

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12637

研究課題名(和文) 肺胞内環境の再現によるナノ粒子・繊維材料の生体内溶解性評価手法の確立

研究課題名(英文) Development of the evaluation method for biosolubility of nanoparticles/fibers under pulmonary alveoli environment

研究代表者

山本 玲子 (YAMAMOTO, Akiko)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・上席研究員

研究者番号：20343882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ粒子・繊維材料の肺毒性が懸念されており、生体安全性の観点から、生体溶解性を有することが求められている。繊維材料とマクロファージの相互作用について検討したところ、活性化マクロファージへの繊維材料の添加により活性酸素産生量が増加するが、繊維材料の分解は促進されないことを明らかにした。細胞を用いない溶解性評価手法として、肺胞・気道内雰囲気下、疑似体液の滴下試験を確立した。市販の生体溶解性繊維材料について滴下試験を実施し、その溶解挙動の差違を確認した。滴下量の調整により、従来の動物試験結果と合致する試験条件の設定も可能であり、簡便なスクリーニング法として期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research project is to develop a new in-vitro evaluation method for biosolubility of ceramic fibers. Co-culture of activated/super-activated human monocyte cell line U937 with commercially available biosoluble alkaline earth silicate (AES) fibers increased generation of hydrogen peroxide from the cells but did not accelerate degradation of the fibers. Therefore, we established simple dissolution test of the fibers into cell culture medium (as a simulated body fluid) under the atmosphere of trachea/pulmonary alveoli environment: dripping of the medium to the fibers on a membrane filter with 10-micrometer-diameter pores. This method can detect the difference in biosolubility of two different fibers and possible to adjust the medium drip rate for obtaining similar results to those of the animal tests currently employed for the evaluation of the bioretention/accumulation rate of the fibers.

研究分野：生体材料学

キーワード：体内蓄積性 繊維材料 生体溶解性 in vitro評価

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーの発展により種々のナノ材料が実用化されている。それに伴い、ナノ粒子・繊維等の生体および環境への影響が懸念されている。特に繊維材料については、アスベストによる発癌(中皮腫)事例が広く知られており、生体為害性が危惧されている。そのため、生体内に滞留しない生体溶解性を有することが強く望まれている。EU 指令 97/69/EC では、セラミック繊維を体内滞留性を考慮して4つのカテゴリーに分類、発癌性リスクに基づき使用を規制している(表1)。

表1 欧州でのセラミック繊維の規制状況[1]

カテゴリー	発癌性	繊維例	備考
1	有り	石綿	指定物質
2	おそらく有り	RCF	繊維組成での区分*
3	可能性あり	RW, GW, SW	
0	無し	生体溶解性繊維	動物実験での証明

RCF: リフレクトリーセラミック繊維、GW: グラスウール、RW: ロックウール、SW: スラグウール

*KNB 値(繊維中 Na₂O, K₂O, MgO, CaO, BaO の合計)18 未満:カテゴリー2、18 以上:カテゴリー3。

カテゴリー1 は使用禁止、カテゴリー2 および3 には、発癌の恐れについて指定ラベルによる表示義務がある。その必要がないカテゴリー0 に分類されるのは生体溶解性繊維であるが、体内滞留性が基準以下であること、もしくは発癌性のないことを動物実験により示さなければならない(表2)。それには高額な費用を要するため、実施の機会が限られること、さらに動物愛護の観点から問題があった。しかし、in vitro (生体外)における簡便かつ適切な生体溶解性評価法は存在せず、例えば新材料の開発段階において、生体溶解性の評価は困難であった。

表2 生体溶解性認定基準[1,2]

評価項目	試験方法と認定基準
繊維の溶解性	1)短期吸入試験(5日間):20µm 超繊維の荷重半減期が10日未満 2)気管内注入試験:20µm 超繊維の荷重半減期が40日未満
発癌性	3)腹腔内投与試験:過大な発癌性の証拠がない 4)長期吸入試験:関連ある病理性変化もしくは腫瘍性変化がない

2. 研究の目的

本研究は、セラミック繊維材料について、生体内分解挙動を生体外(in vitro)にて簡便にスクリーニングする手法の確立を目的とする。細胞培養環境および技術を駆使してヒトの肺胞内環境を in vitro にて再現し、その

