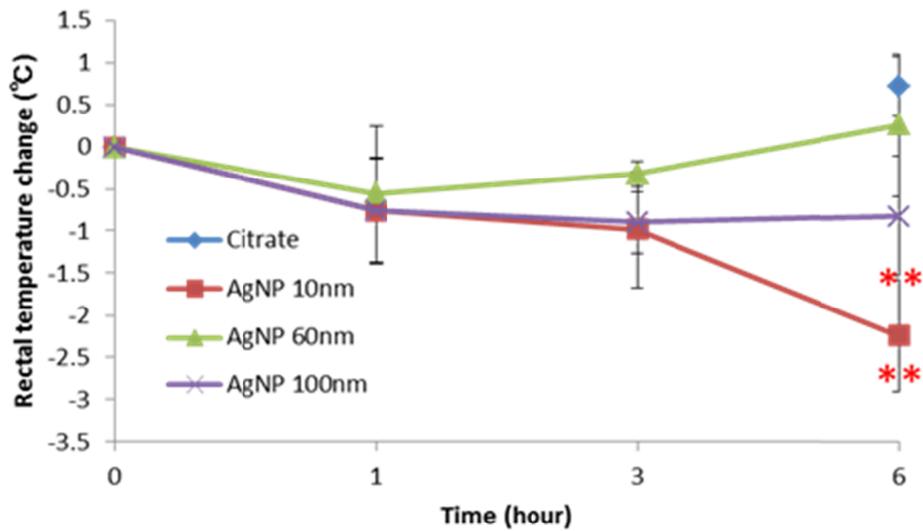
- 1 . 特許所得  
なし
- 2 . 実用新案登録  
なし
- 3 . その他  
なし



Animal 7-week old female BALB/c mouse (n=5/group)

- ▲ Test chemicals exposure (i.p., 300  $\mu$ l/mouse)
  - ① PBS (vehicle, 6 hr only)
  - ② 10 nm AgNP (0.2 mg)
  - ③ 60 nm AgNP (0.2 mg)
  - ④ 100 nm AgNP (0.2 mg)
- ▲ Sacrifice

