

厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全確保推進研究事業)
「食品用途となるナノマテリアルの暴露による毒性評価に関する研究」
分担研究報告書 (令和元年度)

分担研究課題名: 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 部長
研究分担者: 西川 秋佳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 客員研究員
研究分担者: 曹 永晩 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

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 を等量単回腹腔内投与したところ、10 nm の AgNP 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誘導されることを見出した。30 年度には、ポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone, PVP) で表面修飾した AgNP (直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg)を単回腹腔内投与したところ、直径 5 nm AgNP PVP 投与群のみにおいて、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、AgNP の毒性影響は粒子のサイズに相関することが再確認された。本年度は、形状の異なるナノ銀として、PVP でコートされた微細な板状のナノプレート(AgNP PVP プレート;厚さ 10nm、長径 30 nm, 50 nm, 100nm)を用いてマウスへの腹腔内投与による急性毒性を検討するとともに、これまでに得られた直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP を等量単回腹腔内投与したマウス肝臓組織の遺伝子発現パターンについて PCR array を用いてクラスタリング解析を実施した。AgNP PVP プレートの毒性については、投与 6 時間及び 24 時間後において、いずれの投与群も体温、肝臓重量、脾臓重量、及び肝臓での病理組織学的変化には明らかな毒性学的変化は認めなかった。一方で、何れのサイズの AgNP PVP プレートにおいても、投与部位である腹膜の炎症及び血管炎が誘発された。また、これまでの検討で得られた粒子状の AgNP の腹腔内投与 6 時間後のマウス肝臓における遺伝子発現を検討したところ、10 nm AgNP 投与群の肝臓は、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の肝臓とは異なるクラスターに分類され、直径 10 nm の AgNP 腹腔内投与 6 時間後のマウス肝臓における遺伝子発現が増加しているものとして、Slc2a1, Hmox1, Mmp9, Serpine1 等の Hypoxia response 関連因子および、Ccrp, Ccl12 等の Inflammatory response 関連因子が検出され、10 nm の AgNP 特異的な急性肝毒性には、肝臓局所あるいは全身の低酸素応答が関連している可能性が示唆された。

キーワード: ナノ銀、急性毒性、マウス、肝臓、遺伝子発現パターン

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と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 AgNP の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 OVA の有無にかかわらず、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、その結果を報告した (CHO YM et. al., Toxicol Pathol. 2018;31 (73-80))。30 年度には、ナノマテリアルの立体安定剤として使用されているポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone, PVP) で表面修飾した AgNP (直径 5 nm、10 nm、60 nm、100 nm AgNP 0.2 mg) をマウスの腹腔内投与し、その影響について検討したところ、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された。AgNP の急性毒性メカニズムについては十分に知られておらず、ナノ粒子のサイズ及び表面修飾に加え、酸化的ストレスの関与に関する解析を進めることが必要と考えられた。本年度は、形状の異なるナノ銀として微細な

板状のナノプレート(厚さ 10nm、長径 30 nm, 50 nm, 100nm)を用いてマウスへの腹腔内投与による急性毒性を検討するとともに、これまでに得られた直径 10 nm、60 nm 及び 100 nm の AgNP を等量単回腹腔内投与したマウス肝臓組織の遺伝子発現パターンについて PCR array を用いて比較検討した。

B. 研究方法

実験1) ナノプレートの急性毒性

AgNP は nanoComposix 社の PVP コートナノ銀プレート (厚さ 10 nm, 長径 30 nm (SPPH550-10M)、50 nm (SPPH750-10M)、及び 100 nm (SPPH950-10M)、濃度 1 mg/ml in aqueous 5 mM Borate)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。購入時のデータシートでは、プレートは角が丸みを帯びた正三角形～円形を呈しており、それぞれのサイズ分布は 15-65, 50-170, 70-190 nm で、ピークは 35, 90, 110 nm であった。

