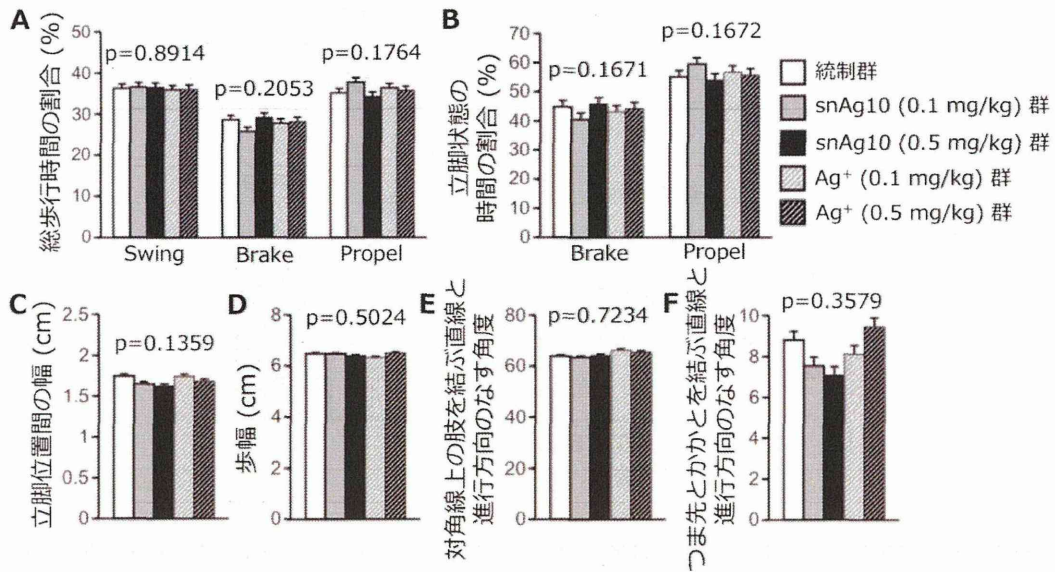


前肢



後肢

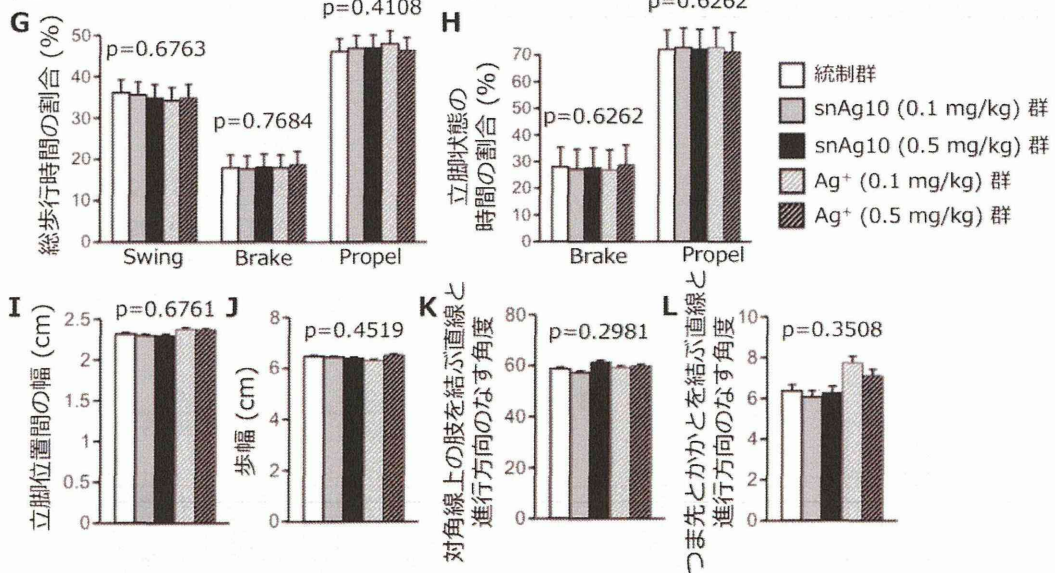


図7. 歩行の解析. BALB/c系の授乳中マウスに産後3週間にわたってサブナノ銀あるいは銀イオンを経口摂取させた(1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg)。その母親マウスに養育された雄の子の成体時の歩行状態を解析した。前肢および後肢における(A, G)総歩行時間の割合、(B, H)各立脚状態を示した時間の割合、(C, I)立脚位置間の幅、(D, J)歩幅、(E, K)対角線上の肢を結ぶ直線と進行方向のなす角度、(F, L)つま先とかかとを結ぶ直線と進行方向のなす角度を測定した。

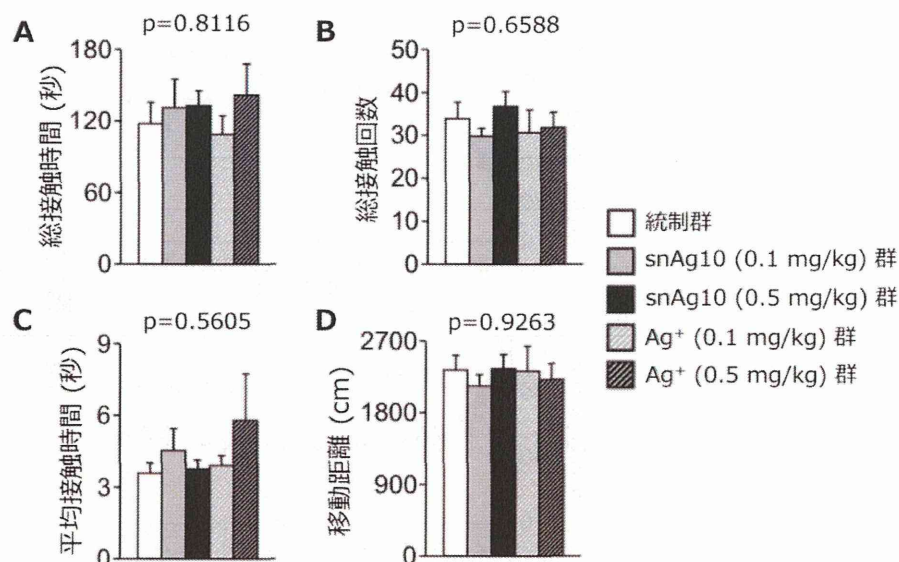
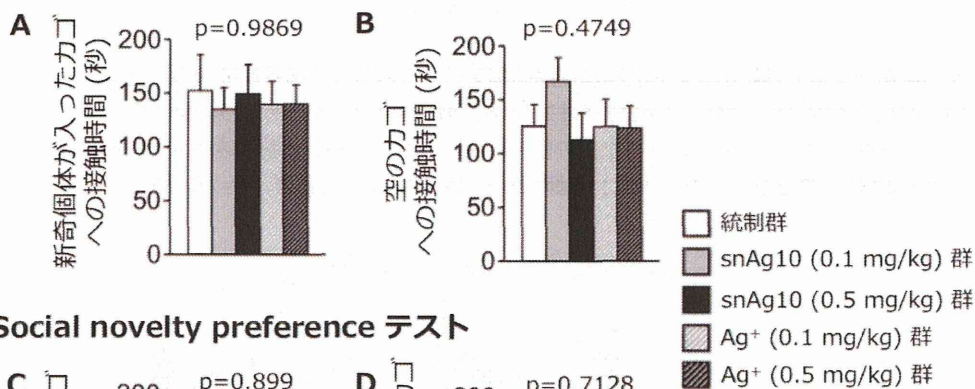


図8. 新奇環境下社会的行動テストによる社会的行動の評価。 BALB/c系の授乳中マウスに産後3週間にわたってサブナノ銀あるいは銀イオンを経口摂取させた（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）。その母親マウスに養育された雄の子の成体時の新奇環境下社会的行動テストにおける他個体との(A)総接触時間、(B)総接触回数、(C)平均接触時間、ならびに(D)移動距離を測定した(各群、n=8-10)。

Sociability テスト



Social novelty preference テスト

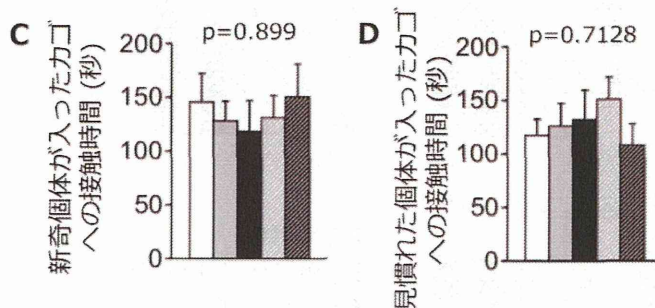


図9. Crawley版社会的行動テストによる社会的行動の評価。 BALB/c系の授乳中マウスに産後3週間にわたってサブナノ銀あるいは銀イオンを経口摂取させた（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）。その母親マウスに養育された雄の子の成体時におけるsociabilityテスト場面での(A)新奇個体が入ったカゴへの接触時間および(B)空のカゴへの接触時間を測定した(各群、n=16-20)。続いて、Social novelty preferenceテスト場面での(C)新奇個体が入ったカゴへの接触時間および(D)見慣れた個体が入ったカゴへの接触時間を測定した。

