

## 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

### $\gamma$ -オリザノールあるいはグリセロール投与の影響

多田 幸恵<sup>a</sup>, 高橋 博<sup>a</sup>, 湯澤 勝廣<sup>a</sup>, 安藤 弘<sup>a</sup>, 久保 喜一<sup>a</sup>, 長澤 明道<sup>a</sup>, 矢野 範男<sup>b</sup>,  
猪又 明子<sup>a</sup>, 中江 大<sup>b,c</sup>, 栗田雅行<sup>d</sup>

磁性ナノ粒子マグネタイトは様々な用途に利用され、抗がん剤のキャリアー、がんの温熱療法等、医療やバイオテクノロジー分野への応用が注目されているが、その安全性に関する情報は限られている。我々はこれまでの検討において、マグネタイトを気管内投与した慢性試験でラットに肺胞上皮の過形成性変化を観察した。マグネタイトは、*in vitro* 及び *in vivo*試験において遺伝毒性が報告されていることから、肺に対する発がんの可能性が懸念される。今回、マグネタイトを気管内投与後、肺発がんプロモーション作用を有する $\gamma$ -オリザノールあるいはグリセロールを投与し、肺における組織変化を病理学的に検索した。

実験は、雄のF344系ラット（10週齢）に、マグネタイトを0あるいは5 mg/kg体重の用量でスプレー投与器により週1回、計4回気管内投与し、最終投与の1週間後から、基礎飼料と飲料水、 $\gamma$ -オリザノール（1%混餌）と飲料水あるいは基礎飼料とグリセロール（8%混水）をそれぞれ32週間与え、病理学的に検索した。その結果、マグネタイト投与群の肺で、マグネタイトを貪食した肺胞マクロファージの浸潤、炎症性細胞浸潤、II型肺胞上皮の腫大等の組織変化を認めた。これらの変化は、 $\gamma$ -オリザノールあるいはグリセロール投与により修飾されず、過形成性病変はいずれの群においても観察されなかった。

**キーワード：**マグネタイト、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>、磁性ナノ粒子、F344系ラット、気管内投与、プロモーター

#### はじめに

磁性ナノ粒子マグネタイト（以下マグネタイトとする）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、コピートナーの原料など様々な用途に利用される。近年、がんの温熱療法<sup>1,2)</sup>、抗がん剤のキャリアー<sup>3,4)</sup>等医療やバイオテクノロジー分野への応用が注目されているが、その安全性に関する情報は限られ早急な安全性評価が求められる。我々はこれまでマグネタイトの急性毒性<sup>5)</sup>、慢性毒性<sup>6)</sup>及び体内動態<sup>7)</sup>等を検討した。ラットを用いた気管内反復投与による慢性毒性試験においては、肺で、慢性炎症と共に肺胞上皮の過形成性変化を観察し、肺に対する発がんの可能性が示唆された。マグネタイトは、*in vitro*<sup>8)</sup>あるいは*in vivo*試験<sup>9)</sup>において遺伝毒性が報告されていることから、その発がん性の評価が重要な課題である。がん化は単一要因で生じるものでなく、正常組織からがん組織に至るまでに複数の段階（イニシエーション、プロモーション、プログレッション）を経る必要があるとされる（多段階発がん）<sup>10)</sup>。

今回、マグネタイトの肺発がんイニシエーター活性を検討するため、マグネタイトを気管内投与後、肺発がんプロ

モーション作用を有する $\gamma$ -オリザノール<sup>11)</sup>あるいはグリセロール<sup>12,13)</sup>を投与し、肺における腫瘍性病変の発生を病理学的に検索した。

#### 実験方法

実験は、当センターの動物飼育施設内ナノ物質取扱いエリアにおいて、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い実施した。試験方法は、可能な限り医薬品非臨床試験ガイドライン<sup>14)</sup>に準じて実施し、経気管投与法に関しては、気道の毒性評価のための暴露技術としての気道内投与<sup>15)</sup>を参照した。

#### 1. 被験物質

被験物質として、磁性ナノ粒子マグネタイト（BMS-10, Lot.111117, pH 10.5, 一次粒子径 5-15 nm, 比表面積 119 m<sup>2</sup>/g, 戸田工業株式会社, 広島）を用いた。被験物質の投与懸濁液は、先に実施した予備実験の結果から、投与試料をスラリー（超微粒子分散液）の状態で入手し、高圧滅菌済超純水（Milli-Q, 18.2 M $\Omega$ , 以下 Milli-Q 水とする）で希釈後、0.2 M HCl（滅菌済超純水にて調製）で pH 7.4-7.5

<sup>a</sup> 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  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部（当時）

