

図 3 金属塩化物共存下における TiO₂ ナノ粒子の粒子径分布（散乱強度分布）

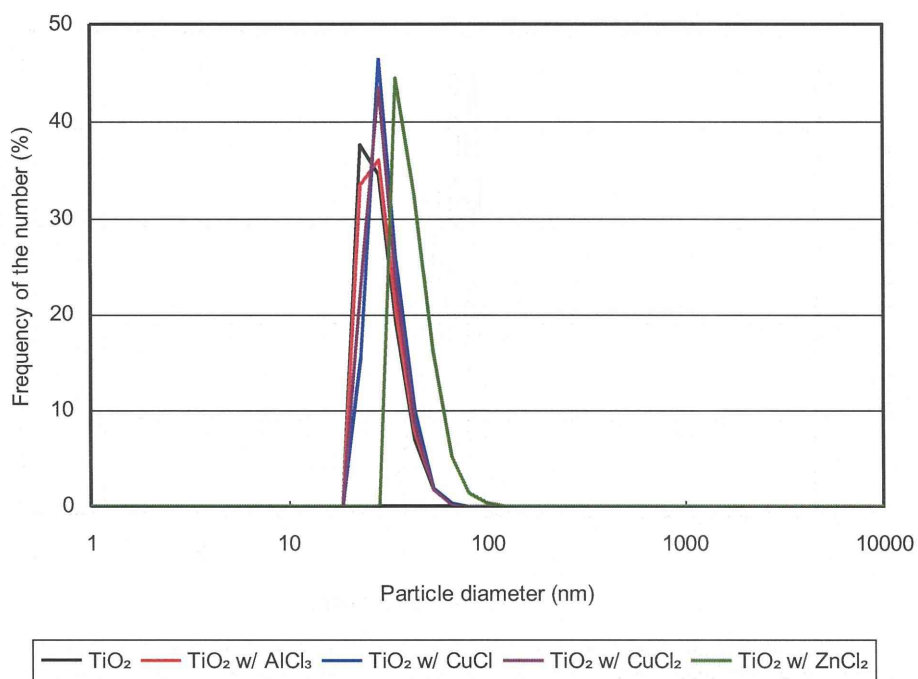


図 4 金属塩化物共存下における TiO₂ ナノ粒子の粒子径分布（個数分布）

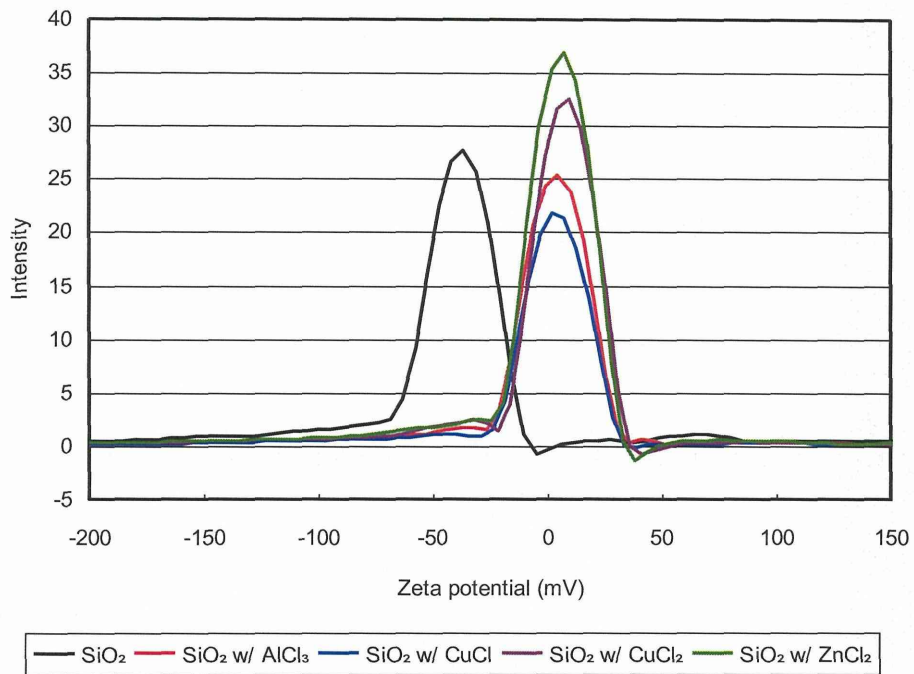


図5 金属塩化物共存下における SiO₂ ナノ粒子のゼータ電位

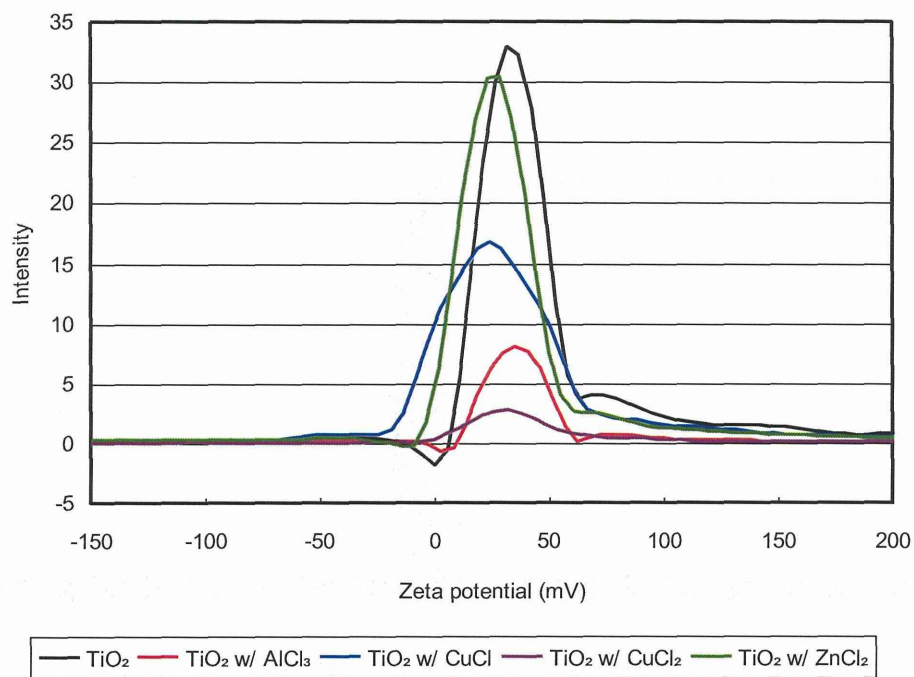


図6 金属塩化物共存下における TiO₂ ナノ粒子のゼータ電位

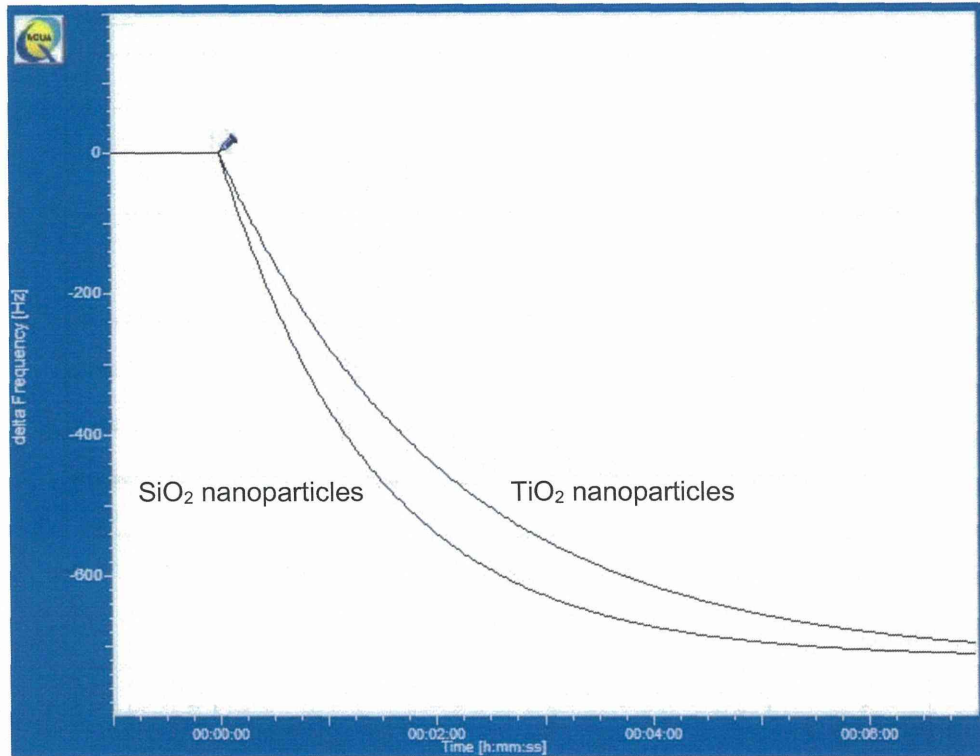


図7 SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子に CuCl₂ が結合する際の QCM センサーグラム

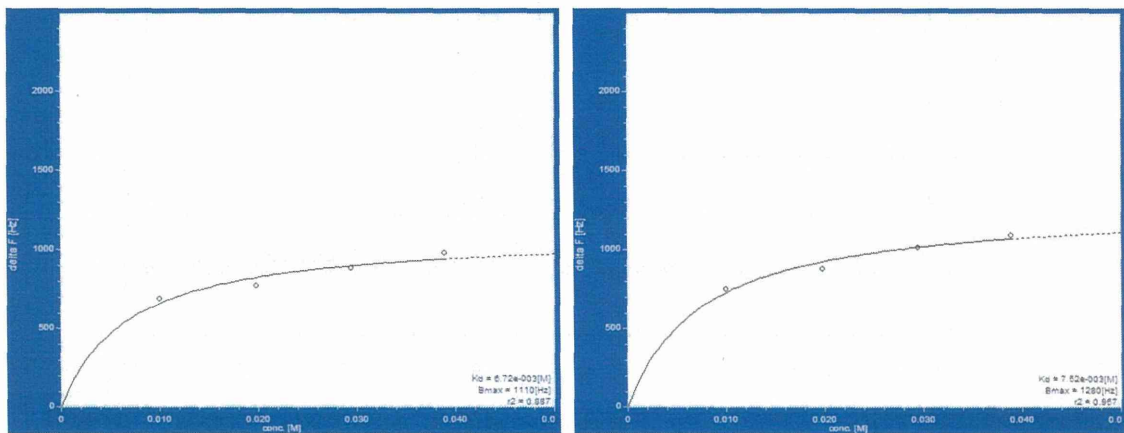


図8 SiO₂ ナノ粒子 (左) 及び TiO₂ ナノ粒子 (右) に結合する CuCl₂ の濃度と QCM 振動数変化量との関係

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

（分担研究課題名） ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究

研究分担者 戸塚 ゆ加里 独立行政法人がん研究センター研究所
発がんシステム研究分野 ユニット長

研究要旨： 近年、様々な製品にナノマテリアルが多用され、ナノマテリアルのヒトへの健康影響や安全性に高い関心が集まっている。我々はこれまでに、ナノマテリアルが遺伝毒性を誘発することを明らかにし、かつ、これら変異の誘発には酸化ストレスや炎症が寄与していると推測した。しかしながら、これらナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性メカニズムについては未だ明らかになっていない。そこで本研究では、質量分析機器を用いて DNA 付加体を網羅的に解析する方法を用いて、マグネタイトの気管内投与によりマウス肺に生成する付加体の解析を行なったところ、マグネタイト投与群で付加体の総数がコントロールと比べ上昇したこと、および、それらの複数が酸化反応ならびに炎症反応由来であることが分かった。更に、炎症のバイオマーカーである抗ニトロクロシン抗体を用いて免疫染色を行なったところ、マグネタイト投与群でニトロクロシン陽性細胞が観察された。これらの結果は、マグネタイトにより誘発される遺伝毒性には、酸化ストレスや炎症が関与する事を裏付けるものとなった。

A. 研究目的

