

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29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年度の研究では抗酸化作用を示すN-acetyl-L-cysteine（NAC）による肝臓の病理所見の有意な減少が確認できた。29年度の本研究では、実験1）においては、AgNPの急性毒性について、AgNPの表面積を考量した投与量（直径10 nm AgNP 0.2 mg、直径60 nm AgNP 1.2 mg、直径100 nm AgNP 2 mg）で腹腔内投与を行い、その影響について検討し、実験2）においては、NAC（2000 mg/kg bw）、Vitamin C（Vit C、200 mg/kg bw）、Vitamin E（Vit E、100 mg/kg bw）及びL-buthionine-(S,R)-sulfoximine（BSO、1.6 g/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。その結果、AgNP 10 nm 6時間群において、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。又、病変と肝臓内の銀濃度とは相関がないことからAgNPの急性毒性は粒子のサイズに相関することが再確認できた。直接活性酸素類を消去するVit C及びVit EよりはGSHの前駆体であるNACの方がAgNPの急性毒性を有効に抑制できた。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。今後、本研究で得られた結果についてさらに検討を重ね、AgNPの急性毒性メカニズムについて、ナノ粒子のサイズ及び酸化ストレスの詳細に関する解析を進めることが必要である。

キーワード：ナノ銀、急性毒性、マウス、抗酸化剤

**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。28 年度の研究では抗酸化作用を示す N-acetyl-L-cysteine (NAC) による病理所見の有意な減少が確認できた。

本研究では、実験 1) においては、AgNP の急性毒性について、AgNP の表面積を考慮し、110  $\text{cm}^2$  で同等とした投与量 (直径 10 nm AgNP 0.2 mg、直径 60 nm AgNP 1.2 mg、直径 100 nm AgNP 2 mg) で腹腔内投与を行い、その影響について検討し、実験 2) においては、NAC (2000 mg/kg bw)、Vitamin C (Vit C、200 mg/kg bw)、Vitamin E (Vit E、100 mg/kg bw) 及び L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO、1.6 g/kg bw) を経口又は腹腔内投与 1 時間後、AgNP 10 nm (0.4 mg) を腹腔内投与し、AgNP による急性毒性に対する抗酸化剤又は又はグルタチオン (GSH) 合成抑制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。

nanoComposix 社からのデータ (Table 1) から 10 nm AgNP の表面積は 60 nm AgNP 及び 100 nm AgNP の各々約 6 倍及び 10 倍であることが分かった。AgNP を 0.2~2 mg/2 ml/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 5-6 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 群、③ 60 nm AgNP 群、④ 100 nm AgNP 群。腹腔内投与 (2 ml /マウス) し、6 及び 24 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、6 及び 24 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。肝臓及び全血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。

### 実験 2)

動物実験は実験 1 と同様に実施した。Citrate (vehicle) や AgNP (10 nm, 0.4 mg/mouse) を腹腔内投与する 1 時間前に saline 又は NAC (2000 mg/kg bw)、Vit C (200 mg/kg bw) 及び Vit E (100 mg/kg bw) を経口投与し、BSO (1.6 g/kg bw) を腹腔内投与した。解剖は vehicle または AgNP を投与した 6 時間及び 24 時間後に実施した。血清を用いて血清生化学検査を行った。

各群は以下の通りに構成した、① Saline + Vehicle 群、② Saline + AgNP 群、③ NAC + AgNP 群、④ Vit C + AgNP 群、⑤ Vit E + AgNP 群、⑥ BSO + AgNP 群 (Figure 2)。

### 統計解析

データは Microsoft Excel により集計し、エクセル統計 (BellCurve for Excel) 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 #  $p < 0.05$ 、\*\*  $p < 0.01$  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)

AgNP 10 nm 群の 1 匹で投与 6 時間後より立毛が認められたが、何れの群においても 24 時間後まで有意な体温低下は認められなかった (Figure 3)。AgNP 投与 6 時間後の解剖時、AgNP 10 nm 群の肝臓は暗赤色調を呈していた (Figure 4)。投与 6 時間後の解剖時にすべての AgNP 投与群の腸間膜で僅かに認められた暗褐色顆粒は、投与 24 時間後の解剖時になると多く観察された (Figure 4)。何れの群においても相対肝臓重量の変化は観察されなかった (Figure 5)。病理組織学的には、投与後 6 時間、AgNP 10 nm 群で、肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化及び胆嚢の浮腫が有意な高頻度に認められ

た (Figure 6、Table 2)。腹膜における黒褐色色素沈着はすべての AgNP 投与群で高頻度に観察された (Table 2)。投与後 24 時間、病変における群間の変化は認めなかった (Table 3)。肝臓中の銀濃度において、AgNP 60 nm 6 時間及び 24 時間解剖群、並びに AgNP 100 nm 24 時間群で各々の vehicle 群及び AgNP 10 nm 群と比べて有意に高い値を示した (Figure 7)。血中の銀濃度において、すべての AgNP 6 時間群及び AgNP 60 nm 24 時間群で有意に高い濃度を示した (Figure 7)。

#### 実験 2)

Saline + Vehicle 6 時間群の 1 匹が投与ミスで死亡し、結果から除外した。AgNP 投与 6 時間後まで、いずれの AgNP 群で活動低下及び有意な体温の低下は認められなかったが、AgNP 投与 24 時間後に Vit C + AgNP 群及び Vit E + AgNP 群で有意な体温の低下が認められた (Figure 8)。Saline + AgNP 24 時間群及び BSO + AgNP 24 時間群で各々 1 匹の死亡例が認められ、Vit C + AgNP 24 時間群及び BSO + AgNP 24 時間群で各々 1 匹の瀕死例が認められた。AgNP 投与 24 時間後において、NAC + AgNP 24 群を除くすべての AgNP 投与群生存動物で立毛又は頻呼吸が認められた。BSO + AgNP 24 時間群 (統計検討対象匹数が 2 匹なので結果は参考値である) 除き何れの群においても相対肝臓重量の変化は観察されなかったが、BSO + AgNP 24 時間群相対肝臓重量の有意な増加が認められた (Figure 9)。AgNP 投与 6 時間後解剖時、AgNP 群で肝臓は暗赤色調を呈し、Saline + AgNP 群が最も強かった (Figure 10)。24 時間後解剖時、NAC + AgNP 群を除くすべての AgNP 群で肝臓及び脾臓は暗赤色調を呈した (Figure 10)。血清生化学検査において、6 時間後解剖時、Saline + AgNP 群で、ALB、T-CHO、TG 及び glucose の有意な減少が認められたが、NAC + AgNP 群ではいずれの項目も変化がなかった (Table 4)。Vit C + AgNP 群、Vit E + AgNP 群及び BSO + AgNP 群