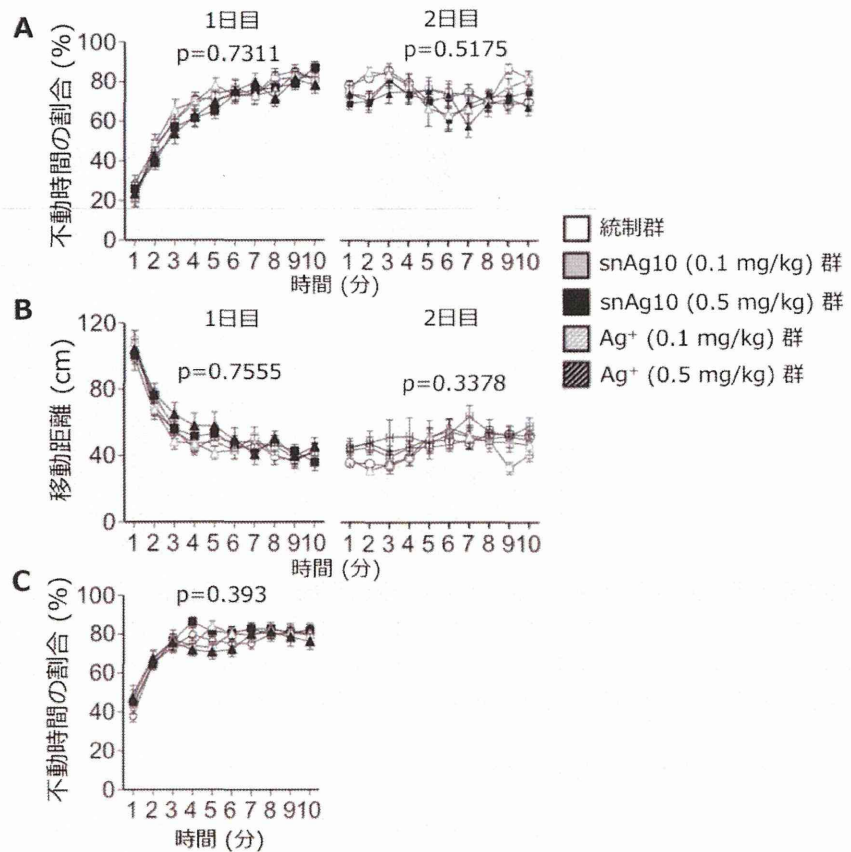


図10. ポーソルト強制水泳テストおよび尾懸垂テストによるうつ様行動の評価。 BALB/c系の授乳中マウスに産後3週間にわたってサブナノ銀あるいは銀イオンを経口摂取させた（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）。その母親マウスに養育された雄の子の成体時のポーソルト強制水泳テストにおける(A)不動時間の割合および(B)移動距離、尾懸垂テストでの(C)不動時間の割合を算出した(各群、n=16-20)。

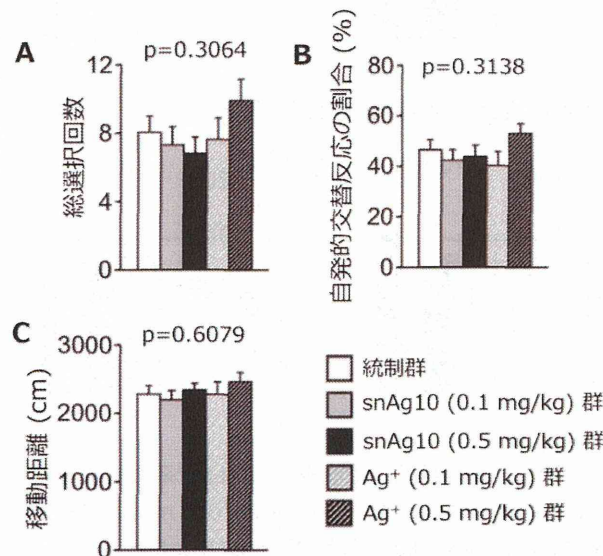


図11. Y字迷路テストによる作業記憶・固執傾向の評価。 BALB/c系の授乳中マウスに産後3週間にわたってサブナノ銀あるいは銀イオンを経口摂取させた（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）。その母親マウスに養育された雄の子の成体時のY字迷路テストにおける(A)総選択回数、(B)自発的交替反応の割合、(C)移動距離を測定した(各群、n=16-20)。

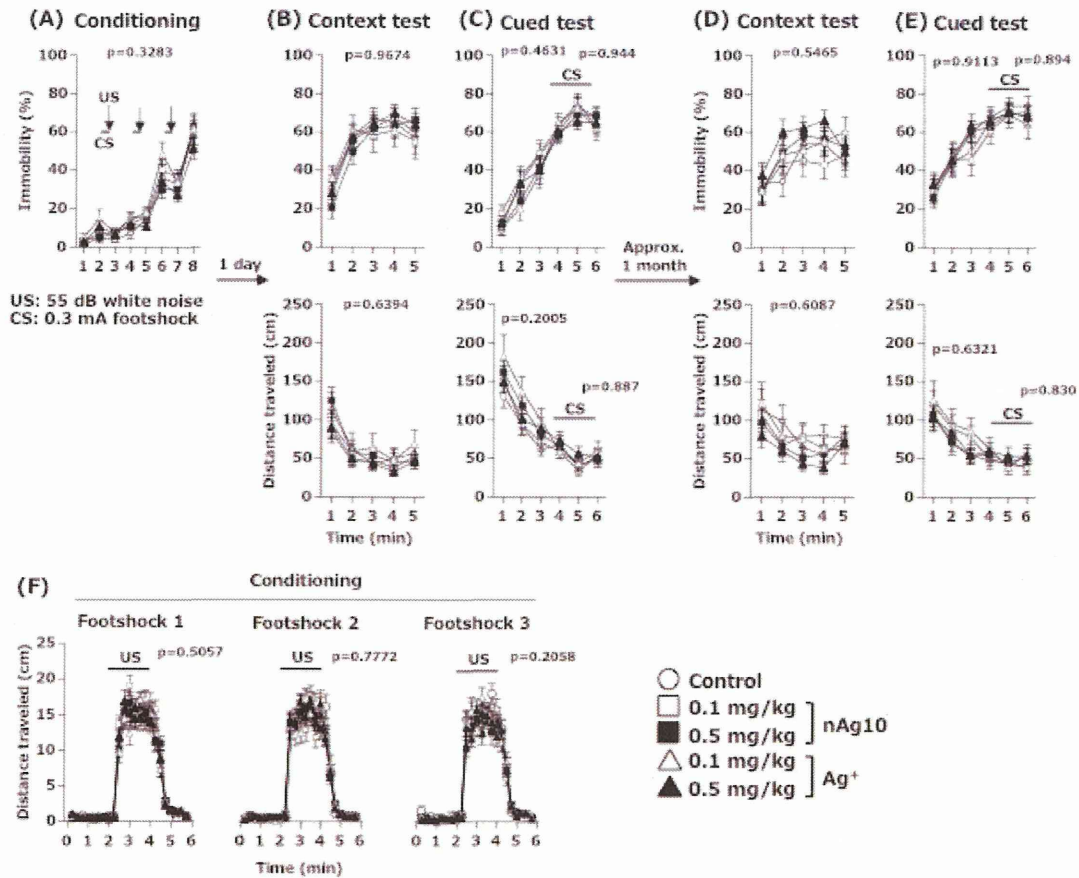


図12. 母乳を介したサブナノ銀あるいは銀イオン曝露の記憶への影響。 サブナノ銀あるいは銀イオンをBALB/c系の授乳中マウスに経口投与し、母乳を介して仔マウスに曝露し、その後、恐怖条件づけテストを行った。

(A) 恐怖条件づけ：マウスを四角箱に入れた後、条件刺激（ホワイトノイズ、55dB）と無条件刺激（電気ショック、0.3mA、2秒間）を対呈示し、それらの刺激に対する恐怖記憶を形成させた。(B) 文脈記憶テスト：24時間後に四角箱に入れ、すくみ反応を指標に文脈記憶を評価した。(C) 手がかり記憶テスト：三角箱に入れて条件刺激を呈示し、すくみ反応を指標に手がかり記憶を評価した。(D-E) 保持テスト：1ヶ月後に文脈記憶・手がかり記憶テストを再実施し、恐怖記憶の保持の程度を評価した。(F) 痛覚感受性の評価：電気ショック負荷中の移動活動量を元に痛覚感受性を評価した。

