

群（Ⅱ・Ⅳ・Ⅵ群）の肺重量が増加した（表3）。解剖時の肉眼観察では、マグネタイト投与群（Ⅱ・Ⅳ・Ⅵ群）の肺に、軽度な腫大と、暗褐色を呈するマグネタイトの広汎な沈着を認めた（図8）。病理組織学的観察では、マグネタイト投与群（Ⅱ・Ⅳ・Ⅵ群）において、マグネタイトを貪食した肺胞マクロファージの肺胞腔への浸潤・炎症性細胞浸潤・Ⅱ型肺胞上皮の腫大などを認めた（図9）。 γ -オリザノールあるいはグリセロールは、これらの変化に対して顕著な影響を与えなかった（表4）。また、本試験においては、いずれの群においても肺胞上皮及び細気管支上皮の過形成性変化を認めなかった。

肺以外の組織については、マグネタイト投与群（Ⅱ・Ⅳ・Ⅵ群）のリンパ節において、HE染色で黄褐色、鉄染色（ベルリン青染色）で青色を呈する顆粒を貪食したマクロファージの浸潤が認められ、特に胸腺リンパ節において顕著であった。同様の顆粒を貪食したマクロファージの浸潤は、対照群（Ⅰ）・ γ -オリザノール単独投与群（Ⅲ）・グリセロール単独投与群（Ⅴ）ラットの胸腺リンパ節においても認められた。したがって、マグネタイト投与群（Ⅱ・Ⅳ・Ⅵ群）の胸腺リンパ節で見られた顆粒は、マグネタイトばかりでなくヘモジデリンも混在するものと考えられた。肝臓においては胆管増生の発生頻度がグリセロール投与群（Ⅴ・Ⅵ群）で有意に低く、腎臓においてはエオジン好性の円柱を含有する尿細管拡張の発生頻度がグリセロール投与群（Ⅴ・Ⅵ群）で有意に高かった。心臓・脳など呼吸器系以外の器官における自然発生病変の発生頻度に関しては、マグネタイト・ γ -オリザノール・グリセロールのいずれもなんらの影響も与えなかった。

[プロモータ試験]

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10）。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5）。

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6）。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11）。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3mm以上の結節について有意な減少を示した（図12）。

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胞マクロファージの肺胞腔への浸潤・炎症性細胞浸潤・Ⅱ型肺胞上皮の腫大・線維化など、慢性炎症の所見を認めた（図13-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、肺胞上皮過形成（図13-C）・腺腫（図13-D）・腺癌（図13-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13-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7）。

D. 考察

[ADME試験]

気管内投与されたマグネタイトの量は、肺で1日に最高値に達した後、7日まで比較的速やかに減少し、21-50日にピーク時のほぼ3分の1の濃度でプラトーに推移した。したがって、肺でのマグネタイトの生物学的半減期は、ほぼ7日間であると推定された。Zhuらは、SDラットの雄にアイソトープで標識した

Fe₂O₃を気管内投与して体内分布及び排泄を観察した試験の肺におけるFe₂O₃の生物学的半減期として、ほぼ45日という本試験結果より長い値を報告している¹²⁾。Zhuらの用いたFe₂O₃は平均粒径が144±36 nm、比表面積が53.27 m²/gであるのに対し、本試験で用いたマグネタイトは粒径5-15 nm、比表面積が122 m²/gのスラリー(Fe₃O₄の超微粒子分散液)であった。したがって、本試験のマグネタイト粒子は、非常に微細であり、マクロファージに容易に貪食された結果、Zhuらの実験と比較して短期間で肺から排出されたものと考えられる。

気管内投与されたナノ物質の移行については、[1]肺胞マクロファージにより貪食されリンパ管を介して血流へ、[2]肺胞腔内の微粒子が肺胞上皮・基底膜・血管内皮を経て血流へ、[3]肺から気道内を上行し喀痰等の嚥下により消化管から血流あるいは糞便中へ、等の経路がある¹³⁾。Zhuらは、気管内投与したFe₂O₃が、肝・腎・脾など単核貪食細胞の多い器官に多く分布したと報告している¹²⁾。本試験においても、肝・腎で鉄濃度が1日から50日まで継続して増加する傾向が認められた。したがって、気管内投与されたナノ粒子は、マクロファージに貪食され、他臓器に移行したものと考えられる。

Hubbsらは、ナノ粒子の体内動態に関して、ナノ粒子の血液脳関門通過の決定的要因が粒子の大きさであると述べている¹⁴⁾。本試験では、脳において50日に対照群と比較して鉄濃度の有意な上昇が認められた。このことは、本試験で用いたマグネタイトが粒径5-15 nmの超微粒子である事実と併せ、マグネタイトが血液脳関門を通過し脳に移行する可能性を示唆する。この点については、今後、詳細な検討が必要である。

本試験の病理組織学的検索においては、投与群の肺及びリンパ組織にマグネタイトを貪食したマクロファージの浸潤が多数認められた。肺の粒子貪食マクロファージは投与後の時間経過に伴って減少し、この組織学的変化の推移は肺の鉄濃度の推移とよく一致していた。したがって、気管内投与されたマグネタイトは、肺胞マクロファージにより貪食され、一定期間肺に停留した後、徐々に肺からリンパ節及び他臓器に移行したと考えられる。一方、体外への排泄は尿と比較して糞に多く、尿中鉄濃度の上昇がわずかであったことから尿路系を介した排泄は少ないと考えられる。

[イニシエータ試験およびプロモータ試験]

マグネタイトの発がん性に関しては、Slesinskiらが、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、肺の腫瘍発生が増加しなかったと報告している¹⁵⁾。また、Steinhoffらは、8週齢のSDラットにマグネタイト(平均粒径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ヵ月齢で病理検索した結果、マグネタイトに発がん性が認められなかったと報告している¹⁶⁾。しかしながら、Pottらは、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ヵ月齢で検索した結果、69%のラットに肺の腫瘍が認められたと報告した¹⁷⁾。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⁷⁾。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ョン(0.2-10 μm, 2-3 μm, 0.5-1.0 μm, 20-60 nm)で遺伝毒性⁸⁾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。イニシエータ試験では、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。プロモータ試験では、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。

