

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28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 永晩 （国立医薬品食品衛生研究所 病理部）  
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、経皮あるいは静脈内投与試験では脾臓への影響が報告されているものの、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。26年度及び27年度我々はマウスに直径10 nm、60 nm及び100 nmのAgNPを腹腔内投与したところ、AgNP 10 nmを投与した全動物において24時間内の死亡又は瀕死例が認められ、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、脾臓のうっ血及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に観察された。28年度の本研究では、実験1)において、昨年度に行った実験の肝臓サンプルを用いて、肝臓内銀濃度及び活性酸素種（ROS）関連 mRNA の発現を検討し、実験2)においては、10 nm AgNPの急性毒性について、直径10 nm AgNPを0.002 mg、0.02 mg及び0.2 mg濃度で、硝酸銀（AgNO<sub>3</sub>）を0.32 mg濃度で腹腔内投与を行い、AgNPの濃度による影響について検討し、実験3)においては、N-acetyl-L-cysteine（NAC、2000 mg/kg bw）を経口投与1時間後、AgNP 10 nm（0.2 mg）を腹腔内投与し、AgNPによる急性毒性に対する抗酸化剤の影響について検討した。本試験で使用したナノ銀のイオン化度を調べるため、ナノ銀溶液の超遠心上清に含まれている銀イオンをICP-MSを用いて測定したところ、AgNP 10 nmが他のサイズのAgNPより有意に高い濃度を示した。実験1)について、AgNP 10 nm群の肝臓内銀濃度が他の群に比べ有意な高値を示した。実験2)について、AgNO<sub>3</sub>群で投与30分後より立毛及び活動低下が、投与1時間後より有意な体温低下が認められ、投与3時間後より死亡又は瀕死状態になった。AgNP 10 nm 0.2 mg群で投与5時間後より立毛及び活動低下が、投与6時間後より有意な体温低下が認められ、解剖時、肝臓は暗赤色調を呈していた。また、AgNP 10 nm 0.2 mg群及びAgNO<sub>3</sub>群で相対肝臓重量の増加が見られた。病理組織学的には、AgNP 10 nm 0.2 mg群及びAgNO<sub>3</sub>群で、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に認められた。細胞質内封入体及び胸腺髓質の単細胞壊死はAgNP 10 nm 0.2 mg群でのみ認められた。実験3)について、投与6時間後よりAgNP群で活動低下が認められ、有意な体温の低下が認められた。投与7時間後よりNAC + AgNP群で活動低下が認められた。解剖時、AgNP群で肝臓は暗赤色調を呈し、AgNP群及びNAC + AgNP群で相対肝臓重量の増加が見られた。病理組織学的には、AgNP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、胸腺皮質の単細胞壊死及び腸間膜リンパ節傍皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に認められ、NAC + AgNP群では観察されなかった。AgNP群及びNAC + AgNP群で胸腺周囲リンパ節の褐色～黒色素の沈着、腸間膜の肉芽腫及び褐色～黒色素の沈着が高頻度に認められた。被験物質による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、そのメカニズムの一つとして酸化的ストレスの関与が考えられた。しかし、死因に酸化的ストレスが直接関わっていることは考えにくいことから、機序については心筋や神経への患与など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変

化が示され (Bergin IL et. al., *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol.* 2013;3. doi: 10.1504/IJBNN.2013.054515.)、経皮あるいは静脈内投与試験では脾臓への影響が報告されている (Korani M et. al., *Int J Nanomedicine.* 2011;6, 855-862, Schäfer B et.al., *Arch Toxicol.* 2013;87, 2249-2262) 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 (94-99))、動物を用いた検討での報告はない。最近、Balb/c マウスに腹腔内投与した高濃度の AgNP による急性毒性に関して報告があった (Elkhawass E.A. et. al., *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2014;6 (9810-9817))。

26 年度及び 27 年度我々は抗原性あるいは卵白アルブミン (OVA) の抗原性に対するアジュバント作用を検討するためマウスに直径 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、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、脾臓のうっ血及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に観察された。本研究では、実験 1) において、昨年度に行った実験の肝臓サンプルを用いて、肝臓内銀濃度及び活性酸素種 (ROS) 関連 mRNA の発現を検討し、実験 2) においては、10 nm AgNP の急性毒性について、直径 10 nm AgNP を 0.002 mg、0.02 mg 及び 0.2 mg 濃度で、硝酸銀 (AgNO<sub>3</sub>) を 0.32 mg 濃度で腹腔内投与を行い、AgNP の濃度による影響について検討し、実験 3) においては、N-acetyl-L-cysteine (NAC、2000 mg/kg bw) を経口投与 1 時間後、AgNP 10nm (0.2 mg) を腹腔内投与し、AgNP による急性毒性に対する抗酸化剤の影響について検討した。

