

# 気管内投与によるナノ材料の 有害性評価手法の開発

山口大学大学院連合獣医学研究科

小林 俊夫

2021年3月

## 目次

緒論	4
第一章 ナノサイズ二酸化チタンを用いた気管内投与試験条件の検討	7
1.1. 緒論	7
1.2. 材料と方法	8
1.2.1. 二酸化チタン	8
1.2.2. 投与液調製	8
1.2.3. 使用動物	9
1.2.4. 飼育環境	9
1.2.5. 気管内投与	10
1.2.5.1. 炎症反応解析	11
1.2.5.2. 肺内沈着量及び分散性解析	12
1.2.6. 統計学的解析	13
1.3. 結果	13
1.3.1. 炎症反応解析	13
1.3.1.1. 投与液量の違いが及ぼす影響	13
1.3.1.2. 投与器具の違いが及ぼす影響	14
1.3.2. 肺内分散解析	14
1.3.2.1. 投与した肺及び気管からの検出量及び検出率	14
1.3.2.2. 投与液量の違いが及ぼす影響	15
1.3.2.3. 投与器具の違いが各肺葉及び気管の TiO <sub>2</sub> 濃度に及ぼす影響	16
1.4. 考察	16
小括	19
第二章 ナノサイズ酸化ニッケルの気管内投与により誘発された肺炎症反応の経時的比較	20
2.1. 緒論	20
2.2. 材料と方法	21
2.2.1. 酸化ニッケル	21
2.2.2. 模擬生体液に対する溶解性	21
2.2.3. 投与液調製	22
2.2.4. 使用動物	23
2.2.5. 動物実験	23
2.2.5.1. 気管内投与	23
2.2.5.2. 一般状態観察及び体重測定	24
2.2.5.3. 血液検査	24
2.2.5.4. 病理学的検査	25

2.2.5.5.	BALF 検査.....	25
2.2.6.	統計学的解析.....	25
2.3.	結 果.....	26
2.3.1.	死亡及び瀕死動物.....	26
2.3.2.	一般状態.....	26
2.3.3.	体 重.....	27
2.3.4.	血液検査.....	28
2.3.4.1.	血液学的検査.....	28
2.3.4.2.	血液生化学的検査.....	29
2.3.5.	BALF 検査.....	30
2.3.5.1.	BALF 細胞検査.....	30
2.3.5.2.	BALF 生化学検査.....	32
2.3.6.	病理検査.....	32
2.3.6.1.	器官重量.....	32
2.3.6.2.	剖 検.....	34
2.3.6.3.	病理組織学的検査.....	35
2.4.	考 察.....	37
	小 括.....	44
	総合考察.....	46
	総 括.....	48
	謝 辞.....	51
	引用文献.....	52
	付図・付表.....	57

## 緒 論

科学技術の発展は、多様な化学物質の合成、加工を可能にし、人類に様々な恩恵をもたらしてきた。工業用製品はより小型化され、ナノメートルオーダーの領域での製造も可能となり、ナノサイズの工業用材料（ナノ材料）やその加工製品が様々な用途で利用されている。西欧諸国をはじめとする国や地域、並びに国際機関によって多少の相違はあるものの、ナノ材料は一般的に縦横奥行き of 三次元のうち少なくとも1辺が1~100 nm の範囲にある物質と定義されている。ナノ材料の出現により、様々な分野において製品の軽量化、高機能化を達成する研究開発の加速、技術革新が期待されている一方で、従来とは異なる新規の物理化学的特性（物性）に起因した、予期しえない健康影響が生じる懸念も高まっている。

ナノ材料の主要なばく露経路として、呼吸器、消化器及び経皮経路が挙げられる。このうち、製造過程における作業者の吸入ばく露の機会が最も多く、呼吸器経路を介した有害影響が発現する懸念が高いと想定されている[1]。一般的な化学物質の場合、吸入ばく露物質は、ラットを用いる吸入毒性試験によって有害性評価が行われ、その結果を参照してヒトの作業環境中のリスク評価、すなわち許容ばく露濃度の設定や防護法が決定される。一方、ナノ材料の場合、同一の化学組成であっても、サイズや形状、表面性状といった物性の異なる材料が存在し、これらの物性は有害性の違いに寄与することが知られている[2]。そのため、物性の異なるそれぞれの材料について詳細な検証を行う

ことが理想的な有害性評価であると考えられる。しかしながら、吸入毒性試験は大規模な実験設備や多量の被験物質を必要とする非常に高コストな試験法である。さらに我が国においては、Good Laboratory Practice (GLP、優良試験所基準) に基づいた信頼性の高い吸入毒性試験が実施可能な試験機関は数える程度であり、新規ナノ材料の有害性を速やかに評価することは困難である。このような現状は、我が国における新規ナノ材料開発の大きな律速要因になり得る。以上のことから、簡便かつ低コストで実施可能なナノ材料の有害性評価法の開発が期待されている。

気管内投与試験は、実験動物の気管に直接被験物質を投与し、呼吸器における有害影響を評価する試験であり、簡易な実験器具と少量の被験物質で実施可能である。しかしながら、実際に起こりえる呼吸器経路でのばく露とは異なり、肺は瞬間的に多量の被験物質にばく露されるため、吸入ばく露よりも過剰な生体応答が生じることが懸念されている。また、吸入毒性試験のような自発呼吸によって被験物質が吸入される場合と比較して、被験物質の肺内分布に偏りが生じることも懸念される。これらの影響が肺有害性に及ぼす影響が不明であるため、気管内投与試験ではナノ材料の物性に起因した有害性を適切に検出できない懸念がある。さらに、国際的に適用性が評価された安定的な気管内投与試験のガイダンスが確立されていないため、実施機関はそれぞれの経験や手順に基づいて気管内投与を実施しており、これらの試験条件の違いが試験成績に影響することも懸念されている。

そこで本研究では、気管内投与に関する標準的な試験条件範囲を確立することを目的とし、代表的なナノ材料を用いて、異なる条件下で気管内投与試験を実施し、試験結果に及ぼす影響を定量的に精査した。その後、モデルナノ材料を用いて気管内投与試験を実施し、肺の炎症反応を指標にナノ材料の物性と有害影響の関連性を評価することで、標準的な気管内投与試験法の確立とその性能検証を行った。

## 第一章 ナノサイズ二酸化チタンを用いた気管内投与試験条件の検討

### 1.1. 緒 論

気管内投与は、標準的な試験法ガイドラインが示されていないため、実施機関の経験に基づいた手順で実施されている。そのため、試験機関によって様々な試験条件の違いが認められる。このうち、特に結果への影響が大きい項目として、投与に用いる器具及び動物の体重あたりの投与液量が挙げられる。

気管内投与試験は主に2種類の投与器具を用いて実施される。まず経口投与用ゾンデ（以下、経口ゾンデ）で、投与液は液体のまま肺へ直接送達される。注射針やマイクロピペット等を使用している施設もある[3-5]が、投与時の投与液の様態から経口ゾンデと同等の器具に分類できる。他方は気管内投与専用のスプレー型器具（以下、スプレーゾンデ）であり、肺内での投与液の広がりをより均一にするため、投与液をエアロゾル状に噴霧することが出来る[6-8]。

吸入ばく露物質を用いる気管内投与試験ではラットが汎用される。ラットの肺は図I-1に示すとおり一葉の左肺と、前、中、後及び副葉の四葉からなる右肺に分葉している。気管内へ投与された投与液は、重力の影響で下方へ移動することが知られていることから[8, 9]、投与器具の違い、すなわち投与液の様態の違いが肺葉間での分布に影響する懸念がある。

投与液量については、既報ではラットの体重1 kgあたり1~2 mLの範囲での投与が一

一般的である[10]。体重あたりの投与液量 (mL/kg) が多いほど良好な分布となると予測出来るが、過剰な液量の投与は呼吸困難を来す懸念がある[10]。

しかしながら、これらの投与手技の違いに起因する肺内での投与液の分布の違いや、有害性評価項目への関連性は明らかでない。そこで本章では、投与器具及び投与液量の違いに着目し、これらの違いがラットの肺内におけるナノ材料の沈着量及び肺内分散性、並びに誘発される肺炎症に及ぼす影響を検討した。

## 1.2. 材料と方法

### 1.2.1. 二酸化チタン

モデルナノ材料として、数多くの毒性研究に用いられているナノサイズ二酸化チタン ( $\text{TiO}_2$ ) 製品であるP25 (日本アエロジル) を使用した[11–15]。製造元によるP25の物性 (規格情報) を表I-1に示す。 $\text{TiO}_2$ は結晶構造の違いから、ルチル型とアナターゼ型に分類される。P25はルチル型：アナターゼ型=20：80の比率で含む結晶構造を有する。粒子の形状は球形であり、単位重量あたりの表面積 (比表面積) は $50 \pm 15 \text{ m}^2/\text{g}$ である。粒子の表面には特段の改質加工は施されていない。

### 1.2.2. 投与液調製

ナノ材料は一般に水中で互いに凝集し、粒子一個の大きさ (一次粒子径) よりも粗大



な粒子（二次粒子）を形成する[16]。そのため本章では、TiO<sub>2</sub>の分散助剤として汎用されるリン酸二ナトリウム（Disodium phosphate、以下DSP）を使用した[5, 14]。所定量のP25を採取し、1.0、1.5、3.0、6.0 mg/mLとなるように2 mg/mLで調製したDSP溶液を加えて懸濁させ、P25分散液（投与液）を調製した。調製液中の二酸化チタン濃度（実測値）及び動的光散乱法（Dynamic Light Scattering、以下DLS、Zetasizer、マルバーン社）により測定した調製液中の二次粒子径を表I-2に、DLSで得られた粒度分布を図I-2に示す。調製した1.0～6.0 mg/mLの範囲では二次粒子径は同等であった。

### 1.2.3. 使用動物

日本チャールス・リバー株式会社日野飼育センター（滋賀県）より、F344/DuCrI CrIjラット（雄、9又は10週齢）を入手した。動物は一般財団法人化学物質評価研究機構日田事業所の動物飼育施設に収容し、群飼育で6日間の検疫後、12週齢になるまで馴化した。なお、本実験は「日田事業所動物実験に関する規程」に従って実施し、試験施設の実験動物管理委員会の承認を得た。

### 1.2.4. 飼育環境

動物は気温21～25°C、相対湿度40～70%、換気回数10～15回/時に設定したバリアーシステムの飼育室にて飼育した。照明は12時間点灯（7:00～19:00）及び12時間（19:00

～7:00) 消灯させた。

動物は検疫・馴化中はW260×D380×H180 mmのステンレス製金網床ケージに2又は3匹/ケージで、実験中はW165×D300×H150 mmのステンレス製金網床ケージに1匹/ケージで収容し、自動給水装置付きハンガー式ラックで飼育した。飼料はオートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料CRF-1（オリエンタル酵母工業）を、飲料水は水道水に塩素濃度が3～5 ppmとなるように次亜塩素酸ナトリウムを添加し、自動給水装置より自由摂取させた。

#### 1.2.5. 気管内投与

ラットを吸入麻酔用チャンバーに収容し、イソフルラン（4%）を4分間吸入麻酔後、気管内投与専用保定台（000A3467 Rodent WorkStand、Hallowell EMC）に仰臥位で保定した。喉頭鏡を用いて目視下で投与器具を気管内へ挿入し、単回気管内投与を行った（図I-3a）。投与には1 mLシリンジ（テルモ）に接続した経口ゾンデ（KN-348、夏目製作所）又はスプレーゾンデ（MicroSprayer Aerosolizer®、Penn-Century）を用い（図I-3b、c）、投与器具先端が気管分岐部に相当する位置で投与した。投与直後に目視にて喉頭部での投与液の逆流がないことを確認し、さらに投与液の逆流を低減するため、一定時間動物を保定状態のまま静置した。

### 1.2.5.1. 炎症反応解析

表I-3に試験群構成を示す。投与条件の違いが肺炎症反応に及ぼす影響を検討するため、P25の用量を固定し、3又は4段階の投与液量で変えて単回気管内投与を行った。また、投与器具の違いによる影響を比較するため、2種類の投与器具を用いて同条件で投与を行った。投与用量は気管内投与後に急性炎症を十分に誘発することが可能な3.0 mg/kg体重 (mg/kg) とした[3, 11, 12, 14, 15, 17, 18]。

1.2.2.で調製した各濃度の投与液を、ラットへのP25投与用量が3.0 mg/kgとなるよう、それぞれ0.5、1.0、2.0及び3.0 mL/kgの液量で投与した。なお、事前検討において媒体をスプレーゾンデを用いて2.5 mL/kg以上の液量で気管内投与を実施した場合、呼吸不全による死亡が散発したことから、3.0 mL/kgの液量は経口ゾンデのみで行った。

投与3日後にソムノペンチル（共立製薬）を50 mg/kgの用量で腹腔内投与して麻酔し、腹部大動脈から放血して安楽死させた後、気管を露出させて一部切開し、切開創からゾンデ（DISPOSABLE経口ゾンデ、フチガミ器械）を挿入して肺側で気管とともに結紮した。その後、ゾンデより7 mLの生理食塩液（大塚製薬工場）を30 cmH<sub>2</sub>Oで注入し、肺全体を拡張させて洗浄し、液を回収した。この操作を2回繰り返し、合計14 mLの生理食塩液から気管支肺胞洗浄液（Bronchoalveolar lavage fluid: BALF）を得た。洗浄液の回収率はすべての動物で90%以上であった。

BALFに含まれる総細胞数を、血液自動分析装置（ADVIA 120 hematology analyzer、Siemens Healthcare Diagnostics）により測定した後、BALFを遠心分離（400×g、10分、

4°C) し、上清に含まれる総タンパク量及び乳酸脱水素酵素 (Lactate Dehydrogenase、以下LDH) 活性を測定した (Clinical Analyzer 7170、Hitachi Science Systems)。また、上清を除去した細胞残渣にはリン酸緩衝液を1 mL添加して再懸濁させ、サイトフェージ2 (スタットスピン) を用いた細胞遠心法 (1000 r.p.m.×2分) によりスライドガラスに塗沫標本を作製し、ギムザ染色を施した。光学顕微鏡下で各個体200個の白血球細胞 (マクロファージ、好中球、好酸球、リンパ球) を計測し、機器測定した総細胞数から好中球数を算出した。総細胞数、好中球数、総タンパク量及びLDHは投与3日後時点での炎症の評価に用いた。

#### 1.2.5.2. 肺内沈着量及び分散性解析

表I-4に肺内沈着量及び分散性解析における試験群構成を示す。前項と同様の投与条件で、P25の単回気管内投与を各群10匹のラットに実施した。投与30分及び3日後に、各5匹をイソフルラン麻酔下で放血して安楽死させた後、肺及び気管を採取した。肺は右肺の前葉、中葉、後葉及び副葉、並びに左肺に切り出し、それぞれ電子天秤 (ザルトリウス) で重量を測定した後、1 mLの硫酸硝酸混合液 (1 : 1 v/v) に浸漬し、120°Cで60分間加熱して溶解させた。その後希釈し、シリンジフィルター (孔径45 µm) で供雑物を除去した後、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy : ICP-AES、Optima 5300 DV、Perkin-Elmer, Inc.) で試料中のチタンイオン量を測定した。さらに肺重量及び分子量比から各肺葉及び気管中TiO<sub>2</sub>濃度

( $\mu\text{g/g}$ 肺)を算出した。また、分析法による検出ロス量を検討するため、未処置動物3匹から採取した肺組織を含む試験管内に、所定量のP25標準液を添加した後に、前述の前処理法及び分析を行い、添加量に対するP25の回収率を算出した(添加回収試験)。

### 1.2.6. 統計学的解析

BALF中の炎症関連項目、並びに肺及び気管組織中の $\text{TiO}_2$ 濃度の統計解析にはStatlightソフトウェア(ユックムス、東京)を用いた。投与液量間の比較については、Bartlett法による分散検定を実施し、有意水準 $P=0.05$ で分散が均一である場合はパラメトリックのTukey Kramer検定、分散が不均一の場合はノンパラメトリックのTukey Kramer検定を実施した。投与器具間の比較については、 $F$ 検定による分散分析を実施し、有意水準 $p=0.05$ で等分散の場合は $t$ 検定、不等分散の場合はAspin-Welchの $t$ 検定を実施した。

## 1.3. 結果

### 1.3.1. 炎症反応解析

#### 1.3.1.1. 投与液量の違いが及ぼす影響

図I-4及び5に、経口ゾンデ及びスプレーゾンデ使用時のBALF中炎症関連項目の結果を示した。経口ゾンデ使用時は、媒体投与群の炎症関連項目に $0.5\sim 3.0\text{ mL/kg}$ の範囲で著変は認められなかった。P25投与群では、 $3.0\text{ mL/kg}$ 群の総細胞数及び総タンパク質量

が他の液量と比較して統計学的に有意な低値、好中球数及びLDH活性が1.0及び2.0

mL/kg群と比較して有意な低値を示した。

スプレーゾンデ使用時には、媒体、P25投与群ともに0.5～2.0 mL/kgの範囲ではいずれの項目にも明らかな変動は認められなかった。

### 1.3.1.2. 投与器具の違いが及ぼす影響

図I-6に、各液量における経口ゾンデ及びスプレーゾンデ使用時のBALF中炎症関連項目の結果を示した。

媒体投与群については、1.0 mL/kgの液量でスプレーゾンデ使用時のLDH活性は、経口ゾンデ使用時と比較して統計学的に有意な低値を示した。しかしながら、他の炎症関連項目においては明らかな差は認められなかった。P25投与群では、スプレーゾンデを用いて2.0 mL/kgの液量で投与した群の総細胞数は、経口ゾンデ使用時と比較して有意な低値を示した。その他の炎症関連項目では統計学的有意差は認められなかった。また、0.5及び1.0 mL/kgでは、いずれの項目にも有意な差は認められなかった。

## 1.3.2. 肺内分散解析

### 1.3.2.1. 投与した肺及び気管からの検出量及び検出率

添加回収試験の結果、未処置肺組織からの回収率は79.5%であった。以降、回収率を基に算出したTiO<sub>2</sub>濃度で記載する。P25投与30分後及び3日後に採取した各群の肺及び気

管におけるTiO<sub>2</sub>沈着量、並びに投与用量（3.0 mg/kg）に対する沈着量比率（沈着率）を表I-5に示す。なお、投与時のラットの平均体重は約250 gであり、投与したP25はよそ750 µg/匹であった。

投与30分後における肺内沈着量及びその比率は、経ロゾンデ使用時には683.1～783.7 µg及び92.0～104%、スプレーゾンデ使用時は691.0～771.0 µg及び92.1～103%であり、投与30分後時点では液量または器具の違いに関わらず投与したTiO<sub>2</sub>の概ね全量が肺及び気管に沈着していることを確認した。

投与3日後では、経ロゾンデ使用時には532.2～584.6 µg及び71.4～78.5%、スプレーゾンデ使用時は569.1～598.2 µg及び75.4～79.4%であり、投与液量または投与器具の違いに関わらず概ね同程度の量のTiO<sub>2</sub>が肺または気管に残存していることを確認した。

#### 1.3.2.2. 投与液量の違いが及ぼす影響

図I-7に投与30分後及び3日後の各投与液量における各肺葉又は気管のTiO<sub>2</sub>濃度を示す。経ロゾンデによる投与30分後では、各肺葉間でTiO<sub>2</sub>濃度に統計学的有意差は認められず、投与液量の違いによる影響は認められなかった。ただし、0.5 mL/kgで投与したときの気管中TiO<sub>2</sub>濃度は、他の投与液量と比較して統計学的に有意な高値を示した。投与3日後にはいずれの肺葉または気管でTiO<sub>2</sub>濃度に有意差は認められなかった。

スプレーゾンデ使用時には、投与30分後に0.5 mL/kgで投与したときの後葉中TiO<sub>2</sub>濃度が、2.0 mL/kgで投与したときと比較して統計学的に有意な高値を示した。しかし、そ

の他の肺葉及び気管では有意な差を認めなかった。投与3日後にはいずれの肺葉または気管中TiO<sub>2</sub>濃度に有意差は認められなかった。

### 1.3.2.3. 投与器具の違いが各肺葉及び気管の TiO<sub>2</sub> 濃度に及ぼす影響

図I-8に、投与30分後及び3日後の両器間の肺葉及び気管のTiO<sub>2</sub>濃度の比較を示す。各肺葉については、1.0 mL/kgで投与した群の副葉で、投与3日後に器具間で統計学的有意差が認められた。しかしながら、投与30分後並びに投与3日後の他の液量においては有意差を認めなかった。一方気管では、スプレーゾンデ使用時に、1.0および2.0 mL/kgの投与30分後、並びに2.0 mL/kgの投与3日後に統計学的に有意な高値を示した。有意差の認められなかった他の条件でも、気管中TiO<sub>2</sub>濃度はスプレーゾンデ使用時に高値を示した。

## 1.4. 考 察

気管内投与試験は簡易な実験器具で実施可能であり、また、正確な用量で被験物質を肺に投与可能であることから、肺における有害性評価を目的として多くの研究者によって実施されている。しかしながら、吸入ばく露物質のリスク評価を想定した行政的な枠組みにおいて活用するためには、信頼性の高い試験成績を安定して得られるような標準的な試験法の確立が必須である。本章では、P25を用いて、投与液量及び投与器具の違いが結果に及ぼす影響を、炎症反応及び肺葉間分散性の観点で検討した。



P25は代表的な球形不溶性のナノ材料としてさまざまな毒性試験に汎用されており、ラットの気管内に投与すると一過性の急性肺炎を誘発することが報告されている[15, 18, 19]。本研究では、試験条件の違いによる影響を高感度かつ定量的に比較、検討するため、急性期（投与3日後）のBALF中炎症関連項目を測定し、比較した。既報では投与24時間後時点における炎症反応を比較した実験もあるが、投与24時間後時点では気管内投与手技自体の侵襲性や媒体の影響で軽度の炎症反応が誘発される[11, 13, 20]ことから、投与3日後に解析した。また、炎症反応と肺内分散の関連性について比較するため、投与直後（30分後）に加えて、炎症反応の評価と同じ投与3日後に組織中TiO<sub>2</sub>量の解析を行った。

投与液量の違いに着目すると、3.0 mg/kgのP25投与により誘発されるBALF中の炎症関連項目は、投与器具の違いに関わらず、0.5~2.0 mL/kgの範囲で同等であった。経口ゾンデ使用時に、3.0 mL/kgの液量で投与した場合においてのみ、BALF中炎症関連項目の有意な低値がみられた。一般的に、気管内投与は1.0~2.0 mL/kgの液量の範囲で実施されており[10]、3.0 mL/kgはやや過剰な液量と推定される。また、過剰量の投与は気管から消化管への逆流を来し、肺における被験物質量が減少し、肺炎が減弱することが懸念される。しかしながら、本研究において投与直後に解析した肺及び気管中のTiO<sub>2</sub>沈着量は、3.0 mL/kgを含むすべての液量で90%を超えており、また液量の違いに関連した変動もみられなかったことから、投与液の逆流によるTiO<sub>2</sub>の喪失はなかったか、ごくわ

ずかであったものと推定される。さらに、投与3日後時点のTiO<sub>2</sub>沈着量並びに肺葉間分布においても、投与液量の違いによる変動は認められなかったことから、3.0 mL/kgにおいてみられた肺炎症反応の減弱は、P25の沈着量の違いによって生じた変化ではないと考えられる。

投与器具間で比較すると、経口ゾンデ及びスプレーゾンデではいずれもP25投与により同等の肺炎症反応が誘発され、器具特有の反応は認められなかった。また、総沈着量や肺葉間分布についても器具間で明らかな変化は認められなかった。気管内投与では、被験物質を肺全体に均一に分布させることは困難であり、ラットでは右肺の後葉及び副葉、並びに左肺に多く分布し、前葉及び中葉への分布は少なくなることが報告されている[9, 21–23]。本研究においてはその傾向は明らかでなかったが、投与液をエアロゾル状に噴霧するスプレーゾンデを使用しても、著明な分散性の向上は認められなかった。

気管へのTiO<sub>2</sub>沈着量に関しては、液量及び器具特有の影響がみられた。投与液の濃度が高い0.5 mL/kgで、経口ゾンデ投与群における投与直後の気管のTiO<sub>2</sub>濃度は、他の液量投与時よりも高値であり、投与液量の増加、すなわち投与液濃度の低下に伴ってTiO<sub>2</sub>濃度も低下する傾向を示した。これは、投与直後に一定量の投与液が気管部分に滞留していたことを示す結果である。経口ゾンデ投与3日後時点では、気管のTiO<sub>2</sub>濃度は液量に関わらず同等となったことから、滞留した投与液は3日後までに肺葉へ分布または消化管へ排泄されたものと考えられる。一方、スプレーゾンデで投与した場合、投与3日後

の気管のTiO<sub>2</sub>濃度はやや高い傾向を示した。同様の知見は複数報告されており[24, 25]、気管内でエアロゾル上に噴霧されたナノ材料は、気管組織中に沈着し滞留しやすいものと考えられている。しかしながら、本研究において、スプレーゾンデ投与による気管中TiO<sub>2</sub>濃度の増加と、BALF検査結果との間に関連性は認められなかった。ナノ材料が気管に沈着し、長期間滞留した場合の影響は不明であるが、少なくとも肺炎症反応解析を目的として気管内投与を実施する場合、これらの器具の違いが結果に及ぼす影響はほとんどないことが明らかとなった。

本章において我々は、気管内投与の試験条件が結果に及ぼす影響を定量的に評価し、投与器具の違いに関わらず、0.5~2.0 mL/kgの投与液量範囲では同等の結果が得られることを示した。この範囲で気管内投与試験を実施することにより、投与手技に影響されない標準的な実験手技を確立することができると考えられる。

## 小 括

本研究において、ナノ材料の気管内投与試験における投与液量及び投与器具の違いが結果に及ぼす影響を検討し、最適な試験条件範囲を設定することができた。すなわち、投与液量が0.5~2.0 mL/kgの範囲であれば、投与器具の違いに関わらず同等の結果が得られることを示した。この範囲で気管内投与試験を実施することにより、投与条件に影響されない安定した試験成績を取得することが可能となる。

## 第二章 ナノサイズ酸化ニッケルの気管内投与により誘発された肺炎症反応の経時的比較

### 2.1. 緒 論

ニッケル化合物は、採鉱、精錬業や金属加工従事者等の労働衛生上、極めて重要な物質である。ニッケル化合物のばく露によって誘発される毒性影響は、解離したニッケルイオン (II) の寄与が大きいことが知られており、呼吸器経路でばく露された場合、ヒトでは鼻腔や肺、小型齧歯類では肺及び副腎に発がん性を示すことが確認されている [26]。

近年、酸化ニッケル（以下、NiO）はニッケル電池の原料として使用されており、経済産業省により毎年公開されている年間製造・輸入量情報によると、2014～2016年は30,000 t/年であったが、2017年には50,000 t/年、2018年には100,000 t/年と急増している。昨今のナノメートルオーダーでの加工技術の発展に伴い、ナノサイズのNiOを含む製品も数多く存在することは想像に難くない。ナノサイズに加工されることにより、従来のNiOとは異なる予期せぬ有害性発現する可能性も否定できない。

そこで本章では、4種類の代表的なナノサイズのNiO製品を用いて気管内投与試験を実施し、誘発される全身影響及び肺炎症反応を経時的に解析して、物性と有害性、および両者の関連性を検討した。気管内投与は第一章で設定した標準的な手技を適用した。

## 2.2. 材料と方法

### 2.2.1. 酸化ニッケル

表II-1に本章で使用したNiOの物性を示す。ナノサイズのNiOとして、US3352（以下NiO A、US Research Nanomaterials, Inc.）、NovaWireNi01（以下NiO B、Novarials Corporation）、I小粒径（以下NiO C、日下レアメタル）及び637130（以下NiO D、Sigma-Aldrich）の4種類の製品を入手した。なお、本試験に使用したNiOの物性及び投与液中の分散状態に関する詳細は、先行研究において報告した[27]。

NiO Aは黒色粉末であり、走査型電子顕微鏡（SEM）観察では球形を呈した。SEM観察において300個の粒子から計測した一次粒子径は、4種のうちでは最小の20 nm、ガス吸着法により測定した比表面積は51 m<sup>2</sup>/gであった。NiO Bは黒色粉末であり、SEM像では長さ240 nm、太さ29 nmの繊維状を呈した。比表面積は4材料中で最大の180 m<sup>2</sup>/gであった。NiO Cは4種のNiOのうちで唯一、暗緑色粉末であり、SEM像では不定形を呈した。一次粒子径は平均140 nm、比表面積は6.6 m<sup>2</sup>/gであった。NiO Dは黒色粉末であり、SEM像では球形を呈したが、粒子が凝集し一次粒子径の計測はできなかった。製造元が公開している規格情報によると、粒子径は50 nm未満とされている。比表面積は93 m<sup>2</sup>/gであった。

