

AC group, Day 2

Findings	Group Pretreatment Grade	Vehicle control					5 nm Ag (1 mg/mL)					AgNO ₃ (1 mg/mL)				
		AC					AC					AC				
		-	±	+	2+	3+	-	±	+	2+	3+	-	±	+	2+	3+
Epidermis																
Parakeratosis, focal		2	2	0	0	0	1	3	0	0	0	1	3	0	0	0
Decrease, keratohyaline granule		3	1	0	0	0	2	2	0	0	0	3	1	0	0	0
Attachment, brown pigment		4	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	4	0	0	0
Crust, focal		3	1	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Thickening		0	4	0	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	0	0
Dermis																
Proliferation, fibroblast, focal		3	1	0	0	0	4	0	0	0	0	4	0	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
 AC: Acetone wiping

H26 図 8. AC 処理群の貼付部位皮膚の病理組織学的変化。 ナノ銀および銀イオン投与群では、褐色色素の付着がみられた。また、全投与群において、ケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化等がみられたが、限局的であり、投与群間に差は認められなかった。

Pretreatment	Group	Skin		Liver		Blood	
		Day 2	Day 5	Day 2	Day 5	Day 2	Day 5
No pretreatment	Vehicle control	<0.05	-	<0.05	-	<0.05	-
	5 nm Ag (1 mg/mL)	9.7	-	<0.05	-	<0.05	-
	AgNO ₃ (1 mg/mL)	2.5	-	<0.05	-	<0.05	-
TP	Vehicle control	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	5 nm Ag (1 mg/mL)	63.0	26.5	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	5 nm Ag (1 mg/mL, TP-)	42.5	14.5	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
	AgNO ₃ (1 mg/mL)	88.0	13.4	0.12	0.07	<0.05	<0.05
AC	Vehicle control	<0.05	-	<0.05	-	<0.05	-
	5 nm Ag (1 mg/mL)	97.5	-	<0.05	-	<0.05	-
	AgNO ₃ (1 mg/mL)	25.0	-	<0.05	-	<0.05	-

Each value shows mean (ppm).
 The lower limits of Ag detection : 0.05 ppm.
 -: Not examined.
 Vehicle control: 2 mM citric acid solution
 TP: Tape stripping, AC: Acetone wiping

H26 図 9. 皮膚バリア除去による組織中の銀含有量(ICP-MS 分析)。 皮膚では溶媒投与群を除く全投与群において銀が検出された。肝臓では TP 処理を施した銀イオン投与群において銀が検出された。血液ではいずれの投与群においても銀の含有は認められなかった。また、TP 処理群に認められた銀の含有量は、いずれの投与群も貼付後 2 日よりも 5 日の方が少なかった。

(1) TP group

Group	Vehicle control		5 nm Ag (1 mg/mL)		AgNO ₃ (1 mg/mL)	
	TP		TP		TP	
Pretreatment	TP		TP		-	
Number of animals	11		11		7	
Exposure day	1	277.3 ± 9.5	279.9 ± 8.6	277.4 ± 9.1	280.0 ± 9.5	
Day after exposure	2	245.7 ± 13.0	253.3 ± 13.5	257.1 ± 4.3	248.7 ± 12.6	
	3	256.5 ± 14.4 (7)	263.3 ± 11.0 (7)	267.9 ± 5.9 (5)	270.0 ± 10.5 (7)	
Fasting →	4					
	5	242.2 ± 9.6 (5)	247.9 ± 11.1 (5)	247.6 ± 4.4 (5)	250.8 ± 9.3 (5)	

Each value shows mean (g) ± S.D.

Not significantly different from control.

Figures in parentheses indicate number of animals.

Vehicle control: 2 mM citric acid solution

TP: Tape stripping

(2) AC group

Group	Vehicle control		5 nm Ag (1 mg/mL)		AgNO ₃ (1 mg/mL)	
	AC		AC		AC	
Pretreatment	AC		AC		AC	
Number of animals	4		4		4	
AC treatment day	1	244.7 ± 2.2	245.9 ± 3.8	243.0 ± 3.7		
	4	263.6 ± 4.8	265.6 ± 8.7	262.2 ± 4.7		
Day after exposure	2	257.1 ± 6.8	261.3 ± 7.7	252.6 ± 8.7		

Each value shows mean (g) ± S.D.

Not significantly different from control.

Figures in parentheses indicate number of animals.

Vehicle control: 2 mM citric acid solution

AC: Acetone wiping

H26 図 10. 体重. TP および AC 処理群とともに溶媒投与群と各投与群の間に有意な差は認められなかった。

TP group, Day5

Group	Vehicle control		5 nm Ag (1 mg/mL)		AgNO ₃ (1 mg/mL)	
	TP		TP		TP	
Pretreatment	TP		TP		-	
Number of animals	5		5		5	
RBC	10000/μL	697 ± 33	678 ± 23	714 ± 32	665 ± 28	
Hemoglobin	g/dL	14.3 ± 0.7	14.8 ± 0.3	15.2 ± 0.6	14.4 ± 0.4	
Hematocrit	%	41.4 ± 1.5	42.9 ± 1.0	43.7 ± 1.9	42.1 ± 1.1	
MCV	fL	59.5 ± 1.8	63.2 ± 1.6 **	61.3 ± 1.2	63.4 ± 1.5 **	
MCH	pg	20.5 ± 0.7	21.8 ± 0.6 **	21.3 ± 0.4	21.7 ± 0.4 **	
MCHC	g/dL	34.4 ± 0.4	34.5 ± 0.4	34.7 ± 0.2	34.2 ± 0.3	
Platelet	10000/μL	134.1 ± 14.0	126.8 ± 16.4	105.6 ± 42.9	116.3 ± 9.4	
WBC	100/μL	116.3 ± 32.3	111.5 ± 24.3	89.8 ± 10.4	88.6 ± 40.0	
Neutrophil	%	10.2 ± 1.5	13.9 ± 8.7	13.9 ± 4.2	10.4 ± 1.5	
Eosinophil	%	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.4	
Basophil	%	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	
Monocyte	%	2.7 ± 0.4	2.6 ± 0.9	2.6 ± 1.1	2.4 ± 0.6	
Lymphocyte	%	86.2 ± 1.8	82.6 ± 9.4	82.7 ± 5.2	86.2 ± 1.9	
Reticulocyte	%	5.42 ± 0.52	5.16 ± 1.22	5.66 ± 0.88	5.39 ± 0.77	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (**: P<0.01).