## B. 研究方法

### 実験 1)

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 のイオン化度を調べるために、1 µg Ag/mL 濃度で調整した AgNP 及び AgNO<sub>3</sub> サンプ

ルを超遠心 (40,000 g、2 時間) し、その上清における銀濃度を ICP-MS を用いて測定した。

AgNP を 0.2 mg/300 µl/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、① 溶媒対照 (Vehicle) 6 時間群、② 10 nm AgNP 6 時間群、③ 60 nm AgNP 6 時間群、④ 100 nm AgNP 6 時間群。腹腔内投与 (300 µl/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 標本を作製し、病理組織学的検討を行った。肝臓の凍結サンプルを採取し、ICP-MS を用いて銀濃度を測定した。また、採取した肝臓サンプルより mRNA を抽出し、ROS 関連遺伝子 (Gstt1、Gpx1、Fmo2) の発現量をリアルタイム RT-PCR により相対定量した。血清を採取し、心不全のバイオマーカーである brain natriuretic peptide (BNP) をキットを用いて測定した。

### 実験 2)

動物実験は実験 1 と同様に実施した。

各群は以下の通りに構成した、① Vehicle 群、② AgNP 10 nm 0.002 mg 群、③ AgNP 10 nm 0.02 mg、④ AgNP 10 nm 0.2 mg 群 (Figure 2)。

### 実験 3)

動物実験は実験 1 と同様に実施した。Citrate (vehicle) や AgNP (10 nm, 0.2 mg/mouse) を腹腔内投与する 1 時間前に NAC (2000 mg/kg bw) を経口投与し、前処置する群を設けた。解剖は vehicle や AgNP を投与した 7 時間後に実施した (Figure 3)。

各群は以下の通りに構成した、① Citrate 群、② NAC + Citrate 群、③ AgNP 群、④ NAC + AgNP 群 (Figure 3)。

## 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 \*又は#  $p < 0.05$ 、\*\*又は##  $p < 0.01$  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

### 実験 1)

超遠心上清の銀濃度は AgNP 10 nm 及び AgN03 で有意な高値を示したが、AgNP 60 nm 及び AgNP 100 nm では vehicle に比べ高い傾向は示したものの統計学的有意な変化は見られなかった (Figure 4)。肝臓内銀濃度において、AgNP 10 nm 群では vehicle のみならず、AgNP 60 nm 及び AgNP 100 nm に比べても有意な高値を示した (Figure 5)。肝臓における ROS 関連遺伝子の発現について、AgNP 10 nm 群の Fmo2 が有意な低値を示した (Figure 6)。また血清を用いて心不全のバイオマーカーである BNP の測定を試みたが、使用したキットの測定限界以下だった (データなし)。

### 実験 2)

AgN03 群で投与 30 分後より立毛及び活動低下が、投与 1 時間後より有意な体温低下が認められ (Figure 7)、投与 3 時間後より死亡又は瀕

死状態になった。AgNP 10 nm 0.2 mg 群では投与 5 時間後より立毛及び活動低下が、投与 6 時間後より有意な体温低下が認められ (Figure 7)、解剖時、肝臓は暗赤色調を呈していた (Figure 8)。AgNP 10 nm 0.2 mg 群及び AgN03 群で相対肝臓重量の増加が見られた (Figure 7)。病理組織学的には、AgNP 10 nm 0.2 mg 群及び AgN03 群で、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に認められた。細胞質内封入体及び胸腺髄質の単細胞壊死は AgNP 10 nm 0.2 mg 群でのみ認められた (Table 1)。