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 5 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 (5 mM Borate, Vehicle) 群、② 30 nm AgNP PVP プレート群、③ 50 nm AgNP PVP プレート群、④ 100 nm AgNP PVP プレート群。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、腸管膜、腸管膜リンパ節、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 標本作製し、病理組織学的検討を行った。

実験2) ナノ銀投与マウス肝臓の PCR-array

これまでの検討で得られて凍結保存されていた、直径 10, 60, 100 nm の球状の AgNP を単回腹腔内投与 6 時間後に摘出したマウス肝臓(n=3)から mRNA を抽出し、QUAGEN 社の RT² Profiler PCR アレイの mouse stress and toxicity pathway finder, mouse molecular toxicology pathway finder, Cellular stress responses を用いて、搭載されているそれぞれ 84 の遺伝子発現について、プロトコールに沿って検討した。10 nm の AgNP 投与マウスの肝臓 3 サンプルにおいて、対照群および 60 nm ならびに 100 nm AgNP 投与群の肝臓サンプルと異なる発現を示す遺伝子を抽出した。

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。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

実験1) ナノプレート投与の急性毒性

AgNP PVP プレート投与群を含め、いずれのマウスにおいても全身状態の異常は見られなかつ

た。投与後の直腸温変化について、6 時間観察群では、50 nm 群(1, 3, 6 時間後)及び 30 nm 群(3 時間後)で有意な変動が見られた(Figure 2)。また、6 時間後の相対肝臓重量、相対脾臓重量、及び、24 時間後の体重、相対肝臓重量、相対脾臓重量には群間に差異は見られなかった(Figure 3)。

血液生化学検査では、投与 6 時間後において、Cl の有意な高値が 100 nm 群に、T-cho の有意な低値が 30 nm および 100 nm 群に、TG の有意な低値が 50 nm 群に認められた。また、投与 24 時間後において、ALB の有意な低値が 30 nm 群に、ALP の有意な低値が 30 nm および 50 nm 群に認められた(Table 1,2)。

剖検時、6 時間後及び 24 時間後とも、AgNP PVP プレート投与群では、腸間膜表面や胸腺近傍のリンパ節が黒色調を呈していた。

病理組織学的検査では、投与 6 および 24 時間後において、いずれの群でも肝臓には投与に関連した明らかな変化は見られなかった。ナノ銀と考えられる微細な黒褐色色素沈着は、投与 6 および 24 時間後にすべての AgNP PVP プレート投与群において、腹膜表面および気管周囲リンパ節で観察された(Figure 4, Table 3,4)。腹膜表面のリンパ球浸潤は投与 6 および 24 時間後に溶媒投与群にも観察されたが、AgNP PVP プレート投与群でやや高度であった。また、色素沈着部の近傍において腹膜脂肪織内への好中球浸潤を伴う、血管炎が投与 6 時間後の全ての AgNP PVP プレート投与群に観察され、30 nm 群では 24 時間後にも 3 匹中 1 匹に観察された。血管炎は血管壁に好中球主体の炎症細胞浸潤を示すと共に血管内腔に好中球の集簇が認められた(Figure 4, Table 3, 4)。また、いずれの群においても、腎臓の再生尿細管および心臓心外膜の鉍質沈着が散見された。

実験2) ナノ銀投与マウス肝臓の PCR-array

3 セットの pathway finder について PCR-array を用いてクラスタリング解析を実施したとこ

る、10 nm AgNP 投与群の 3 サンプルは、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の合計 9 サンプルとは異なる発現パターンをとっていることが示された。10 nm AgNP 投与群の 3 サンプルで共通して発現増加している遺伝子として Slc2a1, Hmox1, Mmp9, Serpine1 等の Hypoxia response 関連因子および、Crp, Ccl12 等の Inflammatory response 関連因子が検出された(Figure 5)。

