

平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業)分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアル曝露による慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの慢性影響評価系に関する研究および国際動向調査

研究分担者: 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 部長
研究協力者: 北條 幹 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 主任
坂本 義光 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部
山本 行男 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部
長谷川 悠子 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部
猪又 明子 東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 科長
中江 大 東京農業大学 応用生物科学部 教授
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員
独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 所長
高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨

本研究では、ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性及び遅発毒性に関わる研究の一環として、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の腹腔内投与および気管内投与による発がん性と、催奇形性について解析を行っている。MWCNT-7の腹腔内投与により誘発されるラット腹膜中皮腫の経時的な観察において、少なくとも32週間にわたって腹腔内の炎症反応が持続し、腹膜周囲でCINC-1やMCP-1等の分泌が亢進することが示された。病理組織学的には、投与8週後より、観察期間を通して肉芽腫形成、中皮下組織の肥厚、肥満細胞および好酸球の集簇が腹膜全般に認められた。16週から24週後にかけて、腹膜表層の組織球の集簇は減少し、間質で線維化が進行した。また、3種のMWCNTの単回噴霧投与終生飼育実験(投与後156週迄)を行った結果、SD-1およびMWNT-7投与群で中皮腫が胸腔内あるいは腹腔内で有意ではないが単発的に認められた。投与検体の前処理がMWCNTの腹腔内投与発がん性に与える影響を検討した実験において、投与後44週が経過し、低濃度群および対照群を除く各MWCNT投与群で、中皮腫によると思われる死亡が27週後から認められた。中皮腫による死亡数の中間評価では、熱処理でその誘発能が減弱した催奇形性とは異なり、熱処理によりMWCNTの発がん性が顕著に変化する可能性は少ないことが考えられる。また、OECDやEUの活動において規制当局、産業界に提言するナノマテリアルの評価に必要な評価手法に関して、H28年度に行われた専門家会議などの国際動向を調査した。

A. 研究目的

新素材として一般消費者向けにも使用されている産業用ナノマテリアルについては、物理化学特性が従来の粒子とは異なることから、未知のヒト健康影響がもたらされる可能性と

共に、既存の毒性試験法がその評価に適切かどうかについて問題視されている。これまで、およそ10年近くにわたりOECDや各国がこの問題に取り組んできており、ナノマテリアルの特性に配慮した毒性試験用サンプル分散法

や、試験ガイドラインの改訂の必要性が示されつつあるものの、ナノマテリアル特有の多様な物理特性に応じた体系的な評価アプローチが見いだせずにいる状況である。一方、我々は体内残留性に基ついた慢性影響が最も懸念すべき健康影響であるとの認識に則り、in vivo 試験研究を中心に進めており、形状的にアスベストに類似した多層型カーボンナノチューブ (MWCNT) が中皮腫誘発性を持つことを明らかにしてきた。本研究では、MWCNT によるラット中皮腫誘発の経過とそのメカニズム解析と気管内投与による発がん誘発能について解析を行っている。

B. 研究方法

MWCNT によるラット中皮腫誘発過程の経時的観察

MWCNT の腹腔内投与により誘発されるラット腹膜中皮腫について、その発現前から発現までの病理組織学および免疫学的性状を経時的に解析した。MWNT-7 を 2%CMC 溶液に懸濁分散させ、1mg/kg 体重の用量で F344 雄性ラット (8 週齢) の腹腔内に単回投与した。8・16・24・32 週間目後に各々 10 匹から 15 匹を解剖し、病理学的検索と、腹腔洗浄液の各種液性因子 (IL-1 β ・4・6・10・12、TNF- α 、IFN- γ 、CINC-1、MCP-1/CCL-2、CTGF、メソテリン) の濃度測定を行った。

ラットにおける多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の経気管噴霧単回投与および投与後終生飼育実験

