

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08789

研究課題名(和文)新規開発金属ナノワイヤーの有害性試験

研究課題名(英文)Effect of silver nanowires with fiber length on lung by intratracheal instillation

研究代表者

大藪 貴子(OYABU, Takako)

産業医科大学・産業生態科学研究所・講師

研究者番号：20320369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ粒子の有害性が懸念されている中、繊維状のナノ材料の有害性の検討はほとんどなされていない。本研究では、アスベストで有害性の指標である繊維の長さに焦点を当て、繊維径や他の物理化学的条件は同じで、長さの異なる2種類の銀ナノワイヤーを作製し、ラットに対して気管内注入試験を行い、12ヶ月までの長期の影響を調べた。その結果、肺重量や気管支肺胞洗浄液中の細胞数、好中球数、LDH活性は、長短繊維注入群ともに、注入後3日目に著しく増加したが、その変化は徐々におさまり、その影響は3ヶ月頃までであった。長短の差異については、短繊維注入群の方がその影響は長く続いた。肺の線維化や腫瘍の発生は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：For investigating the effect of length of silver nanowires on the hazard to the lungs, we performed the in vivo intratracheal instillation experiment. We made the shorter nanowires from the commercialized silver nanowires and performed the in vivo experiment and compare the biological effects. The geometric mean lengths of the original and shorter wires were 12.4 and 1.2 micro-m and the diameters of both wires were 62-64 nm. We performed intratracheal instillation examination of these 2 nanowires to rats, and evaluated the total cell, PMN counts and LDH activity in the BALF and histopathological change in lung. The increase of these indicators in BALF and tissue changes were remarkable at 3 days after the instillation of both wires. After 1 month, the reactions of the original wires were decreased but those of shorter wires were maintained. After 3 months, those of both wires were gradually diminished. From these results, shorter silver nanowires are more reactive than longer wires.

研究分野：産業医学

キーワード：銀ナノワイヤー 気管内注入試験 実験動物 BALF中好中球 病理組織変化

1. 研究開始当初の背景

粒子はナノサイズになると、ナノ領域に特有の電気的性質、光学的性質が発現する。この特性を利用して様々な新規工業ナノ材料が開発されており、今後急激にその生産量、使用量が増加すると予測される。しかし、この環境中に放出されたナノ粒子を吸入することによってミクロン粒子とは異なった反応や最初の標的臓器である肺だけでなく全身における生体影響も懸念されている。

最近では、ナノワイヤーと呼ばれる金属または金属酸化物の工業用ナノ材料が開発されはじめているが、その形状は繊維状であり、そのサイズが石綿と類似していることより、石綿と同様の有害性が懸念される。その中でも、最近、ITOに代わる透明導電膜材料などで開発が進んでいる銀ナノワイヤーは繊維状であり、石綿に類似した形状を持つ。このようなナノワイヤーが将来大量に製造されれば、その製造、使用、廃棄の過程において、ナノワイヤーが空气中に飛散し、浮遊する可能性があるため、産業界での生産、使用がはじまる前にその影響を早急に判断、評価し、その生体影響（有害性）を明らかにしておくなければ、最悪の場合、石綿のように大量使用後に重篤な健康被害が明らかとなる悲劇を繰り返す危険性がある。

研究代表者らは、これまで10年以上にわたり実験動物を用いて、数十種類の石綿および石綿代替繊維状物質、新規開発化学物質、ナノサイズ粒子の吸入曝露試験、気管内注入試験を行い、吸入性粒子の有害性を、粒子の肺内動態、病理組織学的評価、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数などを行うことにより検討してきた。