さらに、プロモータ試験では、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

本研究は、ラットに気管内投与したマグネタイトについて、その体内動態と肺に対する発がん性を有さないことを明らかにするに留まらず、肺発がんを抑制する可能性を示した。

F. 引用文献

- 1) Hood E, 2004. Nanotechnology: Looking as we leap. *Environ Health Perspect* **112**, A740-749.
- 2) Kikumori T, Kobayashi T, Sawaki M, Imai T, 2009. Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes. *Breast Cancer Res Treat* **113**, 435-441.
- 3) Kawai N, Futakuchi M, Yoshida T, Ito A, Sato S, Naiki T, Honda H, Shirai T, Kohri K, 2008. Effect of heat therapy using magnetic nanoparticles conjugated with cationic liposomes on prostate tumor in bone. *Prostate* **15**, 784-792.
- 4) Jin H, Kang KA, 2007. Application of novel metal nanoparticles as optical/thermal agents in optical mammography and hyperthermic treatment for breast cancer. *Adv Exp Med Biol* **599**, 45-52.
- 5) Lin BL, Shen XD, Cui S, 2007. Application of nanosized Fe₃O₄ in anticancer drug carriers with target-orientation and sustained-release properties. *Biomed Mater* **2**, 132-134.
- 6) 広瀬明彦, 西村哲治, 菅野純, 2009. 産業用ナノマテリアルの健康影響評価法開発における課題と慢性影響研究の重要性. *Bull Natl Inst Health Sci* **127**, 15-25.
- 7) 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).
- 8) 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-κB, *Chemical Research in Toxicology*, **24**, 1460-1475 (2000)
- 9) Ringler D, Dabich L, 1979. Hematology and clinical biochemistry. In: Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH (Eds), *The laboratory rat, 1. Biology and diseases*, Academic Press, New York, pp 105-121.
- 10) Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB, 2000. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicol Sci* **55**, 24-35.
- 11) 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).
- 12) Zhu MT, Feng WY, Wang Y, Wang B, Wang M, Ouyang H, Zhao YL, Chai ZF, 2009. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment. *Toxicol Sci* **107**, 342-51.
- 13) Rozman KK, Klaassen CD, 2004. Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: Klaassen CD (Ed), *Casarett and Doull's toxicology 6th ed.*, Scientist co. Tokyo, 127-154.
- 14) ubbs AF, Mercer RR, Benkovic SA, Harkema J, Sriram K, Berry DS, Goravanahally MP, Nurkiewicz TR, Castranova V, Sargent LM, 2011. Nanotoxicology—A Pathologist's Perspective. *Toxicologic Pathology*, **39**, 301-324.
- 15) 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)
- 16) Steinhoff D, Mohr U, Hahnemann S: Carcinogenesis studies with iron oxides, *Experimental Pathology*, **43**, 189-194 (1991)
- 17) Pott F, Ziem U, Reiffer FJ, Huth F, Ernst H, Mohr U: Carcinogenicity studies on fibres, metal compounds, and some other dusts in rats,

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 広瀬明彦, 高木篤也, 西村哲治, 津田洋幸, 坂本義光, 小縣昭夫, 中江 大, 樋野興夫, 菅野 純: ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性, 薬学雑誌, 131, 195-201, 2011
- 2) Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A: Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice, J Toxicol Sci, 37, 81-89, 2012
- 3) Yamaguchi A, Fujitani T, Ohyama K, Nakae D, Hirose A, Nishimura T, Ogata A: Effects of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotube on immune and inflammatory responses in mice, J Toxicol Sci, 37, 177-189, 2012
- 4) Xu J, Futakuchi M, Shimizu H, Alexander DB, Yanagihara K, Fukamachi K, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Ogata A, Sakamoto Y, Nakae D, Omori T, Tsuda H: Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats, Cancer Science 103, 2045-2050 (2012)
- 5) Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Ogata A, Nakae D: Acute phase pulmonary responses to the single intratracheal spray instillation of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in Fischer 344 rats, Journal of Toxicologic Pathology 25, 233-239 (2012)
- 6) 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)
- 7) 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) Totsuka Y, Kato T, Ishino K, Masuda S, Nakae D, Tada Y, Oyama K, Ogata A,

Kawanishi M, Yagi T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H: Genotoxicity induced by nanomaterials, 41st European Environmental Mutagen Society (EEMS) Annual Conference (Barcelona, 2011.7) .

- 2) 坂本義光, 小縣昭夫, 前野智和, 西村哲治, 広瀬明彦, 大山謙一, 中江 大: 腹腔内投与によるラット中皮腫の誘発性に対して多層カーボンナノチューブ (MWCNT)の性状が及ぼす影響, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (横浜, 2011.7) .
- 3) 山口敦美, 藤谷知子, 大山謙一, 広瀬明彦, 西村哲治, 小縣昭夫, 中江 大: 多層カーボンナノチューブの投与による鉛法免疫系への影響 (II), 第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (横浜, 2011.7) .
- 4) 高橋 省, 坂本義光, 大山謙一, 小縣昭夫, 中江 大, 広瀬明彦, 西村哲治: 多層カーボンナノチューブ腹腔投与マウスにおける急性的酸化ストレス, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (横浜, 2011.7) .
- 5) 山本行男, 大貫 文, 坂本義光, 大山謙一, 中江 大, 小縣昭夫: 多層カーボンナノチューブ投与ラットの血清におけるプロテオーム解析, 第84回日本生化学会大会 (京都, 2011.9) .
- 6) Sakamoto Y, Ogata A, Nishimura T, Hirose A, Nakae D: Influence of the product level physic-chemical property on the carcinogenicity of multi-wall carbon nanotube in rats, 第70回日本癌学会学術総会 (名古屋, 2011.10) .
- 7) 鈴木俊也, 小杉有希, 富士栄聡子, 保坂三継, 中江 大, 小縣昭夫: 水試料中のカーボンナノチューブの分析法, 第48回全国衛生化学技術協議会総会・研究会 (長野, 2011.11) .
- 8) 富士栄聡子, 鈴木俊也, 小杉有希, 保坂三継, 小縣昭夫, 中江 大: 水試料中のフラーレンの分析法, 第48回全国衛生化学技術協議会総会・研究会 (長野, 2011.11) .
- 9) 多田幸恵, 齋藤育江, 矢野範男, 高橋博, 湯澤勝廣, 安藤 弘, 久保喜一, 長澤明道, 大山謙一, 小縣昭夫, 中江 大: 気管内注入による磁性ナノ粒子マグ

