

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30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年度の検討において、我々はマウスに直径10 nm、60 nm及び100 nmのAgNPを単回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ことを報告した。AgNPの毒性を規定する要因として、重量あたりの表面積、サイズの相異による動態の違い、あるいは、粒子の表面修飾の関与等が議論されているが、現在の所、詳細は不明のままである。ナノマテリアルは様々な目的で表面修飾が施されており、それに影響も異なっていることが知られている。そこで、30年度の本研究では、高分子化合物、ポリビニルピロリドン（Polyvinylpyrrolidone, PVP）で表面修飾したAgNPの単回腹腔内投与による急性毒性について、AgNP（直径5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg）で腹腔内投与を行い、その影響について検討した。その結果、直径5 nm AgNP PVP投与群において、体温低下に加え、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表面修飾に加え、酸化的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、表面修飾、ポリビニルピロリドン

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))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少ない。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年度の検討において、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、その結果を報告した (CHO YM et. al., Toxicol Pathol. 2018;31 (73-80))。AgNP の毒性を規定する要因として、重量あたりの表面積あるいはサイズの相異による動態の違い等が想定されるが、現在の所、詳細は不明のままである。

ポリビニルピロリドン

(Polyvinylpyrrolidone, PVP) は工業用には水に溶けにくい物質を溶解・分散させるための溶解補助剤・分散剤として用いられ、ナノマテリアルにも立体安定剤として使用されている。

PVP で表面修飾した AgNP がラットの脳細胞に細胞毒性を誘発し、それには粒子のサイズ及び形態に依存した炎症の誘発と考えられた

(Trickler WJ et. al., Toxicol Sci. 2010;118 (160-170))。クエン酸又は PVP で表面修飾した AgNP をラットに気管内注入した結果、PVP 修飾 AgNP はクエン酸修飾 AgNP に比較して、BALF 中のマクロファージ中の銀は急速に減少し、肺組織からも迅速に排泄されていた

(Anderson DS et. al., Nanotoxicology. 2015;9(591-602))と報告されている。

本研究では、PVP で表面修飾した AgNP の急性毒性について、AgNP (直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg) を腹腔内投与し、その影響について検討した。

B. 研究方法

AgNP は nanoComposix 社の PVP コーティング銀ナノ粒子 (直径 5 nm (AGPB5)、10 nm

(AGP010)、60 nm (AGPB60) 及び 100 nm (AGPB100)、濃度 1 mg/ml) を用いることとした。AgNP を 0.2 mg/0.2 ml/マウスとなるよう希釈せずに投与した。

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 (投与 6 時間後解剖群) 又は 3 匹 (投与 24 時間後解剖群) とし、各群は以下の通りに構成した、① 溶媒対照 (Saline、Vehicle) 群、② 5 nm AgNP PVP 群、③ 10 nm AgNP PVP 群、④ 60 nm AgNP PVP 群、⑤ 100 nm AgNP PVP 群。単回腹腔内投与 (0.2 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。

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 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 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

5 nm AgNP PVP 群のすべての生存マウスで投与3時間後より活動低下及び促迫呼吸が認められた。全9匹（投与6時間及び24時間後解剖予定マウス各々6匹及び3匹）中、投与30分及び4時間後各々1匹ずつ死亡し、残りのすべての動物は投与4時間後に瀕死状態になった。投与24時間後に解剖予定の3匹は投与30分及び7時間後に各々1匹及び2匹死亡した。

5 nm AgNP PVP 群において、投与3時間後から有意な体温低下が認められた (Figure 2)。100 nm AgNP PVP 群において、AgNP 投与24時間後に僅かながら低温低下が認められた (Figure 2)。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 2)。投与6時間後の解剖時、5 nm AgNP PVP 群の肝臓及び脾臓は暗赤色調を呈していた (Figure 3)。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時間後の解剖時には、より多く観察された (Figure 3)。病理組織学的には、投与後6時間、5 nm AgNP PVP 群で、肝臓のうっ血、類洞内細胞数増加、肝細胞の空胞化、胆嚢の浮腫及び胸腺皮質の単細胞壊死が有意な高頻度に認められ、10 nm AgNP PVP 群の全例で、肝臓類洞内の黒褐色色素沈着が、一部で核分裂像が見られた (Figure 4, Table 1)。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 1)。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 2)。