2. 研究の目的

本研究では、これらの技術を用いて、新規開発の長さの異なる銀ナノワイヤーの気管内注入試験を行い、気管支肺胞洗浄液中の細胞の反応や病理組織変化を測定することにより、銀ナノワイヤーそのものの有害性を評価するとともに、物理的因子としての“長さ”が石綿と同様に生体影響を左右する因子となるのかどうかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 本研究では、まず市販の銀ナノワイヤーから長さの異なる2種類の注入試料懸濁液を作製する。調製した懸濁液中の各繊維の径および長さの測定を行い、形状を明らかにする。
- (2) サイズ確認後、2種類の長さの試料懸濁液を深麻酔したラット肺に気管内注入する。陰性対照群として蒸留水を同容量注入する。注入されたラットを経時的(3日後、1、3、6、12ヶ月後)に解剖し、肺重量を測定する。
また、気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取

し、有害性の指標となる洗浄液中の総細胞数、炎症細胞数、細胞死の指標である乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定する。

さらに病理組織標本を作製し、病理組織評価を行う。

- (3) 注入後のナノワイヤーの肺内での存在場所が長短で異なるのかどうか、その差異が肺に与える影響に関係するのかを検討するために、BALF中の細胞や病理組織を電子顕微鏡を用いて観察し、各ナノワイヤーの存在場所と定性的な量を確認する。これらの結果から、銀ナノワイヤーの有害性に“長さ”の影響があるのかどうかを総合的に評価する。

4. 研究成果

(1) 長短の銀ナノワイヤーの作製

市販の銀ナノワイヤー蒸留水分散液(5mg/ml、Novarials製、公称径70nm、長さ45 μ m)から、超音波分散処理をし、長さの異なる短い銀ナノワイヤー懸濁液を作製した。この2種類の懸濁液は、原液は同じなので、繊維径、懸濁液濃度は同じものである。図1にそれぞれの電子顕微鏡写真を示す。

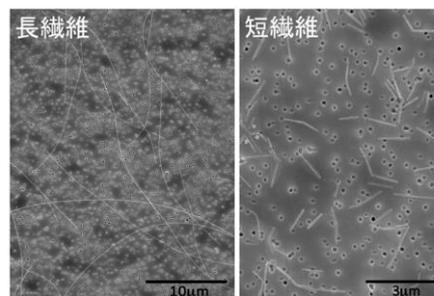


図1 長繊維、短繊維ナノワイヤーの電子顕微鏡写真

撮影した電子顕微鏡写真から市販の繊維210本、作成した短繊維282本の繊維径と長さを計測した。その分布を図2、3に示した。

図より、市販の繊維(長繊維)の幾何平均径は、64nmであり、幾何平均長さは12.4 μ mであった。作製した短繊維の幾何平均径は長繊維とほぼ同様に62nm、長さは1.2 μ mであり、短いナノワイヤーは肺胞マクロファージが十分に貪食することのできる長さであった。

