

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09177

研究課題名(和文) ナノ材料による肺腫瘍発生を予測する新規システムの開発

研究課題名(英文) Development of a new system to predict lung tumor caused by nanomaterials

研究代表者

和泉 弘人 (Izumi, Hiroto)

産業医科大学・産業生態科学研究所・准教授

研究者番号：50289576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：工業用ナノ材料の有害性を評価することは、労働者が安心・安全に作業するために重要である。本研究では、実験動物の犠牲を最小限に抑え、肺腫瘍の発生前に見られる持続炎症を予測するシステムの開発を試みた。ナノ材料を気管内投与したラット肺のCT画像を定期的に撮影することで炎症と腫瘍発生が評価できることが示唆された。また、尾静脈中のエクソソームに含まれるmicroRNAの発現プロファイルを使った機械学習は持続炎症を投与後1ヶ月で予測できる可能性を示した。これらの結果から、実験動物の犠牲を最小限に抑えたCT検査とエクソソーム内包microRNA解析はナノ材料による有害性の評価と予測に貢献できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

技術革新に伴い様々なナノ材料が開発され、多くは肺への有害性が不明のまま使用されているのが現状である。労働者が安心して作業するにはナノ材料の有害性を評価して適切に使用することが必要である。ナノ材料の有害性評価においては現在でも動物実験が主流であるが、動物愛護の観点から実験動物を使う場合には犠牲を最小限に抑えることが求められる。本研究の学術的意義は、実験動物を定期的にCT撮影することで肺の炎症や腫瘍発生を評価できること、採取した血液を解析することで持続炎症を予測できることにある。社会的意義は、これらの解析が少数の実験動物で実施できること、これらの成果は労働者の安全に貢献できることにある。

研究成果の概要(英文)：Assessing the harmfulness of industrial nanomaterials is important for workers to work safely. In this study, we attempted to develop a system that minimizes the sacrifice of experimental animals and predicts persistent inflammation that occurs before the development of lung tumors. It was suggested that CT images of rat lungs intratracheally administered with nanomaterials could evaluate the inflammation and tumor development. In addition, machine learning using the expression profile of microRNAs contained in exosomes collected from the tail vein showed that persistent inflammation could be predicted one month after administration. From these results, it is possible that CT images of lungs and expression profiles of exosomal microRNAs that minimize the sacrifice of experimental animals can contribute to the evaluation and prediction of the harmfulness of nanomaterials.

研究分野：分子生物学

キーワード：ナノ材料 気管内投与 持続炎症 エクソソーム microRNA 機械学習 CT検査 実験動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

空気中には様々な粒子が存在し、呼吸とともに気管内に侵入してくる。大きな粒子であれば気道粘膜上皮細胞の線毛運動によって排除されるが、一般的に $5\ \mu\text{m}$ 以下の粒子は肺胞内に侵入する(日本産業衛生学会 許容濃度等に関する委員会「粉塵等の許容値の暫定値の提案理由書(2011年度)」。肺胞に達する粒子の中でも $20\ \text{nm}$ のナノ粒子が最も沈着率が高く、慢性気管炎や肺気腫などの慢性閉塞性肺疾患や肺がんとの関連が指摘されている(Eur J Pharmacol 533: 341-350, 2006)。肺胞内に沈着したナノ粒子はマクロファージに代表される食細胞の貪食・輸送などのクリアランス機構により徐々に排除されるが、多くの場合炎症反応を誘導する(Toxicology 294: 61-79, 2012)。炎症の程度や期間は、ナノ粒子の大きさや形、表面の素材、親水性・疎水性などにより異なることが報告されている(Environ. Health Perspect 113: 823-840, 2005, Inhal Toxicol 21: 55-60, 2009, Occup Environ Med 61: 442-447, 2004, Part Fibre Toxicol 5: 17, 2008)。一方、ナノテクノロジーの発展にはナノ材料の開発が不可欠であり、これまで多くのナノ材料が開発され、今後も様々なナノ材料が開発されることが予想される。これらのナノ材料を吸入する確率が高い人は、これらを扱う製造現場で働く労働者であり、労働者が安心・安全に作業するためにはナノ材料の肺に対する有害性を正しく評価する必要がある。