### 2.2.2. 模擬生体液に対する溶解性

ニッケルの有害性は溶解したニッケルイオンの寄与が大きいことから、本研究では

NiOの物理化学的特性の一要素として、模擬生体液に対する溶解度を測定した。各材料の生理食塩水及び超純水に対する溶解度に加え、模擬間質液（pH 7.4）、模擬リソソーム液（pH 4.5）並びに過酸化水素（200  $\mu\text{mol/L}$ ）に対する溶解性を検討した。これらの模擬生体液は、投与後の体内動態を間接的に反映する指標であり[27]、模擬間質液は肺胞腔内、模擬リソソーム液は貪食細胞内、過酸化水素は好中球による異物処理機構を想定し、選定した。

純水で2.0 mg/mLに調製した各NiO分散液を、1 : 3 (v/v) の割合で各種溶媒と混和し、216時間攪拌した。その後、混合液を一部採取してフィルターろ過し、溶解したNi<sup>2+</sup>をICP-AESで定量し、溶解率を算出した。

表II-2に模擬リソソーム液に対する各NiOの溶解度を示す。NiO Aは11%、NiO Bは100%、NiO Cは0.7%、NiO Dは33%であった。一方、他の溶媒に対してはいずれも溶解度が低く、NiO Aで2.3~3.7%、NiO Bで3.5~6.5%、NiO Cで0.14~0.51%、NiO Dで3.9~6.3%であった。

### 2.2.3. 投与液調製

各NiO粉末を1 g/mLで精製水に混合し、超音波照射により懸濁液を調製した。その後、懸濁液を遠心分離して粗大な凝集粒子を除去し、上澄から6、2及び0.67 mg/mLの投与液を調製した。DLSで測定したNiO A、C及びDの懸濁液中の二次粒子径はそれぞれ

49、1600及び39 nmであった（表II-1）。NiO Bは繊維状であり、DLSでの二次粒子径測定は適用できなかった。

#### 2.2.4. 使用動物

日本チャールス・リバー株式会社日野飼育センターより、F344/DuCrIjラット（雄、10週齢）を入手した。動物は一般財団法人化学物質評価研究機構日田事業所の動物飼育施設に収容し、群飼育で6日間の検疫後、12週齢になるまで馴化した。

動物は、第一章と同様の環境で飼育した。なお、本実験は「日田事業所動物実験に関する規程」に従って実施し、試験施設の実験動物管理委員会の承認を得た。

#### 2.2.5. 動物実験

##### 2.2.5.1. 気管内投与

イソフルランでラットを麻酔処置下に置き、精製水またはNiO懸濁液を単回気管内投与した。投与液量は1.0 mL/kgとし、投与には経口ゾンデを用いた。NiO Aを用いた予備実験より、6.0 mg/kgの用量で投与3日後に明らかな炎症反応を誘発することを確認したことから、最高用量は6.0 mg/kgとし、以下公比3で減じて2.0及び0.67 mg/kgの3用量を設定した。NiO A、C及びDについては、各用量を30匹ずつ投与した。NiO B投与群については結果で示すように死亡例が頻出したため、より長期間の有害性評価を目的として各用量50匹を追加設定した。すなわち各用量30匹に加え、投与52週後解剖群（各15匹）及

び104週後解剖群（各35匹）を含めた各用量80匹に投与を行った。

#### 2.2.5.2. 一般状態観察及び体重測定

投与後は毎日生死を含む一般状態観察を実施し、投与3日後並びに以降は週1回の頻度で、電子天秤（ザルトリウス）を用いて体重を測定した。体重測定は投与3日後までは各群30匹、4～28日後までは20匹、28～91日後までは10匹について実施し、平均及び標準偏差を算出した。なお、集計結果についてはNiO Bを投与した長期観察群の数値は除外した。

#### 2.2.5.3. 血液検査

投与3、28及び91日後に、各10又は8匹にソムノペンチルを単回腹腔内投与して麻酔し、うち半数（各5又は4匹）については腹部大動脈よりEDTA-2K添加採血びんSB-41（シスメックス）を用いて採血した。NiO B 6 mg/kg処置群の28及び91日後では、死亡例を除いた各4匹を血液検査に供した。血液試料からは表II-3に示す項目を測定した（測定機器：多項目自動血球分析装置XT-2000i、シスメックス）。また、ガラス製試験管で採血した試料を遠心分離（3000 r.p.m.×10分）し、得られた血清を用いて表II-4に示す項目について測定した（測定機器は表II-4脚注に記載）。残りの半数（各5又は4匹）については2.2.5.5.のBALF検査に供した。



#### 2.2.5.4. 病理学的検査

採血後、腹部大動脈より放血して安楽死させたのち、体表、体表開孔部、皮下、胸腔、腹腔及び骨盤腔とその内容について肉眼的観察を行った。肺及び気管、肝臓、腎臓、脳及び脾臓を採取して電子天秤で重量を測定し、10%中性緩衝ホルマリン液に入れて固定した。また、後縦隔リンパ節及び傍胸腺リンパ節を採取して、ホルマリン固定した。採取した各臓器は、定法にしたがってパラフィン包埋を行い、薄切してヘマトキシリン・エオジン染色を行った。また、一部の肺組織切片についてはマッソントリクローム染色を実施した。

#### 2.2.5.5. BALF 検査

各5又は4匹のラットをソムノペンチル麻酔下で腹部大動脈より放血して安楽死させ、2.2.5.4.と同様に剖検を行った後、1.2.5.1.と同様の手順でBALFを採取して、細胞学的検査及び生化学的検査を実施した。

#### 2.2.6. 統計学的解析

体重、血液学的検査結果、器官重量及びBALF検査結果については、Statlightソフトウェアにより解析した。Bartlett法による分散検定を実施し、有意水準 $P=0.05$ で分散が均一である場合、Dunnet検定により媒体対照群と各投与群の平均値を解析した。分散が不均

一の場合は、Steel検定により媒体対照群と各投与群を比較した。体重、血液学的検査結果、器官重量については両側検定、BALF検査結果については片側検定を実施した。

## 2.3. 結果

### 2.3.1. 死亡及び瀕死動物

実験期間中、NiO A、C及びDを投与した動物では、死亡及び瀕死動物は発生しなかった。前述のようにNiO Bの6 mg/kg群において、投与4～23日後にかけて摂餌不良、自発運動低下、無便、消瘦を呈し、投与4～16日後の間に70匹（投与3日後に解剖した10匹を除く）のうち20匹が死亡した。NiO Bの2及び0.67 mg/kg群では投与3～15日目にかけて摂餌不良及び自発運動低下を呈し、2 mg/kgでは投与4及び5日後に各1例、0.67 mg/kgでは投与3日後に1例が死亡した。なお、NiO B 2及び0.67 mg/kgの死亡動物は長期観察群であり、28及び91日時点の検査動物数の調整は行わなかった。NiO B投与動物の生存率を図II-1に示す。

### 2.3.2. 一般状態

NiO A及びC投与した動物では、観察期間中の一般状態に異常は認められなかった。

NiO Bを投与した動物では、前述のように6 mg/kg群で投与2～23日後に摂餌不良、自発運動低下、無便、消瘦がみられた。2 mg/kg群では投与3～15日後、0.67 mg/kg群では投与4～8日後の間にかけて摂餌不良及び自発運動低下がみられた。

NiO Dを投与した動物では、6 mg/kg群で投与3～20日後に摂餌不良、糞量減少、白濁尿、呼吸促拍、自発運動低下、異常呼吸音がみられた。2 mg/kg群では、投与7～13日後にかけて摂餌不良及び糞量減少がみられた。

### 2.3.3. 体 重

各投与群の体重推移を図II-2に示す。NiO Aを投与した動物では、6 mg/kgで投与3～7日目に平均体重が減少し、対照群と比較して統計学的に有意な低値を示した。2及び0.67 mg/kgでは有意な差は認められなかった。

NiO B投与群では、6 mg/kgで投与1～14日目、2及び0.67 mg/kgで投与1～7日目にかけて体重が減少した。平均体重は6 mg/kgで投与3～35日目及び49日目、2 mg/kgで投与3～28日目、0.67 mg/kgで投与7～21日目にかけて、それぞれ対照群と比較し有意な低値を示した。

NiO Cを投与した動物では、いずれの用量でも対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

NiO D投与群では、6 mg/kgで投与1～7日目にかけて体重が減少し、投与3～56日目並びに84～91日目にかけては対照群と比較して統計学的に有意な低値を示した。2 mg/kgでは投与3～7日目にかけて体重が減少し、投与7～21日目にかけて統計学的に有意な低値を示した。0.67 mg/kgでは有意な差は認められなかった。

#### 2.3.4. 血液検査

##### 2.3.4.1. 血液学的検査

表II-5-1～12に各群の血液学的検査結果を示す。

NiO A群では投与28日後に6 mg/kgでEosino、6及び2 mg/kgでMonoの統計学的有意な低値がみられた。その他、3日後に0.67 mg/kgでRCの低値、28日後に2 mg/kgでNeutroの高値及びLymphの低値がみられたが、それぞれの血液細胞の数値異常に用量依存性は認められなかった。投与91日後には、いずれの項目でも統計学的有意差は認められなかった。

NiO B群では、投与3日後に全用量でRBC、Hb、PLT及びNeutroの有意な高値、またLymphの有意な低値が、6及び2 mg/kgでHt、MCHC、Monoの高値及びMCVの低値、6 mg/kgでRCの低値がみられた。28日後には6 mg/kgでNeutroの高値及びLymphの低値がみられた。91日後になると統計学的に有意な変動は認められなかった。その他、3日後に2及び0.67 mg/kgでWBCの有意な低値、28日後に2 mg/kgでMCV及びRCの高値がみられたが、用量依存性は認められなかった。

NiO Cでは、投与3及び28日後に全用量でMonoの有意な低値がみられたほか、28日後に6 mg/kgでHbの低値、91日後に6 mg/kgでPLTの高値がみられた。その他、3日後に0.67 mg/kgでRBC及びHbの低値、6及び0.67 mg/kgでLUCの低値、28日後に0.67 mg/kgでMCHの低値及びPLTの高値、91日後に2及び0.67 mg/kgでMonoの低値がみられたが、いずれも用量依存性は認められなかった。

NiO Dでは、投与3日後に6 mg/kg LUCの統計学的有意な低値、91日後に全用量でWBCの有意な低値がみられた。その他、28日後に2 mg/kgでPLTの低値、2及び0.67 mg/kgでMonoの低値、2 mg/kgでLUCの低値、91日後に0.67 mg/kgでMonoの低値がみられたが、用量依存性は認められなかった。

#### 2.3.4.2. 血液生化学的検査

表II-6-1～12に血液生化学的検査の結果を示す。

NiO Aでは、3日後において6 mg/kg投与量でTC、TG、BUN、IP及びCaにおいて統計学的に有意な高値が、91日後の6及び2 mg/kg投与量でGGTの有意な高値がみられた。その他、3日後の2 mg/kgでNaの低値、28日後の2及び0.67 mg/kgでClの高値、および0.67 mg/kgでGluの低値、91日後の2 mg/kgでBUNの有意な低値、0.67 mg/kgでTG、Alb及びNaの有意な低値、TB及びKの有意な高値がみられたが、これらの検査値の変動にはNiO Aの用量依存性は確認できなかった。

NiO Bでは、投与3日後において全ての用量でTCの有意な高値が、6及び2 mg/kgでALTの高値、およびA/G ratio、IP、Naの低値、6 mg/kgでAST、BUN、Cre、TPの高値、およびK、Clの低値がみられた。28日後には、すべての用量でGluの低値並びにIPの高値、6及び2 mg/kgではTP、Albの低値並びにClの高値、6 mg/kgではALPの高値並びにCreの低値がみられた。その他、投与28日後の0.67 mg/kgでBUNの有意な高値、91日後の0.67 mg/kgでNaの低値及びKの高値がみられたが、NiO Bへの用量依存性は確認できな

った。

NiO Cでは、3日後において6 mg/kg投与量でALT、Cre、Gluの有意な低値、28日後に6 mg/kgでTPの有意な低値、91日後に6 mg/kgでCaの有意な高値がみられた。その他、投与3日後で2及び0.67 mg/kgのClの有意な高値、0.67 mg/kgでGGTの有意な高値、91日後に2 mg/kgでALP及びAlbの低値、0.67 mg/kgでGluの低値並びにKの高値がみられたが、NiO Cへの用量依存性は確認できなかった。

NiO Dでは、3日後に6及び2 mg/kg投与量でTC及びCaの有意な高値を、6 mg/kgでGGT、Na及びKの有意な高値を、28日後に6 mg/kgでTP及びAlbの有意な低値並びにIPの有意な高値、91日後に6及び2 mg/kgでTCの有意な低値、6 mg/kgでTPの有意な低値がみられた。その他、投与3日後の2 mg/kgでA/G ratio及びClの有意な低値、28日後の0.67 mg/kgでTCの有意な低値、91日後の2及び0.67 mg/kgでIPの有意な高値がみられたが、NiO Dへの用量依存性は確認できなかった。

### **2.3.5. BALF 検査**

#### **2.3.5.1. BALF 細胞検査**

図II-3にBALF細胞検査結果を示す。NiO A投与群では、投与3日後に好中球数がすべての用量で、リンパ球数が6及び2 mg/kg投与量で、マクロファージ数が6 mg/kgで、それぞれ媒体対照群と比較して統計学的に有意な高値を示した。投与28日後にはすべての用

量で、マクロファージ、好中球及びリンパ球数が統計学的に有意な高値を示した。投与91日後にはマクロファージ数及びリンパ球数がすべての用量で、好中球数が6及び2 mg/kgで統計学的に有意な高値を示した。

NiO B投与群では、投与3日後にマクロファージ、好中球及びリンパ球数がすべての用量で、好酸球数が6及び2 mg/kgで統計学的に有意な高値を示した。投与28日後にはすべての用量で、マクロファージ、好中球及びリンパ球数が統計学的に有意な高値を示した。投与91日後には6及び2 mg/kgで、マクロファージ数が統計学的に有意な高値を示したが、好中球とリンパ球は媒体対照群と同レベルに回復した。

NiO C投与群では、投与3及び28日後に6 mg/kgにおいてのみ、マクロファージ、好中球及びリンパ球数が統計学的に有意な高値を示した。投与91日後には全ての項目で、統計学的に有意な変動は認められなかった。

NiO D投与群では、投与3日後にマクロファージ数及び好中球数が全ての用量で、リンパ球数が6及び2 mg/kgで統計学的に有意な高値を示した。投与28及び91日後には全ての用量で、マクロファージ、好中球及びリンパ球数が統計学的に有意な高値を示した。

図II-4では、各NiOを投与した後のBALF中の総細胞数について、投与後に体内で溶解したNiO量との関連性を検証するため、各NiOの溶解度（表II-4）を投与用量に乗じて溶解NiO量を計算し、横軸にプロットした。投与3日後ではNiO A、NiO B及びNiO Dの各用量で、溶解したNiO量に関連して細胞数が増加する傾向がみられた。NiO Cでは炎症

細胞の増加は明らかではなかった。投与28日後ではNiO B群の炎症反応は減弱し、91日後には溶解NiO量との関連性は明らかでなかった。NiO A及びNiO D投与群では、溶解NiO量に依存した炎症細胞の増加が投与91日後まで持続した。

### 2.3.5.2. BALF 生化学検査

表II-7-1～12に投与3、28、91日後のBALF中のTP、Alb、LDH活性の測定結果を示す。

NiO A投与群では、投与3、28及び91日後にすべての用量で、TP、Alb及びLDH活性が統計学的に有意な高値を示した。

NiO B投与群では、投与3及び28日後にすべての用量で、TP、Alb及びLDH活性が有意な高値を示したほか、投与91日後にすべての用量でAlbが有意な高値を示した。

NiO C投与群では投与3日後に6 mg/kgでTP、Alb及びLDH活性、投与28日後に6 mg/kgでTP及びLDH活性の有意な高値がみられた。投与91日後には2 mg/kgでTPの有意な差がみられたが、減少方向の変化であり、NiO Cの用量依存性は認められなかった。

NiO D投与群では、投与3、28及び91日後にすべての用量で、TP、Alb及びLDH活性が統計学的に有意な高値を示した。

### 2.3.6. 病理検査

#### 2.3.6.1. 器官重量

表II-8-1～12に投与3、28、91日後の各器官の絶対重量、並びに解剖時体重に対する相



対重量を示す。

NiO A投与群では肺の絶対及び相対重量について、投与3及び91日後において6及び2 mg/kgで、28日後においてすべての用量で統計学的に有意な高値を示した。その他の器官では統計学的に有意な変動は認められなかった。

NiO B投与群では、投与3、28及び91日後にすべての用量で肺の絶対及び相対重量が有意な高値を示した。また、投与3日後に6 mg/kgで腎臓の相対重量、並びに脳の相対重量に有意な高値が、また脾臓の絶対重量の有意な低値がみられた。投与28日後では6 mg/kgで腎臓、脾臓及び脳の相対重量に有意な高値が、肝臓の絶対重量に有意な低値がみられた。

NiO C投与群では、投与に関連した変化は認められなかった。投与28日後に2及び0.67 mg/kgの肺の相対重量が統計学的に有意な低値を示したが、NiO Cの用量に依存性のない変化であった。

NiO D投与群では、投与3、28及び91日後にすべての用量で肺の絶対及び相対重量が有意な高値を示した。また、投与28日後に6 mg/kgで脾臓の絶対重量の有意な低値がみられた。投与91日後に2 mg/kgで脳の絶対重量の有意な高値がみられたが、NiO Dの用量に依存しない変化であった。

### 2.3.6.2. 剖 検

表II-9-1～12に剖検所見を示す。

NiO Aの6及び2 mg/kg投与群では、投与3日後に肺の変色部（赤色：出血が主体、又は白色：炎症が主体）がそれぞれ10匹中7匹及び6匹にみられた。0.67 mg/kgでは異常は認められなかった。また、後縦隔リンパ節の腫大が6 mg/kgで6匹にみられた。投与28日後には、6及び2 mg/kgで肺の変色部がともに10匹すべてに、0.67 mg/kgで5匹にみられた。後縦隔リンパ節の腫大が6及び2 mg/kgでそれぞれ10匹及び6匹にみられた。投与91日後には、6及び2 mg/kgで肺の変色部がともに10匹すべてにみられた。後縦隔リンパ節の腫大は6及び2 mg/kgでそれぞれ6匹すべて及び2匹にみられた。0.67 mg/kgでは異常は認められなかった。

NiO B投与3日後には、すべての用量ですべての動物に、肺の変色部がみられた。また、後縦隔リンパ節の腫大が6、2及び0.67 mg/kgでそれぞれ7、5及び2匹にみられた。投与28日後には、6及び2 mg/kgで肺の変色部がそれぞれ8匹中7匹、及び10匹中2匹にみられた。また、後縦隔リンパ節の腫大が6 mg/kgで8匹中1匹、2 mg/kgで10中1匹にみられた。0.67 mg/kgでは異常は認められなかった。投与91日後には、すべての用量で異常はみられなかった。

NiO Cでは、投与3日後に6 mg/kgで後縦隔リンパ節の腫大が10匹中1匹にみられた。その他の用量では、異常は認められなかった。投与28及び91日後には、6 mg/kgで肺の変色部がそれぞれ10匹中1匹でみられたが、その他の用量では異常は認められなかった。

NiO Dでは、投与3日後に6及び2 mg/kgで肺の変色部がそれぞれ10匹中9匹及び8匹にみられた。また、後縦隔リンパ節の腫大が6及び2 mg/kgでそれぞれ8匹及び4匹にみられた。0.67 mg/kgでは異常は認められなかった。投与28日後には、6、2及び0.67 mg/kgで肺の変色部がそれぞれ9、10及び7匹にみられた。また、後縦隔リンパ節の腫大が6、2及び0.67 mg/kgでそれぞれ9、7及び2匹にみられた。投与91日後には、すべての用量のすべての動物で、肺の変色部がみられたほか、後縦隔リンパ節の腫大が6及び2 mg/kgでそれぞれ3匹及び2匹にみられた。

### 2.3.6.3. 病理組織学的検査

各NiO投与後の肺の病理組織学的所見を表II-10-1～12に、代表的な病理組織像を図II-5に示す。

NiO Aを6及び2 mg/kgで投与した動物の肺では、投与3日後に炎症性細胞浸潤が肺胞腔、細気管支周囲及び血管周囲にみられ、肺胞マクロファージ内及び肺胞腔にNiO粒子沈着を認めた。6 mg/kgでは炎症領域を中心にII型肺胞上皮細胞の増生がみられた。炎症反応は投与28、91日後でも持続し、肺胞マクロファージの変性及び壊死を伴った。特に投与91日後では肉芽腫性の炎症に進展し、マッソントリクローム染色で青染するコラーゲン増生を認めた（図II-5A-3）。

NiO B投与群では、投与3日後にすべての用量で炎症性細胞浸潤及び出血を認め、6及

び2 mg/kgでは肺胞マクロファージの変性及び壊死を伴った。粒子沈着像は認められなかった。投与28日後には、6及び2 mg/kgで肺胞マクロファージの変性及び壊死を認めたが、炎症細胞浸潤は顕著でなかった。また、すべての用量でマクロファージ数の増加がみられた。投与91日後では6 mg/kgでごく軽度のマクロファージ数の増加を認めた。

NiO C投与群では、投与3日後にすべての用量で肺胞マクロファージ内又は肺胞腔へのNiO粒子沈着がみられたが、他に異常所見は認められなかった。投与28及び91日後では同様の変化が6及び2 mg/kgでのみみられた。

NiO Dでは、投与3日後にすべての用量でII型肺胞上皮細胞の増生を伴う急性炎症反応が認められたほか、6及び2 mg/kgではNiO粒子沈着がみられた。炎症細胞の浸潤は投与3日後から91日後まで持続した。投与28日後には6 mg/kgで線維化がみられ、投与91日後にかけてその発生頻度及び重篤度ともに増大した。

後縦隔リンパ節について表II-11-1～12に病理組織学的所見を、図II-6に代表的な病理組織像を示す。後縦隔リンパ節では、傍皮質の肥大が投与3日後以降、NiO Aの6及び2 mg/kg用量で、NiO Dのすべての用量でみられた。同様の所見はNiO B投与群では投与3日後にすべての用量でみられたが、投与28日後では6 mg/kgのみに認められ、投与91日後にはすべての用量で認められなかった。NiO C投与では傍皮質の肥大は認められなかった。また、黒色～淡褐色を呈するNiO粒子沈着は、投与28日後にNiO Aの6及び2 mg/kg投与群、並びにNiO C及びNiO Dの6 mg/kg投与群で認められ、投与91日後にはNiO

A及びNiO Dのすべての用量、並びにNiO Cの6 mg/kg用量でみられた。NiO B投与群では、粒子沈着は認められなかった。粒子沈着がみられたNiO A、NiO C及びNiOD投与群では、リンパ節の炎症性変化又は変性像は認められなかった。

表II-12にNiO B（6 mg/kg）投与群における腎臓及び脾臓の病理組織学的所見を示す。腎臓においては、NiO Bを6 mg/kgで投与した動物において、投与3日後に皮質尿細管の壊死が認められた（代表的な病理組織像を図II-7に示す）。2及び0.67 mg/kg並びに投与28及び91日後の6 mg/kgでは著変は認められなかった。NiO A、NiO C並びにNiO D投与群では異常は認められなかった。

脾臓においては、NiO Bを6 mg/kgで投与した動物において、投与3日後に軽度な萎縮が認められた。2及び0.67 mg/kg並びに投与28及び91日後の6 mg/kgでは著変は認められなかった。NiO A、NiO C並びにNiO D投与群では異常は認められなかった。

脳ではすべてのNiO投与群で、いずれの観察時点においても組織学的な異常は認められなかった。

## 2.4. 考 察

NiOの安全性は職業ばく露の観点から非常に重要であり、その毒性メカニズムを解明するため、これまでに数多くの毒性研究が実施されてきた。NiOを含むニッケル化合物の毒性本態は、溶解して生成するニッケルイオンであることが知られており、従ってニ

ニッケル化合物の溶解性は有害性に大きな影響を及ぼすと考えられている[26]。NiOの溶解性は粒子のサイズ（すなわち比表面積）の違いに起因すると理解されている[28]。本研究において使用した線維状物質であるNiO Bの溶解性の高さも、極めて大きな比表面積に起因するものと推定される。また、NiOの溶解性は化学量論的にも説明される。すなわち、NiOは典型的な不定比化合物であり、NiO分子中のNiとOの組成比は製品によって異なる。酸素の比率が高い場合、NiOは黒色を呈して溶解性が高く、低い場合は緑色調を呈し、不溶性となる。本研究では、NiO中の組成比解析は行っていないものの、NiO Cの外観が暗緑色であることから、NiO Cは酸素比の低い材料であると推定され、実際に種々の溶液に対する溶解度は最も低かった。一般にNiOは、NaCl型の結晶構造を示すが、緑色NiOの方が安定的な結晶構造を呈し、ニッケルイオン放出能は低い[28]。したがって、本研究で示されたNiO Cの有害性の低さは、その不溶性と関連しているものと推定される。

溶解性を有するNiO A、NiO B及びNiO Dに着目すると、NiO B > NiO D > NiO Aの順に重篤な炎症を誘発した。この順位は溶解度と同じ順であることから、これらの有害性の本態はニッケルイオンに起因しているものと推定される。易溶解性ニッケル化合物では、肺胞領域に到達後、直ちにイオン化して速やかに尿へ排泄される[29]。一方、部分的に溶解するニッケル化合物は、肺胞マクロファージの貪食、又は気管支上皮の吸収過程などによって細胞内に取り込まれた後、主にリソソーム内の酸性環境下でイオン化す

る[29]。細胞内で生成されたニッケルイオンは細胞毒性や核傷害を誘発し、長期的には発がん性に関与する[29]。前述のとおり、NiO A、NiO B及びNiO Dは模擬リソソーム液に溶解するものの、模擬間質液を含む他の溶液に対する溶解性は低いことから、気管内投与後のNiOの体内動態は肺での細胞内吸収過程が重要であり、その後の細胞内イオン化および細胞毒性を誘発することが推察される。病理組織学的検査でみられたマクロファージの変性壊死像はこの毒性機序を反映していると考えられる。

NiO A、NiO B及びNiO D投与群では、投与3日後から肺重量の有意な高値がみられた。吸入毒性試験では、肺重量増加は肺におけるの炎症細胞浸潤等の組織学的変化と相関する有用な評価項目であると報告されている[30]。炎症反応が明らかでなかったNiO C投与群では肺の重量変化が認められなかったことを考慮すると、NiO A、NiO B及びNiO D投与群でみられた肺重量増加は炎症反応を反映した変化であると考えられる。ただし、炎症反応が回復したNiO B投与91日後においても肺の重量増加は持続したことから、肺の重量は肺における炎症のみならず、その陳旧過程も反映している可能性が推定される。また、NiO B投与3日後に6 mg/kgでみられた脾臓の重量低値は、萎縮を反映したものと考えられる。一方、腎臓及び脳の相対重量の高値は、解剖時体重の低値に起因したものと推察され、投与28日後まで継続した。

本研究で作製したNiO実験モデルにおいて、溶解性の最も高いNiO B投与群でのみ死亡が発生し、強い全身毒性影響を誘発した。しかしながら、生存した動物はその後明ら

かに回復性を示し、投与91日後には病理組織学的検査でも著変を認めなかった。これもニッケルイオンの体内動態から説明される。すなわち、投与後に多量のニッケルイオンが肺内で生成され、重篤な炎症反応が誘発されたものの、炎症細胞の変性・細胞死によりイオンは肺胞腔や間質に遊離し、尿から速やかに排泄されたことが推測できる。一般に易溶解性のニッケル化合物は、重篤な毒性影響を誘発して高い死亡率を伴うことから、長期的な評価が必要な発がん性研究は実施が困難であるとされている[31]。本研究においても、NiO B投与群において多くの死亡例が認められたが、投与52週後および104週後において、明らかな発がん影響がなかったことを確認している（非公開データ）。

また我々は先行研究において、NiO B投与91日後時点でNiOがほとんど肺に沈着しておらず、大部分が排泄されたことを確認しており[27]、投与91日以降の長期観察期間には有害影響が発現しないものと推察される。また、NiO Bは線維状構造を示すが、線維状物質に特徴的な肺内動態[32]、すなわち胸膜領域への蓄積並びに中皮細胞反応を示唆する所見は認められなかった。これは、NiO Bの線維状構造が、比表面積が増大、すなわち易溶解性に寄与しているためであり、線維状物質としての挙動を示さなかったものと考えられる。その他、ナノ材料の有害性に寄与する物理化学的特性として粒子の形状や粒子径、比表面積等が知られているが、本研究においては、いずれも間接的に溶解性に反映されたものと考えられる。