近年、化粧品や医薬品、各種商業用品等にナノマテリアルが多用され、ナノマテリアルのヒトへの健康影響や安全性に高い関心が集まっている。我々はこれまでに、フラーレン（C60）、カオリン、マグネタイト及び、今後、様々な分野における応用が有望視されている MWCNT 等のナノマテリアルの遺伝毒性について *in vitro* 及び *in vivo* の試験系で検討し、これら全てのナノマテリアルが遺伝毒性を示す事を明らかにした。しかしながら、これらナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性メカニズムについては未だ良くわかっていない。従って、

本研究では、分析化学的手法及び免疫組織学的な手法を用い、マグネタイトの遺伝毒性メカニズムについて検討を行なった。本研究の遂行により、有用ナノマテリアルのメカニズムに基づく遺伝毒性低減化方法が明らかとなれば、より安全なナノマテリアルを製造する上に極めて有効な資料を提供する。

B. 研究方法

今年度は、マグネタイト（図1）の遺伝毒性のメカニズムの解明の為に、質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的な解析を試みた。また、マグネタイト投与による

炎症マーカーの発現についても免疫組織化学的な手法を用いて検討を行なった。

① 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的な解析

7 週齢の雄性 ICR マウスにマグネタイト (戸田工業) を 0.2 mg/body の用量で気管内投与を行い、24 時間後に肺を摘出した。摘出した肺からゲノム DNA を抽出し、DNA 分解酵素によりモノヌクレオシドに分解した後、超高速液体クロマトグラフィー連結飛行時間型質量分析器 (UPLC-TOF MS) に供した。Waters 社が提供するソフトウェア MarkerLynx を用い、分析データから DNA 付加体の候補となりうるピークを抽出した。また、デオキシリボヌクレオシドに特徴的なニュートラルロス -116.04736 を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズを除去できるように系をデザインした。更に、コントロールである native な ctDNA で検出された DNA 付加体をサンプルの結果から引くことで basal に存在する DNA 付加体を結果から除外した。質量分析の結果得られた各 DNA 付加体の m/z 、保持時間、面積値から DNA 付加体マップを作製した。次に、マグネタイト投与群に特徴的な DNA 付加体をスクリーニングするため、主成分分析 (PCA) を行なった。

② マグネタイト投与マウス肺における炎症マーカー (ニトロチロシン) の解析

gpt delta マウス (10 週齢雄) にマグネタイトを 0.2 mg/body の用量で週 1 回、4 回連続気管内投与を行い、最終投与から 2 ヶ月後にマウスを屠

