

## NNKイニシエートによるA/Jマウスの肺における

### 磁性ナノ粒子マグネタイト気管内投与の影響

多田 幸恵<sup>a</sup>, 中江 大<sup>b,c</sup>, 北條 幹<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>, 海鋒 藤文<sup>a</sup>, 長谷川 悠子<sup>a</sup>, 鈴木 俊也<sup>a</sup>, 猪又 明子<sup>d</sup>, 守安 貴子<sup>d</sup>

磁性ナノ粒子マグネタイトは、医療あるいは産業分野などで様々な用途に利用されているが、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。マグネタイトの*in vitro* 及び *in vivo*における遺伝毒性を考慮すると、その発がん性の評価は重要な課題である。今回、マグネタイトの肺に対する発がん性を検討する目的で、A/Jマウスを用いて、4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)イニシエートによる中期発がん性試験を実施した。

7週齢のA/JJmsSlc雌マウス100匹を4群に分け、生食あるいはNNK 2 mg/マウスを腹腔内投与し、その後マグネタイトを0あるいは5.0 mg/kg体重で4週間毎に1回、気管内投与した。実験開始から16週間後に、イソフルラン麻酔下でと殺解剖し病理学的に検索した。その結果、肉眼観察で、NNKを投与したマウスの肺に、多発性に結節あるいは白斑が認められ、組織学的検索で肺胞上皮の過形成あるいは気管/肺胞上皮腺腫が高い確率で認められた。肺胞上皮の過形成及び腺腫の発現率と個体当たりの腫瘍数にマグネタイト併用投与の影響は認められず、本試験条件下で、マグネタイトは肺に対する発がん性を有しないことが明らかとなった。

**キーワード：**マグネタイト, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, ナノ粒子, A/Jマウス, 肺, 気管内投与, NNK

#### はじめに

径100 nm以下のナノマテリアルは、特有な物性を有し様々な分野で活用されているが<sup>1)</sup>、近年、健康被害が懸念されている<sup>2)</sup>。磁性ナノ粒子マグネタイトは、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、コピータナーの原料など様々な用途に利用され<sup>3)</sup>、抗がん剤のキャリアー<sup>4,5)</sup>、がんの温熱療法<sup>6,7)</sup>等の医療や、バイオテクノロジー分野への応用が注目されている。しかしその安全性に関する情報は限られており、早急な安全性評価が求められる<sup>8)</sup>。我々はこれまでマグネタイトの生体影響を検討し、急性及び慢性影響、体内動態等について報告した<sup>9-12)</sup>。ラットを用いた気管内反復投与による慢性毒性試験では、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<sup>10)</sup>。マグネタイトの*in vitro*<sup>13,14)</sup>あるいは*in vivo*<sup>15)</sup>での遺伝毒性を考慮すると、その発がん性の評価は重要な課題である。

今回、肺発がんのリスク分析に用いるモデル動物として有用なA/Jマウスを用いて<sup>16,17)</sup>、4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (以下NNKと略す)によりイニシエートした中期発がん性試験を実施した。中期発がん性試験は、従来の発がん性試験と比較し短期間で発がん性を検索する試験法で、*in vivo* におけるがん原性検出のための追加試験として、医薬品規制調和国際会議 (ICH) の発がん性試

験ガイドラインに導入されている<sup>18)</sup>。

#### 実験方法

本実験は、動物実験委員会の承認の下、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、動物実験実施規程に基づいて実施した。実験動物の取扱いについては、Guide for the Care and Use of Laboratory Animalsの指針<sup>19)</sup>を遵守し、気管内投与法に関しては、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>20)</sup>を参照した。

#### 1. 被験物質及び試薬

被験物質として、磁性ナノ粒子マグネタイト (BMS-11; Lot.140528, pH 9.7, 一次粒径5-15 nm, 比表面積123.8 m<sup>2</sup>/g, 戸田工業株式会社, 広島)を用いた (Fig. 1)。投与試料の調製は、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, 電気抵抗18.2 MΩ) で希釈後、0.2 M HCl (滅菌済超純水にて調製) でpH 7.4-7.5 (マウスの組織液pH)<sup>21)</sup>に調整した。調製に用いた容器及びピペットチップはいず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るためである。

イニシエート薬剤NNK (Lot. 64091-91-4, Tront Research

<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> 当時：東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

<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

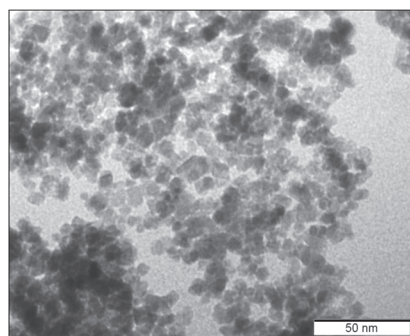


Fig. 1. Transmission Electron Microscopic View of Magnetite Nanoparticles. The estimated primary particle size is about 5–15 nm in diameter.

Chemicals, Tront, ON, カナダ) は、滅菌済生理食塩液 (大塚製薬株式会社, 東京) で2%に溶解後使用, 麻酔薬はイソフルラン吸入麻酔液ファイザー (マイラン製薬/ファイザー, 東京) を用いた. その他の試薬は特級を使用した.