D. 考察

26年度の研究で、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、AgNPの急性毒性は粒子のサイズによって異なることをあきらかにした。28-29年度は抗酸化剤 *N*-acetyl-L-cysteine (NAC)を含む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、AgNPによる急性毒性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。本年度は、高分子化合物、PVPで表面修飾したAgNPの急性毒性について、AgNP (直径5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg)で腹腔内投与を行い、その影響について検討した。

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。ナノマテリアルの高い分散性及び安定性のため、クエン酸、PVP、シリカ、1-ドデカンチオール及びアミノ化による表面修飾が行われている (<https://nanocomposix.com>)。我々は今までクエン酸修飾AgNPを用いて研究を行ってきたが、表面修飾の異なるAgNPを用いて様々な検討が行われている。PVPで修飾したAgNPがラットの脳細胞に細胞毒性を誘発し、それには粒子のサイズ及び形態に依存した炎症の誘発と考えられ、*in vitro*の結果ではあるが、AgNPの毒性におけるサイズによる違いについて一致した結果がほうこくされた (Trickler WJ et. al., *Toxicol Sci*. 2010;118 (160-170))。また、クエン酸又はPVPに表面修飾したAgNPをラットに気管内注入を行った結果、PVP修飾AgNPはクエン酸修飾AgNPに比較

して、BALF 中の マークロファージ中の銀は急速に減少し、肺組織からも迅速に排泄されていたことから、AgNP の表面修飾によって体内分布及び排泄の違いを誘発する可能性が示唆されている (Anderson DS et. al., Nanotoxicology. 2015;9(591-602))。

AgNP は酸性状態でイオン化が早まることが知られており、PVP はそのもの自体が弱い酸性を示すことから、40 nm 以下の PVP 修飾 AgNP はイオン化が早いとの報告がある

(<https://nanocomposix.com/pages/stability-and-shelf-life-of-small-pvp-silver-nanoparticles>)。これまで、クエン酸修飾 AgNP は投与 6 時間後まで死亡例は認められていないが、今回の検討において PVP 修飾 AgNP は投与 4 時間後から死亡例が認められ、強い毒性を示した。しかし、同じ 10 nm の AgNP において、クエン酸修飾 AgNP 投与群でのみ急性毒性が認められ、PVP 修飾 AgNP 投与によって毒性は認められなかった。考えられる理由としては、PVP 修飾によって細胞内分布に制限が生じた可能性が推測できる。実際、10 nm AgNP PVP 投与群で肝臓の類洞内黒褐色色素の沈着が認められたものの、病変は殆ど認められなかった。10 nm AgNP PVP 投与群の一部で認められた、核分裂像はクエン酸修飾 60 nm AgNP 投与群においても認められた病変であり、細胞の明らかな病変を示さないが、防御反応との関連が疑われる。何れの実験でも、検討したサイズの中で最小の AgNP で強い毒性が認められ、サイズが小さい程、強い毒性を示す、我々の今までの報告と一致した結果が得られた。修飾の異なる両物質の毒性メカニズムは大きく異なることは無いと思われるが、PVP 修飾 AgNP の狭い安全域及び毒性強度の違いに関する詳細な研究が必要と考えられた。

E. 結論

本研究では、高分子化合物、PVP に修飾した AgNP の急性毒性について、AgNP (直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg) で腹腔内

投与を行い、その影響について検討した。

その結果、その結果、5 nm AgNP PVP 投与群において、体温低下に加え、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表面修飾に加え、酸化ストレスの関与に関する解析を進めることが必要である。

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)

Cho YM, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Ogawa K: Effects of antioxidants on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. The Korean Society of Toxicologic Pathology 2018 (2018. 10. 25)