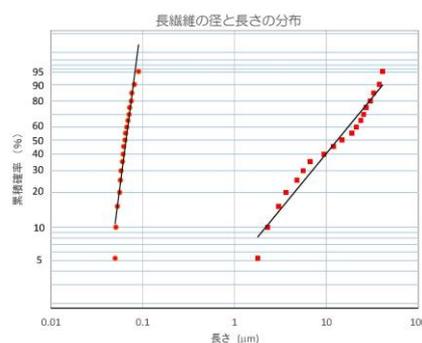


図2 長繊維の形状計測結果

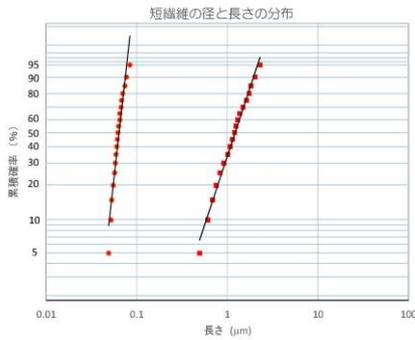


図3 短繊維の形状計測結果

(2) 気管内注入試験

原液（長繊維）と作製した分散液（短繊維）の2種類の長さの異なるナノワイヤーの分散液を滅菌蒸留水で希釈し1.25mg/mlの濃度とし、その0.4ml（銀ナノワイヤーとして0.5mg）をWistar系雄性ラットの気管内に注入を行った。陰性対照群は、滅菌蒸留水のみを同量注入した。注入したラットの匹数は、陰性対照群50匹、長短繊維注入群各75匹とした。注入後、3日、1、3、6、12ヶ月目に各群10匹ずつ深麻酔下で解剖し、各5匹に気管支肺胞洗浄を行った。洗浄は20mlの滅菌生理食塩水を数回に分けて注入し、回収できる溶液を全量回収した。洗浄液中の総細胞数は細胞成分を遠心分離後、自動血球計数器（日本光電 セルタック MEK5204）により測定し、サイトスピンによりスライド上に塗布した細胞をディフクイック染色し、光学顕微鏡目視下に細胞分画を計測した。LDH活性は、細胞毒性測定キット（Roche）を用いた。肺重量は気管支肺胞洗浄前の気管付きの重量から、気管支肺胞洗浄後に気管を切り外し測定した気管の重量を差し引く形で計算した。残りの各5匹は病理組織標本を作製し、左肺を通常ホルマリン固定後包埋し、薄切し、ヘマトキシリンとエオシンで染色した肺組織を鏡視した。また光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡、元素分析計（日立、TM-3000）を用い肺内に存在している銀ナノワイヤーの観察を行い、両群の結果の差異を検討した。長短繊維注入群の残りは繊維形状の測定用とした。

以下の図4～7に結果の経時変化を示す。

① 肺重量

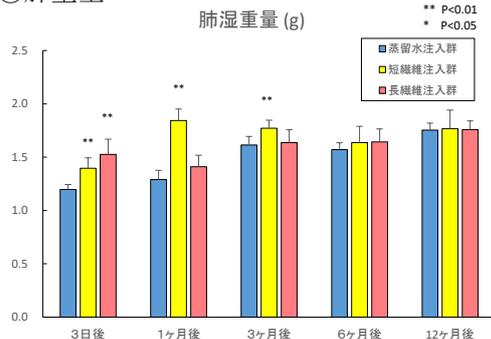


図4 肺重量の経時変化

肺重量は、注入後3日目に長短両繊維注入群で対照群に比較して有意に増加しており、その程度は長繊維注入群の方が大きかった。しかし、注入後1ヶ月を経過すると長繊維注入群ではその増加はおさまっており、対照群との有意な差は認められなくなった。逆に短繊維注入群ではさらに増加しており、その有意な増加は注入後3ヶ月目まで持続していた。その後、時間の経過とともに両注入群ともに対照群との有意な差は認められなくなった。

② 気管支肺胞洗浄液中の総細胞数

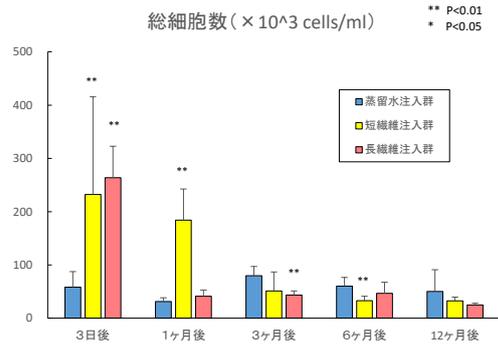


図5 気管支肺胞洗浄液中の総細胞数の経時変化

総細胞数も、注入後3日目に長短両繊維注入群で対照群に比較して有意に増加し、注入後1ヶ月を経過すると長繊維注入群ではその増加はおさまり、逆に短繊維注入群では有意な増加は継続していた。しかし、両注入群とも経時的にはおさまっており、この傾向は肺重量と同様であった。