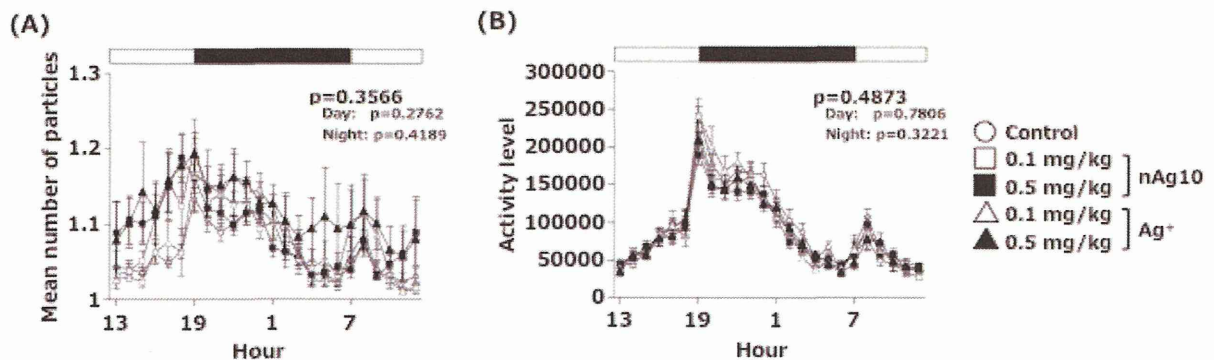


図13. 母乳を介したサブナノ銀あるいは銀イオン曝露のホームケージ内社会的行動への影響。 サブナノ銀あるいは銀イオンをBALB/c系の授乳中マウスに経口投与し、母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオンに曝露された仔マウスの成長後のホームケージ内社会的行動を評価した。同群の2匹をペアにしてホームケージの中に入れ、24時間にわたり連続1週間行動をモニタリングした。図は最終3日間のデータを平均したものである。(A) 社会的行動：2個体が接触している場合は「1」、接触していない場合は「2」と評定した。(B) 移動活動量：2個体の活動量を測定した。

ナノ銀およびナノ白金を用いた角質バリア除去後のラットにおける 24 時間経皮投与毒性に関する研究

研究分担者 桑形 麻樹子 一財 食品薬品安全センター秦野研究所 病理学研究室

研究要旨

これまでに我々は各種ナノ素材（フラーレン、カーボンナノチューブ、白金、銀）の 28 日間反復経皮曝露によるラットの生体への影響を評価してきた。1 および 20nm ナノ白金は貼付部位に皮膚病変（痂皮、潰瘍）が認められ、ICP-MS 分析により皮膚以外に生体内にも 1nm ナノ白金の移行が確認された。その他のナノ粒子では、貼付部位の皮膚以外はいずれのナノ粒子も生体内組織では検出限界以下（0.05ppm 以下）であった。なお、一般毒性学的な影響は認められないことを明らかにしている。

今期は、表面をクエン酸修飾したナノ銀（1 mg/mL）、あるいはナノ白金を 24 時間連続貼付し、皮膚内動態を詳細に検討した。また、体表皮脂や毛組織の密度がナノ素材の皮膚透過に影響を及ぼすかを、2 系統のラット（SD 系ラットおよびヘアレスラット）を用いて比較した。さらに、角質バリアを変化させ、これらのナノ粒子の皮膚透過性について検討した。その結果、SD およびヘアレスラットともに 5 および 10nm 径ナノ銀（1 mg/mL）は皮膚に残留していたが、血液中は検出限界以下であった。アルコールにより背部皮膚を清拭したが、体表皮脂の存在は皮膚中のナノ銀含有量に影響を及ぼさなかった。

皮膚表面バリアをテープストリッピング（TP）あるいはアセトン清拭（AC）により変化させた後に、表面クエン酸修飾 5nm ナノ銀（1 mg/mL）を 24 時間連続貼付し、ナノ銀の生体内動態（皮膚、肝臓、血液）を投与翌日（1 日）、2 日、5 日に ICP-MS 分析により検討した。その結果、皮膚バリアを破壊しても、ナノ銀は皮膚にのみ検出され、血液および肝臓中は検出限界以下であった。しかし、陽性対照として設置した銀イオン群では、TP 処理により皮膚以外に肝臓に僅かであるが銀が確認された。

TP 処理後に、表面クエン酸修飾 5 nm ナノ白金（1 mg/mL）を 24 時間連続貼付し、ナノ白金の生体内動態（皮膚、肝臓、血液）を投与翌日に ICP-MS 分析により検討した結果、ナノ白金は皮膚にのみ検出され、血液および肝臓中は検出限界以下であった。透過型電子顕微鏡による貼付皮膚部位の観察から、白金粒子は皮膚の角質最上層に限局していた。さらに、樹状細胞の活性化を示唆する微細形態像が白金投与群で確認された。

なお、ナノ銀あるいはナノ白金の 24 時間経皮投与により、一般状態、体重推移、器官重量、血液学検査、血液生化学検査、病理組織学検査には急性変化は認められなかった。

以上の結果から、体表皮脂や毛組織の密度は 5nm ナノ銀の皮膚透過性には影響を及ぼさないことが明らかになった。また、皮膚バリアを破壊しても 5nm ナノ銀および 5nm ナノ白金は生体内には移行しないことが確認された。しかし、イオン化したナノ銀は皮膚バリアが正常ではない場合に皮膚を透過し生体内に分布する可能性が示唆されたことから、ナノ粒子のイオン化は皮膚透過性を考

える際には留意する必要があると考えられた。また、ナノ白金と皮膚免疫応答との関連についてはさらなる検討が必要と考えられた。

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、経皮投与によるナノマテリアルの皮膚透過性および生体内分布を確認するために、24 時間経皮暴露による皮膚透過性および全身への影響を調べた。1 年目(平成 25 年度)は粒径の異なる 2 種のナノ銀について、2 年目(平成 26 年度)は皮膚バリアが破壊された時のナノ銀について、3 年目(平成 27 年)はナノ白金を用いて実施した。

B. 研究方法

1. 被験物質および投与方法

ナノ粒子はいずれも nanoComposix 社から購入した。ナノ銀およびナノ白金の投与量は、入手検体をそのまま用いて 1 mg/mL とした。被験物質は投与直前まで 4℃にて保管し、ポルテック ミキサー (KMC-1300V、Vision Scientific.Co.LTD.) で 30 秒攪拌した後、直ちに投与に用いた。

平成 25 年度および 26 年度

5nm 径(Citrate Biopure™ Silver、1 mg/mL、Lot no. MGM2185) および 10 nm 径 (Citrate Biopure™ Silver、1 mg/mL、Lot no. MGM1300) のクエン酸表面修飾したナノ素材の銀を用いた。

対照群として被験物質の溶媒である 2 mM クエン酸水を、陽性対照群として銀イオン液 (0.1M 硝酸銀溶液を日局注射用水で希釈して、銀イオン濃度として 1 mg/mL に調製) を設定した。

平成 27 年度

5 nm 径 (Citrate Biopure™ Platinum、1 mg/mL、Lot no. DAG2419、 4.6 ± 0.8 nm) のクエン酸表面修飾したナノ素材の白金を用いた (H27 図 1)。また、対照群として被験物質の溶媒である 2 mM クエン酸水を設定した。

3. 投与方法

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)。テガダーム(非吸収性フィルム)に 3x3 cm のリント布を置き、リント布上に被験物質を滴下(2 mL/kg 体重)した後、皮膚にリント布およびテガダームを貼付し、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および伸縮性粘着包帯を巻き、固定した。

いずれの試験も投与時間は 24 時間とした。投与日の朝に背部処理を行った後に体重を測定し、体重値を基に投与液量を算出して午後から投与した。

なお、これまでの背部処理(バリカンによる剪毛)に加え、アルコールによる皮膚油脂の除去、テープストリッピング(TP)法あるいはアセトン(AC)処理による皮膚バリアを破壊する処理を施した。

各年度の投与量および群構成は、H25 図 1、H26 図 1、H27 図 2 に示す。

2. 投与部位の皮膚前処理

平成 25 年度

背部をバリカンにて剪毛した。

一部の動物は、さらに 70%アルコールにより背部皮脂を除去、あるいは粘着性伸縮包帯にて 20 回貼付部位をタップして角質を除去する処理を行った。

平成 26 年度

前年度よりも、皮膚バリアをより重篤に破断させるために、セロハンテープによるテープストリッピング(TP)およびアセトンによる皮脂除去(AC)を行った。即ち、バリカンおよびシェイバーにて背部皮膚を剃毛し、セロハンテープにて 20 回、背部皮膚表面を剥離させる処理(TP)を投与直前に 1 回実施した TP 処理、あるいは剃毛後にアセトン清拭を 1 日 1 回、連続 4 日間実施