曹永晩, 水田保子, 赤木純一, 豊田武士, 井手鉄哉, 小川久美子: 腹腔内投与銀ナノ粒子によるBALB/cマウスの急性毒性における抗酸化剤の影響. 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2019. 1. 31)

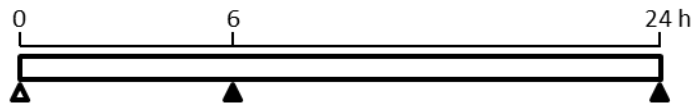
Cho YM, Akagi J, Mizuta Y, Toyoda T, Ogawa K: Effects of N-acetyl-L-cysteine on acute toxicity of silver nanoparticles intraperitoneally administered in BALB/c mice. 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2019. 3. 12)

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., 0.2 ml/mouse)
Silver nanoparticles (5-100 nm AgNP PVP, i.p., 0.2 mg/mouse)
 - ① Saline (vehicle)
 - ② 5 nm AgNP PVP
 - ③ 10 nm AgNP PVP
 - ④ 60 nm AgNP PVP
 - ⑤ 100 nm AgNP PVP
- ▲ Sacrifice

Figure 1. 実験デザイン

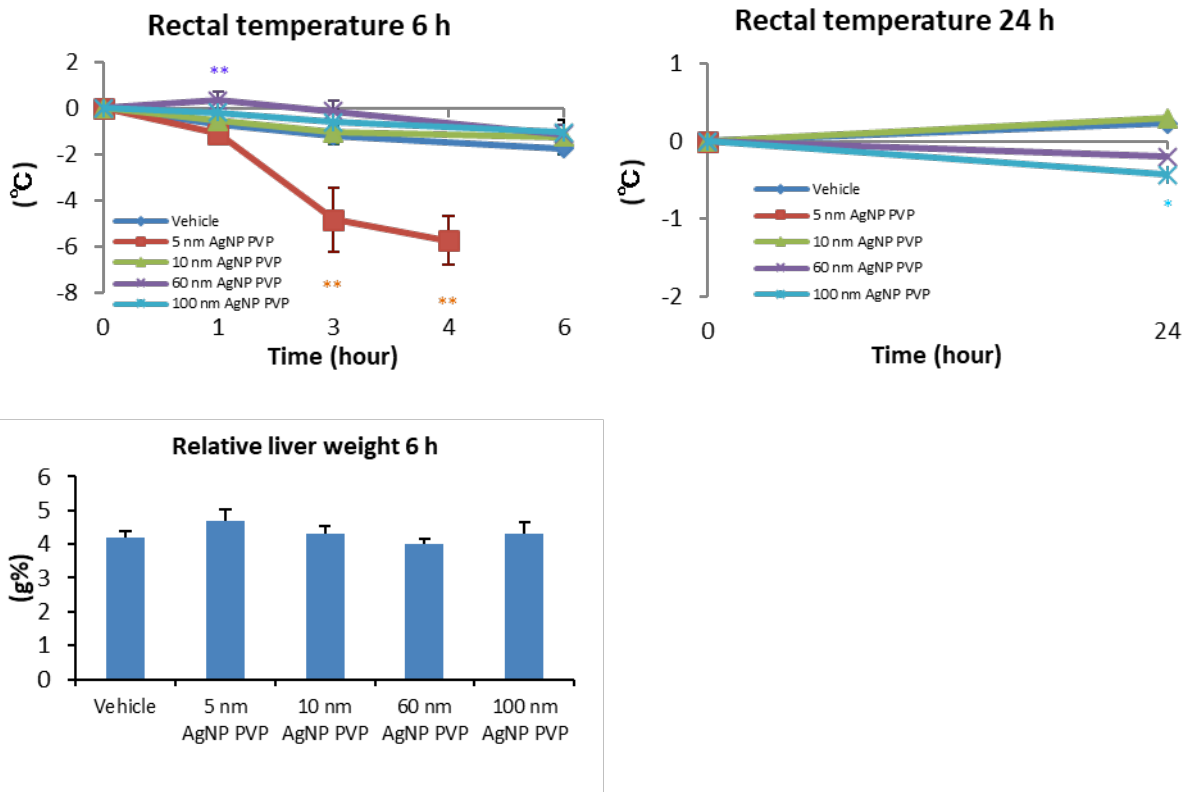


Figure 2. 体温変化及び相対肝重量

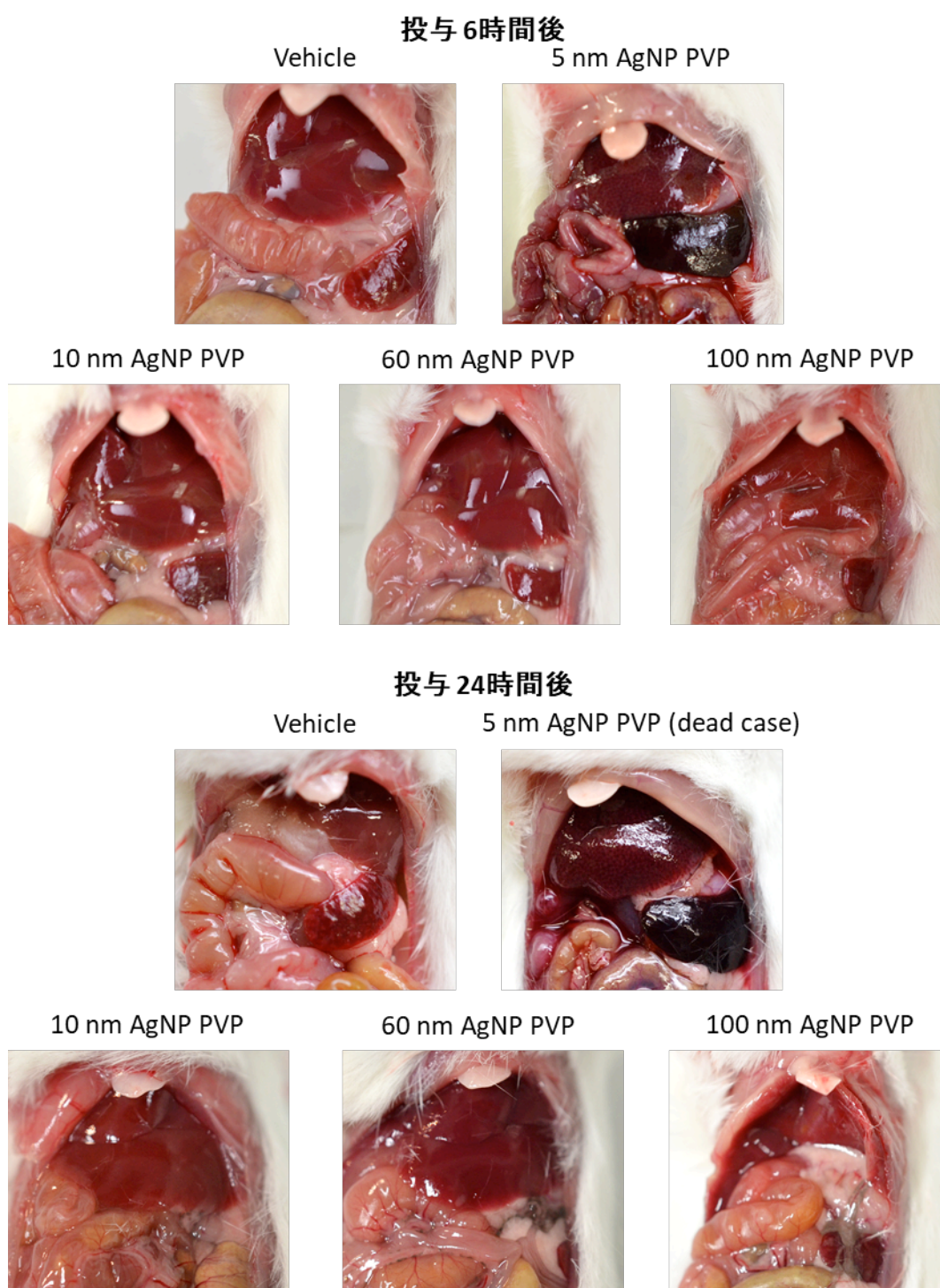


Figure 3. 剖検時の肉眼変化