で glucose の減少及び Vit E + AgNP 群で AST の増加が認められた (Table 4)。また、BSO + AgNP 群で TP、ALB、ALP、T-CHO 及び TG の減少が認められた (Table 4)。24 時間後解剖時、NAC + AgNP 群を除くすべての AgNP 投与群で TP、ALB、T-CHO の何れかの減少又は AST の増加が認められた (Table 5)。病理組織学的には、AgNP 投与 6 時間後、NAC + AgNP 群を除くすべての AgNP 投与群で肝臓のうっ血、類洞内細胞成分増加、肝細胞の空胞化及び脾臓の白脾髄のアポトーシスが Saline + Vehicle 群に比べ、有意に増加又は増加傾向を示した (Figure 11、Table 6)。すべての AgNP 投与群で腸間膜及び胸腺リンパ節に暗褐色色素の沈着が有意に増加又は増加傾向を示した (Table 6)。Saline + AgNP 群において、肝臓の単細胞壊死及び Vit C + AgNP 群において、肝臓の巣状壊死並びに胆嚢の浮腫・出血が認められた (Figure 11、Table 6)。AgNP 投与 24 時間後、群間の有意な差は認められなかったが、AgNP 投与群で認められる肝臓、胆嚢、脾臓及び胸腺の病変が NAC + AgNP 群では観察されなかった (Table 7)。

#### D. 考察

26 年度の研究中で、OVA の有無にかかわらず AgNP 10 nm 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。28 年度は抗酸化剤 NAC を用いた検討から、AgNP による急性毒性のメカニズムの一つとして酸化ストレスの関与が考えられた。本年度は、そのメカニズムを更に明らかにするため、実験 1) においては、AgNP の表面積を考量した投与量で腹腔内投与を行い、その影響について検討し、実験 2) においては、様々な抗酸化剤又は GSH 合成抑制剤の影響について検討した。

AgNP の表面積を考量した投与量による検討において、AgNP 10、60 及び 100 nm の表面積は各々 55.1、9.4 及び 5.4 m<sup>2</sup>/g であることから

AgNP 60 及び 100 nm 群の投与量は AgNP 10 nm 群の各々 6 及び 10 倍に設定した。投与 6 時間後、何れの AgNP 投与群でも体温の低下及び明らかな臨床症状は見られなかった。また、AgNP 10 nm 群で肝臓における肉眼病変及び肝臓並びに胆嚢における病理組織学的変化が認められたが、28 年度までの検討で観察された変化より弱い病変であった。28 年度までの検討において、AgNP の投与量は 300 µl/マウスであったが、今回の検討では被験物質の納品時の濃度から全群 2 ml/マウスで行うことになった。27 年の研究から 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が、今回の結果から、AgNP の急性毒性は総暴露量のみならず、暴露濃度によっても影響を受ける可能性が考えられた。また、AgNP 10 nm 群では肝臓及び胆嚢の病変が Vehicle 群に比べ有意に高頻度に認められたが、その 6 及び 10 倍の量を投与した AgNP 60 及び 100 nm 群の肝臓及び胆嚢において、AgNP による病変は認められなかったことから、AgNP の毒性はサイズ依存性であることが示唆された。

肝臓及び血中の銀濃度について、AgNP 投与後の肝臓中の銀濃度は AgNP 10 nm 群より投与量の多かった AgNP 60 及び 100 nm 群で 6 時間及び 24 時間まで高い濃度に達し、維持したが、2 群間の平均値に大きな差がなかったことから、腹腔内投与したナノ銀が肝臓内に蓄積可能な量には限界があることが示唆された。又、肝臓内の銀濃度と病変には相関がないことから AgNP の急性毒性は粒子のサイズに相関することが再確認できた。今回の検討で用いた ICP-MS は金属イオンのみを検出できることから、肝臓内に存在する AgNP が粒子のままなのか、イオン化したのかは不明である。28 年度の結果から AgNP 溶液の超遠心上清における銀濃度は、AgNP 10 nm 群で 60 及び 100 nm 群に比べ高い値を示し、AgNP のサイズによるイオン化の違いが示唆された。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)) 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。一方、AgNP 10 nm 群の肝臓内濃度は経時的な減少がみられ、60 及び 100 nm 群と異なる動態を示した。AgNP の急性毒性は肝臓内蓄積量より初期暴露量及び粒子のサイズに相関することが明らかとなった。毒性が投与濃度によって観察されにくくなる問題についてはさらなる検討が必要と考えられた。

AgNP の急性毒性における様々な抗酸化剤の影響を調べたところ、NAC を除く何れの投与群でも明らかな抑制作用は認められなかった。直接活性酸素類を消去する Vit C 及び Vit E よりも GSH の前駆体である NAC の方が AgNP の急性毒性を有効に抑制された。NAC は 28 年度の研究においても同様の結果を示した。NAC のみではあるが、抗酸化剤の投与によって AgNP による毒性が著しく抑制されたことは、少なくとも一部は酸化的ストレスによる AgNP の毒性メカニズムの関与を支持する結果と考えられた。また、GSH 合成抑制剤である BSO による毒性亢進作用も観察されなかった。BSO は GSH 生合成に重要な役割を果たす酵素である  $\gamma$ -グルタミルシステインシンターゼを阻害することにより、GSH 欠損を誘導し、細胞内プロセスにおける GSH の役割を検討するために用いられる (Drew R et. al., *Biochemical Pharmacology*. 1984;33 (2989-2994))。今回の検討で認められた AgNP の急性毒性は 26~28 年度までの検討で認められた臨床症状などに比して弱い傾向はあるものの、病理組織学的検討において、同様の病変が観察された。臨床症状及び病理組織病変の強弱は被験物質のロット差などが考えられた。

## E. 結論

本研究では、AgNP の急性毒性について、AgNP の表面積を同等とした投与量の影響及び様々な抗酸化剤の影響について検討した。その結果、AgNP 10 nm 6 時間群において、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。又、病変と肝臓内の銀濃度とは相関がないことから AgNP の急性毒性は粒子のサイズに依存することが再確認できた。直接活性酸素類を消去する Vit C 及び Vit E よりも GSH の前駆体である NAC の方が AgNP の急性毒性を有効に抑制した。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的ストレスによる AgNP の毒性メカニズムを支持すると考えられた。今後、本研究で得られた結果についてさらに検討を重ね、AgNP の急性毒性メカニズムについて、ナノ粒子のサイズ及び酸化的ストレスに関する解析を進めることにより、食品の安全性確保に資する知見を集積することが重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

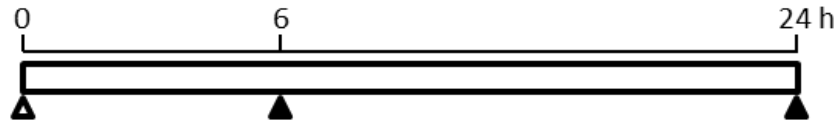
Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K: Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J Toxicol Pathol*. 2018;31:73-80.