D. 考察

実験1) ナノプレートの急性毒性

我々はこれまでの検討において、の球状 AgNP がサイズによって毒性発現が異なることを示してきた。本年度はプレート状の PVP コートナノ銀プレート (厚さ 10 nm, 長径 30 nm、50 nm、及び 100 nm) について検討した。その結果、厚さ 10 nm, 長径 30 nm の AgNP PVP プレートについても、明らかな一般状態、肝重量、脾重量の変化は見られなかった。投与後の直腸温変化では、6 時間観察群において、50 nm 群(1, 3, 6 時間後) 及び 30 nm 群(3 時間後) で有意な変動が見られるものの、同群では溶媒対照群で軽度の体温低下が見られていること、24 時間観察群では、1, 3, 24 時間後のいずれも直腸温の変動は見られないことから、毒性学的意義は乏しいと考えられた。血液生化学検査では、投与 6 時間後において、Cl の有意な高値が 100 nm 群に認められたが、他の電解質に変動は見られず、意義は乏しいと考えられた。T-cho の有意な低値が 30 nm および 100 nm 群に、TG の有意な低値が 50 nm 群に認められ、脂質代謝がわずかに抑えられる傾向がみられた。投与 24 時間後において、ALB の有意な低値が 30 nm 群に、ALP の有意な低値が 30 nm および 50 nm 群に認められたが、肝臓に関連する他のパラメーター及び病理組織学的検討において明らかな変化は伴っておらず、毒性学的意義は乏しいと考えられた。これまで検討において、直径 10 nm のクエン酸コート AgNP 粒子及び直径 5 nm の PVP コート AgNP 粒子の腹腔内投与によ

って肝臓のうっ血、肝細胞の空胞化、細胞質内封入体、単細胞壊死等が観察されたが、今回の AgNP PVP コートプレートを用いた検討では、肝臓の変化は認めなかった。形状の相違による生態反応の相違の検討を目的としたが、今回用いたプレート状のナノ粒子は 1 辺は 10 nm とされているが他辺の大きさとしては、これまでに明らかな毒性が認められた粒子状の AgNP に比較すると大きいと考えられ、肝臓内への分布は起こらなかったと考えられる。一方で、AgNP PVP プレート投与 6 時間後において、AgNP 粒子と同様に腹腔内のリンパ節には、黒褐色色素沈着は見られず、気管周囲リンパ節では色素沈着が見られた。また、腹膜表面へのリンパ球集簇は溶媒群でも認められるが、黒褐色色素沈着をともなう結節状のリンパ球集簇巣が AgNP PVP プレート投与 6 時間後は全群に、投与 24 時間後は 30 nm 及び 50 nm 群に認められ、小型の AgNP PVP プレートは長く留まる可能性が見られた。また、腹膜脂肪織内への好中球浸潤を伴う、血管炎が投与 6 時間後の全ての AgNP PVP プレート投与群に観察され、30 nm 群では 24 時間後にも 3 匹中 1 匹に観察された。血管炎は血管壁への炎症細胞浸潤と血管内腔での好中球集簇があり、出血及び血流の乱れ並びに血栓形成を誘発する可能性があると考えられた。黒褐色色素沈着をともなうリンパ球集簇の近傍で観察されており、ナノ銀の存在との関連が示唆されるが、発生機序及び毒性学的意義については、今後の検討が必要と考えられた。

実験2) ナノ銀投与マウス肝臓の PCR-array

3 セットの pathway finder を用いた PCR-array による遺伝子発現のクラスタリング解析において、10 nm AgNP 投与群の肝臓では、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の肝臓とは異なるクラスターに分類された。異なる発現パターンをとる遺伝子として、Slc2a1, Hmox1, Mmp9, Serpine1 等の Hypoxia response 関連因子および、Crp, Ccl12 等の Inflammatory response 関連因子が検出され、