MWCNT を経気管単回投与後、終生飼育実験を行うことで、長期間に亘って体内に滞留する MWCNT の呼吸器系及び体腔中皮への影響、また加齢に伴って発現する腫瘍性及び非腫瘍性病変発現に対する影響について

観察した。3 種の MWCNT {MWNT-7 : 平均長、5.48 μ m、径、66.8nm ; SD-1 : 平均長、4.51 μ m、径、177nm ; SD-2 : 長さ 3 μ m、径 10-15nm (提供企業データ)} をそれぞれ 2%CMC 溶液に懸濁分散させ、0.5mg/kg 体重の用量で F344 雄性ラット (10 週齢) 各群 15 匹に、経気管肺内噴霧法 (TIPS) により単回投与した。動物はいずれも投与後終生飼育し、途中死亡例および瀕死屠殺例について、病理組織学的解析を行った。

投与検体の前処理が MWCNT の発がん性に与える影響

熱処理 (250 $^{\circ}$ C、2 時間) が、MWCNT のマウス催奇形性の結果に影響を与えることが示されたため、熱処理 MWCNT を用い、ラット腹膜中皮腫の誘発性を検討することとした。また、熱処理は懸濁媒への分散性に影響することが疑われたため、Taquann 処理 MWCNT についても検討した。MWNT-7 に対し、熱処理あるいは Taquann 処理を施し、0.1%Tween80 に懸濁分散させ、以下の用量で 7 群 (①から⑦) の F344 雄性ラット (10 週齢) 各群 20 匹に、腹腔単回投与し、途中死亡例および瀕死屠殺例について、病理組織学的解析を行った : ①Taquann 処理 CNT、1mg/kg 体重 (高濃度)、②Taquann 処理 CNT、0.05mg/kg 体重 (低濃度)、③熱処理後-Taquann 処理 CNT、1mg/kg 体重 (高濃度)、④熱処理後-Taquann 処理 CNT、0.05mg/kg 体重 (低濃度)、⑤未処理 CNT、1mg/kg 体重、⑥熱処理 CNT、1mg/kg 体重、⑦対照。

国際動向調査

H28 年 4 月に EU のホスト (ブリュッセル) で開催された「産業用ナノマテリアルの有害性評価におけるグループ及びカテゴリー評価に関する OECD 専門家会合 (The OECD

Working Party on Manufactured Nanomaterials (WPMN) Expert Meeting on Grouping and Read-Across for the Hazard Assessment of Manufactured Nanomaterials)」と H28 年 11-12 月に OECD 本部の会議センター(パリ)開催された「ProSafe と OECD の合同科学会議(Joint scientific conference of ProSafe & OECD)」、および H29 年 2 月に EU の FP7 プロジェクトで開催(マラガ)された「ナノ材料安全性評価における新規ツールとアプローチ会議 (New tools and approaches for nanomaterial safety assessment)」の調査を行った。

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析、疫学研究は行っていない。動物試験を実施した研究では、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護の配慮の上で実施した

C. 研究結果

MWCNT によるラット中皮腫誘発過程の経時的観察

病理組織学的に、肉芽腫形成、中皮下組織の肥厚、肥満細胞および好酸球の集簇が投与 8 週間より、観察期間を通して腹膜全般に認められた。一方、腹膜表層の組織球の集簇は 16 週から 24 週にかけて減少し(表 1)、間質では線維化が進行した。投与後 16 週に中皮細胞の過形成が初めて観察され、32 週にはほとんどの個体に中皮腫が認められた(表 2)。腫瘍は、結節状あるいは肥厚した被膜状に腹膜全般にびまん性に広

がっていた。腫瘍組織は、長円形あるいは維芽細胞様の細胞が多く、免疫組織化学的に E-Cadherin は最表層の細胞を除き陰性であり、Desmin がびまん性に陽性であることなど、間葉系の性質が強い傾向を示した。投与 32 週後は、24 週後に比べ、細胞形態および組織像が比較的多様で、周辺組織への浸潤等悪性度が高かった(図 1)

