

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590566

研究課題名（和文） 表面積基準に着目したナノ粒子の生体影響評価に関する研究

研究課題名（英文） Pulmonary effect of titanium dioxide and various particles by instillation to rats: in relation with surface area dose metrics.

研究代表者

大神 明（OGAMI AKIRA）

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授

研究者番号：40301692

研究成果の概要（和文）：

重量濃度と表面積濃度に着目して、ラットに5種類の二酸化チタンナノ粒子を一定の重量濃度で気管内単回投与し、投与後の経時的な炎症度評価を行い、肺への生体影響を比較検討した。同様の表面積でも、二酸化チタンの種類により肺での反応は差が見られた。表面積は吸入によるナノ粒子毒性を決定する重要な一つの要因であることは示唆されたが、粒子の生成法や表面性状などもまた毒性決定要因であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the pulmonary effect of nano-titanium dioxide in relation with surface area. We used five nano-titanium dioxide particles from different products. Each material suspension at the dose of 1mg per rat was intratracheally instilled once to male Wistar rats. Pathological results showed that, with the similar surface area, the difference of pulmonary effect was observed by the product of nano-titanium dioxide. Surface area should be one of a significant factor for toxicity of nanoparticles. However, other factors such as manufacturing method or surface characters of particles may be also responsible for the toxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学・産業衛生

キーワード：①ナノ粒子 ②気管内注入 ③肺毒性

## 1. 研究開始当初の背景

近年の工業技術の発展により、ナノ工業材料など過去に存在しなかった物質を取り扱う機会が生産作業者を中心に増加し、その吸

入による生体影響について懸念されている傾向がある。

これまでの毒性研究では粒子の重量濃度を基本的な濃度指標として強調されてきた。しかしながら、ナノ粒子は、従来の規制の対

象であったミクロンサイズの粉じんと異なり、物理化学特性が変化し、表面積、粒子の粒径分布、粒子表面の親水性疎水性、凝集状態等、規制する上で考慮しなければならない点が多いと思われる。すなわち、新規ナノ粒子の有害性を分析評価するためには、毒性パラメータの変化をもたらす粒子のポテンシャルを正確に評価する濃度指標の開発が必要である。

最近の知見では、低毒性、低溶解性のナノ粒子においては、特に表面積による濃度指標が毒性を評価する上で重要という報告がなされている。Donaldson<sup>1)</sup>らの研究では、平均粒径 14nm のカーボンブラックナノ粒子と平均粒径 260nm のファインカーボンブラック粒子を同じ重量濃度でラットに注入し、注入 6 時間後の気管支肺胞洗浄液中の PMN 数にて炎症変化を調べ、重量濃度基準ではカーボンブラックナノ粒子はファインカーボン粒子より大きな炎症反応を引き起こした。しかしながら、これを表面積で換算したところ、炎症変化は同一の表面積では同程度であった。また、Stoeger ら<sup>2)</sup>は 6 種類の表面積の異なるカーボンナノ粒子を用いて、これら 6 種類の粒子の毒性は BET 表面積に強く相関していたと報告している。一方で、Warheit ら<sup>3,4)</sup>は、ファインサイズの二酸化チタンとナノサイズの二酸化チタンをラットに気管内注入し、急性毒性を確認しているが、表面積の大小よりも、ナノ粒子の表面性状が影響していると報告し、ナノ粒子を管理する上での毒性評価に、表面積を基準とするのか、あるいは従来の重量濃度で規制できるのかまだ明確な結論は出ていない。

この研究の目的は、ナノ粒子のリスクアセスメントや作業現場での管理を行う上で、従来の重量基準濃度による評価基準と、表面積基準による評価基準を比較検討し、より確かな濃度指標を開発することを目的としている。方法として、ナノサイズ粒子の表面積による影響について、毒性影響が比較的既知の 3 物質について同組成での粒径分布からナノ分画とミクロンサイズ分画に分級した試料を作成し、BET 表面積を測定するとともにいくつかの異なる重量濃度にて気管内注入し、経時的な生体影響を多方面より検討することにより、表面積濃度基準の生体影響への寄与度を評価する指標を開発することが可能と考え、今回の申請に至った。

1) Donaldson K, et al.: The pulmonary toxicology of ultrafine particles. *J Aerosol Med* 2002, 15(2):213-220.