10 nm の AgNP 特異的な急性肝毒性には、肝臓局所あるいは全身の低酸素応答が関連している可能性が示唆された。

E. 結論

本研究では、プレート状の PVP コートナノ銀プレート (厚さ 10 nm, 長径 30 nm、50 nm、及び 100 nm) についてマウスの腹腔内投与による急性毒性を検討した。その結果、厚さ 10 nm, 長径 30 nm 以上の AgNP PVP プレートにおいては、全身状態への影響を及ぼす変化は認めなかった。一方で、何れのサイズの AgNP PVP プレートにおいても、投与部位である腹膜の炎症及び血管炎が誘発された。また、これまでの検討で得られた粒子状の AgNP の腹腔内投与後のマウス肝臓における遺伝子発現を検討したところ、10 nm AgNP 投与群の肝臓は、対照群、60 nm AgNP 投与群及び 100 nm AgNP 投与群の肝臓とは異なるクラスターに分類され、低酸素及び炎症関連の遺伝子発現が肝臓での毒性影響に関連していると考えられた。

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, 赤木純一, 井手鉄哉, 豊田武士, 山下修司, 平田岳史, 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関する検討.

第 34 回発癌病理研究会 (2019.8.28)

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 *N*-acetyl-l-cysteine の影響.

第 5 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2019.9.14)

Ogawa K, Cho YM, Ide T, Akagi J, Toyoda T,

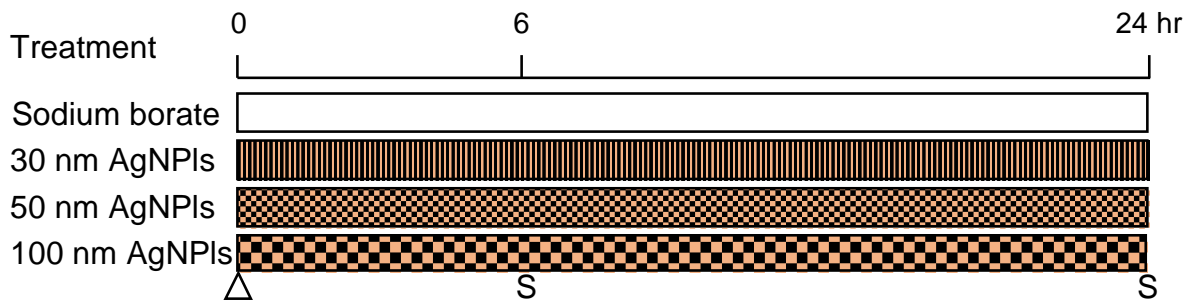
Yamashita S, Hirata T: Size-dependent toxicity of silver nanoparticles. Global Summit on Regulatory Science 2019 (2019.9.25)

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



Animal ; 6 week old, BALB/c, female

△ Sodium borate (5 mM, i.p., 0.3 ml/mouse)

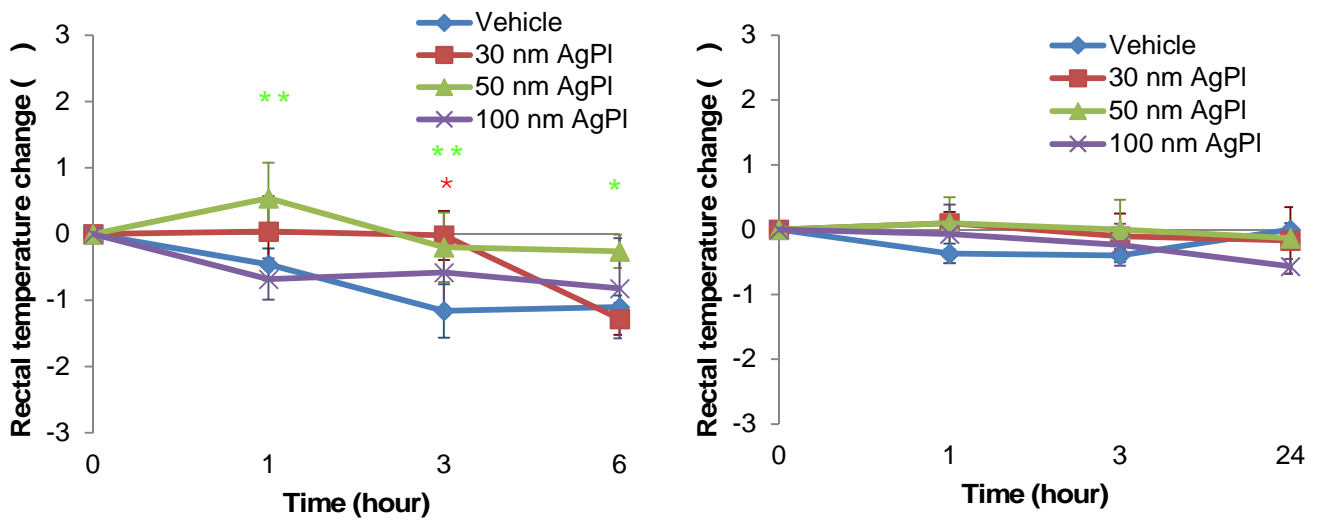
▨ Silver nanoplates (30 nm AgNPI, i.p., 0.2 mg/mouse)