また、腹腔洗浄液中の各種分子のうち、CINC-1、MCP-1/CCL-2、CTGF、メソテリン濃度は、各時期とも投与群が対照群より有意に高値であるが、経時的な傾向や組織変化との関連は明らかでなかった(図 2)。

ラットにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の経気管噴霧単回投与および投与後終生飼育実験

投与後 156 週で実験を終了した。対照群を含む全個体について、途中死亡あるいは瀕死の動物の剖検を実施した。投与後 104 週までの体重及び生存率には、対照群と各投与群間で顕著な差はなかった。

解剖時の肉眼的観察および組織所見から、いずれの MWCNT を投与した群においても、縦隔リンパ節および肺表面に MWCNT の沈着が認められ、単回投与によって摂取された MWCNT が非常に長い期間、体内に滞留し続けることがわかった。

組織学的に、胸腔内あるいは腹腔内で中皮腫が SD-1 および MWNT-7 投与群のみで見られたが、いずれも単発的な発現であった(有意差なし)(表 3)。肺の増殖性病変および腫瘍性病変の発現率についても投与との関連は認められなかった。また、全群に共通した変化として、単核細胞白血病、精巢間細胞腫、下垂体腫瘍および皮下線維腫

などが認められた(表3)。これらの腫瘍の発生率について投与による影響を疑わせるものはなかった。

投与検体の前処理が MWCNT の発がん性に与える影響

投与後 44 週を経過し、低濃度群および対照群を除く各 MWCNT 投与群で、中皮腫によると思われる死亡が 27 週後から認められた。各群 20 匹中の解剖例数は以下の通りである。

①Taquann 処理 CNT、1mg/kg 体重(高濃度): 18/20、②Taquann 処理 CNT、0.05mg/kg 体重(低濃度): 0/20、③熱処理後-Taquann 処理 CNT、1mg/kg 体重(高濃度): 9/20、④熱処理後-Taquann 処理 CNT、0.05mg/kg 体重(低濃度): 0/20、⑤未処理 CNT、1mg/kg 体重: 10/20、⑥熱処理 CNT、1mg/kg 体重: 14/20、⑦対照: 0/20。

⑤群と⑥群の早期死亡の各 1 例ずつを除き、肉眼所見から、すべての個体で中皮腫の発現が認められた

国際動向調査

OECD WPMN Expert Meeting on Grouping and Read-Across for the Hazard Assessment of Manufactured Nanomaterials は、OECD の WPMN プログラムの一環としてナノマテリアルの有害性評価における、グループ評価とリーアクロス手法の適用を検討するために開催されることとなった専門家会合の 1 つで OECD の 22 の代表団体から 69 名の専門家が出席して行われた。当該会議には、当研究班で様々な MWCNT を用いて、腹腔内投与などや *in vitro* 実験を行ってカテゴリー評価を

行った研究成果を紹介した。本会議の主要なアウトプットは、ナノマテリアルの有害性評価におけるデータギャップを埋めるためには、グルーピングとリーアクロス手法は必要であり適切なツールであることであった。しかしナノマテリアルの特性に応じて各種のパラメータのリストを適合させる必要と指針の作成が必要である。そのために、まず OECD の一般の化学物質に対応したグルーピングガイダンスのナノマテリアルに関する章を改定することが合意された。また、今後テストガイドラインやガイダンス改定により信頼性のあるデータを取得し、グルーピングやリーアクロスに関連したパラメータの同定を進めるべきであることが示された。