- ネタイトの体内動態及び排泄について、第 28 回日本毒性病理学会年次学術集会（千代田，2012.2）。
- 10) 坂本義光，小縣昭夫，前野智和，西村哲治，広瀬明彦，大山謙一，中江 大：ラットにおける多層カーボンナノチューブの発がん性に対して製品レベルの物理化学的特性が及ぼす影響，第 28 回日本毒性病理学会年次学術集会（千代田，2012.2）。
 - 11) 坂本義光，小縣昭夫，前野智和，西村哲治，広瀬明彦，小杉有希，鈴木俊也，中江 大：ラットによる 5 種の多層カーボンナノチューブの腹腔内中皮腫発生に関する検討，第 39 回日本毒性学会学術年会（仙台，2012.7）。
 - 12) 藤谷知子，大山謙一，広瀬明彦，西村哲治，中江 大，小縣昭夫：マウスにおける多層カーボンナノチューブの催奇形性について，第 39 回日本毒性学会学術年会（仙台，2012.7）。
 - 13) 坂本義光，小縣昭夫，西村哲治，広瀬明彦，中江 大：5 種の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のラット腹腔内投与による中皮腫の誘発，第 71 回日本癌学会学術総会（札幌，2012.9）。
 - 14) 中江 大，坂本義光，藤谷知子，多田幸恵，齋藤育江，保坂三継，猪又明子，小縣昭夫：ナノマテリアルの発がん性，日本環境変異原学会第 41 回大会（静岡，2012.11）。
 - 15) 坂本義光，小縣昭夫，西村哲治，広瀬明彦，猪又明子，中江 大：ラットにおける多層カーボンナノチューブによる中皮腫誘発性に繊維長が及ぼす影響，第 29 回日本毒性病理学会（つくば，2013.1）。
 - 16) 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，猪又明子，小縣昭夫，中江 大： γ -オリザノール/グリセロール併用投与が磁性ナノ粒子マグネタイト気管内スプレー投与によるラット肺病変に及ぼす影響，第 29 回日本毒性病理学会（つくば，2013.1）。
 - 17) 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）。
 - 18) 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）。
 - 19) 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）。
 - 20) 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)。
 - 21) 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）。
 - 22) 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）。
 - 23) 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)。
 - 24) 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）。
 - 25) 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）。
 - 26) 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

図1. イニシエータ試験：実験デザイン.

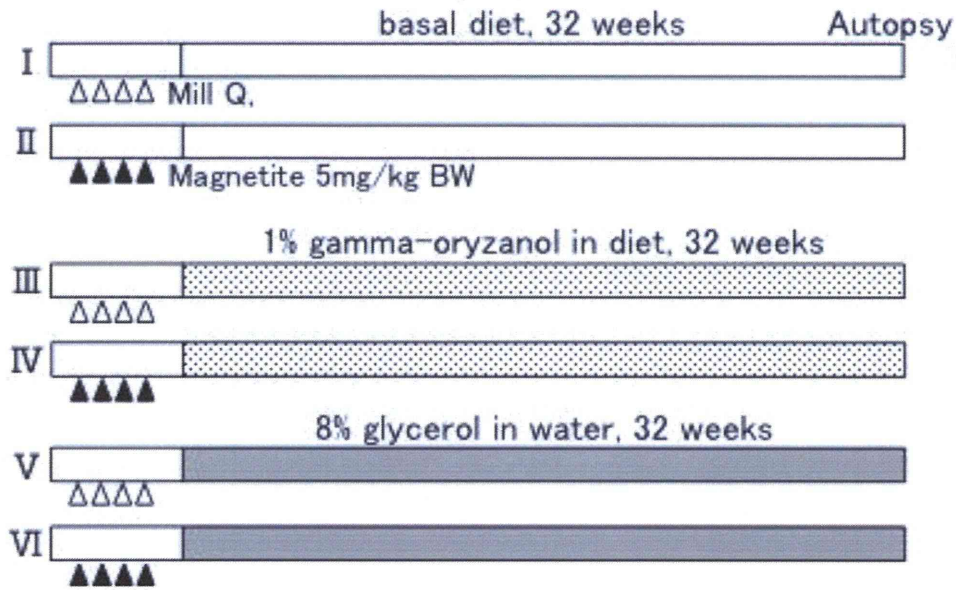


図2. プロモータ試験：実験デザイン.



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

表 1. ADME 試験：初期及び最終体重と 1・3・7・21・50 日の尿量・糞乾燥重量・臓器重量。

	投与用量 (mg/kg 体重)	投与後期間 (日)			
		1	3	7	21
初期体重 (g)	0 (control)	231.7±5.4 ^c	232.9±7.2	229.5±7.3	232.0±10.3
	15	226.2±7.2	219.0±5.9	220.3±12.2	222.2±9.5
最終体重 (g)	0	232.6±4.9	236.8±9.2	239.7±9.3	266.0±16.1
	15	216.1±7.7*	214.5±9.9*	221.8±6.7	244.4±5.8
尿量 (mL) ^a	0	10.3±1.5	12.0±2.1	8.8±0.7	9.5±2.3
	15	8.3±0.7	8.9±0.7	7.6±0.4	9.5±0.7
糞乾燥重量 (g) ^b	0	3.4±0.3	3.4±0.1	3.4±0.3	3.2±0.6
	15	2.4±0.4*	2.7±1.0	3.2±0.5	3.7±1.9
臓器絶対重量 (mg)					
肝	0	8239.8±263.0	9135.2±192.5	8639.7±436.8	8627.3±1619.3
	15	6787.6±28.0*	8382.9±1007.8	7937.1±681.8	7646.8±1083.2
腎	0	1591.7±28.7	1656.6±65.4	1673.5±86.9	1774.7±116.8
	15	1552.6±51.8	1454.4±54.2*	1574.1±58.2	1629.1±51.7
肺	0	827.4±27.6	784.6±11.8	817.4±53.0	873.3±42.6
	15	945.1±33.9*	968.4±42.0*	1033.5±38.8*	898.1±44.1
脳	0	1926.3±10.8	1894.3±15.7	1894.3±15.7	1948.4±51.0
	15	1899.5±15.9	1866.2±26.3	1866.2±26.3	1916.3±22.9

^a24時間尿量, ^b24時間乾燥糞量

^c数値は平均値±標準偏差 (n=3).

*対照群との比較で有意差あり (*P<0.05, t検定)

表 2. ADME 試験 : 1・3・7・21・50 日の血液・尿・糞・臓器中の鉄濃度.

	投与用量 (mg/kg 体重)	投与後期間 (日)				
		1	3	7	21	50
血液	0 (対照群)	0.189±0.065 ^a	0.348±0.066	0.222±0.028	0.124±0.019	0.140±0.012
	15	0.188±0.075	0.468±0.108	0.261±0.070	0.150±0.030	0.196±0.108
尿	0	0.272±0.281	0.193±0.049	0.273±0.039	0.440±0.089	0.535±0.087
	15	0.154±0.105	0.169±0.066	0.226±0.070	0.396±0.089	0.587±0.026
糞	0	140.7±5.933	158.4±9.708	160.7±11.49	209.2±45.45	222.1±2.697
	15	148.4±2.906	170.0±28.48	175.7±16.75	213.4±20.64	233.7±10.63
肝	0	4.059±1.400	2.823±0.184	2.534±0.488	2.598±0.929	2.951±0.622
	15	4.905±0.996	3.876±0.748	2.783±0.878	1.804±0.631	3.440±0.517
腎	0	3.831±0.162	3.427±0.050	3.322±0.581	3.575±2.132	7.164±1.911
	15	4.022±1.008	4.111±0.930	3.615±0.277	3.364±0.489	7.551±0.957
肺	0	13.25±1.506	11.27±1.305	7.909±1.592	5.069±3.906	9.699±1.305
	15	1564.2±79.01*	956.6±136.4*	723.4±150.5*	453.9±78.69*	461.1±43.23*
脳	0	2.159±2.005	2.309±0.297	1.813±0.313	3.315±0.437	1.974±0.653
	15	2.590±0.479	2.416±0.735	1.613±0.355	2.963±1.350	3.736±0.612*