2) Stoeger T, et al.: Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice. *Environ Health Perspect* 2006, 114:328-333.

3) Warheit D, et al.: Pulmonary instillation studies

with nanoscale TiO<sub>2</sub> rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol Sci* 2006, 91(1):227-236.

4) Warheit D, et al.: Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: differential responses related to surface properties. *Toxicology* 2007, 230(1):90-104.

## 2. 研究の目的

新規工業ナノ粒子の生体影響評価を効果的に行う方法の開発のために、動物における気管内注入試験を用いて、表面積ベースの濃度基準による生体影響と重量ベースの濃度基準による生体影響を、経時的な病理学的評価を通して比較検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1)試料

購入した二酸化チタン試料は、P25、P90（製造元：D社）、アナターゼ、ルチル（製造元：T社）、アモルファス（製造元：W社）の5種類であった。これらの試料作成にあたっては、分画抽出とキャラクターゼーションを行い気管内注入試験に使用した。

### (2)気管内注入試験

8 週齢の Wistar 系雄性ラットに対して、二酸化チタン試料をラット 1 匹あたり 1mg の重量濃度で 0.4ml の生理食塩水に懸濁し、喉頭鏡を用いて直視下に単回注入した。対照群は生理食塩水のみ注入した。注入後 3 日、1 ヶ月、6 ヶ月の 3 タイムポイントで解剖を行った。各タイムポイントで各群 5 匹ずつに投与した。

解剖時に気道からカニューラを挿入し、右肺から生理食塩水を用いて気管支肺胞洗浄を行う。1 回につき 5-10ml の注入を行い、自然落下にて採取し、計 50ml の気管支肺胞洗浄液 (BALF) を回収した。左肺では病理組織標本作製するため、4%パラホルムアルデヒドで定圧固定を行った。回収した BALF を遠沈し、回収した細胞を自動血球計にて総細胞数を算定した。さらに、塗抹標本作製し、細胞分画より好中球数 (PMN) を算定した。

### (3)病理評価

作成された病理標本をデジタル画像として顕微鏡下に取り込み、ポイントカウンティング法にて炎症エリアの評価と線維性変化の評価を行い、各物質による肺への生体影響評価について比較検討を行った。

①肺標本は、炎症度を評価するためにヘマトキシリンエオジン染色、線維化を評価するためにエラスチカワンギーゼン染色を行った。

②ポイントカウンティング法による肺の炎症度：ヘマトキシリンエオジン染色を行った肺標本を光学顕微鏡倍率 100 倍に 6 画像を無作為的に取り込んだ。画像を取り込む際に、

大血管や気道を除外し、肺胞領域を中心とした。コンピューター画面で、グリッドを画面上に 300 ポイントおき、グリッドに重なった炎症細胞をカウントした。ヒットした炎症細胞数を、全グリッド数である 300 で除した数値を肺の炎症度とした。

③ポイントカウンティング法による線維化・コラーゲン沈着度：エラスチカワングーズン染色を行った肺組織を肺胞道と胸膜部位にわけ、各々において顕微鏡上偏光をかけ、光った線維をカウントし、上記の炎症度と同様に光った線維数のカウントを肺野のグリッド数にて除した値を肺胞及び胸膜のコラーゲン沈着度とした。

#### 4. 研究成果

##### (1)試料の分析

5 種類の二酸化チタンナノ粒子の BET (Brunauer, Emmet and Teller's) 表面積を (株)UBE 科学分析センターにて測定した結果では、アナターゼ(102 m<sup>2</sup>/g)、ルチル(102 m<sup>2</sup>/g)、P90(102 m<sup>2</sup>/g)、P25(53.8 m<sup>2</sup>/g)、アモルファス(110 m<sup>2</sup>/g)であり、また全粒子の全表面積に対する全粒子の全体積と同じ表面積対体積率を有する粒子径(Sauter 径)は、アナターゼ(14 nm)、ルチル(14 nm)、P90(15 nm)、P25(28 nm)、アモルファス(15 nm)であり、これらの粒子がナノ粒子であることと、ほぼ同等の表面積であることが確認された。(表 1)