Joint scientific conference of ProSafe & OECD は、OECD 主催でオランダのインフラ・環境省が調整し、EU H2020 プロジェクト ProSafe がホストした会議であると同時に EUNANoREG の最終会議でもあった。会議の結果は、ナノ物質の影響とリスクをどのように試験・評価するかについて、政策立案者、規制当局、産業界に ProSafe プロジェクトから勧告するために基礎となる。また、OECD 試験ガイドラインプログラムにも提供される。会議は物化性状の同定評価、暴露評価、環境動態・代謝、ヒト健康および環境影響とそれらの評価戦略と幅広い分野で議論が行われた。ヒト健康に関する *in vivo* データの評価に関しては、現存の吸入試験は、ナノマテリアルの評価に適用できるが、可能であれば肺負荷量を計測し、グルーピングのパラメータとして検討する他に代替試験法の開発に重要な因子となるかもしれない。吸入試験結果、*in vitro* 試験

結果、短期吸入試験結果などをリンクできるベンチマーク基準の開発が必要であること、*in vitro* 関係では、試験法の標準化の必要性に加えて、経口暴露毒性評価、免疫毒性評価、線維化のための *in vitro* 評価系が現状で不足していることなどが、結論として採用された。

New tools and approaches for nanomaterial safety assessment は、EU の FP7 プロジェクトで行われたナノマテリアルの安全性にかかわる 5 つのプロジェクト NANOSOLUTIONS、GUIDEnano、SUN、NanoMILE、eNanoMapper が共同で開催した会議である。ナノマテリアルの安全性分野の今後の研究プログラムの可能性に関する議論を促進するためにプロジェクト成果を発表することを目的としている。会議のトピックスとしては、ナノ対応製品のライフサイクルに沿ったハザード評価と暴露評価、リスクアセスメントと管理、ナノ安全評価におけるシステム生物学のアプローチ、ナノマテリアルの特徴とグルーピング、ナノセーフティインフラ、セーフバイデザイン（設計による安全性）と広範囲であった。しかし、詳細な解析やモデリングは、溶解性が高いことから培養細胞を用いた試験において短期に強い反応が出やすい酸化金属系のナノマテリアルに偏っているという指摘がなされるなど、更なるデータの集積が必要であるという報告が多かった。

D. 考察

MWCNT の腹腔単回投与後の経時観察から、少なくとも 32 週間にわたって炎症反応が持続し、腹膜周囲で CINC-1 や MCP-1 等の分泌が亢進することが示された。投与 16 から 24

週後の時期は、障害修復に関連した反応が減弱し、中皮細胞の増殖が開始するため、中皮腫発症に関連した質的変化が起こる時期と推察される。本実験で見られた中皮腫の初期像として長円形から類円形の細胞が、肥厚した中皮下組織と境界不明瞭に、被膜状に増生しているのが特徴的であった。

気管内単回噴霧投与の終生飼育実験から、今回の条件下においては、MWCNT は呼吸器系の腫瘍あるいは中皮腫を誘発せず、その他臓器の自然発生性の腫瘍の発現率にも影響を与えなかった。しかしながら、SD-1 および MWNT-7 投与群でのみ、体腔での中皮腫が数例認められており、長期間体内に滞留した MWCNT の中皮組織に対する影響の可能性も考えられる。今回とは別の日機装の MWCNT の単回気管内投与により、体腔内に中皮腫を有意に誘発した報告を再現していると考えられる。

熱処理 MWCNT の腹膜中皮腫誘発性については実験が継続中であるが、催奇形性とは異なり、熱処理により MWCNT の毒性が顕著に変化することは無いと考えられる。投与 104 週まで実験を継続し、生存率および生存曲線の解析あるいは病理組織学的解析から、熱処理および Taquann 処理の影響を分析する予定である。

国際動向調査の結果、様々なナノマテリアル製品を現実的に評価するためには、グルーピングなリードアクロス評価手法を使う必要のあることは、基本的な認識として定着していることが示された。さらに、現実的な評価のために *in vitro* や短期の試験系が必要であるが（長期間の）*in vivo* 試験結果との間をつなぐパラメータの同定には至っていないのも現状であることが認識されている。OECD_WPMN では、炎症反