中で材料の分解特性および材料と接した細胞の反応を調べる。得られた情報に基づき、細胞を用いずに材料の生体内溶解性を評価可能な手法を確立する。

従来のナノ材料の生体毒性評価は動物実験が中心であり、毒性発現機構の解明が主流であった。生体内環境を生体外にて再現することにより、生体反応ならびに材料の生体内分解挙動を生体外で簡便に評価するというアプローチはなかった。確立された手法は、動物実験と比して簡便・低コストであり、また環境(生体内溶解性を支配する環境因子)制御が容易であるため、材料の開発段階から実施可能であり、生体反応・分解機構を理解すると同時に、これらの特性を指標とした新たな材料開発を可能にするものである。

3. 研究の方法

繊維製品の肺毒性は、その細さ(吸入性)長さ(生体内蓄積性)および生体残留性(非分解性)に依存する。繊維が細い程(直径1µm以下)また長い程(10µm以上)肺胞内に滞留・蓄積するため、毒性が大きい。図1に、ヒトの呼吸器系の構造を示す。有効径が5µmより大きな粒子は上気道に、1~5µmの粒子は下気道に沈着し、粘膜腺毛の「粘液エスカレータ」と呼ばれる働きにより気道上部へと排出される[3]。しかし、1µmより小さな粒子は肺胞内に到達する。肺胞には粘液層はなく、マクロファージが異物を貪食・消化(分解)することで除去している。マクロファージの大きさは10~20µmであり、長さが20µm以上の繊維はマクロファージに貪食されないため、分解されず肺胞内に長期間滞留し、結果として生体毒性が高くなると考えられる。

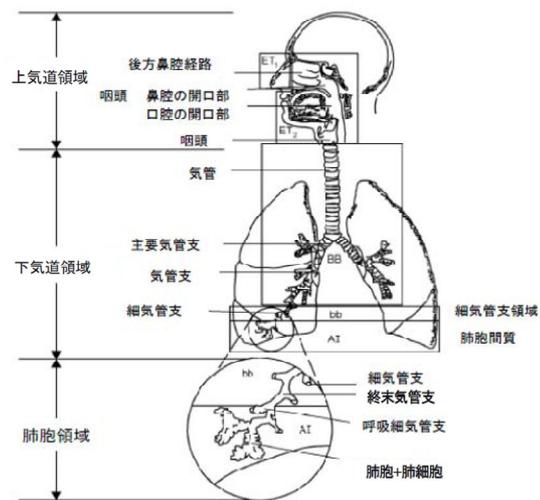


図1 ヒト呼吸器系の構造[4]

したがって、生体内におけるセラミック繊維の分解機構としては、生体組織表面に存在する体液への「溶解」と、マクロファージによる「分解」の二つが推定される。マクロファージは異物を貪食し細胞内で分解するだけでなく、細胞外へ活性酸素等の分解因子

を放出するため、20 μ m 超の繊維においても、マクロファージによる「分解」促進の可能性はある。そこで、セラミック繊維の生体内滞留性の in vitro 評価法を検討するにあたって、次の二つのアプローチが想定される。

- 1) セラミック繊維の疑似体液への溶解性評価
- 2) マクロファージによるセラミック繊維の分解性評価

さらに、2)においては、実際にマクロファージを用いる手法と、マクロファージの放出する活性酸素の影響を、細胞を用いずに再現する手法が考えられる。

そこで、本研究ではまずマクロファージとセラミック繊維の相互作用について検討する。セラミック繊維存在下、マクロファージの生体反応（増殖ならびに活性酸素産生量）を調べ、セラミック繊維の分解に及ぼす影響を明らかにする。そのうえで、セラミック繊維の生体内溶解性を簡便に評価可能な試験条件および手法を確立する。

市販の生体溶解性セラミック繊維は、SiO₂-CaO-MgO 系のガラスであり、その組成から AES 繊維（Alkaline Earth Silicate Fiber）と呼ばれている。アルカリ土類金属の含有量が多い繊維は、生体内でこれらの酸化物が溶出することにより、繊維の溶解・断片化が生じると期待されている。セラミック繊維中のアルカリ金属・アルカリ土類金属酸化物の溶出は、体液の pH に依存すると予想される。ヒトの体液は主として炭酸緩衝系の働きにより pH7.4 に保たれており、生体組織中の二酸化炭素濃度は大気中よりも高く約 5% である。しかし、肺胞内ではガス交換が行われるため、呼気中の測定値によると酸素濃度は 16%、二酸化炭素濃度は約 4% である。さらに、肺胞・気道粘膜はガス交換のために巨視的には気体と接しており、微視的には体液で覆われているが、その層はかなり薄い。すなわち、溶液中への単純な浸漬試験では、肺胞・気道内環境を再現できないことに留意が必要である。