<sup>c</sup> 現所属：東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科  
156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

<sup>d</sup> 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

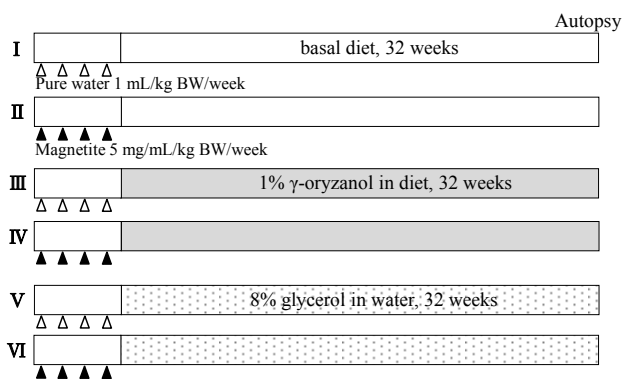


Fig. 1. Six groups of Fischer 344 male rats, age of 10 weeks, were exposed to 4 weekly intratracheal spray instillations of 0 (group I, III and V) or 5.0 (group II, IV and VI) mg/kg body weight magnetite. From 1 week after the last instillation, they received basal diet and drinking water (I and II), basal diet containing 1%  $\gamma$ -oryzanol diet and drinking water (III and IV) or basal diet and 8% glycerol water (V and VI).

(ラットの組織液 pH)<sup>16)</sup>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、調製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。

ラットに対する肺発がんプロモーション処置は、 $\gamma$ -オリザノール混餌投与あるいはグリセロール混水投与により行った。 $\gamma$ -オリザノール添加飼料は、CE-2（粉末基礎飼料，日本クレア株式会社，東京）に  $\gamma$ -オリザノール（生化学用）（Lot. CDJ4639, LAP0500, LAF2910；和光純薬工業株式会社，東京）を 1% の濃度で添加してペレットとした後，変質を避けるため低温（70℃）乾燥させたものを日本クレアに依頼し，試験期間中 2 回に分け製造した。グリセロール添加水は，細菌ろ過器を経由させた水道水にグリセロール（特級，Lot. LAJ6260；和光純薬工業株式会社，東京）を 8% の濃度で添加し調製した。

## 2. 動物及び飼育条件

雄の F344/DuCrIj 系ラット SPF 動物 120 匹を，日本チャールス・リバー株式会社（神奈川）より 8 週齢で入手し，2 週間馴化飼育後，10 週齢で試験に供した。各群の動物数は 20 匹とし，試験開始日の体重を基に，体重別層化無作為抽出法により 6 群に分けた。動物は，馴化及び試験期間中，自動給水装置付き（グリセロール添加水によるプロモーション処置の期間は給水ビンを使用）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，飼料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 23±2℃・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

試験方法の概略を Fig. 1 に示した。6 群に分けた動物の

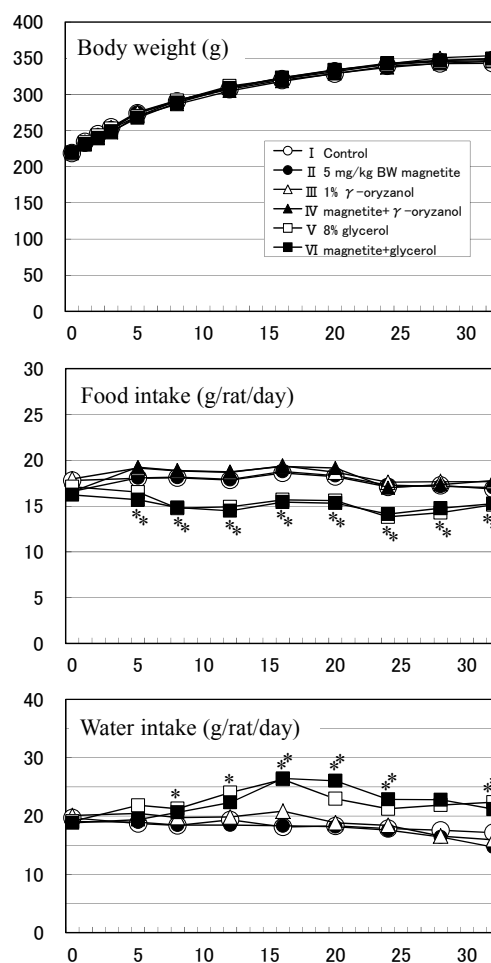


Fig. 2. Average body weight, food intake and water intake changes in Fischer 344 rats treated with magnetite by i.t. and administered  $\gamma$ -oryzanol or glycerol.