### 2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)

曹永晩, 赤木純一, 水田保子, 豊田武士, 小川久美子: サイズによって異なるナノ銀の急性毒性. 第 44 回日本毒性学会学術年会 (2017. 7. 12)

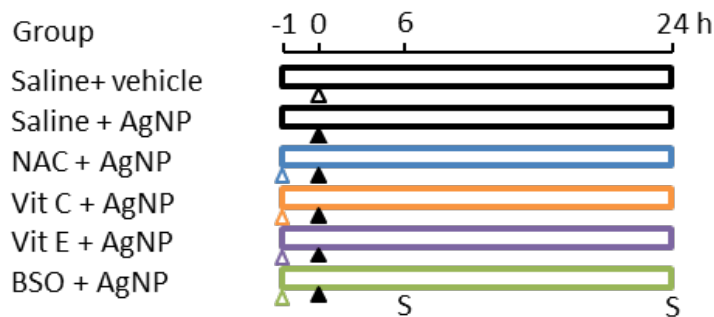
## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし



- ▲ Test chemicals exposure (i.p., 2 ml/mouse)
  - ① Citrate (vehicle)
  - ② 10 nm AgNP (0.2 mg)
  - ③ 60 nm AgNP (1.2 mg)
  - ④ 100 nm AgNP (2 mg)
  
- ▲ Sacrifice

**Figure 1. 実験デザイン (実験 1)**



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

- △ Vehicle (2 mM citrate, i.p., 300  $\mu$ l/mouse)
- ▲ Silver nanoparticles (10 nm AgNP, i.p., 0.4 mg/mouse)
- △ N-acetyl-l-cysteine (NAC, i.g., 2000 mg/kg bw)
- △ Vitamin C (Vit C, i.g., 200 mg/kg bw)
- △ Vitamin E (Vit E, i.g., 100 mg/kg bw)
- △ L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO, i.p., 1.6 g/kg bw)
- S Sacrifice

**Figure 2. 実験デザイン (実験 2)**

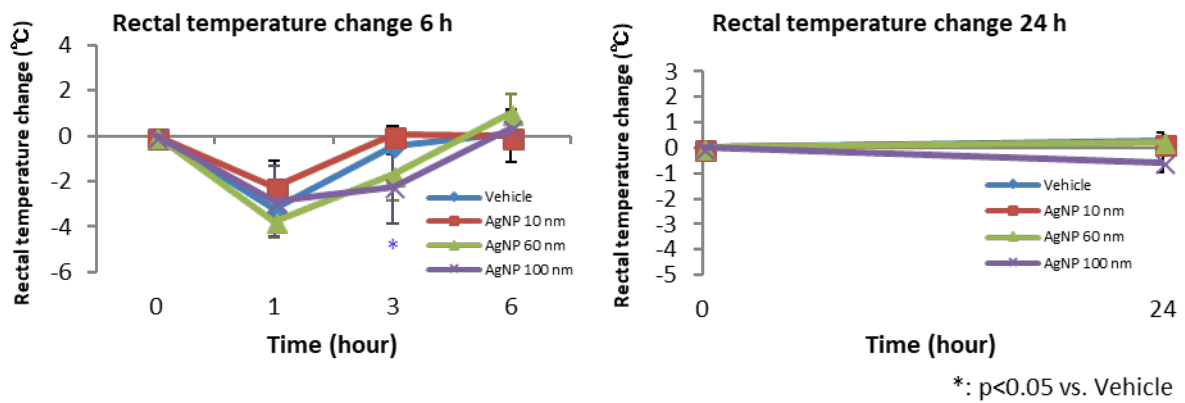


Figure 3. 相对肝重量及び体温変化 (実験 1)

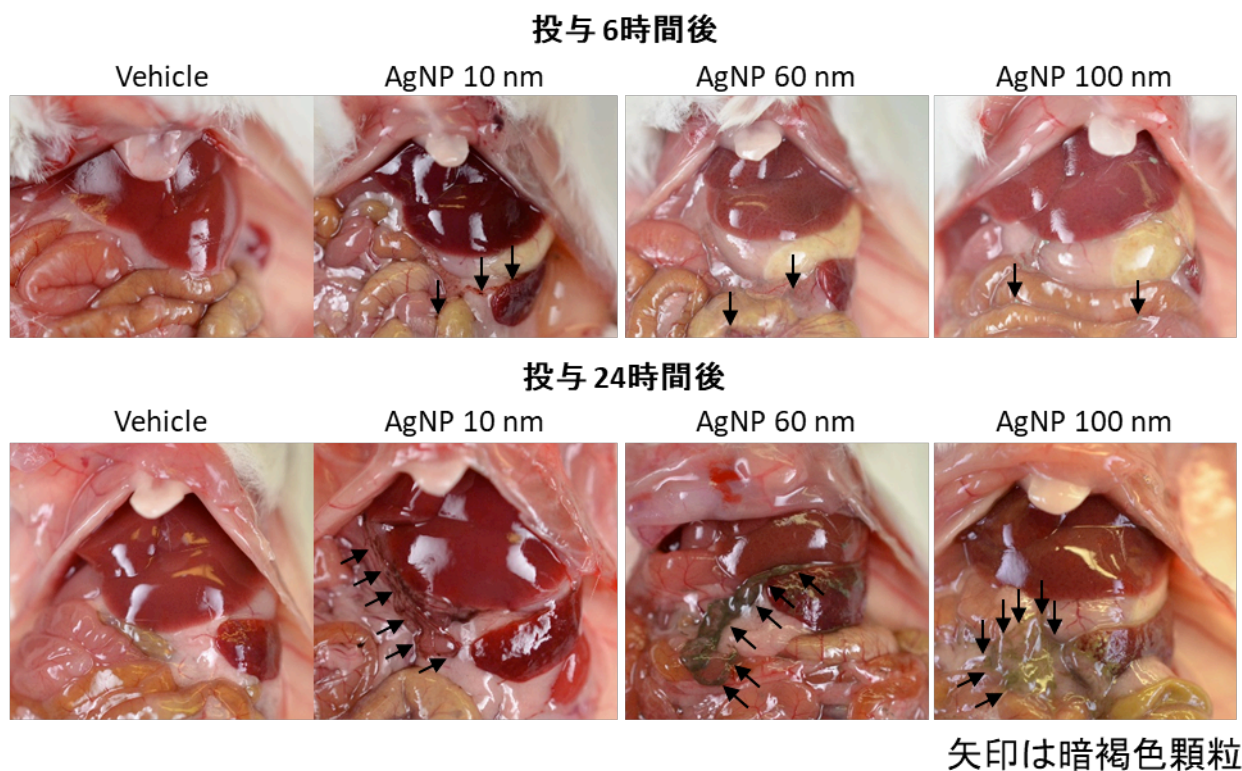


Figure 4. 剖検時の肉眼変化 (実験 1)