③ 気管支肺胞洗浄液中の好中球数

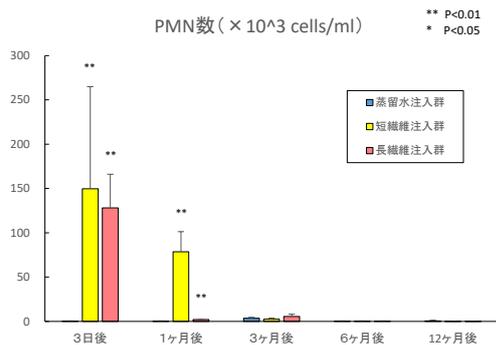


図6 気管支肺胞洗浄液中の好中球数の経時変化

炎症の指標となる好中球数も、総細胞数と同様の経時変化を示し、総細胞数の増加数は、この好中球数の増加に起因していると考えられた。

④気管支肺胞洗浄液中の LDH 活性

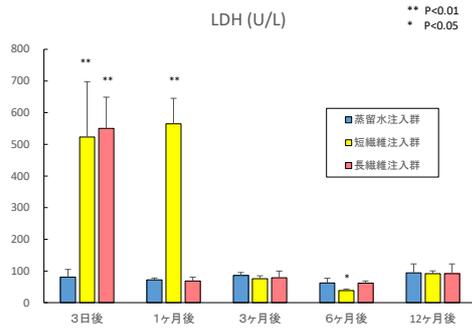


図7 気管支肺胞洗浄液中の LDH 活性の経時変化

細胞死により細胞から放出される LDH も好中球数の経時変化と同様であったが、LDH の増加が認められるラット肺では、細胞死と同時に好中球などの細胞の増加が起こっており、死んでいる細胞の種類が何であるかを明らかにすることも必要であると考えられた。

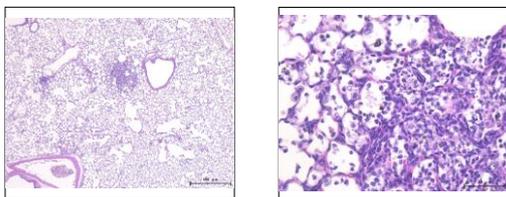
⑤病理組織変化

滅菌蒸留水を注入した陰性対照群には 12ヶ月間を通して変化は認められなかった。

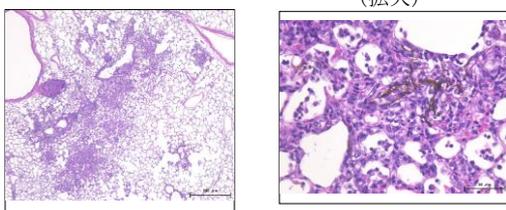
以下に各解剖時期における短繊維注入群、長繊維注入群の代表的な病理組織像とその変化について示す。

【気管内注入後 3 日目】

短繊維注入群



長繊維注入群



長短繊維注入群で、銀ナノワイヤーの沈着を伴った気管支周囲における肺胞マクロファージの増加およびⅡ型肺胞上皮細胞の増生が認められ、短繊維注入群より長繊維注入群で顕著であった。両繊維注入群ともに銀ナノワイヤーと思われる細顆粒状ないし細線維状の褐色物質の沈着が観察された。注入された長繊維は非食食性であった。

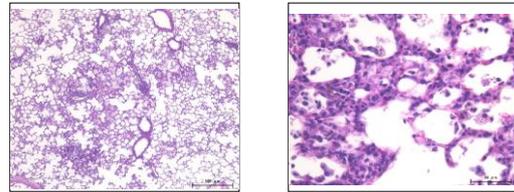
【気管内注入後 1 ヶ月目】

注入後 1 ヶ月目では、銀ナノワイヤーの沈着を伴った気管支周囲における肺胞マクロ

ファージの増加が依然として認められ、長繊維注入群より短繊維注入群で顕著であった。3日目の結果と比較して、肺胞マクロファージの増加が逆転していた。また、非食食性の銀ナノワイヤー沈着は3日目と同様に長繊維注入群のみで認められたが、発現量は著しく減少していた。

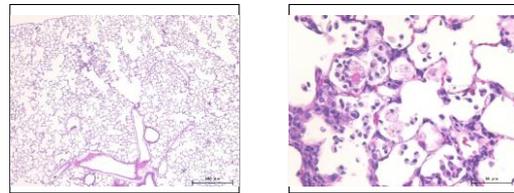
短繊維注入群

(拡大)