肺の有害性で重大な事象は、急性炎症の毒性による個体死と慢性炎症後に発生する腫瘍による個体死である。本研究では後者の腫瘍発生に焦点を置く。ナノ材料の吸入によって肺腫瘍が発生するかどうかを評価するには動物実験が必須であり、その観察も動物の寿命まで行う必要がある。ナノ材料の肺に対する有害性の試験方法として、全身ばく露による吸入試験がゴールドスタンダードであるが、高額な機器や高度な技術が必要であること、ナノ材料の肺内沈着量を調節することが難しいなどの問題点がある。一方、気管内にゾンを挿入し、液体に分散させたナノ材料を肺に流し込む気管内投与試験は、手技が簡便で安価であり、肺への投与量を容易に調節できる。我々は、ラットを用いた全身ばく露と気管内投与法の比較解析を行い、肺の有害性評価のスクリーニングにおいて気管内投与試験は有用であることを報告した[1-3]。未発表ではあるが、ナノ酸化ニッケルナノ材料を気管内に投与したラットにおいて 24 か月後の肺に腫瘍が 22 匹のラットのうち 3 匹に確認された。

肺における腫瘍発生の有無を確認するにはナノ材料を投与後ラットの寿命である 2 年まで観察する必要があるが、定期的に解剖すると多くの犠牲が必要になり動物愛護の観点から懸念が生じる。また、今後開発されるナノ材料は劇的に増加することが予想されることから、産業的には早期に有害性を評価することが求められる。そこで、本研究では、少数のラットを用いて簡便な気管内投与を行い、定期的な肺の CT 画像から肺の炎症を評価すること、尾静脈から採取した血液を使って腫瘍発生の前段階である持続炎症を予測するシステムの開発を目指す。

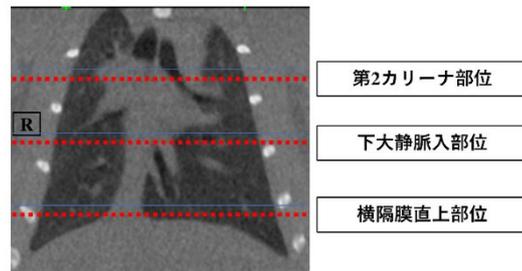


図 1

参考文献

1. Morimoto Y, [Izumi H](#), Yoshiura Y et al. Comparison of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation and inhalation of nanoparticles. Nanotoxicology. 2016;10(5):607-18
2. Morimoto Y, [Izumi H](#), Yoshiura Y et al. Significance of Intratracheal Instillation Tests for the Screening of Pulmonary Toxicity of Nanomaterials. J UOEH. 2017;39(2):123-132
3. Morimoto Y, [Izumi H](#), Yoshiura Y et al. Basic study of intratracheal instillation study of nanomaterials for the estimation of the hazards of nanomaterials. Ind Health. 2018;56(1):30-39

2. 研究の目的

少数のラットに有害性が既知のナノ材料を気管内投与し、肺の CT 画像から肺の炎症が評価できるか検討すること、尾静脈から採取した血液からエクソソームを単離し、エクソソーム内の microRNA の発現プロファイルを使った機械学習からナノ材料の有害性が予測できるか検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 4 種類のナノ材料(ナノ酸化ニッケル、ナノ酸化セリウム、ナノ酸化亜鉛、ナノ二酸化チタン)を蒸留水に分散し、ゾンデを使って 8 週齢の Wistar ラット(雄)の気管内に投与した(各群 9 匹合計 45 匹)。投与量は $1\ \text{mg}$ ($0.4\ \text{mL}$) で対照群には蒸留水を $0.4\ \text{mL}$ 投与した。投与後、1 週、2 週、3 週、1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月、5 ヶ月、6 ヶ月、8 ヶ月、12 ヶ月、16 ヶ月、20 ヶ月に麻酔下で肺の 3D マイクロ X 線 CT 検査を実施した。CT 撮影時にラットの呼吸を同調させ、吸気時における CT 画像を解析に用いた。全肺を 3D 化して炎症部位の体積を測定することが理想と考えたが、撮影範囲がラットの肺より小さいため、3 ヶ所の横断面(図 1: 第 2 カリナーナ部位、下大静脈流入部位、横隔膜直上部位)における「高吸収域の割合」を測定し平均した。また、同時に尾静脈より $1\sim 2\ \text{mL}$ 採血し、血漿に分離したのち解析まで -80°C で保存した。投与