殺・解剖した。肺を摘出し、ホルマリン緩衝液で固定、薄切後、抗ニトロチロシン抗体を用いて免疫染色を行なった。

(倫理面への配慮)

尚、本研究で行った動物実験は、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行った。

C. 研究結果

① 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的な解析

マグネタイトをマウスに気管内投与し、投与後 24 時間後に肺を摘出し DNA を抽出後、UPLC-QToF-MS を用いて DNA 付加体を分析した。その結果、vehicle 投与群 (コントロール群、30 個) と比べて、マグネタイト投与群 (42 個) においてより多くの DNA 付加体が生成されていた (図 2)。これまでに、ナノマテリアルの遺伝毒性に酸化ストレスが関与することを示唆するデータが得られている。そこでマグネタイト投与群において特異的に生成される付加体を同定するために、PCA 解析を行なった。その結果、マグネタイト投与群と vehicle 投与群が奇麗に分離する事が確認出来た (図 3 A)。次に、各群で検出された個々の DNA 付加体について網羅的に PCA 解析を行なったところ、マグネタイト投与群に特徴的である複数の付加体 (A2, A4, A5, A9, A10, A14, A37) をスクリーニングすることが出来た (図 3 B)。スクリーニングされた DNA 付加体の m/z 値を独自に構築した付加体データベースと比較し、同定を試みたところ、マグネタイト投与に特徴的である付加体 A5 [m/z ; M+1: 252.11] が既知付加体である sdC (m/z ; 251.0984) と、A10 [m/z ; M+1: 363.17] が既知付加体である

BedA (m/z; 363.1816)であることが推測された。一方、これら以外の付加体はデータベース内の既知付加体とは一致しなかったが、いくつかは酸化ストレス、炎症由来の未知付加体である可能性が示唆された (表 1)。

② マグネタイト投与マウス肺における炎症マーカー (ニトロチロシン) の解析

マグネタイトを投与したマウス肺において、ニトロチロシン陽性細胞が観察された。特に、被検物質を貪食したマクロファージにおいて強く染色される傾向があった。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato T, Totsuka Y, Hasei T, Watanabe T, Wakabayashi K, Kinae N, Masuda S, In vivo examination of the genotoxicity of the urban air and surface soil pollutant, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, with intraperitoneal and intratracheal administration. *Environ., Toxicol.*, 2013, 28:588-94
2. Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H. Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China. *J Epidemiol.* 2013, 23:233-42.
3. Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology*, 2013 7: 452-61
4. Kawanishi M, Ogo S, Ikemoto M, Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Yagi T. Genotoxicity and reactive oxygen

species production induced by magnetite nanoparticles in mammalian cells. *J Toxicol Sci.* 2013;38(3):503-511.

5. Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, Kurioka D, Nittami T, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kawai K, Kasai H, Totsuka Y. Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. *Int J Mol Sci.* 2013, 14:15546-60.
6. Totsuka Y, Watanabe T, Coulibaly S, Kobayashi S, Nishizaki M, Okazaki M, Hasei T, Wakabayashi K, Nakagama H. In vivo genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinoline-derivative (ABAQ), produced by the Maillard reaction between glucose and l-tryptophan. *Mutat Res.* 2014, in press.
7. Totsuka Y, Ishino K, Kato T, Goto S, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K. Magnetite Nanoparticles Induce Genotoxicity in the Lung of Mice via Inflammatory Response. *Nanomaterials*, 2014, in press.

2. 学会発表

1. 石野孔祐、戸塚ゆ加里、松島芳隆、鰐淵英機、魏民、山野莊太郎、中森正二、柴田龍弘、土原一哉、落合淳志、中釜 斉；職業性胆管がんの原因候補物質であるハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体及び変異原性の解析、第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜、10月3-5日)
2. 中釜 斉、戸塚ゆ加里、三牧幸代、中森正二、鈴木 穰、柴田龍弘、落合淳志、土原一哉；1,2-DCP, DCM 曝露歴のある印刷工胆管癌に認められた高頻度ゲノム変異、第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜、10月3-5日)

- 日)
3. 戸塚ゆ加里、石野孔祐、中江 大、渡辺昌俊、若林敬二、中釜 斉；マグネタイトナノ粒子は炎症反応を介してマウス肺に遺伝毒性を誘発する、第 72 回日本癌学会学術総会（横浜、10月3-5日）
 4. Totsuka Y, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.; Mechanisms of genotoxicity in the lungs by nanomaterials, 11th ICEM (ブラジル、11月3-8日)
 5. Totsuka Y, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.; Magnetite nanoparticles induce genotoxicity in the lung of mice via inflammatory response, NanOEH (名古屋、10月28-31日)
 6. 後藤 正憲、松島 芳隆、中釜 斉、戸塚 ゆ加里；ジクロロメタン由来の DNA 付加体を含むシャトルプラスミドを用いたヒト細胞内変異原性試験、第 42 回日本環境変異原学会（岡山、11月29-30日）
 7. 馬場 明、後藤純雄、松島芳隆、中釜 斉、戸塚ゆ加里；職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性及び変異スペクトラムの解析、第 42 回日本環境変異原学会（岡山、11月29-30日）
 8. 辻田俊寛、石野孔祐、加藤 護、柴田龍弘、後藤純雄、魏民、松島芳隆、中釜 斉、戸塚ゆ加里；職業性胆管がん発生に関するハロゲン系炭化水素の DNA 付加体の網羅的な解析（アダクトーム解析）、第 42 回日本環境変異原学会（岡山、11月29-30日）
- E. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）
1. 特許取得
特に無し
 2. 実用新案登録
特に無し
 3. その他
特に無し