▩ Silver nanoplates (50 nm AgNP, i.p., 0.2 mg/mouse)

▧ Silver nanoplates (100 nm AgNPI, i.p., 0.2 mg/mouse)

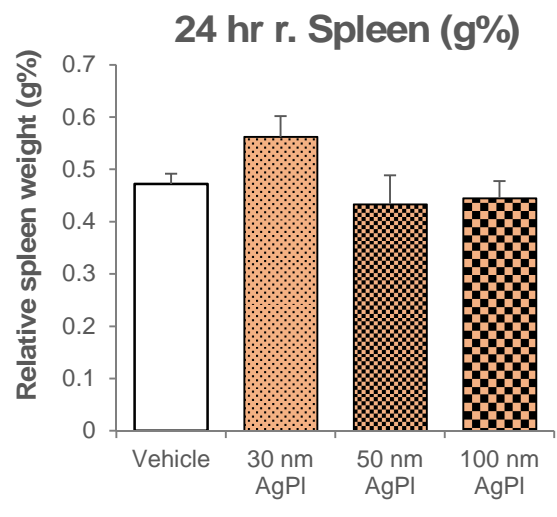
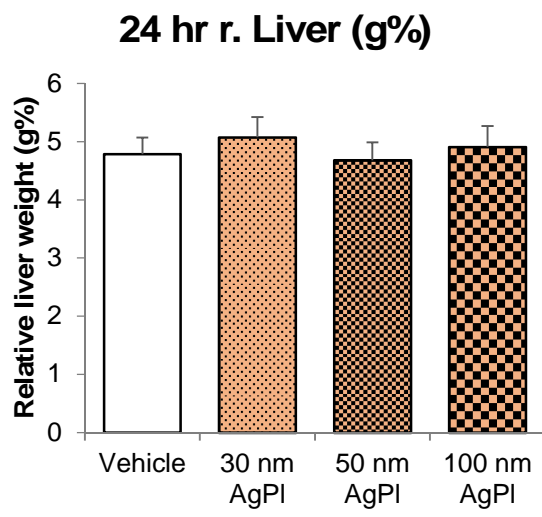
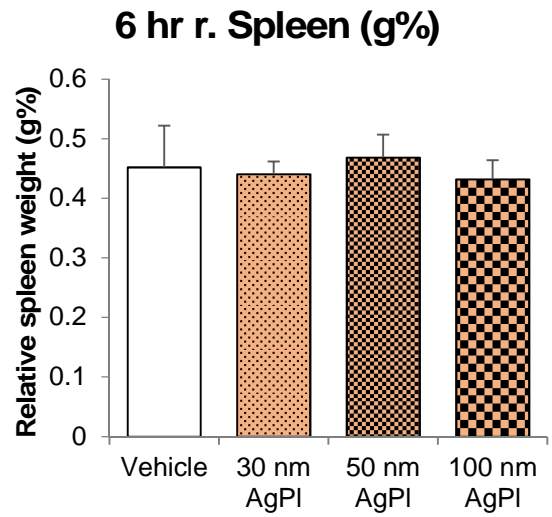
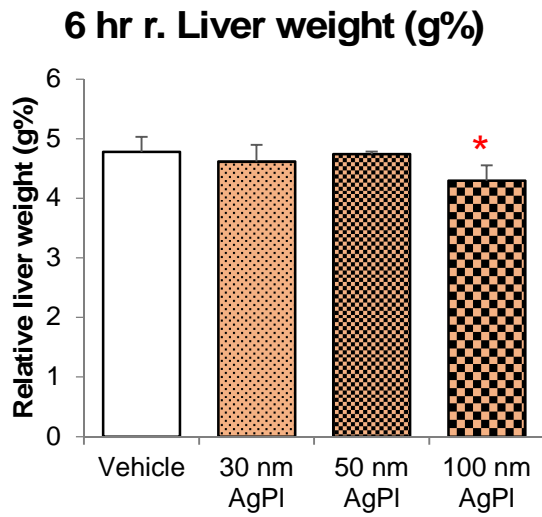
S Sacrifice (n=5 at 6 hr and n=3 at 24 hr)