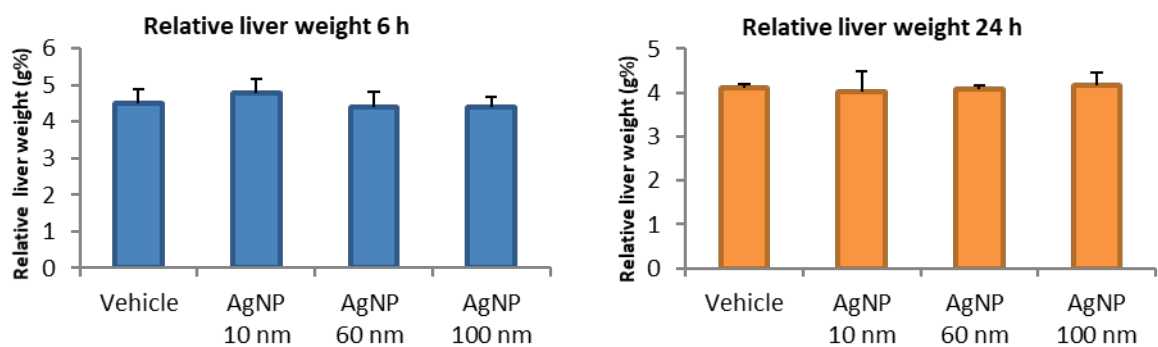


Figure 5. 相对肝重量 (実験 1)

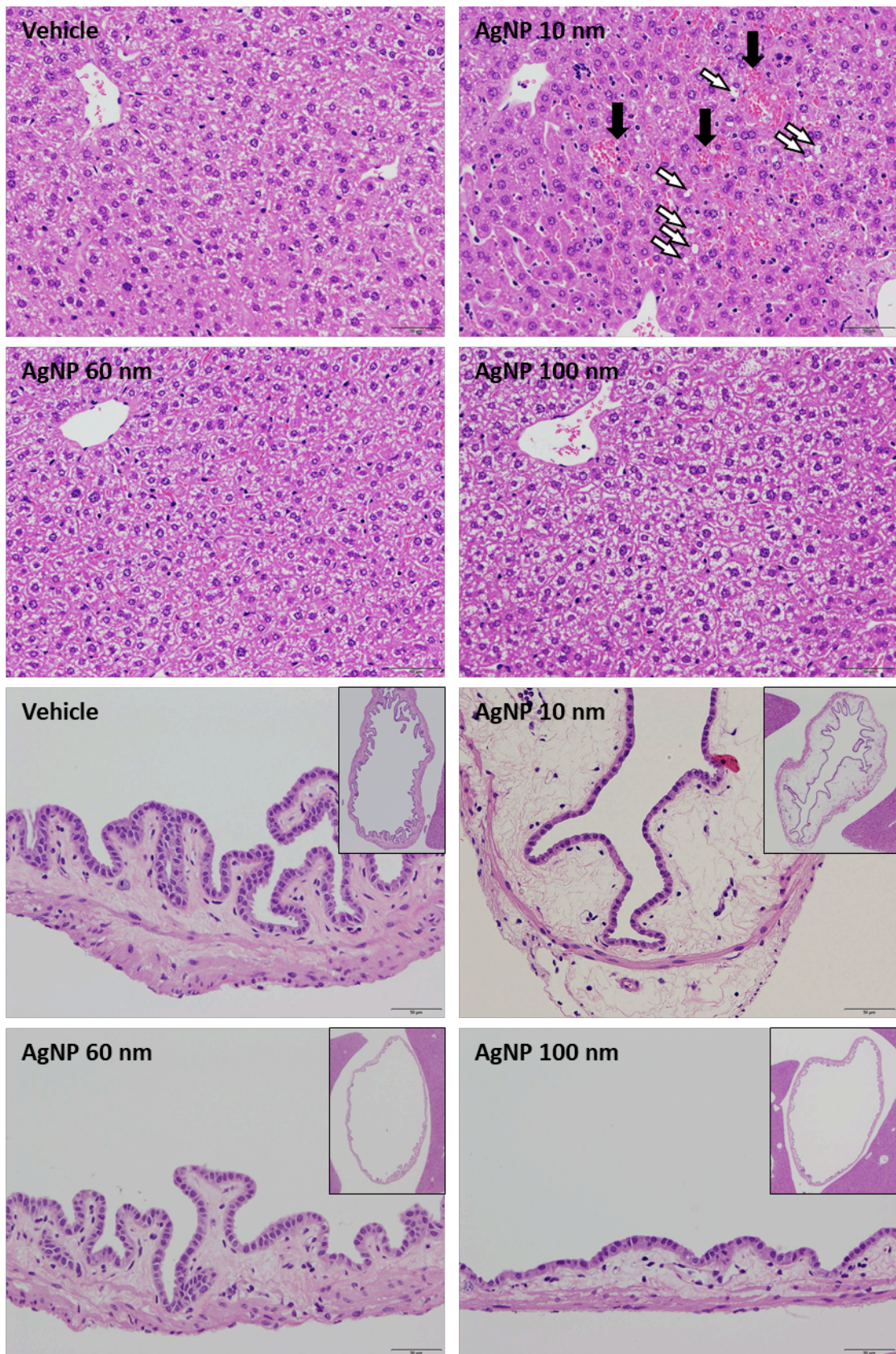


Figure 6. 肝臓及び胆嚢の病理組織写真(実験 1)。  
 AgNP 10 nm 群の肝臓のうっ血(黒矢印)、肝細胞の空胞化(白矢印)及び胆嚢粘膜下並びに漿膜の浮腫が認められた。



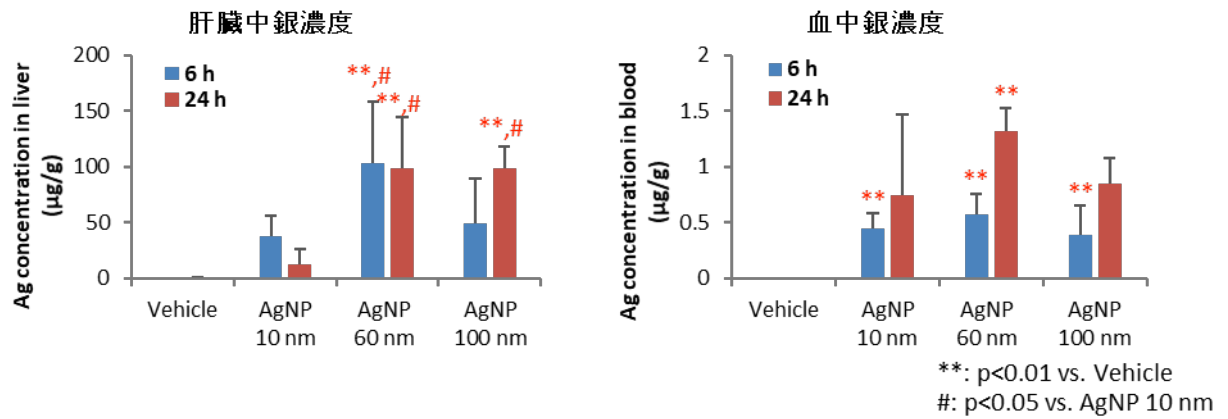


Figure 7. 肝臓中及び血中銀濃度 (実験 1)