また、二酸化チタンサンプル計 5 検体試料の結晶子の大きさを、X線回折(XRD)測定により計測した。その結果、1) 5 検体中 4 検体の試料の結晶子のサイズは Sauter 平均径(比表面積径)とほぼ同じであり、一次粒子は単結晶からなっていると思われた。2) 気相合成で製造された試料はアナターゼとルチルの両方の結晶子を含んでいた。3) 液相で晶析により製造された試料はそれぞれルチルとアナターゼのほぼ単一の結晶系からなっていた。4) 製造方法は不明の試料はアモルファスであるが、アナターゼの結晶子も観察された。

二酸化チタン名称	製造元	生成法	BET表面積(m <sup>2</sup> /g)	Sauter径(nm)	X線回折測定による結晶子の大きさ(nm)	
					Anatase	Rutile
P25	D社	気相	53.8	28	Anatase	23.5
					Rutile	35.9
P90	D社	気相	102	15	Anatase	13.5
					Rutile	21.7
アナターゼ	T社	液相	102	15	Anatase	16.9
					Rutile	-
ルチル	T社	液相	102	14	Anatase	-
					Rutile	15.5
アモルファス	W社	-	110	15	Anatase	6.1
					Rutile	-

表 1：二酸化チタンの表面積と粒径

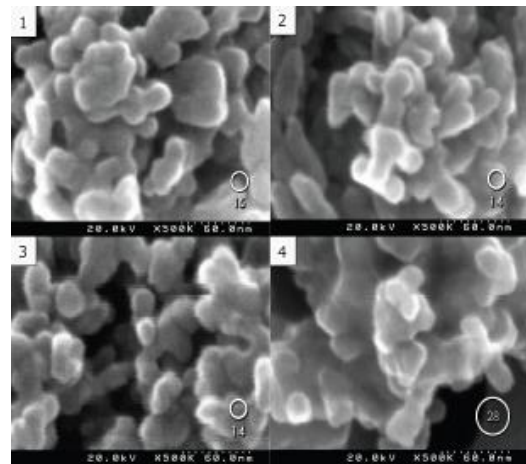


図 1：二酸化チタンナノ粒子 走査電子顕微鏡画像 (1 アナターゼ 2 ルチル 3 アモルファス 4 P25)

##### (2)BALF の解析

注入 3 日後の BALF 所見では、総細胞数は amorphous>P90>P25>>rutile=anatase であった。PMN 数は amorphous>P25>P90>>rutile=anatase であったが、1 ヶ月後と 6 ヶ月後では有意差を認めなかった。(表 2) また、表面積基準と 3 日後の BALF 中 PMN 数との相関を見た解析では、同じ表面積で比較しても PMN 数にばらつきがあり、単なる表面積基準で毒性が決定されるものではないことが示唆された。(図 2)

表 2：気管内注入後 BALF 所見要約

	anatase		rutile		amorphous		P90		P25	
	3d	1m	3d	6m	3d	1m	6m	3d	1m	6m
BALF中の好中球数	-	-	±	-	↑↑	-	↑	-	↑↑	-
BALF中の総細胞数	-	-	-	-	↑	-	±	-	+	-
注入量(mg/rat)	1.0									
BET 表面積*(m <sup>2</sup> /g)	102	102	110	102	53.8					
表面積基準注入量(cm <sup>2</sup> /rat)	1020	1020	1100	1020	538					

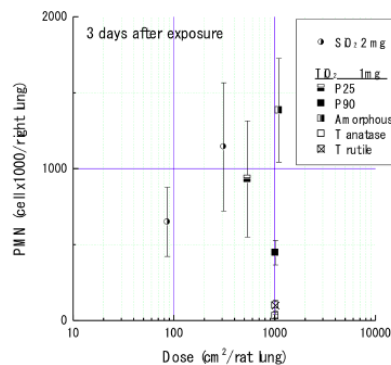


図 2：表面積基準と BALF 中 PMN 数との相関

### (3)肺組織の病理解析

①ポイントカウンティング法による肺組織の炎症度の解析では限局性の肺炎が散見されたが、その炎症度の程度は

P25>P90>amorphous>rutile>anatase の順で差が見られた。しかしながら、これらの現象は注入後3日のみに見られた所見であり、注入後1ヶ月以後は対照群と有意差を認めず、炎症度が経時的に増加する傾向は見られなかった。(図3)

