

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19252

研究課題名(和文)難溶性インジウム化合物による発がん機序と種差の解明

研究課題名(英文)Carcinogenicity and species differences by indium compounds exposure.

研究代表者

吉岡 範幸 (Yoshioka, Noriyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70365229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの長期吸入曝露により発がんが確認された酸化インジウム・スズ焼結体(ITO)の化学発がんの機序とその種差を解明するため、難溶性インジウム化合物であるITO、酸化インジウム( $\text{In}_2\text{O}_3$ )、水酸化インジウム( $\text{In}(\text{OH})_3$ )をマウス、ラットならびにヒトのマクロファージ細胞株に曝露した。貪食能が高かったラット細胞株で細胞毒性試験の感受性が最も高く、難溶性インジウム化合物の細胞毒性の発現には貪食作用が関与していることが示唆された。さらに、酸化インジウム曝露による活性酸素種の増加とDNA損傷度の上昇が認められたことから、ITOに加えて酸化インジウムの毒性にも注視する必要があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to assess the mechanism of carcinogenesis and those species differences of indium tin oxide (ITO). ITO, indium oxide and indium hydroxide was exposed to mouse, rat and human macrophage cell lines, respectively. Rat cell lines with highest phagocytic ability in these cell lines were most susceptible to cytotoxicity tests. This observation suggest that phagocytosis was involved in the development of cytotoxicity of indium compounds. Further, exposure to indium oxide induced high levels of reactive oxygen species generation and DNA damage in comparison to ITO and indium hydroxide. It is need to further studies the toxicity of indium oxide in addition to ITO.

研究分野：産業衛生学

キーワード：インジウム

## 1. 研究開始当初の背景

レアメタルであるインジウムは1990年頃までは産業需要が少なく、毒性は注目されることもなかった。1990年代になると化合物半導体としてのインジウム・インジウムヒ素、および液晶ディスプレイパネルの透明伝導電膜用の酸化インジウム・酸化スズ焼結体 (ITO) の需要増により、インジウム化合物粒子曝露機会が増大し、健康影響が懸念された。1995年以降、慶應義塾大学、および九州大学は化合物半導体粒子の強い肺への起炎症性を明らかにし (Tanaka et al.,1996; Tanaka et al.,2000; 他)、「吸入すると危険な金属化合物」であると可能性を示した。

2001年には、1998年に発症したITO微細粒子曝露に起因する可能性がある間質性肺炎死亡例が世界で初めてわが国で発生し、Journal of Occupational Health (JOH) (Homma et al.,2003)に公表された。我々のチームはこの症例発生情報を得た後、インジウム曝露と間質性肺炎の因果関係の確立を目的として、ITO製造・研究・リサイクルに関わる秋田～鹿児島 の24社28工場・研究所、2大学でBaseline Study, Follow-up Study, 情報交換を実施し因果関係を確立した。研究成果は、Occupational and Environmental Medicine (Hamaguchi et al.,2007)、JOH (Nakano et al.,2009)、Int Arch Occup Environ Med (Omae et al., 2010)に公表した。また、日本バイオアッセイ研究センターで行われたラットとマウスを用いたITOの長期吸入曝露試験において、ラットにのみ肺胞上皮腺腫/肺胞上皮がんの増加が確認された。この試験ではLOAELが0.01mg/m<sup>3</sup>であり、非常に低濃度のITO曝露において発がんが確認された。この結果を踏まえ、インジウム技術指針における目標濃度が0.01mg/m<sup>3</sup>となったが、事業者が遵守するには厳しい値であった。

厚生労働省は、我々の研究成果および日本バイオアッセイ研究センターの発がん実験結果を背景に、2010年8月に「インジウムの健康障害防止に関わる小検討会を設置し、「インジウム・スズ酸化物等の取り扱い作業による健康障害防止のための技術的指針」を策定、同年12月に施行した。さらに、労働安全衛生法の改正によりインジウムは特定化学物質の第2類に指定され、2013年1月から年2回の特殊健康診断の実施、作業環境測定の実施、記録の30年間保存等が事業者義務づけられることとなった。