\*Significantly different from the control values ( $p < 0.05$ , Dunnet's test).

3 群に Milli-Q 水を（I・III・V群），残り 3 群にマグネタイト懸濁液を 5 mg/kg 体重の用量で（II・IV・VI群），いずれも 1 mL/kg 体重で週 1 回，計 4 回にわたりスプレー投与器（IA-1B, Penn-Century, Inc., USA）を用いて気管内投与した。最終投与の 1 週間後から，I・II 群には CE-2 と細菌ろ過器を経由した水道水を，III・IV 群には 1%  $\gamma$ -オリザノール添加飼料と水道水を，V・VI 群には CE-2 と 8% グリセロール水を，それぞれ 32 週間自由に摂取させ，投与期間終了後ラットをイソフルラン麻酔下で屠殺解剖した。心臓・肝臓・脾臓・腎臓・副腎・精巣・脳・肺は摘出後秤量し，胸腺・唾液腺・顎下部リンパ節・腸間膜リンパ節・睪臓・気管・小腸（空腸・回腸）・その他変化のみられた部位・組織は摘出後，それぞれ中性緩衝ホルマリンで固定し，定法に従いヘマトキシリン・エオジン（HE）染色，必要に応じ特殊染色し，顕微鏡下で観察した。

## 4. 統計学的解析

体重，摂餌量，摂水量及び器官重量の統計学的解析は，

Table 1. Body and Organ Weights in Fischer 344 Rats treated with Magnetite by i.t. and administered  $\gamma$ -Oryzanol or Glycerol

| Group                               | I (control)                  | II                   | III                | VI                   | V                    | VI                   |
|-------------------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Dose of Magnetite (mg/kg BW)        | 0                            | 5.0                  | 0                  | 5.0                  | 0                    | 5.0                  |
| Dose of $\gamma$ -oryzanol (%)      | 0                            | 0                    | 1.0                | 1.0                  | 0                    | 0                    |
| Dose of glycerol (%)                | 0                            | 0                    | 0                  | 0                    | 8.0                  | 8.0                  |
| Initial number of rats              | 20                           | 20                   | 20                 | 20                   | 20                   | 20                   |
| Initial body weight (g)             | 218.8 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup> | 219.4 $\pm$ 10.3     | 218.7 $\pm$ 9.1    | 219.4 $\pm$ 8.9      | 218.6 $\pm$ 8.8      | 219.4 $\pm$ 9.2      |
| Effective number of rats            | 20                           | 20                   | 20                 | 20                   | 20                   | 20                   |
| Final body weight (g)               | 342.9 $\pm$ 35.3             | 349.3 $\pm$ 23.8     | 354.0 $\pm$ 28.0   | 347.4 $\pm$ 22.7     | 342.5 $\pm$ 37.4     | 350.6 $\pm$ 25.2     |
| Absolute organ weight (mg)          |                              |                      |                    |                      |                      |                      |
| Brain                               | 2062.7 $\pm$ 38.7            | 2054.1 $\pm$ 67.2    | 2057.2 $\pm$ 52.3  | 2053.3 $\pm$ 39.2    | 2064.6 $\pm$ 59.0    | 2071.7 $\pm$ 40.4    |
| Adrenal glands                      | 41.9 $\pm$ 4.1               | 41.1 $\pm$ 2.5       | 41.7 $\pm$ 3.8     | 41.8 $\pm$ 4.1       | 44.8 $\pm$ 5.5       | 41.9 $\pm$ 4.4       |
| Heart                               | 932.1 $\pm$ 75.1             | 938.4 $\pm$ 55.3     | 958.9 $\pm$ 66.9   | 922.3 $\pm$ 59.3     | 920.7 $\pm$ 58.7     | 927.2 $\pm$ 48.7     |
| Lung                                | 968.1 $\pm$ 56.5             | 1087.3 $\pm$ 85.9 *† | 912.0 $\pm$ 79.4   | 1039.2 $\pm$ 62.0 *† | 944.3 $\pm$ 45.4     | 1029.5 $\pm$ 88.9 †  |
| Spleen                              | 598.1 $\pm$ 60.9             | 616.9 $\pm$ 35.8     | 653.7 $\pm$ 92.2   | 604.7 $\pm$ 37.6 †   | 621.1 $\pm$ 62.1     | 629.8 $\pm$ 39.4     |
| Liver (g)                           | 10.569 $\pm$ 1.387           | 10.710 $\pm$ 1.027   | 10.792 $\pm$ 1.191 | 10.578 $\pm$ 0.787   | 11.781 $\pm$ 1.478 * | 12.194 $\pm$ 1.170 * |
| Kidneys                             | 2382.4 $\pm$ 220.8           | 2357.8 $\pm$ 154.1   | 2364.4 $\pm$ 157.5 | 2271.0 $\pm$ 131.4   | 2457.2 $\pm$ 187.3   | 2464.6 $\pm$ 127.1   |
| Testes                              | 3065.4 $\pm$ 178.2           | 3167.1 $\pm$ 113.0   | 3106.9 $\pm$ 395.2 | 3188.3 $\pm$ 123.5   | 3087.7 $\pm$ 360.9   | 3103.6 $\pm$ 490.7 * |
| Relative organ weight (mg/100 g BW) |                              |                      |                    |                      |                      |                      |
| Brain                               | 607.7 $\pm$ 64.1             | 590.3 $\pm$ 40.8     | 584.3 $\pm$ 44.6   | 593.0 $\pm$ 32.1     | 609.6 $\pm$ 67.5     | 593.6 $\pm$ 41.8     |
| Adrenal glands                      | 12.3 $\pm$ 1.7               | 11.8 $\pm$ 1.0       | 11.8 $\pm$ 0.9     | 12.1 $\pm$ 1.2       | 13.3 $\pm$ 3.0       | 12.0 $\pm$ 1.5       |
| Heart                               | 272.7 $\pm$ 12.8             | 269.1 $\pm$ 13.3     | 271.7 $\pm$ 19.0   | 265.6 $\pm$ 8.1      | 270.6 $\pm$ 19.1     | 265.3 $\pm$ 18.3     |
| Lung                                | 283.3 $\pm$ 23.4             | 311.8 $\pm$ 22.5 *†  | 258.5 $\pm$ 24.3 * | 299.7 $\pm$ 16.5 †   | 278.9 $\pm$ 32.6     | 294.1 $\pm$ 23.1     |
| Spleen                              | 174.6 $\pm$ 6.9              | 177.0 $\pm$ 9.4      | 184.9 $\pm$ 23.7   | 174.2 $\pm$ 6.6      | 181.8 $\pm$ 8.9 *    | 179.9 $\pm$ 8.5      |
| Liver (g)                           | 3.076 $\pm$ 0.146            | 3.063 $\pm$ 0.163    | 3.047 $\pm$ 0.223  | 3.045 $\pm$ 0.127    | 3.435 $\pm$ 0.137 *  | 3.479 $\pm$ 0.232 *  |
| Kidneys                             | 696.0 $\pm$ 25.5             | 675.8 $\pm$ 32.5 †   | 669.9 $\pm$ 44.3 * | 654.2 $\pm$ 19.2 *   | 721.8 $\pm$ 51.1     | 705.0 $\pm$ 44.2     |
| Testes                              | 903.1 $\pm$ 104.6            | 910.1 $\pm$ 61.0     | 880.9 $\pm$ 122.1  | 920.0 $\pm$ 46.2     | 913.5 $\pm$ 151.8    | 888.8 $\pm$ 153.2    |