Vehicle control: 2 mM citric acid solution

TP: Tape stripping

H26 図 11. 血液学検査(TP 処理群, Day 5). TP 処理をしたナノ銀投与群および銀イオン投与群では、平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン量が有意に増加したが、赤血球数、ヘモグロビンおよびヘマトクリット値に有意な差はみられなかった。また、病理組織学検査においても、腎臓および脾臓に異常所見は認められなかった。

(1) TP group, Day 2

Group		Vehicle control		5 nm Ag (1 mg/mL)		AgNO ₃ (1 mg/mL)	
		TP		TP		TP	
Number of animals		4		4	2		4
Total protein	g/dL	5.1 = 0.1		5.1 = 0.4	5.0 = 0.2		5.2 = 0.1
Albumin	g/dL	3.3 = 0.1		3.2 = 0.2	3.2 = 0.1		3.2 = 0.1
A/G		1.76 = 0.05		1.77 = 0.07	1.83 = 0.01		1.64 = 0.08
Glucose	mg/dL	213 = 25		223 = 59	204 = 18		204 = 20
Total cholesterol	mg/dL	58 = 4		63 = 15	71 = 4		59 = 6
Triglyceride	mg/dL	32 = 16		31 = 17	27 = 10		36 = 11
AST	U/L	85 = 13		81 = 27	68 = 11		97 = 20
ALT	U/L	30 = 7		30 = 5	28 = 1		29 = 7
BUN	mg/dL	17 = 3		18 = 2	20 = 2		15 = 1
Creatinine	mg/dL	0.22 = 0.02		0.23 = 0.02	0.23 = 0.02		0.22 = 0.01
ALP	U/L	1253 = 206		1312 = 166	1599 = 260		1218 = 209
Inorganic phosphorus	mg/dL	8.8 = 1.4		9.5 = 1.8	9.3 = 0.2		8.3 = 0.3
Ca	mg/dL	9.9 = 0.3		10.0 = 0.9	10.1 = 0.2		9.8 = 0.2
Na	mEq/L	145.5 = 0.8		145.8 = 1.0	147.3 = 1.7		146.7 = 1.0
K	mEq/L	4.47 = 0.37		5.07 = 2.10	4.08 = 0.23		3.82 = 0.20
Cl	mEq/L	104.4 = 2.2		106.2 = 2.5	107.9 = 1.3		103.8 = 0.6

Each value shows mean ± S.D.

Not significantly different from control.

Vehicle control: 2 mM citric acid solution

TP: Tape stripping

(2) TP group, Day 3

Group		Vehicle control		5 nm Ag (1 mg/mL)		AgNO ₃ (1 mg/mL)	
		TP		TP		TP	
Number of animals		2		2		2	
Total protein	g/dL	5.0 = 0.1		5.1 = 0.1	5.3 = 0.1		
Albumin	g/dL	3.1 = 0.1		3.2 = 0.0	3.3 = 0.1		
A/G		1.57 = 0.02		1.73 = 0.07	1.70 = 0.13		
Glucose	mg/dL	183 = 13		198 = 3	200 = 4		
Total cholesterol	mg/dL	67 = 14		62 = 16	66 = 11		
Triglyceride	mg/dL	19 = 11		29 = 1	55 = 31		
AST	U/L	70 = 2		79 = 16	69 = 1		
ALT	U/L	31 = 8		34 = 2	34 = 2		
BUN	mg/dL	19 = 1		18 = 6	16 = 1		
Creatinine	mg/dL	0.24 = 0.01		0.22 = 0.04	0.20 = 0.00		
ALP	U/L	1097 = 54		1555 = 240	1433 = 187		
Inorganic phosphorus	mg/dL	8.4 = 0.2		8.5 = 0.4	9.6 = 1.7		
Ca	mg/dL	9.5 = 0.1		9.8 = 0.1	10.4 = 0.0		
Na	mEq/L	144.5 = 0.9		145.4 = 1.8	144.5 = 0.7		
K	mEq/L	4.69 = 0.30		4.44 = 0.06	4.31 = 0.09		
Cl	mEq/L	107.0 = 0.1		107.8 = 0.6	106.6 = 0.8		

Each value shows mean ± S.D.

Not significantly different from control.

Vehicle control: 2 mM citric acid solution

TP: Tape stripping

(3) TP group, Day 5

Group		Vehicle control		5 nm Ag (1 mg/mL)		AgNO ₃ (1 mg/mL)	
		TP		TP		TP	
Number of animals		5		5	5		5
Total protein	g/dL	4.9 = 0.1		4.9 = 0.2	4.9 = 0.2		4.8 = 0.2
Albumin	g/dL	3.2 = 0.1		3.2 = 0.1	3.2 = 0.2		3.1 = 0.2
A/G		1.96 = 0.26		1.84 = 0.10	1.86 = 0.10		1.86 = 0.16
Glucose	mg/dL	144 = 5		137 = 13	133 = 12		114 = 15 **
Total cholesterol	mg/dL	44 = 7		49 = 8	49 = 7		46 = 10
Triglyceride	mg/dL	22 = 6		35 = 16	22 = 18		17 = 5
AST	U/L	64 = 6		67 = 8	66 = 7		63 = 9
ALT	U/L	23 = 5		27 = 3	24 = 6		23 = 2
BUN	mg/dL	12 = 2		12 = 3	11 = 1		11 = 1
Creatinine	mg/dL	0.21 = 0.01		0.21 = 0.02	0.20 = 0.02		0.20 = 0.02
ALP	U/L	1030 = 191		1160 = 148	1265 = 173		1064 = 113
Inorganic phosphorus	mg/dL	8.1 = 0.3		8.3 = 0.5	8.2 = 0.5		8.4 = 0.3
Ca	mg/dL	9.1 = 0.3		9.3 = 0.2	9.2 = 0.2		9.5 = 0.3
Na	mEq/L	145.2 = 1.9		146.8 = 1.2	146.7 = 0.9		147.7 = 1.3
K	mEq/L	4.09 = 0.22		4.04 = 0.10	4.20 = 0.20		4.06 = 0.24
Cl	mEq/L	102.2 = 0.3		102.4 = 0.8	102.6 = 2.0		103.6 = 1.4

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (**: P<0.01).

Vehicle control: 2 mM citric acid solution

TP: Tape stripping

H26 図 12. 血液生化学検査(TP 処理群)。貼付後 5 日の銀イオン投与群では、グルコース濃度が有意に低下したが、病理組織学検査において肝臓および副腎に異常所見は認められなかった。

AC group, Day 2

Group	Pretreatment	Vehicle control			5 nm Ag (1 mg/mL)			AgNO ₃ (1 mg/mL)		
		AC			AC			AC		
Number of animals		4			4			4		
Total protein	g/dL	5.2	±	0.2	5.3	±	0.2	5.0	±	0.3
Albumin	g/dL	3.3	±	0.1	3.3	±	0.1	3.2	±	0.3
A/G		1.74	±	0.04	1.57	±	0.09	1.80	±	0.22
Glucose	mg/dL	219	±	11	195	±	9	199	±	3
Total cholesterol	mg/dL	62	±	2	65	±	10	62	±	5
Triglyceride	mg/dL	22	±	4	21	±	6	20	±	2
AST	U/L	76	±	16	70	±	10	93	±	24
ALT	U/L	32	±	7	28	±	1	37	±	12
BUN	mg/dL	17	±	2	18	±	3	17	±	5
Creatinine	mg/dL	0.21	±	0.01	0.23	±	0.03	0.23	±	0.02
ALP	U/L	1333	±	81	1345	±	478	1253	±	100
Inorganic phosphorus	mg/dL	9.0	±	0.5	9.5	±	1.1	9.5	±	0.5
Ca	mg/dL	10.3	±	0.3	10.6	±	0.3	10.7	±	0.2
Na	mEq/L	143.9	±	1.6	144.8	±	1.5	145.5	±	1.6
K	mEq/L	4.02	±	0.19	4.09	±	0.33	4.01	±	0.21
Cl	mEq/L	104.3	±	2.0	105.5	±	0.5	105.0	±	0.9