した AC 処理を行った。

平成 27 年度

TP 法を用いて皮膚バリアを変化させた。

4. 動物および飼育条件

動物は 6 週齢の雄 SD 系ラット (CrI:CD(SD)SPF) を購入し、温度 (21.0~25.0℃) 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、日本クリア) および水道水を自由に摂取させた。約 1 週間の検疫・馴化期間の後、検疫終了時の体重を基に 3 群に群分けした。投与開始週齢は 7 週齢である。

5. 観察

平成 25 年度

動物は 24 時間の投与終了後に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部側のみ包帯を切除し、腹部後大静脈から採血した。採血後、貼付部位を露出させ、蒸留水で湿らせたキムタオル、続いて乾いたキムタオルにて貼付部位を拭きとった。その後、主要な器官、組織の肉眼的観察を実施し、貼付部位皮膚は、病理組織学検査および ICP-MS 分析用にそれぞれ保存した。対照群を除く各群 2 例について、ICP-MS 分析を実施し血液および皮膚中の銀の存在を確認した。なお、一部の動物については投与後のリント布、キムタオル中銀濃度についても分析した。皮膚について、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。

体表皮脂や毛組織の密度がナノ素材の物質透過に影響を及ぼすのかを、毛組織が密な SD 系ラットと疎である HL ラットを用いて比較した。

(1) 体表皮脂による被験物質の透過性の影響を検討するために、両系の対照群、5 nm Ag および Ag+群を用いて、投与前に 70%アルコールにて貼付部位を清拭する動物 (各 2 例) を設けた。また、(2) 表皮 (角質層) に残存する被験物質の割

合を検討するために、HL ラットの対照群、5 nm Ag 群および Ag+群を用いて、貼付前にテープ (粘着性伸縮包帯) にて 20 回貼付部位をタップして角質を除去する動物 (各 2 例) を設けた。群構成は H25 図 1 に示した。

平成 26 年度

TP 処理群および AC 処理群の実験スケジュールは H26 図 1 に示した。

体重測定を行うとともに、TP 処理群ではナノ銀暴露後、経時的に解剖をして、皮膚、肝臓、血液を採取し、組織中銀測定、病理組織学検査および血液生化学検査を実施した。また、投与 5 日の解剖前日に絶食を施し、器官重量、血液学および血液生化学検査も併せて行った。AC 処理群では、24 時間の投与終了後 (投与 2 日) に剖検し、組織中の銀測定および病理組織学検査を行った。

平成 27 年度

ナノ白金暴露後、24 時間後に解剖をして、皮膚、肝臓、血液を採取し、組織中白金測定、病理組織学検査を実施した。また、皮膚の一部を透過型電子顕微鏡にて精査した。また、体重および主要臓器の器官重量も測定した。

なお、リント布、組織中の銀あるいは白金測定は ICP-MS 分析にて確認した (検出限界 0.05 ppm、日本食品分析センターにて実施)。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

(平成 25 年度)

1. 皮膚の病理組織学的検査

SD 系ラットと HL ラットの正常皮膚組織像を H25 図 2 に示す。特徴として、毛根数は SD 系ラットの方が多く、表皮の厚さは HL ラットの方が厚い。また、HL ラットでは毛包の嚢胞や毛漏斗部の膿瘍がみられる。これらの正常像の特徴を留意して皮膚変化の評価をする必要がある。

24 時間貼付後の背部皮膚肉眼写真（各群代表例）を **H25 図 3** に示した。いずれの群の貼付皮膚部位にはナノ銀および Ag+ の 24 時間貼付による肉眼的変化はみられなかった。

病理組織学検査 (**H25 図 4**) および組織写真 (各群代表例、**H25 図 5**) の結果を示した。SD 系ラットにはいずれの群にも変化はみられなかった。HL ラットでは、表皮に嚢胞が対照群を含む全ての動物にみられ、そのうち対照群の 1 例および Ag+ 群の 2 例には鉍質沈着を伴っていた。また、表皮の過形成を伴った毛漏斗部の膿瘍が対照群の 1/2 例、5 nm Ag 群に 3/5 例、Ag+ 群に 2/5 例観察されたが対照群との間に程度の差はなく、ナノ銀および Ag+ 貼付による病理組織学的変化は観察されなかった。

2. 組織中銀濃度 (ICP-MS 分析)

(1) 70%アルコールによる皮脂除去の影響

貼付前に 70%アルコールにより皮脂を除去してナノ銀を貼付した皮膚および未処理にて貼付した皮膚間には、皮膚に残留しているナノ銀に差はなかった (**H25 図 6**)。また、血液中のナノ銀量はいずれの群も検出限界 (0.05 ppm) 以下であった。すなわち、アルコール前処理による皮脂除去によりナノ銀の皮膚内含量には差はなかった。また、いずれの群にも血液中のナノ銀含量は検出限界以下であった。

(2) タッピングによる角質除去の影響

貼付後にテープ (伸縮性包帯) を用いて 20 回皮膚表面を剥離した組織像を **H25 図 7** に示した。組織学的に顕著な差はなかった。

ICP-MS 分析の結果 (**H25 図 8**)、タップテープにもナノ銀は検出されたが、角質除去をした皮膚および未処理の皮膚間にはナノ銀の分布に差はなかった。また、いずれの群にも血液中のナノ銀含量は検出限界以下であった。

本条件では角質剥離は不十分であると考えられた。より粘着度の強いテープの使用、回数が増加等、角質除去には手法検討の必要性が残された。

3. その他

今回、SD 系ラットに加え HL ラットを用いて、皮膚および血液サンプル以外に貼付に用いたリント布、余分なナノ銀を清拭した際に用いたキムワイプ、角質除去に用いたテープ中の銀含量を ICP-MS 分析にて解析し、皮膚内動態の検討を試みた。

HL ラットは遺伝性の皮膚形態学的変化 (嚢胞など) がみられることから、ナノ銀の皮膚含量に個体差が生じた。また、今回実施したテープによる角質除去は十分ではなく、ナノ銀が表皮に残留しているのか否かの評価はできなかった。

貼付に用いたリント布、余分なナノ銀を清拭した際に用いたキムワイプ中の銀含量を分析することにより皮膚内動態評価を予備的に試みたが、個体差が大きく、有用な結果は得られなかった。

(平成 26 年度)

1. 皮膚バリア破壊による皮膚の変化

TP 処理および AC 処理直後の皮膚変化を **H26 図 2** に示す。TP 処理により、角質層はほぼ除去され、角化細胞の変性も観察された。AC 処理により、表皮は軽度に肥厚したが角質層は菲薄化し、ケラトヒアリン顆粒は減少、細胞核を失わない不完全角化 (錯角化) が観察された。

TP 処理と AC 処理を病理組織学的に比較すると、AC 処理の皮膚変化の方が、TP 処理と比較して軽度であった。

また、前年度に実施したアルコール処理あるいは伸縮性包帯によるタッピング処理よりも、今年度実施した AC あるいは TP 処理の方が、確実に皮膚バリアを破壊させていると考えられた。

2. 皮膚バリア破壊によるナノ銀の皮膚への影響

(1) TP 処理

TP 処理後にナノ銀あるいは Ag+ を 24 時間貼付後 (投与 2 日)、投与 3 日、投与 5 日の背部皮膚肉眼写真 (各群代表例) を **H26 図 3** に示した。

投与2および3日にはナノ銀投与群にはTP処理の有無に関係なく皮膚の黒色化が観察された。投与5日には、いずれの群の貼付皮膚部位に肉眼的変化に差はみられなかった。

TP処理後のナノ銀投与皮膚病理学検査（H26 図7）および組織写真（各群代表例、H26 図4）を示した。投与2および3日では、TP処理により、表皮ではケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化、痂皮、表皮の肥厚、細胞間の水腫が軽度であるが観察された。真皮では炎症細胞浸潤、線維芽細胞の増生、出血がごく軽度であるが観察された。また、ナノ銀および銀イオン投与により、表皮表面に褐色色素の付着がみられた。投与5日では、TP処理による変化はほぼ回復し、褐色色素の付着もみられなかった。各群間の回復性に差は認められなかった。

(2) AC処理

AC処理後にナノ銀あるいはAg+を24時間貼付後(投与2日)の背部皮膚肉眼写真(各群代表例)をH26 図5に示した。AC処理後のナノ銀投与皮膚病理学検査(H26 図8)および組織写真(各群代表例、H26 図6)を示した。

投与2日の銀イオン投与群の皮膚で皮膚の黒色化が肉眼的に観察された。

組織学的には褐色色素の付着がナノ銀および銀イオン投与群でみられた。また、全投与群でケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化がみられたが、限局的であり、群間にも差はなかった。

3. 組織中銀濃度 (ICP-MS 分析)

