

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590612

研究課題名（和文）磁界測定法によるナノ粒子の生体影響評価

研究課題名（英文）The living body impact statement of the nanoparticle by the magnetic measurement

研究代表者

工藤 雄一郎（KUDO YUICHIRO）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60348505

研究成果の概要（和文）：

本研究ではナノ粒子の一つであるフラーレンとその誘導体であるPCBMの生体影響を肺磁界測定法を用いて評価した。フラーレンとPCBMをオスWisterラット6匹に0.5ml気管内投与した。その後外部磁化をかけ、ラットから発生する残留磁界を20分間測定した。また、各測定日の磁化直後の残留磁界をプロットし四酸化三鉄の肺からのクリアランスを求めた。残留磁界とクリアランスはフラーレンとPCBM投与群ともに正常であった。以上から投与3ヶ月後までの観察期間でフラーレンとPCBMの肺障害性は見られなかった。

研究成果の概要（英文）：

I used lungs magnetic field mensuration, and the living body of PCBM which was the fullerene which was the one of the nanoparticles and the derivative evaluated influencing it in this study. A 0.5ml trachea administered fullerene and PCBM to six male Wister rats. For outside magnetization, I measured the residual magnetic field that occurred from a rat afterwards for 20 minutes. In addition, I plotted a residual magnetic field just after the magnetization of each measurement day and demanded the clearance from four three oxidation iron lungs. As for the residual magnetic field and the clearance, fullerene and a PCBM treated group were normal together. The lungs disorder characteristics of PCBM were not thought to be fullerene in the observation periods from the above to three dosage back issues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：肺磁界測定法、緩和、クリアランス、肺障害性、フラーレン、ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノテクノロジーの進歩によりナノ粒子と呼ばれる微小粒子の開発が進んでい

る。代表的な物質であるフラーレンやカーボンナノチューブは半導体や化粧品などに使用されている。これらの物質の健康影響は、呼吸器系さらに心臓血管系および中枢神経系などへ移行しこれらの臓器への影響が報告されているが、未解明の部分も多い。

私どもの研究室では、これまでに磁界測定法という方法を用いて、アスベスト代替品などの繊維状物質やトナーなどの粒子状物質の安全性評価を行ってきた。また、アスベスト代替品の一種であるロックウールやセラミックファイバーをラットに対し鼻部吸入曝露または気管内注入実験を施行し、ロックウールやセラミックファイバーの肺への影響を評価してきた。吸入された物質は気管・気管支を経て肺胞に到達する。肺胞では肺胞マクロファージが経気道的な異物の侵入に対する防御機構として中心的な役割を担っている。

そこで、安全性評価が急務とされる様々なナノ粒子のうち、注目されているフラーレンとその誘導体 (PCBM) について、生体影響評価のため、ラットに対し気管内注入実験を行なった。その後肺障害性の評価のため、注入されたラットを用いて肺磁界測定法を行い、*in vivo* におけるナノ粒子の安全性評価を行なった。

2. 研究の目的

近年、ナノテクノロジーの進歩によりナノ粒子と呼ばれる微小粒子の開発が進んでいる。代表的な物質であるフラーレンやカーボンナノチューブは半導体や化粧品などに使用されている。これらの物質の健康影響は、呼吸器系さらに心臓血管系および中枢神経系などへ移行し、臓器への影響が報告されているが、未解明の部分も多い。

当研究室では、アスベスト代替品（特にロックウールやセラミックファイバー）の繊維状物質や、トナーなどの粒子状物質を、ラットに鼻部吸入曝露または気管内投与を行い、磁界測定法を主体に生化学的、形態学的方法を用いて総合的に肺への影響を評価してきた。吸入された物質は気管・気管支を経て肺胞に到達する。肺胞では肺胞マクロファージが経気道的な異物の侵入に対する防御機構として中心的な役割を担っている。磁界測定法とは、異物を貪食する際に重要な役割を果たすマクロファージの細胞骨格機能を測定し、マクロファージの障害性を評価する方法である。細胞磁界測定法では、アスベスト代替品のロックウールは日本製、EU製ともに石綿の一種であるクリソタイルに比べ細胞障害性が低かった。また、セラミックファイバーを用いた細胞磁界測定法ではセラミックファイバーは石綿の一種であるクリソタイル

に比べ細胞障害性が低かった。さらに細胞レベルだけでなく、肺への影響を評価する必要があり、我々はロックウールを用いた肺磁界測定法を行った。この実験では、ラットに対し、ロックウールを1日6時間吸入させた。その後、ラット肺から発生する残留磁界を測定した。その結果、ロックウールのラットに対する肺障害性は低かった。これらのことからロックウールは細胞および肺への障害性が低いことが示唆された。