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Vehicle control: 2 mM citric acid solution

AC: Acetone wiping

H26 図 13. 血液生化学検査(AC 処理群). ナノ銀投与群および銀イオン投与群では、グルコース濃度が有意に低下したが、病理組織学検査において肝臓および副腎に異常所見は認められなかった。

(1) TP group, Day 2

Group	Vehicle control		5 nm Ag (1 mg/mL)		AgNO ₃ (1 mg/mL)	
	TP		TP		TP	
Pretreatment	TP		TP		-	
Number of animals	4		4		2	
Body weight	(g)	249.5 = 13.5	261.3 = 6.3	259.9 = 7.9	243.5 = 16.9	
Liver	(mg)	11501.2 = 1890.3	12224.5 = 1548.2	11716.9 = 184.8	11064.6 = 847.2	
	(mg/g)	45.918 = 5.457	46.710 = 4.806	45.114 = 2.086	45.426 = 1.056	

Each value shows mean ± S.D.

Not significantly different from control.

Vehicle control: 2 mM citric acid solution

TP: Tape stripping

(2) TP group, Day 3

Group	Vehicle control		5 nm Ag (1 mg/mL)		AgNO ₃ (1 mg/mL)	
	TP		TP		TP	
Pretreatment	TP		TP		TP	
Number of animals	2		2		2	
Body weight	(g)	241.4 = 15.2	252.8 = 2.5	271.7 = 17.5		
Liver	(mg)	10482.7 = 1251.2	12569.7 = 1125.1	12631.2 = 155.3		
	(mg/g)	43.356 = 2.454	49.756 = 4.938	46.605 = 3.579		

Each value shows mean ± S.D.

Not significantly different from control.

Vehicle control: 2 mM citric acid solution

TP: Tape stripping

(3) TP group, Day 5

Group	Vehicle control		5 nm Ag (1 mg/mL)		AgNO ₃ (1 mg/mL)	
	TP		TP		TP	
Pretreatment	TP		TP		-	
Number of animals	5		5		5	
Body weight	(g)	242.2 = 9.6	247.9 = 11.1	247.6 = 4.4	250.8 = 9.5	
Liver	(mg)	8729.8 = 1054.2	8653.1 = 602.0	8202.4 = 629.2	8292.3 = 499.8	
	(mg/g)	36.015 = 3.646	34.889 = 1.150	33.102 = 2.060	33.111 = 2.509	
Kidneys	(mg)	2472.0 = 178.1	2208.7 = 196.0	2339.9 = 98.1	2342.9 = 163.9	
	(mg/g)	10.202 = 0.518	8.903 = 0.527 **	9.448 = 0.280 *	9.340 = 0.525 *	
Spleen	(mg)	703.2 = 175.5	716.0 = 121.5	657.5 = 79.9	669.9 = 110.8	
	(mg/g)	2.890 = 0.633	2.889 = 0.464	2.657 = 0.336	2.662 = 0.359	
Adrenal glands	(mg)	53.8 = 7.6	48.2 = 6.6	51.2 = 3.4	52.8 = 3.6	
	(mg/g)	0.222 = 0.027	0.194 = 0.024	0.207 = 0.014	0.210 = 0.015	

Each value shows mean ± S.D.

Significantly different from the control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Vehicle control: 2 mM citric acid solution

TP: Tape stripping

H26 図 14. 器官重量(TP 処理群). 貼付後 5 日のナノ銀投与群および銀イオン投与群では、腎臓の相対重量の有意な低下がみられたが、病理組織学検査において腎臓に異常所見はみられず、血液生化学検査においても尿素窒素およびクレアチニンの値に有意差は認められなかった。

AC group, Day 2

Group	Vehicle control		5 nm Ag (1 mg/mL)		AgNO ₃ (1 mg/mL)	
	AC		AC		AC	
Pretreatment	AC		AC		AC	
Number of animals	4		4		4	
Body weight	(g)	257.1 = 6.8	261.3 = 7.7	252.6 = 8.7		
Liver	(mg)	11147.2 = 697.6	11368.1 = 861.4	10515.8 = 657.2		
	(mg/g)	43.329 = 1.798	43.478 = 2.421	41.610 = 1.525		

Each value shows mean ± S.D.

Not significantly different from control.

Vehicle control: 2 mM citric acid solution

AC: Acetone wiping

H26 図 15. 器官重量(AC 処理群). AC 処理群の肝臓重量では、溶媒投与群と各投与群の間に有意な差は認められなかった。

(1) TP group, Day 2

Findings	Group	Vehicle control					5 nm Ag (1 mg/mL)					AgNO ₃ (1 mg/mL)									
		Pretreatment					TP					-					TP				
		Grade	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+
Liver																					
		3	1	0	0	0	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	0	0	0
		3	0	1	0	0	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	0	1	0	0
		2	2	0	0	0	4	0	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	3	1	0	0	0	2	0	0	0	0	4	0	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

(2) TP group, Day 3

Findings	Group	Vehicle control					5 nm Ag (1 mg/mL)					AgNO ₃ (1 mg/mL)				
		Pretreatment					TP					TP				
		Grade	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+
Liver																
		2					2					2				

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	Vehicle control					5 nm Ag (1 mg/mL)					AgNO ₃ (1 mg/mL)									
		Pretreatment					TP					-					TP				
		Grade	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+
Liver																					
		5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
		4	1	0	0	0	4	1	0	0	0	4	1	0	0	0	4	1	0	0	0
		4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Kidney																					
		2	3	0	0	0	2	3	0	0	0	2	3	0	0	0	3	1	1	0	0
		5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	3	0	1	1	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
Spleen																					
		0	0	4	1	0	0	0	3	2	0	0	0	3	2	0	0	0	5	0	0
		5					5					5				5					

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

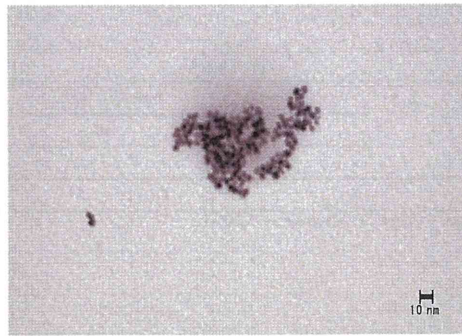
H26 図 16. 病理組織学所見(TP 処理群)。貼付後 2 および 3 日の肝臓ならびに貼付後 5 日の肝臓、腎臓、脾臓および副腎では、銀投与によると考えられる変化は認められなかった。

AC group, Day 2

Findings	Group	Vehicle control					5 mM Ag (1 mg/mL)					AgNO ₃ (1 mg/mL)				
	Pretreatment	AC					AC					AC				
	Grade	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+	-	=	+	2+	3+
Liver		4					4					4				