図1 マグネタイトのSEM像

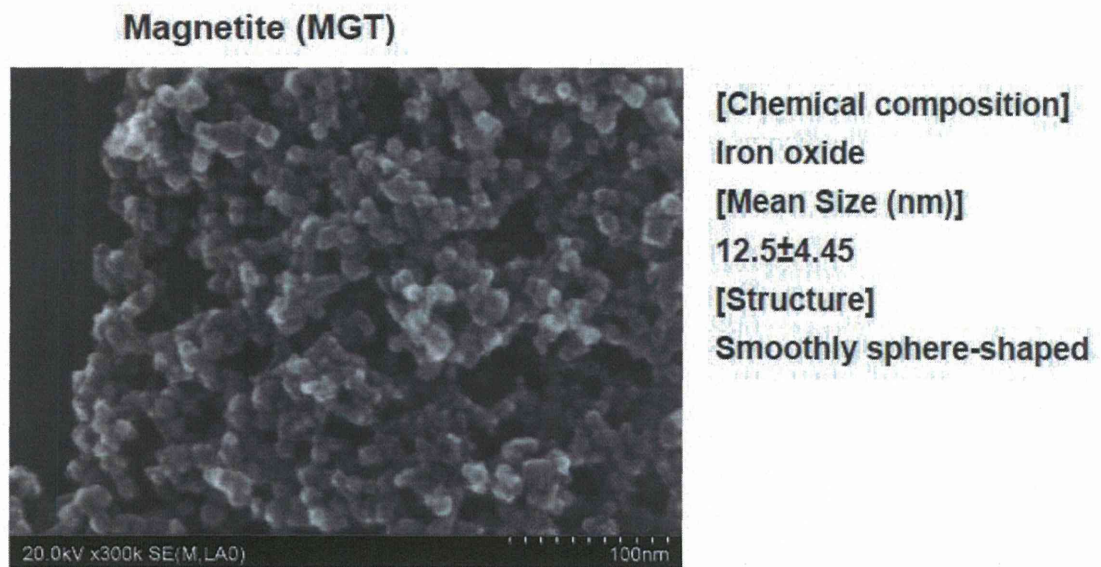


図2 DNA付加体の網羅解析による付加体マップ

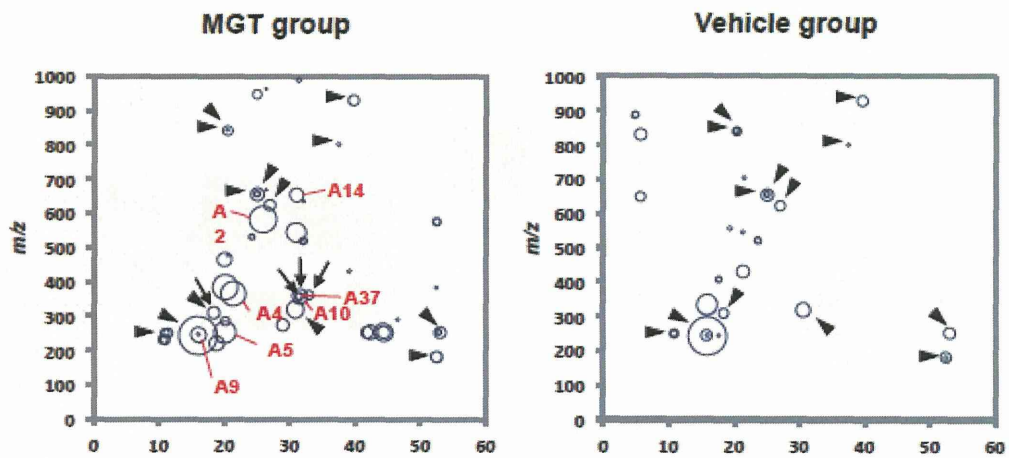
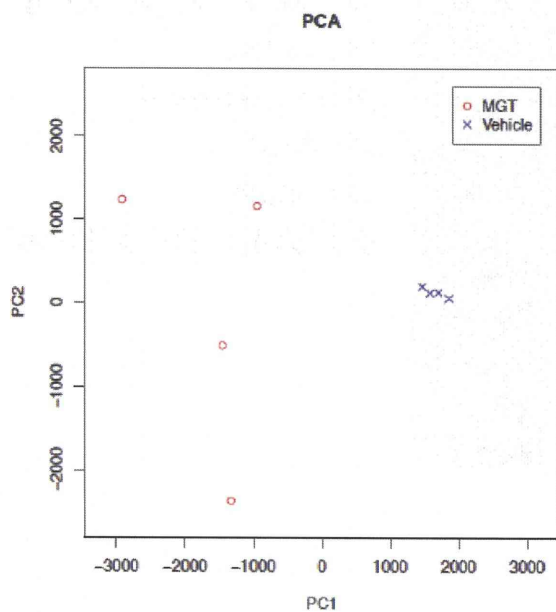


図3 PCA分析によるスクリーニング

A

主成分分析(PCA analysis)の結果



B

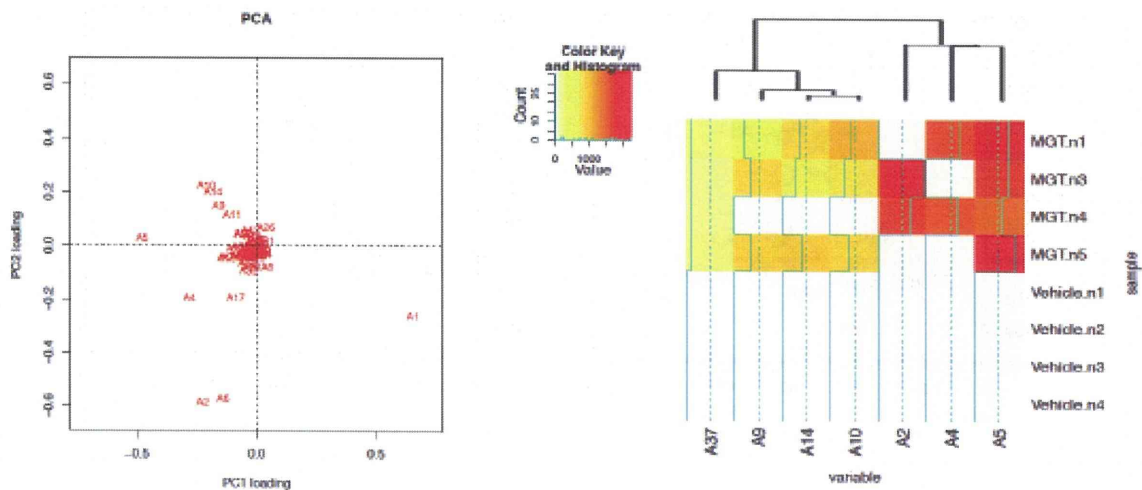


表1 マグネタイト投与に特徴的な付加体一覧

List of Major contributors to MGT exposure

Adducts	M/Z [M+H]	Comparing with DNA adduct database [M+H]	Derivation
A2	580.79	Unknown	
A4	363.17	BεdA [363.1816 (+NH ₃)]	Lipid peroxidation (4-OHE), inflammation-related adduct
A5	252.11	εdC [252.0984]	Lipid peroxidation (4-hydroperoxy-2-nonenal), inflammation-related adduct Induce C to T transition
A9	243.12	dT [243.0981], N ³ -MedC [243.1213]	5-mdC deamination (dT), Alkylating agent (MNU)
A10	355.23	Unknown adduct in model reaction [355.23]	DNA oxidation
A14	652.37	Unknown	
A37	356.24	Unknown adduct in model reaction [356.24]	DNA oxidation

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

（分担研究課題名） ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の *in vivo* 評価

研究分担者	中江 大	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 部長
研究協力者	多田 幸恵	東京都健康安全研究センター	薬事環境化学部 生体影響研究科 主任研究員
研究協力者	猪又 明子	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 生体影響研究科 科長
研究協力者	小縣 昭夫	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 生体影響研究科 科長補佐