後 16 ヶ月以降において約半数のラットが死亡したため、20 ヶ月で全解剖を実施した。定期的に CT 検査と採血を行うラット以外に、ナノ酸化ニッケルとナノ二酸化チタンの投与後、3 週で解剖するラットを用意した。気管内投与、飼育、解剖は産業医科大の動物実験管理規程に則り苦痛が伴わないように配慮した。

(2) ラットの血漿 0.5 mL から精密ろ過法でエクソソームを単離した。具体的には、血漿を 200 nm のシリンジフィルターを通過させ、さらに 50 nm のシリンジフィルターを通過させた。50 nm のシリンジフィルターに捕捉されたエクソソームに含まれる全 RNA をフェノールで抽出して精製した。精製した全 RNA を使って microRNA のマイクロアレイ解析 (東レの 3D-Gene®) を実施した。チップには 761 種類のプローブが搭載されている。

4. 研究成果

これまでに 4 種類のナノ材料 (ナノ酸化ニッケル、ナノ酸化セリウム、ナノ酸化亜鉛、ナノ二酸化チタン) の有害性は、ラットを使った動物実験の病理組織診断と肺胞洗浄液中の炎症指標 (炎症細胞浸潤や各種サイトカインの濃度など) からナノ酸化ニッケルとナノ酸化セリウムは有害性が高く、ナノ酸化亜鉛とナノ二酸化チタンは有害性が低いと報告した。経時的にラットを解剖した場合、有害性のスクリーニングは投与後 1 ヶ月から 3 ヶ月の結果で可能であると考えている。そこで、早期に有害性を予測するため、ナノ材料を投与後 1 ヶ月の肺 CT 画像とエクソソーム内包 microRNA の解析に注力した。

(1) ナノ材料の気管内注入による肺の悪性腫瘍の発生

本研究では、再度 4 種類のナノ材料 (ナノ酸化ニッケル、ナノ酸化セリウム、ナノ酸化亜鉛、ナノ二酸化チタン) を各 1 mg を気管内投与した。16 ヶ月以降に死亡するラットが増えたため 20 ヶ月で全ラットを解剖した。20 ヶ月以前に死亡したラットについてはその都度解剖を行い、肺腫瘍の有無を評価した。その結果、ナノ酸化ニッケルを投与したラット肺に扁平上皮がん (図 2: 投与後 19 ヶ月で死亡) と浸潤性粘液腺がん (図 3: 投与後 20 ヶ月に解剖を実施) を各 1 匹ずつ観察した。他のナノ材料を投与したラットおよび蒸留水を投与したラットでは肺に腫瘍は観察されなかった。肺に扁平上皮がんを発生し 19 ヶ月で死亡したラットは直前の 16 ヶ月の CT 画像において腫瘍の陰影は確認できなかった。一方、肺に浸潤性粘液腺がんを発生したラットは最終解剖時である 20 ヶ月まで生きており、解剖の直前に撮影した CT 画像で腫瘍陰影が確認できた (図 4: 赤の矢印)。