皮膚、肝臓および血液中の銀濃度をH26 図9に示した。

皮膚では対照群を除くすべての群で銀が検出された。肝臓では、TP処理をした銀イオン投与群のみで銀が検出された。血液ではいずれの投与群においても検出限界(0.05 ppm)以下であった。また、TP処理群で投与2日と5日を比較すると、いずれの投与群も投与2日よりも投与5日のほうが銀濃度は低値を示した。

4. 皮膚バリア破壊下でのナノ銀暴露による全身毒性

(1) 体重推移(H26 図10)

TPおよびAC処理群ともに24時間にあたる閉塞貼付により、対照群を含む全ての群において体重が減少した。しかし、体重の減少の程度に群間に差はなく、解剖時での体重値にも群間に差はなかった。

(2) 血液学検査 (TP処理群、投与5日)

TP処理群の投与5日に実施した血液学検査の結果をH26 図11に示した。TP処理したナノ銀投与群および銀イオン投与群のMCVおよびMCHが高値を示したが、その変化は僅かであること、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値には差はないことから、ナノ銀あるいは銀イオン投与による変化ではないと判断した。

(3) 血液生化学検査 (TP処理群)

TP処理群の投与2日、3日および5日に実施した血液生化学検査の結果をH26 図12に示した。投与2および3日にはナノ銀あるいは銀イオン投与による影響は認められなかった。投与5日では銀イオン投与群においてグルコース濃度の有意な減少がみられた。しかし、体重推移、肝臓の病理組織学検査に対照群との間に差はなかった。本実験では、銀の試料汚染を防ぐために銀イオン群の解剖が最後になったことから、対照群の解剖実施時間との差が2時間あった。したがって、銀イオンによる影響ではなく、絶食時間の差に起因した変化と推察された。

(4) 血液生化学検査 (AC処理群)

AC処理群の投与2日に実施した血液生化学検査の結果をH26 図13に示した。ナノ銀および銀イオン投与群においてグルコース濃度が減少したが、その程度は僅かであり、病理組織学検査において肝臓に投与による変化は認められなかったことから、ナノ銀および銀イオンによる変化ではないと判断した。

(5) 器官重量 (TP処理群)

TP 処理群の投与 2 日、投与 3 日、投与 5 日に実施した解剖時の器官重量を **H26 図 14** に示した。投与 2 および 3 日の肝臓重量にはナノ銀あるいは銀イオン投与による影響は認められなかった。投与 5 日の腎臓比体重値がナノ銀および銀イオン群で有意に低値を示したが、病理学組織学検査には変化はなく、血液生化学検査においても腎障害を示唆する変化は認められていないことから、ナノ銀あるいは銀イオン投与による影響ではなく、解剖時体重のわずかな高値に起因した変化と考えられた。

(6) 器官重量 (AC 処理群)

AC 処理群の投与 2 日に実施した解剖時の器官重量を **H26 図 15** に示した。AC 処理群では肝臓重量にナノ銀あるいは銀イオン投与による影響はなかった。

(7) 病理組織学検査 (TP 処理群)

TP 処理群の投与 2 日、投与 3 日、投与 5 日に実施した病理組織学検査の結果を **H26 図 16** に示した。肝臓、腎臓、脾臓、副腎にはナノ銀あるいは銀イオン投与による変化はなかった。

(8) 病理組織学検査 (AC 処理群)

AC 処理群の投与 2 日に実施した肝臓の病理組織学検査では変化はなかった(**H26 図 17**)。

(平成 27 年度)

1. TP 処理による皮膚の変化

昨年度までの検討により、TP 処理直後の皮膚の病理組織学変化では、角質層はほぼ除去され、角化細胞の変性が確認されている。

2. TP 処理によるナノ白金の皮膚への影響

TP 処理後にナノ白金を 24 時間貼付後(投与 2 日)の背部皮膚肉眼写真(各群代表例)を **H27 図 3** に示した。投与 2 日のナノ白金投与群では皮膚の黒色化が観察され、TP 処理群でより顕著であった。それ以外にいずれの群の貼付皮膚部位に肉眼的変化は認められなかった。

TP 処理後のナノ白金投与皮膚病理組織学検査(**H27 図 4**) および組織写真(各群代表例、**H27**

図 5) を示した。

ナノ白金投与により、表皮表面に黒色色素の付着がみられ、TP 処理群ではその程度および頻度が増強した。

TP 処理をした対照群およびナノ白金投与群では、表皮にケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化、痂皮、表皮の肥厚、細胞間の水腫および炎症細胞浸潤が観察された。真皮では炎症細胞浸潤、線維芽細胞の増生、出血が観察された。しかし、これらの所見の程度および頻度には両群間に差はなかった。

TP 未処理のナノ白金投与群では、表皮表面に黒色色素の付着以外に表皮および真皮に病理組織学的変化はみられなかった。

3. 組織中白金濃度 (ICP-MS 分析)

皮膚、肝臓および血液中の白金濃度を **H27 図 6** に示した。白金はナノ白金を投与した皮膚でのみ検出され、TP 処理により多くなる傾向が認められた。肝臓および血液では検出限界 (0.05 ppm) 以下であった。なお、対照群ではいずれの組織においても検出限界以下であった。

4. ナノ白金粒子の皮膚局在(透過型電子顕微鏡観察)

透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により、TP 処理後の皮膚組織内におけるナノ白金粒子の局在を調べた (**H27 図 7**)。なお、ナノ粒子と生体内粒子を区別するために、0.1M リン酸緩衝 2%パラホルムアルデヒド・1.25%グルタルアルデヒド固定液に浸漬固定後、四酸化オスミウムによる後固定をせずにエポキシ系樹脂による樹脂包埋標本作製した。

その結果、ナノ白金粒子は角質最表層において 1 μ m 程度の深さまで観察されたが、それより深層では認められなかった。

5. 皮膚バリア破壊下での 24 時間ナノ白金経皮暴露による全身毒性

(1) 体重推移(H27 図 8)

24 時間にわたる閉塞貼付により、対照群を含む全ての群において体重が減少した。しかし、体重の減少の程度に群間に差はなかった。

(2) 器官重量(H27 図 9)

肝臓、腎臓、脾臓、副腎重量には、対照群と比較して、ナノ白金投与による影響は認められなかった。5nPt(TP+)群と 5nPt(TP-)群との間で比較すると、肝臓および副腎重量の減少が TP 処理群で観察されたが、病理組織学的検査では TP 処理あるいはナノ白金投与による影響は認められなかった。

(3) 病理組織学検査(H27 図 10)

肝臓、腎臓、脾臓、副腎の病理組織学検査の結果、ナノ白金投与による変化はなかった。

6. ナノ白金経皮暴露による皮膚免疫応答(TEM 観察)

これまでに実施した 28 日反復ナノ白金経皮毒性試験による結果から、皮膚病変が投与 2 週から発現し、LLNA 試験から弱い刺激性もあるが感作性もあることが示唆されたことから、ナノ白金の皮膚免疫応答系への関与を微細形態学的に検討した。その結果、ナノ白金投与群では、TP 処理に関わらず、表皮角質層の樹状細胞では、細胞突起を伸長しているランゲルハンス細胞が多くみられ、バーベック顆粒が豊富な細胞も多く、ランゲルハンス細胞が活性化している像がみられた(H27 図 11)。

E. 結論

(平成 25 年度)

本条件下では、5 nm および 10 nm のクエン酸表面修飾系のナノ銀 (100 mg/mL) の 24 時間経皮投与により、ナノ銀は生体内にはほとんど浸透せず (検出限界以下)、皮膚に残留していることが明らかになった。

(平成 26 年度)

皮膚バリアを破壊した本条件下では、5 nm のクエン酸表面修飾系のナノ銀 (100 mg/mL) の 24 時間経皮投与により、ナノ銀は生体内にはほとんど浸透せず (検出限界以下)、皮膚に残留していることが明らかになった。しかし、ナノ銀がイオン化した場合には皮膚を通過し、生体内に分布する可能性が示唆されたが、その量は少なく蓄積性はなく、急性毒性も誘発しないと考えられた。

(平成 27 年度)

皮膚バリアを TP 処理により破壊した本条件下では、5 nm のクエン酸表面修飾系のナノ白金 (1 mg/mL) の 24 時間経皮投与により、ナノ白金は皮膚の角質層上層に局限して存在し、生体内にはほとんど浸透しないことが明らかになった。28 日反復経皮投与毒性試験で生体内に観察された白金は、潰瘍などの真皮にまで達する障害から移行したと考えられた。また、ナノ白金と皮膚免疫応答については観察例数を増やし精査を続ける必要があるが、形態観察像からは皮膚応答が活性化していることが示唆された。また、急性毒性は誘発しないと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

【総説・その他】

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】

第 31 回日本毒性病理学会総会および学術集会 (2015.01.東京)