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
 AC: Acetone wiping

H26 図 17. 病理組織学所見(AC 処理群). 肝臓では、全投与群において変化は認められなかった。



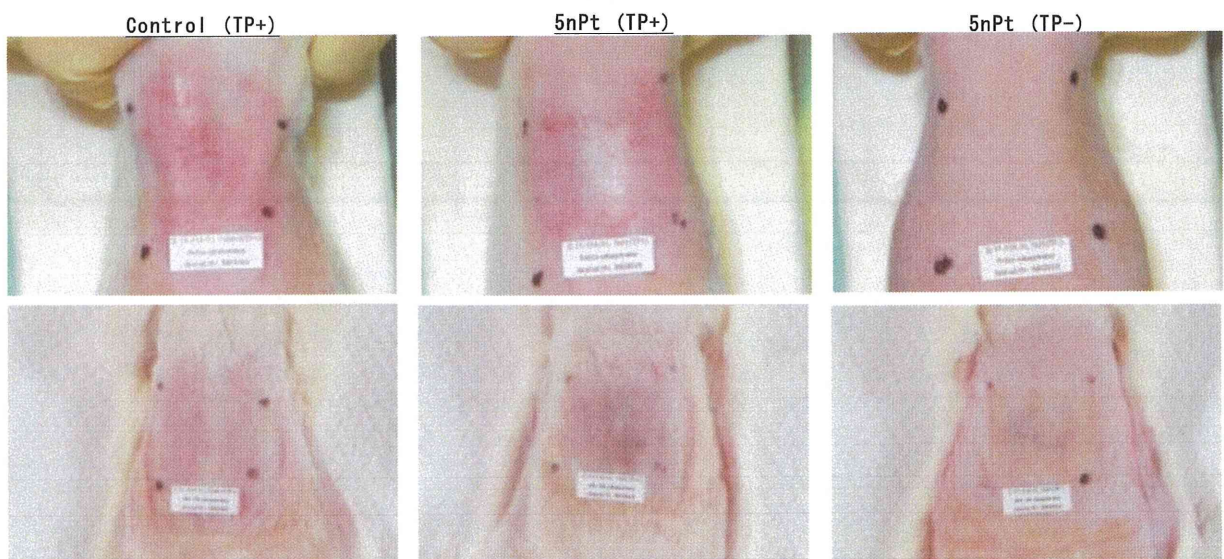
Lot No. DAG2419 (4.6 ± 0.8 nm)

H27 図 1. 本研究に用いたナノ白金粒子

入手した白金液を膜貼付メッシュに滴下し乾燥後、透過型電子顕微鏡にて観察した。

投与群	TP 処理	動物数	投与物質
対照群	ありCont (TP+)	5	2 m M クエン酸水溶液
5nPt群	あり5nPt (TP+)	5	5nPt
	なし5nPt (TP-)	5	5nPt

H27 図 2. 群構成.



H27 図 3. 投与皮膚部位の肉眼的変化.

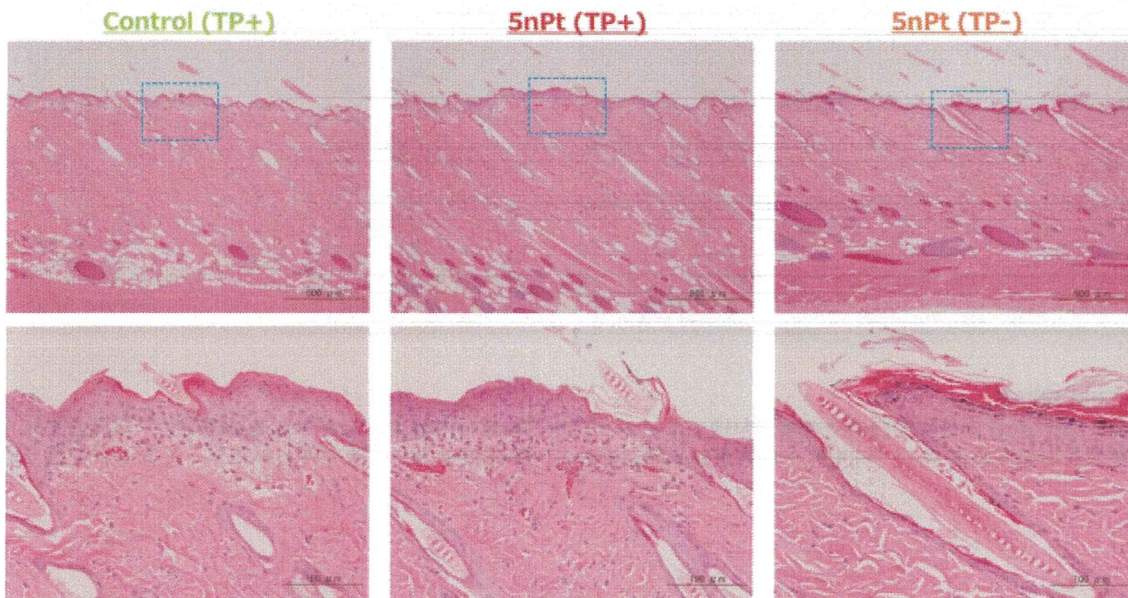
上段は各群代表例の投与直前 (TP 処理後) を、下段は投与 2 日 (解剖日) の背部皮膚領域を示す。

TP 処理直後の皮膚には赤色点が認められたが、24 時間後には TP 処理による肉眼的変化は回復していた。また、5nPt 投与部位は黒色化を呈していた。その他、5nPt 投与による投与部位の肉眼的変化は認められない。

Findings	Group Grade	Control (TP+)					5nPt (TP+)					5nPt (TP-)						
		-	±	+	2+	3+	-	±	+	2+	3+	-	±	+	2+	3+		
Application site																		
Epidermis																		
Attachment, black pigment, surface of stratum corneum		5	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	**	1	4	0	0	0
Cellular infiltration, inflammatory		0	5	0	0	0	0	2	3	0	0	0		5	0	0	0	0
Crust, focal		0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0		5	0	0	0	0
Decrease, keratohyaline granule		0	0	0	2	3	0	0	0	1	4		5	0	0	0	0	0
Edema, intercellular		0	1	4	0	0	0	1	3	1	0		5	0	0	0	0	0
Parakeratosis		0	0	5	0	0	0	2	3	0	0		5	0	0	0	0	0
Thickening		0	5	0	0	0	0	5	0	0	0		5	0	0	0	0	0
Dermis																		
Cellular infiltration, inflammatory, subepidermal		0	2	3	0	0	0	0	5	0	0		5	0	0	0	0	0
Edema, subepidermal		2	3	0	0	0	2	2	1	0	0		5	0	0	0	0	0
Hemorrhage, subepidermal		4	1	0	0	0	4	1	0	0	0		5	0	0	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<0.01 : Significantly different from control(Fisher's exact test).