応などを標的とした AOP(毒性発現経路)の開発プロジェクトが開始されているが、ナノマテリアルによって引き起こされる慢性影響のメカニズム解析を行うことが、今後評価系の確立にもっとも上葉なことであると再認識できた。

E. 結論

MWCNT-7 の腹腔内投与により誘発されるラット腹膜中皮腫の経時的な観察において、少なくとも 32 週間にわたって腹腔内の炎症反応が持続し、腹膜周囲で CINC-1 や MCP-1 等の分泌が亢進することが示された。病理組織学的には、投与 8 週後より、観察期間を通して肉芽腫形成、中皮下組織の肥厚、肥満細胞および好酸球の集簇が腹膜全般に認められた。16 週から 24 週後にかけて、腹膜表層の組織球の集簇は減少し、間質で線維化が進行した。

また、3 種の MWCNT の単回噴霧投与終生飼育実験(投与後 156 週迄)を行った結果、SD-1 および MWNT-7 投与群で中皮腫が胸腔内あるいは腹腔内で有意ではないが単発的に認められた。

投与検体の前処理が MWCNT の腹腔内投与発がん性に与える影響を検討した実験において、投与後 44 週が経過し、低濃度群および対照群を除く各 MWCNT 投与群で、中皮腫によると思われる死亡が 27 週後から認められた。中皮腫による死亡数の中間評価では、熱処理でその誘発能が減弱した催奇形性とは異なり、熱処理により MWCNT の発がん性が顕著に変化する可能性は少ないことが考えられる。

また、OECD や EU の活動において規制当局、産業界に提言するナノマテリアルの評価に必要な評価手法に関して、H28 年度に

行われた専門家会議などの国際動向を調査した。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

(論文発表)

Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Alexander WT, Jiegou X, Tsuda H., Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci.* 107, 924-935. 2016.

Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Hirose A, Sato K., Phagocytosis-dependent and independent mechanisms underlie the microglial cell damage caused by carbon nanotube agglomerates. *J Toxicol Sci.* 41, 501-509. 2016.

(学会発表)

Akihiko Hirose, Yoshimitsu Sakamoto, Tomoko Nishimaki-Mogami, Yuhji Taquahashi, Takashi Yamada, Tetsuji Nishimura, Akiko Inomata, Dai Nakae, Hiroyuki Tsuda and Jun. Analysis of size-dependent carcinogenic potential of multiwalled carbon nanotubes. *Global Cancer: Occurrence, Cause, and Avenues to Prevention. IARC 50th Anniversary Conference (2016.6), Lyon, Poster.*

