

令和元年6月19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05257

研究課題名(和文) インジウムナノ粒子の体内吸収と毒性メカニズム

研究課題名(英文) tissue distribution and toxic mechanism of indium nano particles

研究代表者

田中 昭代 (Tanaka, Akiyo)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：10136484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：インジウム(In)ナノ粒子および三酸化インジウム(In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)をラットの気管内に1回(10 mg In/ml蒸留水)投与し、投与後36週までの肺病変、臓器In濃度、尿、糞中の1日In排泄量より生体影響、In体内分布について評価した。各In群で各臓器でInが検出され、In濃度は経時的に上昇し、36週目ではInナノ群はIn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>群に比べて各臓器のIn濃度は4～21倍の高値であった。Inの体外排泄に関し、両In群では経時的に尿一日In排泄量は増加したが、糞一日排泄量は低下し、さらに、各In群の膀胱尿中にInナノ粒子が認められた。Inナノ群の肺病変の程度はIn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>群に比べて重度であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノサイズのIn粒子の肺障害性がサブミクロンサイズの酸化インジウムに比べて肺障害性が強く発現し、粒子径が肺障害惹起性に寄与すること可能性があり、ナノサイズのインジウム粒子の生体影響には特に注意を払う必要がある。経気道性に曝露されたInナノ粒子は全主要臓器に沈着することが認められ、さらに、Inナノ粒子の極一部は粒子とし全身循環により体内臓器へ移行することが示唆されたことより、遠隔臓器の臓器障害の可能性が示唆された。インジウム作業者の疫学研究では肺以外の臓器障害は明らかではなく、全身の病態影響の解明はインジウム作業者の健康障害防止の観点から重要である。

研究成果の概要(英文)：To clarify health effects of indium nanoparticles, we studied animal experiment using rats. Rats received a dose of 10 mg In/kg of indium nanoparticles (In Metal:In(OH)<sub>3</sub>:8:2, mean diameter: 6 nm) or indium oxide(In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, mean diameter:150 nm) once intratracheally. A subset of rats was euthanized periodically throughout the study from 1 day to 36 weeks after a treatment. The indium concentration each organ in the both groups gradually increased over time until 36 weeks. The levels of indium in the organs in the In nano group was higher than that in the In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> group during observation period. The severity of lung lesions in the In nano group was more severe in comparison with the In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> group. Furthermore, indium nanoparticles were detected in the bladder urine of rats. It is necessary to consider the effects of exposure to indium nanoparticles in humans, and precautions against such exposure are paramount with regard to health management.

研究分野：環境衛生学

キーワード：インジウム ナノ粒子 体内動態 毒性メカニズム 排泄 肺障害 健康影響

## 1. 研究開始当初の背景

インジウム粉塵は強い肺炎惹起金属であり、動物実験では肺癌がん性が認められている<sup>1)2)</sup>。しかし、吸入性インジウムの体内分布と毒性発現メカニズムは未だに解明されていない。一方、インジウム作業場の環境測定において粒子径が 20nm 以下のインジウムナノ粒子の存在が確認され、インジウムナノ粒子による肺障害が懸念される。さらに、インジウムナノ粒子は肺胞マクロファージに貪食されずに粒子として肺胞上皮細胞に取り込まれて肺障害を発現し、イオン化することなく肺胞上皮細胞や血管内皮細胞を通過し、全身循環により遠隔臓器に運ばれる可能性が強く示唆される。さらに、体内に侵入したインジウムナノ粒子の一部は粒子のままトランスフェリンと結合せずに、体内を循環、各臓器に分布・沈着している可能性がある。

## 2. 研究の目的

経気道性に吸入されたインジウムナノ粒子の肺および遠隔臓器障害の報告はなく、健康影響や体内動態解明はほとんど行われていない。本研究ではインジウムナノ粒子およびサイズ効果の対照として三酸化インジウムをラットの気管内へ投与し、インジウムナノ粒子の体内分布と臓器障害発現メカニズムを総合的に評価するものである。