^a 数値は平均値±標準偏差 (n=3), 血液及び尿 (µg/mL), 糞 (µg/g 乾燥重量), 臓器 (µg/g 湿重量)

*対照群との比較で有意差あり (*P<0.05, t検定)

図 3. ADME 試験：1・3・7・21・50 日の血液・尿・糞・臓器中の鉄濃度（投与群平均値から対照群平均値を差し引いた値を表示）。

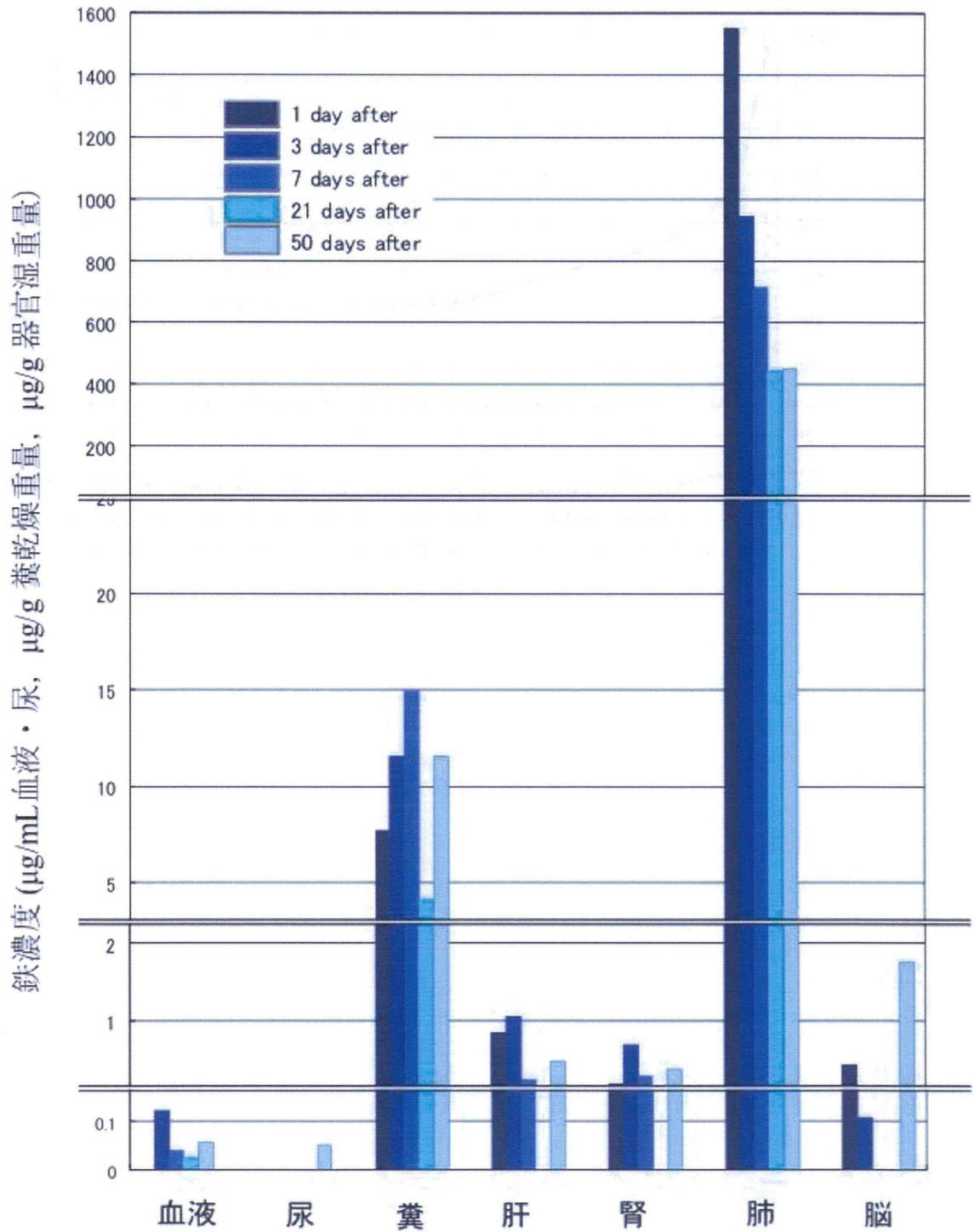


図4. ADME 試験：1・3・7・21・50 日の肺の鉄濃度.