H27 図 4. 皮膚の病理組織学的観察所見



H27 図 5. 皮膚の病理組織学的変化

上段は各群代表例の弱拡大像を示し、点線部の拡大像を下段に示した。

TP 処理により、ケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化および軽度な炎症が認められたが、対照群と 5nPt 群 (TP+) の程度に差はなかった。

5nPt 群では、TP+群および TP-群ともに角質層表面に黒色の付着物(被験物質由来)がみられ、TP 処理群の方が顕著であった。

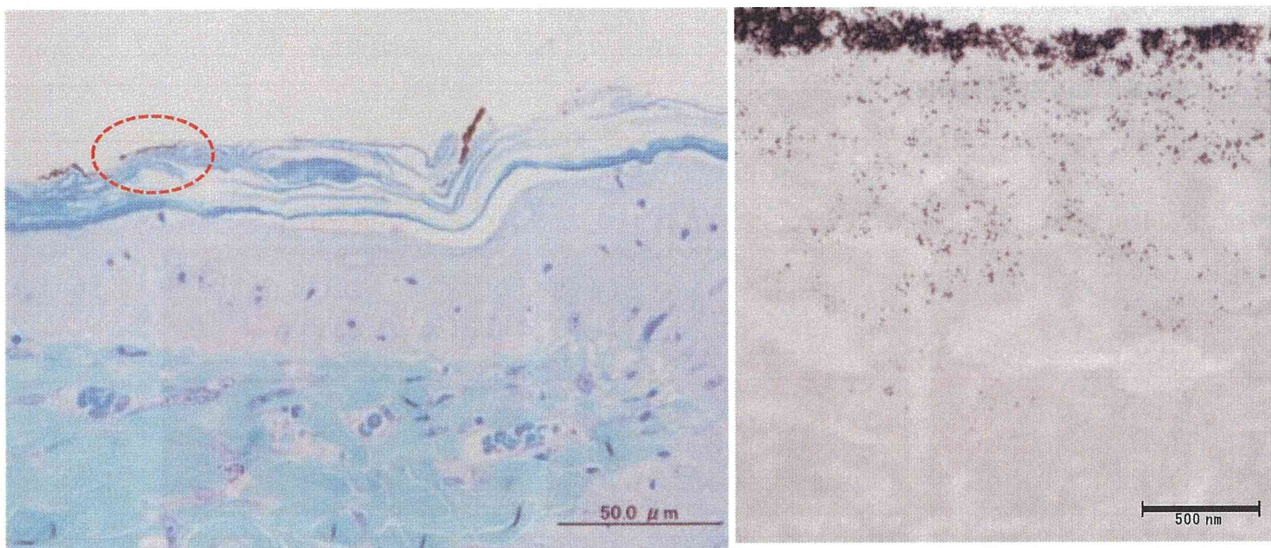
Group	Platinum concentration (ppm)		
	Skin	Liver	Blood
Control (TP+)	< 0.05	< 0.05	< 0.05
5nPt (TP+)	29.3	< 0.05	< 0.05
5nPt (TP-)	25.0	< 0.05	< 0.05

Each value shows mean.

The lower limits of Pt detection : 0.05 ppm .

H27 図 6. ICP-MS 分析結果

5nPt 投与群では TP 処理群、未処理群ともに皮膚にナノ粒子が確認された。肝臓および血液中は検出限界以下であった。



H27 図 7. 皮膚の TEM 観察像

左写真は 5nPt (TP+) 群における投与皮膚領域の樹脂包埋トルイジンブルー染色（四酸化オスミウム未処理切片）組織像を示す。点線領域の TEM 観察像を右側写真に示す。5nPt 粒子は角質最表層において 1μm 程度の深さにまでみられたが、それより下層では観察されなかった。

Group	Control (TP+)	5nPt (TP+)	5nPt (TP-)
Number of animals	5	5	5
Days of administration			
1	226.6 ± 5.9	225.1 ± 5.3	225.2 ± 6.4
2	209.6 ± 9.1	207.0 ± 5.3	206.0 ± 4.7

Each value shows mean (g) ± S.D.

H27 図 8. 体重推移

24 時間の閉塞貼付により体重減少がみられたが、その程度は 3 群間に差はなかった。

Group		Control (TP+)			5nPt (TP+)			5nPt (TP-)		
Number of animals		5			5			5		
Body weight	(g)	209.6	±	9.1	207.0	±	5.3	206.0	±	4.7
Liver	(m g)	8502.0	±	758.8	7954.4	±	421.3	8467.3	±	499.2
	(m g/g)	40.518	±	2.212	38.425	±	1.512 #	41.095	±	1.811
Kidney (R)	(m g)	925.2	±	62.9	861.9	±	67.3	924.5	±	61.1
	(m g/g)	4.413	±	0.152	4.164	±	0.287	4.487	±	0.243
Kidney (L)	(m g)	906.8	±	36.4	869.4	±	76.6	946.2	±	72.5
	(m g/g)	4.328	±	0.062	4.199	±	0.325	4.595	±	0.341
Kidneys	(m g)	1832.0	±	98.9	1731.3	±	143.4	1870.8	±	129.5
	(m g/g)	8.740	±	0.195	8.363	±	0.607	9.082	±	0.568
Spleen	(m g)	626.6	±	73.8	749.6	±	400.4	545.7	±	57.1
	(m g/g)	2.992	±	0.341	3.650	±	2.045	2.649	±	0.269
Adrenal gland (R)	(m g)	21.8	±	4.4	20.4	±	2.6	22.5	±	0.9
	(m g/g)	0.105	±	0.023	0.098	±	0.012	0.110	±	0.004
Adrenal gland (L)	(m g)	22.0	±	3.2	20.8	±	2.3	24.9	±	1.9
	(m g/g)	0.106	±	0.019	0.100	±	0.010	0.121	±	0.007
Adrenal glands	(m g)	43.9	±	6.5	41.2	±	3.8 ##	47.5	±	2.6
	(m g/g)	0.210	±	0.038	0.199	±	0.016 ##	0.230	±	0.011

Each value show s mean ± S.D.

Control (TP+) vs 5nPt (TP+), or Control (TP+) vs 5nPt (TP-) : Not significantly different from control

#, ## : Significantly different between 5nPt (TP+) and 5nPt (TP-) at p<0.05, p<0.01.

H27 図 9. 器官重量

対照群と各 nPt 群の肝臓、腎臓、脾臓、副腎重量には差はなかった。

5nPt 群では TP 処理により、肝臓および副腎重量の低下がみられた。

Findings	Group Grade	Control (TP+)					5nPt (TP+)					5nPt (TP-)							
		-	±	+	2+	3+	P	-	±	+	2+	3+	P	-	±	+	2+	3+	P
Liver																			
Fatty change, hepatocyte, periportal		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0			
Hematopoiesis, extramedullary		1	4	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0			
Kidney																			
Basophilic tubule, cortex		3	2	0	0	0	3	2	0	0	0	2	3	0	0	0			
Cyst, cortex		5				0	4				1	4				1			
Hyperplasia, transitional cell, unilateral		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0			
Spleen																			
Hematopoiesis, extramedullary		0	0	0	1	4	0	0	0	2	3	0	0	0	1	4			
Adrenal gland																			
		5					5					5							