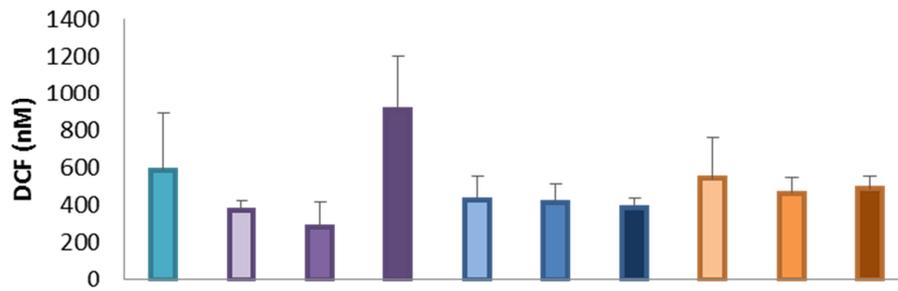
Figure 1. 実験デザイン



\*\* : p<0.01 vs. Vehicle

Figure 2. 投与後の直腸温の変化

## Serum ROS



## Hepatic ROS

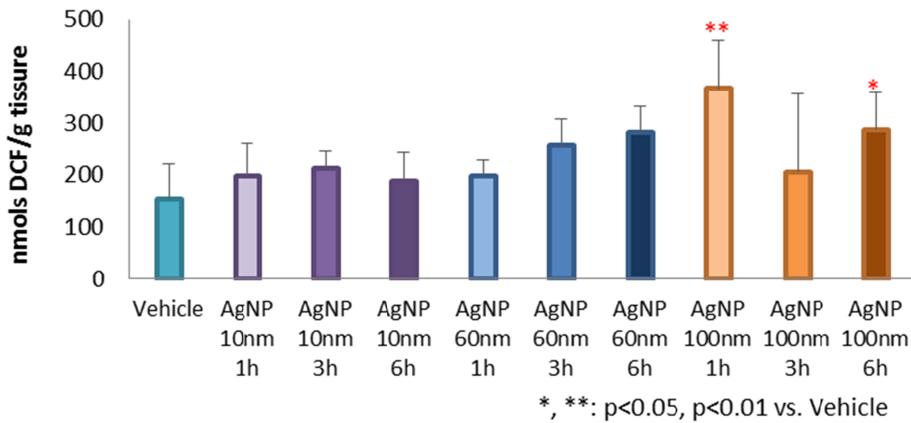


Figure 3. 血清及び肝臓中のROS産生量

No. 1, Citrate, 6 hr



No. 18, AgNP 10 nm, 6 hr



No. 35, AgNP 60 nm, 6 hr



No. 50, AgNP 100 nm, 6 hr



Figure 4. 剖検時の肉眼変化



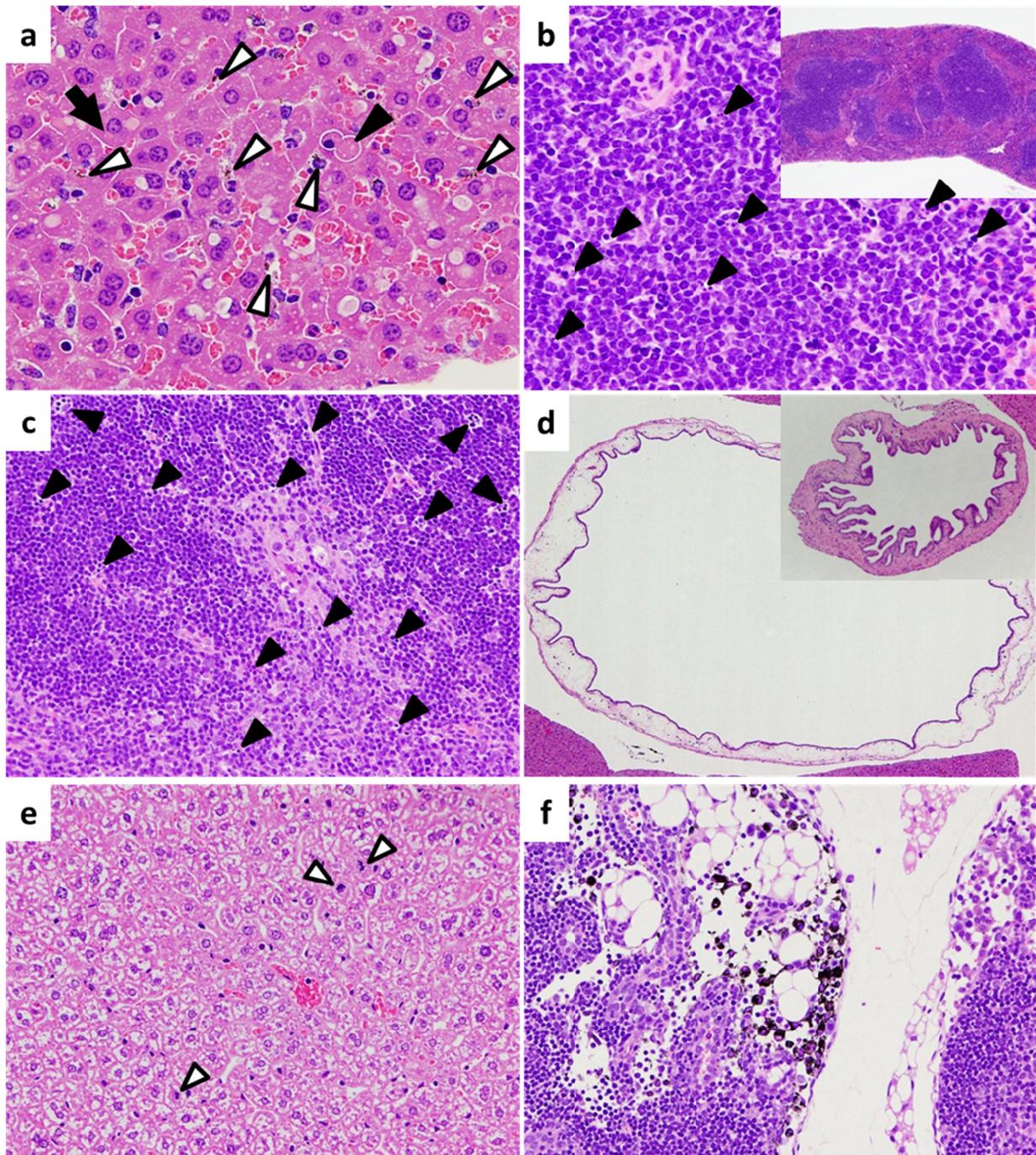


Figure 5. AgNP 10 nm 6時間群(a-d)、AgNP 60 nm 1時間群(e) 及び 3時間群(f)の病理組織写真。(a)肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、クッパー細胞の暗褐色色素沈着(白矢頭)、肝細胞単細胞壊死(黒矢頭)及び細胞質内封入体(矢印)、(b)脾臓のうっ血及び白脾髄における細胞死、(c)胸腺の細胞死、(d)胆嚢粘膜下の浮腫(枠内はVehicle群)、(e)肝細胞の細胞分裂像(白矢頭)、(f)胸腺周囲リンパ節の褐色～黒色色素の沈着が認められた。

Table 1 Serum biochemistry for BALB/C mouse treated with AgNP

Treatment	Vehicle					AgNP 10 nm					AgNP 60 nm					AgNP 100 nm				
	6h		1h		3h		6h		1h		3h		6h		1h		3h		6h	
	No. of animals		No. of animals		No. of animals		No. of animals		No. of animals		No. of animals		No. of animals		No. of animals		No. of animals		No. of animals	
TP g/dL	4.78 ± 0.13	4.54 ± 0.28	4.74 ± 0.18	4.06 ± 0.17**	4.50 ± 0.21	4.70 ± 0.16	4.64 ± 0.15	4.62 ± 0.13	4.78 ± 0.26	4.58 ± 0.19										
ALB g/dL	3.30 ± 0.10	3.24 ± 0.17	3.34 ± 0.09	2.88 ± 0.08**	3.14 ± 0.15	3.28 ± 0.15	3.22 ± 0.16	3.28 ± 0.08	3.35 ± 0.13	3.14 ± 0.13										
A/G	2.24 ± 0.09	2.50 ± 0.16	2.40 ± 0.19	2.44 ± 0.23	2.34 ± 0.21	2.30 ± 0.19	2.30 ± 0.33	2.46 ± 0.05	2.38 ± 0.22	2.20 ± 0.20										
BUN mg/dL	31.80 ± 4.89	19.88 ± 2.27**	22.34 ± 3.49**	27.66 ± 5.35	19.80 ± 2.13*	23.64 ± 2.90*	29.98 ± 3.63	16.98 ± 2.44**	26.63 ± 5.89	30.54 ± 1.94										
Cre mg/dL	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01										
Na mEq/L	152.40 ± 0.55	147.40 ± 1.92**	150.60 ± 1.67	150.60 ± 2.41	145.40 ± 1.52*	151.00 ± 1.22	152.00 ± 1.22	147.60 ± 1.95**	151.75 ± 0.96	153.40 ± 1.82										