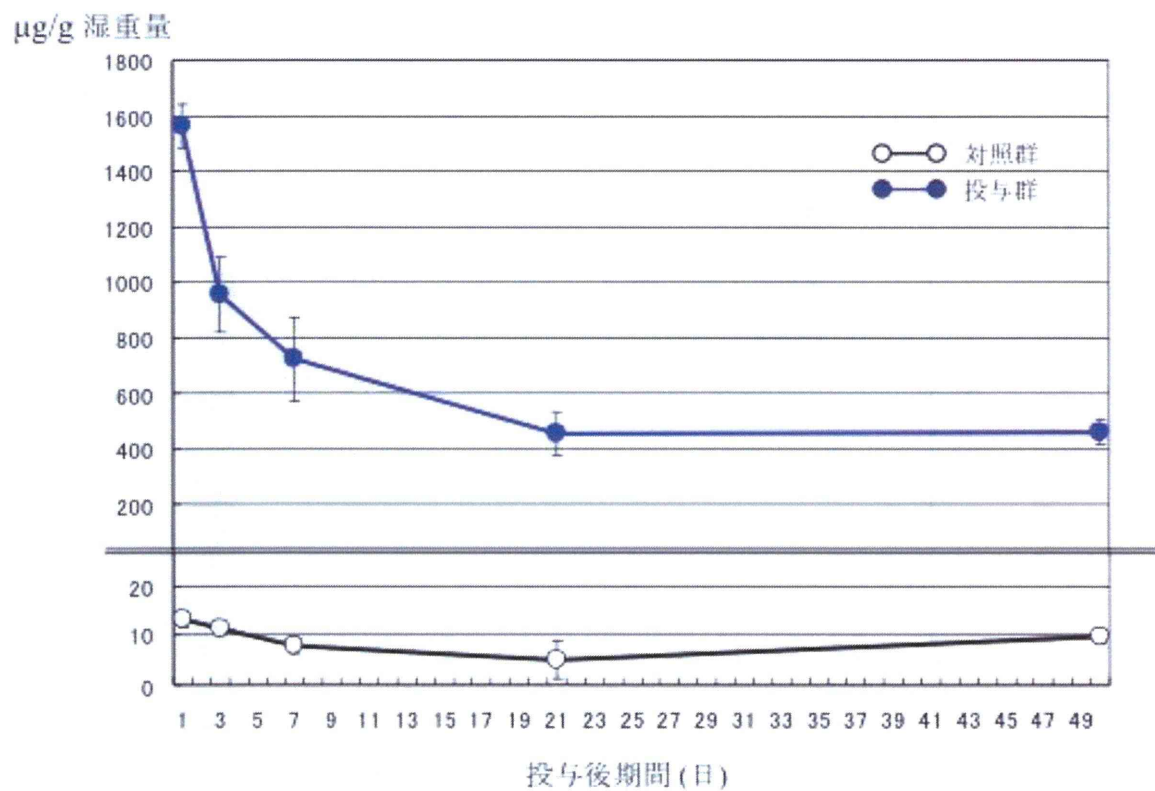


図5. ADME試験：マグネタイト投与後7日（A, C），50日（B, D）の肉眼像. 肺（A, B），
胸腺リンパ節（C, D；矢印）.

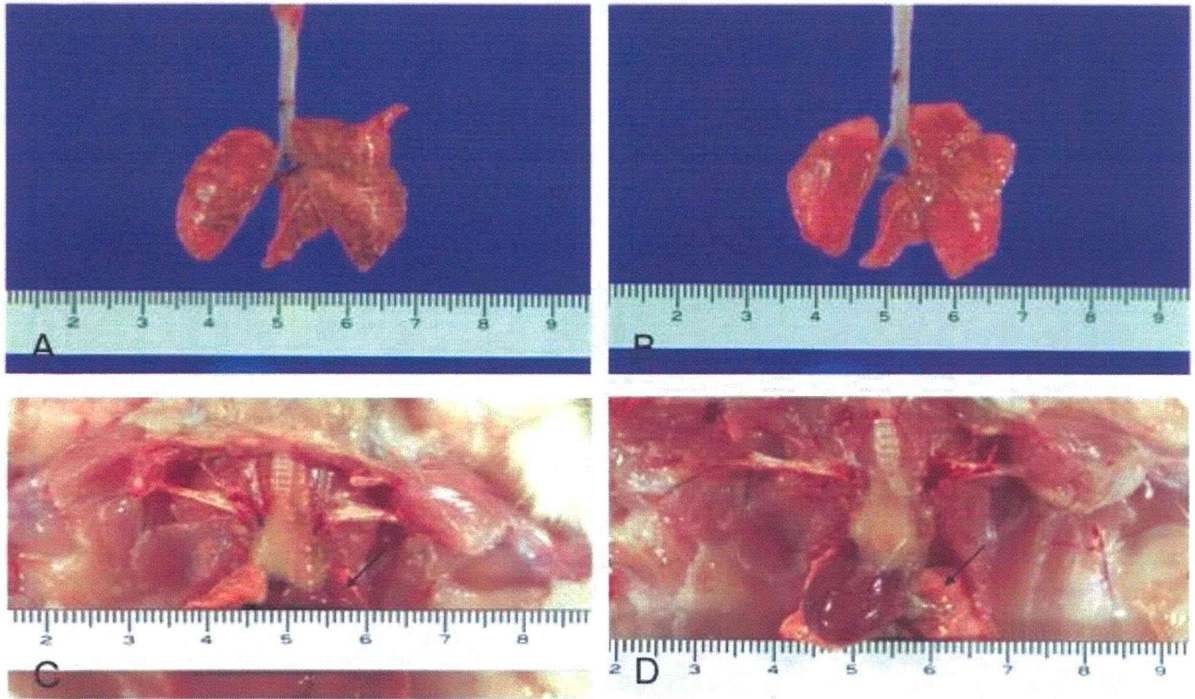


図 6. ADME 試験：マグネタイト投与後 7 日 (A, C), 50 日 (B, D) の病理組織像. 肺 (A, B), 胸腺リンパ節 (C, D). (ヘマトキシリン・エオジン染色; 枠内はベルリンブルー染色).

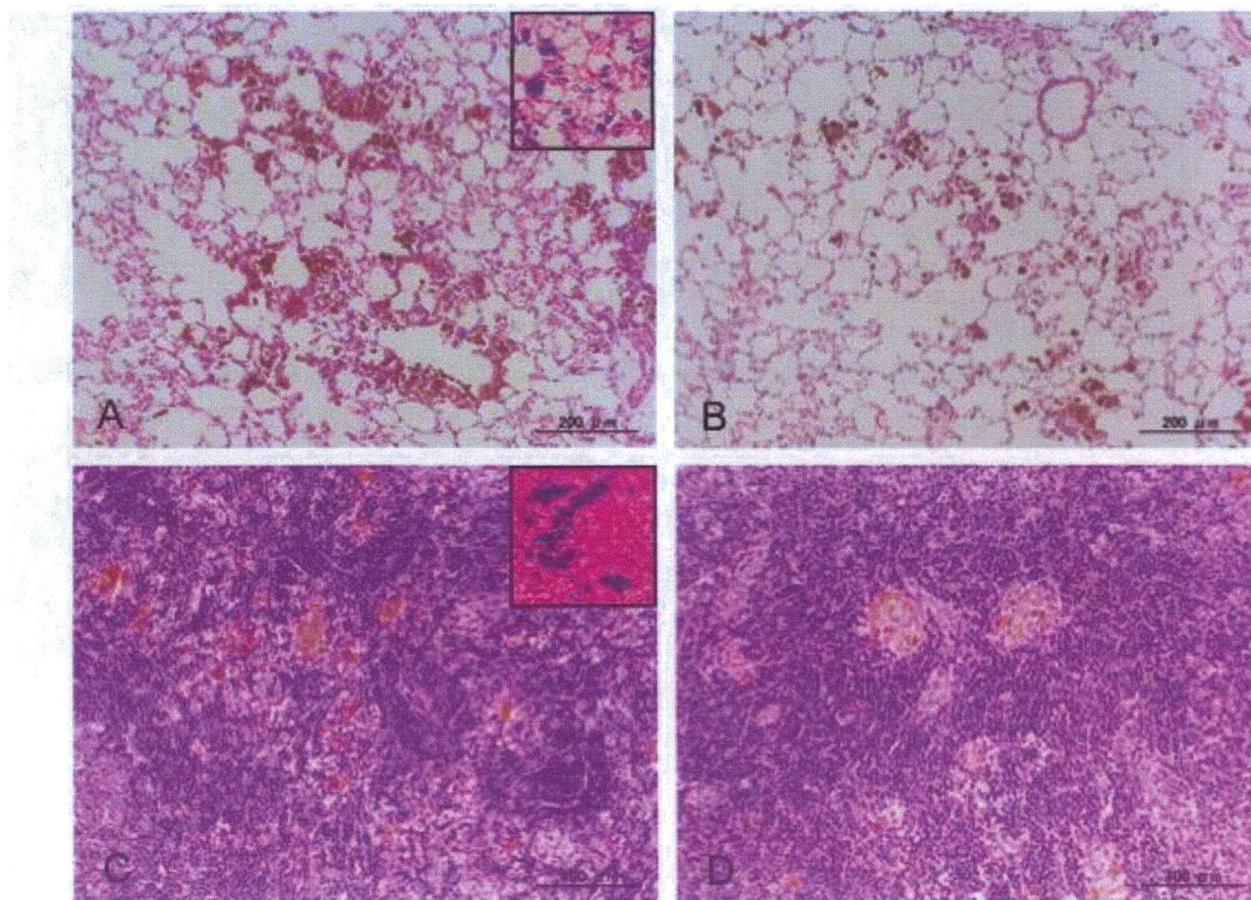


図7. イニシエータ試験：平均体重・摂餌量・摂水量の推移.