Figure 1. ナノ銀プレートのマウス腹腔内投与



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

Figure 2. 直腸温の変化 (6 時間試験 , 24 時間試験)



* : p<0.05 vs. Vehicle

Figure 3. 相对肝重量及び相对脾重量 (投与 6 時間後及び 24 時間後)

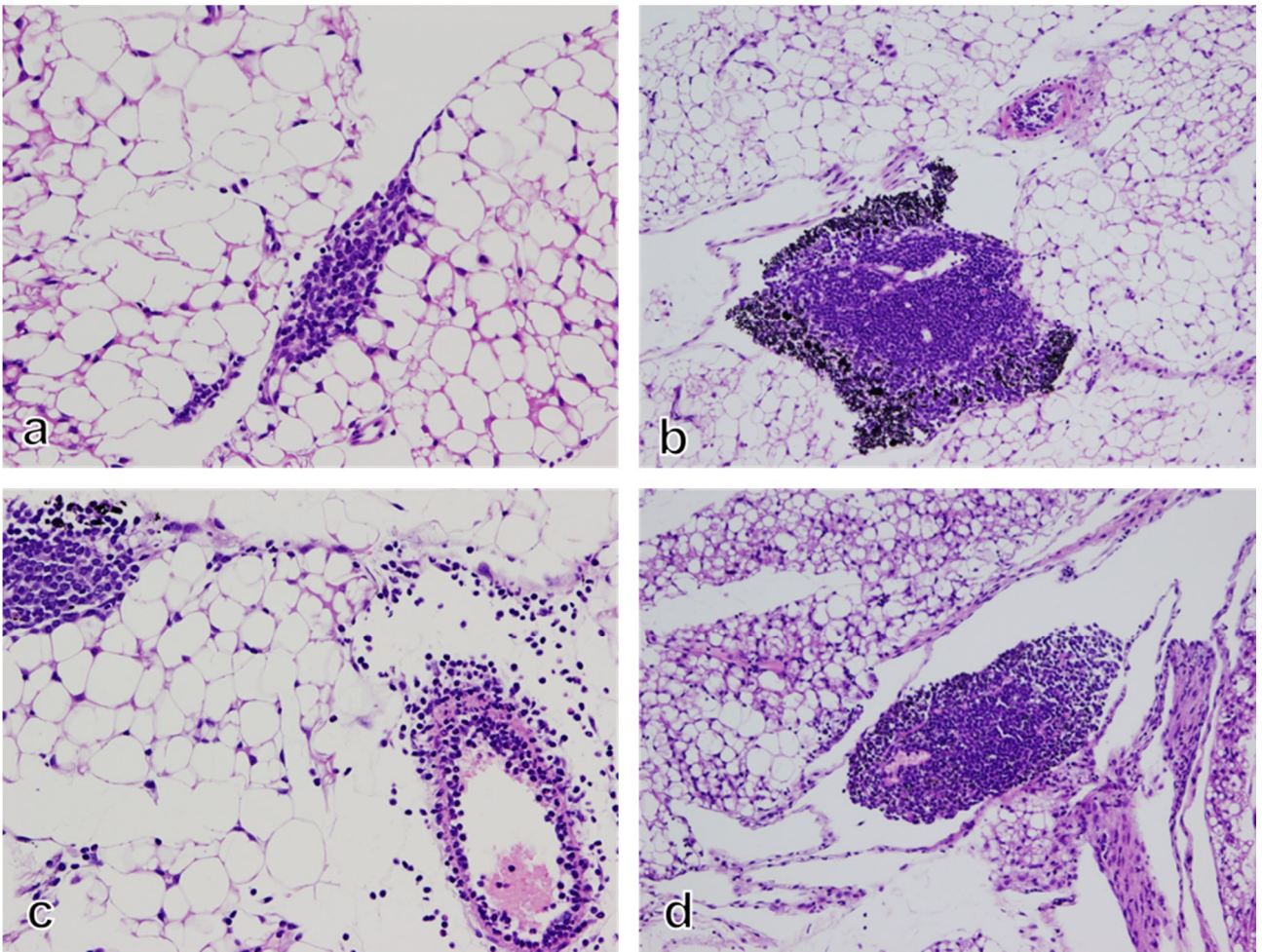


Figure 4. 病理組織学的変化

a; 腹膜へのリンパ球浸潤(溶媒対照群, 6 時間後)

b; 腹膜への黒褐色色素沈着を伴うリンパ球浸潤(30 nm AgNP PVP プレート群, 6 時間後)

c; 腹膜脂肪織の好中球浸潤を伴う血管炎(30 nm AgNP PVP プレート群, 6 時間後)

d; 腹膜へのリンパ球浸潤(30 nm AgNP PVP プレート群, 24 時間後)

Table 1. Serum biochemistry in BALB/c mouse treated with AgNpls after 6 hours

		6 h			
		Vehicle	AgNP plate		
			30 nm	50 nm	100 nm
No. of animals		5	5	5	5
TP	g/dL	4.3 ± 0.2	4.2 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.2
ALB	g/dL	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1
A/G		2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1