研究要旨：磁性ナノ粒子マグネタイトは、様々な用途に広く利用され、医療やバイオテクノロジーの分野への応用展開が注目されているが、その安全性に関する情報が限られている。我々は、先行研究として行ったマグネタイトの気管内反復投与によるラット慢性毒性試験により、肺における慢性炎症と共に肺胞上皮過形成性の発生を観察し、肺に対する発がん性を持つ可能性を示した。マグネタイトは *in vitro* 試験において遺伝毒性を持つ可能性を示されていることから、その発がん性の有無に関する評価は喫緊の課題と考えられた。そこで、本研究は、ラット 2 段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。昨年度は、マグネタイトが明らかな肺発がんイニシエータ活性を有しないことを見出した。本年度は、マグネタイトの肺発がんプロモータ活性の有無を明らかにする目的で、さらなる検索を行った。試験は、当センターの動物飼育施設内のナノ物質取扱いエリアにおいて、当センターのナノマテリアルの取扱いに関する作業規定及び試験管理マニュアルに従って、F344/DuCrIjCrIj 雄性ラット（6 週齢）に *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)（0.1%混水）による 2 週間の発がんイニシエーション処置を行った後、マグネタイトを 0（対照群）・5.0・1.0 mg/kg 体重の用量で 4 週間に 1 回、計 7 回の気管内投与を実施し、試験開始後 30 週の時点で肺における腫瘍性病変の発生を病理組織学的に検索した。その結果、肺の肉眼観察においては、DHPN 投与により結節が多発性に観察されたが、マグネタイト 5.0 mg 併用群で結節数が減る傾向を示し、径 3 mm 以上の結節数に関して統計学的に有意な減少を示した。病理組織学的検索においては、DHPN 投与により肺胞上皮過形成及び肺の腺腫・腺癌が発生し、マグネタイト併用投与群で、腫瘍の発生頻度と個体当たりの腫瘍数がマグネタイトの用量に依存した減少傾向を示した。特に、マグネタイト 5.0 mg 併用群の個体当たりの全腫瘍数は、統計学的に有意に減少した。以上の結果から、マグネタイトは、明らかな肺発がんプロモータ活性を有さず、むしろ DHPN の肺発がん性を抑制することが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究は、ナノマテリアルの遺伝毒性低減化のための *in vivo* 評価を目的として遂行している。ナノマテリアルは、特有の物性を示すことから様々な分野で広範な活用が見込まれる画期的な新素材として注目され、積極的な研究開発が進められている。一方で近年、径 100 nm 以下の超微粒子（ナノ粒子）の健康影響が注目されているが、その安全性の評価は十分でなく、ナノマテリアルの生体影響に関する研究は未だ十分な知見を得ていない。ナノマテリアルが人々の生活利便性を飛躍的に向上させる可能性を秘めていることを考えれば、そのリスクを十分に評価し、その結果に基づいて適切に利用・管理されることは、ナノマテリアルの円滑な普及にとってきわめて重要である。

磁性ナノ粒子マグネタイト（マグネタイト）は、化学的に安定で比較的大きな磁性を有することから、磁気記録媒体・磁性流体・磁性トナーなど様々な用途に広く利用され、医療やバイオテクノロジーの分野への応用展開が注目されている。日本においても、マグネタイトは、現在、がんの温熱療法への応用や抗がん剤のキャリアーとしての利用が検討されており、今後さらなる活用分野が拡大するものと予想される。しかしながら、マグネタイトの安全性に関する情報は、限られており、早急に安全性評価を行うことが求められている。

我々は、先行研究として行ったマグネタイトの気管内反復投与によるラット慢性毒性試験において、肺における慢性炎症及び肺胞上皮過形成性を観察し、肺に対する発がん性を持つ可能性が示した¹⁾。マグネタイトは *in vitro* 試験において遺伝毒性を持つ可能性を示されている²⁾ことから、その発がん性の有無に関する評価は喫緊の課題

と考えられた。そこで、本研究は、ラット 2 段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。昨年度は、マグネタイトが明らかな肺発がんイニシエータ活性を有しないことを見出した。本年度は、マグネタイトの肺発がんプロモータ活性の有無を明らかにする目的で、肺発がん物質である *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)によるイニシエーション処置をラットに施した後、マグネタイトを気管内反復投与し、肺における腫瘍性病変の発生を病理組織学的に検索した。

B. 研究方法

本試験は、当センター動物飼育施設内のナノ物質取扱いエリアにおいて、当センターのナノマテリアルの取扱いに関する作業規定及び試験管理マニュアルに従って行った。なお、試験実施に当たっては、当センター薬事環境科学部生体影響研究科において、研究協力者である多田幸恵主任研究員の主導下に、同科員の協力を仰いだ。

1. 被験物質

被験物質は、戸田工業株式会社（広島）より購入した磁性ナノ粒子マグネタイトスラリー（マグネタイト超微粒子分散液）（BMS-10, Lot.130207, pH 10.2, 一次粒子径 5-15 nm, 比表面積 124 m²/g）を用いた。被験物質の投与懸濁液は、先行研究において行った検討結果に基づき、マグネタイトスラリーを高圧滅菌済超純水（Milli Q 水, 18.2 MΩ）で必要濃度に希釈後、0.2 M HCl（滅菌済 Milli Q 水にて調製）にて pH 7.4-7.5（ラットの組織液 pH）に調整した。調製に用いた容器及びピペットチップは、何れも高圧滅菌済みの物を使用した。なお、調整後に試料を高圧滅菌しなかった理由は、マグネタイトの高温処理による酸化を避け

たためである。

DHPN (Lot. M8P9950, 含量 96.9%, 岐阜薬科大学) は, 投与時に限外濾過装置 (KN614-12, 夏目製作所, 東京) を経由した水道水で 0.1% 水溶液とした。

2. 動物及び飼育条件

動物は, 雄の F344/DuCrIj 系ラット SPF 動物を, 日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川) より 4 週齢で入手し, 2 週間馴化飼育した後, 6 週齢で試験に供した。各群の動物数は, 20 匹とし, 投与開始前日の体重を基に, 体重別層化無作為抽出法により 5 群に分けた。馴化から 10 週齢になるまではポリカーボネートケージにて ALPHA-dri 床敷 (エルエスシー株式会社, 東京) で 5 匹ずつ収容し, 10 週齢になった後は自動給水装置付きベルト式飼育棚のステンレス製懸垂式ケージに 1 匹ずつ収容した。動物は, 飼料 (CE-2, 日本クレア株式会社, 東京) と飲料水を自由に摂取させ, バリアシステム内の飼育室にて, 室温 22±2°C・湿度 55±10%・換気回数毎時 10 回・12 時間蛍光灯照明の条件下で飼育した。

3. 動物試験方法

動物試験方法の概略は, 図 1 に示した。5 群中 2 群 (I・II 群) には限外濾過装置を経由した水道水を, 3 群には (III・IV・V 群) に DHPN 含有水を, それぞれ給水ビンで 2 週間自由に摂取させ, その後 2 週間の休薬期間を設けた。その後は, Milli Q 水で懸濁させたマグネタイトを 0 (I 群, III 群)・5.0 (II・IV 群) あるいは 1.0 mg/kg 体重 (V 群) の用量となるように, いずれも 1 mL/kg 体重の容量で 4 週間毎に 1 回, 計 7 回にわたり, イソフルラン麻酔下でスプレー投与器 (IA-1B, Penn-Century, Inc., USA) を用いて気管内投与した。気管

内投与法は, 気道の毒性評価のための暴露技術としての気道内投与³⁾を参照した。動物は, 試験開始から 30 週間後に, イソフルラン麻酔下で屠殺し, 腹部大動脈より採血し, 抗凝固剤 EDTA-2K を入れた試験管に血液を採取し, 多項目自動血球計数装置 (KX-21NV, シスメックス株式会社, 兵庫) にて, 赤血球数 (RBC)・白血球数 (WBC)・血色素量 (HGB)・ヘマトクリット値 (HCT)・平均赤血球容積 (MCV)・平均赤血球血色素量 (MCH)・平均赤血球血色素濃度 (MCHC)・血小板数 (PLT) を測定した。