### 実験 3)

投与 6 時間後より AgNP 群で活動低下が認められ、有意な体温の低下が認められた (Figure 9)。投与 7 時間後より NAC + AgNP 群で僅かな活動低下が認められた。解剖時、AgNP 群で肝臓は暗赤色調を呈し (Figure 10)、AgNP 群及び NAC + AgNP 群で相対肝臓重量の増加が見られた (Figure 9)。病理組織学的には、AgNP 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、胸腺皮質の単細胞壊死及び腸間膜リンパ節傍皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に認められ、NAC + AgNP 群ではいずれの病変も観察されなかった (Table 2)。AgNP 群及び NAC + AgNP 群で胸腺周囲リンパ節の褐色～黒色素の沈着、腸間膜の肉芽腫及び褐色～黒色素の沈着が高頻度に認められた (Table 2)。

## D. 考察

26 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。27 年度の研究では経時的観察を行い、急性毒性の再現性、血清生化学的解析及び病理組織学的解析を主体に検討した。本年度は、その死因を明らかにするため、実験 1) では肝臓内銀濃度及び活性酸素種 (ROS) 関連 mRNA の発現を検討し、実験 2) では AgNP の濃度による影響について検討し、実験 3) では抗酸化剤の影響について検討した。

AgNP の濃度による検討において、AgNP 10 nm 0.2 mg 群及び AgN03 群の肝臓及び胸腺でのみ、病変が有意な高頻度に認められ、体温の低下も見られたが、AgNP 10 nm 0.002 mg 及び AgNP 10 nm 0.02 mg 群では見られなかった。Balb/c マ

ウスにAgNPの急性毒性は少なくともAgNP 10 nm 0.02 mg 以上が必要と考えられた。Balb/c マウスに腹腔内投与したAgNP 20nmによる急性毒性に関する報告があったが (Elkhawass E. A. et. al., International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;6 (9810-9817))、急性毒性を誘発する量(214 mg/kg bw)は我々が27年度の研究で用いた投与量(9.9-12.3 mg/kg bw)に比べはるかに多かった。AgNPの急性毒性に関してはサイズの僅かな差によっても毒性の表現型が大きい差を示す可能性が考えられる。

AgNO3は腐食性があり、マウスのLD50(腹腔内投与)は17~24 mg/kgである。本研究で使われたAgNO3の投与量は約16 mg/kgであったことから、強い急性毒性が現れたと考えられる。明らかな死因は不明だが、褐色~黒色色素の沈着を除くと肝臓及び胸腺などの病変はAgNPと類似していた。

昨年の結果からAgNPのサイズの相違が死亡の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はされていない (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はリンパ管を介して拡散した可能性が考えられた。また、肝臓にうっ血が認められたことから、右心主体の循環障害が死亡原因と関連している可能性が考えられ、死因に関しては心筋細胞や神経細胞に直接作用した毒性メカニズムについても検討する必要がある。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 (Gliga AR et. al., Particle and Fibre Toxicology. 2014;11 (DOI:10.1186/1743-8977-11-11))と報告されている。今回、肝臓のROS関連遺伝子mRNAの発現において明らかな発現上昇はみられなかった。27年度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る。肝臓及び脾臓にうっ血がみられ、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。

実験1)の結果から、超遠心上清の銀濃度及び肝臓内銀濃度において、他のサイズのAgNPに比べAgNP 10 nmで明らかに高い値を示した。AgNPによる毒性の主体が銀イオンなのか、ナノ粒子なのか不明であるが、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。表面積とイオン化度の関連が示唆されている。

AgNP 10 nm群において酸化ストレスに関連した遺伝子の発現上昇は認められなかった。AgNPによる毒性メカニズムは酸化ストレスによるとの報告もみられるが、その詳細は不明である (McShan D et. al., Journal Food Drug Analysis. 2014;22 (116-127))。AgNPの毒性がナノ粒子によるものなのか銀イオンによるものなのかについても議論が続いている (Reidy B et. al., Materials. 2013;6 (2295-2350))。しかし、抗酸化剤の投与によってAgNPによる毒性が著しく抑制できたことは、少なくとも一部は酸化ストレスによるAgNPの毒性メカニズムを支持すると考えられた。メカニズムの解明のために、本研究においてもROS関連たんぱく発現の検討及び作用メカニズムの違う抗酸化剤による検討が必要と考えられる

## 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 はサイズにより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傷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，曾根瑞季，安達玲子，木村美恵，最上（西巻）知子，小川久美子：マウス経皮曝露モデルにおけるコレラトキシンのアジュバント作用の検討．第43回日本毒性学会学術年会（2016年6月）