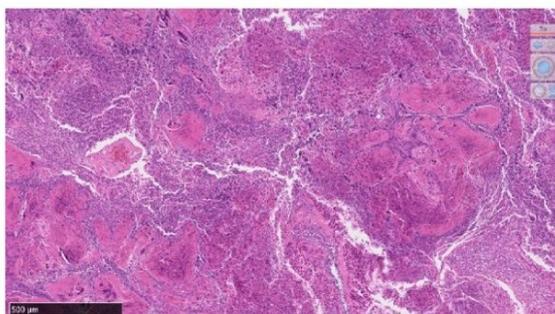


図 2

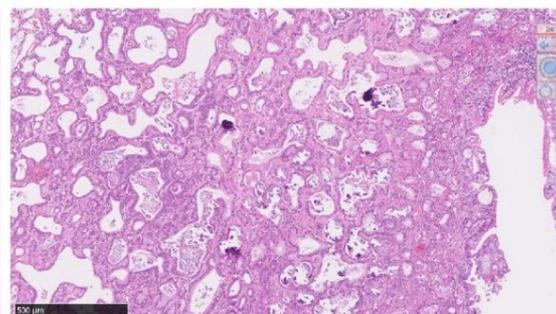


図 3

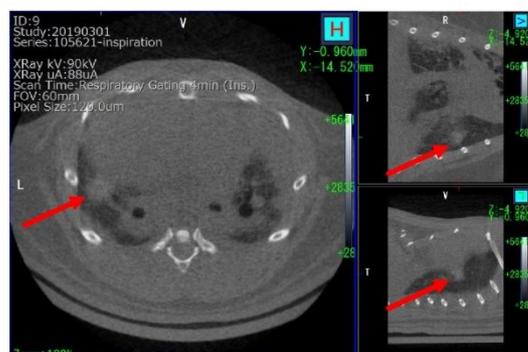


図 4

(2) 有害性の高いナノ酸化ニッケルと低いナノ二酸化チタンの投与肺における病理学的評価と CT 画像の比較

未処理のラット肺 (8 週齢) の CT 画像を図 5 に示す。ナノ酸化ニッケルとナノ二酸化チタンを各 1 mg 投与した 3 ヶ月後のラット肺の CT 画像と HE 染色を図 6 に示す。有害性の高いナノ酸化ニッケルでは肺胞内に炎症細胞の浸潤が観察されたが、有害性の低いナノ二酸化チタンでは炎症細胞の浸潤は少なかった。肺の CT 画像では、蒸留水あるいはナノ二酸化チタンを投与した肺に比べてナノ酸化ニッケルを投与した肺では高吸収域の割合が高く、高吸収域は炎症細胞の浸潤と関連することが示唆された。