K mEq/L	4.68 ± 0.19	4.56 ± 0.23	4.54 ± 0.26	5.14 ± 0.29	5.06 ± 0.37	4.74 ± 0.27	5.06 ± 0.27	4.82 ± 0.29	4.65 ± 0.13	4.84 ± 0.24										
Cl mEq/L	114.80 ± 1.48	111.20 ± 2.28	110.00 ± 7.91	110.60 ± 7.16	108.20 ± 2.49	112.00 ± 1.00	114.20 ± 2.28	110.00 ± 1.87	112.25 ± 0.96	113.80 ± 1.30										
Ca mg/dL	8.20 ± 0.20	8.18 ± 0.41	7.38 ± 0.67	7.33 ± 0.22	8.22 ± 0.41	7.38 ± 0.30	7.92 ± 0.62	7.98 ± 0.48	7.78 ± 0.78	8.46 ± 0.27										
IP mg/dL	8.34 ± 0.60	9.80 ± 0.64	11.80 ± 2.36**	10.98 ± 0.73*	10.54 ± 1.11	12.80 ± 1.12*	10.26 ± 1.50	10.24 ± 1.90	11.25 ± 0.58*	9.28 ± 0.92										
AST IU/L	54.80 ± 10.47	60.20 ± 6.87	74.20 ± 34.77	347.80 ± 97.79**	60.80 ± 11.19	57.80 ± 12.56	52.00 ± 11.05	107.60 ± 96.87	52.75 ± 11.12	47.40 ± 3.78										
ALT IU/L	27.00 ± 7.18	14.60 ± 13.16	17.00 ± 4.85	54.00 ± 20.65	28.00 ± 9.30	23.80 ± 3.96	21.20 ± 5.89	56.80 ± 65.10	22.50 ± 5.80	18.60 ± 1.67										
ALP IU/L	565.00 ± 49.89	565.20 ± 22.63	607.40 ± 47.37	513.40 ± 47.20	572.40 ± 42.44	617.40 ± 24.63	574.20 ± 16.38	577.40 ± 72.61	622.50 ± 31.27	527.40 ± 42.34										
γGTP IU/L	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3										
TC mg/dL	68.80 ± 3.70	64.40 ± 3.65	67.80 ± 3.56	59.00 ± 4.18**	69.00 ± 2.35	73.80 ± 6.53	69.60 ± 5.68	64.40 ± 2.51	73.50 ± 3.70	70.40 ± 3.44										
TG mg/dL	60.20 ± 19.80	44.20 ± 11.80	28.60 ± 8.65**	19.00 ± 5.20**	68.20 ± 7.40	41.60 ± 10.60	34.60 ± 8.99*	49.60 ± 8.68	38.00 ± 9.06*	49.20 ± 17.47										
BIL mg/dL	0.04 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.14	0.14 ± 0.02*	0.09 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.05 ± 0.02	0.09 ± 0.06	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00										
Glucose mg/dL	162.20 ± 15.71	221.20 ± 21.73	202.80 ± 26.73**	111.00 ± 19.24*	216.00 ± 22.33*	197.20 ± 32.85	143.00 ± 20.48	194.20 ± 29.81	176.25 ± 38.29	145.80 ± 15.01										