<sup>a</sup> Values are means  $\pm$  standard deviations.

\*Significantly different from the control (group I) values ( $p < 0.05$ , Dunnet's test).

†Significantly different from the control or positive control values (I vs II, III vs IV, V vs VI;  $p < 0.05$ , Aspin-Welch  $t$  test).

各群の分散をBartlettの方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析、不等分散の場合はKruskal-Wallisの方法により、それぞれ検定した。群間に有意差が認められた場合の多重比較はDunnetの方法を用いた。病理組織学的検索結果については、Fisherの直接確立検定を行った<sup>17)</sup>。危険率はいずれも5%とし、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及び動物実験委員会による審査を受け、実験動物の適切な扱いに関する法規、規則及びガイドライン<sup>18)</sup>に準拠して行った。

## 結 果

### 1. 体重及び摂餌・摂水量

試験期間中の体重の推移は、対照群 (I 群) と比較し全群で有意差がなく (Fig. 2), いずれの群においても一般症状に異常な所見は観察されなかった。摂餌量は、対照群 (I 群) と比較し、グリセロール投与群 (V・VI群) で試験開始後5週から、試験期間を通じて有意な減少を認めた。

摂水量は、グリセロール投与群 (V群) で8週から、グリセロール+マグネタイト投与群 (VI群) で16週から有意な増加を認め、28週を除き試験期間中有意な増加を認めた (Fig. 2)。しかし、I 群対II群, III群対IV群, V群対VI群