NiO B投与3日後にBALF検査においてみられた好酸球浸潤は、酸化亜鉛や酸化銅など



他の溶解性物質の気管内投与においても誘発されることが知られている[33]。ニッケル化合物では塩化ニッケル及びNiOで同様の報告がある[34]。肺への好酸球浸潤は、肺胞マクロファージや肺構成細胞が死滅し、漏出した細胞内成分に含まれるエオタキシンが誘引因子であると報告されている[34]が、浸潤好酸球の病態への寄与や毒性学的意義については不明である。NiO Bの気管内投与実験は、ニッケル化合物を要因とする肺炎誘発機序と、特に炎症初期における好酸球の病理学的寄与を解明するために有用なモデルになる可能性がある。

一方、NiO A及びNiO Dでは、すべての観察時期においてBALF中マクロファージ数、好酸球数、並びにリンパ球数の用量依存的な増加が認められた。BALFは肺全体を洗浄して得られる試料であるため、検査結果は肺全体の炎症の程度を反映している。投与3日後におけるBALF内の細胞数の増加レベルは、NiO B 投与群がもっとも顕著であり、NiO溶解性が初期病態に強く寄与することを示した。しかしながら、投与28日後以降、NiO B投与群の肺炎症は減弱し、回復したのに対し、NiO A及びNiO D投与群では総細胞数は遅延性に増大し、持続性かつ進行性の肺炎症を示した。NiO A及びNiO Dの炎症反応の程度は投与28及び91日後とも、見かけ上、溶解したNiO量と関連しているが、その持続性については溶解性のみからは説明できない。NiO A及びNiO D投与群では炎症の回復傾向はなく、また膠原線維成分の増生が生じていることからさらに重篤な毒性影響を発現することが推察されるものの、本実験モデルでは原因となる物性を特定するには

いたらなかった。この解明のためには、炎症反応の持続性を同定するための実験的エンドポイントを確立する必要があり、今後さらなる*in vivo*データの蓄積が必須であると考えられる。

後縦隔リンパ節における傍皮質の肥大は、肺炎症がみられた群、すなわちNiO A、NiO B、NiO D投与群でのみ認められた。NiO B投与群の肺炎症反応の沈静化とともに肥大は認められなくなったことから、炎症に伴う反応性変化であると理解された。一方、リンパ節における投与材料由来の粒子沈着は、他の気管内投与試験でも報告[35], [36]があるが、本研究同様、いずれもリンパ節での炎症や変性性の変化を伴っていない。また、最も溶解性の高いNiO B投与群では全く認められないことから、リンパ節の粒子沈着は投与部位からのリンパ流を介した不溶成分の排泄過程を反映する二次的変化であると推定される。

NiOの気管内投与により、肺炎症反応の誘導以外に、血液検査において二次的な影響がみられた。前述のとおりNiO B投与群では重篤な全身毒性影響が発現し、投与した70匹中20匹が、4~16日後の間に死亡した。投与後3日時点での血液検査では、赤血球系項目（赤血球数、ヘモグロビン量ほか）、尿素窒素、総タンパク質が顕著に増加し、6 mg/kgでは血中グルコースの高値傾向や電解質異常がみられた。これらの異常は、重篤な全身状態の悪化を反映した血液濃縮パターンを意味する。血液濃縮の毒性評価項目への影響については、摂餌制限モデルで詳細に研究されている[37-39]。森山らは、SDラ

ットを用いた2週間の摂餌制限実験により、赤血球関連項目の増加を報告した。ただしこのモデルでは、低栄養に起因した造血抑制が持続し、白血球数や網状赤血球数が減少することも報告されている。また、摂餌制限モデルでは、低栄養性の血中グルコース低下やタンパク量低下が報告されている。本研究では、解剖前の動物を絶食していないため、血中グルコースの変動は摂餌行動の影響を受けている可能性も否定できない。しかし、NiO B 6 mg/kg群の平均値の高値傾向並びに一般状態でみられた摂餌不良を考慮すると、グルコースも血液濃縮の影響を反映しているものと推定される。また、体液量の減少はグルココルチコイドの分泌を刺激する[40]ことから、全身性ストレスを介して血中グルコース量の増加に寄与している可能性もある。

一方、NiO Bを6 mg/kgで投与した動物において、3日後に軽度～中等度の腎臓尿細管壊死がみられた。類似病変は摂餌制限モデルにおいても報告されており[39]、尿細管上皮にヘモグロビンと推定される硝子滴沈着並びに血色素尿を伴う溶血に起因すると判断されている。しかしながら本研究では、硝子滴の増加は認められず、血液検査や病理組織検査を含む各項目で溶血を示唆する変化は確認できなかった。また、ニッケルイオンの主要な排泄経路は尿であるが、ニッケル化合物による毒性試験では腎臓に組織学的変化は報告されていない[41–44]。OboneらはSDラットを用いて硫酸ニッケルの13週間飲水投与試験を実施し、腎臓におけるニッケル沈着、血中尿素窒素の増加及び腎臓の相対重量増加を認めたものの、病理組織学的には異常はなかったと報告している[44]。また、

F344ラットを用いたNiOの2年間吸入ばく露試験においても、腎臓に病理組織学的変化は認められていない[43]。ヒトのニッケル精錬業従事者の大量ばく露事故例においては、ばく露後重篤な全身状態の悪化を伴って死亡した症例で腎臓の急性尿細管壊死が認められている[45]が、ばく露後の重篤な全身状態悪化や、ラットにおける毒性学的知見[41-44]を考慮すると、ニッケルによる腎毒性が発現したとは考えにくい。したがって、本研究においてNiO B投与後にみられた腎臓の病変も、重篤な全身状態の悪化から続発した、低血流ショックに起因するものかもしれない。

本研究において、物性の異なるNiOの気管内投与によって、様々な毒性パターンが発現した。急性期の肺炎症反応の程度は細胞内リソソームに対するNiOの溶解性と関連するものの、易溶解性材料は速やかに排泄されるため一過性の反応を示し、部分的に溶解する材料では炎症が持続して、線維成分の増生を伴って進行性に増悪した。一方、不溶性材料ではほとんど炎症反応を誘発しなかった。炎症反応の持続性に関しては溶解性からは説明できず、別の要因が示唆されたもののその特定には至らなかった。炎症の持続性は発がん性にも関連する可能性があるため、今後更なるデータの蓄積、特に経時的かつ定量的な実験データの集積が必要である。

## 小 括

本研究において、物性の異なる4種類のNiOを単回気管内投与し、炎症反応を中心に

経時的に評価を行った。その結果、NiOのリソソーム液の溶解度に関連した炎症反応が誘発された。すなわち、溶解性の高い材料ほど強い肺炎症を誘発することを定量的に示した。一方で、炎症の持続性と溶解度の関連性はなく、また持続性に寄与する物性の特定には至らなかった。

## 総合考察

近年の著しい科学技術の発展に伴い、国際的にナノ材料の研究・開発が加速している。一方で、合理的かつ効率的なリスク評価のための有害性評価手法の整備は十分ではないのが現状である。本研究では、呼吸器経路でのばく露を想定した効率的な有害性評価法として気管内投与試験に着目した。気管内投与は有害性評価研究のほか、病態モデル作製、体内動態解析等様々な目的で実施されている手法であるが、標準的な手順は確立されておらず、試験条件の違いが結果に影響している懸念がある。そこで、試験条件のうち特に結果に及ぼす影響が大きいと想定される投与器具及び投与液量について検証を行った。

気管内投与における標準的な投与器具及び投与液量を決定するため、ナノサイズのTiO<sub>2</sub>を用いて投与器具の違い及び液量の違いが有害性評価に関する成績に及ぼす影響を評価した。その結果、投与器具の違いによる気管内での投与液噴出様態の違いは、肺内分布並びに誘発される炎症反応には顕著な影響を及ぼさないことを明らかにした。また、投与液量については0.5~2.0 mL/kgの範囲であれば、肺内分布並びに誘発される炎症反応には顕著な影響を及ぼさないことを明らかにした。以上の検証結果から、標準的な気管内投与試験の条件範囲を確立した。

次に、確立した標準的な気管内投与手法を用いて、物性の異なる4種類のナノサイズNiOの気管内投与試験を実施し、肺炎症を中心とした各種毒性関連項目について経時的

に評価し、物性と有害性の関連性を検討した。その結果、NiOのリソソーム液に対する溶解性と、肺炎症の程度に関連性を認めた。本研究で確立した標準的な気管内投与試験は、物性の違いに起因する多様な有害影響を定量的に検出することが出来ることを示した。一方で、NiOの持続的炎症に関連する有害物性を明らかにすることはできなかった。

本研究において、効率的なナノ材料の呼吸器有害性評価のための、気管内投与試験の試験条件を標準化した。この試験法は有害性情報のほとんどない新規ナノ材料について、初期情報を取得するために利用することが出来、物性の違いに起因した有害性影響を適切に検出することが期待できる。一方で、実際のヒトのばく露環境下における主要な経路は肺からの吸入経路である。したがって、実験動物における気管内投与試験の成績をヒトのリスク評価に適用するためには、それぞれのばく露法によるナノ材料の肺内での挙動や有害影響を詳細に比較検討する必要がある。今後、安全係数評価等のヒトへの外挿性やリスク管理に係る知見の集積が、気管内投与試験法の有用性をさらに高める重要な因子となろう。

## 総 括

昨今の科学技術の発展に伴い、ナノテクノロジーに関する研究・開発は進捗著しく、我々の身の回りの様々なものへ応用されている。一方でナノ材料特有の特性とそれに起因した有害影響については未知の部分が多い。わが国においては、国際的に強調した規制管理を想定し、欧米諸国の規制動向に注視している反面、欧米諸国でスタンダードな評価法である吸入ばく露試験の実施は容易ではなく、明確な規制方針を示すに至っていない。吸入ばく露物質の簡易的な有害性評価手法である気管内投与試験は、一定の有用性は認められているものの、公定的な試験法ガイドラインが示されていないため、試験条件は試験機関によって様々であり、得られたデータについても法規制上の利用は困難である。

第一章では、気管内投与における結果に影響しうる主要な要因である投与液量の違い並びに投与器具の違いについて、肺内分散性及び炎症反応の観点から定量的に解析した。肺内分散性については投与液量の違いは顕著でないものの、エアロゾル状に噴霧した場合には気管に粒子が沈着しやすいことが明らかとなった。一方、肺炎症反応については、投与器具の違いは明らかでなく、投与液量についても0.5～2.0 mL/kgの範囲では著変は認められなかった。これにより、肺炎症反応を中心とした有害性評価を目的とする場合、投与器具の違いは結果に影響せず、また投与液量についても0.5～2.0 mL/kgの範囲であれば同等の反応を誘発することが可能であることを明らかとした。

第二章においては、モデルナノ材料として物性の異なる4種類のNiOを単回気管内投



与し、投与3、28、91日後における肺炎症反応を含む各種毒性学的検査項目について評価した。4種類のNiOは特に模擬リソソーム液に対する溶解性に大きな違いがあり、溶解性の高い物質ほど投与3日後には強い炎症反応を誘発した。しかしながら、溶解したニッケルイオンは速やかに排泄されるため、28日後以降には回復した。中等度の溶解性を示す2材料は、投与3日後に肺炎症反応を誘発し、さらに炎症は28日後にかけて進行性に持続し、91日後にはさらに増悪し、肺における線維成分の増生を伴った。一方、不溶性の材料では明らかな炎症反応は示さず、細胞貪食性のNiO粒子が肺に残存又は所属リンパ節へ移行し沈着した。上記のことから、第一章で確立した気管内投与試験は、物性の異なるナノ酸化ニッケルの有害性を明確に判別可能であることを示した。一方で、炎症の持続性に関しては溶解性からは説明できず、関連する物性を特性するにはいたらなかった。肺での線維化は発がんにつながる所見であることから、炎症の持続性に起因する物性の特定は、酸化ニッケルの呼吸器における毒性機序の重要課題であることが分かった。

本研究において整備した気管内投与試験の標準的手法に基づき、ナノ材料の気管内投与試験を実施することにより、試験条件に影響されない有害性に関するデータを取得することが可能である。一方で、気管内投与はそのばく露様式から吸入ばく露物質のリスク評価のための有害性評価法とは認知されていない。今後、信頼性の高い気管内投与試験データを蓄積するとともに、ヒトのリスク評価につながる知見を集積することが重要

になる。本研究において作成した標準的試験手法はその重要な足がかりとなるものと期待される。

## 謝 辞

本論文作成にあたり、細部までご指導賜りました山口大学連合獣医学研究科の日下部健教授並びに九州栄養福祉大学の木曾康郎教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なご協力を賜りました国立研究開発法人産業技術総合研究所の川口建二博士、佐々木毅博士、篠原直秀博士に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、甚大なる協力を賜りました一般財団法人化学物質評価研究機構の諸氏に感謝申し上げます。

## 引用文献

- [1] OECD, “Analysis of the survey on available methods and models for assessing exposure to manufactured nanomaterials,” Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, No. 56, 2015.
- [2] H. M. Braakhuis, M. V. Park, I. Gosens, W. H. De Jong, and F. R. Cassee, “Physicochemical characteristics of nanomaterials that affect pulmonary inflammation,” *Part. Fibre Toxicol.*, 11, 18, 2014.
- [3] B. Rehn, F. Seiler, S. Rehn, J. Bruch, and M. Maier, “Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 189, 84–95, 2003.
- [4] K. Wako, Y. Kotani, A. Hirose, T. Doi, and S. Hamada, “Effects of preparation methods for multi-wall carbon nanotube (MWCNT) suspensions on MWCNT induced rat pulmonary toxicity,” *J. Toxicol. Sci.*, 35(4), 437–446, 2010.
- [5] N. Kobayashi, M. Naya, S. Endoh, J. Maru, K. Yamamoto, and J. Nakanishi, “Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO<sub>2</sub> particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results,” *Toxicology*, 264(1–2), 110–118, 2009.
- [6] C. J. Funk, R. Manzer, T. A. Miura, S. D. Groshong, Y. Ito, E. A. Travanty, J. Leete, K. V. Holmes, R. J. Mason, “Rat respiratory coronavirus infection: Replication in airway and alveolar epithelial cells and the innate immune response,” *J. Gen. Virol.*, 90(12), 2956–2964, 2009.
- [7] S. Ahmad, D. O. Raemy, J. E. Loader, J. M. Kailey, K. B. Neeves, C. W. White, A. Ahmad, P. Gehr, B. M. Rothen-Rutishauser, “Interaction and Localization of Synthetic Nanoparticles in Healthy and Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells: Effect of Ozone Exposure,” *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, 25(1), 7–15, 2012.
- [8] Y. Hasegawa-Baba, H. Kubota, A. Takata, and M. Miyagawa, “Intratracheal instillation methods and the distribution of administered material in the lung of the rat,” *J. Toxicol. Pathol.*, 27(3–4), 197–204, 2014.
- [9] J. D. Brain, D. E. Knudson, S. P. Sorokin, and M. A. Davis, “Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation,” *Environ. Res.*, 11(1), 13–33, 1976.
- [10] K. E. Driscoll, “Intratracheal Instillation as an Exposure Technique for the Evaluation of Respiratory Tract Toxicity: Uses and Limitations,” *Toxicol. Sci.*, 55(1), 24–35, 2000.
- [11] D. B. Warheit, T. R. Webb, K. L. Reed, S. Frerichs, and C. M. Sayes, “Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: Differential responses related to surface properties,” *Toxicology*, 230(1), 90–104, 2007.

- [12] T. M. Sager and V. Castranova, "Surface area of particle administered versus mass in determining the pulmonary toxicity of ultrafine and fine carbon black: Comparison to ultrafine titanium dioxide," *Part. Fibre Toxicol.*, 6, 1–12, 2009.
- [13] D. B. Warheit, T. R. Webb, C. M. Sayes, V. L. Colvin, and K. L. Reed, "Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO<sub>2</sub> rods and dots in rats: Toxicity is not dependent upon particle size and surface area," *Toxicol. Sci.*, 91(1), 227–236, 2006.
- [14] N. Hashizume, Y. Oshima, M. Nakai, T. Kobayashi, T. Sasaki, K. Kawaguchi, K. Honda, M. Gamo, K. Yamamoto, Y. Tsubokura, S. Ajimi, Y. Inoue, N. Imatanaka, "Categorization of nano-structured titanium dioxide according to physicochemical characteristics and pulmonary toxicity," *Toxicol. Reports*, 3, 490–500, 2016.
- [15] T. M. Sager, C. Kommineni, and V. Castranova, "Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area," *Part. Fibre Toxicol.*, 5(1), 17, 2008.
- [16] OECD, "Guidance on sample preparation and dosimetry for the safety testing of manufactured nanomaterials," *Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials*, No. 36, 2012.
- [17] J. C. Bonner, R. M. Silva, A. J. Taylor, J. M. Brown, S. C. Hilderbrand, V. Castranova, D. Porter, A. Elder, G. Oberdörster, J. R. Harkema, L. A. Bramble, T. J. Kavanagh, D. Botta, A. Nel, K. E. Pinkerton, "Interlaboratory evaluation of rodent pulmonary responses to engineered nanomaterials: The NIEHS nano GO consortium," *Environ. Health Perspect.*, 121(6), 676–682, 2013.
- [18] R. M. Silva, C. Teesy, L. Franzi, A. Weir, P. Westerhoff, J. E. Evans, K. E. Pinkerton, "Biological response to nano-scale titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>): Role of particle dose, shape, and retention," *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues*, 76(16), 953–972, 2013.
- [19] D. B. Warheit, T. R. Webb, V. L. Colvin, K. L. Reed, and C. M. Sayes, "Pulmonary Bioassay Studies with Nanoscale and Fine-Quartz Particles in Rats: Toxicity is Not Dependent upon Particle Size but on Surface Characteristics," *Toxicol. Sci.*, 95(1), 270–280, 2006.
- [20] D. B. Warheit, T. R. Webb, V. L. Colvin, K. L. Reed, and C. M. Sayes, "Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: Toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics," *Toxicol. Sci.*, 95(1), 270–280, 2007.
- [21] B. K. J. Leong, J. K. Coombs, C. P. Sabaitis, D. A. Rop, and C. S. Aaron, "Quantitative morphometric analysis of pulmonary deposition of aerosol particles inhaled via intratracheal nebulization, intratracheal instillation or nose-only inhalation in rats.," *J. Appl. Toxicol.*, 18(2), 149–60, 1998.

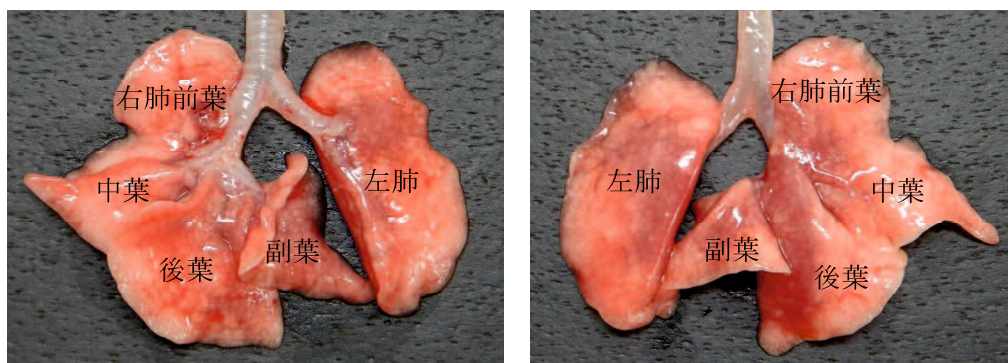
- [22] J. N. Pritchard, A. Holmes, J. C. Evans, N. Evans, R. J. Evans, and A. Morgan, "The distribution of dust in the rat lung following administration by inhalation and by single intratracheal instillation," *Environ. Res.*, 36(2), 268–297, 1985.
- [23] G. Zhang, N. Shinohara, H. Kano, H. Senoh, M. Suzuki, T. Sasaki, S. Fukushima, M. Gamo, "Quantitative evaluation of the pulmonary microdistribution of TiO<sub>2</sub> nanoparticles using X-ray fluorescence microscopy after intratracheal administration with a microsyringe in rats," *J. Appl. Toxicol.*, 35(6), 623–630, 2015.
- [24] T. Numano, H. Higuchi, T. Sugiyama, K. Uda, K. Ikeda, R. Ogawa, K. Sato, F. Banno, A. Nishioka, Y. Hagiwara, H. Fukui, T. Yoneda, H. Tsuda, "A 13-week subchronic toxicity study of VGCF<sup>®</sup>-H by intratracheal instillation in F344 rats," *The 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology*, P-103, 2020.
- [25] R. M. Molina, N. V. Konduru, H. Hirano, T. C. Donaghey, B. Adamo, B. Laurenzi, G. Pyrgiotakis, J. D. Brain, "Pulmonary distribution of nanocerium: comparison of intratracheal, microsyringe instillation and dry powder insufflation," *Inhal. Toxicol.*, 28(12), 550–560, 2016.
- [26] S. C. Gad, "Nickel and Nickel Compounds," in *Encyclopedia of Toxicology*, vol. 1989, Elsevier, 2014, pp. 506–510.
- [27] N. Shinohara, G. Zhang, Y. Oshima, T. Kobayashi, N. Imatanaka, M. Nakai, T. Sasaki, K. Kawaguchi, M. Gamo, "Kinetics and dissolution of intratracheally administered nickel oxide nanomaterials in rats," *Part. Fibre Toxicol.*, 14(1), 48, 2017.
- [28] S. Takahashi, M. Yamada, T. Kondo, H. Sato, K. Furuya, I. Tanaka, "Cytotoxicity of nickel oxide particles in rat alveolar macrophages cultured in vitro.," *J. Toxicol. Sci.*, 17(4), 243–251, 1992.
- [29] A. R. Oller, M. Costa, G. Oberdörster, "Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143(1), 152–166, 1997.
- [30] E. Wahlström, A. Ollerstam, L. Sundius, H. Zhang, "Use of Lung Weight as Biomarker for Assessment of Lung Toxicity in Rat Inhalation Studies," *Toxicol. Pathol.*, 41(6), 902–912, 2013.
- [31] J. K. Dunnick, M. R. Elwell, A. E. Radovsky, J. M. Benson, F. F. Hahn, K. J. Nikula, E. B. Barr, C. H. Hobbs, "Comparative carcinogenic effects of nickel subsulfide, nickel oxide, or nickel sulfate hexahydrate chronic exposures in the lung," *Cancer Res.*, 55(22), 5251–5256, 1995.
- [32] K. Donaldson, F. A. Murphy, R. Duffin, C. A. Poland, "Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review and the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma," *Part. Fibre Toxicol.*, 7(1), 5, 2010.

- [33] W. S. Cho, R. Duffin, C. A. Poland, A. Duschl, G. J. Oostingh, W. Macnee, M. Bradley, I. L. Megson, K. Donaldson, "Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo ; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs," *Nanotoxicology*, 6,(1), 22–35, 2012.
- [34] S. Lee, S. H. Hwang, J. Jeong, Y. Han, S. H. Kim, D. K. Lee, H. S. Lee, S. T. Chung, J. Jeong, C. Roh, Y. S. Huh, W. S. Cho, "Nickel oxide nanoparticles can recruit eosinophils in the lungs of rats by the direct release of intracellular eotaxin," *Part. Fibre Toxicol.*, 13(1), 1–11, 2016.
- [35] Y. Tada, N. Yano, H. Takahashi, K. Yuzawa, H. Ando, Y. Kubo, A. Nagasawa, A. Ogata, D. Nakae, "Acute Phase Pulmonary Responses to a Single Intratracheal Spray Instillation of Magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanoparticles in Fischer 344 Rats," *J. Toxicol. Pathol.*, 25(4), 233–239, 2012.
- [36] Y. Umeda, T. Kasai, M. Saito, H. Kondo, T. Toya, S. Aiso, H. Okuda, T. Nishizawa, S. Fukushima, "Two-week Toxicity of Multi-walled Carbon Nanotubes by Whole-body Inhalation Exposure in Rats," *J. Toxicol. Pathol.*, 26(2), 131–140, 2013.
- [37] R. G. Pickering, C. E. Pickering, "The effects of reduced dietary intake upon the body and organ weights, and some clinical chemistry and haematological variates of the young wistar rat," *Toxicol. Lett.*, 21(3), 271–277, 1984.
- [38] S. Levin, D. Semler, Z. Ruben, "Effects of Two Weeks of Feed Restriction on Some Common Toxicologic Parameters in Sprague-Dawley Rats," *Toxicol. Pathol.*, 21(1), 1–14, 1993.
- [39] T. Moriyama, S. Tsujioka, T. Ohira, S. Nonaka, H. Ikeda, H. Sugiura, M. Tomohiro, K. Samura, M. Nishikibe, "Effects of reduced food intake on toxicity study parameters in rats," *J. Toxicol. Sci.*, 33(5), 537–547, 2008.
- [40] S. G. Ruginsk, A. Lopes da Silva, R. R. Ventura, L. L. K. Elias, J. Antunes-Rodrigues, "Central actions of glucocorticoids in the control of body fluid homeostasis: Review," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 42(1), 61–67, 2009.
- [41] National Toxicology Program, "NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nickel Sulfate Hexahydrate (CAS No. 10101-97-0) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies).," *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.*, vol. 454, no. 96–3370, pp. 1–380, Jul. 1996.
- [42] National Toxicology Program, "NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nickel Subsulfide (CAS No. 12035-72-2) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies).," *Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser.*, vol. 453, no. 38, pp. 1–365, Jul. 1996.

- [43] National Toxicology Program, "NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Nickel Oxide (CAS No. 1313-99-1) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies).," Natl. Toxicol. Program Tech. Rep. Ser., vol. 451, no. 451, pp. 1–381, Jul. 1996.
- [44] É. Obone, S. K. Chakrabarti, C. Bai, M. A. Malick, L. Lamontagne, K. S. Subramanian, "Toxicity and bioaccumulation of nickel sulfate in sprague-dawley rats following 13 weeks of subchronic exposure," *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A*, 57(6), 379-401, 1999.
- [45] R. E. G. Rendall, J. I. Phillips, K. A. Renton, "Death following exposure to fine particulate nickel from a metal arc process," *Ann. Occup. Hyg.*, 38(6), 921–930, 1994.