剖検時には肉眼観察を行い, 以下に示す組織・器官を採取し, 下線を付したものについては重量を測定した後に 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。採取した組織・器官は, 脳・下垂体・脊髄 (頸部)・坐骨神経・眼球・ハーダー腺・ジンバル腺・胸腔内大動脈・甲状腺/上皮小体・鼻腔・気管・肺・胸腺・心臓・脾臓・顎下腺/舌下腺・耳下腺・外涙腺・舌・食道・前胃/腺胃・十二指腸・小腸 (空腸・回腸)・大腸 (盲腸・結腸・直腸)・肝臓・膵臓・副腎・腎臓・膀胱・精巢・精巢上体・精囊/凝固腺・前立腺・包皮腺・皮膚・乳腺・リンパ節 (顎下部・胸腺リンパ節・腸間膜)・大腿筋・胸骨 (骨髄を含む)・大腿骨 (骨髄を含む) とその他の肉眼的異常部位であった。肺に発生する肉眼的結節の観察は, ホルマリン固定 2 日後, 肺の結節が見易くなった時点で, 拡大ルーペ下で周囲の組織から隆起した輪郭が明瞭なものを, 径が 3 mm 未満と 3 mm 以上に分けて計数した。病理組織学的検索は, RITA と NACAD グループ提唱の器官サンプリングとトリミングの方法⁴⁾により切り出しを行い, 全動物について定法に従いパラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色後, 光学顕微鏡下で観察した。

4. 統計学的解析

体重及び器官重量の統計学的解析は、各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合一元配置の分散分析により、不等分散の場合 Kruskal-Wallis の方法により、それぞれ検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は、Dunnett の方法で有意差検定を行った。病変の発生頻度については、Fisher の直接確率検定を行った⁵⁾。統計処理ツールは、StatLight (Yukms 株式会社, 東京) を用いた。

5. 倫理面への配慮

本研究は、当センターの研究調整委員会および動物実験委員会による事前審査を受け、そのモニター下に、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規・規則・ガイドライン等に準拠して行った。

C. 結果

試験期間中の体重の推移は、対照群 (I 群) と比較して、DHPN 投与群 (III・IV・V 群) で有意に減少した (図 2)。DHPN 投与群間では、マグネタイト投与による有意な差が認められなかった。

血液学的検索では、対照群と比較して、III 群で WBC・RBC・HGB の有意な減少が認められ、III・IV・V 群で MCV・MCH の有意な増加が認められた (表 1)。

病理学的検索では、対照群と比較して、肺の絶対重量がマグネタイト投与群 (II・IV 群) で有意に増加し、体重 100g あたりの肺の相対重量が II・III・IV 群で有意に増加した。DHPN 投与群間の比較では III 群と比較し、IV 群で肺の絶対重量及び相対重量が有意に増加した (表 2)。そのほか、脳・心臓・肝臓・精巣の絶対重量及び肝臓の相対重量は対照群と比較して III・IV・V

群で有意に減少し、脳及び脾臓の相対重量は対照群と比較して III・IV・V 群で有意に増加した。

解剖時の肉眼観察では、マグネタイト高用量投与群 (II・IV 群) のラットの肺に、軽度な腫大及び暗褐色のマグネタイトの広汎な沈着を認めた (図 3)。ホルマリン固定後の肺の観察においては、I・II 群の肺に結節を認めず、DHPN 投与群 (III・IV・V 群) の肺の各葉に大小の結節を認めた。マグネタイト高用量併用群 (IV 群) では、DHPN 単独投与群 (III 群) と比較して、結節が減る傾向を示し、径 3 mm 以上の結節について有意な減少を示した (図 4)。

病理組織学的観察では、マグネタイト高用量投与群 (II・IV 群) の肺で、マグネタイトを貪食した肺泡マクロファージの肺泡腔への浸潤・炎症性細胞浸潤・II 型肺泡上皮の腫大・線維化など、慢性炎症の所見を認めた (図 5-B)。同様の変化は、マグネタイト低用量投与群 (V 群) においても、軽度に認めた。

DHPN 投与群 (III・IV・V 群) の肺では、肺泡上皮過形成 (図 5-C)・腺腫 (図 5-D)・腺癌 (図 5-E) が認められた。そのほか、マグネタイト低用量併用群 (V 群) に、扁平上皮癌が 1 例 (1/18, 5.6%) のみ認められた (図 5-F)。肺における腫瘍発生頻度と個体当たりの腫瘍数はマグネタイトの用量に依存した減少傾向を示し、マグネタイト高用量併用群 (IV 群) における個体当たりの総腫瘍 (腺腫+腺癌) 数は有意に減少した (表 3)。

E. 考察

マグネタイトの発がん性に関しては、Pott らが、11 週齢の Wistar ラットにマグネタイトを 15 mg/ラットの用量で 1 週間毎に 15 回投与し (総投与量 225 mg/ラッ

ト), 2年6ヵ月齢で69%のラットに肺の腫瘍が認められたと報告した⁶⁾. 一方Steinhoffらは, 8週齢のSDラットにマグネタイト(平均直径0.5 μm)を10-40 mg/kg体重の用量で2週間毎に約2年間投与し(総投与量1530 mg/kg体重), 2年6ヵ月齢で病理学的に検索した結果, マグネタイトに発がん性が認められないと報告した⁷⁾. また, Slesinskiらは, 雌雄のWistar Hanラットに写真トナー(45-50%のマグネタイトを含有)を1日5時間, 週5日間で13週間あるいは104週間吸入させた結果, 肺の腫瘍発生は増加しなかったと報告した⁸⁾. これらの報告は相反する結果であり, マグネタイトの吸入あるいは気管内投与による発がん性については本研究終了時まで明らかでなかった.

我々は, 先行研究として, マグネタイトをF344系ラットに, 0(対照群)・0.2・1.0・5.0 mg/kg体重の用量で4週間ごとに1回, 1年間反復気管内投与する慢性毒性試験を行い, 雌雄の1.0 mg/kg体重以上の群に用量依存性の炎症細胞浸潤・II型肺胞上皮の腫大・肉芽形成などの炎症性変化と共に, 細気管支/肺胞上皮過形成性を観察した¹⁾. マグネタイトは, Könczölらによるヒトの肺胞上皮細胞A549を用いたコメットアッセイ及び小核試験において, 試験した全てのフラクシオン(0.2-10 μm, 2-3 μm, 0.5-1.0 μm, 20-60 nm)で遺伝毒性²⁾を示しており, 我々の慢性毒性試験結果と併せ, その肺発がん性が懸念された. 本研究においては, このことに鑑み, ラット2段階肺発がんモデルを用い, マグネタイトの肺発がん性について詳細に検討したのである. まず, 昨年度の本研究は, ラットにマグネタイトを気管内投与した後にγ-オリザノールあるいはグリセロールでプロモーション処理する試験を行い, マグネタイトに明らかな肺発がんイニシエータ活性がな

いことを明らかとした. 次に, 本年度の試験は, マグネタイトに肺発がんプロモータ活性が認められないことを明らかとした. したがって, マグネタイトには, 肺発がん性がないものと評価された. 慢性毒性試験における過形成については, 炎症性変化の一部であったか, 増殖性病変であっても腫瘍への進展に至らないものであったと考えられる.