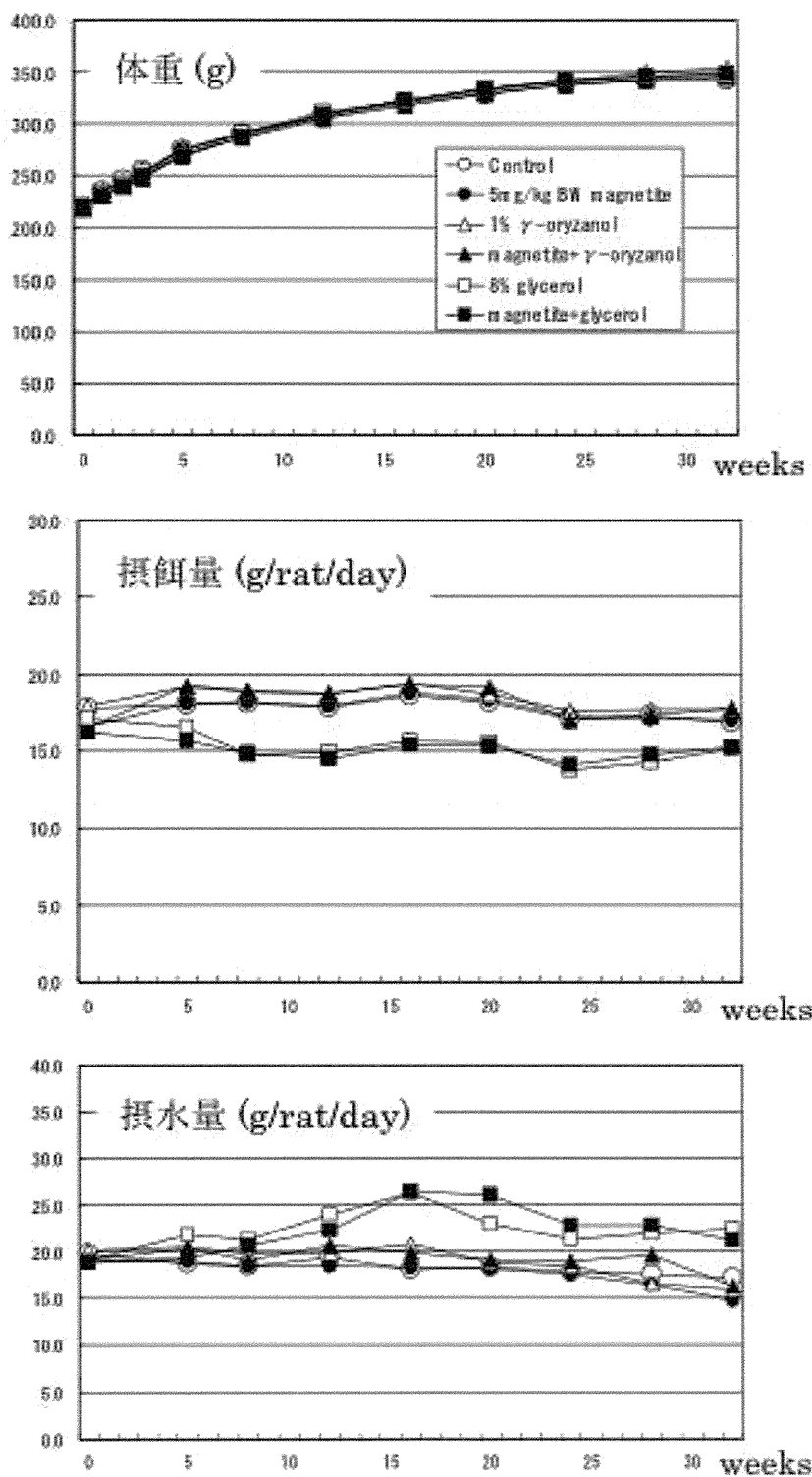


表 3. イニシエータ試験：体重及び臓器重量.

群	I	II	III	VI	V	VI
マグネタイト用量 (mg/kg 体重)	0	5.0	0	5.0	0	5.0
γ-オリザノール(%)	0	0	1.0	1.0	0	0
グリセロール (%)	0	0	0	0	8.0	8.0
実験開始時動物数	20	20	20	20	20	20
初期体重 (g)	218.8±9.5 ^a	219.4±10.3	218.7±9.1	219.4±8.9	218.6±8.8	219.4±9.2
試験匹数	20	20	20	20	20	20
最終体重 (g)	342.9±35.3	349.3±23.8	354.0±28.0	347.4±22.7	342.5±37.4	350.6±25.2
絶対重量 (mg)						
脳	2062.7±38.7	2054.1±37.2	2057.2±52.3	2053.3±39.2	2064.6±59.0	2071.7±40.4
副腎	41.9±4.1	41.1±2.5	41.7±3.8	41.8±4.1	44.8±5.5	41.9±4.4
心臓	932.1±75.1	938.4±55.3	958.9±66.9	922.3±59.3	920.7±58.7	927.2±48.7
肺	968.1±56.5	1087.3±85.9 *†	912.0±79.4	1039.2±62.0 *†	944.3±45.4	1029.5±88.9 †
脾臓	598.1±60.9	616.9±35.8	653.7±92.2	604.7±37.6 †	621.1±62.1	629.8±39.4
肝臓 (g)	10.569±1.387	10.710±1.027	10.792±1.191	10.578±0.787	11.781±1.478 *	12.194±1.170 *
腎臓	2382.4±220.8	2357.8±154.1	2364.4±157.5	2271.0±131.4	2457.2±187.3	2464.6±127.1
精巣	3065.4±178.2	3167.1±113.0	3106.9±395.2	3188.3±123.5	3087.7±360.9	3103.6±490.7 *
相対重量 (mg/100g 体重)						
脳	607.7±64.1	590.3±40.8	584.3±44.6	593.0±32.1	609.6±67.5	593.6±41.8
副腎	12.3±1.7	11.8±1.0	11.8±0.9	12.1±1.2	13.3±3.0	12.0±1.5
心臓	272.7±12.8	269.1±13.3	271.7±19.0	265.6±8.1	270.6±19.1	265.3±18.3
肺	283.3±23.4	311.8±22.5 *†	258.5±24.3 *	299.7±16.5 †	278.9±32.6	294.1±23.1
脾臓	174.6±6.9	177.0±9.4	184.9±23.7	174.2±6.6	181.8±8.9 *	179.9±8.5
肝臓 (g)	3.076±0.146	3.063±0.163	3.047±0.223	3.045±0.127	3.435±0.137 *	3.479±0.232 *
腎臓	696.0±25.5	675.8±32.5 †	669.9±44.3 *	654.2±19.2 *	721.8±51.1	705.0±44.2
精巣	903.1±104.6	910.1±61.0	880.9±122.1	920.0±46.2	913.5±151.8	888.8±153.2