しかしながら、これら肺への起炎症性、発がん性の作用機序については明らかにされておらず、毒性機序解明は衛生管理上で非常に重要であり、機序解明の研究が急務である。Lison et al.,2009によるとITOによりフェントン様反応 (金属が触媒として過酸化水素から活性酸素である反応性が高く酸化力の強いヒドロキシラジカルが生成される反応)が検出され、小核試験により小核の増加が認め

られている。さらにITO曝露作業員において有意ではないが酸化性的DNA損傷の増加が示唆され (Liu et al.,2012) ITOと活性酸素種の関連が注目されている。しかし、マウスのマクロファージ細胞株を用いた実験ではITO曝露によって活性酸素は生成されず、DNA損傷も認められなかった (Badding et al.,2014)。

本研究ではラットにおいてのみ発がんが確認されたことに着目し、ITO曝露による発がん機序の解明とその種差を検討する。毒性機序、種差が解明できれば、既存の疫学研究結果に加えて毒性機序に基づいた予防対策が実施可能となる。実際にはマウス、ラットおよびヒトの細胞株に難溶性インジウムを曝露し、関連が疑われている活性酸素種とそれによるDNA損傷、さらには細胞毒性の程度を評価する。

## 2. 研究の目的

本研究課題は、ラットの長期吸入曝露により発がんが確認された難溶性インジウム化合物をマウス、ラットならびにヒトのマクロファージ細胞株を用いて化学発がんの機序とその種差を解明することを目的とする。難溶性インジウム化合物の毒性機序、種差が解明できれば、既存の疫学研究結果に加えて毒性機序に基づいた予防対策が実施可能となる。

## 3. 研究の方法

### (1) 難溶性インジウム化合物

難溶性インジウム化合物である酸化インジウム・スズ焼結体 (ITO) \ 酸化インジウム (In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) \ 水酸化インジウム (In(OH)<sub>3</sub>) は国内のITO製造事業所より入手した。難溶性インジウム化合物はレーザー回折法による粒度分布測定を行い、粒子径等を測定した。

### (2) 細胞株の準備

Gwinn et al.,2013によると難溶性インジウム化合物の細胞毒性の発現には貪食作用、低pH環境が必要であるためマクロファージ細胞株であるRAW264.7 (マウス) \ NR8383 (ラット) およびTHP-1 (ヒト) を準備する。ATCCより入手した。

### (3) 難溶性インジウム化合物の曝露

難溶性インジウム化合物は曝露前に、超音波層で分散させた。RAW264.7 (マウス) \ NR8383 (ラット) \ およびTHP-1 (ヒト) のマクロファージ株化細胞に各難溶性インジウム化合物を0,25,50,100,200,400 μg/mlの濃度で曝露した

### (4) 細胞毒性試験 (MTT assay)

各細胞株に難溶性インジウム化合物曝露後、MTT試薬を加える。MTTは生細胞の代謝活性によってフォルマザンに還元される。フォルマザン色素量は代謝活性を有する細胞

数に直接比例し、細胞生存率の測定が可能となる。測定にはプレートリーダーを使用する。

(5) 活性酸素種の測定 (CellRox Deep Red)

各細胞株に難溶性インジウム化合物曝露後、CellRox Deep Red を培地に加え 30 分インキュベートする。CellRox Deep Red は細胞内に拡散、細胞内で酸化されると明るい蛍光を発生し、高感度な検出が可能となるため、これを利用して活性酸素種を測定する。最大励起は 644nm であり、観察の波長は 665nm である。観察には共焦点レーザー顕微鏡を使用する。

(6) DNA 損傷の測定 (コメットアッセイ)

コメットアッセイ (single cell gel electrophoresis) は細胞をシングルセルに分散し、アガロースゲルに包埋してアルカリ電気泳動にかけることにより個々の細胞が受けた DNA 初期傷害を検出する手法である。各株化細胞を難溶性インジウム化合物曝露後、細胞を回収し、TREVIGEN 社の CometAssay Kit を用いて標本を作成、蛍光顕微鏡用カメラで撮影後、専用の画像解析ソフトウェアで評価する。DNA 損傷の指標としては切断された DNA の比である %DNA in tail を用いる。