曹永晩，赤木純一，水田保子，豊田武士，小川久美子：BALB/cマウスにおけるナノ銀の腹腔内投与による急性毒性はサイズによって異なる．第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会（2017年1月）

Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Ogawa K : Acute toxicity of intraperitoneally administered silver nanoparticles of varying sizes in mice. 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2017.3 Baltimore, MD, USA)

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許所得

なし

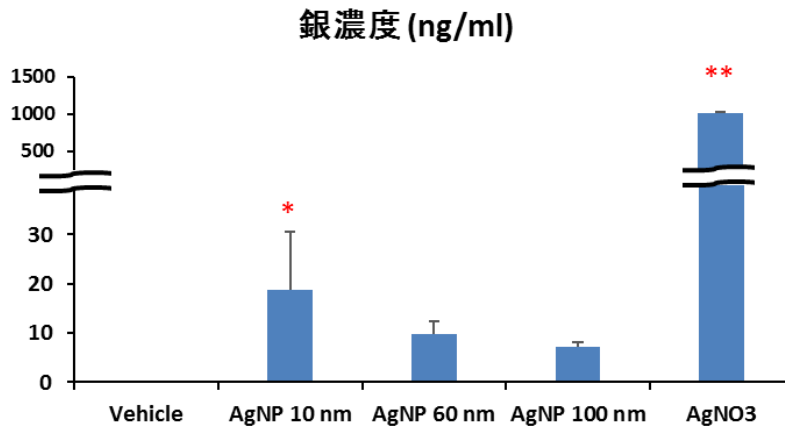
### 2. 実用新案登録

なし

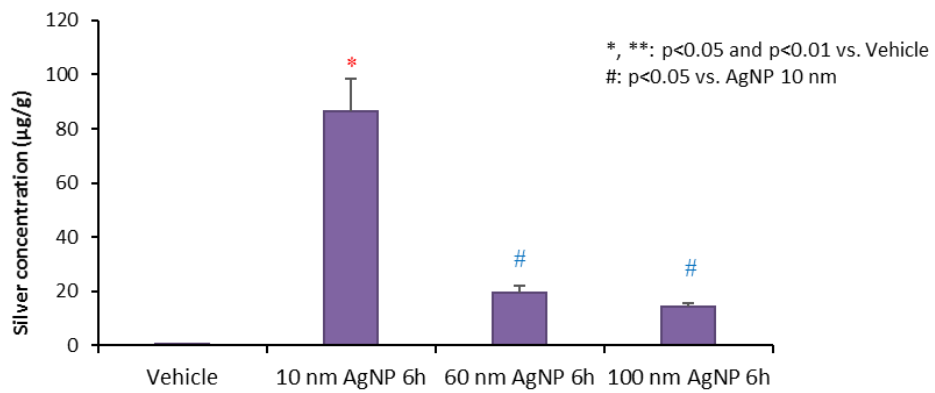
### 3. その他

なし

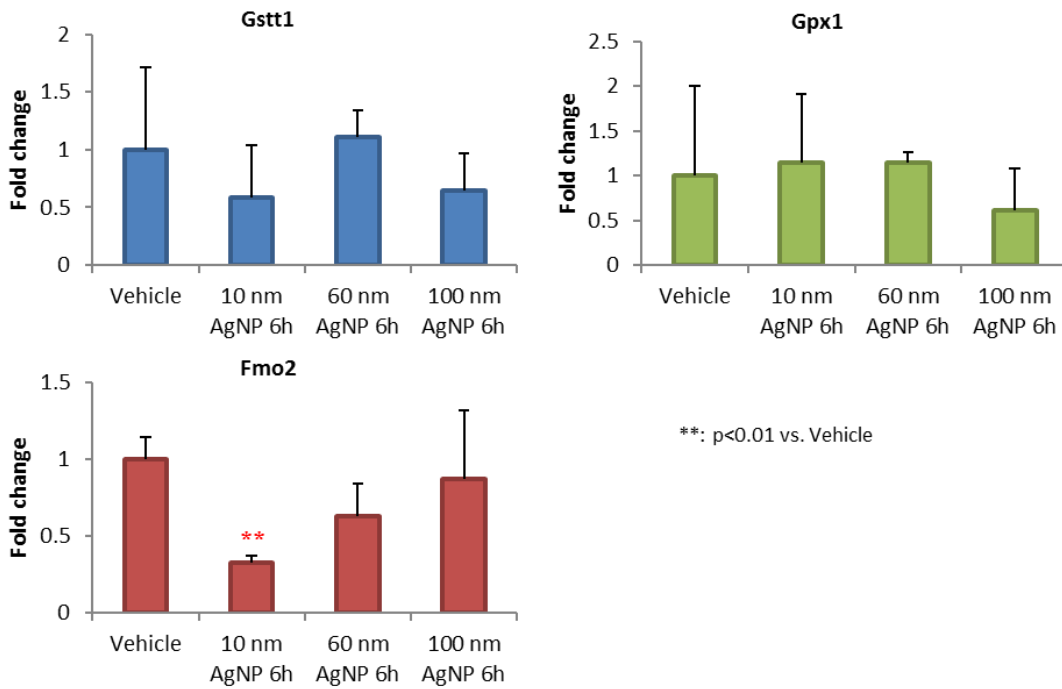




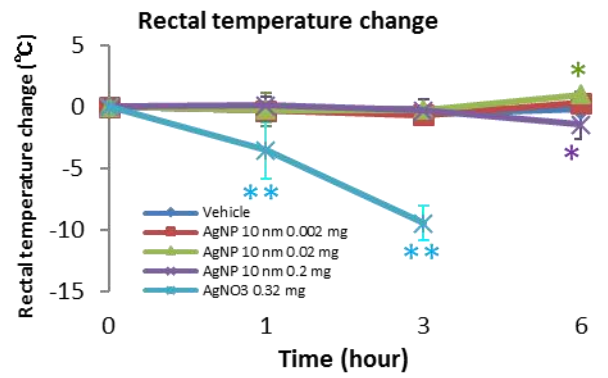
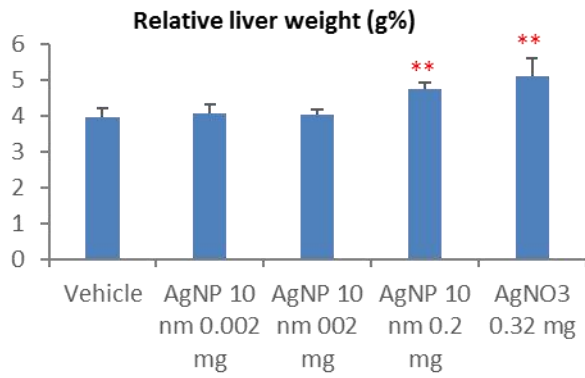
**Figure 4. 超遠心上清の銀濃度 (実験1)**



**Figure 5. 肝臓内銀濃度 (実験1)**



**Figure 6. 肝臓におけるROS関連遺伝子の発現 (実験1)**



\*, \*\*: p<0.05 and p<0.01 vs. Vehicle

Figure 7. 相対肝重量及び体温変化 (実験2)