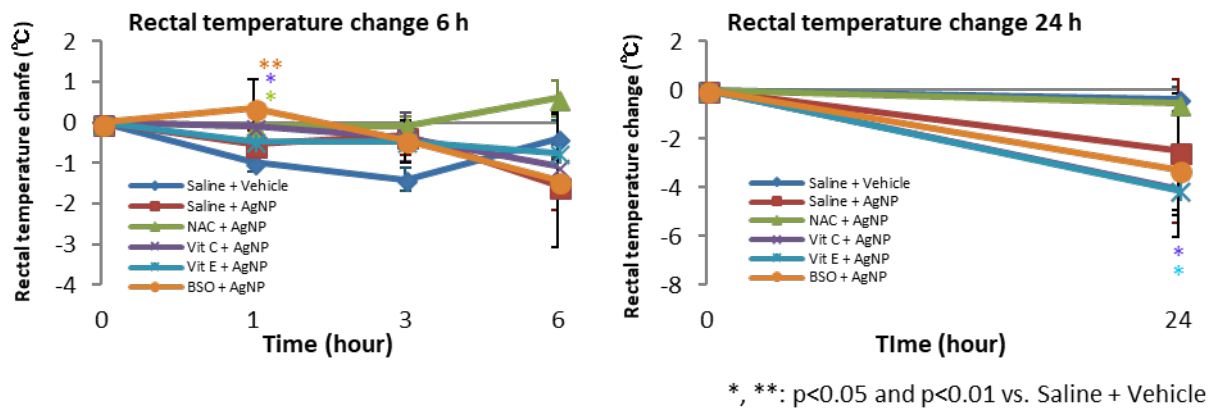


Figure 8. 相対肝重量及び体温変化 (実験 2)