BUN	mg/dL	19.5 ± 2.3	20.1 ± 2.9	18.3 ± 1.3	17.4 ± 2.7
Cre	mg/dL	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.01
Na	mEq/L	152 ± 2	152 ± 1	152 ± 1	151 ± 1
K	mEq/L	3.9 ± 0.4	4.0 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.1 ± 0.2
Cl	mEq/L	111 ± 1	113 ± 1	113 ± 1	115 ± 1**
Ca	mg/dL	7.8 ± 0.3	7.1 ± 0.7	7.2 ± 0.4	7.2 ± 0.5
IP	mg/dL	9.6 ± 1.4	10.9 ± 1.7	10.9 ± 1.6	10.4 ± 1.0
AST	IU/L	60 ± 4	71 ± 19	58 ± 4	57 ± 7
ALT	IU/L	32 ± 3	29 ± 5	27 ± 4	26 ± 9
ALP	IU/L	489 ± 31	479 ± 11	469 ± 49	479 ± 31
LDH	IU/L	421 51	436 137	406 128	327 69
γ-GTP	IU/L	<3	<3	<3	<3
T-CHO	mg/dL	72 ± 3	63 ± 3**	67 ± 5	62 ± 5**
TG	mg/dL	36 ± 8	35 ± 8	25 ± 5*	28 ± 2
BIL	mg/dL	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Glucose	mg/dL	219 ± 11	199 ± 18	190 ± 22	199 ± 46

Each value represents the mean ± S.D.