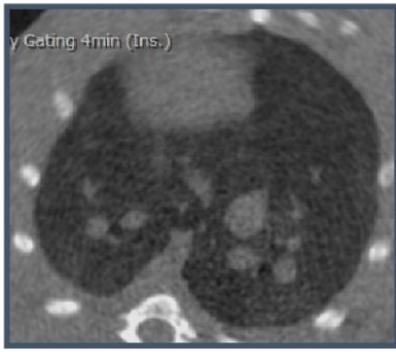


図 5

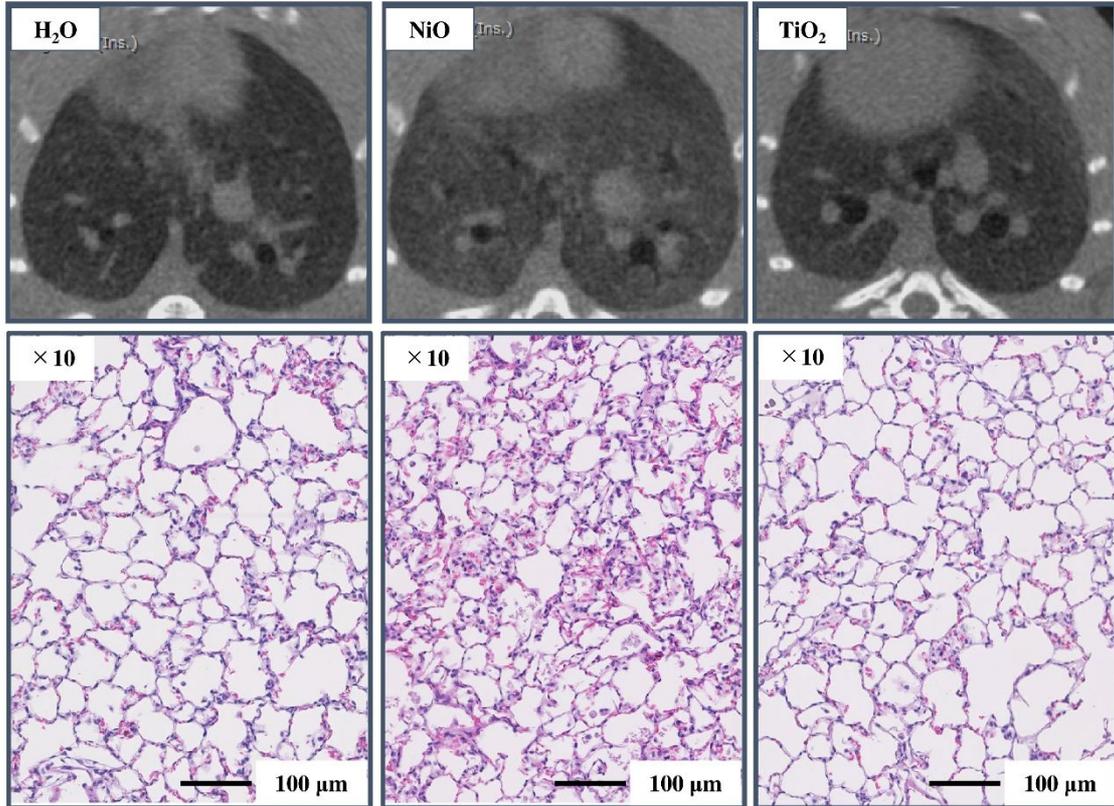


図 6

(3) 3D マイクロ X 線 CT 検査による炎症の推移

4 種類のナノ材料および蒸留水を投与した肺の吸収域を数値化した。これらの結果から各ナノ材料における吸収域から蒸留水の吸収域の平均を引いて、高吸収域の割合を求めた。図 7 に各ナノ材料における高吸収域の割合の経時的推移を示す。有害性の高いナノ酸化ニッケルとナノ酸化セリウムは高吸収域の割合が高く、12 ヶ月後まで高い値が持続していた。一方、有害性が低いナノ酸化チタンとナノ酸化亜鉛では高吸収域の割合は 12 ヶ月後まで低い値であった。

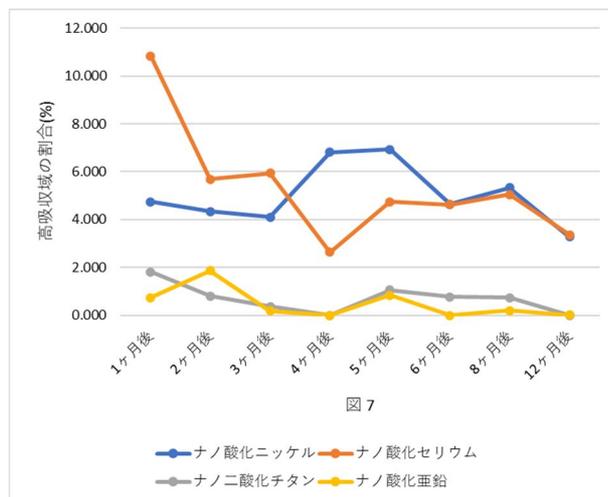


図 7

(4) 血漿エクソソーム内包 microRNA の発現プロファイルによる有害性予測の機械学習

4 種類のナノ材料と対照群から各 4 匹を選定（合計 20 匹）し、血漿からエクソソームを単離した。エクソソームに含まれる microRNA のマイクロアレイ解析から 1 匹以上に発現が確認された microRNA は 603 種類あった(20 匹すべてにおいて発現が確認されなかった microRNA は 158 種類)。603 種類の microRNA の発現量を統計解析ソフト (JMP14 pro) で分析した。実測値として蒸留水を有害性「無」、ナノ酸化亜鉛とナノ二酸化チタンを有害性「低」、ナノ酸化ニッケルとナノ酸化セリウムを有害性「高」の 3 群に分けて判別分析を行った (図 8)。