Hirose A, Cui H, Ema M, Kanno J, Tsuda

- H, Nishimaki-Mogami T,
Comparison with the NLRP3
inflammasome activations in THP-1
cells by various nanomaterial. 第 14 回
国際毒性学会 (ICT2016), (2016.10),
Merida, Mexico, Poster.
- 北條幹、坂本義光、山本行男、長谷川悠子、
多田幸恵、久保喜一、長澤明道、海鉦藤文、
高橋博、湯澤勝廣、安藤弘、田中和良、矢
野範男、藤谷知子、小縣昭夫、猪又明子、
広瀬明彦、中江大:MWCNT によるラット中
皮腫誘発過程の経時的解析. 第 43 回日本
毒性学会学術年会(2016 年 6 月 29 日~7
月 1 日)名古屋市
- Tsuda H, Xu J, Alexander DB, Alexander
WT, Mohamed Abd El-gied, Suzui M,
Futakuchi M, Fukamachi K, Numano
T, Takahashi S, Ohnishi M, Hirose A,
Kanno J, Development of a series of
assay model of toxicity and
carcinogenicity of carbon nanotubes.
2016 Korean Association for Laboratory
Animal Science, 慶州, Korea, Aug.
24-26,2016
- Tsuda H, Alexander DB, Alexander WT,
AbdElgied M, ELGazzar A, Xu J,
Numano T, Suzui M, Futakuchi M,
Fukamachi K, Hirose A, Kanno J,
Development of a Mechanism Based
Short-term Assay Protocol to Test
Carcinogenicity of Multiple Wall
Carbon Nanotubes (MWNCTs) in the
Rat. XIV International Congress of
Toxicology, Merida, Mexico, Oct. 2-6,
2016
- Kobayashi N, Tanaka S, Ikarashi Y,
Hirose A., Developmental toxicity
assessment of various sizes of
multiwall carbon nanotubes in mice
after repeated intratracheal
instillation to initiate grouping and
read across. Society of Risk Analysis
2016 Annual Meeting. San Diego,
U.S.A., Dec 11-15, 2016.
- 坂本義光、広瀬明彦、中江大:多層カーボン
ナノチューブ(MWCNT)を経気管反復投与
したラットに見られた肺胞過形成病変に関
する病理組織学的解析. 第 75 回日本癌学
会学術総会(2016 年 10 月 6 日~8 日)横浜
市
- 北條幹、坂本義光、山本行男、長谷川悠子、
多田幸恵、湯澤勝廣、広瀬明彦、猪又明
子、中江 大:多層カーボンナノチューブ
によるラット中皮腫誘発過程の経時的観察.
第 33 回日本毒性病理学会学術集会(2017
年 1 月 26 日~27 日)堺市
- 坂本 義光、北條 幹、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(CNT) の発がん性と phenyl
N -tert-butyl nitron (PBN) 併用が及ぼ
す影響. 第 33 回日本毒性病理学会学術
集会(2017 年 1 月 26 日~27 日)堺市
- 寺田央子、加藤雄大、橋口誠子、権藤喜貴、
広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、
杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 チタン酸
カリウム曝露の RSV 肺炎への影響 日本
薬学会第 137 年会、27PB-am155、
2017 年 3 月、仙台国際センター
- 渡辺 渡、権藤喜貴、橋口誠子、加藤雄大、
広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、
杉田千泰、黒川昌彦 多層型カーボンナノ
チューブ曝露による RSV 感染初期応答へ
の影響 日本薬学会第 137 年会、
27PB-am154、 2017 年 3 月、仙台国際
センター
- H. 知的財産権の出願・登録状況**(予定を含
む)

1. 特許取得
(該当なし)

2. 実用新案登録
(該当なし)

3. その他
(該当なし)

表 1. 腹膜における組織球/マクロファージを含む炎症巣の程度

炎症の程度	8週後 (7)	16週後 (11)	24週後 (14)	32週後 (13)
-	0	0	1	3
+	1	0	6	10
++	2	8	3	0
+++	4	3	0	0

カッコ内は観察例数，脾臓周囲の間膜の標本観察による評価

-: 病変無しあるいはほとんど無し, +: 軽度, ++: 中程度, +++: 多数の炎症巣が散見される

表 2. 増殖性病変の発現頻度

(観察例数)		8週後 (7)	16週後 (11)	24週後 (14)	32週後 (13)
増殖性なし	-	7	5	4	0
過形成	+	0	4	5	3
	++	0	2	1	0
	+++	0	0	1	0
中皮腫	+	0	0	2	3
	++	0	0	0	2
	+++	0	0	1	5

表 3. 経気管噴霧単回投与および投与後終生飼育実験における組織所見
(腫瘍性病変および肺における過形成)