第 32 回日本毒性病理学会総会および学術集会 (2016.01.高松)

【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

齊藤義明、熊谷文明（一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所）

(1) SD系ラット

群	投与物質	投与量 (mg/mL)	動物数	オプション
1 (対照群)	クエン酸水	0	3	アルコール 前処理
2	5nmAg	1	4	
3	10nmAg	1	4	
4	Ag+	1	4	

(2) HLラット

群	投与物質	投与量 (mg/mL)	動物数	オプション
5 (対照群)	クエン酸水	0	2	アルコール 前処理 タッピング
6	5nmAg	1	5	
7	Ag+	1	5	

H25 図 1. 被験物質および投与量

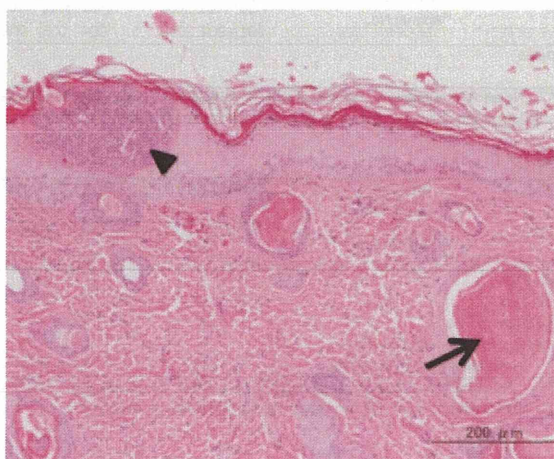
SD ラットにてアルコール前処理は各群 2 例の動物を配した。

HL ラットでは、アルコール前処理をする動物は 6 および 7 群で各 1 例、タッピング処理は 5 群で 1 例、6 および 7 群で各 2 例の動物を配した。

(1) SD系ラット



(2) HLラット

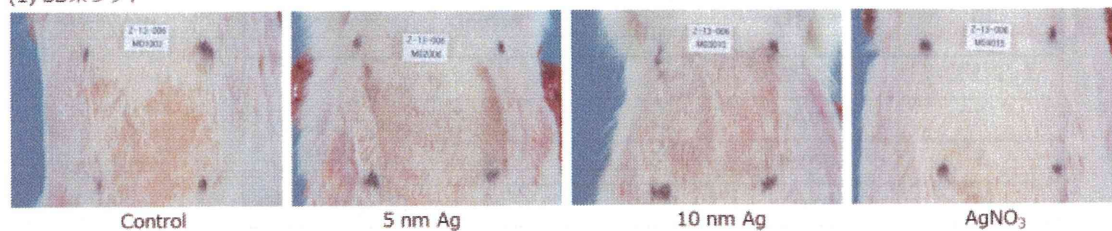


H25 図 2. SD 系ラットとヘアレス(HL)ラットの皮膚比較(無処置動物)

毛根数は SD 系ラットの方が多く、表皮の厚さは HL ラットの方が厚い。

また、HL ラットでは、毛包の嚢胞(矢印)や毛漏斗部の膿瘍(矢頭)がみられる。

(1) SD系ラット



(2) HLラット



H25 図 3. ナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付後の貼付部位皮膚

いずれの群にも貼付部位にはナノ銀および銀イオン貼付による肉眼的変化は観察されなかった。

(1) SD系ラット

Group	2 mM Citrate			5 nm Ag 1 mg/mL				10 nm Ag 1 mg/mL				AgNO ₃ 1 mg/mL			
Dose(mL/kg)	2			2				2				2			
Findings	M01	M01	M01	M02	M02	M02	M02	M03	M03	M03	M03	M04	M04	M04	M04
Animal No.	001	002	003	004	005	006	007	008	009	010	011	012	013	014	015

Application site

Notes) - : No abnormal changes ±: Very slight + : Slight 2+: Moderate 3+: Marked
P : Non-graded change NE: Not examined M: Missing A: Autolysis

(2) HLラット

Group	2 mM Citrate		5 nm Ag 1 mg/mL					AgNO ₃ 1 mg/mL				
Dose(mL/kg)	2		2					2				
Findings	M05	M05	M06	M06	M06	M06	M06	M07	M07	M07	M07	M07
Animal No.	016	017	018	019	020	021	022	023	024	025	026	027

Application site

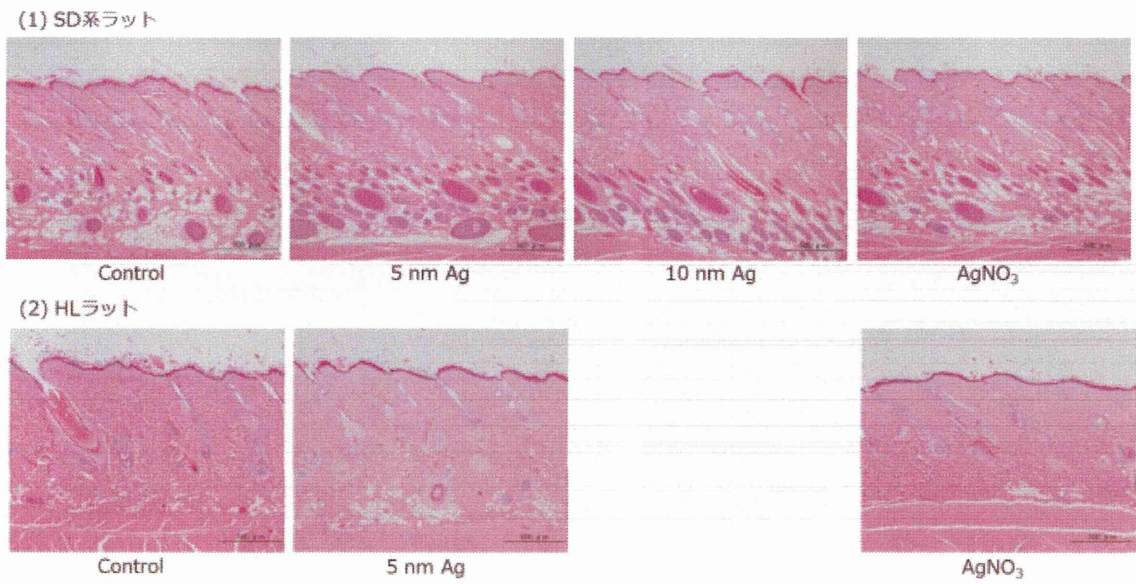
Follicular cyst P P P P P P P P P P P P
Mineralization, follicle - ± - - - - - - - - ± ± -
Microabscess, follicular infundibulum, with epidermal hyperplasia ± - - - ± ± ± ± - - ± -

Notes) - : No abnormal changes ±: Very slight + : Slight 2+: Moderate 3+: Marked
P : Non-graded change NE: Not examined M: Missing A: Autolysis

H25 図 4. 貼付部位皮膚の病理組織学的変化

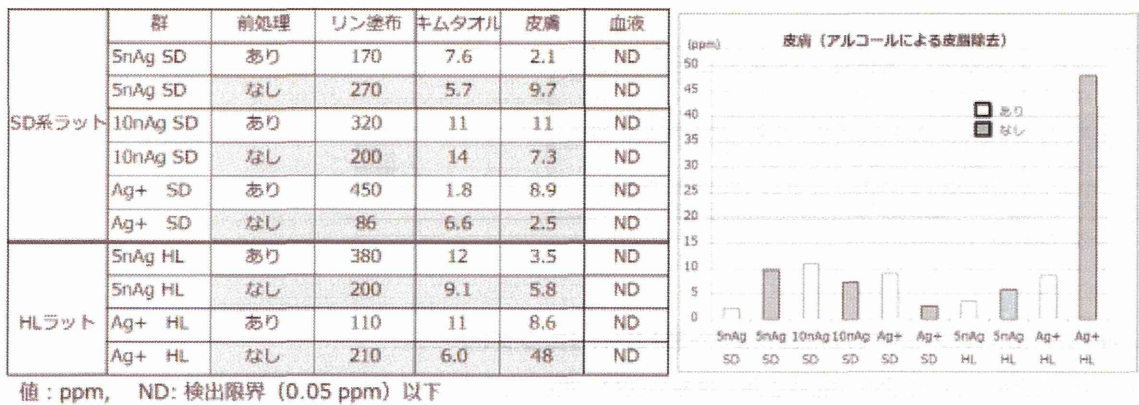
SD 系ラットにはいずれの群にも病理組織学的変化は観察されなかった。

HL ラットでは、表皮に嚢胞が対照群を含む全ての動物にみられ、一部の動物には鉍質沈着が伴っていた。また、表皮の過形成を伴った毛漏斗部の膿瘍が各群に観察された。しかし、対照群との間に程度の差はなかった。