の比較では、有意な差はなく、マグネタイト投与による摂餌量及び摂水量の変化は認められなかった。

### 2. 器官重量

器官重量は、体重の増減に伴い重量変動し易い器官 (心臓・肺・脾臓・肝臓等) については体重比重量を、体重の増減に伴い重量変動をし難い器官 (脳・精巣等) については絶対重量を重視し、総合的に判断した。対照群と比較し、マグネタイト投与群 (II・IV群) で肺重量の有意な増加を、マグネタイト投与群 (VI群) で肺重量の増加傾向を認めた。また、グリセロール投与群 (V・VI群) の肝臓重量に有意な増加を、 $\gamma$ -オリザノール投与群 (III・IV群) の腎臓に有意な減少を認めた (Table 1)。

### 3. 病理学的検索

解剖時の肉眼観察でマグネタイト投与群 (II・IV・VI群) の肺に、暗褐色を呈するマグネタイトの広汎な沈着を認めた (Figs. 3B, 3D, 3F)。顕微鏡による組織観察では、マグネタイト単独投与群 (II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胞腔及び肺胞壁への浸潤、炎症性細胞浸潤、II型肺泡上皮の腫大等を認めた (Fig. 4B)。これらの変化はマグネタイトと $\gamma$ -オリザノール (IV群) あるいはマグネタイトとグリセロールを投与した群 (VI群) においても同様に認められ (Figs. 4D, 4F), 病変

Table 2. Histology in Fischer 344 Rats treated with Magnetite by i.t. and administered  $\gamma$ -Oryzanol or Glycerol

| Group                                              | I (control)    | II   | III | VI   | V   | VI   |
|----------------------------------------------------|----------------|------|-----|------|-----|------|
| Dose of Magnetite (mg/kg BW)                       | 0              | 5.0  | 0   | 5.0  | 0   | 5.0  |
| Dose of $\gamma$ -oryzanol (%)                     | 0              | 0    | 1.0 | 1.0  | 0   | 0    |
| Dose of glycerol (%)                               | 0              | 0    | 0   | 0    | 8.0 | 8.0  |
| Effective number of rats                           | 20             | 20   | 20  | 20   | 20  | 20   |
| Lung                                               |                |      |     |      |     |      |
| Infiltration of macrophage phagocytosing magnetite | 0 <sup>a</sup> | 20*† | 0   | 20*† | 0   | 20*† |
| Inflammatory cell infiltration                     | 2              | 20*† | 3   | 20*† | 5   | 20*† |
| Hypertrophy of alveolar type II cells              | 1              | 20*† | 0   | 20*† | 0   | 20*† |
| Bronchio/alveolar hyperplasia                      | 0              | 0    | 0   | 0    | 0   | 0    |
| Osseous metaplasia                                 | 1              | 2    | 3   | 2    | 4   | 2    |
| Heart                                              |                |      |     |      |     |      |
| Myofiber degeneration                              | 15             | 17   | 16  | 17   | 14  | 16   |
| Liver                                              |                |      |     |      |     |      |
| Inflammatory cell infiltration                     | 20             | 20   | 17  | 19   | 17  | 17   |
| Microgranuloma                                     | 0              | 0    | 0   | 1    | 2   | 0    |
| Focal necrosis of hepatocyte                       | 12             | 11   | 9   | 7    | 9   | 10   |
| Bile duct hyperplasia                              | 18             | 19   | 19  | 17   | 8*  | 9*   |
| Kidney                                             |                |      |     |      |     |      |
| Inflammatory cell infiltration                     | 3              | 5    | 3   | 3    | 4   | 3    |
| Tubular dilation                                   | 5              | 9    | 9   | 9    | 17* | 19*  |
| Tubular atrophy                                    | 5              | 3    | 1   | 3    | 3   | 2    |
| Mineralization                                     | 6              | 4    | 4   | 3    | 4   | 4    |
| Tubular hyperplasia                                | 0              | 0    | 0   | 0    | 1   | 0    |
| Cyst                                               | 0              | 1    | 0   | 1    | 1   | 0    |
| Testis                                             |                |      |     |      |     |      |
| Tubular atrophy                                    | 4              | 0    | 2   | 0    | 4   | 3    |

<sup>a</sup>Number of rats with the lesion.

\*Significantly different from the control values ( $p < 0.05$ , Fisher's exact test).

†Significantly different from the control or positive control values (I vs II, III vs IV, V vs VI;  $p < 0.05$ , Fisher's exact test).

No apparent histological changes were observed in the other organs, when compared with the control rats.