Body systems	Neoplasms	Control (Vehicle)	SD2	SD1	MWNT-7
		14 ^{a)}	15	15	17
Central nervous system					
Brain	Meningiosarcoma	0	0	1(7)	0
Hemato/lymphopoietic tissue					
Systemic	Leukemia	7(50)	7(45)	6(40)	10(59)
Respiratory system					
Lung	Bronchiol-alveolar adenoma	1(5)	1(7)	1(7)	1(6)
	Bronchiol-alveolar carcinoma	1(5)	0	0	0
	Bronchiol-alveolar hyperplasia	1(5)	1(7)	1(7)	0
Stomach	Leiomyosarcoma	0	1(7)	0	0
Pancreas	Achinar cell adenoma	0	0	0	2(12)
	Achinar cell carcinoma	0	1(7)	0	0
Endocrine system					
Pituitary gland.	Pars dtalis adenoma	3 (21)	4(27)	1(7)	1(2)
	Pars intermedia adenoma	0	0	0	0
Thyroid gland	C-cell adenoma	5(36)	3(20)	3(20)	3(18)
Aderenal gland	Pheocromoacytoma	1(5)	2(13)	0	1(6)
	Pheocromoacytoma, malignant	0	0	0	1(6)
Pancreas islet cell	Islet cell adenoma	6(43)	5(33)	2(13)	5(29)
	Islet cell carcinoma	0	1(7)	0	0
Reproductive system					
Testis	Interstitial cell tumor	12(86)	11(73)	11(73)	14(82)
Prostate	Adenoma	1(5)	0	0	0
Prepeutial gland	Acina cell adenoma	1(5)	2(10)	0	0
Pleural caity	Mesothelioma	0	0	1(7)	0
	Hemangiosarcoma	0	1(7)	0	0
	Osteosarcoma	0	0	1(7)	0
Peritoneal cavity	Mesothelioma	0	0	2(13)	1(5)
	Cordoma	0	0	1(7)	1(6)
	Lipoma	0	0	1(7)	0
Skin	Squamous cell carcinoma	0	0	1(7)	0
Subcutis/mmamary gland	Fibroma	3(21)	5(33)	1(7)	5(29)
	Fibrosarcoma	1(5)	0	0	0
	Fibroadenoma	0	0	2(13)	0
Zymbal's gland	Adenoma	0	0	0	0

a) Number of rats observed, b) Number of rat with tumor, c) Incidence of tumor (%).