## 2. 実験動物及び飼育条件

雌性A/JJmsSlcマウスのSPF動物100匹を, 日本SLC株式会社 (静岡) より5週齢で入手し, 2週間の馴化飼育後, 視診上健康なマウスを7週齢で試験に供した. 投与開始日の体重をもとに, 体重別層化無作為抽出法により4群 (25匹/群) に分けた. 動物は馴化及び試験期間中, バリアーシステム内の飼育室にて, ALPHA-dri (Shepherd Specialty Papers) 床敷きのプラスチックケージに5匹ずつ収容し, 基礎飼料CE-2 (日本クレア株式会社, 東京) と限外ろ過処理した水道水を自由に摂取させ, 室温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 湿度 $50\pm 5\%$ , 換気回数毎時10回 (HEPAフィルター経由), 12時間蛍光灯照明の条件下で飼育した.

## 3. 投与及び分析法

イニシエート薬剤NNKを用いた中期発がん性試験は, Imaidaらの法<sup>22)</sup>により実施した. 試験方法の概略をFig. 2に示す. 4群に分けた動物のうち, 2群に滅菌済生理食塩液を0.1mL/マウス (I, II群), 残り2群にNNKを, 2.0 mg/0.1 mL生食/マウス (III, IV群), 1週間に1度, 計2回腹腔内投与した. NNKの投与終了から2週間後に, I及びIII群に滅菌済Milli-Q水を, II及びIV群にマグネタイト懸濁液を5 mg/kg 体重の用量, 2 mL/kg 体重の容量で気管内投与した. 以降4週間に1回, 計4回マグネタイトを気管内投与し, 初回のNNK投与から16週間後に, イソフルラン麻酔下で大腿動静脈切開により放血致死させた.

血液学的検索は, EDTA-2K処理し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) を用い, 白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), 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) 及び血小板数 (PLT) を測定した.

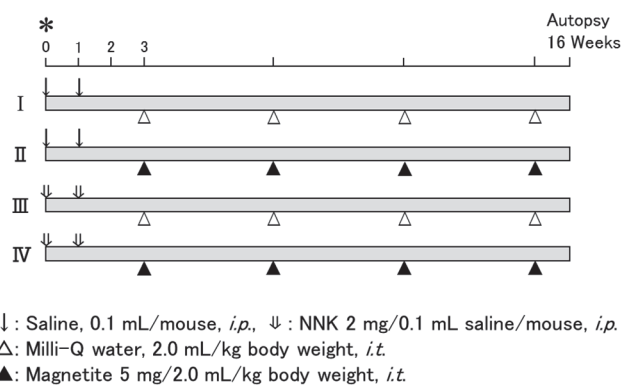


Fig. 2. Experimental Design. \*A total of 100, A/JJmsSlc mice, 7-week-old, was separated into four groups.

病理学的検索は, 解剖時に肉眼観察後, 脳, 副腎, 心臓, 肺, 脾臓, 肝臓, 腎臓, 卵巣及び子宮を摘出し, 秤量後に体重100 gあたりの相対重量を算出した. 以上の器官と唾液腺, 顎下部リンパ節, 腸間膜リンパ節, 脾臓, 気管, 小腸及びその他変化のみられた部位及び組織を摘出後, それぞれを中性緩衝ホルマリンで固定し, RITAとNACADグループ提唱の方法<sup>23)</sup>により切り出しを行った. 定法に従いヘマトキシリン・エオジン染色, 必要に応じ特殊染色し, 顕微鏡下で観察した. 肺の結節の観察は, 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結節として計数した.

## 4. 統計解析

血液, 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<sup>24)</sup>を用いた.

またIII群とIV群間の比較は, 等分散の場合は $t$ 検定を, 不等分散の場合はAspin-Welchの $t$ -検定<sup>24)</sup>を行った. 病理組織学的検索結果については, Fisherの直接確率検定<sup>24)</sup>を行った. 統計処理ツールはStatLight (Yukms株式会社, 東京) を用い, 危険率はいずれも5%とした.

## 結果及び考察

### 1. 一般状態, 体重の推移及び血液

投与期間中, 気管内投与時の深麻酔により, I群 (対照群) に2例, II群に1例, III群に2例及びIV群に4例の死亡を認めた. 一般症状には投与の影響はみられなかった.

試験期間中の体重の推移をFig. 3に示す. 全投与群で対照群との間に有意な差はみられなかった.

血液学的検索では, NNKを投与した群 (III及びIV群) にMCVの有意な減少が認められた (Table 1).

### 2. 病理学的検索

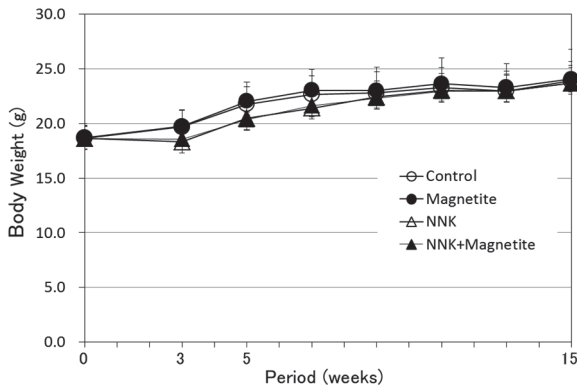


Fig. 3. Changes in Mean Body Weights of A/J Mice treated with NNK and/or Magnetite.