②ポイントカウンティング法による線維化・コラーゲン沈着度評価では、P25注入群は肺胞道部において3日、1か月、6か月のすべての時点および胸膜部において3日時点で対照群と比較しコラーゲン沈着率は有意に高値( $p < 0.01$ ;Mann-Whitney U検定)であり、1か月、6か月時点においても対照群よりも高い傾向を認めた。肺胞道部においてルチル注入群3日時点、アナターゼ注入群1か月時点で対照群と比較し有意に高値( $p < 0.05$ )であった。(図4上)

二酸化チタンナノ粒子の線維性評価における比較では、炎症度評価と同様にP25が最も高いコラーゲン沈着率を示し、注入後6か月時点まで高値の状態が持続していた。化学組成が同じ二酸化チタンナノ粒子において結晶構造や生成法が異なる粒子間で線維性変化に差を認めた。(図4下)

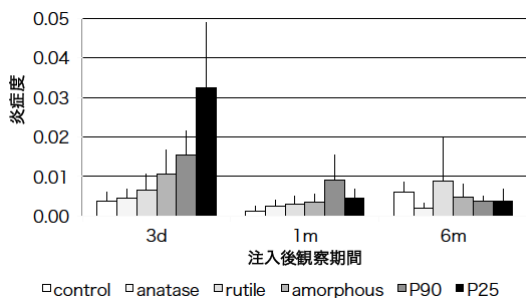


図3：気管内注入後の肺組織炎症度

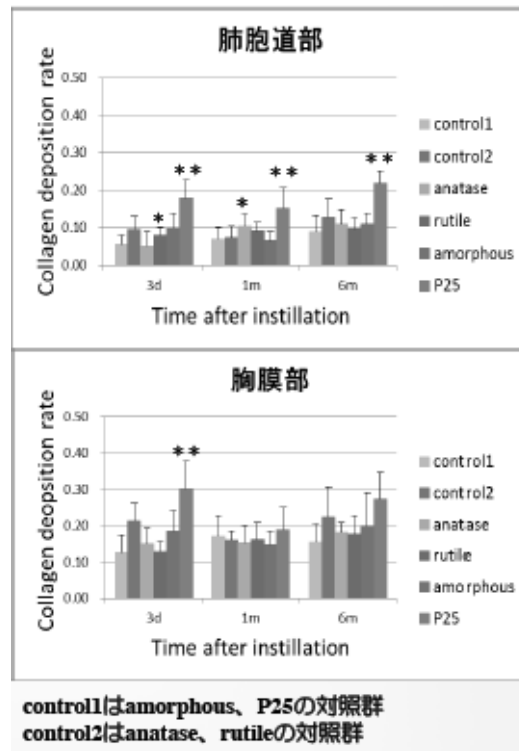


図4：気管内注入後の肺組織の線維化度評価 (上：肺胞道部 下：胸膜部)

一般的なナノ粒子の生体影響として、粒子径が小さい程、また比表面積が大きい程生体影響を及ぼす可能性があると考えられているが、今回もっとも線維化度が高かったP25は他の二酸化チタンナノ粒子と比較してBET比表面積は小さく粒子径は大きかった。また、結晶構造の解析による各試料のルチルとアナターゼの結晶系の相違と相関から考えれば、生体影響は、結晶の質(結晶の複合体、非晶質など)の違いではないかと推論された。これらのことより、表面積のみがナノ粒子の毒性を決定する要素ではなく、表面性状あるいは生成方法などの物性因子を考慮して毒性を評価する必要性が示唆された。

### 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)

[学会発表] (計2件)

- ① Akira Ogami, Toshihiko Myojo, et al. Pulmonary effect of titanium dioxide and various particles by instillation to rats: in relation with surface area dose metrics. 30<sup>th</sup> International Congress on Occupational Health (ICOH) 2012. 3. 21 Cancun, Mexico

- ② 岡田崇願、大神明、大藪貴子、李秉雨、明星敏彦  
各種二酸化チタンナノ粒子の生体影響  
～ラット肺における病理組織所見 エラスチカ・ワンギーソン染色による線維性  
変化の評価～  
第 86 回日本産業衛生学会総会  
2013. 5. 16 松山 ひめぎんホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大神 明 (OGAMI AKIRA)

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授  
研究者番号：40301692

(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

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：