#### 4. 研究成果

(1) 株化細胞間の差

RAW264.7 (マウス)、NR8383 (ラット) および THP-1 (ヒト) のマクロファージ株化細胞に各難溶性インジウム化合物を曝露した結果、それぞれの難溶性インジウム化合物の貪食像が観察されたが、NR8383 (ラット) 株化細胞が最も高い貪食能を示した。さらに ITO 曝露による細胞毒性試験 (MTT assay) の結果、株化細胞の中で NR8383 が最も高い感受性を示した。

(2) 細胞毒性試験 (MTT assay)

NR8383 において難溶性インジウム化合物の曝露による細胞毒性試験を行った結果、図 1 の通り、ITO 曝露における細胞毒性が最も感受性が高かった。

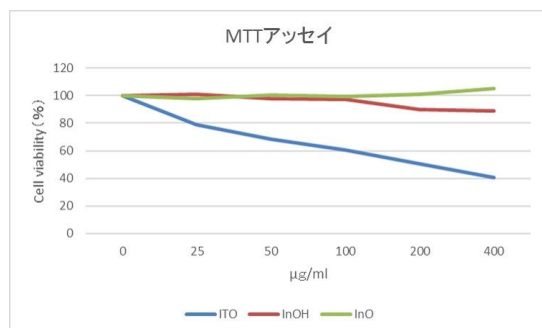


図 1. 細胞毒性試験による細胞生存率

(3) 活性酸素種の観察

NR8383 において難溶性インジウム化合物の曝露による CellRox Deep Red による活性酸素種の観察を行った結果、酸化インジウム曝露において活性酸素種の増加していることが観察された。

(4) DNA 損傷の評価

NR8383 において難溶性インジウム化合物の曝露による DNA 損傷の評価を行った結果、酸化インジウムによる DNA 損傷度が最も高く、図 2 のように、50µg/ml 以上で有意に DNA 損傷度が高くなっていた。

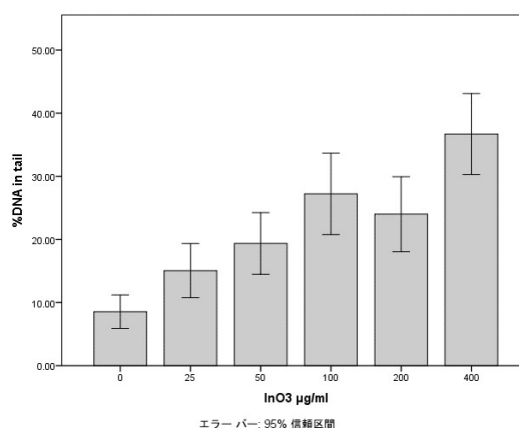


図 2. InO<sub>3</sub> 曝露による NR8383 の DNA 損傷度

本研究では貪食能が高かった NR8383 で細胞毒性試験の感受性が最も高く、Gwinnet al. (2013) が報告した難溶性インジウム化合物の細胞毒性の発現には貪食作用が関与していることと一致していた。貪食能の差が細胞毒性と関連していることが考えられ、今後、生体や正常細胞におけるマクロファージの難溶性インジウム化合物貪食作用に種差がないか検討する必要性が示唆された。

また、NR8383 において酸化インジウム曝露による活性酸素種の増加と DNA 損傷度の上昇が認められたことから、ITO に加えて酸化インジウムの毒性にも注視する必要があることが示唆された。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

中野真規子、田中昭代、平田美由紀、吉岡範幸、大前和幸、インジウム曝露と腎影響の関係 時間断面観察、第 89 回日本産業衛生学会、2016 年 5 月 27 日、福島県文化センター(福島県・福島市)  
中野真規子、田中昭代、平田美由紀、吉岡範幸、岩澤聡子、大前和幸、インジウ

△曝露と新規肺がん発生についての現状  
報告 コホート研究、第 86 回日本衛生学  
会、2016 年 5 月 24 日～27 日、旭川市民  
文化会館(北海道・旭川市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉岡 範幸 (YOSHIOKA, Noriyuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号： 70365229