器官重量を、最終体重と共にTable 2に示す。対照群と比較し、NNKを投与したⅢ及びⅣ群で脳、腎臓及び卵巣の絶対及び相対重量の有意な減少、心臓及び肝臓で相対重量の有意な減少を認めた。肺の重量は、マグネタイトを投与したⅡ及びⅣ群で、それぞれⅠ群及びⅢ群と比較し有意な増加を認めた。

解剖時に行った肉眼観察では、マグネタイトを投与したⅡ及びⅣ群の肺全例にマグネタイトの沈着と思われる黒色斑を認めた。また、NNKを投与したⅢ及びⅣ群の肺では乳白色の結節が認められた (Fig. 4, 上段)。ホルマリン固定後の拡大鏡による観察では、Ⅰ及びⅡ群の肺に少数、Ⅲ及びⅣ群の肺に多数の乳白色の結節が認められた (Fig. 4, 下段)。結節の出現率 (incidence) は、NNK処置のⅢ群で100%、NNKとマグネタイト併用投与のⅣ群で95.2%であった (Fig. 5)。マウス一匹当たりの結節数

(multiplicity) は、Ⅲ群で $9.87 \pm 5.33$ 個/マウス、Ⅳ群で $11.24 \pm 6.34$ 個/マウスであった (Fig. 5)。Ⅲ・Ⅳ群間における結節の出現率及び一匹当たりの結節数の比較では、統計的に有意な差は認められなかった。

顕微鏡による組織の観察結果をTable 3に示す。マグネタイトを投与したⅡ及びⅣ群のマウス全例の肺に、マグネ

タイトと思われる黄褐色の顆粒を貪食したマクロファージの浸潤が認められ (Fig. 6-Ⅱ, 矢印)、その部位では炎症性細胞の浸潤も認められた。NNK処置したⅢ及びⅣ群では、肺胞上皮の過形成及び気管/肺胞上皮腺腫 (Fig. 6-Ⅲ, Ⅳ) が多数認められた。肺胞上皮過形成の出現率は、Ⅲ群で100%、Ⅳ群で95.2%、気管/肺胞上皮腺腫の出現率は、Ⅲ群で87%、Ⅳ群で95.2%であった (Fig. 7)。肺の組織切片全視野を観察、計数したマウス一匹当たりの肺胞上皮過形成と気管/肺胞上皮腺腫の総数 (multiplicity) は、Ⅲ群で $7.39 \pm 4.48$ 個/マウス、Ⅳ群で $8.05 \pm 4.48$ 個/マウスであった。Ⅲ・Ⅳ群間における過形成及び腺腫、それぞれの出現率及び一匹当たりの総数の比較では、統計的に有意な差は認められなかった (Fig. 7)。

呼吸器系以外の器官では、肝臓で炎症性細胞浸潤、肝細胞の巣状壊死、腎臓で尿細管の好塩基変性、炎症性細胞浸潤、唾液腺におけるリンパ球浸潤、副腎で被膜下細胞の軽度過形成、角膜の鈣質沈着等が全群のマウスに観察された (Table 3)。これらの自然発生病変の発現頻度にNNKあるいはマグネタイト投与の影響は認められなかった。

今回A/JJmsSlcマウスを用いて、タバコに含まれるNNKによりイニシエートした中期発がん性試験を実施した。肺の肉眼観察で、NNKを投与したⅢ及びⅣ群の肺に多発性に結節が認められ、組織学的検索で肺胞上皮の過形成及び腺腫が高い確率で認められた。肺胞上皮の過形成及び腺腫の発現率と個体当たりの腫瘍数は、Ⅲ・Ⅳ群間で統計学的に有意な差がみられず、マグネタイト併用投与による腫瘍発現の増強作用は認められなかった。

マグネタイトの発がん性に関しては、Pottら<sup>25)</sup>が、Wistarラットに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)、69%のラットに肺の腫瘍が認められたと報告しているのに対し、Steinhoffら<sup>26)</sup>は、SDラットにマグネタイトを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)、マグネタイトに発がん性が

Table 1. Hematology of A/JJmsSlc Mice treated with NNK and/or Magnetite

| Item                              | I (control)       | II               | III              | IV               |
|-----------------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| NNK (mg/mouse)                    | 0                 | 0                | 2                | 2                |
| Magnetite (mg/kg body weight)     | 0                 | 5                | 0                | 5                |
| Final effective number of mice    | 23                | 24               | 23               | 21               |
| WBC ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ ) | $77.0 \pm 34.2^a$ | $72.3 \pm 30.5$  | $83.8 \pm 40.6$  | $88.3 \pm 28.7$  |
| RBC ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) | $918.0 \pm 47.5$  | $923.5 \pm 47.5$ | $936.8 \pm 34.7$ | $936.9 \pm 51.7$ |
| HGB (g/dL)                        | $14.1 \pm 0.6$    | $14.1 \pm 0.4$   | $14.2 \pm 0.6$   | $14.2 \pm 0.6$   |
| HCT (%)                           | $45.6 \pm 2.4$    | $45.7 \pm 2.4$   | $46.3 \pm 1.9$   | $46.2 \pm 2.7$   |
| MCV (fL)                          | $49.7 \pm 0.5$    | $49.4 \pm 0.5$   | $49.2 \pm 0.6^*$ | $49.3 \pm 0.5^*$ |
| MCH (pg)                          | $15.4 \pm 0.8$    | $15.3 \pm 0.8$   | $15.1 \pm 0.3$   | $15.1 \pm 0.6$   |
| MCHC (g/dL)                       | $31.0 \pm 1.7$    | $31.0 \pm 1.6$   | $30.7 \pm 0.4$   | $30.7 \pm 1.2$   |
| PLT ( $\times 10^4/\mu\text{L}$ ) | $63.5 \pm 30.2$   | $71.2 \pm 32.6$  | $58.9 \pm 27.6$  | $53.3 \pm 25.1$  |

