

機関番号： 37116
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2009 ~ 2011
 課題番号： 21590674
 研究課題名 (和文) 経気道曝露法による工業用ナノ粒子の標的臓器の検索と有害性評価
 研究課題名 (英文) Researches on the target organ and its hazard of engineering nanoparticles 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・助教
 研究者番号：20320369

研究成果の概要 (和文)：ルチル型二酸化チタン原粉から平均径 55nm のナノ粒子を作製し、ラットの気管内に 0.2mg、0.5mg の投与量で注入を行った。気管内注入後、経時的に肺、肝臓、腎臓、脾臓、血液の粒子量の定量を行った結果、肺からの排泄速度は 0.2mg、0.5mg 注入群で、それぞれ半減期 3.4 ヶ月、3.9 ヶ月で順調に排泄されていた。血液、肝臓、腎臓、脾臓のチタン量については、チタンはほぼ定量下限以下であった。血液、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、好中球数は、正常ラットとほぼ差異はなかった。肺の病理組織観察では、炎症惹起作用は非常に軽度であり、線維化や細気管支ないし肺胞上皮の増殖性変化は認められなかった。

研究成果の概要 (英文)：Titanium dioxide nanoparticle, rutile crystalline structure, was dispersed in distilled water and average 55 nm size particles were fractionated by ultracentrifugation. 0.2 mg and 0.5mg TiO₂ were intratracheally instilled into rat's lung. The amounts of TiO₂ in lungs, bloods, livers, kidneys, spleens were determined by ICP-AES subsequently. TiO₂ were cleared from lungs and the biological half time of were 3.4 months (0.2mg) and 3.9 months (0.5mg). TiO₂ amounts in the other organ and blood were not determined or extremely low. There were no dose-dependent increases of total cells and neutrophils in BALF. The histopathological examination reveals the slight infiltration of inflammatory cells and no fibrosis and hyperplastic changes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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： ナノ粒子・二酸化チタン・有害性評価・気管内注入試験・体内動態・排泄速度

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。この性質を利用して、日本の産業界では半導体などの電子材料や化粧品への実用化が進んでおり、今後急激にその生産量、使用量が増加すると予測される。しかしナノ粒子含有製

品の開発、製造、使用、廃棄の過程において、ナノ粒子が空気中に飛散し、浮遊する可能性があり、早急にナノ粒子吸入による生体影響の評価が必要である。またナノサイズの粒子はミクロンサイズの粒子に比較して肺への影響が重篤であるという報告や、ミクロンサイズの粒子とは異なる体内動態、すなわち吸入されたナノ粒子が、脳や血管内へ移行する

ことも指摘されており、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る。ナノ粒子がミクロン粒子と異なった体内動態をとり、肺以外の臓器にも影響を及ぼすとすれば、産業界での大量生産、使用がはじまる前にその影響を早急に判断、評価し、ナノ粒子の生体影響（有害性評価）を明らかにしておかなければ、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。

2. 研究の目的

本研究では、化粧品や光触媒ですでにそのナノ粒子が実用化され始めており、ミクロンサイズ粒子は通常陰性対照として用いられている二酸化チタンを対象物質とする。超音波分散法および超遠心分離法を用い、二酸化チタンのナノ粒子懸濁液を作成し、粒径分布を測定し、ナノサイズであることを確認した後、ラットの気管内に懸濁液を注入する。注入されたラットを経時的に解剖し、肺、肝臓、腎臓、脾臓、血液における粒子量を定量的に化学分析し、体内分布の経時変化を明らかにする。また、気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の変化や、病理組織変化を明らかにし、二酸化チタンナノ粒子の有害性についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 気管内注入する二酸化チタン粒子懸濁液の作製

ルチル型二酸化チタンナノ粒子($n\text{TiO}_2(\text{R})$)は、Nanostructured & Amorphous Materialsから購入した。購入粉体は凝集していたので、ナノサイズの気管内注入用懸濁液を以下のようにして作製した。 $n\text{TiO}_2(\text{R})$ 2gを超純水400mlに懸濁し、超音波ホモジナイザーで15分×3回（途中5分休み）の分散を行い、8900gで20minの遠心分離後、上澄みを採取。1 μm のフィルターでろ過したろ液を採取し、その10mlを採取、乾燥し、重量を測定した。重量濃度は1.92mg/mlであったため、これを希釈し、0.2mg/0.4mlおよび0.5mg/0.4mlの注入懸濁液を作製した。