長繊維注入群

(拡大)

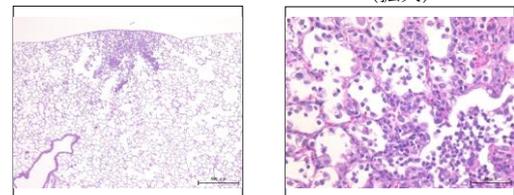


【気管内注入後 3 ヶ月目】

3ヶ月目では、Ⅱ型肺胞上皮細胞の増生を伴う肺胞マクロファージの増加および血管周囲への炎症性細胞浸潤（主に単核細胞）が認められたが、短繊維注入群および長繊維注入群の群間差は明らかでなかった。注入後1ヶ月目の所見と比較して、短繊維注入群および長繊維注入群とも肺胞マクロファージは減少しており、特に短繊維注入群で顕著であった。また、両群とも目視では銀ナノワイヤーは確認されなくなっていた。さらに、短繊維注入群ではⅡ型肺胞上皮細胞の増生および血管周囲への炎症性細胞浸潤は1ヶ月目と同程度であったが、長繊維注入群では増加していた。

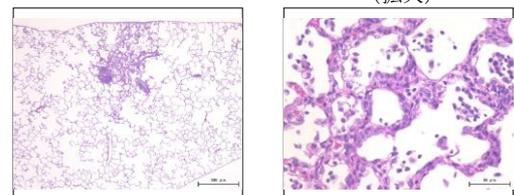
短繊維注入群

(拡大)



長繊維注入群

(拡大)



【気管内注入後6ヶ月目】

【気管内注入後12ヶ月目】

銀ナノワイヤー注入後6ヶ月目、12ヶ月目の肺についても、3日、1、3ヶ月目と同様に病理組織を検査したが、6ヶ月目、12ヶ月目の各群の肺では、対照群、短繊維注入群および長繊維注入群の全例とも、明らかな変化は観察されなかった。すでにこの時点で気管内に注入した銀ナノワイヤーの影響はなくなっていると考えられた。

銀ナノワイヤー注入後の12ヶ月間を通して、肺組織の線維化や肺内での良性および悪性腫瘍の発生は認められなかった。

(3) 電子顕微鏡を用いたナノワイヤーの存在場所と定性的な量の確認

病理組織切片においても、銀ナノワイヤーと思われる物質の量は経時的に減少していたが、この物質が銀であることを確認するために電子顕微鏡を用いて確認した。

① 気管支肺胞洗浄液中の細胞

長繊維注入群では、細胞分画計数用のサイトスピンスライドの染色画像で、マクロファージに貪食された銀ナノワイヤーが容易に確認されたが、短繊維注入群の画像では黒色の物質が銀ナノワイヤーなのか他の物質なのかの区別が付きにくかった。そこで、銀ナノワイヤーの存在を確認するために、サイトスピンスライドを元素分析計付属の電子顕微鏡で検鏡することにより、銀ナノワイヤーの存在を確認することを試みた。

まず、長繊維気管内注入後3日目の気管支肺胞洗浄液中のサイトスピン像の光学顕微鏡像を陰性対照群のスライドとともに図8に示す。

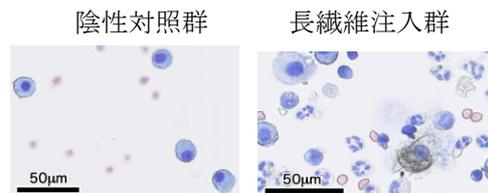


図8 陰性対照群と長繊維気管内注入後3日目の肺胞洗浄液中の細胞像

長繊維注入群の肺胞洗浄液中には、好中球が多数出現しており、肺胞マクロファージ内に長い銀ナノワイヤーと思われる繊維状物質が絡まって貪食されているのが確認できた。そこで、この物質(画像は異なる)を電子顕微鏡で確認した画像を図9に示した。