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

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

Table 2. Absolute and Relative Organ Weights of A/JJmsSlc Mice treated with NNK and/or Magnetite

| Item                                         | I (control)             | II             | III             | IV              |
|----------------------------------------------|-------------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| NNK (mg/mouse)                               | 0                       | 0              | 2               | 2               |
| Magnetite (mg/kg body weight)                | 0                       | 5              | 0               | 5               |
| Initial number of mice                       | 25                      | 25             | 25              | 25              |
| Initial body weight (g)                      | 18.7 ± 1.3 <sup>a</sup> | 18.7 ± 1.1     | 18.6 ± 1.2      | 18.6 ± 1.1      |
| Final effective number of mice               | 23                      | 24             | 23              | 21              |
| Final body weight (g)                        | 22.9 ± 2.0              | 22.6 ± 1.8     | 23.1 ± 1.6      | 22.9 ± 1.6      |
| Absolute organ weight (mg)                   |                         |                |                 |                 |
| Brain                                        | 420.0 ± 12.9            | 418.6 ± 13.3   | 396.7 ± 8.5*    | 397.0 ± 14.8*   |
| Adrenal glands                               | 7.7 ± 1.2               | 7.7 ± 1.3      | 7.7 ± 1.1       | 7.3 ± 1.3       |
| Heart                                        | 88.2 ± 6.4              | 87.1 ± 7.2     | 80.5 ± 6.9*     | 83.9 ± 5.5      |
| Lung                                         | 120.3 ± 13.5            | 136.7 ± 16.3*  | 112.9 ± 17.3    | 134.7 ± 16.6*†  |
| Spleen                                       | 70.9 ± 10.7             | 73.7 ± 11.6    | 66.3 ± 8.4      | 64.8 ± 10.5     |
| Liver                                        | 925.9 ± 103.0           | 890.0 ± 128.1  | 856.7 ± 82.7    | 855.2 ± 82.1    |
| Kidneys                                      | 295.5 ± 27.9            | 286.3 ± 29.6   | 265.4 ± 18.3*   | 268.2 ± 23.4*   |
| Ovaries                                      | 12.0 ± 1.5              | 11.8 ± 2.2     | 8.6 ± 1.7*      | 8.7 ± 1.4*      |
| Uterus                                       | 92.9 ± 23.4             | 110.6 ± 24.9*  | 74.5 ± 21.1*    | 81.0 ± 21.8     |
| Relative organ weight (mg/100 g body weight) |                         |                |                 |                 |
| Brain                                        | 1845.8 ± 138.2          | 1858.9 ± 136.4 | 1726.5 ± 109.6* | 1738.7 ± 125.6* |
| Adrenal glands                               | 33.9 ± 4.2              | 34.1 ± 4.5     | 30.9 ± 4.8      | 31.7 ± 4.9      |
| Heart                                        | 386.2 ± 20.6            | 385.2 ± 21.3   | 349.1 ± 20.6*   | 367.1 ± 27.6*†  |
| Lung                                         | 528.7 ± 69.6            | 605.8 ± 75.4*  | 490.0 ± 65.9    | 588.1 ± 66.1*†  |
| Spleen                                       | 310.9 ± 48.8            | 326.0 ± 44.7   | 287.5 ± 32.7    | 283.0 ± 43.5    |
| Liver                                        | 4042.5 ± 253.9          | 3928.1 ± 423.6 | 3715.5 ± 284.6* | 3726.5 ± 206.7* |
| Kidneys                                      | 1293.1 ± 88.6           | 1266.1 ± 95.2  | 1152.4 ± 66.9*  | 1171.5 ± 89.8*  |
| Ovaries                                      | 52.6 ± 6.4              | 52.1 ± 9.0     | 37.3 ± 7.4*     | 38.0 ± 6.5*     |
| Uterus                                       | 406.3 ± 96.7            | 489.2 ± 110.8* | 323.8 ± 90.7*   | 353.2 ± 90.5    |

<sup>a</sup> Values are means ± standard deviations.

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

† Significantly different from the III group values ( $p < 0.05$ , Student or Aspin-Welch's  $t$ -test).