(2) 気管内注入試験

Wistar系ラット(9週齢)を麻酔後、気管内に0.2mg、0.5mg/0.4ml蒸留水の投与量で注入を行った。ラット匹数は、それぞれ0.2mg注入群は25匹、0.5mg注入群は50匹とした。注入後3日後、1、3、6、12ヶ月後に0.2mg注入群は各5匹、0.5mg注入群は各10匹の解剖を行った。解剖時に肺、肝臓、腎臓、脾臓、血液を採取し、臓器内二酸化チタンの定量に用いた。0.5mg注入群の5匹の肺は、右肺から気管支肺胞洗浄液を採取し、

左肺は、4%パラホルムアルデヒドで定圧固定をし、病理組織切片を作製した。気管支肺胞洗浄液は、気道に挿入したカニューラから生理食塩水をゆっくり注入し、肺が完全にふくらんだ後、自然落下によって回収を行い、この操作を洗浄液が50mlになるまで行った。

(3) 肺、血液、肝臓、腎臓、脾臓における二酸化チタン量の定量方法および臓器内量定量方法確立のための回収実験

気管内注入した $n\text{TiO}_2(\text{R})$ の各臓器中の量を定量するため、分析方法を決定するための回収実験を行った。今回の気管内注入試験では0.2mg、0.5mgの試料を注入するため、回収実験では、0、2、5、10、25、50、100、250、500 μg の $n\text{TiO}_2(\text{R})$ の回収実験を行った。方法は、肝臓1gと上記量の $n\text{TiO}_2(\text{R})$ をMicrowave灰化装置(Ethos 1)用テフロンフラスコにいれ、試料として各3本ずつ計27本作成した。これに硝酸2.0ml加え、1昼夜常温で放置した後、硫酸+硫酸アンモニウム(100ml+40g)溶液4.0ml、過酸化水素2.0mlを加え、Microwave湿式灰化装置(Milestone Ethos1, Program条件[240°Cまで10分で昇温、20分維持])で湿式分解を行った。灰化後、50ml定容にし、溶液中のTiをICP発光分析法(SII, SPS1500R)で定量し、 $n\text{TiO}_2(\text{R})$ 中のTi含有率(45%)から $n\text{TiO}_2(\text{R})$ 量を算出した。ICP発光分析の強度から検量線を用いてTi量を算出し、添加量との比較により、回収率を算出した。結果を以下の表に示す。

添加量(μg)	回収率 (%)	
500	101 ±	1.6
250	97 ±	0.9
100	101 ±	4.9
50	104 ±	13.3
25	96 ±	0.2
10	103 ±	2.1
5	108 ±	7.8
2	107 ±	7.5

(4) 気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞の測定

回収した洗浄液を遠沈後、細胞成分をPMN Bufferに再浮遊させ総細胞数を自動血球計にて測定した。さらに、塗抹標本作製し、細胞分画計数により好中球数(PMN)を算定した。

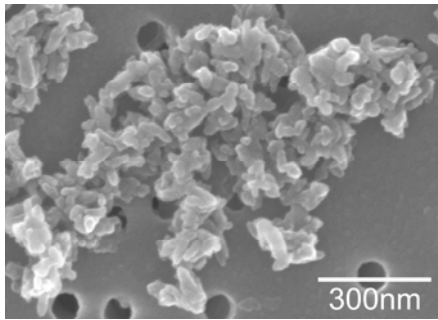
(5) 病理組織切片の作製

4%パラホルムアルデヒドで定圧固定を行った後、パラフィンブロックを作成した。包埋された肺組織より3 μm 厚切片をプレパラートにのせ、ヘマトキシリンエオジン染色をし、組織標本とし、光学顕微鏡により観察を行った。