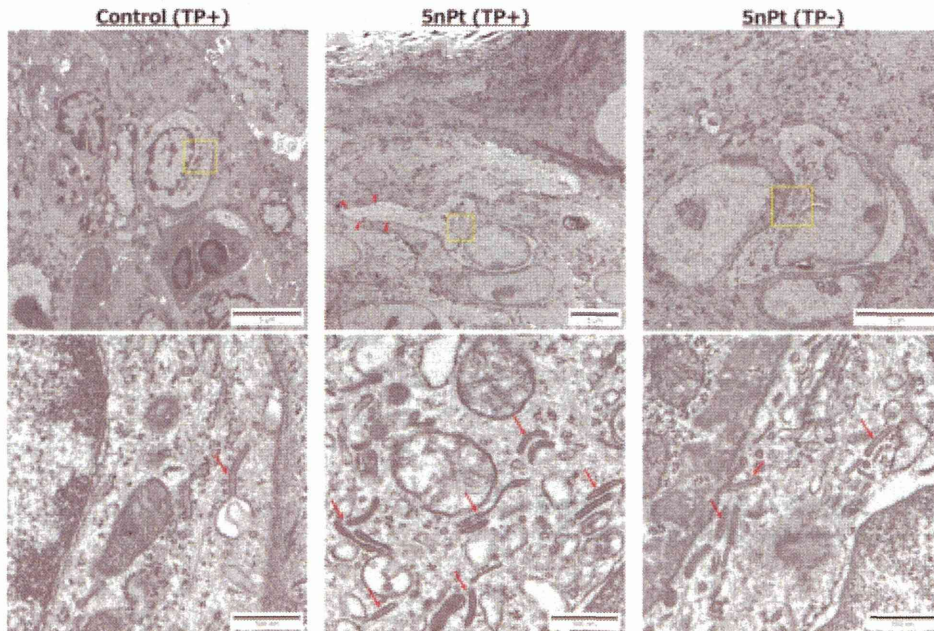
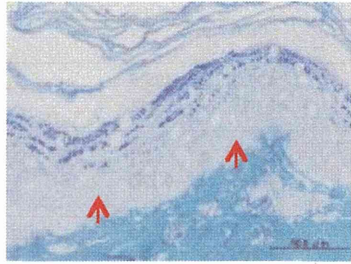
Notes) - : No abnormal changes ± : Very slight + : Slight 2+ : Moderate 3+ : Marked P : Non-graded change

Numerals represent the number of animals.

Not significantly different from control.

H27 図 10. 病理組織学的検査

肝臓、腎臓、脾臓、副腎の病理組織学的検査では、5nPt 投与 (TP+ and TP-) に起因した変化は認められなかった。



H27 図 11. 皮膚角質層の TEM 観察像(染色：酢酸ウラニル・佐藤の鉛液)

最上部写真：トルイジンブルー染色標本中の矢印は樹状細胞を示す。

電顕写真の上段は各群代表例の表皮角質層領域、下段は上段の点線領域拡大像を示す。

5nPt 群では細胞突起(矢頭)を慎重しているランゲルハンス細胞や、パーベック顆粒(矢印)が豊富な細胞が多く観察され、活性化を示唆するような組織像であった。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
東阪和馬, 堤康央	安全・安心な最先端医薬としてのDDS開発とレギュラトリーサイエンス-ナノDDSの安全性評価・確保の現状と今後.	寺田 弘, 中川晋作, 辻 考三, 牧野公子, 絹田精鎮, 西野 敦.	応用が広がるDDS 人体環境から農業・家電まで	NTS出版	日本	2013	140-5
Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	The absorption, distribution, metabolism, and excretion profile of nanoparticles.	Mitsuru Akashi, Takami Akagi, Michiya Matsusaki	Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application.	Springer	日本	2014	259-71
Hirai T., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Potential hazards of skin exposure to nanoparticles.	Takemi Otsuki, Yasou Yoshioka, Andrij Holian	Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances	Springer	日本	2015	123-35
Morishita Y., Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Reproductive and developmental effects of nanomaterials.	Takemi Otsuki, Yasou Yoshioka, Andrij Holian	Biological Effects of Fibrous and Particulate Substances	Springer	日本	2015	77-101
Yoshioka Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Biocompatibility of nanomaterials.	Zheng-Rong Lu, Shinji Sakuma	Nanomaterials in Pharmacology.	Springer	日本	2015	185-99

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshida T., Yoshioka Y., Tochigi S., Hirai T., Uji M., Ichihashi K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Higashisaka K., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.	Intranasal exposure to amorphous nanosilica particles could activate intrinsic coagulation cascade and platelets in mice.	Part. Fibre. Toxicol.	10	41	2013
Nagano T., Higashisaka K., Kunieda A., Iwahara Y., Tanaka K., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Liver-specific microRNAs as biomarkers of nanomaterial-induced liver damage.	Nanotechnology.	24	405102	2013
Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X., Kondoh M., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Yagi K.	Acute and chronic nephrotoxicity of platinum nanoparticles in mice.	Nanoscale Res. Lett.	8	395	2013
東阪和馬, 吉岡靖雄, 堤康央	経皮吸収性に着目したナノマテリアルの安全性評価研究.	コスメテックジャパン	3	945-50	2013
Yoshida T., Yoshioka Y., Takahashi H., Misato K., Mori T., Hirai T., Nagano K., Abe Y., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Intestinal absorption and biological effects of orally administered amorphous silica particles.	Nanoscale Res Lett.	9	532	2014

Higashisaka K., Fujimura M., Taira M., Yoshida T., Tsunoda S., Baba T., Yamaguchi N., Nabeshi N., Yoshikawa T., Nasu M., Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Asian dust particles induce macrophage inflammatory responses via mitogen-activated protein kinase activation and reactive oxygen species production.	J Immunol Res.	2014	856154	2014
Imai S., Yoshioka Y., Morishita Y., Yoshida T., Uji M., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Size and surface modification of amorphous silica particles determine their effects on the activity of human CYP3A4 in vitro.	Nanoscale Res Lett.	9	651	2014
Hata K., Higashisaka K., Nagano K., Mukai Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Evaluation of silica nanoparticle binding to major human blood proteins.	Nanoscale Res Lett.	9	668	2014
Isoda K., Kondoh M., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Imazawa T., Nishimura T., Ishida I., Yagi K.	Silica nanoparticle-induc ed toxicity in mouse lung and liver imaged by electron microscopy.	Fund. Toxicol. Sci.	2	19-23	2015
平井敏郎, 吉岡靖雄, 東 阪和馬, 堤 康央	非晶質ナノシリカが アレルギーの発症・ 悪化におよぼす影響 ～有効かつ安全なナ ノマテリアルの創製 を目指して～.	臨床免疫・アレ ルギー科	61	352-6	2014
東阪和馬, 吉岡靖雄, 堤 康央	経皮曝露に着目した ナノマテリアルの安 全性評価.	ファームテック ジャパン	30	99-102	2014
Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Recent topics on development of nanomaterials and nano-safety science.	Yakugaku Zasshi.	134	721-2	2014

Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Nano-safety Science for Sustainable Nanotechnology.	Yakugaku Zasshi.	134	737-42	2014
堤 康央	ナノマテリアルの安 全性評価 (1)	MEDCHEM NEWS.	25	45-6	2015
Yoshida T., Yoshioka Y., Morishita Y., Aoyama M., Tochigi S., Hirai T., Tanaka K., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Protein corona changes mediated by surface modification of amorphous silica nanoparticles suppress acute toxicity and activation of intrinsic coagulation cascade in mice.	Nanotechnolog y.	26	245101	2015
Hirai T., Yoshioka Y., Takahashi H., Ichihashi K., Udaka A., Mori T., Nishijima N., Yoshida T., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S., Takagi T., Ishii K., Nabeshi H., Yoshikawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y.	Cutaneous exposure to agglomerates of silica nanoparticles and allergen results in IgE-biased immune response and increased sensitivity to anaphylaxis in mice.	Part. Fibre. Toxicol.	12	16	2015
Wakimoto T., Uchida K., Mimura K., Kanagawa T., Mehandjiev TR., Aoshima H., Kokubo K., Mitsuda N., Yoshioka Y., Tsutsumi Y., Kimura T., Yanagihara I.	Hydroxylated Fullerene: a potential anti-inflammatory and anti-oxidant agent for preventing mouse preterm birth.	Am. J. Obstet. Gynecol.	213	708	2015
堤 康央	ナノマテリアルの安 全性評価 (2) .	MEDCHEM NEWS.	25	109-10	2015
Higashisaka K., Yoshioka Y., Tsutsumi Y.	Applications and safety of nanomaterials used in the food industry.	Food Safety.	3	39-47	2015

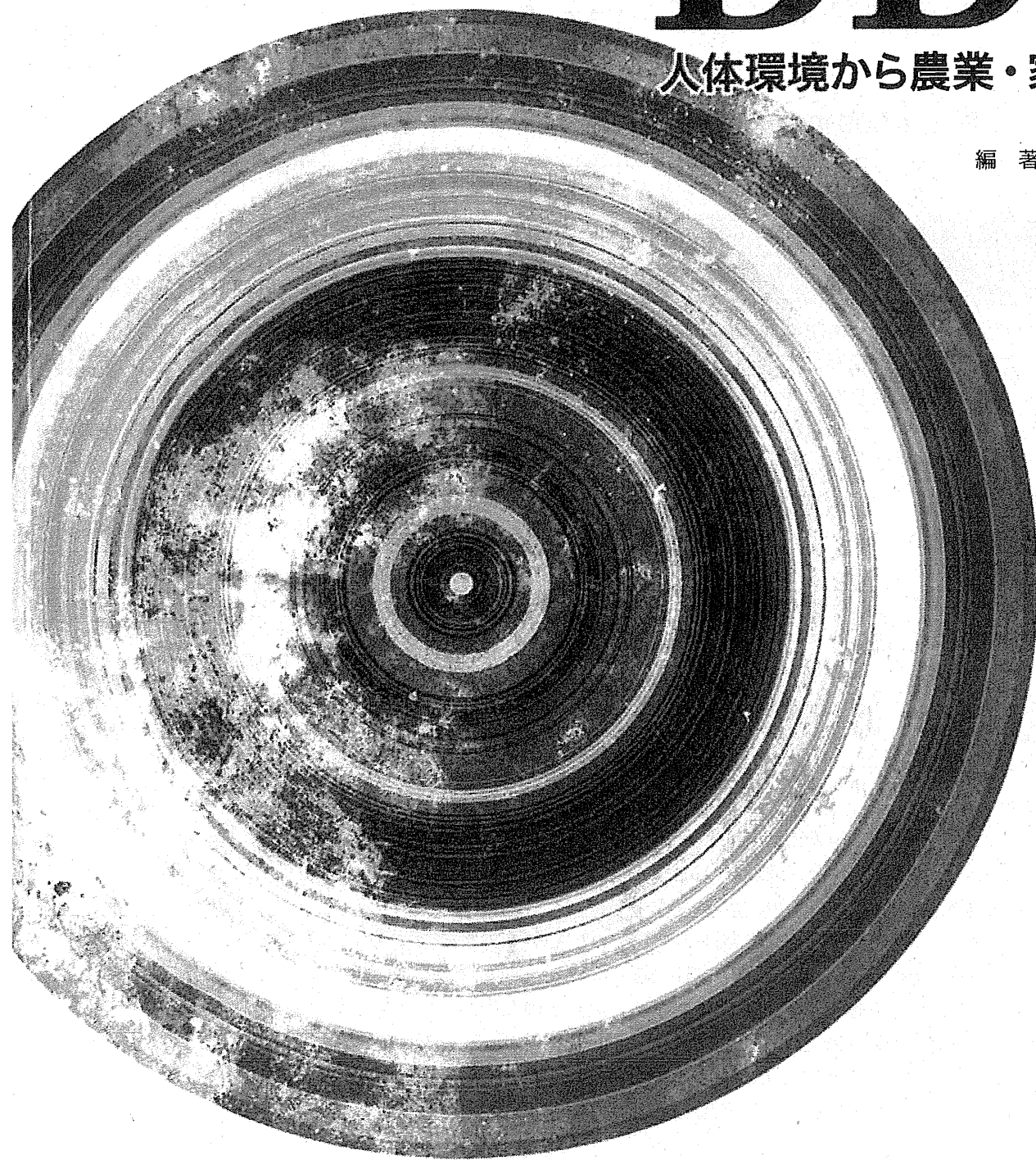
堤 康央	ナノマテリアルの安全性評価（最終回）.	MEDCHEM NEWS.	25	158-59	2015
堤 康央	「安全と安心」を強みにした、付加価値の高い化粧品への期待.	日本化粧品学40周年記念誌（寄稿）.	39	76-8	2015
東阪和馬	ナノ医薬の安全性確保に向けたナノ安全科学研究の推進	Drug Delivery System.	31	168-9	2016

応用が広がる

DDS

人体環境から農業・家電まで

編著 寺田 弘
中川 晋作
辻野 孝子
絹田 公精
西野 敦



安全・安心な最先端医薬としての DDS 開発とレギュラトリーサイエンス

■ ナノ DDS の安全性評価・確保の現状と今後

1. はじめに

近年のナノテクノロジー (Nanotechnology) の発展に伴い、フラーレンやナノ酸化チタンといったナノマテリアルの開発と実用化が世界的に進展している。このうち、フラーレン (C60) やカーボンナノチューブ (CNT) に関しては、日本が多くの物質特許、用途特許を保有しており、カーボン系ナノマテリアルに対する日本の期待は特に計り知れないものがある。最近では、安全性に懸念が残る CNT に代わる素材として、フラーレンを CNT 様に加工し、フラーレンナノウイスキーやフラーレンナノチューブといった鉄を含まないものまで、日本で開発されている。最近では、分子とナノマテリアルとのちょうど中間サイズ、大きさだけで見ると、アルブミンや抗体サイズのサブナノマテリアル (1 nm~10 nm の粒径) までもが台頭し、分子の特性と粒子 (ナノマテリアル) の特性を併せ持ったものまでが実用化されつつある。一般に、少なくとも一次元が 100 nm 以下の素材であるナノマテリアルは、従来までのサブミクロンサイズ (数百 nm) 以上の素材と比較して、①粒子径の減少に伴う組織浸透性の増大、②従来素材とは異なる生体内動態、③比表面積増大による薬物吸着能の増大など、医薬品素材として革新的機能を発揮する。したがって、薬学・医学分野において、21 世紀産業の根幹を担う素材として期待され、ドラッグデリバリーシステム (薬物送達法・薬剤伝達法: DDS) への応用による、ナノ医薬 (ナノメディシン) ともいうべき新たな治療戦略への展開が図られている。たとえば、悪性腫瘍を標的とした「ナノリポソーム製剤」や「高分子ナノミセル」は、がん組織への薬物送達効率や標的組織への