認められないと報告した。また、Slesinskiら<sup>27)</sup>は、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104週間吸入させた実験で、肺の腫瘍発生は増加しなかったと報告している。

我々は、先に実施したマグネタイトの反復投与試験で肺に過形成性病変を観察したことから、マグネタイトの肺発がんを懸念し、F344ラットを用いた中期発がん性試験を実施した。マグネタイトを気管内投与した後、 $\gamma$ -オリザノールあるいはグリセロールによる肺発がんプロモーション処置を施し、病理学的に検索した結果、マグネタイトは肺発がんイニシエータ活性を有しないことが明らかとなった<sup>12)</sup>。

F344ラットを用いたプロモータ活性の検索では、マグネタイトが明らかな肺発がんプロモータ活性を有さず、発がん物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)の肺発がんをむしろ抑制するとの結果を得た（投稿中）。

我々がこれまでに実施したラットを用いた中期発がん性試験及び今回のA/JJmsSlcマウスを用いた試験は、マグネタイトがげっ歯類に対して肺発がんのイニシエータ及びプロモータ活性を示さず、肺に対する発がん性を有しないことを示唆していた。

マグネタイトの遺伝毒性に関して、Könczölら<sup>13)</sup>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で、マグネタイトに遺伝毒性が認められたと報告した。Totsukaら<sup>15)</sup>は、気管内投与したICRマウスでDNAの損傷を、気管内投与したgpt deltaマウスの肺でgpt変異を、それぞれ有意に検出した。これらの結果は、マグネタイトに発がんの可能性あることを示唆している。一方、Hongら<sup>28)</sup>は、ネズミの線維芽細胞L-929を用いて、表面をコーティングした種々の酸化鉄ナノ粒子のコメットアッセイを実施し、修飾無しのFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>ではDNA損傷がみられないと報告した。Singhら<sup>29)</sup>も、ヒトのリンパ芽球細胞MCL-5を用いた小核試験で、Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>による有意な上昇はみられないと報告した。

最近、Peaseら<sup>30)</sup>は、酸化鉄粒子を吸入した際の発がん性に関する総説の中で、一次粒子の粒径が100 nm以上の“bulk”酸化鉄は人に対する発がん性を有しないと結論した。しかし酸化鉄“ナノ粒子”の毒性に関しては、新しい方法（主にin vitro）によるさらなる研究が必要であると述べている。マグネタイトナノ粒子の発がんに関しては、毒性発現のメカニズムを含めた検討が今後も必要であると



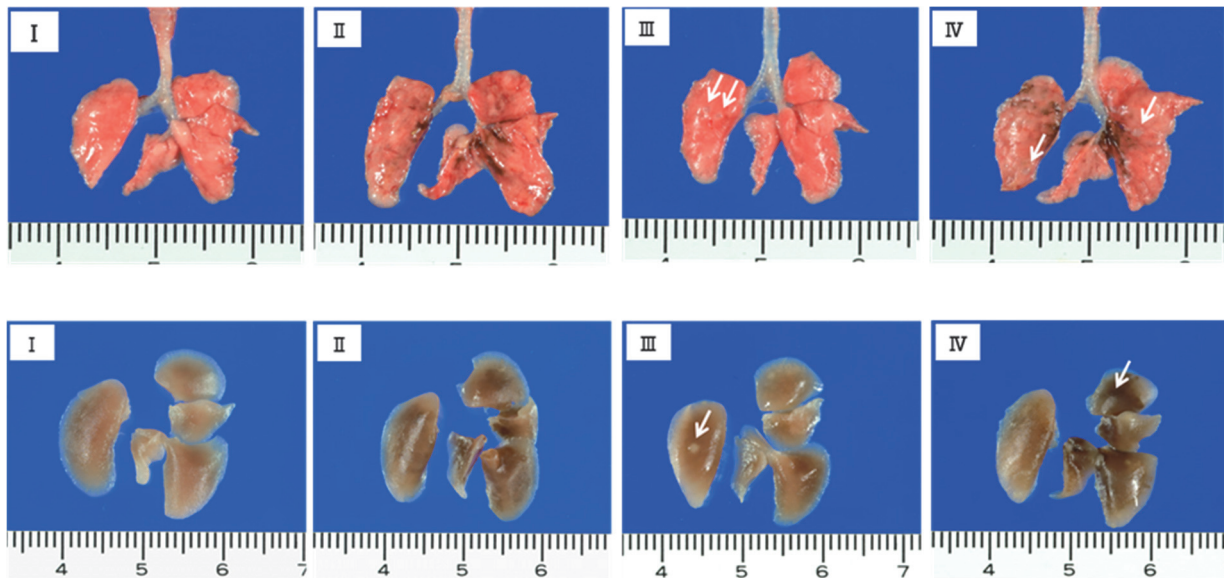


Fig. 4. Macroscopic Views of the Fresh (upper row) and Formalin-fixed (lower row) Lungs from A/J Mice of the Control ( I ), Magnetite ( II ), NNK ( III ) or NNK and Magnetite ( IV ) Groups. Note: the nodules (white arrow) in the NNK treated groups ( III and IV ).