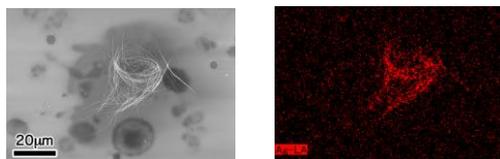


図9 長繊維気管内注入後3日目の肺胞洗浄液中の細胞の電子顕微鏡像と銀の元素分析結果

図9の左の電子顕微鏡像では肺胞マクロファージが黒く見えている。その中に絡まった繊維状物質が白く見えており、この物質を元素分析計で確認したところ、銀(右の画像で赤く見えている)であることが確認できた。

次にこの方法で短繊維注入群でも銀ナノワイヤーの存在を確認できるのかを検討した。短繊維注入後3日目の肺胞洗浄液中の細胞の光学顕微鏡像を図10に示す。

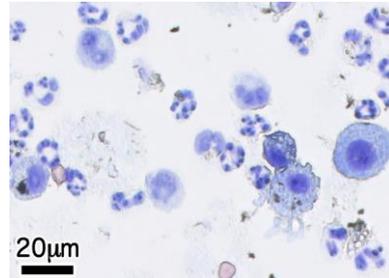


図10 短繊維気管内注入後3日目の肺胞洗浄液中の細胞像

短繊維気管内注入群も、長繊維注入群と同様に、陰性対照群に比較して多数の好中球が出現しており、肺胞マクロファージ内にも銀ナノワイヤーと思われる黒色物質が見える。この物質(画像は異なる)を元素分析計付きの電子顕微鏡で確認した。図11に示す。

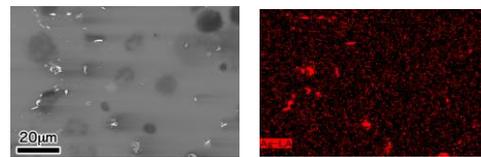


図11 短繊維気管内注入後3日目の肺胞洗浄液中の細胞の電子顕微鏡像と銀の元素分析結果

左図のマクロファージ内で白くみえる物質のほとんどは銀であり、光学顕微鏡像で確認できないマクロファージ内の黒色物質は、銀であることが想像できたが、すべての黒色物質が銀ではなく、元素分析により確認することが必要であると考えられた。しかし、このように元素分析計を用いることで、長短繊維ともに銀ナノワイヤーの存在を確認することができると考えられた。

そこで、肺組織の中の銀ナノワイヤーも同様の方法で確認することができるのかを検討した。

② 病理組織切片

注入後3日目の長繊維注入群の病理組織切片では、褐色の繊維状の物質が確認され、銀ナノワイヤーが肺のどこに存在しているのかがHE染色画像においても比較的認識されやすかったが、短繊維注入群では、繊維が細くて短いため、その存在の確認が光学顕微鏡では難しかった。そこで、電子顕微鏡を用いた方法で注入した長短の銀ナノワイヤー

が肺のどの部分に沈着し、また貪食されているのか否かを把握できるのか、病理組織切片について検討した。

図 12 に長繊維注入後 3 日目の病理画像 (HE 染色) と元素分析した電子顕微鏡画像を示す。

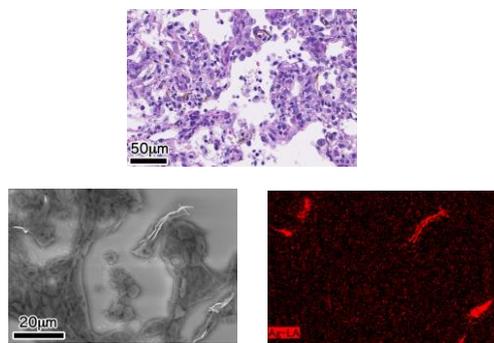


図 12 長繊維気管内注入後 3 日目の病理組織画像と一部を拡大した組織の電子顕微鏡像および銀の元素分析結果

長繊維注入後 3 日目の病理組織画像の一部を拡大し、電子顕微鏡で検鏡すると、繊維状物質が組織に沈着した状態で認められ、元素分析で銀と確認できた。この結果より病理画像で褐色に見える物質は、電子顕微鏡で白く見え、元素分析で銀であることがわかった。次に、短繊維注入後 3 日目の同様の画像を図 13 に示す。