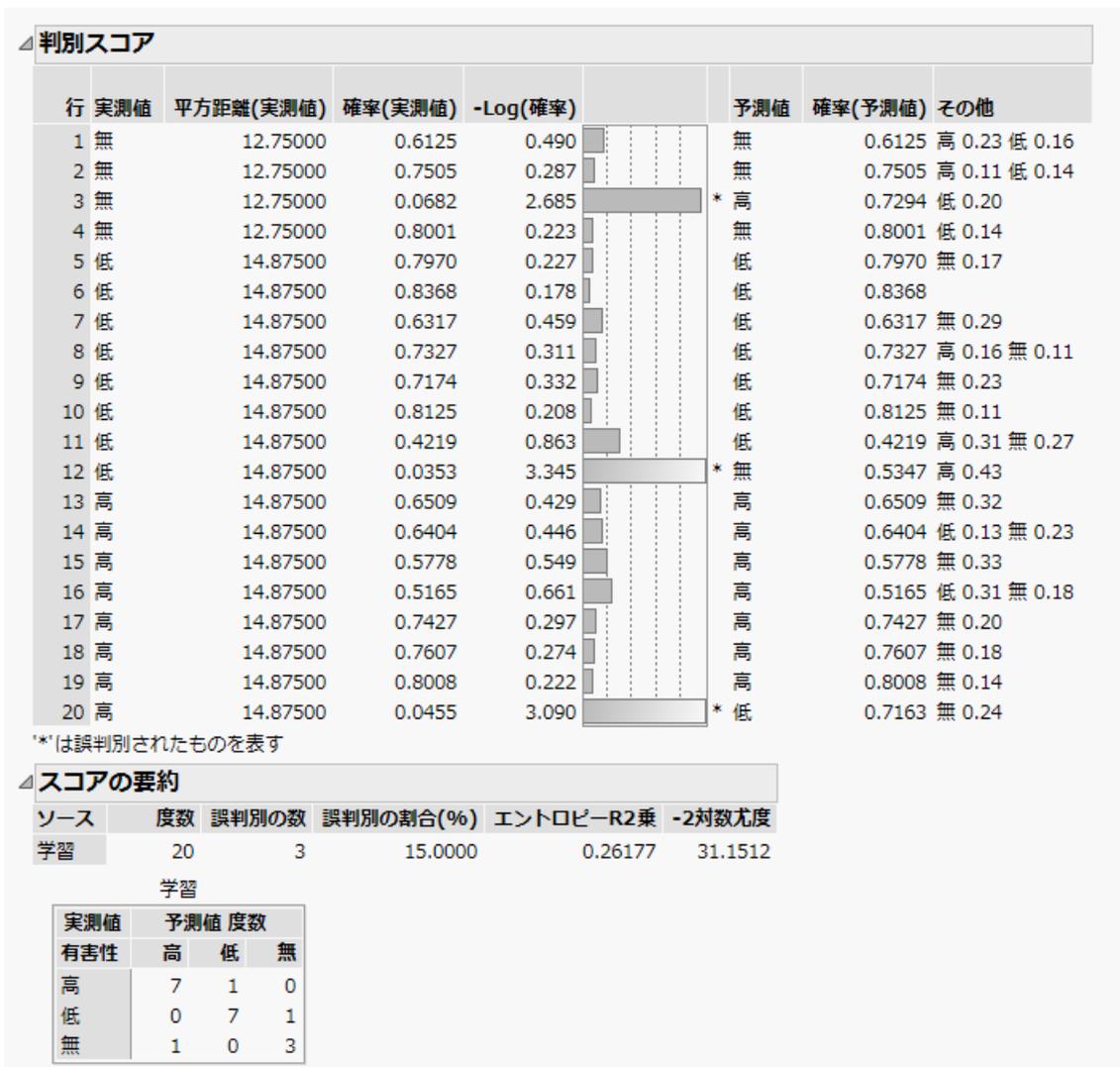


図 8

図 8 の行の番号 1~4 は蒸留水、5~8 はナノ二酸化チタン、9~12 はナノ酸化亜鉛、13~16 はナノ酸化ニッケル、17~20 はナノ酸化セリウムである。20 匹のうち 17 匹は正しく判別したが、蒸留水を投与したラット 1 匹を有害性「高」に、ナノ酸化亜鉛を投与したラット 1 匹を有害性「無」に、ナノ酸化セリウムを投与したラット 1 匹を有害性「低」に誤判別し、正解率は 85%であった。しかしながら、ナノ二酸化チタンではすべてを有害性「低」に、ナノ酸化ニッケルではすべてを有害性「高」に判別し、ナノ酸化亜鉛では 3 匹を有害性「低」に、ナノ酸化セリウムでは 3 匹を有害性「高」に判別しているの、群としては適正に判別していると考えている。