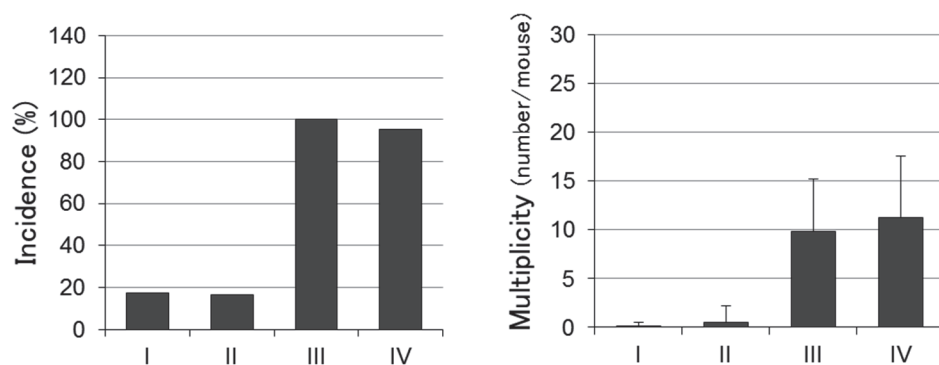


Fig. 5. Incidence and Multiplicity of Macroscopic Nodules in the Lung from A/J Mice of the Control ( I ), Magnetite ( II ), NNK ( III ) or NNK and Magnetite ( IV ) Groups. Values are the means of 21-24 mice, and error bars denote SD.

思われる。

### ま と め

磁性ナノ粒子マグネタイト ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) の肺発がんに及ぼす影響を検討する目的で、A/JJmsSlcマウスを用いたNNKイニシエートによる中期発がん性試験を実施した。

肺胞上皮の過形成及び気管/肺胞上皮腺腫の発現率と個体当たりの腫瘍数に、マグネタイト併用投与の影響は認められず、本試験条件下で、マグネタイトは肺に対する発がん性を有しないことが明らかとなった。

### 文 献

- Hood, E.: *Environ. Health Perspect.*, **112**, A740-749, 2004.
- Hubbs, A.F., Mercer, R.R. and Benkovic, S.A.: *Toxicol. Pathol.*, **39**, 301-324, 2011.
- Cabreraa, L., Gutierrez, S., Menendezb, N., *et al.*: *Electrochim. Acta.*, **53**, 3436-3441, 2008.
- Parveen, S., Misra, R., Sahoo, S.K.: *Nanomedicine*, **8**, 147-166, 2012.
- Hayashi, K., Nakamura, M., Miki, H., *et al.*: *Theranostics*, **4**, 834-844, 2014.
- Hilger, I. and Kaiser, W.A.: *Nanomedicine*, **7**, 1443-1459, 2012.
- Kikumori, T., Kobayashi, T., Sawaki, M., *et al.*: *Cancer Res.*, **113**, 435-441, 2009.
- Singh, N., Jenkins, G.J., Asadi, R., *et al.*: *Nano Rev.*, **1**, 5358-5373, 2010.
- Tada, Y., Yano, N., Takahashi, H., *et al.*: *J. Toxicol.*