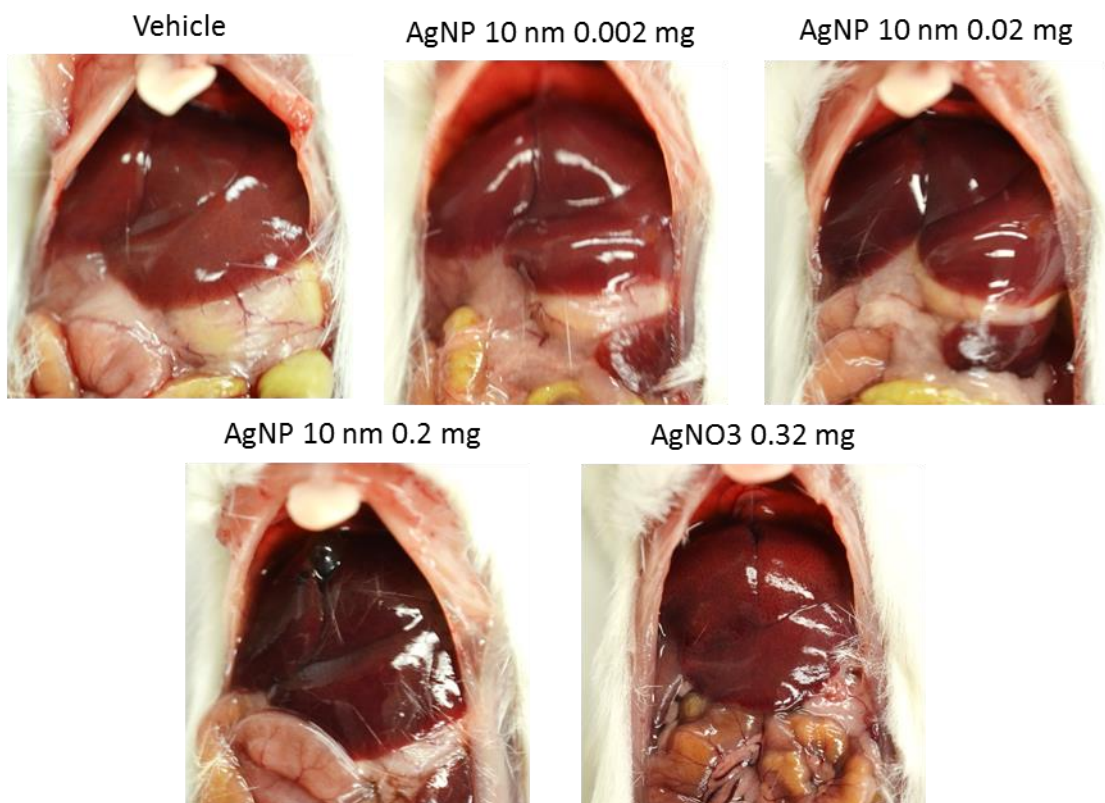
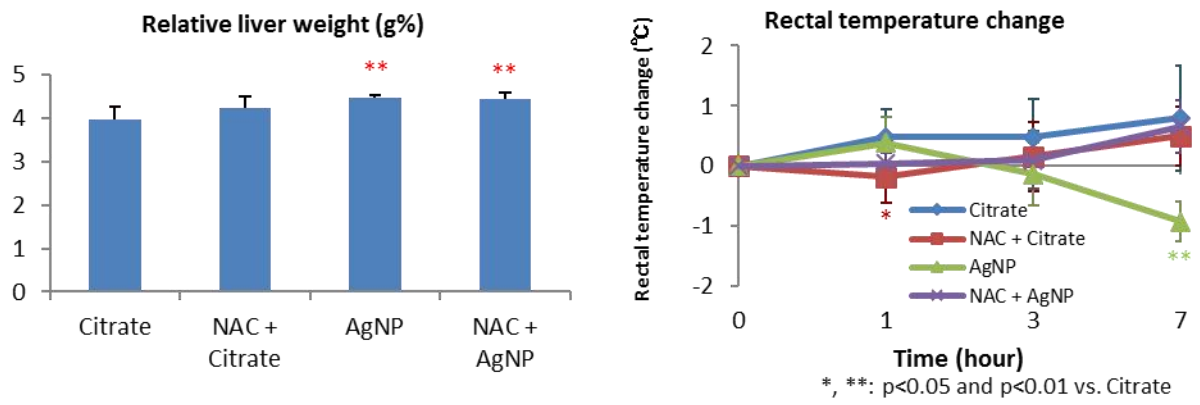
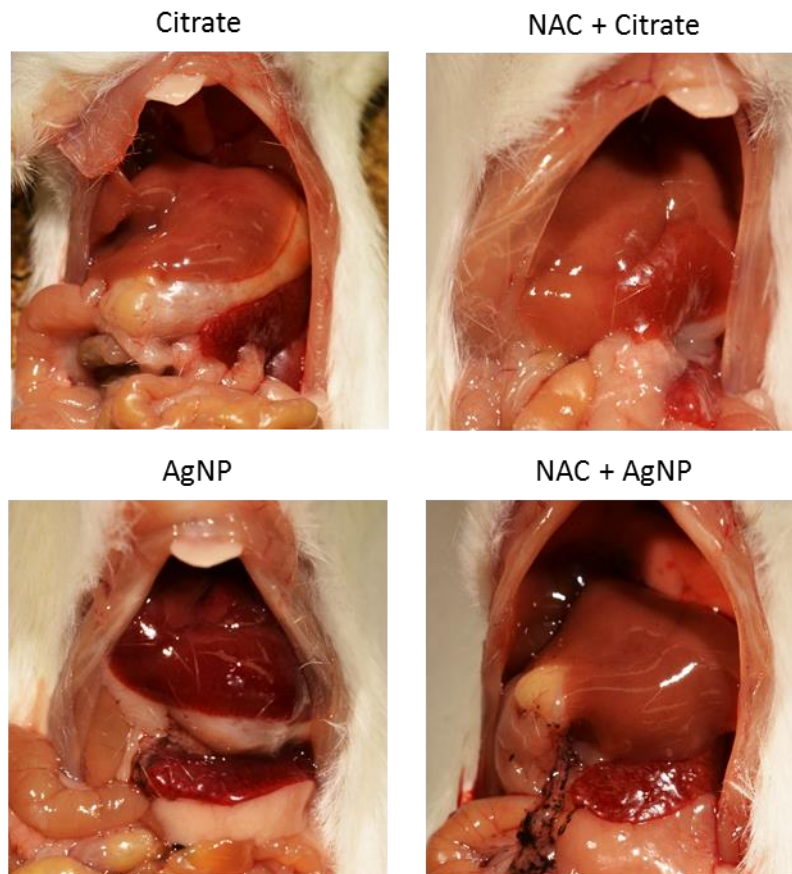