以上を考慮し、具体的な実験手法として下記を検討する。(1)ヒト由来マクロファージ培養下、セラミック繊維添加時の細胞増殖挙動ならびに活性酸素産生量を測定する。同時に、材料の分解挙動を調べ、セラミック繊維の生体内分解におけるマクロファージの影響を明らかにする。

組織中のマクロファージは、通常の状態では貪食能および異物分解能は高くない。異物侵入のシグナルを受信、活性化すると貪食能が向上し、免疫細胞への抗原提示能が発現する。さらに、細菌の細胞壁成分と接することで超活性化すると、貪食能および異物分解能（活性酸素放出量）が著しく増加する（図 2）。そこで、本研究においてもマクロファージを活性化/超活性化し、活性酸素産生量を測定すると同時に、セラミック繊維の分解に及ぼす影響を確認する。活性化には常法である

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を用い、1mM になるよう培養系に添加した後、24 時間培養してから試験に供する。超活性化は、活性化マクロファージ培養系に細胞壁成分であるリポ多糖 (LPS) を 1 μ g/mL になるよう添加して実施する。

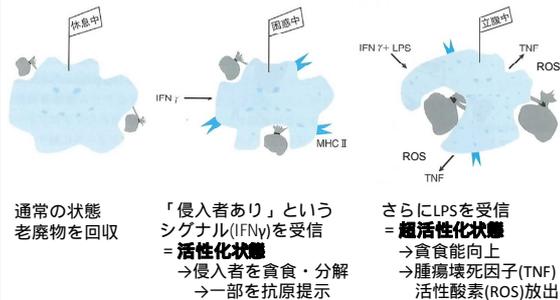


図 2 マクロファージの機能と活性化状態
([5]を基に作製)

続いて (2) 細胞を用いない条件で、同様の分解挙動を再現できる環境・試験方法を検討する。(1)で得られた結果を元に、気道・肺胞内雰囲気を考慮し、簡便な評価手法を確立する。気道・肺胞内の湿潤状態を再現するため、疑似体液への浸漬ではなく疑似体液の滴下試験を検討する。

気道液成分として、水 (84-94%)、タンパク質 (1-5%)、脂質 (0.9-3.1%)、炭水化物 (0.9-1.1%)、無機塩 (0.7-1.1%) [6]や、水 95%、核酸 0.028%、タンパク質 1%、脂質 0.84%、炭水化物 0.95%、無機物質 1.13% [7] という報告があるが、詳細を調べた例はない。組織液は血漿が毛細血管から浸出したものであり、その組成は血漿に近いと考えられる。表 3 にヒト血漿およびそれをもとに開発された細胞培養用培地の主要成分を示す。血清添加培地 (E-MEM+10%FBS) と気道液成分を比較すると、タンパク質濃度が 1/2-1/10 であることを除けば、ほぼ合致している。そこで、滴下試験には血清添加培地を疑似体液として用いる。

表 3 ヒト血漿および血清添加培地の主要成分

成分	ヒト血漿	E-MEM+10%FBS
Na ⁺ (mg/L)	3260	3300
K ⁺ (mg/L)	195.5	209.3
Ca ²⁺ (mg/L)	100	72.2
Mg ²⁺ (mg/L)	36	19.5
Cl ⁻ (mg/L)	3657	4493
HCO ₃ ⁻ (mg/L)	1647	1597
HPO ₄ ²⁻ (mg/L)	96	87.0
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	49	77.9
タンパク質*(g/L)	63-80	3-5
グルコース(g/L)	0.8-1	1
有機酸**(g/L)	0.25-0.4	0.86
脂質*** (g/L)	5-10	0.5-1

*アルブミン、グロブリンなど

** 乳酸、ピルビン酸など

*** コレステロール、脂肪酸など

4. 研究成果

(1) セラミック繊維の分解に及ぼすマクロファージの影響

セラミック繊維試料として、市販の生体溶解性セラミック繊維 2 種 (F および I) を用いた。細胞はヒトリンパ腫由来組織球 U937 を、培地は 10% 牛胎児血清添加 RPMI-1640 を使用した。培地 0.5mL 中に U937 細胞 2 万個を懸濁し、セラミック繊維試料約 7mg を添加、一定期間培養後、生細胞数を WST-1 法にて測定した。先述した方法により活性化 / 超活性化した U937 についても同様に生細胞数を測定した。その結果、セラミック繊維添加により、活性化の有無にかかわらず U937 の増殖が抑制された。増殖抑制は、試料 F よりも試料 I の方がやや強い傾向が認められた。