付図・付表



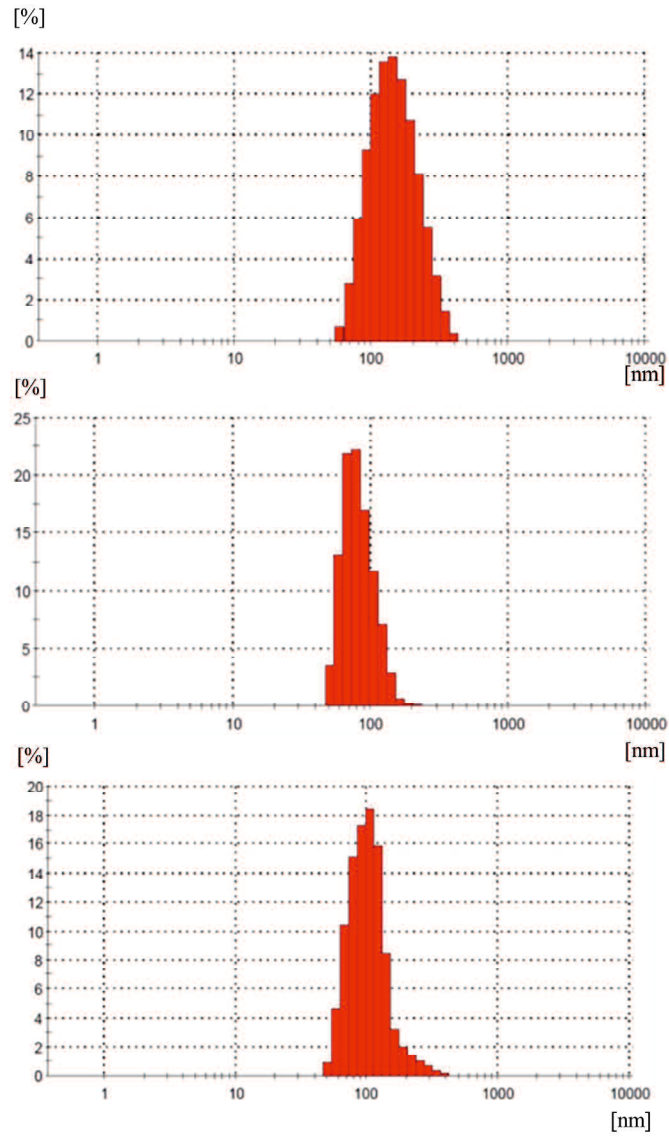
図I-1 ラットの肺の分葉（左：腹側面、右：背側面）

表I-1 P25の物理化学的特性（製造元情報）

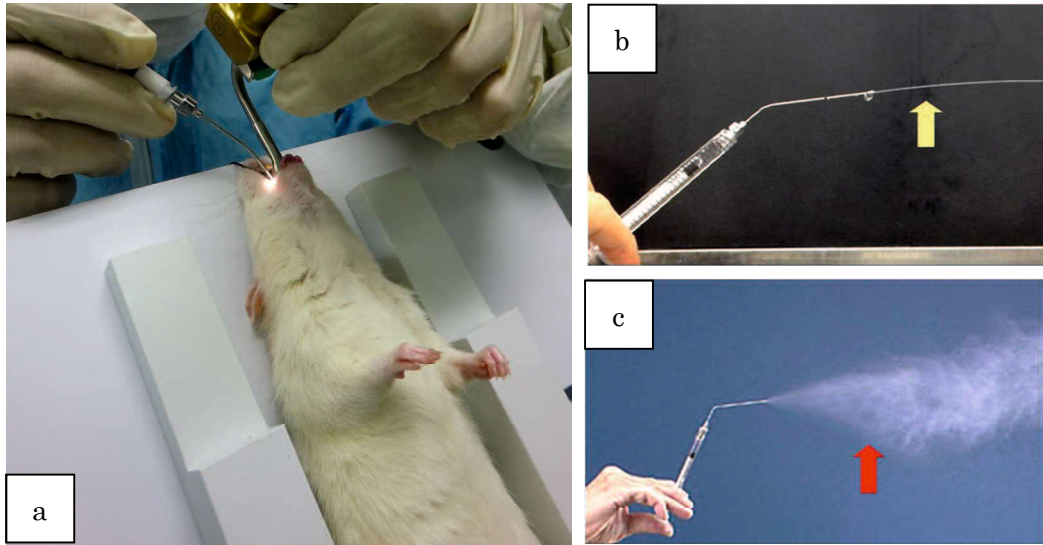
項目	特性
結晶構造	ルチル型：アナターゼ型=20：80
形状	球形
比表面積	50 ± 15 m <sup>2</sup> /g
表面改質	無し

表I-2 投与液の実測濃度及び二次粒子

設定濃度 [mg/mL]	6.0	3.0	1.5	1.0
実測濃度 [mg/mL]	5.96	2.99	1.50	0.96
二次粒子径（z 平均） [nm]	134.5	134.5	134.2	136.7



図I-2 P25分散液（6 mg/mL）の粒度分布  
 上：体積分布、中：個数分布、下：散乱強度分布



図I-3 気管内投与

a : 気管内投与時の様子。b : 経口ゾンデによる注入時の液の様子。

c : スプレーゾンデによる噴霧時の様子 (MicroSprayer Aerosolizer<sup>®</sup>、Penn-Century) 。

表I-3 炎症反応解析における試験群構成

	P25 液濃度	投与液量	動物数
経口ゾンデ使用群			
媒体 対照群	-	0.5 mL/kg	5
	-	1.0 mL/kg	5
	-	2.0 mL/kg	5
	-	3.0 mL/kg	5
P25 投与群	6.0 mg/mL	0.5 mL/kg	5
	3.0 mg/mL	1.0 mL/kg	5
	1.5 mg/mL	2.0 mL/kg	5
	1.0 mg/mL	3.0 mL/kg	5
スプレーゾンデ使用群			
媒体 対照群	-	0.5 mL/kg	5
	-	1.0 mL/kg	5
	-	2.0 mL/kg	5
P25 投与群	6.0 mg/mL	0.5 mL/kg	5
	3.0 mg/mL	1.0 mL/kg	5
	1.5 mg/mL	2.0 mL/kg	5

表I-4 肺内沈着量及び分散性解析における試験群構成

	P25 液濃度	投与液量	動物数
経口ゾンデ使用群			
P25 投与群	6.0 mg/mL	0.5 mL/	10
	3.0 mg/mL	1.0 mL/kg	10
	1.5 mg/mL	2.0 mL/kg	10
	1.0 mg/mL	3.0 mL/kg	10
スプレーゾンデ使用群			
P25 投与群	6.0 mg/mL	0.5 mL/kg	10
	3.0 mg/mL	1.0 mL/kg	10
	1.5 mg/mL	2.0 mL/kg	

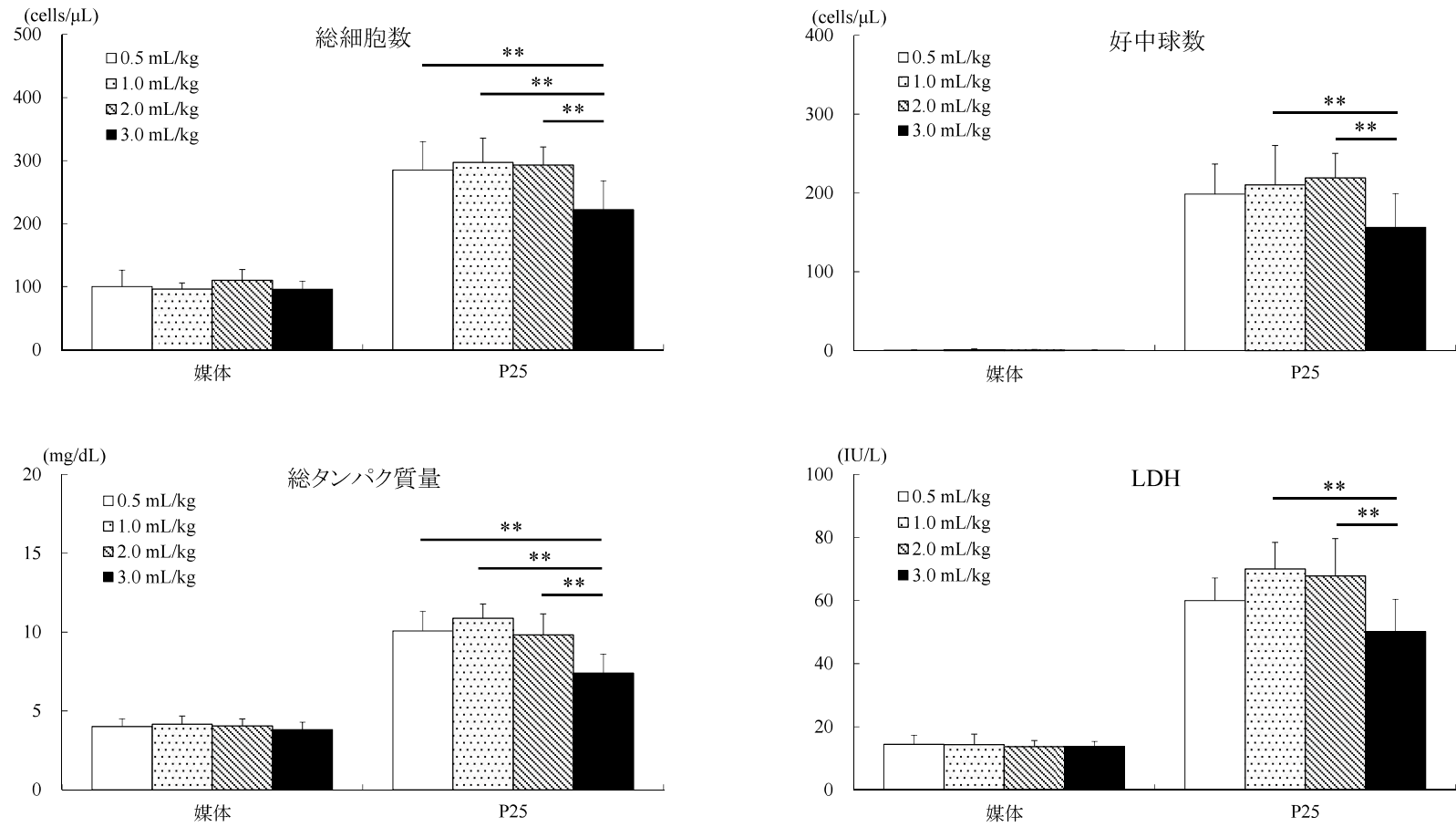
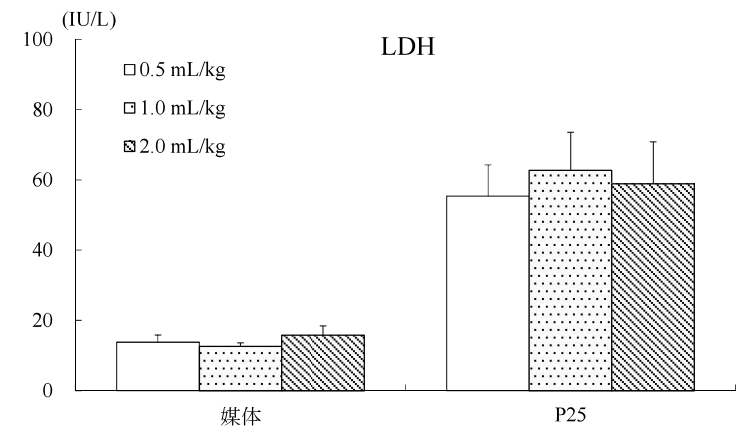
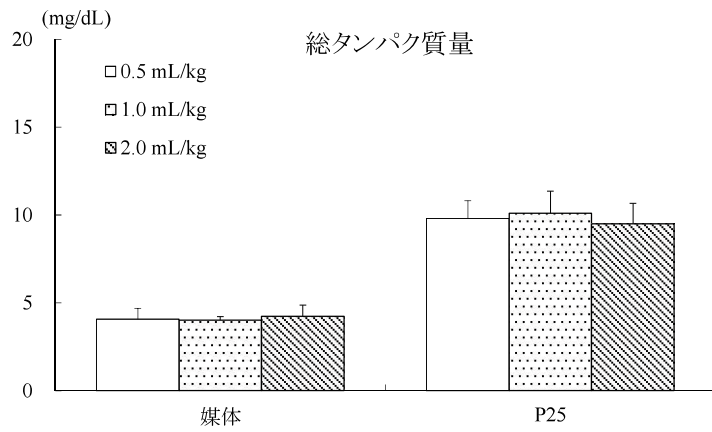
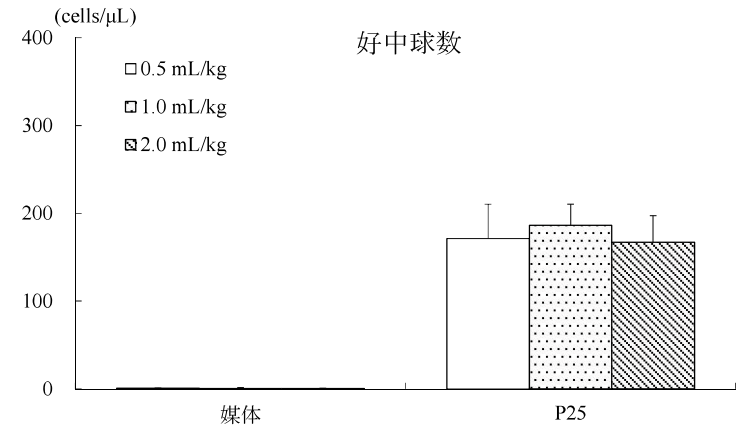
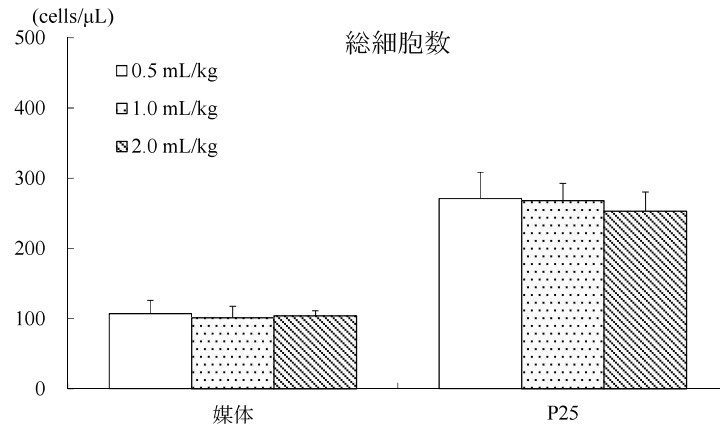


図 I-4 投与液量の違いによる BALF 中炎症関連項目の比較 (経口ゾンデ使用時)

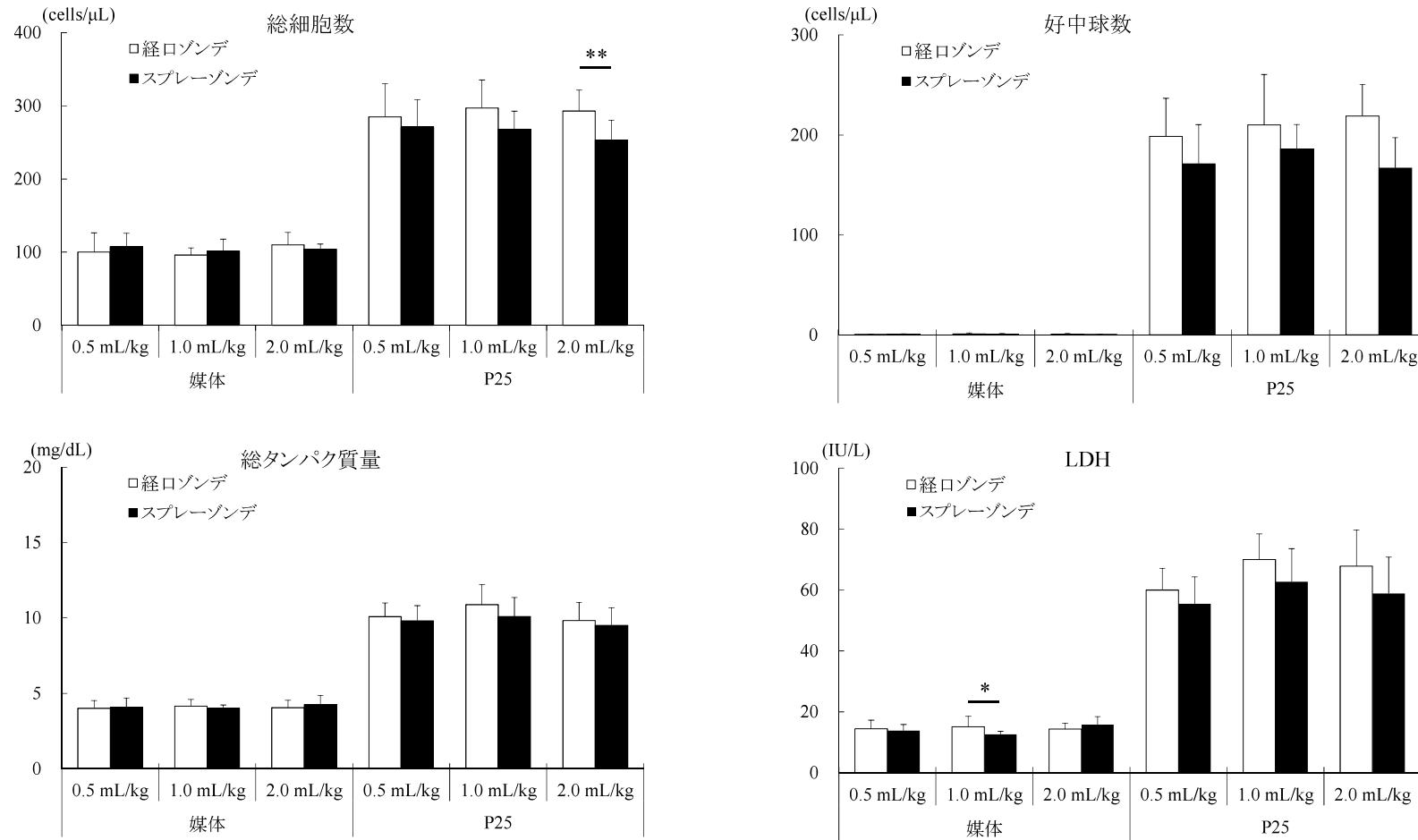
Bar : 標準偏差. \*\*:  $P < 0.01$



図I-5 投与液量の違いによるBALF中炎症関連項目の比較 (スプレーゾンデ使用時)

Bar : 標準偏差。





図I-6 投与器具の違いによるBALF中炎症関連項目の比較

Bar:標準偏差。\*:  $P < 0.01$

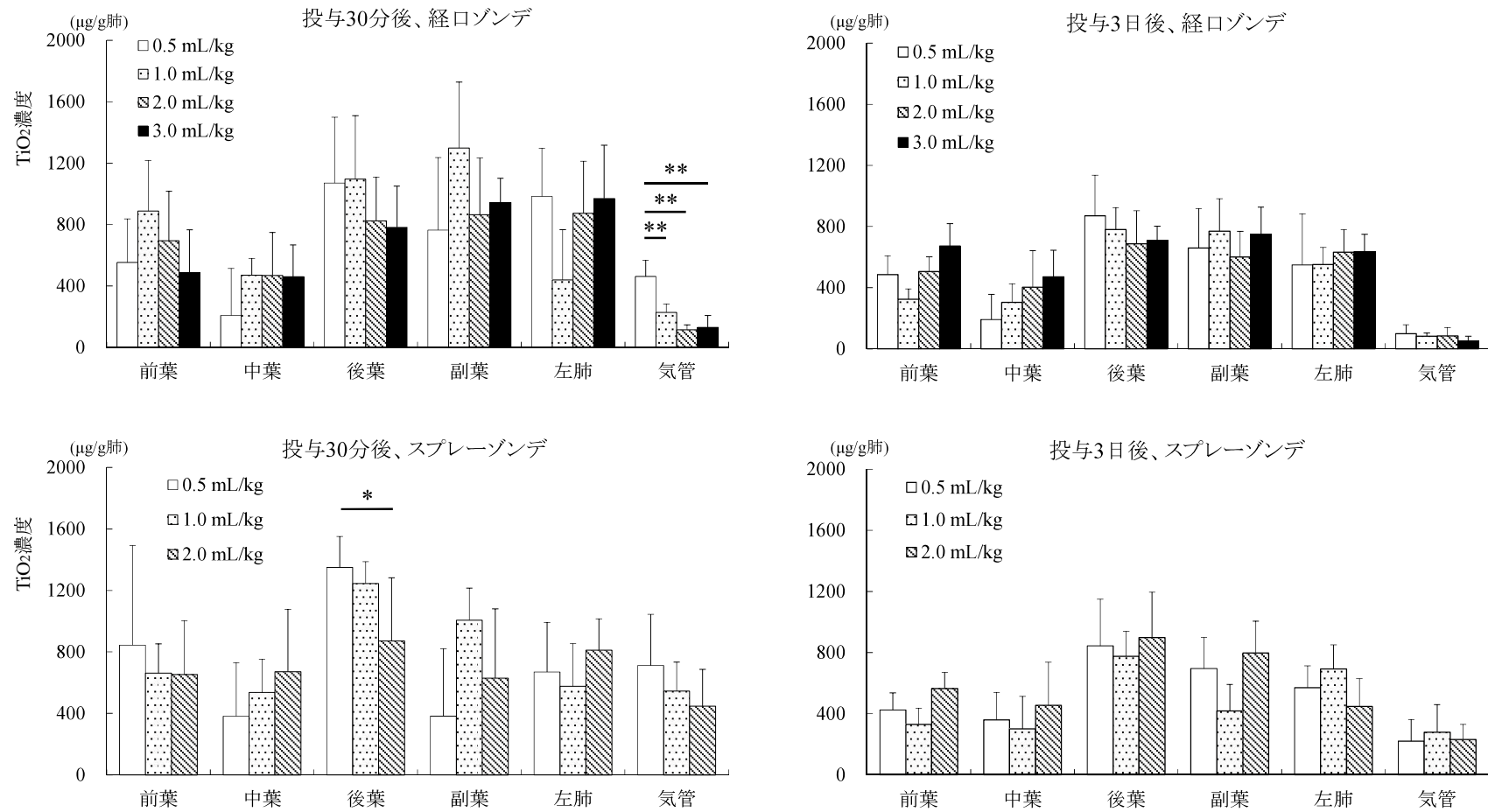
表I-5 総TiO<sub>2</sub>沈着量及び沈着率

投与 30 分後							
投与器具	経口ゾンデ				スプレーゾンデ		
投与液量 (mL/kg)	0.5	1.0	2.0	3.0	0.5	1.0	2.0
動物数	5	5	5	5	5	5	5
沈着量 (μg)	783.7 ±45.7	683.1 ±25.7	688.4 ±53.5	735.1 ±46.0	771.0 ±84.2	753.5 ±36.4	691.0 ±111.7
沈着率 (%)	104 ±7.3	92.0 ±2.6	93.4 ±7.3	98.2 ±6.9	103 ±13.6	101 ±3.5	92.1 ±13.3
投与 3 日後							
投与器具	経口ゾンデ				スプレーゾンデ		
投与液量 (mL/kg)	0.5	1.0	2.0	3.0	0.5	1.0	2.0
動物数	4*	4*	5	5	5	5	5
沈着量 (μg)	584.6 ±29.9	532.2 ±32.2	547.9 ±44.1	578.7 ±27.9	582.9 ±37.9	569.1 ±11.2	598.2 ±46.0
沈着率 (%)	78.5 ±1.8	71.4 ±4.7	73.6 ±4.7	78.3 ±2.9	78.0 ±6.6	75.4 ±2.4	79.4 ±2.8

平均 ± 標準偏差

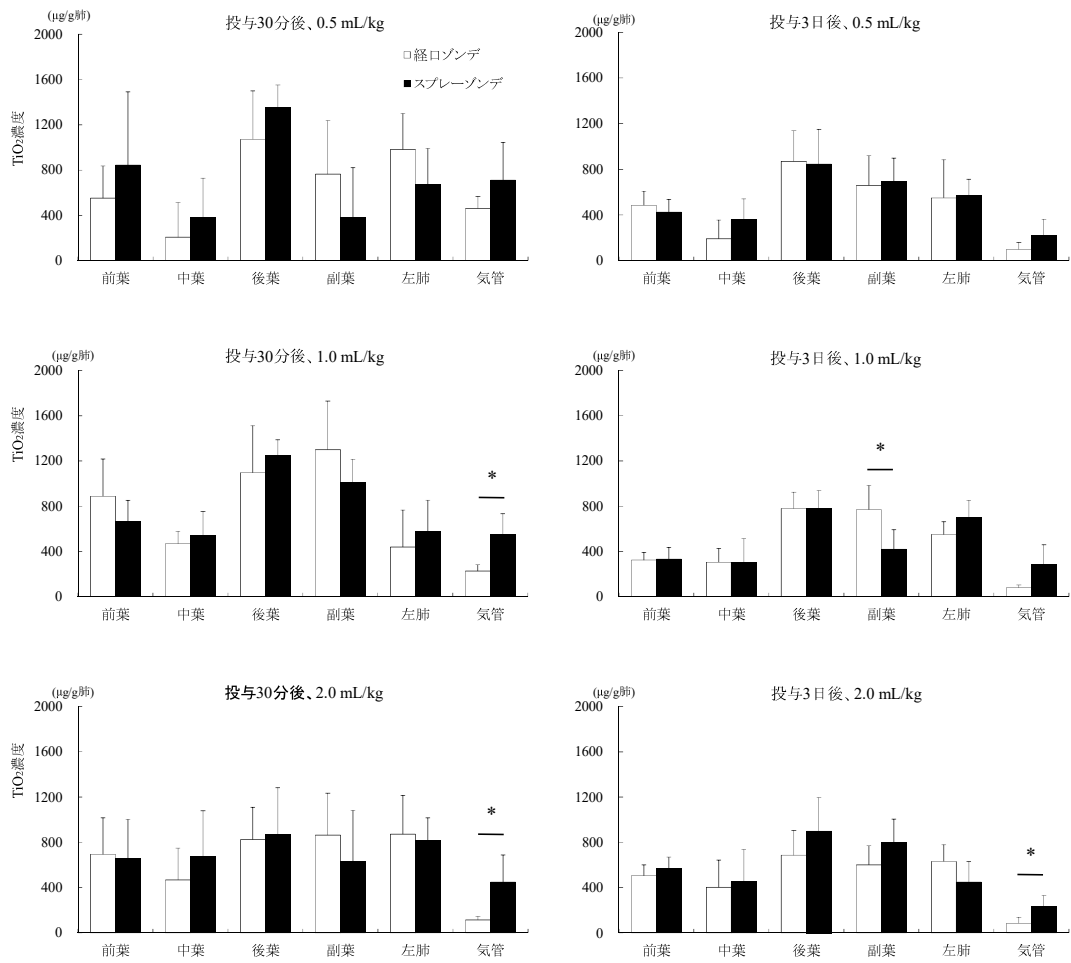
沈着率：(沈着量/設定投与量) × 100

\*: 測定機器の異常により各 1 サンプルが測定できなかった。



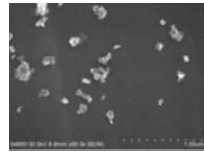
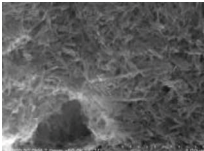
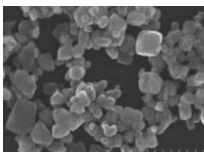
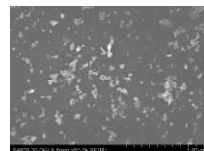
図I-7 投与30分後及び3日後の各投与液量における各肺葉及び気管のTiO<sub>2</sub>濃度の比較

Bar:標準偏差。\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$ 。



図I-8 投与30分後及び3日後の各投与器具における各肺葉及び気管のTiO<sub>2</sub>濃度の比較  
 Bar : 標準偏差。\*:  $P < 0.05$ 。

表II-1 酸化ニッケルの物理化学的特性及び投与液中の分散状態

名称	外観	一次粒子径 <sup>a</sup>	形状	SEM 像	比表面積 <sup>b</sup>	二次粒子径 <sup>c</sup>
US3352 (NiO A)	黒色粉末	20 ± 8 nm	球状		51 m <sup>2</sup> /g	49 nm
NovaWireNi01 (NiO B)	黒色粉末	繊維長 : 240 nm 繊維径 : 29 nm	繊維状		180 m <sup>2</sup> /g	計測不可
I 小粒径 (NiO C)	暗緑色粉末	140 ± 67 nm	不定形		6.6 m <sup>2</sup> /g	1600 nm
637130 (NiO D)	黒色粉末	< 50 nm <sup>d</sup>	球状		93 m <sup>2</sup> /g	39 nm

a : SEM 像より 500 個の粒子を計測して算出

b : ガス吸着法により算出

c : 数平均 (DLS により測定)

d : SEM 像から計測できなかったため、製造元規格を表示

表II-2 模擬間質液の組成

化合物名	最終濃度 (mg/mL)
塩化マグネシウム六水和物	0.20
塩化ナトリウム	6.0
塩化カリウム	0.30
リン酸水素ナトリウム	0.14
硫酸ナトリウム	0.071
塩化カルシウム二水和物	0.37
酢酸ナトリウム三水和物	0.95
重炭酸ナトリウム	2.6
クエン酸ナトリウム二水和物	0.097

各試薬を溶解後、塩酸を用いてpHを7.4に調整した。

表II-3 模擬リソソーム液の組成

化合物名	最終濃度 (mg/mL)
塩化ナトリウム	3.2
水酸化ナトリウム	6.0
クエン酸	21
塩化カルシウム	0.10
リン酸水素ナトリウム七水和物	0.18
硫酸ナトリウム	0.039
塩化マグネシウム六水和物	0.11
グリセリン	0.059
クエン酸ナトリウム	0.077
酒石酸ナトリウム二水和物	0.090
乳酸ナトリウム	0.17
ピルビン酸ナトリウム	0.086
ホルムアルデヒド	2.8

表II-4 216時間混和後のNiOの溶解度 (%)

名 称	模擬リソソーム液
NiO A	11
NiO B	100
NiO C	0.7
NiO D	33

表II-5 血液学的検査項目

項 目	方 法
赤血球数 (RBC)	シーフローDC 検出法
ヘモグロビン濃度 (Hb)	SLS ヘモグロビン法
ヘマトクリット値 (Ht)	シーフローDC 検出法
平均赤血球容積 (MCV)	$\frac{Ht}{RBC} \times 10^3$
平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)	$\frac{Hb}{RBC} \times 10^3$
平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)	$\frac{Hb}{Ht} \times 10^2$
血小板数 (PLT)	シーフローDC 検出法
網状赤血球数比率 (RC)	フローサイトメトリー法
白血球数 (WBC)	フローサイトメトリー法
白血球百分率 (Differentiation of leukocyte) 好中球 (Neutro) 、 リンパ球 (Lymph) 好酸球 (Eosino) 、 好塩基球 (Baso) 単球 (Mono) 、 大型非染性リンパ球 (LUC)	フローサイトメトリー法