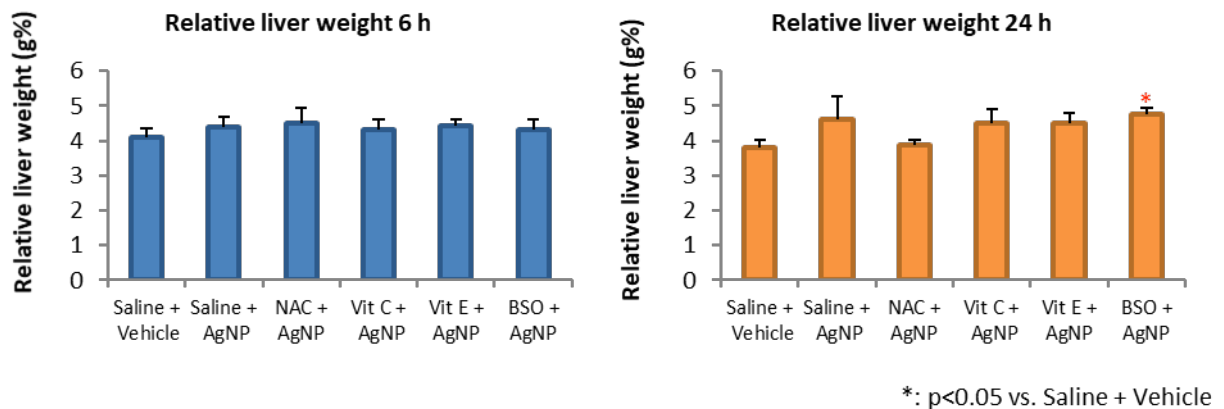
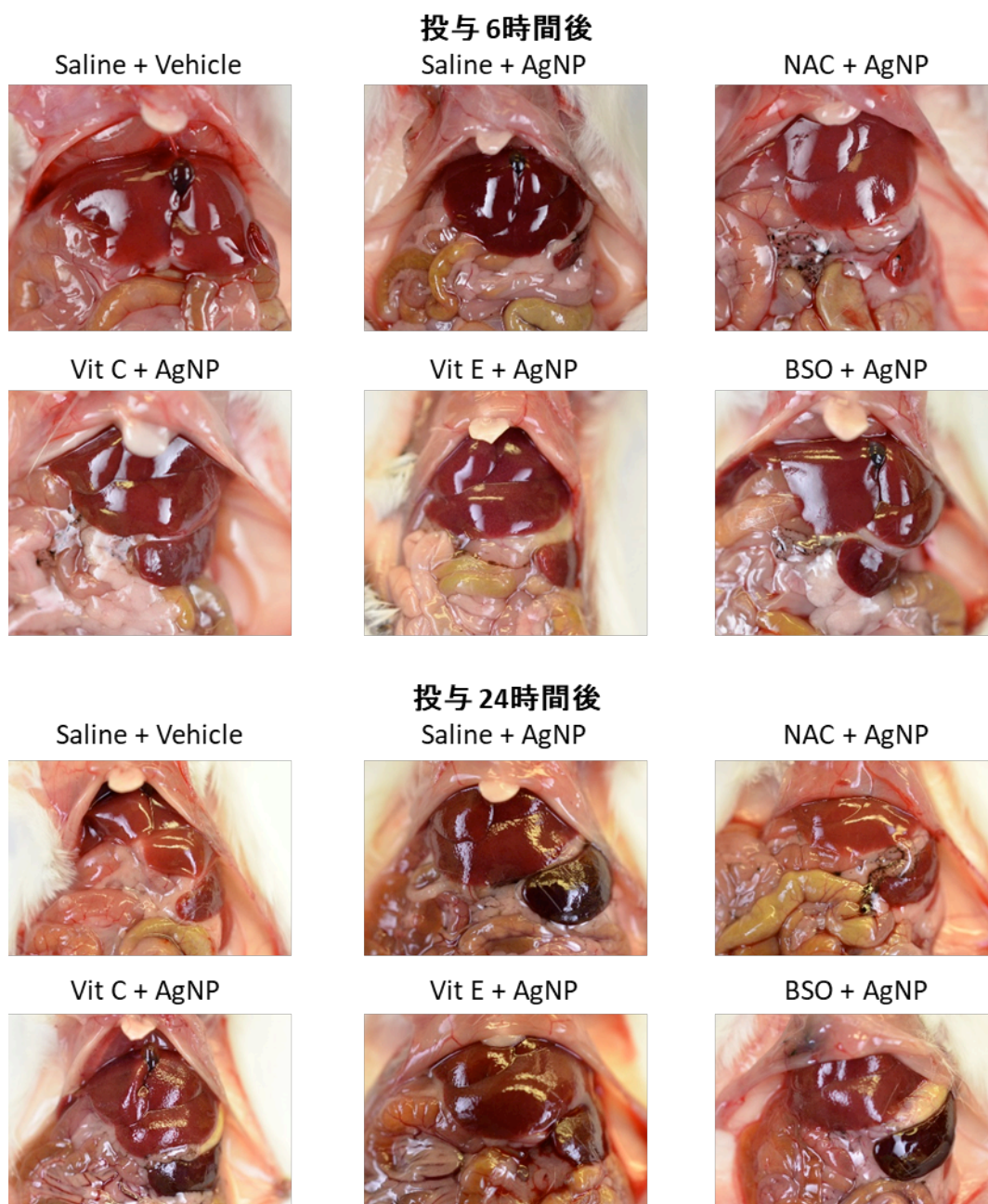
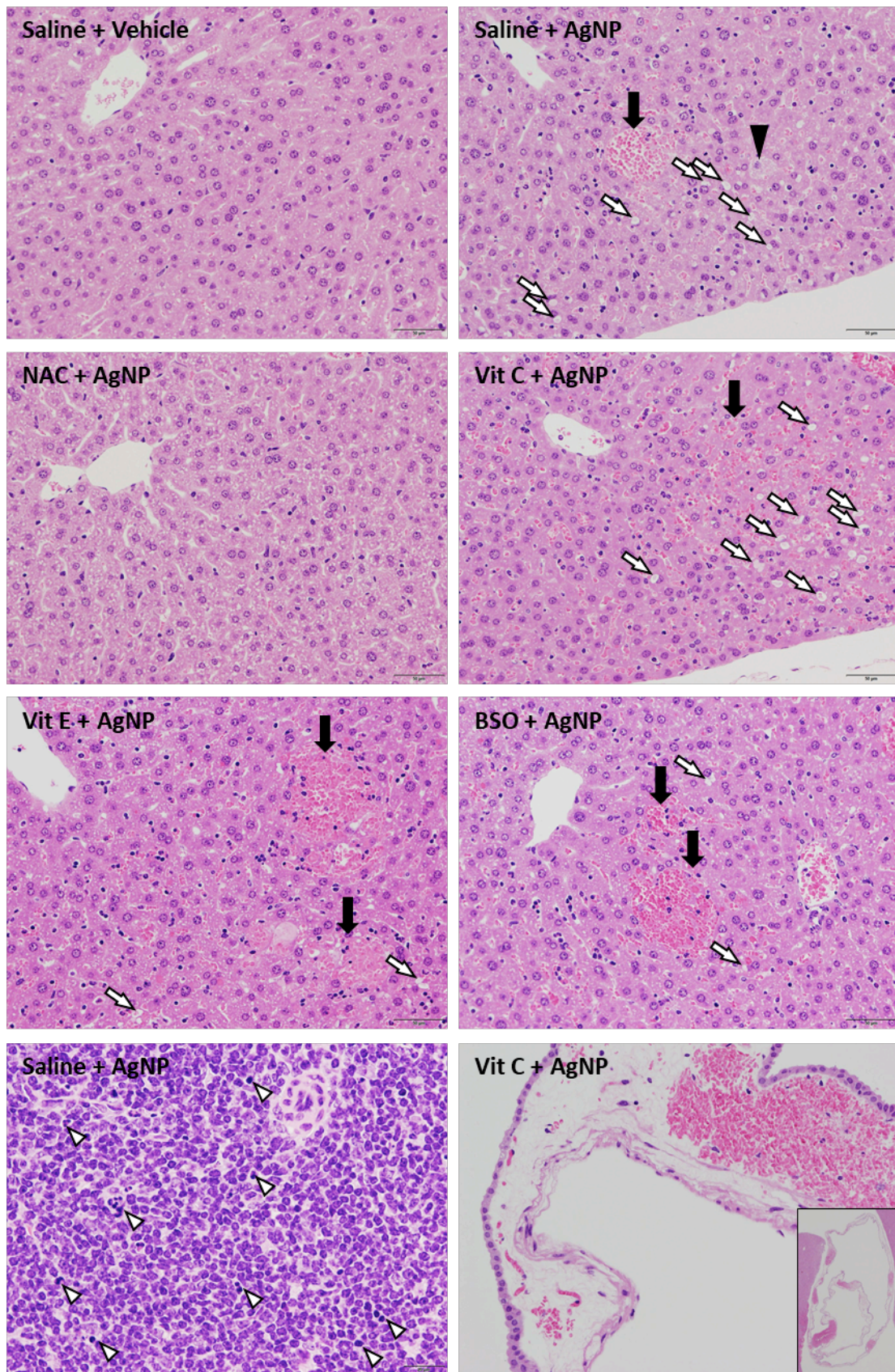


Figure 9. 相対肝重量 (実験 2)



**Figure 10. 剖検時の肉眼変化 (実験 2)**



**Figure 11. 肝臓、胆嚢、脾臓及び胆嚢の病理組織写真 (実験2)。**  
 Saline + AgNP、Vit C + AgNP、Vit E + AgNP及びBSO + AgNP群の肝臓のうっ血(黒矢印)、肝細胞の空胞化(白矢印)、Saline + AgNP群の肝臓の単細胞壊死(黒矢頭)、脾臓のアポトーシス(白矢頭)及びVit C + AgNP群の胆嚢粘膜下・漿膜の浮腫並びに出血が認められた。

**Table 1. Characteristics of tested AgNP reported by the manufacturer in the datasheet (実験 1)**

	10 nm AgNP	60 nm AgNP	100 nm AgNP
Lot No.	DMW0198	DMW0164	DMW0120
Diameter (nm)	9.6 ± 2	59.8 ± 6.2	104.3 ± 12.6
Coefficient of Variation (%)	20.4	10.3	12.1
Particle Concentration (mL <sup>-1</sup> )	2.2 x 10 <sup>14</sup>	9.1 x 10 <sup>11</sup>	1.7 x 10 <sup>11</sup>
Surface Area (m <sup>2</sup> /g)	55.1	9.4	5.3
Mass Concentration (mg/mL)	1.07	1.07	1.05
Endotoxin Concentration (EU/mL)	< 5	< 2.5	< 2.5
Zeta Potential (mV)	-39.4	-46.5	-49.3
pH of Solution	7.7	7.5	7.3
Hydrodynamic Diameter (nm)	13.3	65.8	107
Silver Purity (%)	99.99	99.99	99.99