(5) まとめ

本研究の成果は、肺の CT 画像から炎症を定量できる可能性や腫瘍陰影を発見できる可能性を示唆している。CT 画像で観察される高吸収域は炎症細胞の浸潤だけでなく、線維化でも認められる可能性があるが、今回使用した 3D マイクロ X 線 CT 検査装置の解像度では両者を区別することは難しいと考える。また、エクソソーム内包 microRNA の発現プロファイルを機械学習させることで、ナノ材料の有害性を予測できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tomonaga Taisuke, Izumi Hiroto, Yoshiura Yukiko, Myojo Toshihiko, Oyabu Takako, Lee Byeong-Woo, Okada Takami, Marui Takashi, Wang Ke-Yong, Kubo Masaru, Shimada Manabu, Noguchi Shingo, Nishida Chinatsu, Yatera Kazuhiro, Morimoto Yasuo	4. 巻 15
2. 論文標題 Usefulness of myeloperoxidase as a biomarker for the ranking of pulmonary toxicity of nanomaterials	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Particle and Fibre Toxicology	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12989-018-0277-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oyabu Takako, Myojo Toshihiko, Lee Byeong-Woo, Okada Takami, Izumi Hiroto, Yoshiura Yukiko, Tomonaga Taisuke, Li Yun-Shan, Kawai Kazuaki, Shimada Manabu, Kubo Masaru, Yamamoto Kazuhiro, Kawaguchi Kenji, Sasaki Takeshi, Morimoto Yasuo	4. 巻 18
2. 論文標題 Biopersistence of NiO and TiO2 Nanoparticles Following Intratracheal Instillation and Inhalation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2757 ~ 2757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18122757	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 MORIMOTO Yasuo, IZUMI Hiroto, YOSHIURA Yukiko, FUJISAWA Yuri, YATERA Kazuhiro, FUJITA Katsuhide, MARU Junko, ENDOH Shigehisa, HONDA Kazumasa	4. 巻 56
2. 論文標題 Basic study of intratracheal instillation study of nanomaterials for the estimation of the hazards of nanomaterials	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ind Health	6. 最初と最後の頁 30 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2486/indhealth.2017-0082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 森本 泰夫, 和泉 弘人, 吉浦 由貴子, 藤澤 有里, 友永 泰介, 丸居 誉, 岡田 崇願, 大藪 貴子, 明星 敏彦, 西田 千夏, 矢寺 和博
2. 発表標題 工業用ナノ材料の有害性評価 -免疫染色法の有用性-
3. 学会等名 第91回日本産業衛生学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和泉 弘人, 吉浦 由貴子, 藤澤 有里, 丸居 誉, 友永 泰介, 大藪 貴子, 岡田 崇顧, 明星 敏彦, 森本 泰夫
2. 発表標題 ナノ材料の肺有害性を評価するmicroRNAの探索
3. 学会等名 第91回日本産業衛生学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸居 誉, 吉浦 由貴子, 和泉 弘人, 友永 泰介, 藤澤 有里, 西田 千夏, 矢寺 和博, 森本 泰夫
2. 発表標題 酸化タングステンの吸入ばく露試験による有害性評価
3. 学会等名 平成30年度日本産業衛生学会九州地方会学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉浦由貴子, 和泉弘人, 藤澤有里, 森本泰夫
2. 発表標題 ナノ材料の有害性の早期予測のための新規バイオマーカーの検索
3. 学会等名 第35回産業医科大学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉浦由貴子, 和泉弘人, 藤澤有里, 友永泰介, 丸居誉, 藤田克英, 森本泰夫
2. 発表標題 気管内注入試験によるナノ材料の有害性評価 -注入器具の違いによる肺の反応性の検討
3. 学会等名 平成29年度日本産業衛生学会九州地方会学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森本泰夫, 和泉弘人, 吉浦由貴子, 藤澤有里, 友永泰介, 大藪貴子, 明星敏彦
2. 発表標題 工業用ナノ材料の有害性評価システムの検討
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉浦由貴子, 和泉弘人, 藤澤有里, 友永泰介, 大藪貴子, 明星敏彦, 森本泰夫
2. 発表標題 シリカ粒子気管内注入によるBALF中SP-Dの検討
3. 学会等名 第90回日本産業衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和泉弘人, 吉浦由貴子, 藤澤有里, 友永泰介, 大藪貴子, 明星敏彦, 森本泰夫
2. 発表標題 ナノ材料による肺の有害性を遺伝子発現量で早期に評価する方法の開発
3. 学会等名 第90回日本産業衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森本泰夫, 和泉弘人, 吉浦由貴子, 藤澤有里, 友永泰介, 大藪貴子, 岡田崇願, 明星敏彦
2. 発表標題 気管内投与試験が吸入毒性評価スクリーニング試験として有用性
3. 学会等名 第90回日本産業衛生学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Fujisawa Y, Tomonaga T, Oyabu T, Myojo T, Shimada M, Kubo M
2. 発表標題 Estimation of pulmonary toxicity of nanomaterials following subacute inhalation
3. 学会等名 The European Aerosol Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Marui T, Izumi H, Yoshiura Y, Fujisawa Y, Morimoto Y
2. 発表標題 Gene expression and mutation analyses of lung tumor in rat by intratracheal administration of nickel oxide nanomaterials.
3. 学会等名 The 27th Japan・Korea・China Conference on Occupational Health (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Fujisawa Y, Yatera K, Fijita K, Maru J, Endoh S, Honda K
2. 発表標題 Effect of different injection tube on the pulmonary inflammation following intratracheal instillation nanomaterials for hazard estimation.
3. 学会等名 The 27th Japan・Korea・China Conference on Occupational Health (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----