一方、マクロファージの活性化状態の指標として、活性酸素の一つである過酸化水素産生量を測定した。その結果、細胞のみ、あるいは細胞と繊維試料のみでは過酸化水素はほとんど検出されなかったが、PMA および LPS 添加により、過酸化水素の発生が認められた。さらに、繊維試料が加わることにより、過酸化水素発生量が大きく増加した (図 3)。

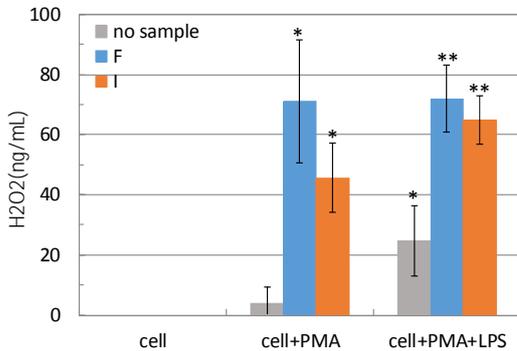


図 3 7 日間培養後の活性酸素発生量
cell と比較して * p<0.1, ** p<0.05

同様の条件下、セラミック繊維試料の分解量を調べた。培地 14mL 中に U937 細胞 56 万個を懸濁し、セラミック繊維試料約 20mg 添加後、7 日間培養した。培養終了後、試料は孔径 10 μ m のポリカーボネート製メンブレンフィルタにより回収、熱処理により有機物を除去した。溶解量は、有機物除去後の重量と初期重量との差から求めた。生体内では 10-20 μ m 以下の粒子はマクロファージによって貪食・除去されるので、肺組織内には滞留しない。その効果を模擬するため、孔径 10 μ m に制御されたトラックエッチ膜を使用した。結果を図 4 に示す。細胞の存在により、試料の溶解が顕著に抑制されることが判明した。一方、マクロファージの活性化状態は試料の溶解量にほとんど影響しなかった。念のため、実際の測定値と同程度の量の過酸化水素を培地に添加して溶解試験を実施したが、繊維 F、I 共に溶解量の増加は認められなかった。

溶解試験後の試料について、電子顕微鏡観察を実施したところ、繊維表面に溶解痕とみ

られる凹凸が観察された (写真 1)。この溶解痕は、培地中浸漬試験で最も凹凸が大きく、また数も多かった。一方、細胞の存在により溶解痕は小さい穴になり、数も減少した。