の浸透性、標的細胞内への導入効率などの点で、がん治療に劇的な革新をもたらすものと有望視されている。さらに、このナノ医薬の台頭は、従来までの低分子医薬品やサブミクロン素材では得られなかった画期的な薬理活性を発揮するナノ医薬品シーズとしても期待され、次世代医薬の筆頭として注目されている。すなわち、薬物担体 (ナノキャリア) としての展開のみならず、昨今では、主剤 (主薬) がナノマテリアルである、狭義のナノ医薬も開発が進んでいる (HIV や肝炎ウイルス、リウマチなどに対してフラーレンの応用が期待されている)。しかしながら、医薬品開発においては、製剤の物性・品質と安全性の担保が必要不可欠であることはいうまでもない。特に、iPS 細胞を含めた細胞医薬、抗体やサイトカインといったタンパク医薬、ナノ医薬、遺伝子・核酸医薬、もちろん、DDS 医薬といった最先端医薬品には有効なのは当たり前で、これまで以上に、品質の確かさや高度なまでの安全性が要求されてくる。この点、いわゆる、医薬品の承認・審査、レギュラトリーサイエンスの遅れも当然の課題ながら、ナノ医薬の根幹をなすナノマテリアルの定義すらいまだ曖昧であるとともに、物性・品質と有効性・安全性の連関評価もほとんど進展していない。そのため、ナノマテリアルの安全性評価研究は、世界的に見ても不十分であり、欧米ではナノマテリアルの影の部分 (ハザード) ばかりが注目され、その結果、残念なことに、光の部分であるナノ医薬品の開発が遅れてしまっている。周知のとおり、医薬品の安全性は、そのものが持つ毒性 (ハザード) と曝露される時間・量の積算 (リスク) によって運命づけられ (ハザードだけでは議論できない点にご留意頂きたい)、ベネフィットとの兼ね合いの中で、その実用化や利用方法が決まっていく。本観点から筆

2. ナノDDS 医薬品開発の現状

近年、医薬品や化粧品、食品といったヒトが直接曝露される領域で、非晶質ナノシリカなど、従来素材と比較して有用性が向上あるいは新たな機能を獲得したナノマテリアルの開発が急速に進んでおり、すでに実用化までもが世界的に進展している。一次元が100 nm以下の素材であるナノマテリアルは、サイズや形状、比表面積などの点で、従来までのサブミクロンサイズ以上(数百 nm 以上)の素材とは一線を画した特徴的な物性を持ち、この特徴的な物性を反映して低分子化合物やタンパク質(抗体・サイトカインなど)では得られなかった画期的な薬理活性を発揮するナノ医薬品シーズになるものと期待されている。蛇足ではあるが、いわゆる、サブナノ素材(0.1~10 nm)もすでに台頭してきており、まさに目が離せなくなっている。これらナノマテリアルの画期的機能は、ナノ医薬としての主薬あるいはナノ添加剤としてだけではなく、薬物治療の最適化

者らは、ナノ医薬の開発を推進するべく、ナノマテリアル投与により誘発される生体影響とナノマテリアルの物性、細胞内・体内動態との連関を解析し、体系化(Nano-Safety Science: ナノ安全科学)していくことで、ナノ医薬の品質や有効性/安全性の担保など、Nano-Safety Design(ナノ最適デザイン)に適う基盤情報の収集を図っている(図1)。すなわち、ナノ医薬品の開発に向けては、単に細胞傷害性を検討して、安全性を議論するようなことはやめ、科学的根拠に基づいたナノマテリアルの安全性情報を幅広く収集し、これら情報を基盤として、有効かつ安全なナノマテリアルを設計していくことが今後のキーポイントとなる。これが、Sustainable Nanotechnologyとも呼ぶべき、次世代のナノDDS研究と位置づけられる。そこで本総説では、まだまだ世界的に未成熟ではあるが、ナノ医薬品開発の現状について紹介するとともに、ナノ医薬品の開発に必須であるナノマテリアルの安全性確保に向けてわれわれが推進しているナノ安全科学研究について、緒についたばかりの最新の知見に少し触れてみたい。

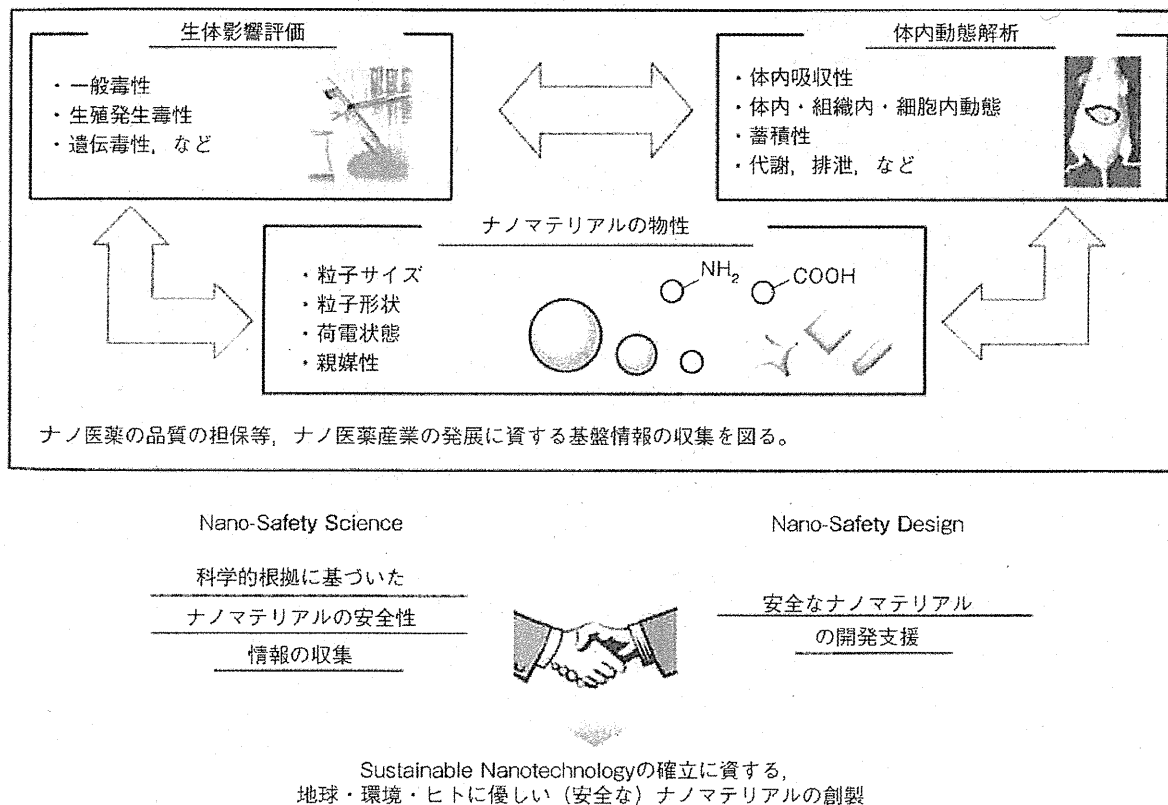


図1 ナノ安全科学研究