以上のことからナノ粒子に関して肺への影響を評価することは大変重要であるが、肺磁界測定法を用いてナノ粒子の安全性を評価する研究は、これまで行われて来なかった。そこで、安全性評価が急務とされるナノ粒子のうち、フラーレンとその誘導体 (PCBM) について、*in vivo* における安全性評価として、ラットに気管内投与を行なった。その後肺障害性の評価のため、注入されたラットを用いて肺磁界測定法を行い、*in vivo* におけるナノ粒子の安全性評価を行なった。

3. 研究の方法

ナノ粒子は凝集しやすく、投与するにあたり、分散剤にフラーレンおよびPCBMを混ぜて実験を行った。実験をするにあたりラットは、実験室の環境に慣らすため、1週間程ケージで予備飼育した。餌及び水は自由摂取とした。飼育室内は、気温22℃、湿度40%の新鮮な過空気に保った。フラーレンとその誘導体であるPCBMをオスWisterラット8から10週令6匹に100 μ g/ml, 200 μ g/mlをあらかじめ分散材（界面活性材）を混ぜた試料を0.5mlを1日1回気管内に単回投与した。

分散材がラットに影響を与えるかを確認するため分散材を単独で40 μ g/ml, 80 μ g/mlに調整し、ラット各6匹ずつ同様に投与した。

さらに陰性対照群として食塩水0.5mlをラット6匹に同様に投与した。肺磁界測定は相澤らが行った方法に従い行われた。今回の実験では、磁性粒子として四三酸化鉄（戸田工業株式会社、東京）が使用された。今回の実験で使用した四三酸化鉄の幾何平均径は0.26 μ mであった。曝露終了1日後に、フラーレン投与群、PCBM投与群、分散剤投与群と生理食塩水投与群のラットにジエチルエーテルで吸入麻酔をし、カテーテルを介して四三酸化鉄（戸田工業社(株)）3mgを生理食塩水0.2mlに懸濁させたものを気管内注入した。肺磁界測定時にはラットにネンブタール(0.15ml/100g)を腹腔内麻酔し、肺磁界測定装置のラットホルダーにのせ、磁化器の直上に肺がくるようにセットし、胸部全体をヘルムホルツ型コイルにより50mTで1秒間磁化

した。その後 20 分間、胸部の残留磁界をフラックスゲート磁束計にて測定し、残留磁界の測定値はパソコン上に出力した。ラットホルダーは 12 秒間に 1 回プローブ上を通るようになっている。また、磁場に与える影響(ノイズ)を排除するため磁気シールドを設置した。この肺磁界測定を気管内投与終了 1 日後、3 日後、7 日後、14 日後、28 日後、3 ヶ月後に行った。

磁化後 40 分間の残留磁界を測定し、緩和の程度を表す緩和曲線を求めた。また、磁化後 2 分間の残留磁界を対数変換するとほぼ直線になるので、この直線と Y 軸との交点を B_0 とした。従って、磁化中止 t 秒後の残留磁界を B 、磁化直後の残留磁界を B_0 、緩和係数を λ とすると、 $B=B_0e^{-\lambda t}$ と表すことができ、この式から緩和係数(λ)を求めた。また各測定日の B_0 を、曝露終了 1 日後を 100%としてプロットし、肺内四三酸化鉄のクリアランスを求めた。

ラットは重量測定を週 1 回行い、実験期間中は継続的にラットの状態を観察し、外観上の兆候に変化がないかを確認した。

実験結果は、フラレン投与群、PCBM 投与群、分散剤投与群と生理食塩水投与群各 6 匹の算術平均値 \pm 標準誤差により示した。緩和曲線、緩和係数、クリアランスの各グラフにおいて、各群間の統計学的解析は一元配置分散分析を用いて行った($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。

4. 研究成果

(1) 結果

測定結果は 1 日後と 3 日後、14 日後、28 日後、3 ヶ月後までのものを示す。磁化直後の残留磁界を 100%として磁化後 20 分間の残留磁界をプロットし緩和曲線を作成したところ、緩和は曝露終了 1 日後、3 日後、14 日後、28 日後、3 ヶ月後のどれもフラレンと PCBM 投与群、分散材投与群、食塩水投与群ともに迅速に認められた。肺障害性を示す 20 分後の残留磁界はフラレン投与群、PCBM 投与群、分散材投与群、食塩水投与群ともに差は見られなかった。