^a数値は平均値±標準偏差

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

†各群間の比較で有意差あり (I vs II, III vs IV, V vs VI; $P<0.05$, Aspin-Welch t test)

図 8. イニシエータ試験：肺の肉眼像. I, 対照群; II, マグネタイト単独投与群; III, γ -オリザノール単独投与群, IV, マグネタイト・ γ -オリザノール併用投与群; V, グリセロール単独投与群, VI, マグネタイト・グリセロール併用投与群.

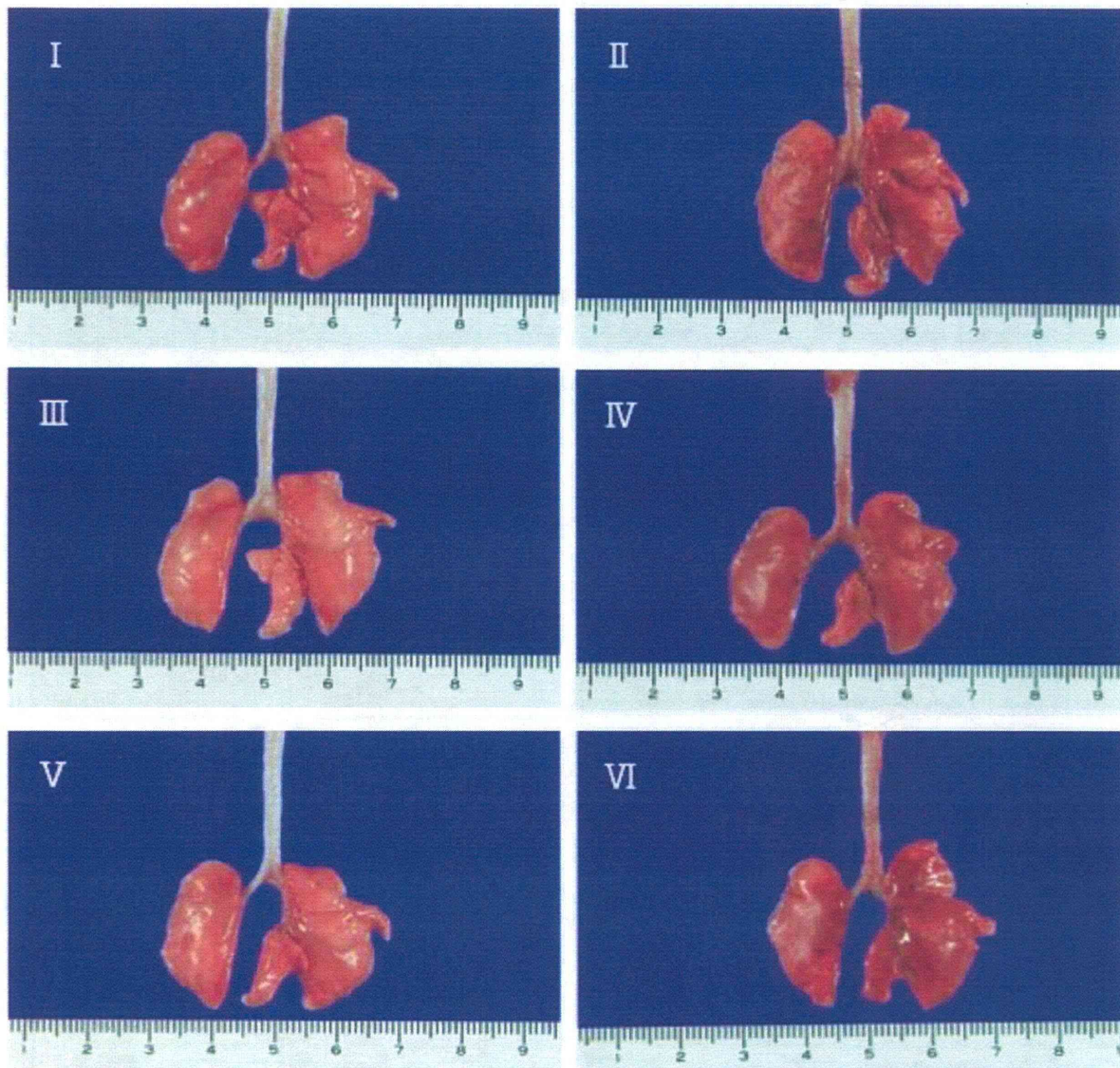


図 9. イニシエータ試験：肺の病理組織像. I, 対照群; II, マグネタイト単独投与群; III, γ -オリザノール単独投与群, IV, マグネタイト・ γ -オリザノール併用投与群; V, グリセロール単独投与群, VI, マグネタイト・グリセロール併用投与群.