表II-6 血液生化学的検査項目

項目	方法	機器
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)	UV 法 JSCC 標準化対応法	A
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)	UV 法 JSCC 標準化対応法	
アルカリ性フォスファターゼ (ALP)	p-Nitrophenyl phosphate 法	
γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT)	L-γ-glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilide 法	
総コレステロール (TC)	COD・ESPAS 法	
トリグリセリド (TG)	GPO・ESPAS グリセロール消去法	
尿素窒素 (BUN)	Urease・GIDH 法	
クレアチニン (Cre)	Creatininase・HMMPS 法	
総蛋白 (TP)	Biuret 法	
アルブミン (Alb)	Bromocresol green 法	
A/G 比 (A/G ratio)	$\frac{\text{Albumin}}{\text{T-Protein} - \text{Albumin}}$	—
血糖 (Glu)	Hexokinase・G-6-PDH 法	A
総ビリルビン (TB)	酵素法	
無機リン (IP)	Fiske-Subbarow 法	
カルシウム (Ca)	OCPC 法	B
ナトリウム (Na)	Crown-Ether 膜電極法	
カリウム (K)	Crown-Ether 膜電極法	
塩素 (Cl)	MO 膜法	

使用機器 A : 生化学自動分析装置7170形 (日立製作所)

B : 電解質分析装置PVA-EX II (A&T)

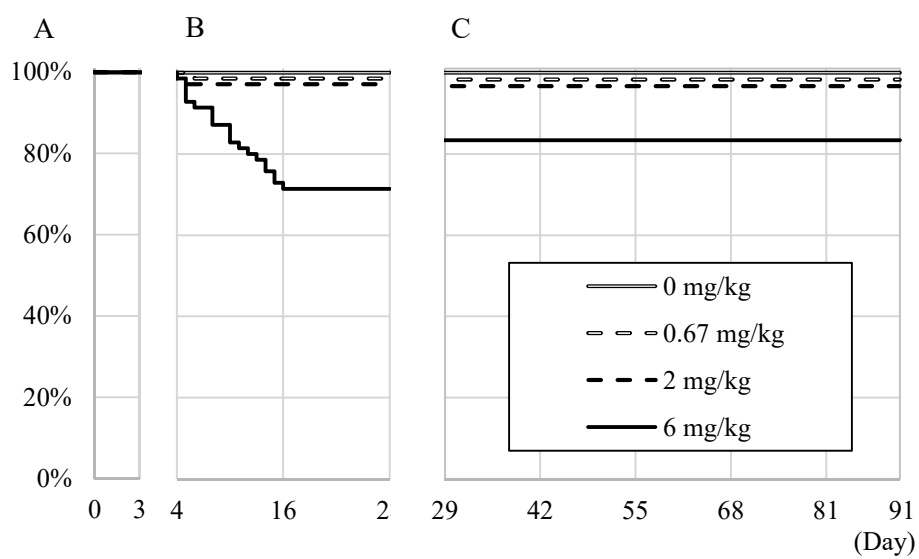
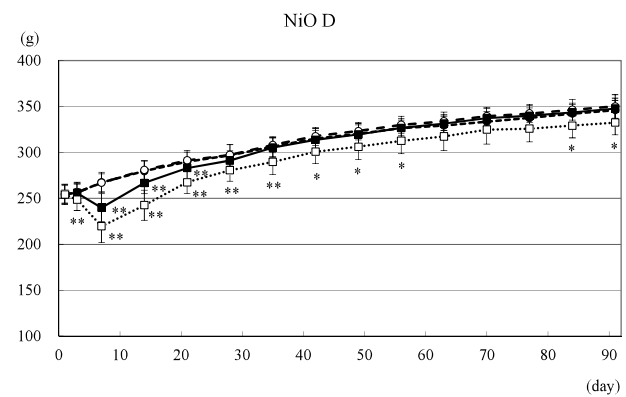
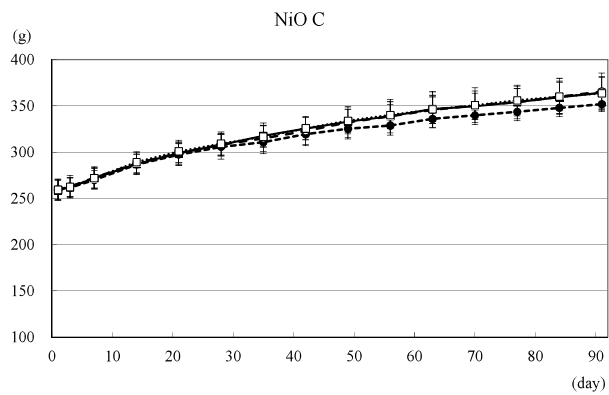
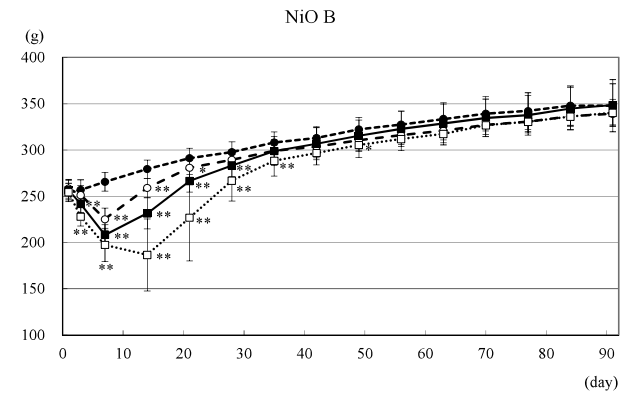
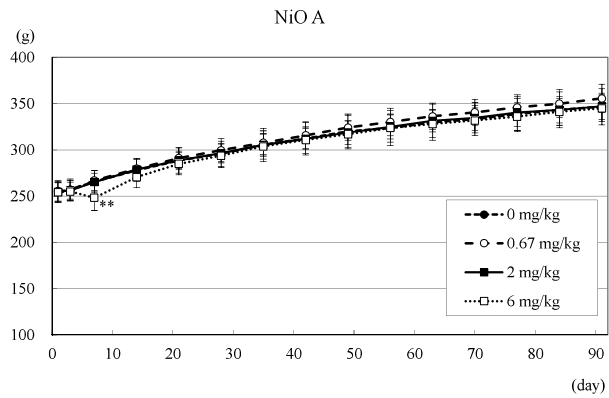


図 II-1 NiO B 投与群の生存率

A (投与日～投与 3 日後) : N=80、B (投与 4～28 日後) : N=70、

C (投与 29～91 日後) : N=60。



図II-2 NiO投与後の体重変動（生存例）

[NiO A、NiO C及びNiO D] 投与日～投与3日後：N=30、投与4～28日後：N=20、投与29～91日後：N=10。

[NiO B] 投与日～投与3日後：N=80、投与4～28日後：N=70、投与29～91日後：N=60。

Bar：標準偏差。\*： $P < 0.05$ 、\*\*： $P < 0.01$ （媒体対照群との比較）

表 II-7-1 NiO A 投与 3 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	886.8± 12.7	894.0 ± 21.9	886.4 ± 17.9	913.6 ± 26.3
Hb (g/dL)	14.92 ± 0.16	14.92 ± 0.30	14.88 ± 0.31	15.40 ± 0.44
Ht (%)	44.72 ± 0.37	44.72 ± 0.86	44.34 ± 0.85	46.12 ± 1.18
MCV (fL)	50.40 ± 0.34	50.02 ± 0.39	50.00 ± 0.39	50.50 ± 0.29
MCH (pg)	16.84 ± 0.15	16.72 ± 0.25	16.76 ± 0.09	16.84 ± 0.09
MCHC (g/dL)	33.38 ± 0.31	33.38 ± 0.38	33.56 ± 0.27	33.34 ± 0.11
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	78.62 ± 4.18	78.96 ± 4.12	79.96 ± 5.26	79.24 ± 2.39
RC (%)	2.40 ± 0.26	2.04 ± 0.21*	2.30 ± 0.14	2.18 ± 0.16
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	52.94 ± 3.31	50.04 ± 4.29	48.88 ± 8.13	46.56 ± 4.08
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	22.40 ± 3.92	23.96 ± 4.46	24.86 ± 3.85	26.66 ± 1.79
Lymph (%)	73.70 ± 3.97	71.70 ± 4.97	71.26 ± 4.12	70.00 ± 1.81
Eosino (%)	1.06 ± 0.13	1.42 ± 0.37	1.18 ± 0.26	0.92 ± 0.18
Baso (%)	0.42 ± 0.11	0.32 ± 0.08	0.30 ± 0.12	0.30 ± 0.07
Mono (%)	1.60 ± 0.25	1.54 ± 0.48	1.56 ± 0.35	1.28 ± 0.13
LUC (%)	0.82 ± 0.22	1.08 ± 0.15	0.84 ± 0.36	0.82 ± 0.15

RBC : 赤血球数、Hb : ヘモグロビン濃度、Ht : ヘマトクリット値、MCV : 平均赤血球容積、MCH : 平均赤血球ヘモグロビン量、MCHC : 平均赤血球ヘモグロビン濃度、PLT : 血小板数、RC : 網状赤血球数比率、WBC : 白血球数、Differentiation of leukocyte : 白血球百分率、Neutro : 好中球、Lymph : リンパ球、Eosino : 好酸球、Baso : 好塩基球、Mono : 単球、LUC : 大型非染色性リンパ球 [以降、表 II-7-2~12 まで同一表記を示す]。

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、 \*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-7-2 NiO A 投与 28 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	897.2 ± 18.9	888.6 ± 14.8	867.4 ± 34.6	887.6 ± 7.8
Hb (g/dL)	14.70 ± 0.40	14.58 ± 0.19	14.32 ± 0.52	14.56 ± 0.18
Ht (%)	43.58 ± 1.23	43.10 ± 0.75	42.20 ± 1.44	43.04 ± 0.30
MCV (fL)	48.56 ± 0.55	48.50 ± 0.48	48.66 ± 0.60	48.48 ± 0.24
MCH (pg)	16.40 ± 0.22	16.42 ± 0.08	16.52 ± 0.16	16.38 ± 0.11
MCHC (g/dL)	33.76 ± 0.32	33.82 ± 0.23	33.98 ± 0.19	33.82 ± 0.28
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	75.00 ± 3.22	75.36 ± 2.11	74.86 ± 2.95	71.38 ± 3.75
RC (%)	2.34 ± 0.23	2.20 ± 0.12	2.14 ± 0.30	2.22 ± 0.18
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	61.48 ± 4.64	55.64 ± 5.39	62.92 ± 8.31	61.86 ± 5.90
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	22.30 ± 4.07	28.46 ± 4.70	29.74 ± 4.28*	27.68 ± 3.39
Lymph (%)	73.16 ± 4.34	67.22 ± 4.51	65.92 ± 3.89*	68.72 ± 3.33
Eosino (%)	1.24 ± 0.17	1.36 ± 0.17	1.30 ± 0.10	0.94 ± 0.15*
Baso (%)	0.22 ± 0.08	0.24 ± 0.11	0.26 ± 0.09	0.24 ± 0.09
Mono (%)	1.90 ± 0.23	1.68 ± 0.13	1.54 ± 0.27*	1.50 ± 0.19*
LUC (%)	1.22 ± 0.16	1.02 ± 0.22	1.24 ± 0.35	0.90 ± 0.12

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-7-3 NiO A 投与 91 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	916.2 ± 21.8	898.4 ± 8.4	913.0 ± 22.2	915.6 ± 12.8
Hb (g/dL)	14.90 ± 0.17	14.58 ± 0.23	14.82 ± 0.28	14.92 ± 0.26
Ht (%)	44.24 ± 0.68	43.10 ± 0.50	44.00 ± 0.81	44.04 ± 0.76
MCV (fL)	48.30 ± 0.58	47.98 ± 0.61	48.20 ± 0.60	48.10 ± 0.27
MCH (pg)	16.24 ± 0.23	16.22 ± 0.22	16.24 ± 0.15	16.30 ± 0.16
MCHC (g/dL)	33.66 ± 0.40	33.80 ± 0.23	33.70 ± 0.25	33.90 ± 0.19
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	76.14 ± 4.35	76.48 ± 2.57	80.96 ± 2.35	74.80 ± 3.05
RC (%)	2.22 ± 0.23	2.06 ± 0.21	2.18 ± 0.29	2.08 ± 0.19
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	58.20 ± 6.42	52.64 ± 4.86	56.58 ± 4.95	59.76 ± 3.41
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	35.76 ± 6.02	31.60 ± 2.38	39.38 ± 5.31	36.86 ± 3.52
Lymph (%)	59.60 ± 6.31	63.92 ± 2.72	56.02 ± 5.23	58.10 ± 3.96
Eosino (%)	1.16 ± 0.05	1.44 ± 0.36	1.22 ± 0.16	1.62 ± 0.73
Baso (%)	0.46 ± 0.09	0.42 ± 0.11	0.32 ± 0.11	0.36 ± 0.09
Mono (%)	2.08 ± 0.44	1.68 ± 0.36	2.14 ± 0.32	2.02 ± 0.30
LUC (%)	0.94 ± 0.25	0.88 ± 0.16	0.94 ± 0.13	1.00 ± 0.33

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-7-4 NiO B 投与 3 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	942.2 ± 11.4	997.2 ± 34.5*	1062.8 ± 24.3**	1110.2 ± 29.5**
Hb (g/dL)	15.76 ± 0.23	16.52 ± 0.57*	17.70 ± 0.38**	18.48 ± 0.52**
Ht (%)	46.58 ± 0.86	48.58 ± 1.52	51.58 ± 1.31**	53.46 ± 1.43**
MCV (fL)	49.44 ± 0.55	48.74 ± 0.48	48.52 ± 0.28*	48.18 ± 0.39**
MCH (pg)	16.74 ± 0.18	16.56 ± 0.05	16.66 ± 0.11	16.64 ± 0.09
MCHC (g/dL)	33.84 ± 0.21	33.98 ± 0.29	34.36 ± 0.21*	34.52 ± 0.29**
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	80.72 ± 3.40	89.86 ± 2.53*	96.14 ± 6.58**	98.32 ± 5.70**
RC (%)	1.82 ± 0.19	2.08 ± 0.23	1.72 ± 0.16	1.36 ± 0.19**
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	55.00 ± 5.71	36.78 ± 7.07**	39.58 ± 0.90*	41.74 ± 3.69
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	24.36 ± 1.65	36.74 ± 7.19*	50.48 ± 7.16**	65.94 ± 5.33**
Lymph (%)	70.28 ± 1.50	57.82 ± 7.09**	43.38 ± 6.77**	28.14 ± 4.94**
Eosino (%)	1.44 ± 0.34	1.66 ± 0.85	1.18 ± 0.50	0.74 ± 0.09
Baso (%)	0.76 ± 0.15	0.54 ± 0.11	0.74 ± 0.27	0.78 ± 0.22
Mono (%)	2.08 ± 0.13	2.16 ± 0.53	2.86 ± 0.57*	3.16 ± 0.44**
LUC (%)	1.10 ± 0.21	1.06 ± 0.23	1.34 ± 0.38	1.22 ± 0.26

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、 \*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-7-5 NiO B 投与 28 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	4
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	902.4 ± 12.6	880.6 ± 15.6	882.6 ± 23.4	904.3 ± 26.3
Hb (g/dL)	15.06 ± 0.22	14.80 ± 0.25	14.88 ± 0.40	14.95 ± 0.33
Ht (%)	43.70 ± 0.70	42.76 ± 0.86	43.22 ± 1.13	44.15 ± 1.17
MCV (fL)	48.38 ± 0.26	48.56 ± 0.21	48.94 ± 0.29*	48.83 ± 0.36
MCH (pg)	16.66 ± 0.11	16.78 ± 0.13	16.88 ± 0.23	16.55 ± 0.37
MCHC (g/dL)	34.44 ± 0.21	34.56 ± 0.28	34.46 ± 0.32	33.90 ± 0.48
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	76.58 ± 2.03	78.94 ± 4.67	80.78 ± 2.72	71.75 ± 3.33
RC (%)	2.40 ± 0.23	2.80 ± 0.12	3.16 ± 0.15**	2.10 ± 1.16
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	56.36 ± 6.39	51.82 ± 3.79	56.24 ± 6.45	59.48 ± 12.44
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	26.24 ± 4.27	36.86 ± 8.51	33.66 ± 4.85	42.08 ± 11.96*
Lymph (%)	69.48 ± 4.77	58.92 ± 9.08	62.10 ± 5.08	53.23 ± 12.04*
Eosino (%)	1.28 ± 0.19	1.24 ± 0.21	1.50 ± 0.37	1.70 ± 0.39
Baso (%)	0.46 ± 0.15	0.30 ± 0.14	0.38 ± 0.18	0.45 ± 0.21
Mono (%)	1.50 ± 0.16	1.60 ± 0.14	1.40 ± 0.22	1.68 ± 0.15
LUC (%)	1.02 ± 0.28	1.08 ± 0.81	0.96 ± 0.37	0.88 ± 0.32

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)



表 II-7-6 NiO B 投与 91 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	4
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	903.8 ± 21.4	872.6 ± 18.9	904.6 ± 13.7	907.3 ± 29.5
Hb (g/dL)	14.98 ± 0.18	14.68 ± 0.23	14.82 ± 0.40	14.78 ± 0.53
Ht (%)	44.34 ± 0.81	43.06 ± 0.50	43.88 ± 0.79	44.13 ± 1.75
MCV (fL)	49.08 ± 0.30	49.34 ± 1.04	48.52 ± 0.48	48.65 ± 0.66
MCH (pg)	16.56 ± 0.25	16.78 ± 0.33	16.36 ± 0.27	16.30 ± 0.29
MCHC (g/dL)	33.76 ± 0.40	34.02 ± 0.18	33.76 ± 0.30	33.50 ± 0.29
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	72.36 ± 5.22	69.66 ± 2.41	74.42 ± 2.20	74.83 ± 5.16
RC (%)	1.92 ± 0.70	2.22 ± 0.15	2.30 ± 0.17	2.18 ± 0.40
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	55.42 ± 10.51	49.44 ± 6.91	51.00 ± 3.61	44.03 ± 6.13
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	37.36 ± 4.76	35.22 ± 6.53	34.78 ± 6.00	39.80 ± 5.17
Lymph (%)	57.96 ± 4.83	60.42 ± 6.67	60.88 ± 5.61	56.30 ± 4.52
Eosino (%)	1.42 ± 0.18	1.46 ± 0.27	1.14 ± 0.15	1.08 ± 0.34
Baso (%)	0.34 ± 0.17	0.28 ± 0.08	0.36 ± 0.17	0.38 ± 0.10
Mono (%)	1.70 ± 0.16	1.36 ± 0.36	1.72 ± 0.25	1.63 ± 0.13
LUC (%)	1.20 ± 0.14	1.26 ± 0.18	1.12 ± 0.29	0.83 ± 0.39

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-7-7 NiO C 投与 3 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	896.4 ± 15.2	866.6 ± 25.9*	874.4 ± 14.9	868.2 ± 10.2
Hb (g/dL)	15.28 ± 0.23	14.82 ± 0.38*	14.96 ± 0.29	14.94 ± 0.17
Ht (%)	43.92 ± 0.79	42.78 ± 1.11	42.96 ± 0.77	42.88 ± 0.25
MCV (fL)	49.02 ± 0.38	49.38 ± 0.47	49.12 ± 0.16	49.44 ± 0.33
MCH (pg)	17.04 ± 0.05	17.12 ± 0.13	17.12 ± 0.13	17.20 ± 0.07
MCHC (g/dL)	34.78 ± 0.13	34.62 ± 0.19	34.84 ± 0.26	34.82 ± 0.16
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	69.36 ± 4.10	69.92 ± 4.14	69.50 ± 2.41	71.46 ± 2.58
RC (%)	1.94 ± 0.17	2.10 ± 0.19	1.98 ± 0.31	2.08 ± 0.16
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	48.38 ± 9.39	54.76 ± 8.51	51.18 ± 6.68	49.22 ± 4.29
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	27.16 ± 4.86	23.88 ± 1.69	22.24 ± 2.91	24.12 ± 2.64
Lymph (%)	66.58 ± 6.08	71.84 ± 2.12	73.02 ± 4.53	71.78 ± 2.63
Eosino (%)	1.28 ± 0.15	1.20 ± 0.12	1.18 ± 0.20	1.14 ± 0.21
Baso (%)	0.58 ± 0.15	0.56 ± 0.17	0.42 ± 0.19	0.56 ± 0.15
Mono (%)	1.84 ± 0.17	1.36 ± 0.22*	1.32 ± 0.40*	1.26 ± 0.29*
LUC (%)	2.52 ± 1.21	1.10 ± 0.25*	1.80 ± 1.19	1.10 ± 0.12*

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-7-8 NiO C 投与 28 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	880.6 ± 21.5	880.6 ± 20.1	869.4 ± 21.9	857.2 ± 15.0
Hb (g/dL)	15.36 ± 0.19	15.12 ± 0.45	15.02 ± 0.28	14.80 ± 0.22*
Ht (%)	42.92 ± 1.14	42.68 ± 0.97	42.12 ± 0.79	41.54 ± 0.50
MCV (fL)	48.70 ± 0.31	48.48 ± 0.19	48.46 ± 0.41	48.44 ± 0.34
MCH (pg)	17.46 ± 0.23	17.16 ± 0.15*	17.30 ± 0.19	17.28 ± 0.11
MCHC (g/dL)	35.86 ± 0.54	35.42 ± 0.33	35.68 ± 0.19	35.62 ± 0.27
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	67.52 ± 1.96	73.02 ± 1.92*	69.98 ± 2.88	71.06 ± 4.24
RC (%)	2.30 ± 0.25	2.38 ± 0.34	2.40 ± 0.16	2.34 ± 0.19
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	60.44 ± 4.08	68.28 ± 11.93	57.54 ± 6.04	57.30 ± 4.36
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	31.32 ± 6.13	30.82 ± 3.82	25.66 ± 4.16	30.42 ± 3.25
Lymph (%)	64.22 ± 5.91	65.06 ± 4.02	70.40 ± 4.31	65.88 ± 3.56
Eosino (%)	1.20 ± 0.21	0.94 ± 0.22	1.12 ± 0.27	1.12 ± 0.34
Baso (%)	0.34 ± 0.13	0.32 ± 0.04	0.22 ± 0.08	0.28 ± 0.08
Mono (%)	1.78 ± 0.28	1.36 ± 0.18*	1.38 ± 0.20*	1.22 ± 0.16**
LUC (%)	1.10 ± 0.34	1.48 ± 0.91	1.26 ± 0.11	1.08 ± 0.26

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-7-9 NiO C 投与 91 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	898.0 ± 35.0	874.6 ± 14.9	871.4 ± 22.7	890.2 ± 23.6
Hb (g/dL)	14.60 ± 0.37	14.34 ± 0.30	14.24 ± 0.32	14.54 ± 0.31
Ht (%)	43.00 ± 1.20	42.42 ± 0.81	42.16 ± 1.04	43.26 ± 0.92
MCV (fL)	47.94 ± 1.11	48.50 ± 0.32	48.40 ± 0.51	48.62 ± 0.43
MCH (pg)	16.28 ± 0.38	16.40 ± 0.12	16.32 ± 0.11	16.34 ± 0.18
MCHC (g/dL)	33.90 ± 0.12	33.84 ± 0.38	33.74 ± 0.26	33.58 ± 0.27
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	65.88 ± 3.17	71.12 ± 5.43	69.08 ± 1.53	70.76 ± 1.38*
RC (%)	2.24 ± 0.17	2.20 ± 0.20	2.08 ± 0.19	2.22 ± 0.18
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	60.38 ± 6.41	56.24 ± 8.19	52.44 ± 5.90	60.62 ± 8.29
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	30.82 ± 1.01	28.92 ± 2.54	31.28 ± 2.63	31.30 ± 3.84
Lymph (%)	64.46 ± 0.76	67.20 ± 2.49	64.94 ± 2.93	64.42 ± 3.65
Eosino (%)	1.02 ± 0.24	0.96 ± 0.11	0.92 ± 0.18	1.08 ± 0.16
Baso (%)	0.42 ± 0.11	0.30 ± 0.10	0.28 ± 0.11	0.30 ± 0.07
Mono (%)	2.04 ± 0.35	1.48 ± 0.13**	1.52 ± 0.33*	1.78 ± 0.11
LUC (%)	1.24 ± 0.34	1.16 ± 0.15	1.06 ± 0.11	1.08 ± 0.16

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-7-10 NiO D 投与 3 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	892.8 ± 37.0	892.6 ± 19.2	897.0 ± 19.3	914.0 ± 31.4
Hb (g/dL)	15.46 ± 0.60	15.42 ± 0.29	15.44 ± 0.48	15.78 ± 0.51
Ht (%)	44.60 ± 1.97	44.42 ± 0.94	44.32 ± 1.13	45.34 ± 1.35
MCV (fL)	49.98 ± 0.45	49.74 ± 0.29	49.42 ± 0.36	49.62 ± 0.44
MCH (pg)	17.30 ± 0.26	17.26 ± 0.09	17.18 ± 0.19	17.26 ± 0.13
MCHC (g/dL)	34.66 ± 0.44	34.68 ± 0.13	34.80 ± 0.31	34.80 ± 0.24
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	75.54 ± 2.65	72.66 ± 2.37	74.34 ± 4.73	74.92 ± 2.32
RC (%)	2.20 ± 0.20	2.08 ± 0.16	2.10 ± 0.19	1.98 ± 0.30
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	60.44 ± 14.98	52.74 ± 4.38	51.46 ± 8.33	52.04 ± 3.38
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	26.36 ± 7.35	25.58 ± 6.17	31.38 ± 6.72	35.00 ± 3.50
Lymph (%)	69.46 ± 7.29	70.58 ± 6.09	64.74 ± 6.87	61.60 ± 3.65
Eosino (%)	0.98 ± 0.22	0.82 ± 0.04	0.94 ± 0.17	0.90 ± 0.20
Baso (%)	0.44 ± 0.15	0.48 ± 0.13	0.40 ± 0.16	0.42 ± 0.08
Mono (%)	1.80 ± 0.17	1.48 ± 0.20	1.46 ± 0.29	1.56 ± 0.26
LUC (%)	0.96 ± 0.25	1.04 ± 0.18	1.06 ± 0.23	0.58 ± 0.16*

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-7-11 NiO D 投与 28 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	869.2 ± 21.2	869.4 ± 20.0	858.8 ± 7.6	872.8 ± 16.5
Hb (g/dL)	14.86 ± 0.29	14.70 ± 0.23	14.68 ± 0.15	14.92 ± 0.30
Ht (%)	42.34 ± 0.89	42.08 ± 0.88	41.92 ± 0.57	42.74 ± 1.22
MCV (fL)	48.72 ± 0.38	48.42 ± 0.35	48.78 ± 0.52	48.98 ± 0.61
MCH (pg)	17.12 ± 0.18	16.92 ± 0.08	17.08 ± 0.18	17.10 ± 0.10
MCHC (g/dL)	35.10 ± 0.17	34.94 ± 0.23	34.98 ± 0.19	34.92 ± 0.38
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	70.04 ± 3.25	68.70 ± 1.89	65.98 ± 2.52*	67.32 ± 1.51
RC (%)	2.40 ± 0.16	2.36 ± 0.24	2.42 ± 0.04	2.60 ± 0.34
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	55.78 ± 3.77	59.82 ± 8.02	58.60 ± 3.83	54.64 ± 6.50
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	28.26 ± 2.23	31.82 ± 3.17	34.26 ± 4.74	36.56 ± 10.25
Lymph (%)	67.42 ± 2.54	64.90 ± 3.03	62.66 ± 4.90	59.70 ± 10.66
Eosino (%)	0.94 ± 0.11	0.82 ± 0.22	0.84 ± 0.15	0.74 ± 0.09
Baso (%)	0.30 ± 0.07	0.26 ± 0.13	0.32 ± 0.08	0.26 ± 0.09
Mono (%)	1.94 ± 0.19	1.36 ± 0.11**	1.26 ± 0.24**	1.82 ± 0.23
LUC (%)	1.16 ± 0.26	0.80 ± 0.16	0.70 ± 0.16*	0.90 ± 0.30