4. 研究成果

(1) 気管内注入を行う二酸化チタン原粉の物理化学的特性

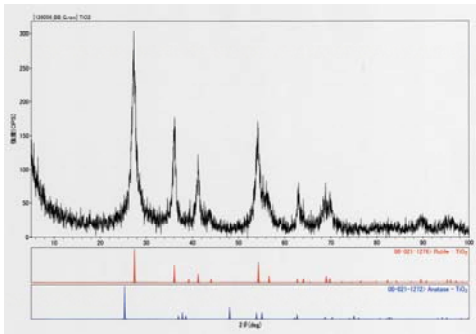
①原粉の電子顕微鏡写真



②化学組成：Ti:45%(TiO₂として75%)
Si:4.8%、Na:2.3%
その他の金属成分：微量

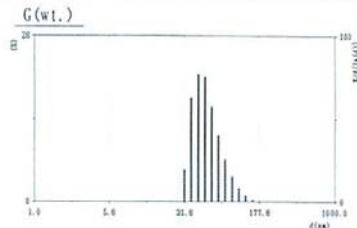
③比表面積：149 m²/g

④結晶構造：以下にXRDの測定結果を示す。
ピークはすべてルチルと一致し、アナターゼは検出されなかった。



(2) 気管内注入粒子の粒子径

超音波粉碎および超遠心分離により蒸留水中に調製した二酸化チタンナノ粒子の粒子径を光散乱測定装置(DLS-6000AL、大塚電子)で測定した。以下に結果を示す。



結果より、蒸留水中に懸濁している二酸化チタンナノ粒子の粒子径は平均55nmであり、ナノサイズであることを確認した。

(3) 各解剖時期における体重および臓器重量

以下に各解剖時期における体重、肺、肝臓、

腎臓、脾臓の重量を示す。

①体重

	0.2mg注入群	0.5mg注入群
3日後	324 ± 6.3	321 ± 6.4
1ヶ月後	426 ± 4.4	432 ± 8.4
3ヶ月後	597 ± 25.2	580 ± 56.7
6ヶ月後	654 ± 20.9	669 ± 29.1
12ヶ月後	741 ± 58.7	730 ± 73.3

(g)

②肺

	0.2mg注入群	0.5mg注入群
3日後	1.18 ± 0.01	1.22 ± 0.08
1ヶ月後	1.31 ± 0.06	1.42 ± 0.08 *
3ヶ月後	1.60 ± 0.08	1.56 ± 0.15
6ヶ月後	1.61 ± 0.07	1.70 ± 0.09
12ヶ月後	1.79 ± 0.14	1.73 ± 0.17

* P<0.05 (g)

③肝臓

	0.2mg注入群	0.5mg注入群
3日後	139 ± 0.95	150 ± 0.55 *
1ヶ月後	169 ± 1.28	189 ± 1.18 *
3ヶ月後	21.3 ± 1.01	20.1 ± 2.38
6ヶ月後	20.8 ± 2.19	21.9 ± 2.25
12ヶ月後	23.7 ± 2.11	24.1 ± 3.50

* P<0.05 (g)

④腎臓

	0.2mg注入群	0.5mg注入群
3日後	243 ± 0.18	240 ± 0.11
1ヶ月後	279 ± 0.28	287 ± 0.26
3ヶ月後	335 ± 0.26	345 ± 0.25
6ヶ月後	331 ± 0.10	343 ± 0.26
12ヶ月後	370 ± 0.38	389 ± 0.55

(g)

⑤脾臓

	0.2mg注入群	0.5mg注入群
3日後	0.757 ± 0.114	0.838 ± 0.093
1ヶ月後	0.807 ± 0.097	0.871 ± 0.064
3ヶ月後	0.947 ± 0.071	0.923 ± 0.103
6ヶ月後	0.961 ± 0.046	1.033 ± 0.096
12ヶ月後	1.054 ± 0.115	1.078 ± 0.129

(g)