**Table 2. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP up to 6 hours (実験 1)**

Organ and lesions	Treatment	6 h			
		Vehicle	10 nm AgNP	60 nm AgNP	100 nm AgNP
	No. of animals	5	5	6	5
Liver	Congestion, intermediate zone	0	4*	0	0
	Increased cellular component in sinusoid	0	3	0	0
	Vacuolation, hepatocyte	0	4*	0	0
	Oval cell hyperplasia	0	1	0	0
	Multinucleated cell	0	1	0	0
Gallbladder	Edema, subserosa	0	4*	0	0
Spleen	Congestion	0	1	0	1
	Apoptosis, white pulp	0	0	2	2
Thymus	Apoptosis, cortex	1	0	4	3
	+	1	0	3	0
	++	0	0	1	3
Thoracic lymph node	Apoptosis, medulla	0	0	1	1
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte +	0a	4	5	3b
Thoracic lymph node	+	0a	0	5	3b
	++	0a	4	0	0b
	Apoptosis	0a	0	0	2b
	Cell infiltration, neutrophil	0a	1	1	0b
Mesenterium	Inflammatory cell foci	5	5	6	5
	+	5	4	2	5
	++	0	1	4	0
Mesenteric lymph nodes	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	4*	6**	5**
	Apoptosis, cortex	1	3	3	2
Kidney	Regenerative tubules	5	5	5	4
Heart	Thrombus, right ventricle	1	0	0	0
	Thrombus, left ventricle	0	0	1	1
	Thrombus, left atrium	0	0	1	0
	Thrombus, intra mural	0	0	1	0
	Mineralization, epicardium	4	4	5	6
	Single cell necrosis	0	0	0	2
	Vacuolation	0	0	1	0
	Megalocyte, cardiomyocyte	0	0	0	2
	Lung	Hemorrhage	1	0	0
Dark brown pigment deposition, alveolar macrophage +		0	0	2	0
Pancreas	Hemorrhage	0	2	0	1

\*, \*\*, significantly different from the vehicle group at p<0.05 and 0.01, respectively. a; n=2, b; n=5.

**Table 3. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP up to 24 hours (実験1)**

Organ and lesions	Treatment	24 hr			
		Vehicle	10 nm AgNP	60 nm AgNP	100 nm AgNP
	No. of animals	3	3	3	3
Liver	Microgranuloma	0	1	1	0
Spleen	Apoptosis, white pulp	0	1	0	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte +/-	0	1	3	3
	+	0	1	0	0
	++	0	0	2	2
	+++	0	0	1	1
Mesenterium	Inflammatory cell foci	3	3	3	3
	+	0	2	2	0
	++	3	1	1	3
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	2	3	3
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, cortex	1	1	0	0
Kidney	Regenerative tubules	3	3	2	3
Heart	Mineralization, epicardium	3	2	2	3
Lung	Dark brown pigment deposition, alveolar macrophage	0	1	0	1
	+	0	1	0	0
	++	0	0	0	1

**Table 4. Serum biochemistry for Balb/C mouse treated with AgNP and antioxidants (実験2)**

		6 h					
		Saline + Vehicle	Saline + AgNP	NAC + AgNP	Vit C + AgNP	Vit E + AgNP	BSO + AgNP
No. of animals		4	5	5	5	5	4
TP	g/dL	4.5 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.6 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.3 ± 0.2	4.0 ± 0.5 *
ALB	g/dL	3.1 ± 0.1	2.8 ± 0.2 **	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.2 **
A/G		2.2 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.3 ± 0.7
BUN	mg/dL	19.4 ± 3.7	20.7 ± 2.9	23.4 ± 3.4	23.6 ± 2.2	22.4 ± 2.8	24.0 ± 7.7
Cre	mg/dL	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.02
Na	mEq/L	152 ± 2	153 ± 3	152 ± 1	151 ± 1	150 ± 2	150 ± 3
K	mEq/L	4.7 ± 0.4	4.7 ± 0.5	3.9 ± 0.4	5.0 ± 0.7	4.9 ± 0.5	5.7 ± 1.4
Cl	mEq/L	110 ± 6	109 ± 8	114 ± 1	110 ± 5	106 ± 8	108 ± 5
Ca	mg/dL	7.5 ± 0.3	7.2 ± 0.7	7.5 ± 0.4	6.7 ± 0.7	7.7 ± 0.6	6.9 ± 0.7
IP	mg/dL	10.1 ± 2.3	10.0 ± 0.9	9.1 ± 0.9	11.8 ± 1.9	10.1 ± 1.5	12.2 ± 3.1
AST	IU/L	113 ± 59	214 ± 85	110 ± 41	210 ± 43	253 ± 68 **	134 ± 11
ALT	IU/L	37 ± 12	16 ± 27	50 ± 42	5 ± 2	27 ± 28	19 ± 6
ALP	IU/L	506 ± 21	476 ± 40	443 ± 21	454 ± 54	506 ± 19	411 ± 35 **
γGTP	IU/L	<3	<3	<3	<3	<3	<3
T-CHO	mg/dL	68 ± 4	59 ± 2 **	64 ± 3	61 ± 5	68 ± 4	57 ± 3 **
TG	mg/dL	30 ± 8	14 ± 3 *	23 ± 9	21 ± 9	20 ± 7	13 ± 5 **
BIL	mg/dL	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.05	0.11 ± 0.08
Glucose	mg/dL	182 ± 18	98 ± 9 **	189 ± 31	117 ± 18 **	124 ± 22 **	123 ± 32 **

Each value represents the mean ± S.D.