## 3. 研究の方法

被験物質としてインジウムナノ粒子 (In nano 粒子 (In metal:In(OH)<sub>3</sub>:8:2、一次粒子径:6 nm)) および三酸化インジウム粒子 (In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 粒子 (同:150 nm)) を用いた。実験動物として雄性 Wistar ラット (SPF) を 6 週齢で購入し、8 週齢で投与を行った。実験群は In nano 群、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群の 2 群 (各 25 匹) および対照群 (蒸留水投与、25 匹) の 3 群を設定した。各 In 被験試料は蒸留水で懸濁し、10 mg In/kg BW (1 ml/kg BW の懸濁液) を気管内に 1 回投与した。対照群には蒸留水のみを 1 ml/kg 投与した。投与後、ラットは無処置で放置し、投与日の翌日 (0 週) 1 週、4 週、12 週、36 週目に各群 5 匹ずつ安楽死させ、後大静脈より採血後、主要臓器の摘出、採取した。肺左葉は 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、常法により病理標本作製し、各時点の肺の病理評価を行なった。肺 (右葉と副葉)、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、副腎、骨髄、脳、血清は In 濃度測定に用いた。糞、尿は 36 週時評価ラットを各評価時点の前日から 24 時間代謝ケージで飼育し、1 日糞および 1 日尿を採取した。主要臓器、1 日糞および尿はマイクロウェーブ分解装置を用いて酸分解を行い、ICP-MS 装置を用いて In 濃度を測定した。さらに 36 週評価ラットの膀胱尿を採取し、SP-ICP-MS を用いて膀胱尿中の In nano 粒子の測定を行った。肺間質性肺炎マーカーの血清 SP-D 濃度は抗ラット SP-D モノクローナル抗体を用いて ELISA により測定した。肺病理組織評価、血清 SP-D 濃度、臓器 In 濃度、糞、尿中の 1 日 In 排泄量より In nano 粒子による生体影響と In 体内分布について評価した。

## 4. 研究成果

各 In 群の In 投与量は In nano 群: 3.1 ± 0.04 mg In/匹 (平均 ± 標準誤差)、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群: 3.0 ± 0.04 mg In/匹であった。体重増加の推移に関し、In nano 群および In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群では対照群と比べて有意な差は観察されなかった。各時点の In nano 群および In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群の肺重量は対照群と比べて有意に増加し、さらに In nano 群の肺重量は In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群に比べて有意に増加した。

0 週の各 In 群の肺 In 量は In nano 群: 0.6 mg (沈着率: 18%)、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群: 1.5 mg (同: 50%) であり、その後、両 In 群の肺 In 量は経時的に減少し、36 週目の肺 In 量は In nano 群: 0.2 mg (同: 6%)、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群: 0.5 mg (同: 18%) であった。0 週から 36 週までの肺に沈着した In の半減期は In nano 群 32.2 週、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群 22.4 週であった (図 1)。

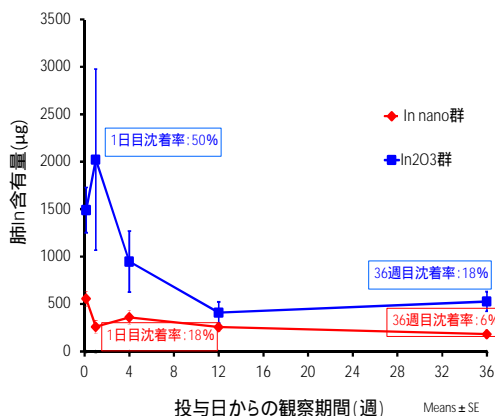


図 1 肺 In 量の推移

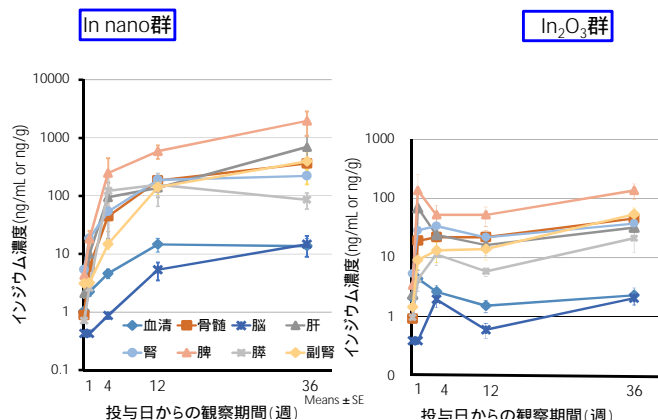


図 2 臓器 In 濃度の推移

両 In 投与群の 0 週では骨髄、脾臓、脳、副腎を除く体内の主要臓器および血清で低濃度ではあるが In が検出された。1 週目では脳を除く臓器で In が検出され、4 週目以降脳を含むすべての臓器で In が検出された。In 濃度は 36 週まで経時的に上昇した。両 In 投与群の 36 週では、ともに脾臓の In 濃度が最も高く、脳および血清中の In 濃度が最も低値を示した。さらに、In nano 群の各臓器の In 濃度は In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群の 4 倍から 21 倍高い値を示した。(図 2)。