肺、肝臓については注入後早い時期に0.2mg 注入群に比較して、0.5mg 注入群で有意の増加が認められたが、体重あたりの重量で補正した肺、肝臓の重量は、有意の増加は認められなかったため、これは注入によるものではなく、成長差によるものと考えられた。また3日後の肺の増加も持続的な変化ではないことから、注入した粒子が各臓器に与える影響はないか、極少ないと考えられた。

(4) 肺、血液、肝臓、腎臓、脾臓における二酸化チタン量の定量結果

各解剖時期における肺の定量結果を下表にまとめ、経時変化を図に示した。

0.2mg 注入群	肺内nTiO ₂ (R)量 (μg)	
3日後	47.9 ±	13.9
1ヶ月後	34.6 ±	2.8
3ヶ月後	15.2 ±	3.9
6ヶ月後	9.7 ±	1.2
12ヶ月後	4.6 ±	2.4

0.5mg 注入群	肺内nTiO ₂ (R)量 (μg)	
3日後	113.7 ±	32.8
1ヶ月後	65.6 ±	23.2
3ヶ月後	40.2 ±	14.1
6ヶ月後	17.4 ±	5.1
12ヶ月後	13.3 ±	7.6

肺から排泄される粒子の速度は、肺内に存在する粒子量(C)に比例すると仮定すると、次式となる。

$$dC / dt = -kC \quad (1)$$

$$\text{初期条件} \quad t = 0, C = C_0 \quad (2)$$

ただし、kは肺内からの排泄速度係数(1/day)で、測定値を用いて求める。

(1)式を(2)の初期条件下で解くと次式を得る。

$$C / C_0 = \exp(-kt) \quad (3)$$

排泄速度の生物学的半減期(T_{1/2})は、肺内に残留している繊維の量が半分になるまでの時間として定義されるので、(3)式を用いて次式から求められる。

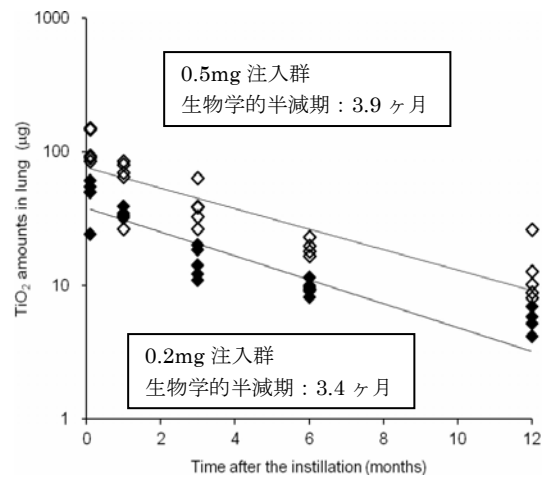
$$T_{1/2} = 0.693 / k \quad (4)$$

0.2mg および0.5mg 注入群の肺内粒子量の測定値に(4)式を適用し、生物学的半減期を求めたところ、0.2mg 注入群で3.4ヶ月、0.5mg 注入群で3.9ヶ月となった。