** , *; Significantly different vs. vehicle at p < 0.01 and 0.05, respectively

Table 2. Serum biochemistry for BALB/c mouse treated with AgNpls after 24 hours

		24 h			
		Vehicle	AgNP plate		
			30 nm	50 nm	100 nm
No. of animals		3	3	3	3
TP	g/dL	4.4 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1
ALB	g/dL	3.0 ± 0.0	2.7 ± 0.1 *	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.2
A/G		2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.2
BUN	mg/dL	22.5 ± 4.4	16.7 ± 2.4	21.4 ± 7.1	24.6 ± 5.8
Cre	mg/dL	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Na	mEq/L	151 ± 1	151 ± 1	152 ± 2	152 ± 2
K	mEq/L	4.6 ± 1.1	4.6 ± 0.7	4.6 ± 0.4	4.9 ± 0.4
Cl	mEq/L	112 ± 2	112 ± 1	113 ± 1	113 ± 2
Ca	mg/dL	8.5 ± 0.2	8.4 ± 0.6	8.4 ± 0.4	8.4 ± 0.2
IP	mg/dL	8.0 ± 0.3	7.7 ± 0.6	8.6 ± 1.2	9.6 ± 1.4
AST	IU/L	48 ± 3	47 ± 5	47 ± 8	62 ± 11
ALT	IU/L	22 ± 3	16 ± 0	18 ± 8	36 ± 18
ALP	IU/L	516 ± 6	407 ± 35 *	391 ± 44*	437 ± 61
LDH	IU/L	402 34	546 108	451 77	435 25
γ-GTP	IU/L	<3	<3	<3	<3
T-CHO	mg/dL	72 ± 12	76 ± 8	79 ± 5	75 ± 4
TG	mg/dL	61 ± 27	39 ± 9	47 ± 25	57 ± 11
BIL	mg/dL	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Glucose	mg/dL	213 ± 23	186 ± 38	175 ± 13	191 ± 9

Each value represents the mean ± S.D.

*; Significantly different vs. vehicle at p < 0.05

Table 3. Histopathological findings in BALB/c mice 6 hour after intraperitoneal injection of AgNP plate

Organ and lesion		Treatment	6 hr			
			Vehicle	AgNP plate		
				30 nm	50 nm	100 nm
No.of animals		5	5	5	5	
Liver	Nectosis, focul		0	0	2	
	Mitosis,hepatocyte		1	0	2	
	Microgranuloma		4	2	4	
Gall bladder	Edema, submucosa		0	1	2	
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition		0	5**	5**	
Mesenterium	Inflammatory cell foci, lymphocyte		4	5	5	
	Inflammatory cell foci, lymphocyte, +		4	2	3	
	Inflammatory cell foci, lymphocyte, ++		0	3	2	
	Inflammatory cell, neutrophil		0	3	5**	
	Vasculitis		0	5**	4*	
	Dark brown pigment deposition		0	5**	5**	
Kidney	Regenerative tubules		4	3	3	
Heart	Mineralization, epicardium		2	3	3	

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

Table 4. Histopathological findings in BALB/c mice 24 hour after intraperitoneal injection of AgNP plate

Organ and lesion		Treatment	24 hr			
			Vehicle	AgNP plate		
				30 nm	50 nm	100 nm
No.of animals		3	3	3	3	
Liver	Microgranuloma		3	3	2	
Thoracic lymph node	Dark brown pigment deposition		0	3	3	
Mesenterium	Inflammatory cell foci, lymphocyte		3	3	3	
	Inflammatory cell foci, lymphocyte, +		3	0	1	
	Inflammatory cell foci, lymphocyte, ++		0	3	2	
	Inflammatory cell, neutrophil		1	3	3	
	Vasculitis		0	1	0	
	Dark brown pigment deposition		0	3	3	
Kidney	Regenerative tubules		2	3	2	
Heart	Mineralization, epicardium		3	2	2	