また、磁化後 2 分間の緩和係数もどの測定日においてもフラレン投与群、PCBM 投与群、分散材投与群、食塩水投与群ともに差は見られなかった。各測定日の磁化直後の残留磁界値(B_0)を曝露終了 1 日後を 100%としてプロットし、クリアランス曲線を作成したところ、フラレン投与群、PCBM 投与群、分散材投与

群、食塩水投与群ともに迅速に減衰した。また、どの測定日においてもフラレン投与群、PCBM 投与群、分散材投与群、食塩水投与群に有意差は認められなかった。

(2) 考察

肺磁界測定法は Cohen により初めて行われた手法である。肺磁界測定法の原理は、磁性粒子が滞留した肺に外部から磁化をかけると、外部磁化を中止後、肺から微弱な磁界(残留磁界)を計測することができる。残留磁界は時間とともに急速に減衰する。この減衰を緩和と呼ぶ。これは、肺胞マクロファージに貪食された四三酸化鉄が、外部磁化により磁化され一方向に配列し、外部磁化を止めると細胞骨格により食胞がランダムに回転して、残留磁界は急速に減衰すると考えられる。しかし、肺障害性のある有害物質が投与されると、その物質が物理的、化学的に細胞骨格に影響を与える。そのため、食胞の回転が悪くなり、磁性方向が失われにくくなることで、緩和が遅延すると考えられる。

緩和は、生体のみでみられ、剖検肺や死亡した動物肺ではみられない。よって、肺磁界測定法は、非侵襲的に同一個体の肺障害性評価が可能である。また、外部磁化直後の残留磁界を経過を追って測定すれば、肺内滞留酸化鉄量の推移(クリアランス)を推定することもできる。肺を障害する物質を同時に投与すると酸化鉄のクリアランスも遅延するので、投与物質が肺障害性を示すかどうかの評価に用いられる。緩和係数は細胞障害性の程度を表し、この値が大きい程細胞障害性が低く、小さい程細胞障害性が高いと言える。

これまでに肺磁界測定法を用いた研究では、相澤らが、家兔にガリウムヒ素やシリカを気管内投与したところ量依存性に緩和とクリアランスの遅延を観察している。

本実験で得られた緩和曲線では、フラレン投与群、PCBM 投与群、分散剤投与群と生理食塩水投与群間に有意差は認められず、いずれの群とも緩和は迅速であった。フラレン、PCBM は、細胞骨格による食胞の回転が速やかに行われたため、緩和は迅速であったと考えられる。

緩和係数は残留磁界が急速に減少する 2 分間で測定し、この値が大きい程緩和が迅速である。緩和係数も、フラレン投与群、PCBM 投与群、分散材投与群、食塩水投与群間に有意差は認められなかったことから、緩和曲線の結果と同様、フラレン、PCBM 曝露後も食胞の回転は速やかに行われたと考えられる。

クリアランス曲線では、フラレン投与群、PCBM 投与群、分散剤投与群と生理食塩水投与群における残留磁化鉄量

の磁化直後の残留磁界値は、時間の経過とともに減衰し、いずれの群間にも有意差は認められなかった。このことから、フラレン、PCBM 曝露による肺障害性はなかったと考えられる。

以上から投与3ヶ月後までの観察期間でフラレンとPCBMの肺障害性は見られなかった。この理由はこれらのナノ粒子は肺胞マクロファージの食胞に取り込まれ、食胞が迅速に回転したためと考えられる。

以上のことから投与3ヶ月後までの観察期間でフラレンとPCBMの肺影響は少ないことが示唆された。今後は、現在進行中のフラレンとPCBM曝露後、1年後までの観察による肺障害性評価を行いフラレンとPCBMのさらなる安全性評価を進める必要がある。併せて、病理学的影響評価を行い、発がん性の評価を併せて進めることが必要と思われる。また、他のナノ粒子についても磁界測定法を中心とした評価を行い、様々なナノ粒子の安全性を確認していく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文]

なし

[学会発表]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 雄一郎 (KUDO YUICHIRO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60348505

(2) 研究分担者

相澤 好治 (AIZAWA YOSHIHARU)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：10124926

角田 正史 (TSUNODA MASASHI)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：00271221

佐藤 敏彦 (SATO TOSHIHIKO)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：10225972

(H20-H21)

三木 猛生 (MIKI TAKEO)

北里大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00327397

(H20-H21)

小谷 誠 (KOTANI MAKOTO)

北里大学・医学部・客員教授

研究者番号：60057205

(H22)

(3) 連携研究者

なし