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-7-12 NiO D 投与 91 日後の血液学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
RBC (x10 <sup>4</sup> /μL)	909.6 ± 13.8	890.6 ± 19.0	899.0 ± 6.7	912.2 ± 20.6
Hb (g/dL)	15.00 ± 0.16	14.76 ± 0.26	14.76 ± 0.17	15.02 ± 0.40
Ht (%)	44.02 ± 0.61	43.48 ± 1.08	43.42 ± 0.46	44.44 ± 1.26
MCV (fL)	48.42 ± 0.28	48.80 ± 1.07	48.28 ± 0.34	48.72 ± 0.40
MCH (pg)	16.48 ± 0.15	16.58 ± 0.18	16.40 ± 0.10	16.48 ± 0.19
MCHC (g/dL)	34.04 ± 0.38	33.92 ± 0.52	33.96 ± 0.33	33.86 ± 0.30
PLT (x10 <sup>4</sup> /μL)	67.86 ± 4.93	65.90 ± 2.51	68.26 ± 0.78	66.68 ± 2.02
RC (%)	2.14 ± 0.32	2.06 ± 0.19	2.04 ± 0.21	2.10 ± 0.23
WBC (x10 <sup>2</sup> /μL)	74.50 ± 13.52	54.06 ± 4.18**	59.70 ± 6.53*	57.98 ± 5.66*
Differentiation of leukocyte				
Neutro (%)	33.62 ± 4.40	33.26 ± 1.08	30.20 ± 2.64	36.44 ± 2.81
Lymph (%)	61.74 ± 4.11	62.68 ± 0.85	65.74 ± 2.71	58.92 ± 2.64
Eosino (%)	1.10 ± 0.19	1.24 ± 0.13	1.08 ± 0.16	1.32 ± 0.35
Baso (%)	0.44 ± 0.18	0.36 ± 0.22	0.38 ± 0.08	0.32 ± 0.08
Mono (%)	2.06 ± 0.19	1.64 ± 0.24*	1.68 ± 0.29	2.06 ± 0.23
LUC (%)	1.06 ± 0.18	0.80 ± 0.12	0.92 ± 0.25	0.96 ± 0.22

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-8-1 NiO A 投与 3 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
AST (IU/L)	60.8 ± 4.1	58.8 ± 4.3	59.2 ± 2.0	63.8 ± 1.6
ALT (IU/L)	28.6 ± 0.5	28.6 ± 2.1	26.6 ± 0.9	31.8 ± 2.6
ALP (IU/L)	453.0 ± 22.6	436.4 ± 30.2	444.2 ± 17.3	444.4 ± 27.6
GGT (IU/L)	0.68 ± 0.13	0.84 ± 0.18	0.78 ± 0.33	0.78 ± 0.23
TC (mg/dL)	46.8 ± 0.8	45.2 ± 2.8	45.8 ± 3.1	52.4 ± 1.8**
TG (mg/dL)	24.2 ± 7.0	25.6 ± 4.9	24.8 ± 7.0	38.4 ± 8.4*
BUN (mg/dL)	15.02 ± 0.90	15.86 ± 0.68	14.68 ± 0.95	16.70 ± 0.79*
Cre (mg/dL)	0.184 ± 0.009	0.180 ± 0.012	0.192 ± 0.008	0.184 ± 0.021
TP (g/dL)	5.36 ± 0.05	5.40 ± 0.21	5.38 ± 0.08	5.52 ± 0.15
Alb (g/dL)	2.56 ± 0.05	2.62 ± 0.08	2.58 ± 0.04	2.66 ± 0.05
A/G ratio	0.914 ± 0.022	0.942 ± 0.016	0.922 ± 0.043	0.930 ± 0.030
Glu (mg/dL)	122.6 ± 5.0	122.4 ± 5.5	122.8 ± 8.7	116.6 ± 8.1
TB (mg/dL)	0.040 ± 0.000	0.042 ± 0.004	0.038 ± 0.004	0.042 ± 0.004
IP (mg/dL)	8.20 ± 0.32	8.54 ± 0.33	8.56 ± 0.11	9.00 ± 0.21**
Ca (mg/dL)	9.58 ± 0.19	9.76 ± 0.11	9.70 ± 0.12	9.88 ± 0.11**
Na (mEq/L)	142.8 ± 0.4	142.2 ± 0.4	141.8 ± 0.4*	142.4 ± 0.5
K (mEq/L)	3.70 ± 0.07	3.70 ± 0.14	3.58 ± 0.15	3.76 ± 0.05
Cl (mEq/L)	107.32 ± 0.67	107.82 ± 0.92	107.96 ± 0.78	106.62 ± 0.48

AST : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ALT : アラニンアミノトランスフェラーゼ、ALP : アルカリ性フォスファターゼ、GGT :  $\gamma$ -グルタミルトランスペプチダーゼ、TC : 総コレステロール、TG : トリグリセリド、BUN : 尿素窒素、Cre : クレアチニン、TP : 総蛋白、Alb : アルブミン、A/G ratio : A/G比、Glu : 血糖、TB : 総ビリルビン、IP : 無機リン、Ca : カルシウム、Na : ナトリウム、K : カリウム、Cl : 塩素 [以降、表II-8-2~12まで同一表記を示す]。

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、 \*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)



表 II-8-2 NiO A 投与 28 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
AST (IU/L)	67.6 ± 5.7	64.8 ± 3.8	66.4 ± 2.2	64.8 ± 5.5
ALT (IU/L)	34.2 ± 5.9	33.8 ± 4.7	36.2 ± 2.2	34.2 ± 1.3
ALP (IU/L)	340.6 ± 31.2	353.8 ± 25.1	343.0 ± 21.2	355.0 ± 22.6
GGT (IU/L)	0.70 ± 0.21	0.58 ± 0.22	0.72 ± 0.16	0.76 ± 0.17
TC (mg/dL)	56.2 ± 2.2	54.8 ± 1.9	54.8 ± 3.1	54.0 ± 2.9
TG (mg/dL)	59.0 ± 13.7	46.8 ± 13.9	59.2 ± 16.9	60.0 ± 16.9
BUN (mg/dL)	17.90 ± 1.59	17.70 ± 0.93	18.08 ± 0.53	18.88 ± 1.51
Cre (mg/dL)	0.206 ± 0.011	0.224 ± 0.013	0.206 ± 0.013	0.208 ± 0.008
TP (g/dL)	5.68 ± 0.08	5.72 ± 0.19	5.66 ± 0.15	5.56 ± 0.09
Alb (g/dL)	2.64 ± 0.05	2.62 ± 0.08	2.62 ± 0.04	2.62 ± 0.08
A/G ratio	0.870 ± 0.021	0.846 ± 0.023	0.864 ± 0.025	0.892 ± 0.037
Glu (mg/dL)	131.2 ± 10.9	119.8 ± 5.5*	123.6 ± 3.9	131.6 ± 4.0
TB (mg/dL)	0.044 ± 0.005	0.048 ± 0.008	0.040 ± 0.007	0.040 ± 0.007
IP (mg/dL)	7.04 ± 0.19	7.46 ± 0.34	7.36 ± 0.36	7.22 ± 0.28
Ca (mg/dL)	9.64 ± 0.09	9.78 ± 0.08	9.78 ± 0.08	9.66 ± 0.15
Na (mEq/L)	142.4 ± 0.5	141.6 ± 0.5	141.8 ± 0.4	141.6 ± 0.5
K (mEq/L)	4.06 ± 0.18	4.08 ± 0.11	4.08 ± 0.08	4.02 ± 0.19
Cl (mEq/L)	107.76 ± 0.64	109.32 ± 1.00**	109.24 ± 0.69*	108.44 ± 0.25

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-8-3 NiO A 投与 91 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
AST (IU/L)	93.8 ± 15.2	88.8 ± 18.5	99.4 ± 21.9	91.4 ± 15.9
ALT (IU/L)	54.0 ± 7.8	54.6 ± 10.4	60.6 ± 15.3	55.2 ± 7.4
ALP (IU/L)	258.6 ± 9.4	242.2 ± 24.4	247.4 ± 12.0	254.2 ± 12.2
GGT (IU/L)	0.46 ± 0.15	0.56 ± 0.09	0.74 ± 0.17*	0.74 ± 0.15*
TC (mg/dL)	63.6 ± 5.0	61.2 ± 3.3	61.4 ± 3.0	63.6 ± 1.9
TG (mg/dL)	73.2 ± 17.2	42.4 ± 8.8**	56.2 ± 12.2	67.2 ± 15.0
BUN (mg/dL)	20.60 ± 2.29	18.24 ± 1.65	17.88 ± 0.73*	19.22 ± 1.40
Cre (mg/dL)	0.266 ± 0.044	0.252 ± 0.029	0.248 ± 0.015	0.244 ± 0.011
TP (g/dL)	5.84 ± 0.17	5.76 ± 0.09	5.80 ± 0.00	5.92 ± 0.16
Alb (g/dL)	2.64 ± 0.05	2.54 ± 0.05*	2.60 ± 0.00	2.66 ± 0.05
A/G ratio	0.826 ± 0.035	0.790 ± 0.030	0.810 ± 0.000	0.816 ± 0.040
Glu (mg/dL)	149.2 ± 22.4	133.6 ± 11.6	130.0 ± 15.9	135.6 ± 6.2
TB (mg/dL)	0.046 ± 0.005	0.060 ± 0.000*	0.046 ± 0.005	0.046 ± 0.005
IP (mg/dL)	6.24 ± 0.30	6.56 ± 0.22	6.42 ± 0.35	6.52 ± 0.25
Ca (mg/dL)	9.70 ± 0.10	9.72 ± 0.13	9.80 ± 0.07	9.74 ± 0.09
Na (mEq/L)	142.8 ± 0.4	141.2 ± 0.8**	142.6 ± 0.9	142.4 ± 0.5
K (mEq/L)	3.90 ± 0.00	4.18 ± 0.08*	4.02 ± 0.31	3.90 ± 0.10
Cl (mEq/L)	106.62 ± 0.57	107.44 ± 0.67	108.02 ± 1.39	107.40 ± 0.50

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-8-4 NiO B 投与 3 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	4
AST (IU/L)	63.4 ± 3.4	61.4 ± 2.9	74.6 ± 11.8	76.6 ± 5.0*
ALT (IU/L)	27.2 ± 2.0	35.2 ± 7.8	41.0 ± 5.1**	40.6 ± 3.1**
ALP (IU/L)	415.6 ± 20.7	418.2 ± 27.6	391.2 ± 16.2	429.4 ± 31.0
GGT (IU/L)	0.48 ± 0.20	0.48 ± 0.16	0.84 ± 0.39	0.78 ± 0.37
TC (mg/dL)	45.8 ± 1.5	63.4 ± 5.3*	81.6 ± 3.0*	96.4 ± 13.8*
TG (mg/dL)	32.6 ± 4.8	39.2 ± 6.8	39.2 ± 4.8	40.0 ± 10.8
BUN (mg/dL)	18.04 ± 0.93	18.68 ± 1.28	20.24 ± 1.28	33.78 ± 10.42**
Cre (mg/dL)	0.212 ± 0.008	0.218 ± 0.016	0.218 ± 0.011	0.264 ± 0.055*
TP (g/dL)	5.54 ± 0.11	5.54 ± 0.17	5.54 ± 0.09	6.06 ± 0.24**
Alb (g/dL)	2.70 ± 0.00	2.64 ± 0.05	2.60 ± 0.00	2.84 ± 0.11
A/G ratio	0.950 ± 0.037	0.912 ± 0.040	0.888 ± 0.027*	0.882 ± 0.011**
Glu (mg/dL)	131.2 ± 6.6	136.2 ± 14.3	135.2 ± 18.1	154.0 ± 22.9
TB (mg/dL)	0.048 ± 0.004	0.044 ± 0.005	0.044 ± 0.009	0.050 ± 0.000
IP (mg/dL)	8.06 ± 0.53	7.56 ± 0.68	7.02 ± 0.47*	6.78 ± 0.23**
Ca (mg/dL)	9.58 ± 0.15	9.60 ± 0.27	9.50 ± 0.16	9.58 ± 0.22
Na (mEq/L)	142.6 ± 0.5	140.8 ± 1.5	139.6 ± 1.8*	137.4 ± 1.7**
K (mEq/L)	3.96 ± 0.18	4.14 ± 0.15	4.30 ± 0.41	3.46 ± 0.27*
Cl (mEq/L)	109.20 ± 0.70	104.66 ± 3.40	102.68 ± 2.00	94.70 ± 4.52**

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-8-5 NiO B 投与 28 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	4
AST (IU/L)	60.0 ± 4.8	68.6 ± 7.9	70.4 ± 7.5	62.8 ± 3.1
ALT (IU/L)	30.8 ± 2.4	36.8 ± 6.6	34.4 ± 5.2	28.5 ± 2.1
ALP (IU/L)	332.8 ± 24.1	360.2 ± 27.5	370.6 ± 16.4	430.0 ± 49.4**
GGT (IU/L)	0.52 ± 0.13	0.56 ± 0.11	0.52 ± 0.28	0.55 ± 0.06
TC (mg/dL)	57.6 ± 3.0	55.6 ± 4.6	51.8 ± 3.4	52.0 ± 5.8
TG (mg/dL)	43.6 ± 12.4	38.2 ± 22.0	27.8 ± 7.7	39.5 ± 14.8
BUN (mg/dL)	18.42 ± 0.27	20.20 ± 1.10*	18.94 ± 1.26	18.23 ± 1.36
Cre (mg/dL)	0.294 ± 0.025	0.272 ± 0.013	0.278 ± 0.019	0.245 ± 0.017**
TP (g/dL)	5.66 ± 0.11	5.68 ± 0.13	5.44 ± 0.09*	5.28 ± 0.15**
Alb (g/dL)	2.72 ± 0.04	2.72 ± 0.04	2.54 ± 0.05**	2.48 ± 0.13**
A/G ratio	0.924 ± 0.025	0.918 ± 0.034	0.876 ± 0.064	0.885 ± 0.054
Glu (mg/dL)	158.4 ± 6.9	138.6 ± 5.7**	137.0 ± 9.6**	128.3 ± 9.8**
TB (mg/dL)	0.040 ± 0.007	0.040 ± 0.000	0.046 ± 0.009	0.038 ± 0.005
IP (mg/dL)	6.94 ± 0.18	7.58 ± 0.16**	7.66 ± 0.28**	7.78 ± 0.19**
Ca (mg/dL)	9.76 ± 0.11	9.86 ± 0.15	9.78 ± 0.08	9.63 ± 0.17
Na (mEq/L)	141.8 ± 0.4	141.0 ± 0.7	141.2 ± 0.4	141.8 ± 1.0
K (mEq/L)	3.88 ± 0.13	4.02 ± 0.19	4.06 ± 0.11	3.95 ± 0.13
Cl (mEq/L)	106.66 ± 0.34	107.46 ± 1.21	108.30 ± 0.91*	108.35 ± 0.51*

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-8-6 NiO B 投与 91 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	4
AST (IU/L)	79.8 ± 14.8	73.8 ± 19.3	73.8 ± 19.0	84.5 ± 15.6
ALT (IU/L)	54.0 ± 11.3	45.8 ± 15.1	42.4 ± 13.7	53.8 ± 13.9
ALP (IU/L)	216.8 ± 23.0	226.0 ± 42.0	215.8 ± 38.6	270.5 ± 22.8
GGT (IU/L)	0.80 ± 0.10	1.00 ± 0.17	0.60 ± 0.14	1.08 ± 0.54
TC (mg/dL)	55.6 ± 1.3	51.4 ± 13.4	47.8 ± 11.0	57.3 ± 8.2
TG (mg/dL)	49.2 ± 26.6	40.8 ± 18.0	30.2 ± 3.0	31.3 ± 12.2
BUN (mg/dL)	15.70 ± 2.16	16.14 ± 1.21	14.72 ± 2.26	19.53 ± 3.18
Cre (mg/dL)	0.230 ± 0.014	0.234 ± 0.026	0.238 ± 0.045	0.283 ± 0.031
TP (g/dL)	5.08 ± 0.30	5.06 ± 0.84	4.82 ± 0.99	5.55 ± 0.47
Alb (g/dL)	2.32 ± 0.13	2.34 ± 0.41	2.18 ± 0.40	2.53 ± 0.17
A/G ratio	0.840 ± 0.026	0.858 ± 0.029	0.832 ± 0.056	0.838 ± 0.031
Glu (mg/dL)	130.8 ± 12.6	114.4 ± 15.6	115.2 ± 17.6	138.0 ± 32.3
TB (mg/dL)	0.046 ± 0.009	0.048 ± 0.011	0.042 ± 0.008	0.053 ± 0.010
IP (mg/dL)	4.88 ± 0.27	5.38 ± 0.91	5.26 ± 0.99	6.10 ± 0.50
Ca (mg/dL)	8.44 ± 0.50	8.70 ± 1.33	8.32 ± 1.51	9.25 ± 0.50
Na (mEq/L)	143.0 ± 0.7	141.8 ± 0.8*	142.2 ± 0.4	142.3 ± 0.5
K (mEq/L)	3.68 ± 0.04	3.86 ± 0.09*	3.68 ± 0.04	3.78 ± 0.15
Cl (mEq/L)	110.06 ± 0.74	110.38 ± 0.64	109.00 ± 1.08	110.28 ± 0.62

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-8-7 NiO C 投与 3 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
AST (IU/L)	57.6 ± 7.7	51.6 ± 12.2	55.4 ± 8.0	43.2 ± 6.6
ALT (IU/L)	27.4 ± 5.6	23.0 ± 4.6	26.6 ± 4.6	19.2 ± 3.4*
ALP (IU/L)	372.8 ± 44.0	356.4 ± 73.1	392.2 ± 54.1	312.8 ± 56.5
GGT (IU/L)	0.58 ± 0.11	0.84 ± 0.09*	0.56 ± 0.09	0.50 ± 0.20
TC (mg/dL)	40.0 ± 5.9	37.4 ± 6.9	43.4 ± 4.6	33.8 ± 7.7
TG (mg/dL)	28.0 ± 12.6	23.0 ± 7.3	35.0 ± 9.7	32.8 ± 8.5
BUN (mg/dL)	17.26 ± 1.40	13.98 ± 2.42	15.96 ± 2.24	13.66 ± 2.75
Cre (mg/dL)	0.228 ± 0.018	0.198 ± 0.034	0.218 ± 0.041	0.172 ± 0.025*
TP (g/dL)	4.94 ± 0.61	4.62 ± 0.80	5.02 ± 0.53	4.00 ± 0.73
Alb (g/dL)	2.38 ± 0.34	2.20 ± 0.43	2.42 ± 0.28	1.92 ± 0.33
A/G ratio	0.928 ± 0.037	0.904 ± 0.051	0.930 ± 0.019	0.928 ± 0.044
Glu (mg/dL)	122.6 ± 10.2	107.4 ± 25.4	113.2 ± 13.3	94.6 ± 14.2*
TB (mg/dL)	0.038 ± 0.008	0.032 ± 0.008	0.036 ± 0.013	0.034 ± 0.005
IP (mg/dL)	6.88 ± 0.58	7.42 ± 1.20	7.70 ± 0.76	6.22 ± 0.99
Ca (mg/dL)	8.78 ± 1.03	8.56 ± 1.51	9.36 ± 0.80	7.32 ± 1.21
Na (mEq/L)	142.6 ± 0.5	142.8 ± 0.4	142.8 ± 0.8	142.0 ± 1.0
K (mEq/L)	3.82 ± 0.15	3.72 ± 0.15	3.64 ± 0.17	3.66 ± 0.05
Cl (mEq/L)	106.76 ± 0.37	108.50 ± 0.25**	108.16 ± 0.76**	107.46 ± 0.49

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-8-8 NiO C 投与 28 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
AST (IU/L)	65.8 ± 7.4	58.8 ± 1.9	61.6 ± 5.7	60.0 ± 2.9
ALT (IU/L)	32.2 ± 3.0	29.4 ± 3.0	31.8 ± 4.4	29.8 ± 1.1
ALP (IU/L)	333.6 ± 19.5	335.4 ± 10.4	333.4 ± 10.1	330.4 ± 22.0
GGT (IU/L)	0.78 ± 0.18	0.84 ± 0.18	0.74 ± 0.38	0.50 ± 0.07
TC (mg/dL)	56.8 ± 5.7	54.6 ± 1.5	55.2 ± 5.0	54.0 ± 3.5
TG (mg/dL)	46.4 ± 11.4	42.8 ± 8.6	45.0 ± 7.6	46.0 ± 5.9
BUN (mg/dL)	17.40 ± 1.44	17.74 ± 1.32	16.50 ± 1.20	16.60 ± 1.19
Cre (mg/dL)	0.246 ± 0.009	0.246 ± 0.015	0.256 ± 0.011	0.246 ± 0.005
TP (g/dL)	5.62 ± 0.04	5.48 ± 0.11	5.50 ± 0.10	5.44 ± 0.15*
Alb (g/dL)	2.66 ± 0.05	2.60 ± 0.00	2.62 ± 0.08	2.60 ± 0.00
A/G ratio	0.900 ± 0.030	0.906 ± 0.033	0.912 ± 0.056	0.918 ± 0.045
Glu (mg/dL)	136.6 ± 10.1	138.2 ± 8.5	129.0 ± 8.0	132.8 ± 6.5
TB (mg/dL)	0.040 ± 0.007	0.036 ± 0.005	0.040 ± 0.007	0.042 ± 0.008
IP (mg/dL)	7.06 ± 0.34	7.28 ± 0.53	7.22 ± 0.33	7.14 ± 0.11
Ca (mg/dL)	9.82 ± 0.08	10.02 ± 0.24	9.98 ± 0.15	9.82 ± 0.11
Na (mEq/L)	142.4 ± 0.5	141.4 ± 1.1	142.6 ± 0.9	142.2 ± 0.4
K (mEq/L)	3.90 ± 0.10	4.02 ± 0.34	3.80 ± 0.07	3.84 ± 0.13
Cl (mEq/L)	105.78 ± 0.46	105.86 ± 0.60	106.76 ± 1.04	106.48 ± 0.34

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-8-9 NiO C 投与 91 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
AST (IU/L)	83.8 ± 11.0	87.8 ± 13.3	79.0 ± 13.3	82.6 ± 9.5
ALT (IU/L)	51.2 ± 11.0	47.8 ± 7.3	45.4 ± 6.2	47.8 ± 6.2
ALP (IU/L)	275.8 ± 27.1	246.6 ± 20.1	237.4 ± 15.8*	246.0 ± 26.5
GGT (IU/L)	0.86 ± 0.17	0.90 ± 0.19	0.80 ± 0.25	0.60 ± 0.22
TC (mg/dL)	62.4 ± 4.4	66.0 ± 4.4	66.4 ± 3.4	68.4 ± 5.6
TG (mg/dL)	42.8 ± 19.3	36.6 ± 10.7	41.2 ± 9.5	61.8 ± 24.2
BUN (mg/dL)	18.96 ± 1.53	18.96 ± 1.76	17.92 ± 1.08	19.84 ± 0.99
Cre (mg/dL)	0.246 ± 0.021	0.252 ± 0.020	0.250 ± 0.014	0.260 ± 0.020
TP (g/dL)	5.90 ± 0.14	5.82 ± 0.04	5.78 ± 0.19	5.92 ± 0.11
Alb (g/dL)	2.66 ± 0.11	2.58 ± 0.04	2.54 ± 0.05*	2.66 ± 0.05
A/G ratio	0.824 ± 0.065	0.796 ± 0.022	0.784 ± 0.029	0.816 ± 0.037
Glu (mg/dL)	149.4 ± 10.3	128.2 ± 7.5*	132.8 ± 14.8	146.8 ± 12.9
TB (mg/dL)	0.046 ± 0.005	0.058 ± 0.013	0.050 ± 0.007	0.052 ± 0.004
IP (mg/dL)	6.56 ± 0.30	6.64 ± 0.42	6.82 ± 0.18	6.82 ± 0.15
Ca (mg/dL)	9.82 ± 0.16	10.02 ± 0.15	9.98 ± 0.11	10.06 ± 0.05*
Na (mEq/L)	142.6 ± 0.9	142.4 ± 0.5	142.4 ± 0.5	142.4 ± 0.5
K (mEq/L)	3.80 ± 0.07	4.28 ± 0.16**	3.98 ± 0.16	3.92 ± 0.15
Cl (mEq/L)	106.38 ± 0.38	107.66 ± 1.30	106.86 ± 0.38	106.84 ± 0.84

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)



表 II-8-10 NiO D 投与 3 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
AST (IU/L)	62.8 ± 9.4	69.6 ± 6.9	66.6 ± 5.3	66.2 ± 4.8
ALT (IU/L)	28.4 ± 3.2	32.2 ± 5.4	29.6 ± 2.7	29.6 ± 2.1
ALP (IU/L)	441.8 ± 27.5	444.4 ± 21.6	424.4 ± 35.9	407.6 ± 24.2
GGT (IU/L)	0.64 ± 0.18	0.62 ± 0.11	0.60 ± 0.16	0.96 ± 0.18*
TC (mg/dL)	47.0 ± 0.0	46.4 ± 3.6	52.8 ± 2.4*	55.0 ± 3.6**
TG (mg/dL)	28.8 ± 8.8	39.6 ± 9.1	33.8 ± 5.1	33.2 ± 6.8
BUN (mg/dL)	16.34 ± 1.76	18.56 ± 2.29	18.28 ± 1.43	18.02 ± 1.22
Cre (mg/dL)	0.210 ± 0.022	0.204 ± 0.005	0.216 ± 0.011	0.208 ± 0.015
TP (g/dL)	5.42 ± 0.11	5.36 ± 0.09	5.44 ± 0.09	5.44 ± 0.15
Alb (g/dL)	2.72 ± 0.04	2.72 ± 0.08	2.66 ± 0.05	2.72 ± 0.04
A/G ratio	1.008 ± 0.018	1.032 ± 0.044	0.954 ± 0.013*	1.002 ± 0.025
Glu (mg/dL)	136.6 ± 13.1	129.8 ± 7.5	134.0 ± 8.0	129.6 ± 6.5
TB (mg/dL)	0.040 ± 0.007	0.046 ± 0.005	0.044 ± 0.005	0.044 ± 0.005
IP (mg/dL)	7.90 ± 0.55	8.40 ± 0.16	8.40 ± 0.52	8.34 ± 0.17
Ca (mg/dL)	9.98 ± 0.04	10.08 ± 0.08	10.32 ± 0.18**	10.20 ± 0.10*
Na (mEq/L)	143.0 ± 1.0	144.0 ± 0.0	143.4 ± 0.5	144.4 ± 0.5*
K (mEq/L)	3.76 ± 0.11	3.80 ± 0.07	3.90 ± 0.12	3.96 ± 0.05*
Cl (mEq/L)	105.30 ± 0.81	105.82 ± 0.54	103.82 ± 0.62*	104.18 ± 0.81

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-8-11 NiO D 投与 28 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
AST (IU/L)	63.8 ± 2.5	64.0 ± 1.4	68.2 ± 14.0	66.4 ± 1.7
ALT (IU/L)	30.2 ± 3.8	31.8 ± 1.8	35.4 ± 7.4	31.2 ± 2.2
ALP (IU/L)	346.6 ± 14.7	346.2 ± 11.3	352.0 ± 28.1	369.4 ± 24.0
GGT (IU/L)	0.74 ± 0.52	0.68 ± 0.15	0.64 ± 0.17	0.54 ± 0.09
TC (mg/dL)	53.6 ± 3.3	49.0 ± 2.6*	51.6 ± 1.8	50.0 ± 2.1
TG (mg/dL)	38.4 ± 12.3	40.8 ± 13.5	44.4 ± 9.3	37.6 ± 11.6
BUN (mg/dL)	17.50 ± 0.98	17.96 ± 1.65	18.48 ± 0.53	19.46 ± 2.01
Cre (mg/dL)	0.232 ± 0.013	0.228 ± 0.008	0.234 ± 0.015	0.226 ± 0.025
TP (g/dL)	5.56 ± 0.05	5.48 ± 0.08	5.42 ± 0.16	5.30 ± 0.12**
Alb (g/dL)	2.74 ± 0.05	2.70 ± 0.00	2.66 ± 0.05	2.64 ± 0.05*
A/G ratio	0.972 ± 0.048	0.970 ± 0.030	0.962 ± 0.025	0.992 ± 0.033
Glu (mg/dL)	142.8 ± 7.3	139.8 ± 6.2	131.6 ± 12.1	140.0 ± 15.0
TB (mg/dL)	0.048 ± 0.008	0.046 ± 0.005	0.046 ± 0.005	0.046 ± 0.005
IP (mg/dL)	7.44 ± 0.40	7.84 ± 0.24	7.94 ± 0.51	8.04 ± 0.18*
Ca (mg/dL)	9.86 ± 0.09	9.92 ± 0.08	9.92 ± 0.11	9.84 ± 0.13
Na (mEq/L)	144.0 ± 0.7	143.0 ± 0.7	142.6 ± 1.3	142.6 ± 0.5
K (mEq/L)	3.90 ± 0.16	4.02 ± 0.08	4.08 ± 0.13	4.10 ± 0.00
Cl (mEq/L)	105.94 ± 0.11	106.48 ± 0.88	106.30 ± 0.85	105.82 ± 1.24