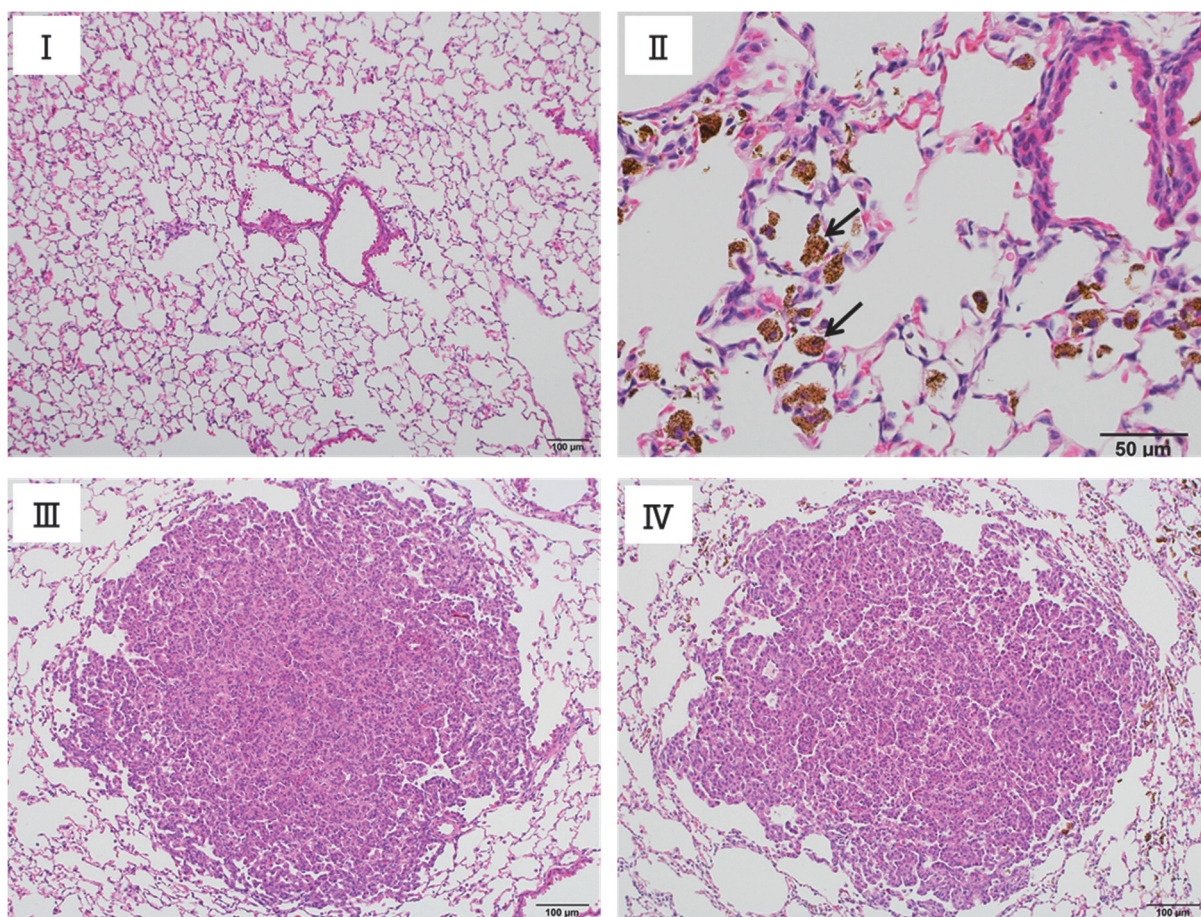


Fig. 6. Microscopic Views of the Lungs from A/J Mice of the Control ( I ), Magnetite( II ), NNK ( III ) or NNK and Magnetite ( IV ) Groups (Hematoxylin and Eosin). Note:the alveolar macrophage phagocytosing magnetite (arrow) in the magnetite treated groups ( II ), alveolar bronchiolar adenoma ( III and IV).

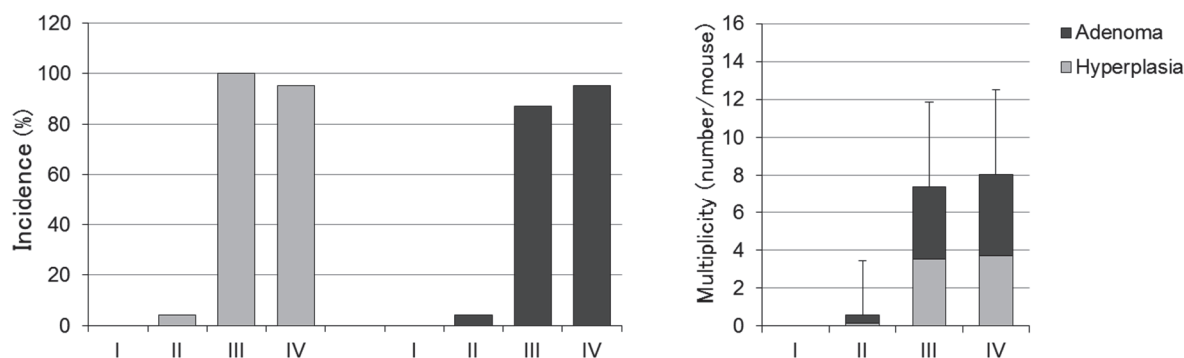


Fig. 7. Incidence and Multiplicity of Hyperplastic Lesions in the Lung from A/J Mice of the Control ( I ), Magnetite ( II ), NNK ( III ) or NNK and Magnetite ( IV ) Groups. Values are the means of 21-24 mice, and error bars denote SD.

*Pathol.*, **25**, 233-239, 2012.

10) Tada, Y., Yano, N., Takahashi, H., *et al.*: *J. Toxicol.*

*Pathol.*, **26**, 393-403, 2013.

11) 多田幸恵, 矢野範男, 高橋博, 他: 東京健安研七  
年報, **65**, 259-265, 2014.

12) 多田幸恵, 矢野範男, 高橋博, 他: 東京健安研七  
年報, **66**, 315-321, 2015.

13) Könczöl, M., Ebeling, S., Goldenberg, E., *et al.*: *Chemical Res. Toxicol.*, **24**, 1460-1475, 2000.

14) Kawanishi, M., Ogo, S., Ikemoto, M., *et al.*: *J. Toxicol.*

Table 3. Histology in A/JJmsSlc Mice treated with NNK and/or Magnetite

| Item                                               | I (control)    | II  | III | IV   |
|----------------------------------------------------|----------------|-----|-----|------|
| NNK (mg/mouse)                                     | 0              | 0   | 2   | 2    |
| Magnetite (mg/kg body weight)                      | 0              | 5   | 0   | 5    |
| Final effective number of mice                     | 23             | 24  | 23  | 21   |
| Lung                                               |                |     |     |      |
| Infiltration of macrophage phagocytosing magnetite | 0 <sup>a</sup> | 24* | 0   | 21*† |
| Inflammatory cell infiltration                     | 3              | 20* | 3   | 16*† |
| Bronchio/alveolar hyperplasia                      | 0              | 1   | 23  | 20   |
| Bronchio/alveolar adenoma                          | 0              | 1   | 20  | 20   |
| Liver                                              |                |     |     |      |
| Inflammatory cell infiltration                     | 20             | 16  | 20  | 16   |
| Focal necrosis of hepatocyte                       | 4              | 1   | 4   | 2    |
| Kidney                                             |                |     |     |      |
| Inflammatory cell infiltration                     | 4              | 2   | 6   | 1    |
| Tubular dilation                                   | 0              | 1   | 3   | 0    |
| Tubular atrophy                                    | 1              | 4   | 2   | 0    |
| Tubular degeneration, basophilia                   | 1              | 1   | 2   | 0    |
| Submandibular salivary gland                       |                |     |     |      |
| Lymphocytic infiltration                           | 6              | 7   | 12  | 11   |
| Pancreas                                           |                |     |     |      |
| Focal atrophy                                      | 1              | 3   | 3   | 2    |
| Adrenal gland                                      |                |     |     |      |
| Subcapsular cell hyperplasia                       | 6              | 6   | 6   | 4    |
| Eye                                                |                |     |     |      |
| Corneal mineralization                             | 3              | 7   | 0   | 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 III group values ( $p < 0.05$ , Fisher's exact test).Sci., **38**, 503–511, 2013.