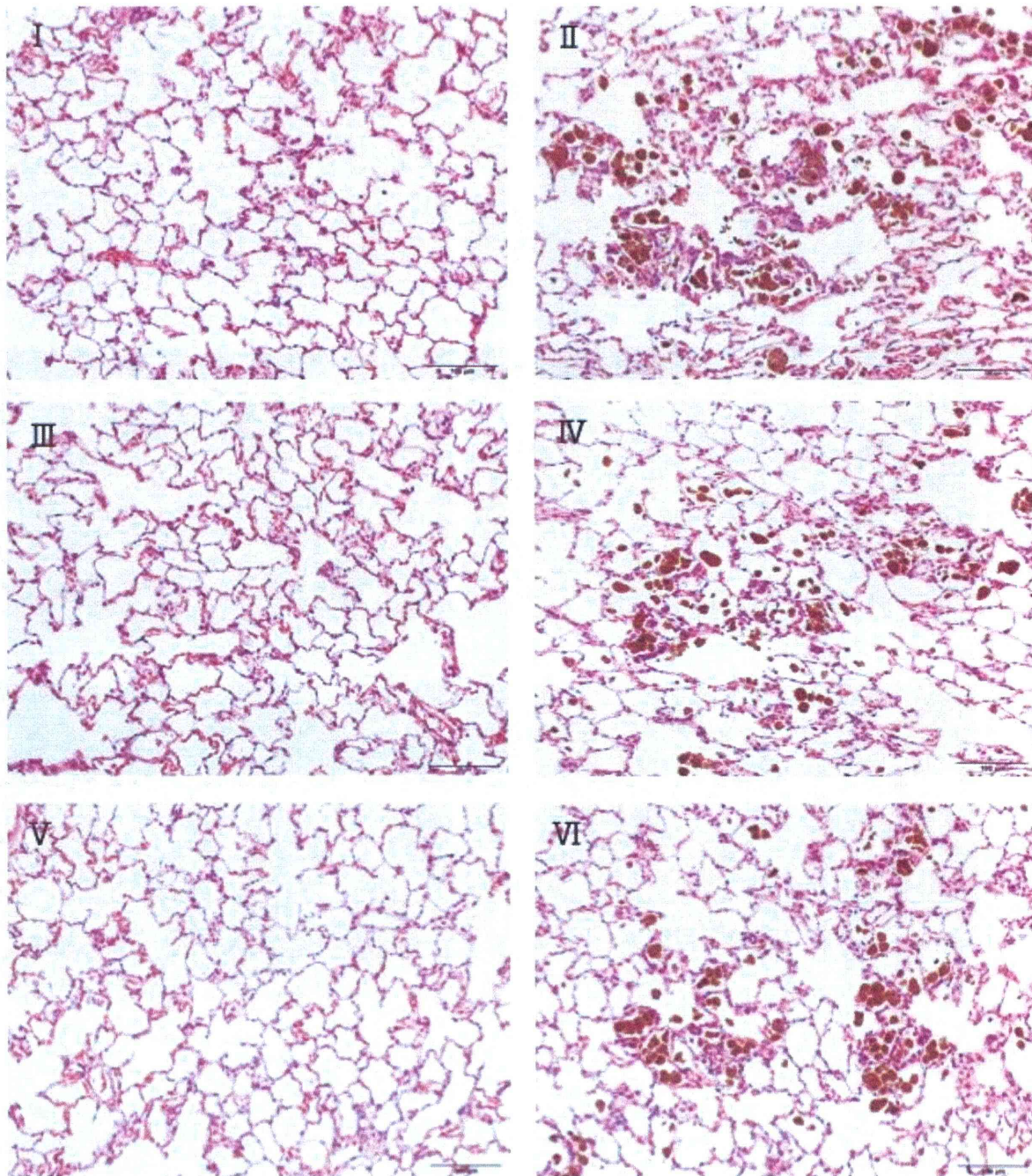


表 4. イニシエータ試験：肺・肝・腎の病理組織学的解析結果.

群	I	II	III	VI	V	VI
マグネタイト用量 (mg/kg 体重)	0	5.0	0	5.0	0	5.0
γ-オリザノール(%)	0	0	1.0	1.0	0	0
グリセロール (%)	0	0	0	0	8.0	8.0
観察匹数	20	20	20	20	20	20
肺						
マグネタイト食食マクロファージの浸潤	0 ^a	20*	0	20*†	0	20*†
炎症性細胞浸潤	2	20*	3	20*†	5	20*†
II型肺胞上皮腫大	1	20*	0	20*†	0	20*†
肺胞上皮過形成	0	0	0	0	0	0
肝臓						
炎症性細胞浸潤	20	20	17	19	17	17
微小肉芽	0	0	0	1	1	0
肝細胞巣状壊死	12	11	9	8	9	10
胆管増生	18	19	19	17	8*	9*
腎臓						
炎症性細胞浸潤	3	5	3	4	4	3
尿細管拡張	5	7	8	8	14*	14*
再生尿細管	17	15	12	17	15	18
石灰沈着	6	4	4	3	4	4
虚血性尿細管萎縮	1	0	0	0	1	1
嚢胞	0	1	0	1	2	0

^a数値は所見を示したラット匹数.

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

† 各群間の比較で有意差あり (I vs II, III vs IV, V vs VI; $p < 0.05$, Fisher's exact test).

他の組織及び器官では対照群との比較で明らかな変化を認めなかった.

図 10. プロモータ試験：平均体重の推移.

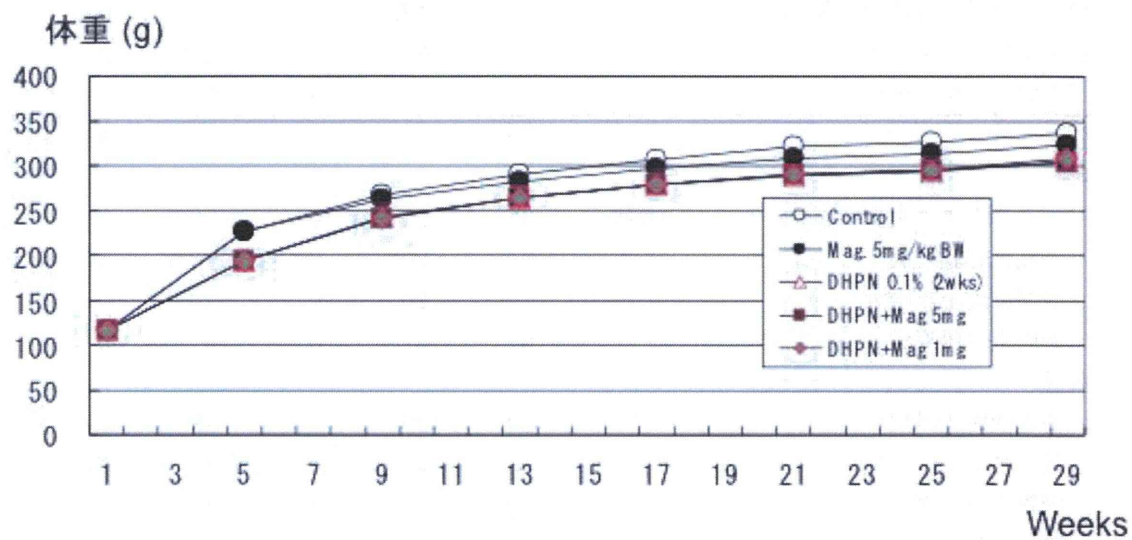


表 5. プロモータ試験：血液性状

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 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	32.6 \pm 4.8*	35.6 \pm 5.4	27.8 \pm 4.8*	32.5 \pm 6.7†	32.2 \pm 6.8
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	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 ($\times 10^9/\mu\text{L}$)	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

*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).

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

表 6. プロモータ試験：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*	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	865.5 \pm 55.1	980.5 \pm 104.0	909.9 \pm 96.0	913.8 \pm 109.7	891.0 \pm 74.8*

*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).

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