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-8-12 NiO D 投与 91 日後の血液生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
AST (IU/L)	90.8 ± 21.6	83.0 ± 11.6	75.8 ± 7.5	83.8 ± 18.8
ALT (IU/L)	49.8 ± 7.3	48.8 ± 10.4	42.8 ± 3.6	46.2 ± 12.9
ALP (IU/L)	272.0 ± 13.2	247.0 ± 16.6	269.4 ± 18.6	284.6 ± 17.3
GGT (IU/L)	0.78 ± 0.13	0.82 ± 0.08	0.78 ± 0.35	0.48 ± 0.08
TC (mg/dL)	62.8 ± 3.7	58.8 ± 4.7	56.8 ± 2.6*	50.6 ± 3.2**
TG (mg/dL)	55.8 ± 22.0	45.2 ± 20.1	42.4 ± 3.9	39.6 ± 1.8
BUN (mg/dL)	18.44 ± 0.94	18.72 ± 1.66	18.44 ± 1.24	19.10 ± 1.34
Cre (mg/dL)	0.246 ± 0.029	0.256 ± 0.021	0.260 ± 0.012	0.264 ± 0.017
TP (g/dL)	5.94 ± 0.11	5.74 ± 0.15	5.76 ± 0.11	5.70 ± 0.19*
Alb (g/dL)	2.80 ± 0.07	2.72 ± 0.08	2.70 ± 0.07	2.70 ± 0.07
A/G ratio	0.892 ± 0.016	0.900 ± 0.021	0.882 ± 0.016	0.900 ± 0.021
Glu (mg/dL)	143.2 ± 9.3	137.0 ± 12.6	133.2 ± 8.8	134.8 ± 9.7
TB (mg/dL)	0.046 ± 0.005	0.044 ± 0.005	0.042 ± 0.004	0.040 ± 0.000
IP (mg/dL)	6.34 ± 0.34	6.90 ± 0.24*	7.02 ± 0.36**	6.64 ± 0.22
Ca (mg/dL)	9.98 ± 0.04	9.96 ± 0.17	9.98 ± 0.16	9.80 ± 0.16
Na (mEq/L)	143.6 ± 0.9	142.2 ± 0.4	142.4 ± 0.9	142.4 ± 1.1
K (mEq/L)	3.74 ± 0.17	3.90 ± 0.19	3.92 ± 0.08	3.90 ± 0.07
Cl (mEq/L)	103.92 ± 0.91	104.30 ± 0.74	104.70 ± 0.85	105.30 ± 1.09

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

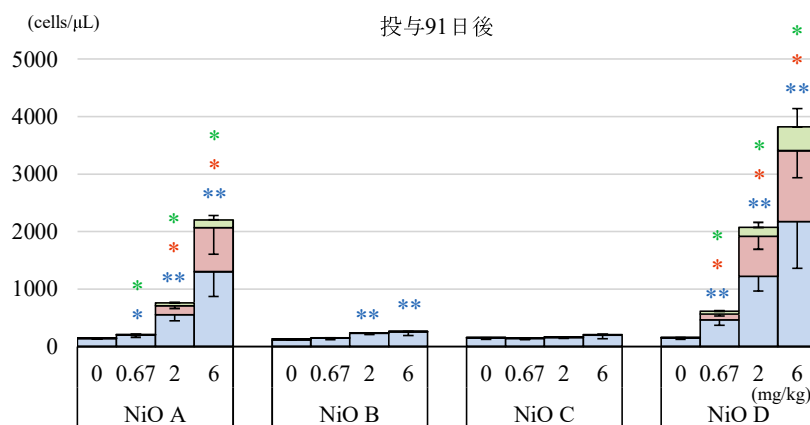
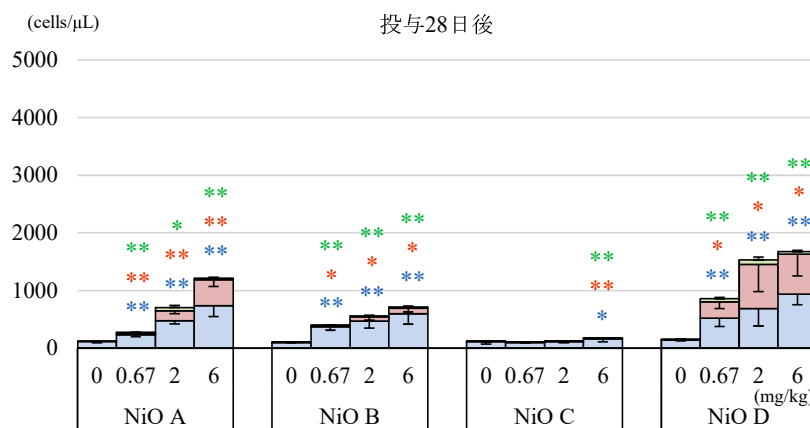
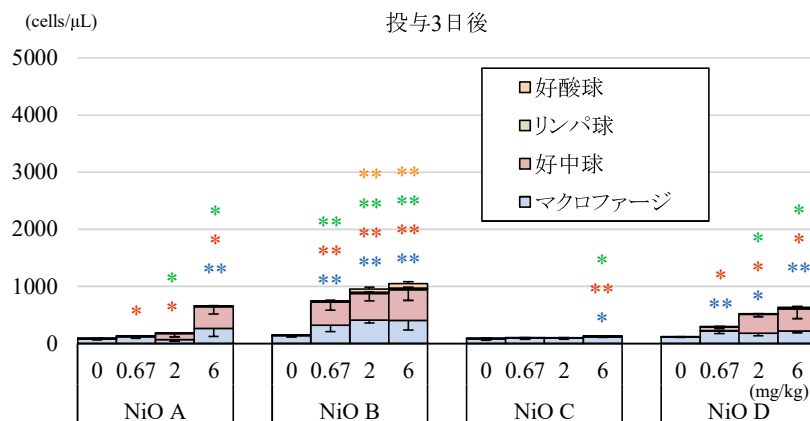


図 II-3 BALF 細胞検査

\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ . (媒体対照群との比較、青：マクロファージ数、赤：好中球数、緑：リンパ球数、橙：好酸球数)

Bar：標準偏差

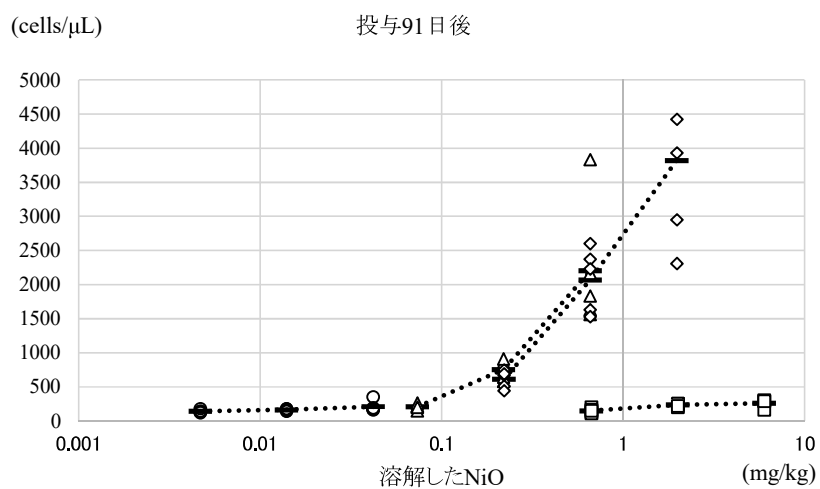
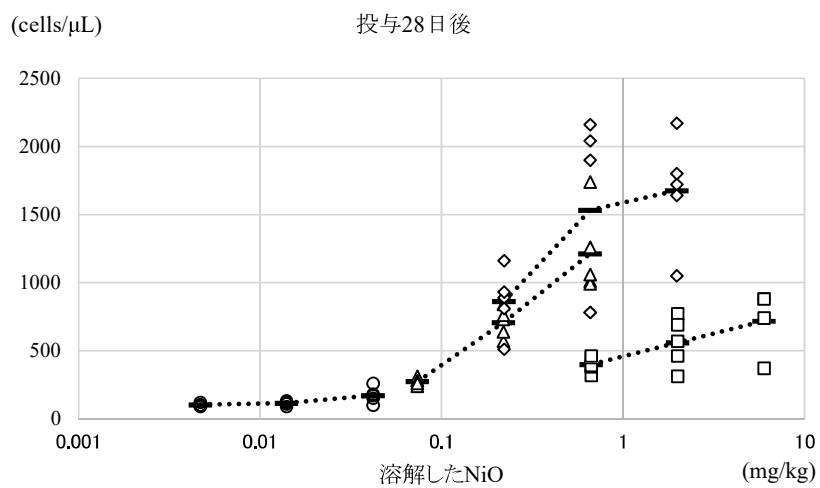
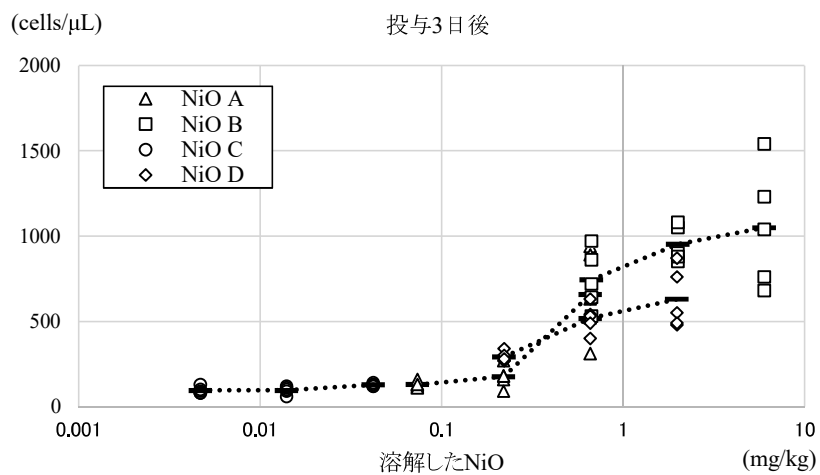


図 II-4 BALF 総細胞数の溶解した NiO に対する用量反応関係  
 - : 各用量の平均値  
 点線 : 各 NiO の平均値の推移

表 II-9-1 NiO A 投与 3 日後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
TP (mg/dL)	3.88 ± 0.40	7.68 ± 0.31*	16.00 ± 5.55*	33.92 ± 3.79*
Alb (mg/dL)	1.07 ± 0.04	2.43 ± 0.11*	4.15 ± 1.29*	8.66 ± 1.27*
LDH (IU/L)	15.2 ± 1.3	62.6 ± 2.1*	172.4 ± 72.6*	375.4 ± 14.3*

TP：総タンパク、Alb：アルブミン、LDH：乳酸脱水素酵素活性 [以降、表 II-9-2～12 ま  
で同一表記を示す]。

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-9-2 NiO A 投与 28 日後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
TP (mg/dL)	3.38 ± 0.31	10.82 ± 3.76*	23.08 ± 1.37*	51.98 ± 10.06*
Alb (mg/dL)	1.03 ± 0.05	3.45 ± 1.03*	6.24 ± 0.34*	10.94 ± 2.44*
LDH (IU/L)	11.2 ± 0.8	71.2 ± 26.6*	222.2 ± 15.9*	558.8 ± 85.8*

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-9-3 NiO A 投与日 91 後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
TP (mg/dL)	4.36 ± 0.24	5.92 ± 1.29*	16.58 ± 1.13**	37.64 ± 9.98**
Alb (mg/dL)	1.06 ± 0.09	1.88 ± 0.44**	4.44 ± 0.23**	8.96 ± 2.26**
LDH (IU/L)	8.8 ± 0.8	19.2 ± 8.3*	112.6 ± 7.7*	340.6 ± 104.2*

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-9-4 NiO B 投与 3 日後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
TP (mg/dL)	3.62 ± 0.66	118.30 ± 30.25**	124.14 ± 29.52**	218.70 ± 71.34**
Alb (mg/dL)	1.21 ± 0.20	49.29 ± 14.24**	50.73 ± 12.62**	59.74 ± 12.94**
LDH (IU/L)	14.8 ± 2.6	624.2 ± 129.0**	827.8 ± 117.3**	1028.4 ± 220.6**

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-9-5 NiO B 投与 28 日後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	4
TP (mg/dL)	8.80 ± 0.34	14.48 ± 1.43**	17.80 ± 3.73**	23.95 ± 4.61**
Alb (mg/dL)	1.35 ± 0.11	3.68 ± 0.57**	4.68 ± 1.23**	6.24 ± 1.23**
LDH (IU/L)	10.6 ± 1.7	38.0 ± 4.1**	65.2 ± 23.5**	145.75 ± 43.1**

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-9-6 NiO B 投与 91 日後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	4
TP (mg/dL)	6.68 ± 3.61	5.84 ± 0.49	6.50 ± 0.51	6.25 ± 2.04
Alb (mg/dL)	1.14 ± 0.12	1.92 ± 0.15**	2.15 ± 0.23**	2.07 ± 0.63**
LDH (IU/L)	11.2 ± 1.6	9.8 ± 2.2	11.6 ± 1.9	12.0 ± 2.9

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-9-7 NiO C 投与 3 日後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
TP (mg/dL)	4.28 ± 0.72	3.88 ± 0.87	3.98 ± 0.70	7.06 ± 0.67**
Alb (mg/dL)	1.23 ± 0.05	1.24 ± 0.16	1.24 ± 0.23	1.95 ± 0.31**
LDH (IU/L)	14.0 ± 0.7	12.4 ± 0.9	14.8 ± 2.9	41.2 ± 8.6**

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-9-8 NiO C 投与 28 日後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
TP (mg/dL)	4.70 ± 0.58	4.28 ± 0.70	4.62 ± 0.64	6.30 ± 1.64*
Alb (mg/dL)	1.28 ± 0.21	1.20 ± 0.11	1.12 ± 0.18	1.64 ± 0.43
LDH (IU/L)	13.8 ± 3.9	10.0 ± 0.7	13.8 ± 1.6	27.4 ± 11.3**

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-9-9 NiO C 投与日 91 後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
TP (mg/dL)	5.40 ± 0.23	5.52 ± 1.38	4.74 ± 0.56*	5.6 ± 2.35
Alb (mg/dL)	0.33 ± 0.07	0.95 ± 1.34	0.30 ± 0.04	0.47 ± 0.48
LDH (IU/L)	12.6 ± 1.3	11.4 ± 0.5	10.8 ± 1.5	18.8 ± 15.8

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)



表 II-9-10 NiO D 投与 3 日後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
TP (mg/dL)	3.54 ± 0.62	23.20 ± 3.60**	51.72 ± 11.53**	144.14 ± 29.99**
Alb (mg/dL)	1.58 ± 0.11	8.08 ± 1.37**	20.50 ± 6.70**	62.73 ± 10.40**
LDH (IU/L)	13.2 ± 3.1	267.6 ± 29.2**	513.4 ± 41.2**	583.2 ± 145.2**

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-9-11 NiO D 投与 28 日後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
TP (mg/dL)	3.90 ± 0.63	25.64 ± 5.69**	44.98 ± 20.32**	37.64 ± 7.96**
Alb (mg/dL)	2.23 ± 0.17	9.59 ± 2.04**	13.17 ± 5.28**	10.27 ± 1.84**
LDH (IU/L)	11.4 ± 2.1	260.6 ± 52.0**	526.6 ± 244.6**	467.8 ± 126.1**

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-9-12 NiO D 投与 91 日後の BALF 生化学的検査結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
TP (mg/dL)	4.64 ± 0.46	13.92 ± 0.78**	42.68 ± 9.14**	66.56 ± 17.09**
Alb (mg/dL)	1.58 ± 0.15	4.51 ± 0.24**	12.18 ± 2.19**	16.71 ± 3.58**
LDH (IU/L)	9.4 ± 2.9	90.8 ± 15.2**	361.8 ± 66.1**	623.2 ± 174.6**

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-1 NiO A 投与 3 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	5
肺	絶対重量 (g)	0.950 ± 0.051	0.998 ± 0.064	1.072 ± 0.043*	1.330 ± 0.097**
	相対重量 (g/100 g)	0.401 ± 0.019	0.423 ± 0.018	0.455 ± 0.022*	0.571 ± 0.038**
肝臓	絶対重量 (g)	6.412 ± 0.410	6.552 ± 0.446	6.312 ± 0.567	6.416 ± 0.459
	相対重量 (g/100 g)	2.702 ± 0.105	2.778 ± 0.084	2.673 ± 0.095	2.752 ± 0.088
腎臓	絶対重量 (g)	1.660 ± 0.139	1.688 ± 0.086	1.650 ± 0.102	1.648 ± 0.100
	相対重量 (g/100 g)	0.699 ± 0.025	0.716 ± 0.010	0.700 ± 0.005	0.707 ± 0.023
脳	絶対重量 (g)	1.966 ± 0.058	1.960 ± 0.035	1.910 ± 0.185	1.918 ± 0.036
	相対重量 (g/100 g)	0.830 ± 0.052	0.832 ± 0.019	0.809 ± 0.055	0.824 ± 0.025
脾臓	絶対重量 (g)	0.588 ± 0.043	0.588 ± 0.022	0.610 ± 0.024	0.584 ± 0.038
	相対重量 (g/100 g)	0.248 ± 0.015	0.250 ± 0.006	0.259 ± 0.007	0.251 ± 0.013
解剖時体重 (g)		237.34 ± 12.84	235.68 ± 9.65	235.84 ± 13.57	232.98 ± 10.92

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-2 NiO A 投与 28 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	5
肺	絶対重量 (g)	0.992 ± 0.047	1.110 ± 0.060*	1.282 ± 0.067**	1.438 ± 0.073**
	相対重量 (g/100 g)	0.363 ± 0.008	0.403 ± 0.010**	0.465 ± 0.012**	0.527 ± 0.025**
肝臓	絶対重量 (g)	7.118 ± 0.531	7.150 ± 0.225	7.260 ± 0.164	7.118 ± 0.273
	相対重量 (g/100 g)	2.601 ± 0.072	2.598 ± 0.052	2.636 ± 0.066	2.605 ± 0.025
腎臓	絶対重量 (g)	1.772 ± 0.119	1.788 ± 0.073	1.818 ± 0.107	1.808 ± 0.055
	相対重量 (g/100 g)	0.648 ± 0.018	0.649 ± 0.016	0.660 ± 0.031	0.662 ± 0.011
脳	絶対重量 (g)	1.992 ± 0.043	1.966 ± 0.045	1.984 ± 0.023	2.020 ± 0.039
	相対重量 (g/100 g)	0.729 ± 0.025	0.715 ± 0.022	0.721 ± 0.017	0.740 ± 0.023
脾臓	絶対重量 (g)	0.626 ± 0.043	0.656 ± 0.011	0.610 ± 0.049	0.628 ± 0.037
	相対重量 (g/100 g)	0.229 ± 0.006	0.239 ± 0.011	0.221 ± 0.013	0.230 ± 0.009
解剖時体重 (g)		273.42 ± 12.80	275.32 ± 9.39	275.46 ± 7.60	273.18 ± 8.87

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-3 NiO A 投与 91 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	5
肺	絶対重量 (g)	1.082 ± 0.093	1.148 ± 0.051	1.436 ± 0.113**	1.750 ± 0.130**
	相対重量 (g/100 g)	0.331 ± 0.028	0.347 ± 0.011	0.437 ± 0.032**	0.535 ± 0.056**
肝臓	絶対重量 (g)	8.056 ± 0.742	7.910 ± 0.424	7.822 ± 0.697	8.146 ± 0.423
	相対重量 (g/100 g)	2.460 ± 0.079	2.389 ± 0.045	2.375 ± 0.103	2.481 ± 0.063
腎臓	絶対重量 (g)	2.036 ± 0.167	2.042 ± 0.143	1.972 ± 0.151	2.034 ± 0.096
	相対重量 (g/100 g)	0.622 ± 0.012	0.616 ± 0.016	0.599 ± 0.020	0.620 ± 0.022
脳	絶対重量 (g)	2.008 ± 0.031	2.050 ± 0.034	2.046 ± 0.021	2.054 ± 0.037
	相対重量 (g/100 g)	0.615 ± 0.031	0.616 ± 0.016	0.623 ± 0.033	0.626 ± 0.020
脾臓	絶対重量 (g)	0.674 ± 0.047	0.688 ± 0.057	0.676 ± 0.047	0.678 ± 0.041
	相対重量 (g/100 g)	0.206 ± 0.010	0.208 ± 0.007	0.205 ± 0.008	0.207 ± 0.009
解剖時体重 (g)		327.16 ± 21.96	331.12 ± 18.58	328.84 ± 15.68	328.34 ± 15.12

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-4 NiO B 投与 3 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	5
肺	絶対重量 (g)	0.914 ± 0.049	1.514 ± 0.107**	1.574 ± 0.051**	1.702 ± 0.173**
	相対重量 (g/100 g)	0.386 ± 0.009	0.640 ± 0.072**	0.702 ± 0.037**	0.802 ± 0.074**
肝臓	絶対重量 (g)	6.356 ± 0.479	6.470 ± 0.366	6.012 ± 0.302	5.816 ± 0.291
	相対重量 (g/100 g)	2.692 ± 0.078	2.734 ± 0.055	2.678 ± 0.042	2.738 ± 0.085
腎臓	絶対重量 (g)	1.686 ± 0.133	1.706 ± 0.094	1.602 ± 0.070	1.620 ± 0.058
	相対重量 (g/100 g)	0.716 ± 0.025	0.720 ± 0.017	0.714 ± 0.005	0.762 ± 0.013**
脳	絶対重量 (g)	1.950 ± 0.053	1.960 ± 0.035	1.918 ± 0.026	1.954 ± 0.018
	相対重量 (g/100 g)	0.828 ± 0.022	0.828 ± 0.035	0.856 ± 0.032	0.922 ± 0.037**
脾臓	絶対重量 (g)	0.558 ± 0.031	0.568 ± 0.033	0.500 ± 0.041	0.468 ± 0.061*
	相対重量 (g/100 g)	0.238 ± 0.004	0.232 ± 0.015	0.224 ± 0.013	0.222 ± 0.022
解剖時体重 (g)		235.68 ± 12.25	236.72 ± 13.54	224.26 ± 9.58	212.38 ± 8.92

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-5 NiO B 投与 28 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	4
肺	絶対重量 (g)	0.906 ± 0.036	1.392 ± 0.088**	1.498 ± 0.103**	1.605 ± 0.126**
	相対重量 (g/100 g)	0.326 ± 0.009	0.504 ± 0.036**	0.566 ± 0.061**	0.673 ± 0.082**
肝臓	絶対重量 (g)	7.266 ± 0.540	7.176 ± 0.384	6.726 ± 0.349	6.208 ± 0.472**
	相対重量 (g/100 g)	2.618 ± 0.087	2.608 ± 0.065	2.540 ± 0.060	2.588 ± 0.044
腎臓	絶対重量 (g)	1.792 ± 0.118	1.848 ± 0.082	1.802 ± 0.098	1.705 ± 0.158
	相対重量 (g/100 g)	0.646 ± 0.021	0.672 ± 0.022	0.682 ± 0.030	0.710 ± 0.029**
脳	絶対重量 (g)	1.984 ± 0.043	1.994 ± 0.068	1.968 ± 0.040	1.968 ± 0.040
	相対重量 (g/100 g)	0.716 ± 0.022	0.726 ± 0.024	0.744 ± 0.021	0.810 ± 0.054**
脾臓	絶対重量 (g)	0.622 ± 0.034	0.636 ± 0.057	0.648 ± 0.041	0.613 ± 0.050
	相対重量 (g/100 g)	0.224 ± 0.005	0.234 ± 0.015	0.246 ± 0.009	0.255 ± 0.026*
解剖時体重 (g)		277.28 ± 12.61	274.92 ± 9.05	264.64 ± 10.66	240.43 ± 22.39
平均±標準偏差					

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-6 NiO B 投与 91 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	4
肺	絶対重量 (g)	1.092 ± 0.015	1.262 ± 0.035**	1.382 ± 0.059**	1.358 ± 0.043**
	相対重量 (g/100 g)	0.334 ± 0.023	0.396 ± 0.009**	0.416 ± 0.026**	0.423 ± 0.029**
肝臓	絶対重量 (g)	7.776 ± 0.893	7.630 ± 0.381	7.902 ± 0.436	7.673 ± 0.595
	相対重量 (g/100 g)	2.366 ± 0.134	2.394 ± 0.038	2.376 ± 0.043	2.380 ± 0.083
腎臓	絶対重量 (g)	1.918 ± 0.072	1.978 ± 0.033	1.998 ± 0.107	1.920 ± 0.171
	相対重量 (g/100 g)	0.588 ± 0.028	0.622 ± 0.018	0.602 ± 0.018	0.598 ± 0.036
脳	絶対重量 (g)	2.052 ± 0.023	2.046 ± 0.035	2.038 ± 0.041	2.013 ± 0.010
	相対重量 (g/100 g)	0.626 ± 0.039	0.644 ± 0.025	0.614 ± 0.021	0.625 ± 0.034
脾臓	絶対重量 (g)	0.636 ± 0.042	0.658 ± 0.052	0.714 ± 0.058	0.688 ± 0.124
	相対重量 (g/100 g)	0.198 ± 0.004	0.206 ± 0.011	0.214 ± 0.011	0.210 ± 0.027
解剖時体重 (g)		327.64 ± 20.79	318.66 ± 12.05	332.86 ± 19.64	322.23 ± 17.71
平均±標準偏差					

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-7 NiO C 投与 3 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	5
肺	絶対重量 (g)	0.936 ± 0.051	0.966 ± 0.043	0.942 ± 0.024	0.966 ± 0.046
	相対重量 (g/100 g)	0.394 ± 0.013	0.400 ± 0.012	0.392 ± 0.004	0.403 ± 0.010
肝臓	絶対重量 (g)	6.314 ± 0.345	6.276 ± 0.293	6.430 ± 0.115	6.380 ± 0.358
	相対重量 (g/100 g)	2.659 ± 0.030	2.601 ± 0.053	2.676 ± 0.081	2.664 ± 0.061
腎臓	絶対重量 (g)	1.684 ± 0.131	1.726 ± 0.093	1.704 ± 0.077	1.718 ± 0.096
	相対重量 (g/100 g)	0.709 ± 0.019	0.715 ± 0.007	0.709 ± 0.026	0.717 ± 0.018
脳	絶対重量 (g)	1.940 ± 0.041	1.972 ± 0.036	1.950 ± 0.039	1.940 ± 0.014
	相対重量 (g/100 g)	0.819 ± 0.039	0.818 ± 0.027	0.811 ± 0.014	0.811 ± 0.025
脾臓	絶対重量 (g)	0.568 ± 0.033	0.572 ± 0.027	0.588 ± 0.040	0.592 ± 0.038
	相対重量 (g/100 g)	0.239 ± 0.007	0.237 ± 0.005	0.245 ± 0.015	0.247 ± 0.013
解剖時体重 (g)		237.52 ± 14.22	241.34 ± 10.79	240.36 ± 4.48	239.42 ± 8.95

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-8 NiO C 投与 28 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	5
肺	絶対重量 (g)	1.032 ± 0.056	0.990 ± 0.053	0.990 ± 0.022	1.080 ± 0.042
	相対重量 (g/100 g)	0.368 ± 0.013	0.344 ± 0.011*	0.348 ± 0.008*	0.376 ± 0.005
肝臓	絶対重量 (g)	7.118 ± 0.468	7.446 ± 0.329	7.342 ± 0.509	7.416 ± 0.546
	相対重量 (g/100 g)	2.524 ± 0.062	2.586 ± 0.048	2.572 ± 0.070	2.572 ± 0.083
腎臓	絶対重量 (g)	1.828 ± 0.115	1.900 ± 0.060	1.852 ± 0.112	1.846 ± 0.065
	相対重量 (g/100 g)	0.648 ± 0.013	0.660 ± 0.019	0.648 ± 0.013	0.638 ± 0.018
脳	絶対重量 (g)	2.034 ± 0.039	2.014 ± 0.036	1.978 ± 0.038	2.042 ± 0.028
	相対重量 (g/100 g)	0.722 ± 0.019	0.700 ± 0.026	0.694 ± 0.023	0.706 ± 0.036
脾臓	絶対重量 (g)	0.614 ± 0.053	0.650 ± 0.060	0.666 ± 0.040	0.660 ± 0.026
	相対重量 (g/100 g)	0.706 ± 0.036	0.228 ± 0.013	0.236 ± 0.018	0.232 ± 0.004
解剖時体重 (g)		281.90 ± 11.83	287.84 ± 11.10	285.46 ± 12.94	288.36 ± 12.49