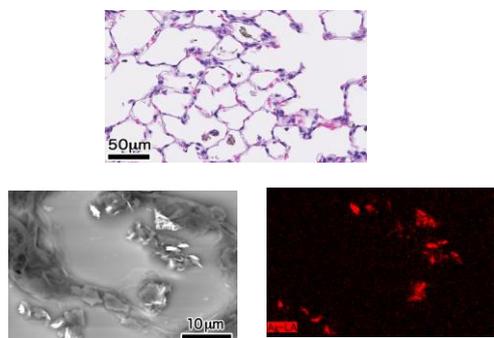


図 13 短繊維気管内注入後 3 日目の病理組織画像と一部を拡大した組織の電子顕微鏡像および銀の元素分析結果

短繊維注入群には、肺胞腔内に銀ナノワイヤーと思われる物質を貪食した肺胞マクロファージが多数出現しており、病理組織像の一部を拡大した電子顕微鏡による検鏡でもこの物質が銀であることを確認できた。

これらの結果より、非常に細い数十 nm のナノワイヤーでも元素分析計付属の電子顕微鏡を用いることにより肺組織や気管支肺胞洗浄液中の細胞に貪食されたナノワイヤーを確認することができた。今後、病理組織変化で認められた組織中のナノワイヤーの減少を確認していきたい。

(4) 研究結果のまとめ

繊維径は同じで長さの異なる銀ナノワイ

ヤーを超音波分散により作製し、その長さが有害性におよぼす影響を検討した。長短ナノワイヤーの懸濁液をそれぞれラットの気管内に 1 匹あたり 0.5mg/0.4ml の量で注入した。陰性対照群には同量の滅菌蒸留水を注入した。注入後 3 日、1、3、6、12 ヶ月目の影響を調べた。

その結果、注入 3 日目には、肺重量および肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球数、LDH 活性は長短ナノワイヤー注入群ともに有意に増加しており、長短の注入群を比較すると、長繊維注入群で短繊維注入群よりやや増加の傾向が認められたが、注入後 1 ヶ月目では、これらの増加は逆転し、短繊維注入群で長繊維注入群に比較して肺重量や、肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球数、LDH 活性が、著しく有意に増加していた。これらの指標の増加は、経時的に反応がおさまり、6 ヶ月ごろから 12 ヶ月には陰性対照群と同程度の値となった。

病理組織においては、両注入群に銀ナノワイヤーの沈着を伴った肺胞マクロファージの増加や肺胞上皮細胞の増生が認められたが、注入初期にはその程度が長繊維注入群で著しく、1 ヶ月後には逆転し、短繊維注入群に著しく認められた。これは気管支肺胞洗浄液中の有害性指標と関連していた。3 ヶ月以降は、長短繊維注入群ともに、その変化は徐々に減少し、6、12 ヶ月後には、陰性対照群と差が認められなくなっていた。組織中の銀ナノワイヤーの存在も徐々に認められなくなっていく。観察期間を通して腫瘍の発生は認められなかった。

これまでの結果から、注入後の肺重量、BALF 中の総細胞数、好中球数、LDH 活性および病理組織変化は関連しており、注入後に増加していたこれらの有害性指標は経時的におさまっていたが、その影響は長繊維注入群より短繊維注入群で長く続いていた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① T. Oyabu, et al., Pulmonary effect of silver nanowires with different length in instillation study., European Aerosol Conference 2017, 2017.
- ② 大藪貴子他、長さの異なる銀ナノワイヤーの気管内注入試験、第 90 回日本産業衛生学会、2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大藪 貴子 (OYABU, Takako)

産業医科大学・産業生態科学研究所・講師
研究者番号：20320369

(2) 研究分担者

明星 敏彦 (MYOJO, Toshihiko)

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授
研究者番号：00209959