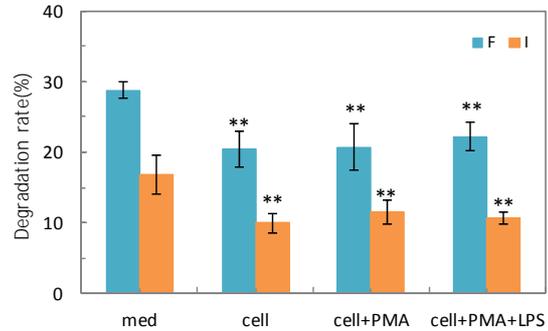


図 4 マクロファージ培養下セラミック繊維分解挙動
med:培地のみ。**med と比較して p<0.05

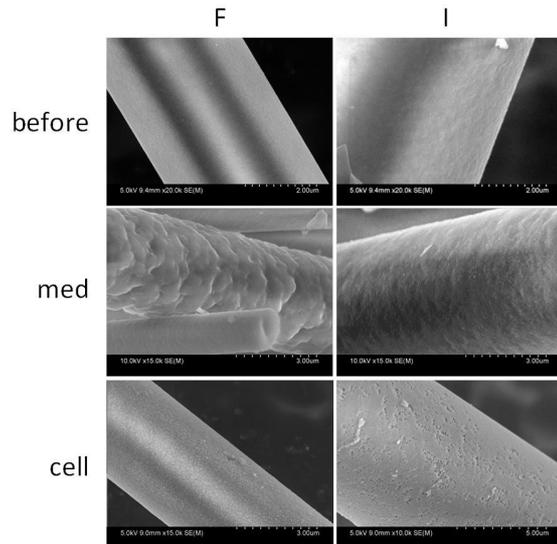


写真 1 溶解試験後の試料の電顕観察例。

溶解試験終了時の培地 pH 測定結果を表 4 に示す。細胞が共存する場合には、代謝による培地 pH の低下が認められた。

培地の緩衝能は、試験雰囲気の影響を受ける。肺胞・気道内においては、二酸化炭素濃度は生体組織中より低下し、酸素濃度も大気中よりも低下する。そこで、4%CO₂-16%O₂ 環境にて培地中への溶解試験を実施した (図 5)。その結果、4%CO₂-16%O₂ 環境では 5%CO₂-20%O₂ 環境よりも有意に溶解量が低下することが判明した。7 日間の溶解試験終了後の培地 pH は、繊維 F、I いずれも 4%CO₂-16%O₂ 環境の方が 5%CO₂-20%O₂ 環境よりも高かった (表 4)。すなわち、細胞のない状態では、pH が低いほど繊維溶解量が大きくなる傾向が確認された。

表 4 溶解試験後の培地 pH

試料	med*	med	cell	cell+PMA	cell+PMA+LPS
F	7.64	7.48	6.80	6.85	7.25
I	7.62	7.52	6.74	6.82	7.17

*4%CO₂-16%O₂ 環境。他は 5%CO₂-20%O₂ 環境

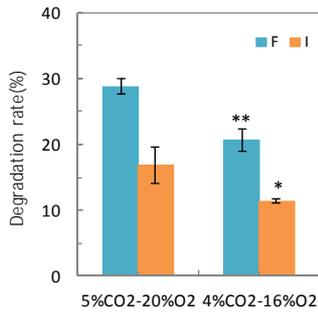


図5 二酸化炭素・酸素濃度の影響
5%CO₂-20%O₂環境と比較して* p<0.1, **p<0.05

今回用いた生体溶解性セラミック繊維は AES 繊維であり(表5)、先述したように、繊維中のアルカリ土類金属酸化物が溶出することにより、分解・断片化すると考えられる。アルカリ土類金属酸化物は中性よりも酸性の溶液の方が溶解しやすく、溶解に伴い溶液 pH を上昇させる。炭酸緩衝系溶液では、雰囲気中の二酸化炭素が溶解し炭酸を形成するため、雰囲気中の二酸化炭素濃度が高い方が、緩衝能が大きくなる。そのため、5%CO₂-20%O₂環境の方が、4%CO₂-16%O₂環境よりも培地 pH が低く維持され、溶解量が高くなったと考えられる。細胞が存在する場合に、培地中 pH は低下したが溶解量が増加しなかったのは、pH 以外の要因の影響が大きいと推測される。

表5 セラミック繊維試料の組成(%)*

繊維	SiO ₂	CaO+MgO	その他
F	76	22	2
I	73-77	22-20	5-3

*カタログにおける公表値

(2) セラミック繊維の生体内分解特性評価手法の開発

(1)では、マクロファージによる生体溶解性セラミック繊維の分解促進はほとんど生じないことが判明した。一方で、体液は炭酸緩衝溶液であるため、雰囲気中の二酸化炭素濃度が溶解量に影響することを確認した。そこで、細胞を用いず、肺胞内・気道内を再現した環境下でセラミック繊維の溶解量を簡便に評価する手法として、疑似体液の滴下試験を検討した。

気道粘膜表面を湿らす気道液は、1日当たり 10-100mL 分泌される[5]。そこで、疑似体液滴下量を 10-50mL の範囲で変化させ、分解量に及ぼす滴下量の影響を検討した。疑似体液として血清添加培地 (E-MEM+10%FBS) を用い、4%CO₂-16%O₂環境にて実施した。セラミック繊維の溶解量は、(1)と同様にポリカーボネート製メンブレンフィルタにて濾別、熱処理後の重量から求めた。

繊維 I についての結果を図 6 に示す。滴下量の増加に伴い分解量が増加する傾向が認められた。滴下量を一定にし、試験期間を最大 28 日まで延長した結果を図 7 に示す。 織