両 In 投与群の糞 1 日 In 排泄量は 0 週から 12 週まで減少したが、12 週から 36 週まではほぼ同じレベルで推移した。36 時点での In nano 群の糞 1 日 In 排泄量は In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群の約 1.5 倍であった。In nano 群の尿 1 日 In 排泄量は 0 週から経時的に増加したが、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群では 1 週目からほぼ同じレベルで推移し、36 週時点での In nano 群の尿 1 日 In 排泄量は In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群の約 4 倍であった(図 3)。36 週までの累積 In 排泄量から In nano 群では投与量の約 12.3%、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群では 21.2% が糞中に排泄され、尿中には In nano 群では約 0.4%、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群では 0.1% が排泄された(図 4)。両 In 投与群の 36 週時の膀胱尿より In nano 粒子が検出された。

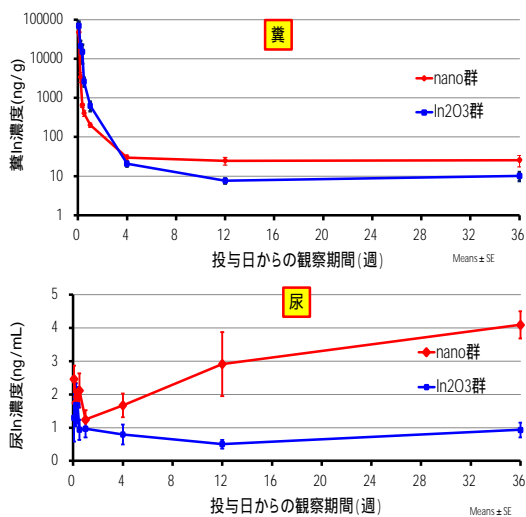


図 3 糞および尿中 1 日 In 排泄量の推移

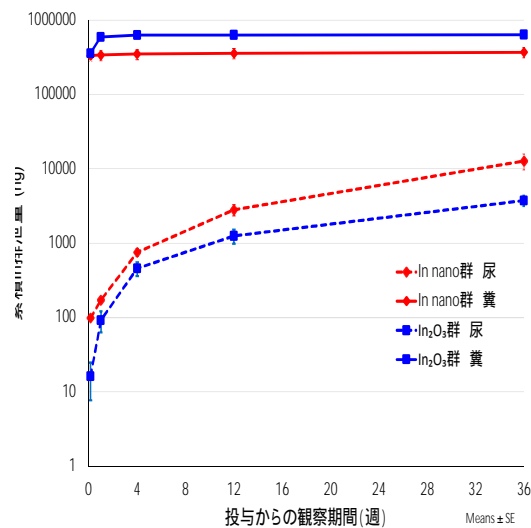


図 4 糞および尿中累積 In 排泄量の推移

肺障害の発現に関し、血清 SP-D 値は各評価時点で In nano 群および In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群は対照群に比べて有意に上昇し、さらに、In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群に比べて In nano 群で有意に上昇した(図 5)。肺の病理学的評価では、両 In 群の 0 週で軽度の肺炎、肺泡マクロファージの肺胞内への遊出、1 週目から肺胞内に壊死片を含む浸出液の貯留が観察された。12 週目から肺胞腔の拡張、肺泡・細気管支上皮細胞の増生が観察され、36 週目では肺泡・細気管支上皮細胞の増生が認められた。肺病変の程度は経時的に進展し、肺病変の程度は In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群に比べて In nano 群で強く発現した(表 1)。

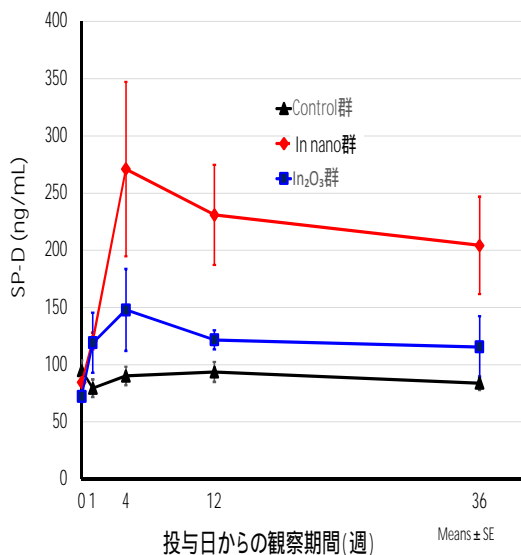


図 5 血清 SP-D の推移

表 1 In nano 群および In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 群の肺病変の推移