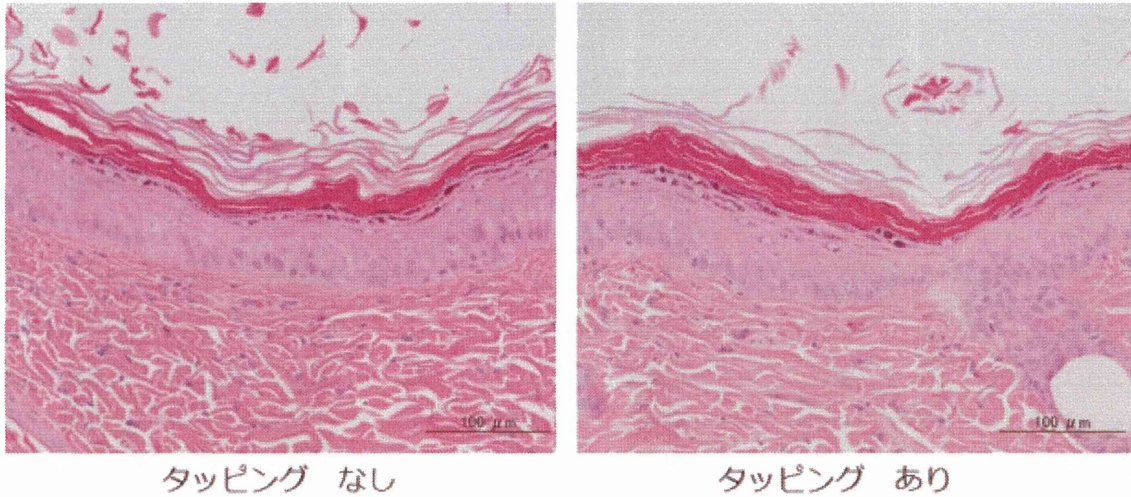
H25 図 5. ナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付後の貼付部位皮膚組織写真

いずれの群の皮膚にもナノ銀および銀イオン貼付による組織学的変化は観察されなかった。



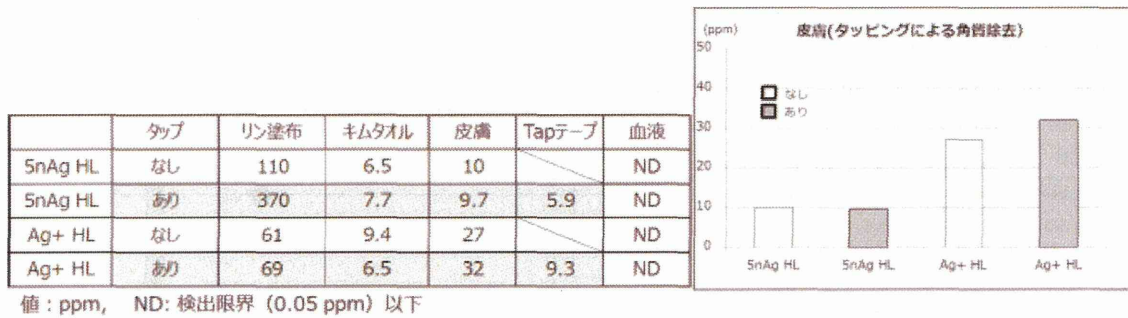
H25 図 6. アルコールによる皮脂除去によるナノ銀含有量の比較(ICP-MS 分析)

アルコール前処理の有無により皮膚中 Ag 含有量には差はなく、粒子の大きさにも皮膚残存性に顕著な差はなかった。HL ラットでは値のばらつきが大きかったが、皮膚構造（スポットの存在）に起因した変化と考えられる。いずれの群も血液中の銀含有量は検出限界以下であった。



H25 図 7. タッピングによる角質除去(貼付部位組織写真、HL ラット、対照群)

テープ（伸縮性粘着包帯）を用いて 20 回表皮をタッピング（剥離）したが、組織学的には顕著な差は認められなかった。



H25 図 8. 角質除去による皮膚銀含有量の比較(ICP-MS 分析、HL ラット)

タッピング処理の有無により、皮膚中 Ag 含有量には差はなかった。

いずれの群も血液中の銀含有量は検出限界以下であった。

(1) TP group

		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
		↑ TP			↑ Fasting	
		24hr exposure				
Number of animals						
Control	TP+	[11]	4	2		5
5 nm Ag	TP+	[11]	4	2		5
	TP-	[7]	2			5
AgNO ₃	TP+	[11]	4	2		5
Autopsy (ICP-MS analysis)			○	○		○
Systemic toxicity evaluation						○

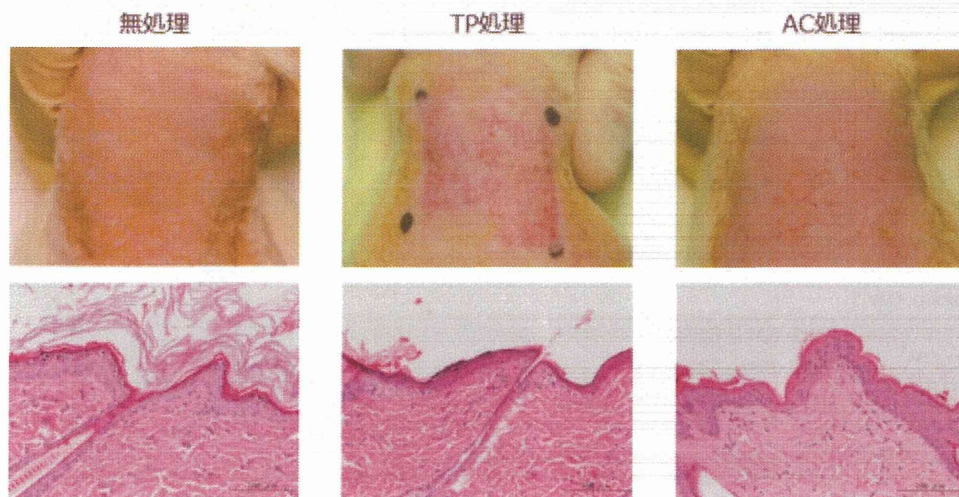
TP: Tape stripping Control: 2 mM citric acid solution
Day 1 = 5 nm Ag exposure day

(2) AC group

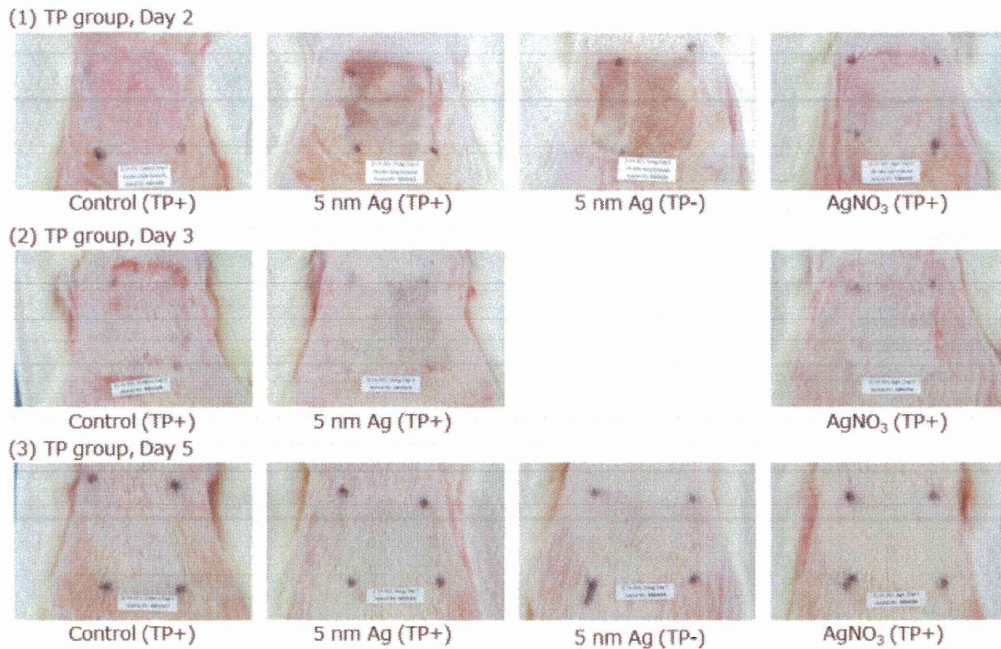
		T1	T2	T3	T4 (Day 1)	Day 2
		↑ AC	↑ AC	↑ AC	↑ AC	
					24hr exposure	
Number of animals						
Control	AC+	[4]				4
5 nm Ag	AC+	[4]				4
AgNO ₃	AC+	[4]				4
Autopsy (ICP-MS analysis)						○

AC: Acetone wiping, Control: 2 mM citric acid solution
T1 - T4: AC treatment days
Day 1 = 5 nm Ag exposure day