の程度、発生頻度に差を認めなかった (Table 2)。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 (Fig. 4)。

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多数認められ、特に胸腺リンパ節において顕著であった。肝臓においては胆管増生の発生頻度が、対照群と比較し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拡張した尿細管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。その他の器官における自然発生病変及びその発生頻度に関しては、マグネタイト、 $\gamma$ -オリザノール、グリセロール投与に関連した影響は認められなかった。

## 考 察

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 (マグネタイトを45-50%含有) を1日5時間、週5日間で13週間あるいは104週間吸入させた実験において、肺の腫瘍発生が増加しなかったと報告している<sup>19)</sup>。Steinhoffらは、8週齢のSDラットにマグネタイト (平均粒径0.5  $\mu$ m) を10-40 mg/kg体重の用量で2-4週間毎に1回、約2年間気管内投与し (最高総投与量

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<sup>20)</sup>。

一方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1回、15回気管内投与し (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<sup>21)</sup>。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、未だ相反する報告が共存している状況である。

Könczölらは、ヒト肺胞上皮由来のA549細胞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  $\mu$ m, 2-3  $\mu$ m, 0.5-1.0  $\mu$ m, 20-60 nm) が陽性を示したことから、マグネタイトが遺伝毒性を有すると報告した<sup>8)</sup>。またTotsukaらは、気管内投与したICRマウスにおけるコメットアッセイでDNA損傷を、気管内投与したgpt deltaマウスの肺においてgpt変異を、それぞれ有意に検出した<sup>9)</sup>。これらの結果は、マグネタイトに発がんの可能性のあることを示唆している。

今回の試験では、マグネタイトを気管内投与した後、肺発がんのプロモーターとされる $\gamma$ -オリザノールあるいはグリセロールを投与した群において、マグネタイト単独投与による肺の病変が修飾されず、肺の過形成性病変も観察されなかった。これらの結果は、本条件下でマグネタイトが肺発がんイニシエーターとしての活性を有しなかったこと

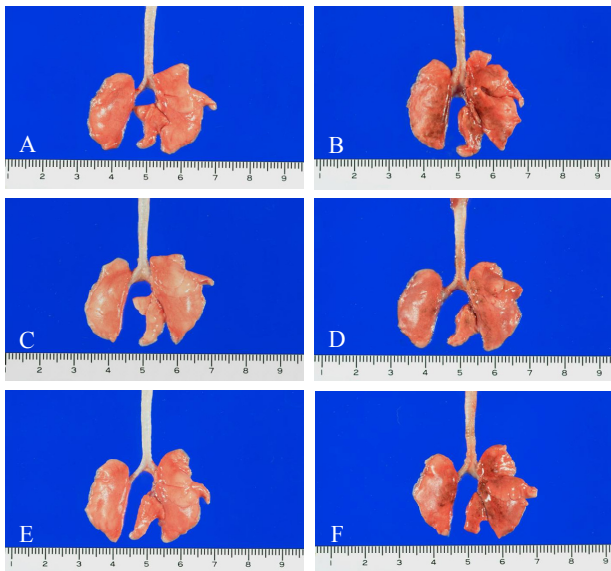


Fig. 3. Gross views of the lungs from Fischer 344 rats of the group I (control; A), Group II (magnetite 5 mg/kg body weight; B), Group III (1%  $\gamma$ -oryzanol; C), Group IV (magnetite+1%  $\gamma$ -oryzanol; D), Group V (8% glycerol; E) and Group VI (magnetite+8% glycerol; F).

を示唆していると考えられる。しかし、マグネタイトのプロモーター活性の有無についてはこれまで報告がなく、マグネタイトの発がん性に関してはさらなる検索が必要であると思われる。

### ま と め

F344系ラットにマグネタイトを気管内投与後、肺発がんプロモーション作用を有する $\gamma$ -オリザノールあるいはグリセロールを投与し、肺における組織変化を病理学的に検索した。

マグネタイト単独投与群の肺で、マグネタイトを食食した肺胞マクロファージの浸潤、炎症性細胞浸潤、II型肺胞上皮の腫大等の組織変化を認めた。これらの変化は、 $\gamma$ -オリザノールあるいはグリセロール投与により修飾されず、過形成性病変はいずれの群においても観察されなかった。

### 文 献

- 1) Kikumori, T., Kobayashi, T., Sawaki, M., *et al.*: *Cancer Res.*, **113**, 435–441, 2009.
- 2) Hilger, I. and Kaiser, W.A.: *Nanomedicine*, **7**, 1443–1459, 2012.
- 3) Lin, B.L., Shen, X.D. and Cui, S.: *Biomed. Mater.*, **2**, 132–134, 2007.
- 4) Hayashi, K., Nakamura, M., Miki, H., *et al.*: *Theranostics*, **4**, 834–844, 2014.
- 5) Tada, Y., Yano, N., Takahashi, H., *et al.*: *J. Toxicol. Pathol.*, **25**, 233–239, 2012.
- 6) Tada, Y., Yano, N., Takahashi, H., *et al.*: *J. Toxicol. Pathol.*,