肺に注入された二酸化チタンナノ粒子は、0.2mg、0.5mg 注入群ともに3ヶ月程度の半減期で肺から順調に排泄されていた。

注入後、3日後、6ヶ月後、12ヶ月後の血液、肝臓、腎臓、脾臓のチタン量を、肺と同

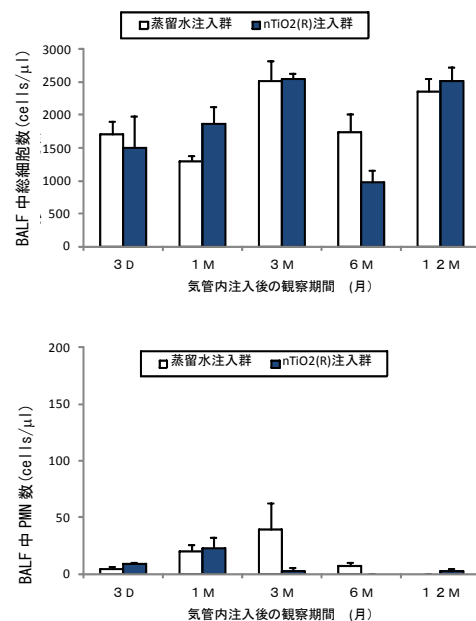
様に定量した。分析に供した血液、肝臓、腎



臓、脾臓の重量は、分解条件の関係から1g以上の重量は分析できないため、それぞれ1ml、約0.8g、約0.8g、0.3~0.6gを分析に供したが、そのチタン量定量の結果、値はほとんど定量限界以下、もしくは定量限界に近い低い値であり、二酸化チタン量に換算すると、その量は0.5μg以下であった。これは注入した量に比較すると非常に低く、気管内注入された二酸化チタンナノ粒子は、他臓器への移行はほとんどないと考えられた。

(5) 気管支肺胞洗浄液中の総細胞数および好中球数

各解剖時期における気管支肺胞洗浄液中の総細胞数およびPMN数を下図に示した。陰性比較対照群は、以前に我々が行った滅菌蒸留水0.4ml注入群を用いた。



総細胞数およびPMN数ともに蒸留水注入群と

比較して有意の変化は認められなかった。

(6) 病理組織評価

ヘマトキシリンエオジン染色を行った病理組織を光学顕微鏡により観察した結果、以下の所見を得た。

nTiO₂(R)を注入した肺では、肺胞内のマクロファージの出現が主たる所見で、極軽度であるが間質の炎症細胞の浸潤も認められた。

出現したマクロファージは黄褐色調を呈する粒子を貪食しており、マクロファージの出現頻度は全期間を通してごく軽度ないしは軽度であった。いずれのマクロファージも肺胞内に分散しており、ほとんど集簇してはいなかった。粒子は全てが肺胞マクロファージに貪食されるのではなく、注入後12ヶ月後であっても肺胞内にそのままの状態を観察されることがあった(下図)。また、注入後3ヶ月以降の肺の傍気管支リンパ装置に、同様の成分を貪食したマクロファージがごく少量ではあるが観察された。

粒子以外の所見として一部の例において炎症細胞浸潤が主に血管周囲に観察されたが、いずれもごく軽微であった。また、線維化や細気管支ないし肺胞上皮の増殖性変化は全期間を通じて認められなかった。

以下に各解剖時期の所見のまとめと病理写真を示す。

① 3日後(n=5)

	—	±	+	++	+++
肺胞マクロファージ [☆] 出現	0	0	5	0	0
マクロファージ [☆] 内粒子	0	5	0	0	0
間質炎症細胞浸潤	4	1	0	0	0
傍気管支リンパ装置内粒子	5	0	0	0	0

—：所見なし、±：ごく軽度、+：軽度、++：中等度、+++：高度

② 1ヶ月後(n=5)

	—	±	+	++	+++
肺胞マクロファージ [☆] 出現	0	3	2	0	0
マクロファージ [☆] 内粒子	0	5	0	0	0
間質炎症細胞浸潤	2	3	0	0	0
傍気管支リンパ装置内粒子	5	0	0	0	0

③ 3ヶ月後(n=5)

	—	±	+	++	+++
肺胞マクロファージ [☆] 出現	0	3	2	0	0
マクロファージ [☆] 内粒子	0	5	0	0	0

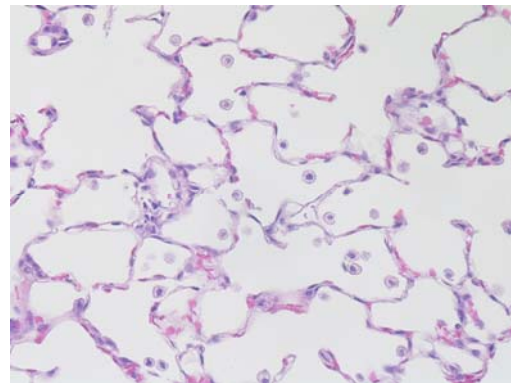
子					
間質炎症細胞浸潤	1	3	1	0	0
傍気管支リンパ装置内粒子	0	5	0	0	0

④ 6ヶ月後(n=5)