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

**Table 5. Serum biochemistry for Balb/C mouse treated with AgNP and antioxidants (実験2)**

		24 h					
		Saline + Vehicle	Saline + AgNP	NAC + AgNP	Vit C + AgNP	Vit E + AgNP	BSO + AgNP
No. of animals		3	2	3	3	3	2
TP	g/dL	5.0 ± 0.1	4.4 ± 0.6	4.7 ± 0.1	4.1 ± 0.2 **	4.3 ± 0.1 *	4.2 ± 0.0 *
ALB	g/dL	3.3 ± 0.1	2.9 ± 0.4	3.0 ± 0.2	2.8 ± 0.1 *	2.9 ± 0.1	2.7 ± 0.1 *
A/G		2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.8 ± 0.3
BUN	mg/dL	24.3 ± 2.7	21.6 ± 8.5	22.5 ± 1.5	29.3 ± 4.2	31.5 ± 3.1	24.8 ± 3.1
Cre	mg/dL	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.15 ± 0.02
Na	mEq/L	156 ± 2	154 ± 2	155 ± 0	156 ± 1	159 ± 5	157 ± 1
K	mEq/L	4.2 ± 0.3	3.8 ± 0.8	4.5 ± 0.2	3.9 ± 0.4	3.6 ± 0.4	3.6 ± 0.3
Cl	mEq/L	112 ± 7	109 ± 9	117 ± 1	105 ± 8	101 ± 4	110 ± 11
Ca	mg/dL	8.4 ± 0.3	8.0 ± 0.6	8.7 ± 0.2	7.8 ± 0.6	8.0 ± 0.0	8.1 ± 0.7
IP	mg/dL	10.2 ± 1.0	8.4 ± 2.2	9.9 ± 0.6	8.2 ± 0.7	8.5 ± 0.9	8.2 ± 1.7
AST	IU/L	79 ± 4	304 ± 359	69 ± 10	514 ± 166 *	395 ± 46	384 ± 102
ALT	IU/L	34 ± 6	27 ± 16	20 ± 6	91 ± 105	22 ± 12	91 ± 47
ALP	IU/L	429 ± 88	400 ± 1	383 ± 29	389 ± 16	441 ± 9	360 ± 6
γGTP	IU/L	<3	<3	<3	<3	<3	<3
T-CHO	mg/dL	84 ± 6	71 ± 2 *	78 ± 2	75 ± 3	97 ± 4 *	77 ± 6
TG	mg/dL	36 ± 12	31 ± 5	29 ± 10	24 ± 12	29 ± 2	21 ± 18
BIL	mg/dL	0.07 ± 0.03	0.13 ± 0.07	0.07 ± 0.01	0.18 ± 0.05	0.18 ± 0.09	0.16 ± 0.01
Glucose	mg/dL	174 ± 20	125 ± 77	147 ± 18	97 ± 22	87 ± 28	82 ± 14

Each value represents the mean ± S.D.

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

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

Organ and lesions	Treatment	6 hr					
		Vehicle	AgNP	NAC + AgNP	Vit C + AgNP	Vit E + AgNP	BSO + AgNP
No. of animals		4	5	5	5	5	5
Liver	Congestion, intermediate zone	0	5**	0	5**	5**	3
	+	0	3	0	5**	4*	2
	++	0	2	0	0	1	1
	Increased cellular component in sinusoid	0	5**	0	4*	4*	1
	Vacuolation, hepatocyte	0	5**	0	3	1	3
	+	0	2	0	2	1	2
	++	0	3	0	1	0	1
	Cytoplasmic inclusions, hepatocyte	0	2	0	1	0	1
	+	0	1	0	1	0	1
	++	0	1	0	0	0	0
	Single cell necrosis, hepatocyte	0	1	0	0	0	0
	Focal necrosis, hepatocyte	0	0	0	1	0	0
	Dark brown pigment deposition, Kupffer cell	0	0	0	1	2	0
	+	0	0	0	1	0	0
++	0	0	0	0	2	0	
Gallbladder	Edema, subserosa	0	4*	3	3	1	4
	+	0	2	3	2	1	2
	++	0	2	0	1	0	1
Spleen	Hemorrhage	0	0	0	1	0	0
	Congestion +	0	1	0	0	1	0
+	0	1	0	0	0	0	
++	0	0	0	0	1	0	
Apoptosis, white pulp		0	2	0	4*	3	4*
	+	0	2	0	4*	1	3
	++	0	0	0	0	1	1
	+++	0	0	0	0	1	0
Thymus	Apoptosis, cortex	0	0	0	2	3	2
	+	0	0	0	2	3	1
	++	0	0	0	0	0	1
Hemorrhage		0	0	1	0	0	0
		0	0	0	0	0	1
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	4	4 <sup>b*</sup>	4 <sup>b*</sup>	5*
	Apoptosis	0 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	1	1 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0
Mesenterium	Inflammatory cell foci +/-	4	5	5	5	5	5
	+	2	3	2	5	4	4
	++	2	2	3	0	1	1
Dark brown pigment deposition, lymphocyte +		0	5**	5**	5**	5**	5**
		0	0	0	1	0	0
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, paracortex	0	0	0	1	0	0
Kidney	Regenerative tubules	4	3	4	4	5	5
Heart	Mineralization, epicardium	3	3	5	5	4	3
Lung	Hemorrhage +	0	1	3	1	1	0
	Dark brown pigment deposition, alveolar macrophage	0	0	0	0	2	0
Pancreas	Hemorrhage	0	0	1	0	1	0

\*,\*\*; significantly different from the vehicle group at p<0.05 and 0.01, respectively. a; n=3, b; n=4.

**Table 7. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP up to 24 hours (実験 2)**

Organ and lesions	Treatment	24 hr					
		Vehicle	AgNP	NAC + AgNP	Vit C + AgNP	Vit E + AgNP	BSO + AgNP
No. of animals		3	2	3	3	3	2
Liver	Congestion, intermediate zone	0	1	0	3	3	2
	+	0	0	0	1	0	1
	++	0	1	0	2	3	1
	Increased cellular component in sinusoid	0	1	0	3	3	1
	Vacuolation, hepatocyte	0	1	0	3	3	1
	+	0	0	0	2	2	1
	++	0	1	0	1	1	0
	Cytoplasmic inclusions, hepatocyte	0	1	0	3	3	1
	+	0	0	0	1	3	1
	++	0	1	0	2	0	0
	Single cell necrosis, hepatocyte	0	1	0	3	2	0
	+	0	1	0	2	2	0
	++	0	0	0	1	0	2
	Focal necrosis, hepatocyte	0	1	0	2	0	0
Dark brown pigment deposition, Kupffer cell	0	1	0	0	2	0	
Gallbladder	Edema, subserosa	0	0	0	2	1	2
	Hemorrhage	0	1	0	2	0	0
Spleen	Congestion	0	1	0	3	2	2
	Apoptosis, white pulp +	0	1	0	2	1	2
	+	0	1	0	0	1	2
Thymus	++	0	0	0	2	0	0
	Apoptosis, cortex	0	1	0	2	3	2
	Apoptosis, medulla	0	0	0	2	3	1
Thoracic lymph node	Hemorrhage	0	1	0	0	1	0
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte+	0	2	3	2	3	2
	Apoptosis	0	1	0	1	1	2
Mesenterium	Hemorrhage	0	0	0	0	1	0
	Inflammatory cell foci	3	2	3	3	3	2
	+	2	2	3	3	1	1
	++	1	0	0	0	2	1
Mesenteric lymph nodes	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	2	3	3	3	2
	Apoptosis, paracortex	0	0	0	1	0	0
Kidney	Regenerative tubules	3	2	3	2	3	2
Heart	Mineralization, epicardium	3	2	3	2	2	1
Lung	High cellularity, alveolar wall	0	1	0	0	0	0
	Hemorrhage	1	2	1	0	2	0
Pancreas	Hemorrhage	0	0	0	1	1	1