肺病変	観察期間(週)				
	0	1	4	12	36
肺炎	In nano	±	±	±	±
	In <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	±	±	±	±
肺泡マクロファージの遊出、集積	In nano	+	+	2+	2+
	In <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	±	+	+	2+
肺胞内に壊死片を含む浸出液の貯留	In nano	-	+	2+	2+
	In <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	+	+	+
肺胞腔内コレステリン結晶物の沈着	In nano	-	-	-	+
	In <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	±
肺胞腔拡張	In nano	-	-	-	±
	In <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	±
肺泡・細気管支上皮細胞の増生	In nano	-	-	-	+
	In <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	-	+

- : none, ± : slight, + : mild, 2+ : moderate, 3+ : severe

In nano 粒子および  $\text{In}_2\text{O}_3$  粒子の気管内投与により肺障害の程度は経時的に進展し、体内臓器のインジウム濃度は経時的に徐々に上昇し、尿、糞からの In 排泄が認められた。今回、In nano 群および  $\text{In}_2\text{O}_3$  群では同じモル濃度の In を投与したにも係わらず、In nano 群で毒性は強く発現した。毒性発現の強さは粒子径に関連している可能性がある。In nano 群では肺胞内にマクロファージの壊死片を含む浸出液の著明な沈着が観察された。このことは肺胞マクロファージが In nano 微粒子を貪食したのち In が肺胞マクロファージに対して障害性が強いために肺胞マクロファージの細胞質が崩壊し、肺胞内に中に沈着したものと推測される。さらに、粒子径と肺障害性に関して、2 種類の粒子径が異なる二酸化チタン粒子の吸入曝露ではナノサイズの二酸化チタン粒子の炎症反応がサブミクロンサイズの粒子に比べて強いという報告<sup>3)</sup>があり、インジウム化合物の粒子径と肺障害性には強い関連性があると考えられた。

不溶性の In nano 粒子や  $\text{In}_2\text{O}_3$  粒子の投与にもかかわらず、投与 1 日目には低濃度ではあるが、体内の主要臓器および血清で In が検出された。各臓器および血清の In 濃度は観察終了時まで増加したことより、肺に沈着した In nano 粒子および  $\text{In}_2\text{O}_3$  粒子から徐々に In が溶出し、全身循環により In は脾臓、肝臓、腎臓に加えて他の体内の臓器に広く分布するものと考えられる。各 In 投与群で肺から消化管への各 In 粒子の呼出が 12 週間まで続くため、糞中への In 排泄量が多いが、12 週から 36 週までほぼ In 排泄量はほぼ一定であるため、12 週以降は肺からの消化管への In 粒子の呼出が減少し、胆汁中に排泄された In が寄与の割合が大きくなったと考えられる。さらに、膀胱尿中に In nano 粒子が存在する可能性があることより、血液、臓器中においても In nano 粒子として存在する可能性が示唆された。

一方、両 In 投与群において、脾臓の In 濃度が最も高濃度であり、血液中の In 濃度の分析では全血と血清 In 濃度はほぼ同じであることから、赤血球に存在する In が寄与していると考えられる。さらに、骨髄の In 濃度も肝臓、腎臓とほぼ同じレベルであり、脾臓と同様に赤血球が寄与していると考えられる。一方、副腎の In 濃度は 3 6 週時では肝臓や腎臓と同様の濃度を示した。ラットを用いた InP の吸入曝露実験<sup>1)</sup>で褐色細胞腫の発生の報告があり、In 蓄積と腫瘍発生との関連について今後の検討が必要である。

今回の結果より、In の対外排泄は非常に遅く、長期間にわたって体内に蓄積することが明らかになった。In nano 群では肺の In 沈着量が  $\text{In}_2\text{O}_3$  群に比べて少ないにもかかわらず、肺障害の程度が強く発現し、In 化合物の粒子径が肺障害惹起性に寄与することが示唆された。

#### < 引用文献 >

- 1) National Toxicology Program (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of indium phosphide (CAS No. 22398-80-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies), NTP TR 499. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health, 2001, p.1-348.
- 2) Nagano K, Nishizawa T, Umeda Y, et al: Inhalation carcinogenicity and chronic toxicity of indium-tin oxide in rats and mice. J Occup Health 53:175, 2011.
- 3) Donaldson K et al., Ultrafine particles. Occup Environ Med., 2001; 58: 211-216.

#### 5 . 主な発表論文等

##### [ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

- 1) S. Iwasawa, M. Nakano, H. Miyauchi, S. Tanaka, Y. Kawasumi, I. Higashikubo, A. Tanaka, M. Hirata, K. Omae, Personal indium exposure concentration in respirable dusts and

serum indium level, Ind. Health, 55(1), 87-90, 2017.