**26**, 393–403, 2013.

- 7) Tada, Y., Yano, N., Takahashi, H., *et al.*: 東京健安研 七 年 報, **65**, 259–265, 2014.
- 8) Könczöl, M., Ebeling, S., Goldenberg, E., *et al.*: *Chemical Res. Toxicol.*, **24**, 1460–1475, 2000.
- 9) Totsuka, Y., Ishino, K., Kato, T., *et al.*: *Nanomaterials*, **4**, 175–188, 2014.
- 10) 高橋道人, 福島昭治編: 伊東毒性病理学2013, 33–46, 2013, 丸善出版株式会社, 東京.
- 11) Hirose, M., Fukushima, S., Imaida, k., *et al.*: *Anticancer Res.*, **19**, 3665–3670, 1999.
- 12) Inayama, Y., Kitamura, H., Ito, T., *et al.*: *Jpn. J. Cancer Res.*, **77**, 103–105, 1986.
- 13) Konoshima, T., Takasaki, M., Kozuka, M., *et al.*: *Yakugaku Zasshi*, **114**, 248–256, 1994.
- 14) 医薬品非臨床試験ガイドライン研究会編: 医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2010, 17–30, 2010, 薬事日報社, 東京.
- 15) Driscoll, K.E., Costa, D.L., Hatch, G., *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **55**, 24–35, 2000.
- 16) Ringler, D. and Dabich, L.: Hematology and clinical biochemistry, *In* Baker, H.J., Lindsey, J.R. and Weisbroth, S.H. (eds), *The laboratory rat, 1. Biology and diseases*, 105–121, 1979, Academic Press, New York.
- 17) Gad, S.C. and Weil, C.S.: Statistics for toxicologist, *In* Hayes, A.W. (ed), *Principles and Methods of Toxicology 3rd ed.*, 221–274, 1994, Raven Press, New York.
- 18) Japanese Association for Laboratory Animal Science (JALAS): *Exp. Anim.* **36**, 285–288, 1987.
- 19) Slesinski, R.S. and Turnbull, D.: *Int. J. Toxicol.*, **27**, 427–439, 2008.
- 20) Steinhoff, D., Mohr, U. and Hahnemann, S.: *Exp. Pathol.*, **43**, 189–194, 1991.
- 21) Pott, F., Ziem, U., Reiffer, F.J., *et al.*: *Exp. Pathol.*, **32**, 129–152, 1987.