Figure 8. 剖検時の肉眼変化 (実験2)





**Figure 9. 相対肝重量及び体温変化 (実験3)**



**Figure 10. 剖検時の肉眼変化 (実験3)**

**Table 1. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP upto 6 hours**

Organ and lesions	Treatment	Citrate (Vehicle)	AgNP 10 nm, 0.002 mg	AgNP 10 nm, 0.02 mg	AgNP 10 nm, 0.2 mg	AgNO3 0.32 mg
	No. of animals	5	5	5	5	5
Liver	Congestion, intermediate zone	0	0	0	4*	5**
	Vacuolation, hepatocyte	0	0	1	4*	5**
	Cytoplasmic inclusions, hepatocyte	0	0	0	4*	0
	Single cell necrosis, hepatocyte	0	0	1	3	0
	Focal necrosis, hepatocyte	0	0	0	2	0
	Dark brown pigment deposition, Kupffer cell	0	0	0	3	0
Gall bladder	Edema, submucous	0	0	0	1	1
	Dilatation	1	0	0	1	0
Spleen	Congestion	0	1	0	0	3
	Apoptosis, white pulp	0	0	0	3	0
Thymus	Apoptosis, cortex	0	2	1	5**	4*
	Apoptosis, medulla	0	0	0	4*	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	0	1	4*	0
Mesenterium	Granuloma	4	1	2	4	2
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, cortex	0	0	1	3	0
	Apoptosis, paracortex	0	0	0	3	0
Kidney	Regenerative tubules	5	4	5	5	5
	Mineralization, medulla	0	0	0	1	0
Heart	Thrombus, right ventricle	0	1	1	1	0
	Thrombus, left ventricle	0	1	0	0	0
	Thrombus, right atrium	0	0	1	0	0
	Thrombus, left atrium	0	1	0	0	0
	Mineralization, epicardium	2	3	1	1	2
	Mineralization, myocardium	0	0	2	1	0

\*,\*\*; significantly different from the Vehicle group at p<0.05, 0.01, respectively.

**Table 2. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP upto 7 hours**

Organ and lesions	Treatment	Citrate	NAC + Citrate	AgNP	NAC + AgNP
	No. of animals	5	5	5	5
Liver	Congestion, intermediate zone	0	0	5**	0##
	Vacuolation, hepatocyte	0	0	5**	0##
	Cytoplasmic inclusions, hepatocyte	0	0	5**	0##
	Single cell necrosis, hepatocyte	0	1	4*	0#
	Dark brown pigment deposition, Kupffer cell	0	0	4*	0#
	Gall bladder	Edema, submucous	0	0	1
Dilatation		1	3	3	3
Spleen	Congestion	0	0	1	0
	Apoptosis, white pulp	0	0	3	0
Thymus	Apoptosis, cortex	0	0	5**	0##
	Apoptosis, medulla	0	0	1	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	0	4*	4*
Mesenterium	Granuloma	0	1	5**	5**
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	0	5**	4*
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, cortex	0	0	0	0
	Apoptosis, paracortex	0	0	5**	1#
	Regenerative tubules	5	5	5	5
Kidney	Simple hyperplasia, tubule	0	1	0	0
Heart	Mineralization, epicardium	<b>35</b>	2	3	4
				4	0#

\*,\*\*; significantly different from the Citrate group at p<0.05, 0.01.

##,###; significantly different from the AgNP group at p<0.05, 0.01.