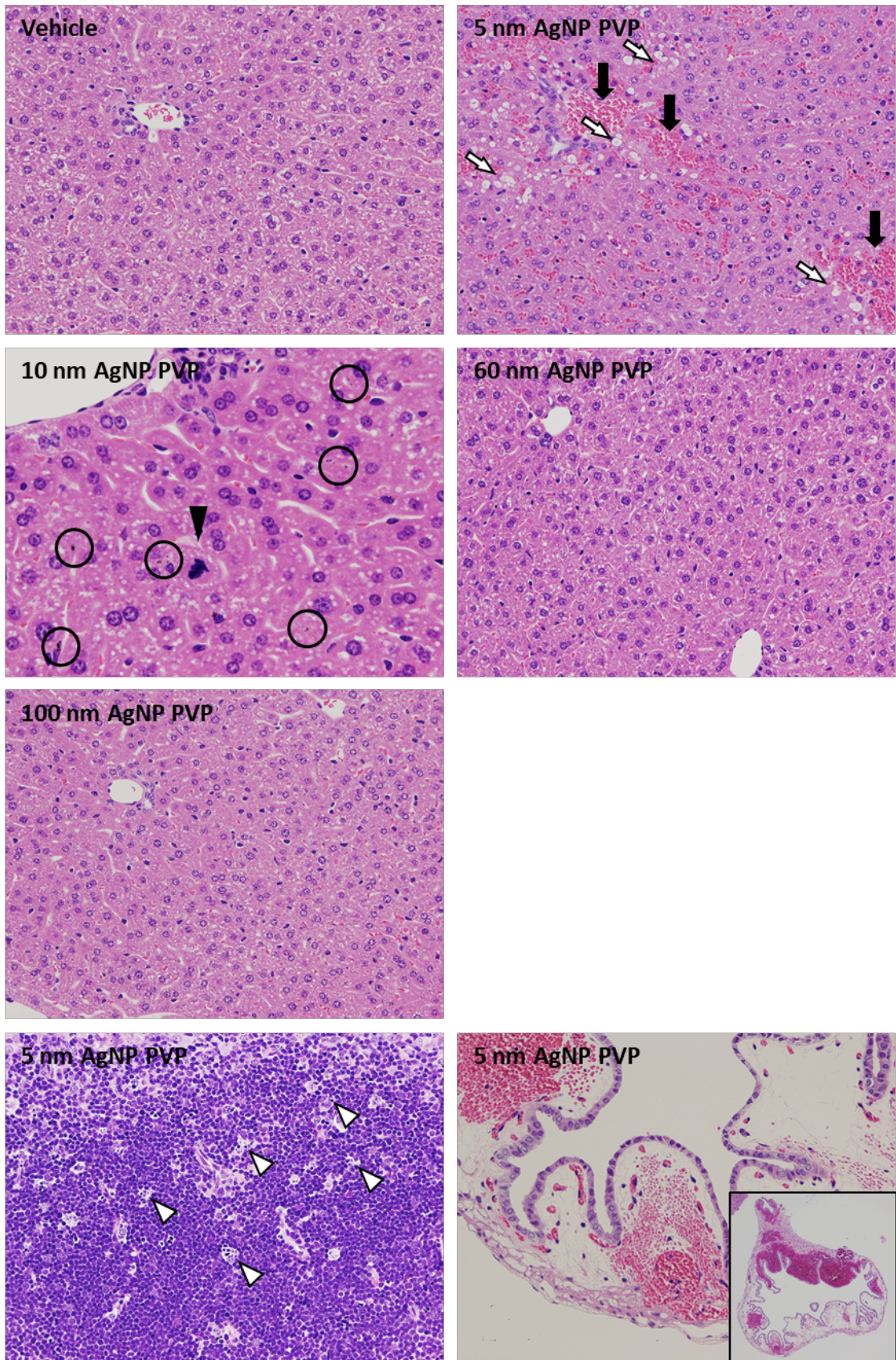


Figure 4. 肝臓、胆嚢、胸腺及び胆嚢の病理組織写真。
 5 nm AgNP PVP 群の肝臓のうっ血（黒矢印）、肝細胞の空胞化（白矢印）、胸腺のアポトーシス（白矢頭）及び胆嚢粘膜下・漿膜の浮腫並びに出血が認められた。10 nm AgNP PVP 群の肝臓の類洞内黒褐色色相沈着（円内）及び核分裂像（黒矢頭）が観察された。

Table 1. Histopathological findings for Balb/C mice treated with AgNP PVP up to 6 hours

Organ and lesions	Treatment	6 hr				
		Vehicle	5 nm AgNP PVP	10 nm AgNP PVP	60 nm AgNP PVP	100 nm AgNP PVP
	No. of animals	5	4	5	5	5
Liver	Congestion, intermediate zone	0	4 **	0	0	0
	Increased cellular component in sinusoid	0	3 *	0	0	0
	Vacuolation, hepatocyte	0	4 **	0	0	0
	Single cell necrosis, hepatocyte	0	1	1	0	0
	Mitosis, hepatocyte	0	0	1	0	0
	Degeneration	0	0	1	0	0
	Dark brown pigment deposition in sinusoid	0	0	5 **	0	0
	Microgranuloma	1	0	0	2	2
Gallbladder	Edema, submucous	0	4 **	0	0	1
	Edema, subserosa	0	4 **	0	0	1