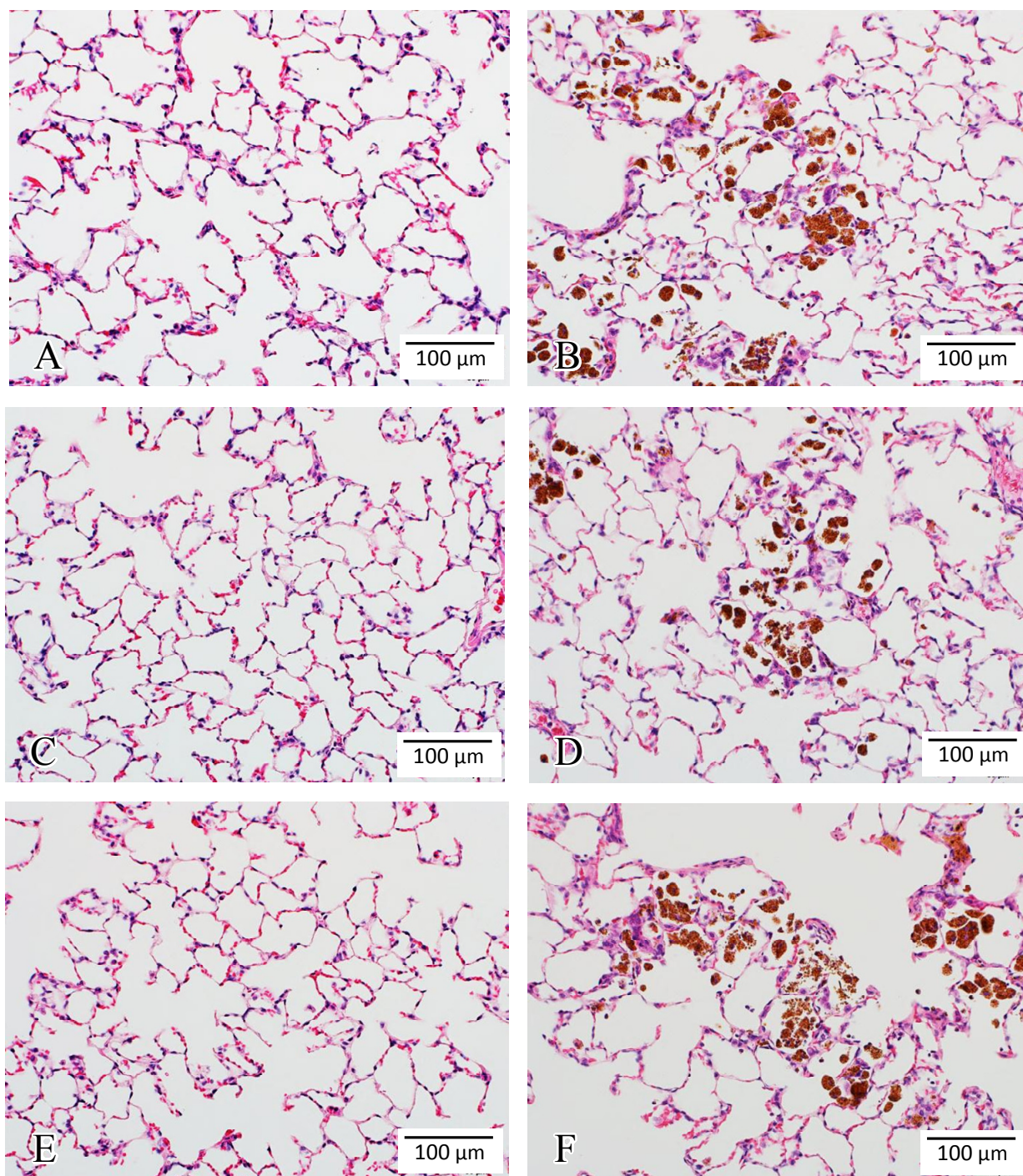


Fig. 4. Microscopic views of the lungs from Fischer 344 rats of the group I (control; A), Group II (magnetite 5 mg/kg body weight ; B), Group III (1%  $\gamma$ -oryzanol; C), Group IV (magnetite+1%  $\gamma$ -oryzanol; D), Group V (8% glycerol; E) and Group VI (magnetite+8% glycerol; F) (hematoxylin and eosin).

**Effects of  $\gamma$ -Oryzanol or Glycerol on Pulmonary Changes Due to Intratracheally Instilled Magnetite Nanoparticles in Fischer 344 Rats**

Yukie TADA<sup>a</sup>, Hiroshi TAKAHASHI<sup>a</sup>, Katsuhiro YUZAWA<sup>a</sup>, Hiroshi ANDO<sup>a</sup>, Yoshikazu KUBO<sup>a</sup>, Akemichi NAGASAWA<sup>a</sup>,  
Norio YANO<sup>b</sup>, Akiko INOMATA<sup>a</sup>, Dai NAKAE<sup>b, c</sup> and Masayuki KURITA<sup>a</sup>

Ferric oxide nanoparticles (magnetite) are of considerable interest because of their applications in nanotechnology-related fields, target drug delivery, and hyperthermia. However, information about their potential risks remains limited. In our chronic study, intratracheally instilled magnetite was shown to induce alveolar hyperplasia. In addition, magnetite has been shown to elicit genotoxicity according to *in vitro* and *in vivo* studies, and the potential for causing lung carcinogenesis is a concern. In the present study, we examined the effects of  $\gamma$ -oryzanol and glycerol, which are lung tumor promoters, on the pulmonary responses induced in rats by intratracheal spray instillation of magnetite.

A total of 120, 10-week-old, male Fischer 344 rats were exposed to 4 weekly intratracheal spray instillations of 0 (control) or 5.0 mg/kg body weight magnetite. From 1 week after the last instillation, the rats were given a basal diet and drinking water, a diet containing 1%  $\gamma$ -oryzanol and drinking water, or a basal diet and water containing 8% glycerol for 32 weeks. The rats were then sacrificed, and the biological consequences were investigated.

Histologically, the lungs of the magnetite-treated groups revealed infiltration of macrophages phagocytosing magnetite, inflammatory cell infiltration, and enlargement of alveolar type II cells. However, hyperplastic or neoplastic lesions were not observed in rats of any groups. In addition,  $\gamma$ -oryzanol and glycerol had no further effects on the pulmonary changes induced by magnetite.

**Keywords:** magnetite, Fischer 344 rat, lung, carcinogenicity, intratracheal instillation, carcinogenic promoter

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

<sup>b</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out.

<sup>c</sup> Present Address: Tokyo University of Agriculture,  
1-1-1 Sakura-ga-Oka, Setagaya, Tokyo 156-8502, Japan