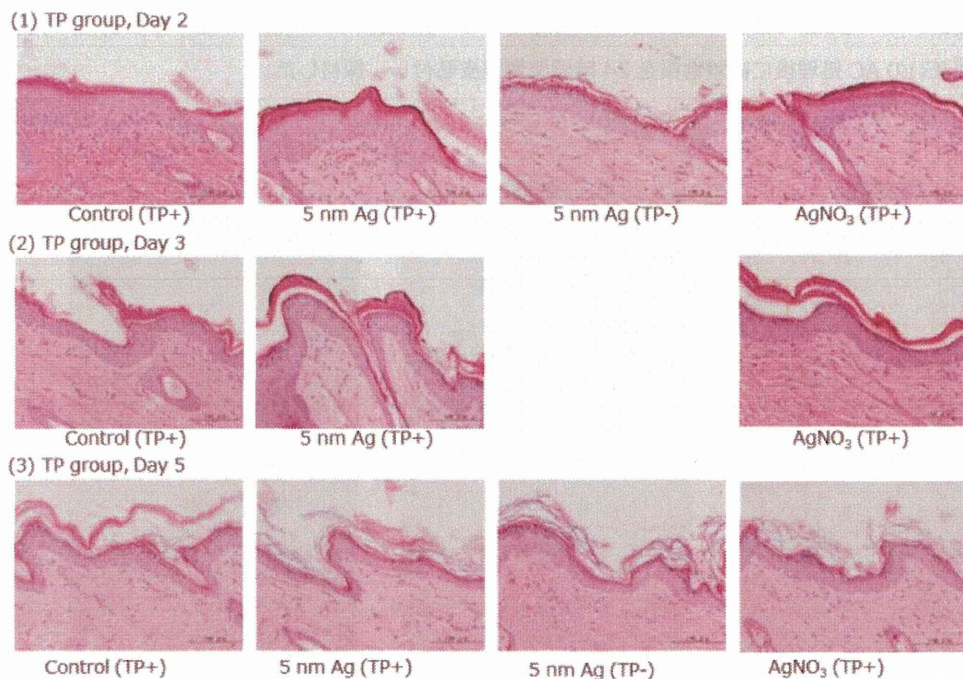
H26 図 1. 試験デザイン. TP 処理群では、TP 処理後に被験物質を 24 時間閉塞経皮貼付し、経時的(Day 2, 3, 5)に採材した。AC 処理群では、4 回(1 回/日)の AC 処理後に被験物質を 24 時間閉塞経皮貼付し、採材した。



H26 図 2. 皮膚バリア除去後(投与直前)の皮膚の肉眼および組織写真。
TP 処理：角質層はほぼ除去され、一部では角化細胞の変性がみられる。
AC 処理：角質層は菲薄化し、一部では錯角化がみられる。



H26 図 3. TP 処理後にナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付した貼付部位皮膚の肉眼写真。 投与 2 日(24 時間貼付後) および 3 日にはナノ銀貼付による皮膚の黒色化がみられたほかは、貼付による肉眼的変化は観察されなかった。TP 処理による変化は時間経過と共に回復する傾向がみられ、投与群間の回復性に差は認められなかった。

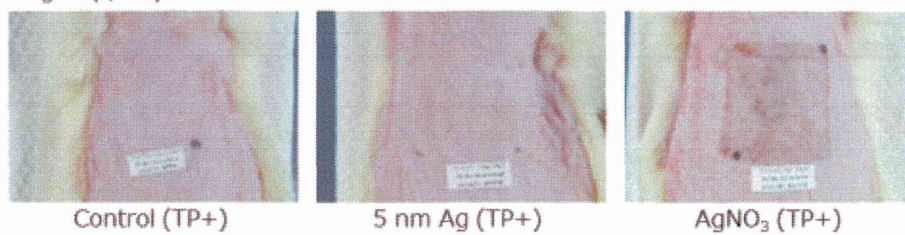


H26 図 4. TP 処理後にナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付した貼付部位皮膚の組織写真。

貼付後 2 日および 3 日(TP+) : ケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化等が全投与群においてみられる。褐色色素の付着がナノ銀および銀イオン投与群においてみられる。

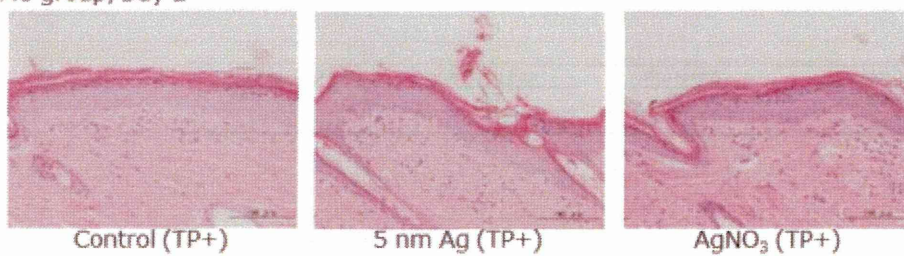
貼付後 5 日 : TP 処理による変化はほぼ回復し、投与群間の回復性に差は認められない。

AC group, Day 2



H26 図 5. AC 処理後にナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付した貼付部位皮膚の肉眼写真。銀イオン投与群において皮膚の黒色化がみられる。

AC group, Day 2



H26 図 6. AC 処理後にナノ銀および銀イオンを 24 時間貼付した貼付部位皮膚の組織写真。褐色色素の付着がナノ銀および銀イオン投与群においてみられる。

(1) TP group, Day 2

Findings	Group Pretreatment Grade	Vehicle control					5 nm Ag (1 mg/mL)					AgNO ₃ (1 mg/mL)									
		TP					TP					TP									
		-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+
Epidermis																					
Parakeratosis		1	1	2	0	0	0	1	3	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	0	0
Decrease, keratohyaline granule		1	0	1	2	0	0	1	1	2	0	2	0	0	0	0	0	1	1	2	0
Attachment, brown pigment		4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	**	1	1	0	0	1	3	0	0	0
Crust, focal		1	2	1	0	0	1	2	1	0	0	2	0	0	0	0	0	2	1	1	0
Thickening		0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	2	0	0	0	0	1	3	0	0	0
Edema, intercellular		1	3	0	0	0	1	3	0	0	0	2	0	0	0	0	1	3	0	0	0
Dermis																					
Cellular infiltration, inflammatory		1	3	0	0	0	1	2	1	0	0	2	0	0	0	0	1	1	2	0	0
Proliferation, fibroblast		0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0	0	0
Hemorrhage		3	1	0	0	0	2	2	0	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0

Notes) -: No abnormal changes =: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked
 Numerals represent the number of animals.
 *P<0.01: Significantly different from control (Mann-Whitney U test).
 #P<0.05: Significantly different from control (Fisher's exact test).
 Vehicle control: 2 mM citric acid solution
 TP: Tape stripping

(2) TP group, Day 3

Findings	Group Pretreatment Grade	Vehicle control					5 nm Ag (1 mg/mL)					AgNO ₃ (1 mg/mL)				
		TP					TP					TP				
		-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+
Epidermis																
Parakeratosis		0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	2	0	0
Decrease, keratohyaline granule		1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
Attachment, brown pigment		2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0
Crust, focal		0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0
Thickening		0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0
Dermis																
Cellular infiltration, inflammatory		1	1	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Proliferation, fibroblast		0	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	0	0

Notes) -: No abnormal changes =: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked
 Numerals represent the number of animals.
 Not significantly different from control.
 Vehicle control: 2 mM citric acid solution
 TP: Tape stripping

(3) TP group, Day 5

Findings	Group Pretreatment Grade	Vehicle control					5 nm Ag (1 mg/mL)					AgNO ₃ (1 mg/mL)									
		TP					TP					TP									
		-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+
Epidermis																					
Parakeratosis, focal		1	4	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	#	2	3	0	0
Decrease, keratohyaline granule, focal		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0
Crust, focal		2	3	0	0	0	4	1	0	0	0	4	1	0	0	0	4	1	0	0	0
Thickening, focal		3	2	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	4	1	0	0	0
Dermis																					
Cellular infiltration, inflammatory, focal		4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Proliferation, fibroblast, focal		4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	3	2	0	0	0

Notes) -: No abnormal changes =: Very slight +: Slight 2+: Moderate 3+: Marked
 Numerals represent the number of animals.
 #P<0.05: Significantly different from control (Fisher's exact test).
 Vehicle control: 2 mM citric acid solution
 TP: Tape stripping

H26 図 7. TP 処理群の貼付部位皮膚の病理組織学的変化。 貼付後 2 および 3 日では、ケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化等が全投与群においてみられた。その他、褐色色素の付着がナノ銀および銀イオン投与群においてみられた。貼付後 5 日では、錯角化等の TP 処理による変化は限局的となりほぼ回復していた。また、投与群間の回復性に差は認められなかった。