	Hemorrhage	0	1	0	0	0
Spleen	Congestion	0	1	0	1	0
Thymus	Apoptosis, cortex	0	4 **	0	0	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	3 *	5 **	5 **	4 *
Intestine	Congestion, small intestine, lamina propria	0	1	0	0	0
Mesenterium	Inflammatory cell foci +/-	5	4	2	3	2
	Inflammatory cell foci +	0	0	2	0	1
	Inflammatory cell foci ++	0	0	1	2	2
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	4 **	5 **	5 **	5 **
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, increased, lymphocyte	3	3	4	1	2
	Hemorrhage	0	1	0	0	0
Kidney	Regenerative tubules	4	3	5	3	3
Heart	Mineralization, epicardium	5	4	4	4	5
	Karyomegaly	0	0	0	1	0
Pancreatic lymph node	Hemorrhage	0	1	0	0	0

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

Table 2. Histopathological findings for Balb/C mice treated with PVP AgNP up to 24 hours

Organ and lesions	Treatment	24 hr				
		Vehicle	5 nm AgNP PVP	10 nm AgNP PVP	60 nm AgNP PVP	100 nm AgNP PVP
	No. of animals	3	0	3	3	3
Liver	Microgranuloma	0	0	0	1	2
Gallbladder	Edema, submucous	0	0	1	0	0
	Edema, subserosa +	0	0	1	0	0
Spleen	Congestion	0	0	1	0	0
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte +	0	0	2	3	3
Mesenterium	Inflammatory cell foci +/-	3	0	1	0	1
	Inflammatory cell foci +	0	0	1	2	0
	Inflammatory cell foci ++	0	0	1	1	2
	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	0	3	3	3
Mesenteric lymph nodes	Apoptosis, increased, lymphocyte	1	0	0	0	0
Kidney	Regenerative tubules	1	0	2	1	2
Heart	Mineralization, epicardium	2	0	2	1	0
	Mineralization, myocardium	1	0	0	0	0
Pancreatic lymph node	Dark brown pigment deposition, lymphocyte	0	0	0	1	0
Cerebellum	Vacuolation	3	0	3	3	3