- 15) Totsuka, Y., Ishino, K., Kato, T., *et al.*: *Nanomaterials*, **4**, 175–188, 2014.
- 16) Imaida, K., Yokohira, M., Hashimoto, N., *et al.*: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **11**, 9–12, 2010.
- 17) Zheng, H.C. and Takano, Y.: *J. Oncol.*, **2011**, 635379, 2011.
- 18) 医薬品規制調和国際会議 (ICH) : 医薬審第548号, 医薬品のがん原性を検出するための試験に関するガイダンス, 平成10年7月9日.  
<https://www.pmda.go.jp/files/000156682.pdf> (2017年11月20日現在. なお本URLは変更または末梢の可能性がある)
- 19) ILAR: *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed. National Research Council, 2011, National Academies Press, Washington DC.
- 20) Driscoll, K.E., Costa, D.L., Hatch, G., *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **55**, 24–35, 2000.
- 21) Ringler, D. and Dabich, L.: Hematology and clinical biochemistry. In Baker, H.J., Lindsey, J.R. and Weisbroth, S.H. (eds.), *The laboratory rat, I. Biology and diseases*, 105–121, 1979, Academic Press, New York.
- 22) Ninomiya, F., Yokohira, M., Kishi, S., *et al.*: *Oncol. Rep.*, **30**, 2632–2638, 2013.
- 23) Kittel, B., Ruehl-Fehlert, C., Morawietz, G., *et al.*: *Exp. Toxic. Pathol.*, **55**, 413–431, 2004.
- 24) 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.
- 25) Pott, F., Ziem, U., Reiffer, F.J., *et al.*: *Exp. Pathol.*, **32**, 129–152, 1987.
- 26) Steinhoff, D., Mohr, U. and Hahnemann, S.: *Exp. Pathol.*, **43**, 189–194, 1991.
- 27) Slesinski, R.S. and Turnbull, D.: *Int. J. Toxicol.*, **27**, 427–439, 2008.
- 28) Hong, S.C., Lee, J.H., Lee, J., *et al.*: *Int. J. Nanomedicine*, **6**, 3219–3231, 2011.
- 29) Singh, N., Jenkins, G.J., Nelson, B.C., *et al.*: *Biomaterials*, **33**, 163–170, 2012.
- 30) Pease, C., Rücker, T. and Birk, T.: *Chem. Res. Toxicol.* **29**, 237–254, 2016.

**Effects of Intratracheally Instilled Magnetite Nanoparticles in Lungs of A/J mice  
Initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)**

Yukie TADA<sup>a</sup>, Dai NAKAE<sup>b,c</sup>, Motoki HOUJOU<sup>a</sup>, Katsuhiko YUZAWA<sup>a</sup>, Hiroshi ANDO<sup>a</sup>,  
Yoshikazu KUBO<sup>a</sup>, Akemichi NAGASAWA<sup>a</sup>, Fujifumi KAIHOKO<sup>a</sup>, Yuko HASEGAWA<sup>a</sup>,  
Toshinari SUZUKI<sup>a</sup>, Akiko INOMATA<sup>a</sup>, and Takako MORIYASU<sup>a</sup>

Ferric oxide (magnetite) nanoparticles are widely used in medicinal and industrial fields. However, information about the potential risks of iron nanomaterials is limited, and a safety evaluation is needed. Magnetite has been shown to elicit genotoxicity according to *in vitro* and *in vivo* studies, and the potential for lung carcinogenesis is concern. In the present study, we examined the effects of intratracheal instillation of magnetite on the pulmonary responses of A/J mice initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK).

A total of 100, 7-week-old female A/JJmsSlc mice, were divided into four treatment groups, and injected intraperitoneally with saline or NNK (2 mg/mouse), once per week, for 2 weeks. After 2 weeks from the twice dose of NNK, the mice were subjected to intratracheal instillations of 0 or 5.0 mg of magnetite/kg body weight, once per 4 weeks, for 16 weeks. At the end of the treatment, the mice were sacrificed under isoflurane anesthesia, and the pathological consequences were investigated.

Macroscopic examination revealed numerous nodules or white patches in the lungs of NNK-treated groups. Histologically, alveolar hyperplasia or alveolar/bronchiolar adenoma appeared with high probability in NNK-treated lungs. However, the incidence and multiplicity of the hyperplastic or neoplastic lesions were not affected by magnetite treatment. It is clear that magnetite does not have carcinogenic effects in the lungs of A/JJmsSlc mice under the present conditions.

**Keywords:** magnetite, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, nanoparticles, A/J mouse, lung, intratracheal instillation, NNK

---

<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