DOI:org/10.2486/indhealth.2016-0015 ( 査読有 )

- 2) M.Nakano, A. Tanaka, M.Hirata, H.Kumazoe, K.Wakamatsu, D.Kamada, K.Omae, An advanced case of indium lung disease with progressive emphysema, J. Occup Health, 58, 477-481, 2016. Doi:org/10.1539/joh.16-0076-CS ( 査読有 )

[ 学会発表 ] ( 計 16 件 )

Akiyo Tanaka, Miyuki Hirata, Nagisa Matsumura, kazunori Koga, Masaharu Shiratani, Health effects of indium nano particles synthesized by plasma in water, 28<sup>th</sup> MRS-J, 18-20 December 2018, Kitakyushu

田中昭代、気腫が増悪し肺移植となったインジウム肺-4) インジウムの体内分布、第 4 6 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2018年11月30日～12月1日、北九州

田中昭代、平田美由紀、松村 渚、古閑一憲、白谷正治、インジウムナノ粒子の体内動態、2018 メタルバイオ研究会、2018年11月16日～17日(土)、仙台

小林恭子、田中昭代、平田美由紀、Chady Stephan, シングルパーティクル ICP-MS による金属ナノ粒子の特性評価とバイオモニタリング、第 6 回メタロミクス研究フォーラム、2018年11月1日～2日、八王子

田中昭代、平田美由紀、インジウムナノ粒子の体内動態と健康影響、第 2 9 回日本微量元素学会、2018年7月7日～8日、名古屋

Kyoko Kobayashi, Akiyo Tanaka, Miyuki Hirata, Chady Stephan, The metal nano-particle characterization and bio-monitoring by Single Particle(SP)-ICP-MS, Open Tox ASIA 2018, 24-25 May, 2018, Tokyo

Akiyo Tanaka, Miyuki Hirata, Nagisa Matsumura, Tissue distribution of indium after an intratracheal instillation or a subcutaneous administration of indium oxide in rats, The 32<sup>nd</sup> International Congress on Occupational Health, 29 April-4 May 2018, Dublin, Ireland

田中昭代、平田美由紀、松村 渚、古閑一憲、白谷正治、インジウムナノ粒子と三酸化インジウムのラット気管内投与による体内動態、第 5 8 回大気環境学会、2017年9月6日～8日、神戸市

田中昭代、平田美由紀、松村 渚、古閑一憲、白谷正治、インジウムナノ粒子のラット気管投与による体内動態、第 2 8 回日本微量元素学会、2017年7月29日～30日 仙台市

田中昭代、平田美由紀、松村 渚、酸化インジウムの皮下および気管内投与による臓器インジウム濃度の比較、第 9 0 回日本産業衛生学会、2017年5月10日～13日、東京  
平工雄介、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺における遺伝子発現の網羅的解析、第 8 7 回日本衛生学会、2017年3月26日～28日、宮崎市

Kazunori Koga, Akiyo Tanaka, Miyuki Hirata, Takaaki Amano, Thapanut Sarinont, Hyunwoong Seo, Naho Itagaki and Masaharu Shiratani, Long-term evaluation of In nanoparticle transport in living body, ISPlasma 2017/IC-PLANTS 2017, 2017, March 1-5, Aichi

平工雄介、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺におけるマイクロ RNA 発現の網羅的解析と標的遺伝子の探索、第 8 6 回日本衛生学会、2016年5月1日～13日、旭川市

田中昭代、平田美由紀、松村 渚、清原 裕、インジウムを構成元素とする化合物半導体 IGZO の亜慢性毒性評価、第 8 9 回日本産業衛生学会、2016年5月24日～27日、福島市

平工雄介、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺におけるマイクロ RNA と標的遺伝子の発現解析、第 8 9 回日本産業衛生学会、2016年5月24日～27日、福島市

田中昭代、平田美由紀、松村 渚、古閑一憲、白谷正治、インジウムナノ粒子のラット皮下投与による体内動態、第 2 7 回日本微量元素学会、2016年7月30日～31日、京都市

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：平田 美由紀

ローマ字氏名：HIRATA, Miyuki

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院

職名：助教

研究者番号(8桁)：30156674

研究分担者氏名：小椋 康光

ローマ字氏名：OGRA, Yasumitsu

所属研究機関名：千葉大学

部局名：薬学研究院

職名：教授

研究者番号(8桁)：40292677

研究分担者氏名：古閑 一憲

ローマ字氏名：KOGA, Kazunori

所属研究機関名：九州大学

部局名：システム情報科学研究院

職名：教授

研究者番号(8桁)：90315127

研究分担者氏名：米本 孝二

ローマ字氏名：YONEMOTO, Kouji

所属研究機関名：琉球大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：90398090

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。