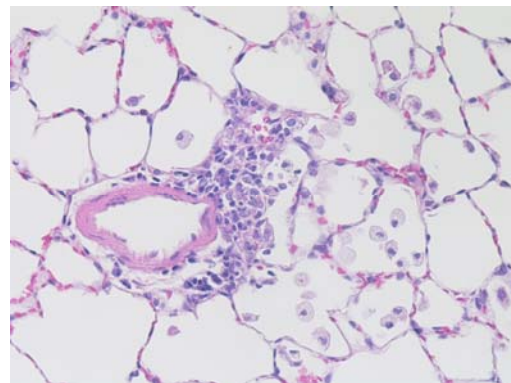
	—	±	+	++	+++
肺胞マクロファージ [☆] 出現	0	3	2	0	0
マクロファージ [☆] 内粒子	0	1	4	0	0
間質炎症細胞浸潤	2	3	0	0	0
傍気管支リンパ装置内粒子	1	4	0	0	0

⑤ 12ヶ月後(n=5)

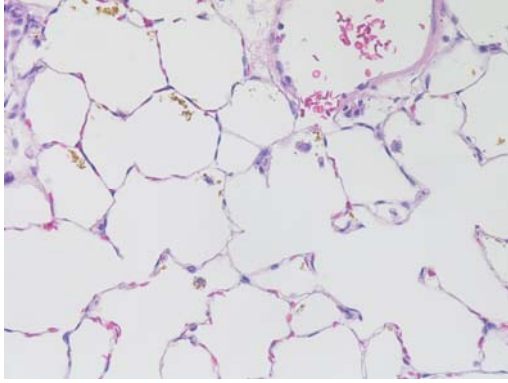
	—	±	+	++	+++
肺胞マクロファージ [☆] 出現	0	3	2	0	0
マクロファージ [☆] 内粒子	0	5	0	0	0
間質炎症細胞浸潤	1	3	1	0	0
傍気管支リンパ装置内粒子	0	5	0	0	0



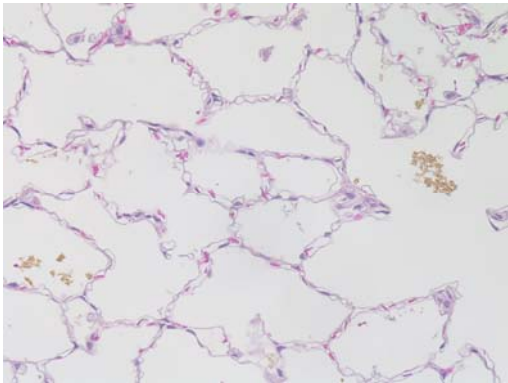
肺胞マクロファージの出現(3日後)



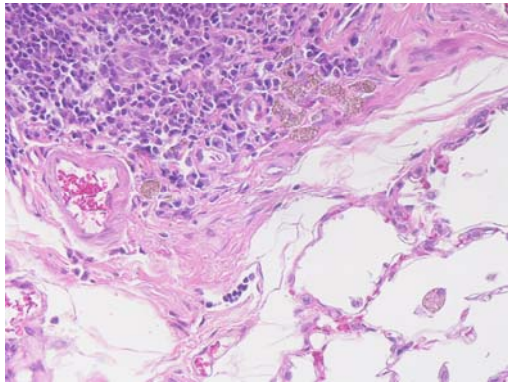
血管周囲の炎症細胞浸潤（3ヶ月後）



肺胞マクロファージに貪食された粒子および肺胞内に放置された粒子（3ヶ月後）



肺胞内に放置された粒子（12ヶ月後）



傍気管支リンパ装置内の粒子貪食マクロファージ（12ヶ月後）

(7) 結果のまとめ

以上の結果より、注入したルチル型二酸化チタンナノ粒子の肺における炎症惹起作用は非常に軽度であり、3～4ヶ月の半減期で肺から順調に排泄されることがわかった。また、血液や他の臓器におけるチタンがほとんど検出されないことから、他臓器へもほとんど移行せず影響も及ぼさないのではないかと

と考えられた。

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)

なし

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・助教
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