本年度の研究は, マグネタイトに, むしろDHPNの肺における腫瘍発現を抑制する作用のあることが示された. 当該作用の詳細や背景機構, また, 当該作用がDHPNに特異的なものであるか否か, 等については, 現在, 検討中である.

E. 結論

本年度は, マグネタイトの肺発がんプロモータ活性の有無と背景機構を明らかにする目的で, ラット2段階肺発がんモデルを用いた検索を行った. その結果, マグネタイトは, 明らかな肺発がんプロモータ活性を有さず, むしろDHPNの肺発がん性を抑制することが明らかとなった.

F. 引用文献

- 1) Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Inomata A, Ogata A, Nakae D: Long-term pulmonary responses to quadweekly intermittent intratracheal spray instillations of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles for 52 Weeks in Fischer 344 Rats, *Journal of Toxicologic Pathology*, 26, 393-403 (2013).
- 2) Könczöl M, Ebeling S, Goldenberg E *et al.*: Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated iron oxide (magnetite) in A549 human lung epithelial cells: role of

- ROS, JNK and NF- κ B, *Chemical Research in Toxicology*, 24, 1460-1475 (2000).
- 3) Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB: Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations, *Toxicological Sciences*, 55, 24-35 (2000).
 - 4) Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G, Klapwijk J, Elwell MR, Lenz B, O'sullivan MG, Roth DR, Wadsworth PF: Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice – Part 2 A joint publication of the RITA and NACAD groups, *Exp Toxic Pathol*, 55, 413–431 (2004).
 - 5) Gad SC, Weil CS: Statistics for toxicologist. In: Hayes AW (Ed), *Principles and methods of toxicology*, 3rd edn, Raven Press, New York, pp. 221-274 (1994).
 - 6) Pott F, Ziem U, Reiffer FJ, Huth F, Ernst H, Mohr U: Carcinogenicity studies on fibres, metal compounds and some other dusts in rats, *Experimental Pathology*, 32, 129-152 (1987).
 - 7) Steinhoff D, Mohr U, Hahnemann S: Carcinogenesis studies with iron oxides, *Experimental Pathology*, 43, 189-194 (1991).
 - 8) Slesinski RS, Turnbull D: Chronic inhalation exposure of rats for up to 104 weeks to a non-carbon-based magnetite photocopying toner, *International Journal Toxicology*, 27, 427-39 (2008).
- G. 研究発表**
- 1. 論文発表**
 - 1) Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Inomata A, Ogata A, Nakae D: Long-term pulmonary responses to quadweekly intermittent intratracheal spray instillations of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles for 52 weeks in Fischer 344 rats, *Journal of Toxicologic Pathology* 26, 393-403 (2013)
 - 2) Nakagawa Y, Suzuki T, Nakajima K, Inomata A, Ogata A, Nakae D: Effects of *N*-acetyl-L-cysteine on target sites of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes, *Archives of Toxicology* 88, 115-126 (2014)
 - 2. 学会発表**
 - 1) 坂本義光, 小縣昭夫, 西村哲治, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江 大: 繊維長の異なる多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発性の検討, 第40回日本毒性学会学術年会(千葉, 2013.6).
 - 2) 藤谷知子, 安藤 弘, 久保喜一, 猪又明子, 小縣昭夫, 広瀬明彦, 西村哲治, 中江 大: マウスにおけるナノマテリアルの催奇形性に関する研究, 第40回日本毒性学会学術年会(千葉, 2013.6).
 - 3) 山本行男, 坂本義光, 大貫 文, 小縣昭夫, 猪又明子, 広瀬明彦, 中江 大: 多層カーボンナノチューブ投与により誘発したラット中皮腫におけるプロテオーム解析(第三報), 第86回日本生化学会大会(横浜, 2013.9).
 - 4) Totsuka Y, Ishino K, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K: Magnetite nanoparticles induce genotoxicity in the lung of mice via inflammatory response, 6th

International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH) (名古屋, 2013.10).

- 5) Totsuka Y, Ishino K, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H: Magnetite nanoparticles induce genotoxicity in the lungs of mice via inflammatory responses, 第 72 回日本癌学会学術総会(横浜, 2013.10).
- 6) 坂本義光, 小縣昭夫, 西村哲治, 広瀬明彦, 中江 大:ラットにおける 7 種の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の腹腔内投与による中皮腫誘発性に関する検討, 第 72 回日本癌学会学術総会(横浜, 2013.10).
- 7) Totsuka Y, Tada Y, Nakae D, Watababe M, Wakabayashi K: Mechanisms of genotoxicity in the lungs by nanomaterials, 11th International Conference on Environmental Mutagens (Foz do Iguassu, 2013.11).
- 8) 坂本義光, 小縣昭夫, 湯澤勝廣, 久保喜一, 安藤 弘, 長澤明道, 高橋 博, 矢野範男, 西村哲治, 広瀬明彦, 井上義之, 橋爪直樹, 猪又明子, 中江 大:ラットにおいて多層カーボンナノチューブの経気管噴霧反復投与が及ぼす影響,

第 30 回日本毒性病理学会年次学術集会(徳島 2014.1).

- 9) 多田幸恵, 矢野範男, 高橋 博, 湯澤勝廣, 安藤 弘, 久保喜一, 長澤明道, 海鋒藤文, 北條 幹, 猪又明子, 小縣昭夫, 中江 大:*N*-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)でイニシエートされたラットにおいて磁性ナノ粒子マグネタイトの気管内スプレー投与が及ぼす影響, 第 30 回日本毒性病理学会年次学術集会(徳島, 2014.1).
- 10) 中江 大:様々な発がん要因と最近の知見. 食品・ナノマテリアル・化学物質, 浜松毒性試験フォーラム 2014 (2 浜松, 2014.2).

H. 知的所有権の取得状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. 血液性状

群	I	II	III	IV	V
DHPN (%)	0	0	0.1	0.1	0.1
マグネタイト用量 (mg/kg 体重)	0 (対照群)	5.0	0	5.0	1.0
試験匹数	20	19	18	19	18
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	32.6 \pm 4.8 ^a	35.6 \pm 5.4	27.8 \pm 4.8*	32.5 \pm 6.7†	32.2 \pm 6.8
RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	839.8 \pm 34.1	809.4 \pm 63.7	789.1 \pm 35.5*	782.9 \pm 124.0	811.4 \pm 43.8
HGB (g/dL)	13.3 \pm 0.5	13.0 \pm 0.9	12.7 \pm 0.4*	12.7 \pm 1.7	13.0 \pm 0.6
HCT (%)	43.6 \pm 1.8	42.3 \pm 3.2	41.5 \pm 1.5	41.5 \pm 5.3	42.6 \pm 2.1
MCV (fL)	51.9 \pm 0.5	52.2 \pm 0.9	52.6 \pm 1.0*	53.4 \pm 3.0*	52.5 \pm 0.5*
MCH (pg)	15.8 \pm 0.2	16.0 \pm 0.2	16.1 \pm 0.3*	16.3 \pm 0.7*	16.0 \pm 0.2*
MCHC (g/dL)	30.5 \pm 0.4	30.7 \pm 0.3	30.6 \pm 0.2	30.5 \pm 0.5	30.5 \pm 0.2
PLT ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	54.3 \pm 3.3	53.3 \pm 10.3	51.3 \pm 5.6	54.5 \pm 5.3	53.8 \pm 6.3

^a数値は平均値 \pm 標準偏差.