* p<0.05. Control vs 0.25mg/kg group. M; malignant tumor

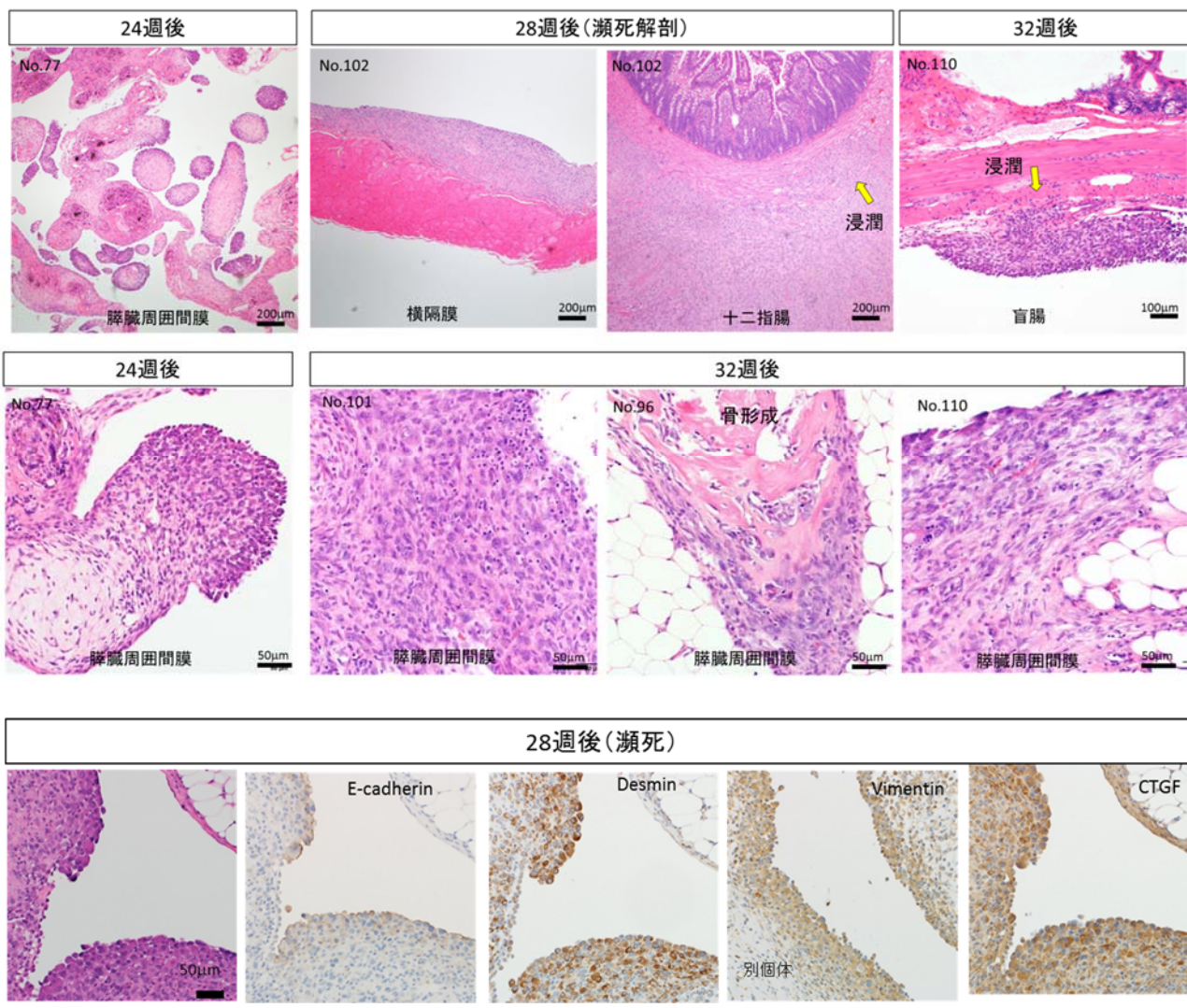


図1 腹膜中皮腫の典型的な組織像（H&E）および免疫組織染色

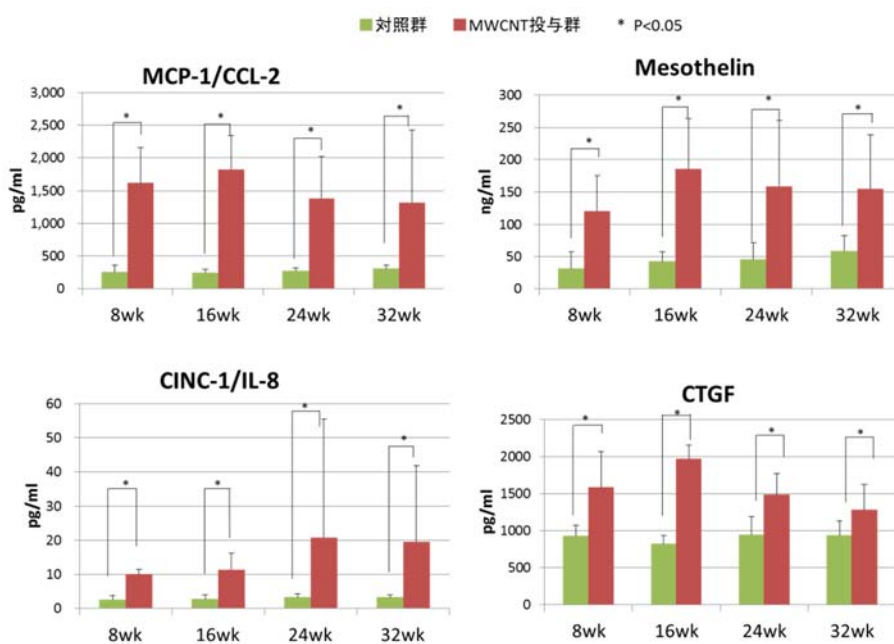


図2 腹腔洗浄液中の液性因子