Each value represents the mean ± SD.

\*, \*\* : Significantly different from vehicle group at p<0.05 and p<0.01, respectively



Table 2. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP up to 6 hours (continued)

Organ and lesions	Treatment Time after treatment No. of animals	Vehicle					AgNP 10 nm					AgNP 60 nm					AgNP 100 nm						
		6 h	1 h	5	3 h	5	6 h	1 h	5	3 h	5	6 h	1 h	5	3 h	5	6 h	1 h	5	3 h	5	6 h	
Intestine	Hemorrhage, large intestine, submucous	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Congestion, large intestine, lamina propria	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Vacuolation, small intestine, mucosal epithelium	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Small intestine injection track	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cecum injection track	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mesenterium	Granuloma	0	3	4*	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	3	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**	5**
	Erythrophagocytosis	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, cortex	0	1	2	3	3	3	2	4*	2	2	2	2	2	4**	2	2	2	2	4**	2	2	2
	Apoptosis, paracortex	0	2	3	3	3	3	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	3
	Regenerative tubules	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Kidney	Mineralization, medulla	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cell infiltration, interstitial lymphocytic	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Thrombus, right ventricle	0	2	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	1	2	0	0	0	1	1	2	2
	Thrombus, left ventricle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Heart	Thrombus, right atrium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Thrombus, left ventricle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mineralization, epicardium	4	5	2	4	4	4	3	2	2	3	3	3	3	1	3	3	3	1	2	2	2	2
	Mineralization, myocardium	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung	Mineralization, endocardium	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cell infiltration, interstitial lymphocytic	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cell infiltration, interstitial neutrophil	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Megalocyte, cardiomyocyte	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung	High cellularity, alveolar wall	0	0	0	1	4*	4*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hemorrhage	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dark brown pigment deposition, alveolar macrophage	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Lymphatic hyperplasia	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*, \*\*, significantly different from vehicle group at p<0.05, 0.01, respectively