*対照群との比較で有意差あり ($p < 0.05$, Dunnet's test) .

† III群との比較で有意差あり ($p < 0.05$, Dunnet's test) .

表 2. 体重及び器官重量

群	I	II	III	IV	V
DHPN (%)	0	0	0.1	0.1	0.1
マグネタイト用量 (mg/kg 体重)	0 (対照群)	5.0	0	5.0	1.0
実験開始時動物数	20	20	20	20	20
初期体重 (g)	116.7 \pm 5.6 ^a	116.6 \pm 5.3	116.5 \pm 5.5	116.2 \pm 5.6	116.3 \pm 5.7
試験匹数	20	19	18	19	18
最終体重 (g)	331.8 \pm 18.1	320.4 \pm 30.5	302.5 \pm 19.3*	299.8 \pm 23.4*	304.5 \pm 17.1*
絶対重量 (mg)					
脳	2038.8 \pm 46.9	2015.3 \pm 50.6	1974.9 \pm 38.0*	1962.4 \pm 42.3*	1971.2 \pm 37.6*
副腎	38.8 \pm 2.4	37.6 \pm 2.1	37.0 \pm 3.2	37.3 \pm 2.2	37.0 \pm 2.3
心臓	903.7 \pm 49.3	870.2 \pm 67.4	829.7 \pm 52.5*	832.9 \pm 60.6*	832.8 \pm 47.3*
肺	976.9 \pm 180.7	1185.8 \pm 86.4 *	984.0 \pm 95.8	1217.6 \pm 110.3*†	973.1 \pm 54.5
脾臓	619.1 \pm 36.0	612.4 \pm 46.0	590.7 \pm 55.9	615.6 \pm 79.4	604.8 \pm 41.3
肝臓 (g)	10.109 \pm 0.682	9.689 \pm 1.105	8.776 \pm 0.733*	8.719 \pm 0.805*	8.746 \pm 0.634*
腎臓	2249.1 \pm 167.7	2185.3 \pm 255.3	2193.1 \pm 334.4	2073.7 \pm 162.0*	2270.0 \pm 338.1
精巣	3196.8 \pm 138.7	3116.3 \pm 182.5	2743.1 \pm 235.2*	2725.3 \pm 223.9*	2711.2 \pm 248.4*
相対重量 (mg/100g 体重)					
脳	615.7 \pm 25.0	634.3 \pm 59.7	655.3 \pm 40.2*	658.1 \pm 51.8*	648.9 \pm 30.4*
副腎	11.7 \pm 0.9	11.8 \pm 1.2	12.3 \pm 1.3	12.4 \pm 1.1	12.2 \pm 0.9
心臓	272.5 \pm 8.1	272.2 \pm 10.1	274.6 \pm 12.4	278.0 \pm 9.6	273.7 \pm 10.4
肺	295.6 \pm 61.7	371.9 \pm 28.8 *	325.4 \pm 25.0*	406.4 \pm 25.6*†	320.3 \pm 22.3
脾臓	186.7 \pm 8.8	191.8 \pm 12.2	195.0 \pm 8.7*	205.9 \pm 27.0*	198.7 \pm 9.9*
肝臓 (g)	3.046 \pm 0.106	3.020 \pm 0.092	2.899 \pm 0.114*	2.905 \pm 0.091*	2.871 \pm 0.088*
腎臓	677.8 \pm 31.7	684.4 \pm 78.0	724.3 \pm 90.4	692.5 \pm 35.8	745.7 \pm 121.1
精巣	965.5 \pm 55.1	980.5 \pm 104.0	909.9 \pm 96.0	913.8 \pm 100.7	891.0 \pm 74.8*

^a数値は平均値 \pm 標準偏差.

*対照群との比較で有意差あり ($p < 0.05$, Dunnet's test) .

† III群との比較で有意差あり ($p < 0.05$, Dunnet's test) .

表 3. 肺の増殖性病変の出現率及び出現数

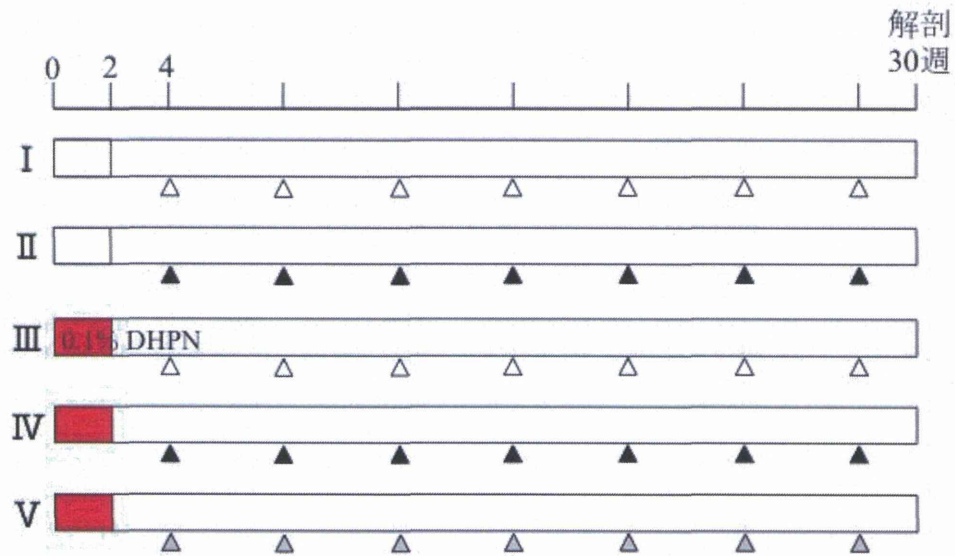
群	I	II	III	IV	V
DHPN (%)	0	0	0.1	0.1	0.1
マグネタイト用量 (mg/kg 体重)	0 (対照群)	5.0	0	5.0	1.0
試験匹数	20	19	18	19	18
肺胞上皮過形成					
出現率 (%)	0 (0%)	0 (0%)	18 (100%)	19 (100%)	18 (100%)
出現数 (数/ラット)	0	0	34.11 ± 7.14 ^a	29.95 ± 7.90	33.50 ± 6.91
腺腫					
出現率 (%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (55.6%)	5 (26.3%)	9 (50.0%)
出現数 (数/ラット)	0	0	1.11 ± 1.13	0.47 ± 0.91	0.75 ± 0.97
腺癌					
出現率 (%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (16.7%)	2 (10.5%)	4 (22.2%)
出現数 (数/ラット)	0	0	0.28 ± 0.75	0.11 ± 0.32	0.25 ± 0.55
総腫瘍 [#]					
出現率 (%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (66.7%)	7 (36.8%)	11 (61.1%)
出現数 (数/ラット)	0	0	1.39 ± 1.20	0.58 ± 0.90*	1.06 ± 1.06

[#]腺腫+腺癌.

^a数値は平均値±標準偏差.

* III群との比較で有意差あり ($p < 0.05$, Dunnet's test).

図 1. 実験デザイン



△: Milli-Q水 1 mL/kg体重, ▲: magnetite 5 mg/mL/kg体重, ▲: magnetite 1 mg/mL/kg体重

図 2. 平均体重の推移