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-9 NiO C 投与 91 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	5
肺	絶対重量 (g)	1.166 ± 0.059	1.176 ± 0.043	1.156 ± 0.080	1.204 ± 0.046
	相対重量 (g/100 g)	0.354 ± 0.015	0.344 ± 0.009	0.344 ± 0.019	0.344 ± 0.011
肝臓	絶対重量 (g)	7.904 ± 0.228	8.384 ± 0.564	7.878 ± 0.327	8.742 ± 0.406
	相対重量 (g/100 g)	2.400 ± 0.037	2.440 ± 0.058	2.344 ± 0.068	2.492 ± 0.037
腎臓	絶対重量 (g)	2.082 ± 0.118	2.090 ± 0.126	2.110 ± 0.100	2.160 ± 0.105
	相対重量 (g/100 g)	2.492 ± 0.037	0.608 ± 0.015	0.630 ± 0.029	0.616 ± 0.017
脳	絶対重量 (g)	2.068 ± 0.054	2.060 ± 0.041	2.082 ± 0.033	2.112 ± 0.040
	相対重量 (g/100 g)	0.626 ± 0.009	0.602 ± 0.023	0.618 ± 0.018	0.604 ± 0.030
脾臓	絶対重量 (g)	0.704 ± 0.080	0.720 ± 0.032	0.712 ± 0.016	0.714 ± 0.031
	相対重量 (g/100 g)	0.214 ± 0.022	0.210 ± 0.007	0.214 ± 0.005	0.202 ± 0.008
解剖時体重 (g)		329.46 ± 8.03	343.28 ± 18.85	336.16 ± 12.28	351.00 ± 14.68

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-10 NiO D 投与 3 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	5
肺	絶対重量 (g)	0.956 ± 0.036	1.076 ± 0.073*	1.420 ± 0.066**	1.580 ± 0.063**
	相対重量 (g/100 g)	0.400 ± 0.013	0.460 ± 0.019**	0.599 ± 0.009**	0.688 ± 0.018**
肝臓	絶対重量 (g)	6.532 ± 0.347	6.370 ± 0.293	6.368 ± 0.296	6.180 ± 0.290
	相対重量 (g/100 g)	2.733 ± 0.042	2.727 ± 0.056	2.684 ± 0.032	2.689 ± 0.080
腎臓	絶対重量 (g)	1.716 ± 0.083	1.698 ± 0.069	1.744 ± 0.103	1.652 ± 0.100
	相対重量 (g/100 g)	0.718 ± 0.017	0.727 ± 0.017	0.735 ± 0.008	0.718 ± 0.019
脳	絶対重量 (g)	1.942 ± 0.041	1.980 ± 0.032	1.970 ± 0.043	1.960 ± 0.047
	相対重量 (g/100 g)	0.813 ± 0.026	0.848 ± 0.025	0.831 ± 0.030	0.853 ± 0.028
脾臓	絶対重量 (g)	0.614 ± 0.043	0.566 ± 0.015	0.588 ± 0.029	0.574 ± 0.063
	相対重量 (g/100 g)	0.257 ± 0.012	0.243 ± 0.009	0.248 ± 0.007	0.250 ± 0.025
解剖時体重 (g)		239.02 ± 11.58	233.56 ± 8.18	237.28 ± 12.18	229.86 ± 9.46

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-11 NiO D 投与 28 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	5
肺	絶対重量 (g)	1.036 ± 0.024	1.368 ± 0.063**	1.612 ± 0.069**	1.664 ± 0.137**
	相対重量 (g/100 g)	0.374 ± 0.022	0.496 ± 0.017**	0.602 ± 0.024**	0.630 ± 0.060**
肝臓	絶対重量 (g)	7.116 ± 0.346	7.094 ± 0.252	6.872 ± 0.400	6.798 ± 0.383
	相対重量 (g/100 g)	2.556 ± 0.033	2.578 ± 0.045	2.566 ± 0.079	2.568 ± 0.048
腎臓	絶対重量 (g)	1.846 ± 0.109	1.836 ± 0.077	1.836 ± 0.077	1.792 ± 0.056
	相対重量 (g/100 g)	0.664 ± 0.023	0.666 ± 0.015	0.680 ± 0.017	0.678 ± 0.013
脳	絶対重量 (g)	2.002 ± 0.030	1.976 ± 0.034	1.996 ± 0.009	1.976 ± 0.017
	相対重量 (g/100 g)	0.678 ± 0.013	0.678 ± 0.013	0.744 ± 0.023	0.748 ± 0.029
脾臓	絶対重量 (g)	0.656 ± 0.011	0.650 ± 0.025	0.644 ± 0.030	0.606 ± 0.022**
	相対重量 (g/100 g)	0.236 ± 0.013	0.236 ± 0.005	0.240 ± 0.010	0.232 ± 0.013
解剖時体重 (g)		278.62 ± 13.06	275.34 ± 6.60	267.90 ± 7.84	264.66 ± 10.64

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-10-12 NiO D 投与 91 日後の器官重量

		媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数		5	5	5	5
肺	絶対重量 (g)	1.128 ± 0.050	1.404 ± 0.036**	1.782 ± 0.169**	2.050 ± 0.138**
	相対重量 (g/100 g)	0.354 ± 0.015	0.432 ± 0.013**	0.534 ± 0.044**	0.654 ± 0.054**
肝臓	絶対重量 (g)	7.898 ± 0.199	8.146 ± 0.268	8.214 ± 0.077	8.214 ± 0.077
	相対重量 (g/100 g)	2.468 ± 0.047	2.500 ± 0.063	2.460 ± 0.045	2.426 ± 0.036
腎臓	絶対重量 (g)	2.008 ± 0.052	2.092 ± 0.052	2.102 ± 0.106	1.960 ± 0.108
	相対重量 (g/100 g)	0.626 ± 0.009	0.644 ± 0.027	0.632 ± 0.026	0.622 ± 0.029
脳	絶対重量 (g)	2.044 ± 0.036	2.080 ± 0.021	2.110 ± 0.045*	2.052 ± 0.023
	相対重量 (g/100 g)	0.640 ± 0.012	0.638 ± 0.018	0.630 ± 0.007	0.650 ± 0.040
脾臓	絶対重量 (g)	2.052 ± 0.023	0.686 ± 0.038	0.686 ± 0.038	0.654 ± 0.034
	相対重量 (g/100 g)	0.650 ± 0.040	0.210 ± 0.016	0.212 ± 0.008	0.212 ± 0.008
解剖時体重 (g)		320.06 ± 5.03	325.92 ± 9.86	333.70 ± 6.58	315.52 ± 18.62

平均±標準偏差

\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$  (媒体対照群との比較)

表 II-11-1 NiO A 投与 3 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	2 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	0/10	6/10	7/10
左肺	(0/10)	(0/10)	(2/10)	(4/10)
右肺前葉	(1/10)	(0/10)	(3/10)	(1/10)
中葉	(1/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
後葉	(1/10)	(0/10)	(6/10)	(7/10)
副葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	0/10	0/10	6/10

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数

表 II-11-2 NiO A 投与 28 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	5/10	10/10	10/10
左肺	(0/10)	(3/10)	(7/10)	(10/10)
右肺前葉	(0/10)	(1/10)	(5/10)	(10/10)
中葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(3/10)
後葉	(0/10)	(3/10)	(10/10)	(10/10)
副葉	(0/10)	(0/10)	(2/10)	(3/10)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	0/10	6/10	10/10

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数



表 II-11-3 NiO A 投与 91 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	0/10	10/10	10/10
左肺	(0/10)	(0/10)	(6/10)	(10/10)
右肺前葉	(0/10)	(0/10)	(5/10)	(10/10)
中葉	(0/10)	(0/10)	(1/10)	(4/10)
後葉	(0/10)	(0/10)	(10/10)	(10/10)
副葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(10/10)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	0/10	2/10	6/10

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数

表 II-11-4 NiO B 投与 3 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	10/10	10/10	10/10
左肺	(0/10)	(8/10)	(7/10)	(10/10)
右肺前葉	(0/10)	(5/10)	(5/10)	(3/10)
中葉	(0/10)	(4/10)	(5/10)	(3/10)
後葉	(0/10)	(10/10)	(10/10)	(9/10)
副葉	(0/10)	(6/10)	(8/10)	(8/10)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	2/10	5/10	7/10

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数

表 II-11-5 NiO B 投与 28 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	0/10	2/10	7/8
左肺	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(6/8)
右肺前葉	(0/10)	(0/10)	(1/10)	(5/8)
中葉	(0/10)	(0/10)	(2/10)	(0/8)
後葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(8/8)
副葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/8)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	0/10	1/10	1/8

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数

表 II-11-6 NiO B 投与 91 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	0/10	0/10	0/8
左肺	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/8)
右肺前葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/8)
中葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/8)
後葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/8)
副葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/8)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	0/10	0/10	0/8

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数

表 II-11-7 NiO C 投与 3 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	0/10	0/10	0/10
左肺	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
右肺前葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
中葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
後葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
副葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	0/10	0/10	1/10

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数

表 II-11-8 NiO C 投与 28 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	0/10	0/10	1/10
左肺	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
右肺前葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(1/10)
中葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
後葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
副葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	0/10	0/10	0/10

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数

表 II-11-9 NiO C 投与 91 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	0/10	0/10	1/10
左肺	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(1/10)
右肺前葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
中葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
後葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(1/10)
副葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	0/10	0/10	0/10

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数

表 II-11-10 NiO D 投与 3 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	0/10	8/10	9/10
左肺	(0/10)	(0/10)	(8/10)	(6/10)
右肺前葉	(0/10)	(0/10)	(2/10)	(6/10)
中葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(1/10)
後葉	(0/10)	(0/10)	(7/10)	(9/10)
副葉	(0/10)	(0/10)	(2/10)	(1/10)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	0/10	4/10	8/10

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数

表 II-11-11 NiO D 投与 28 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	7/10	10/10	9/10
左肺	(0/10)	(6/10)	(10/10)	(8/10)
右肺前葉	(0/10)	(1/10)	(1/10)	(1/10)
中葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(0/10)
後葉	(0/10)	(5/10)	(7/10)	(6/10)
副葉	(0/10)	(0/10)	(0/10)	(1/10)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	2/10	7/10	9/10

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数

表 II-11-12 NiO D 投与 91 日後の剖検結果

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
肺				
変色部	0 <sup>a</sup> /10 <sup>b</sup>	10/10	10/10	10/10
左肺	(0/10)	(6/10)	(10/10)	(10/10)
右肺前葉	(0/10)	(5/10)	(8/10)	(10/10)
中葉	(0/10)	(0/10)	(4/10)	(6/10)
後葉	(0/10)	(10/10)	(10/10)	(10/10)
副葉	(0/10)	(0/10)	(8/10)	(8/10)
後縦隔リンパ節				
腫大	0/10	0/10	2/10	3/10

a: 所定の所見が観察された例数を示す

b: 観察した例数を示す

( ): 肺葉の観察数

表 II-12-1 NiO A 投与 3 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	-	±5 <sup>a</sup>	±4、+1
肺胞腔内	-	-	±5	±4、+1
炎症性細胞浸潤：				
肺胞腔／肺胞壁	-	-	±3、+2	+5
気管支周囲	-	-	±1、+1	+3
血管周囲	-	-	±2	±2、+1
肺胞マクロファージの変性／壊死	-	-	-	-
肺胞マクロファージの増加	-	-	-	-
II 型肺胞上皮細胞の増生	-	-	-	±2
肉芽形成	-	-	-	-
肺胞壁の線維化	-	-	-	-
出血	-	-	-	-

-：異常なし、±：ごく軽度、+：軽度、++：中等度、+++：重度。

a：所定の所見が観察された例数を示す

表 II-12-2 NiO A 投与 28 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	-	±5 <sup>a</sup>	±4、+1
肺胞腔内	-	-	-	±4、+1
炎症性細胞浸潤：				
肺胞腔／肺胞壁	-	±1	±4、+1	+4、++1
気管支周囲	-	-	-	-
血管周囲	-	-	±2	±1、+1
肺胞マクロファージの変性／壊死	-	+3	+4、++1	+2、++3
肺胞マクロファージの増加	-	-	-	-
II 型肺胞上皮細胞の増生	-	-	±2	±1
肉芽形成	-	-	±1	-
肺胞壁の線維化	-	-	-	-
出血	-	-	-	-

-：異常なし、±：ごく軽度、+：軽度、++：中等度、+++：重度。

a：所定の所見が観察された例数を示す

表 II-12-3 NiO A 投与 91 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	-	±5 <sup>a</sup>	±5
肺胞腔内	-	-	-	-
炎症性細胞浸潤：				
肺胞腔／肺胞壁	-	-	±2、+3	±1、+4
気管支周囲	-	-	-	-
血管周囲	-	-	+3	+3
肺胞マクロファージの変性／壊死	-	±3	+5	+5
肺胞マクロファージの増加	-	±2	+3、++2	++5
II型肺胞上皮細胞の増生	-	±1	±1、+3	+4
肉芽形成	-	-	±1	±1、+2
肺胞壁の線維化	-	-	-	-
出血	-	-	-	-

-：異常なし、±：ごく軽度、+：軽度、++：中等度、+++：重度。

a：所定の所見が観察された例数を示す



表 II-12-4 NiO B 投与 3 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	-	-	-
肺胞腔内	-	-	-	-
炎症性細胞浸潤：				
肺胞腔／肺胞壁	-	±2 <sup>a</sup> 、+3	+4、++1	++5
気管支周囲	-	±3、+2	±1、+3、 ++1	+2、++2
血管周囲	-	±3、+1	±1、+2、 ++1	±1、+2、 ++1
肺胞マクロファージの変性／壊死	-	-	±1、+4	+4
肺胞マクロファージの増加	-	-	-	-
II 型肺胞上皮細胞の増生	-	-	-	-
肉芽形成	-	-	-	+1
肺胞壁の線維化	-	-	-	-
出血	-	±1、+1	+1	+2

-：異常なし、±：ごく軽度、+：軽度、++：中等度、+++：重度。

a：所定の所見が観察された例数を示す

表 II-12-5 NiO B 投与 28 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	4
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	-	-	-
肺胞腔内	-	-	-	-
炎症性細胞浸潤：				
肺胞腔／肺胞壁	-	-	-	±1 <sup>a</sup>
気管支周囲	-	-	-	-
血管周囲	-	-	-	±1
肺胞マクロファージの変性／壊死	-	-	±3	+4
肺胞マクロファージの増加	-	±3	±5	±1、+2
II 型肺胞上皮細胞の増生	-	-	-	-
肉芽形成	-	-	-	-
肺胞壁の線維化	-	-	-	-
出血	-	-	-	-

-：異常なし、±：ごく軽度、+：軽度、++：中等度、+++：重度。

a：所定の所見が観察された例数を示す

表 II-12-6 NiO B 投与 91 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	4
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	-	-	-
肺胞腔内	-	-	-	-
炎症性細胞浸潤：				
肺胞腔／肺胞壁	-	-	-	-
気管支周囲	-	-	-	-
血管周囲	-	-	-	-
肺胞マクロファージの変性／壊死	-	-	-	-
肺胞マクロファージの増加	-	-	-	±2 <sup>a</sup>
II 型肺胞上皮細胞の増生	-	-	-	-
肉芽形成	-	-	-	-
肺胞壁の線維化	-	-	-	-
出血	-	-	-	-

-：異常なし、±：ごく軽度、+：軽度、++：中等度、+++：重度。

a：所定の所見が観察された例数を示す

表 II-12-7 NiO C 投与 3 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	±1 <sup>a</sup>	±5	+5
肺胞腔内	-	-	-	±4

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-12-8 NiO C 投与 28 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	-	±4 <sup>a</sup>	±4、+1
肺胞腔内	-	-	-	-

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-12-9 NiO C 投与 91 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	-	±3 <sup>a</sup>	+5
肺胞腔内	-	-	-	±1

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-12-10 NiO D 投与 3 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	-	±3 <sup>a</sup>	+5
肺胞腔内	-	-	-	-
炎症性細胞浸潤：				
肺胞腔／肺胞壁	-	±3、+2	+5	+4、++1
気管支周囲	-	±2	±3、+2	++5
血管周囲	-	-	±3、+1	+2
肺胞マクロファージの変性／壊死	-	-	-	-
肺胞マクロファージの増加	-	-	-	-
II型肺胞上皮細胞の増生	-	±1、+1	+2	++5
肉芽形成	-	-	-	-
肺胞壁の線維化	-	-	-	-
出血	-	-	-	+1

-：異常なし、±：ごく軽度、+：軽度、++：中等度、+++：重度。

a：所定の所見が観察された例数を示す

表 II-12-11 NiO D 投与 28 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	-	±1 <sup>a</sup>	+5
肺胞腔内	-	-	-	-
炎症性細胞浸潤：				
肺胞腔／肺胞壁	-	±2	±3、+2	++5
気管支周囲	-	±2	±3、+2	++5
血管周囲	-	-	±3、+1	++2
肺胞マクロファージの変性／壊死	-	±1、+2	+5	+3、++2
肺胞マクロファージの増加	-	-	-	-
II 型肺胞上皮細胞の増生	-	±2	-	-
肉芽形成	-	-	-	-
肺胞壁の線維化	-	-	-	+1、++2
出血	-	-	-	-

-：異常なし、±：ごく軽度、+：軽度、++：中等度、+++：重度。

a：所定の所見が観察された例数を示す

表 II-12-12 NiO D 投与 91 日後の肺の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
肺				
粒子沈着：				
肺胞マクロファージ内	-	-	±1 <sup>a</sup>	+5
肺胞腔内	-	-	±1	±1、+3
炎症性細胞浸潤：				
肺胞腔／肺胞壁	-	±1、+3	+4、++1	+2、++3
気管支周囲	-	+2	+1	-
血管周囲	-	-	-	-
肺胞マクロファージの変性／壊死	-	±5	+3、++2	++5
肺胞マクロファージの増加	-	±1、+4	+5	+5
II型肺胞上皮細胞の増生	-	-	+1、++2	-
肉芽形成	-	+1	+1	+1
肺胞壁の線維化	-	-	-	+3、++2
出血	-	-	-	-

-：異常なし、±：ごく軽度、+：軽度、++：中等度、+++：重度。

a：所定の所見が観察された例数を示す

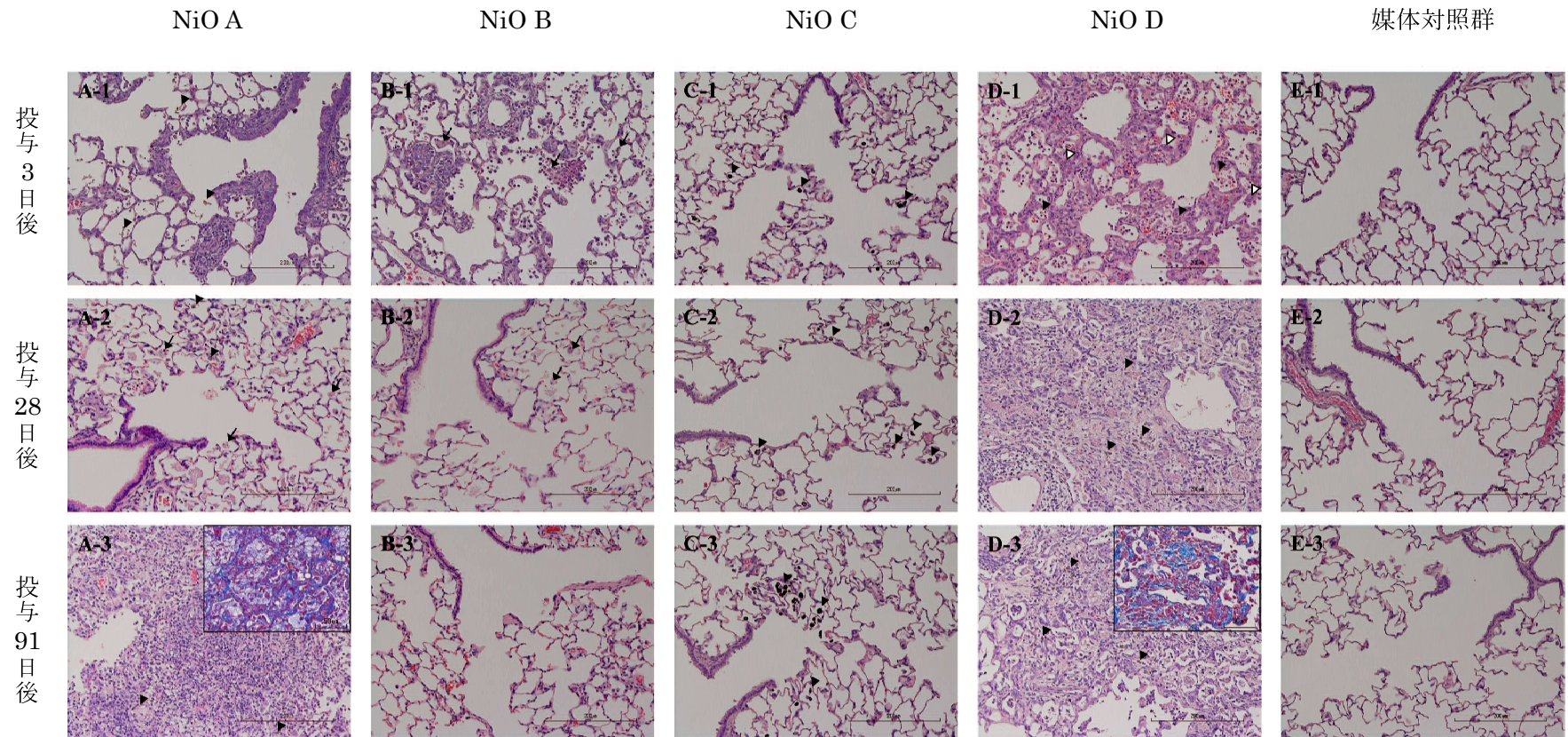


図 II-5 各 NiO 投与後 (6 mg/kg) の肺の代表体表的な病理組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

矢印: マクロファージ変性及び壊死、▲: 粒子沈着、△: II 型肺胞上皮の増生。

挿入図 (A-3、D-3) : マッソントリクローム染色像。



表 II-13-1 NiO A 投与 3 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
粒子沈着	-	-	-	-
傍皮質肥大	-	-	-	±1 <sup>a</sup> 、+1

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-13-2 NiO A 投与 28 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
粒子沈着	-	-	±1 <sup>a</sup> 、+1	±3、+2
傍皮質肥大	-	-	±1、+2、++1	±1、+2、++1

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-13-3 NiO A 投与 91 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
粒子沈着	-	±3 <sup>a</sup>	±1、+4	±2、+3
傍皮質肥大	-	-	±1	+5

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-13-4 NiO B 投与 3 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
粒子沈着	-	-	-	-
傍皮質肥大	-	+5 <sup>a</sup>	+5	±2、+1、++1

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-13-5 NiO B 投与 28 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	4
粒子沈着	-	-	-	-
傍皮質肥大	-	-	-	+1 <sup>a</sup>

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-13-6 NiO B 投与 91 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	4
粒子沈着	-	-	-	-
傍皮質肥大	-	-	-	-

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

表 II-13-7 NiO C 投与 3 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
粒子沈着	-	-	-	-
傍皮質肥大	-	-	-	-

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

表 II-13-8 NiO C 投与 28 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
粒子沈着	-	-	-	±4 <sup>a</sup>
傍皮質肥大	-	-	-	-

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-13-9 NiO C 投与 91 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
粒子沈着	-	-	-	+5 <sup>a</sup>
傍皮質肥大	-	-	-	-

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-13-10 NiO D 投与 3 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
粒子沈着	-	-	-	-
傍皮質肥大	-	±3 <sup>a</sup>	±1、+4	+5

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-13-11 NiO D 投与 28 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
粒子沈着	-	-	-	+5 <sup>a</sup>
傍皮質肥大	-	+1	±1、+3	±2、+2

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

表 II-13-12 NiO D 投与 91 日後の後縦隔リンパ節の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
粒子沈着	-	±2 <sup>a</sup>	±1、+4	+3、++2
傍皮質肥大	-	+1	+4	+4

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

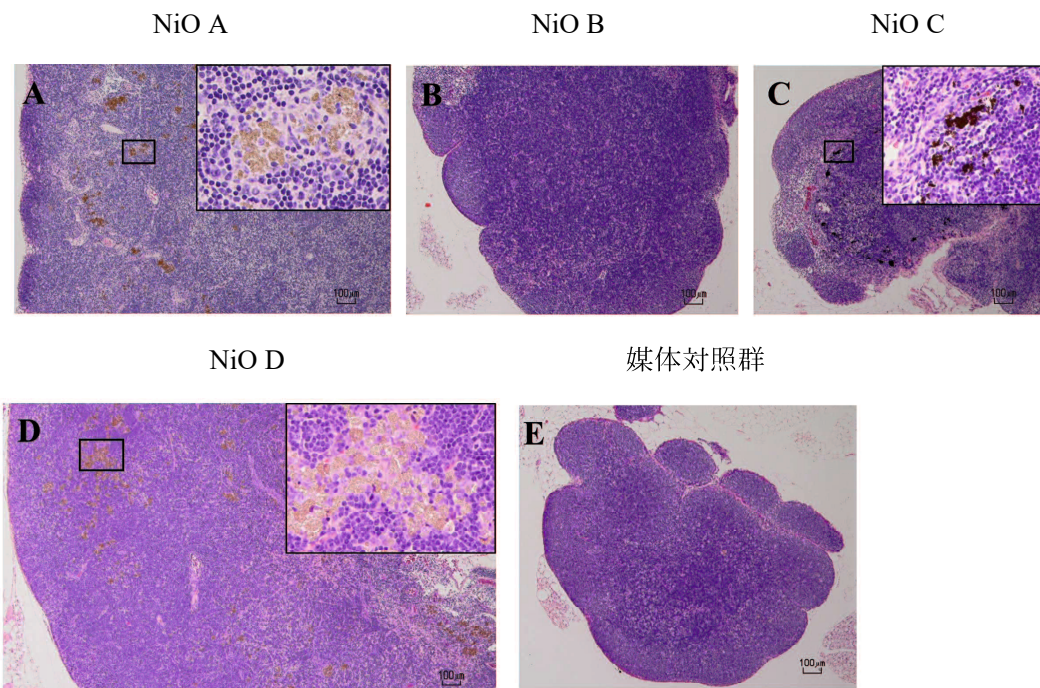


図 II-6 各 NiO 投与 91 日後 (6 mg/kg) の後縦隔リンパ節の代表的な病理組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色)  
 挿入図：強拡大像。

表 II-14 NiO B 投与 3 日後の腎臓及び脾臓の病理組織学的検査

	媒体対照群	0.67 mg/kg	2 mg/kg	6 mg/kg
検査動物数	5	5	5	5
腎臓				
皮質尿細管壊死	-	-	-	±3 <sup>a</sup> 、+2
脾臓				
萎縮	-	-	-	+5

- : 異常なし、± : ごく軽度、+ : 軽度、++ : 中等度、+++ : 重度。

a : 所定の所見が観察された例数を示す

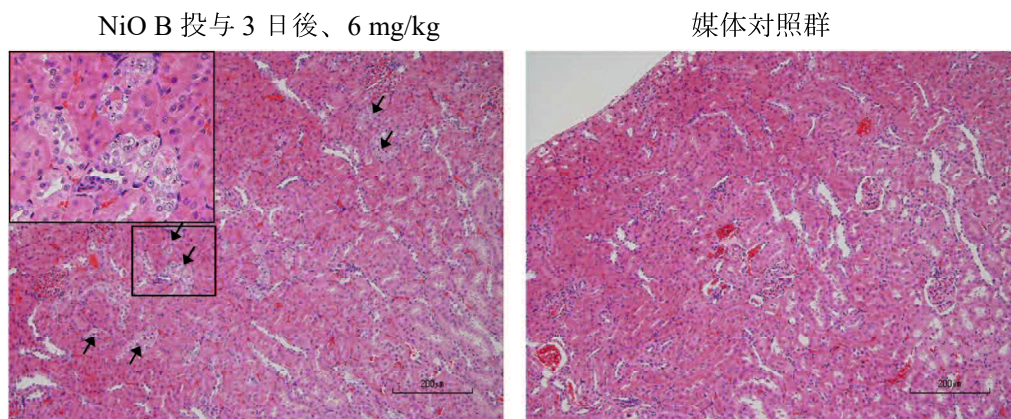


図 II-7 NiO B 投与 3 日後 (6 mg/kg) の腎臓の代表的な病理組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

矢印 : 皮質尿細管の壊死。

挿入図 : 強拡大像。