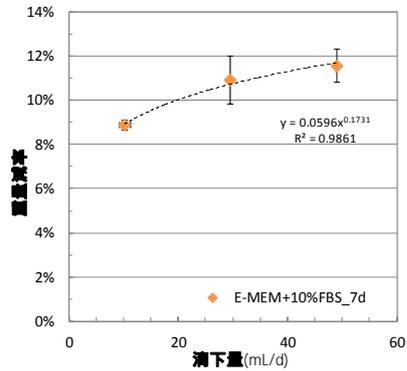


図6 滴下試験に及ぼす滴下量の影響

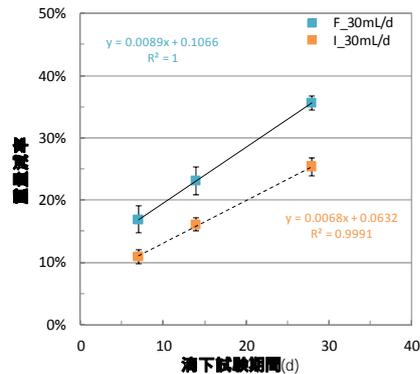


図7 滴下試験結果

維 F および I のいずれも試験期間の増加に伴い、溶解量の増加が認められた。線形近似の外挿に基づき荷重半減期を求めた結果、繊維 F では約 44 日、繊維 I では約 64 日であった。繊維 F の方が I よりも溶解量が大きいう結果は、(1)の溶解試験結果と一致した。繊維 F と I の組成を比較すると(表5)、F の方が I よりもアルカリ土類金属の割合が高い。そのため、溶解性も高くなったと推測される。

繊維 F、I 共に EC 指令におけるカテゴリ 0 を満たしており、動物試験(おそらく気管注入試験)において荷重半減期 40 日以内を満たしていると予想される。開発した in vitro 手法で求めた半減期はいずれも 40 日を上回っていたことから、動物試験よりも分解速度が若干遅いことがわかる。図 7 では 1 日当たりの滴下量を 30mL としたが、図 6 に示すように滴下量により溶解量に変化する。したがって、滴下量を調整することにより動物試験結果に近い値を得ることは可能と推測される。一方、これら繊維材料がヒト体内に侵入した際には、個々人により気道液等の分泌量も異なるため、動物試験の結果とは異なる溶解速度を与える可能性は十分ある。開発手法は、溶解速度を制御する因子も制御可能であるため、溶解機構の考察や、人体への影響のシミュレーション法として有用であることが期待される。

本研究での開発手法のもう一つの大きな特徴は、高価な化学分析機器を用いない点である。必要な機器は、疑似体液滴下のためのローラーポンプ、有機物除去のための電気炉

と重量測定のための分析天秤のみであり、高度な測定技術等を必要とせず、誰でも簡便に実施できる。それを可能にしたのは、肺胞内では10-20 μ m以下の微粒子はマクロファージにより貪食・除去されるため、滞留物として考慮しなくてよいことに着目した点、さらに肺胞内で生じるこの微粒子除去現象を生体外で再現すべく、孔径10 μ mに制御されたトラックエッチ膜を滴下試験後の試料回収に用いる、という発想である。特許出願を優先したため、現在論文発表の準備中であるが、今後は論文発表を進め、本手法が生体内溶解性評価の標準的な方法として汎用化されることを、ひいては動物実験の代替法となることを望みたい。

<引用文献>

- [1]北原英樹、繊維の生体溶解性評価方法、ニチアス技術時報、334巻、2002、1-7.
- [2]森本泰夫、石綿代替品の発がんメカニズムとハザード評価 2005年IARCのワークショップレポート、産衛誌48巻、2006、A38-A43.
- [3]津田修治、6.6呼吸器毒性、日本トキシコロジー学会教育委員会編「トキシコロジー」pp.175-185、朝倉書店、東京、2002.
- [4]US EPA(2004) Air quality criteria for particulate matter. EPA report no. EPA/600/P-99/002aF
- [5]L.Sompayrac(大澤利昭訳)、免疫系のしくみ 免疫学入門、東京化学同人、東京、2001.
- [6]玉置淳、日呼吸会誌36(1998)217-223.
- [7]臨床検査法提要(改訂第31版)p.1736、金原出版、東京、1998.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

山本玲子 他2名「生体溶解性繊維材料の分解に及ぼすマクロファージの影響」日本金属学会2018年春期(第162回)講演大会、2018.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：無機繊維の生体溶解性評価装置および評価方法

発明者：山本玲子

権利者：国立研究開発法人物質・材料研究機構

種類：特許

番号：2017-006113

出願年月日：2017年1月17日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 玲子(YAMAMOTO Akiko)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・上席研究員

研究者番号：20343882

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

神山 祐子(KOHYAMA Yuko)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・研究業務員

菊田 明美(KIKUTA Akemi)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・機能性材料研究拠点・研究業務員