

機関番号：37116

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590939

研究課題名 (和文) ナノ粒子による肺障害の解明と有害性評価システムの構築

研究課題名 (英文) Development of estimating system of hazard effect of nanomaterials

研究代表者

森本 泰夫 (MORIMOTO YASUO)

産業医科大学・産業生態科学研究所・教授

研究者番号：30258628

研究成果の概要 (和文) : ナノ粒子による有害性評価システムを構築するため、キャラクターゼーションを行ったナノ粒子や繊維状物質を用いて以下の試験を行った。気管内注入試験では、酸化ニッケルナノ粒子、二酸化チタンナノ粒子の高用量、チタン酸カリウムウィスカは肺の炎症を誘発した。試験管内試験として、肺胞上皮細胞を用いて、酸化ニッケルでは IL-8 が上昇し、酸化ニッケルでは認めなかった。これらの試験は、有害性評価に有用であった。

研究成果の概要 (英文) : We examined studies using characterized nano and fibrous materials in order to establish the estimating system of hazard effect of these materials. In intratracheal instillation studies, nickel oxide nanomaterials with agglomerates micron-size, high dose of titanium dioxide nanoparticles and potassium octatitanate Whiskers (PT-1) induced the pulmonary inflammation in rat lung. In vitro study using alveolar epithelial cell lines, nickel oxide induced IL-8 concentration and titanium dioxide did not. These studies are useful to estimate the harmful effect of nano and fibrous materials.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
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：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：ナノ粒子、肺障害、キャラクターゼーション、ハザード、環境

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーの飛躍的な技術革新に伴い、工業ナノ製品が世の中にすさまじい勢いで浸透している。しかし、PM2.5などのナノ粒子が、気管支喘息等の呼吸器疾患や心疾患を誘発すること、及びディーゼル粒子の曝露試験により曝露対象外臓器である脳や前立腺に粒子が沈着したことが報告され、工業用ナノ材料の生体影響が懸念されるようになった。しかし、工業用ナノ材料の生体影響は、一定の見解に至っていない。この背景には、

同じナノ材料でも、サイズ、凝集体、成分等が異なると、生体反応に差異を生ずることが考えられる。たとえば、繊維状の工業用ナノ材料であるカーボンナノチューブは、腹腔内注入試験にて、繊維の長さが15ミクロンになると肉芽を誘発するが短い繊維では認められないこと、触媒として鉄成分を多く含むと炎症が著明になることが報告されている。よって、工業用ナノ材料のキャラクターゼーション(物理化学的特性)を十分に把握して、動物試験や試験管内試験を行い、有害性を検

討することが重要である。

2. 研究の目的

本研究目的は、工業用ナノ材料の肺障害の解明及び有害性評価システムの開発である。物理化学的試験、試験管内試験、動物曝露試験を展開する。物理化学的試験においては、対象粒子のキャラクタリゼーション（物理化学的特性）、試験管内試験では、肺障害の機序解明、スクリーニングに有用なマーカーの開発、動物曝露試験においては、対象粒子を気管内注入試験または吸入曝露試験を行い、様々な臓器病態を解明し、有害性評価のためのバイオマーカーの検索を行う。

3. 研究の方法

物理化学的特性

研究に使用した物質は、酸化ニッケルナノ粒子（ナノ粒子の陽性対照物質）、二酸化チタンナノ粒子（ナノ粒子の陰性対照物質）、チタン酸カリウムウイスカ（繊維状物質の陽性対照物質）である。物理化学的特性に関しては、酸化ニッケルナノ粒子（BET 104.6 m²/g、比表面積径 8.41nm、公称径 20nm、純度 99.8%）、二酸化チタンナノ粒子（14nm、DLS:130nm、BET 102 m²/g、比表面積径 15nm、チタン 60%）、チタン酸カリウムウイスカ（幾何平均径 0.35μm(1.6)、幾何平均長さ 4.4μm(2.7)）である。

試験管内試験

試料として、酸化ニッケルナノ粒子、二酸化チタンナノ粒子を用いた。ナノ粒子は、表面積が大きいと、表面に蛋白を吸着し、細胞毒性が反映されない可能性があるため、蛋白コーティング処理を行った。曝露物質を 10% FBS 含有 D-MEM 25 ml で、ボルテックスミキサー、ソニケーターを用いて分散後、遠心。上清を除去した後、FBS を含まない D-MEM 25ml で、ボルテックスミキサー、ソニケーターを用いて再分散し、再度遠心。再度、上清を除去した後、1%FBS を含む D-MEM を加え、再分散を行い、ナノ粒子懸濁液を作成した。0.5%FCS を含む D-MEM 溶液を用いた A549 細胞浮遊液を、6 穴の細胞培養プレートに加え、5.0 X 10⁵/well に調整し、一晚培養。予備吸着させた二酸化チタン、酸化ニッケルの懸濁液を加え、最終濃度 25μg, 50μg/cm² とした。48 時間後に、上清を回収し LDH 放出能を測定した。また、付着した A549 細胞から蛋白を抽出し、IL-8 濃度、Heme-oxygenase-1 (HO-1) 濃度を測定した。

気管内注入試験

試料として酸化ニッケルナノ粒子、二酸化チタンナノ粒子、チタン酸カリウムウイスカを用いた。注入量は、酸化ニッケルナノ粒子が

1mg（生理食塩水の懸濁液）、二酸化チタンナノ粒子（蒸留水の懸濁液）が 0.1mg、0.2 mg、1mg、3mg であり、チタン酸カリウムウイスカ（生理食塩水が懸濁液）は 1mg、2mg であった。Wistar 系雄性ラット 9 週齢に、各々の試料を単回注入した。また、対照群として酸化ニッケルナノ粒子、チタン酸カリウムウイスカでは生理食塩水注入群、二酸化チタンナノ粒子では、蒸留水注入群とした。注入後 3 日、1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月後に解剖を行った。右肺下二葉をホモジナイズし、タンパクを抽出し 500μg/ml に調整した。濃度調節した肺組織のタンパクを用いて、cytokine-induced neutrophil chemoattractant -1 (CINC-1)、CINC-2、CINC-3 または Heme oxygenase-1 (HO-1) の濃度測定を ELISA キットを用いて行った。病理組織標本を作製するため、4%パラホルムアルデヒドで定圧固定を行った。

4. 研究成果

まず、工業用ナノ材料のひとつであるトナーの情報収集を行い、チタン等で有害性に関する報告があることを確認した。

試験管内試験

LDH に関しては、二酸化チタンナノ粒子では、25μg, 50μg/cm²とも medium とほとんどかわらず、酸化ニッケルナノ粒子は用量依存性に放出量が増加した。同様に IL-8 濃度、HO-1 濃度に関しても、二酸化チタンはほとんどかわらないか、経度の低下傾向を示したのに対し、酸化ニッケルナノ粒子では、用量依存性は認められなかったが、有意に増加した。酸化ニッケルが細胞毒性、フリーラジカル生成能をもつことは、報告されており、HO-1 は酸化ストレスが亢進したとき、発現が亢進することも報告されていることから、我々の今回の結果と一致するものと考えられる。

以上の結果から、表面処理を行った酸化ニッケルナノ粒子や二酸化チタンナノ粒子は、試験管内試験において陽性対照、陰性対照となりうることを示唆された。

気管内注入試験

酸化ニッケル

BALF における LDH 放出量に関しては、酸化ニッケルナノ粒子曝露により著明な上昇を認めていない。しかし、ALP 放出量に関しては、有意差はないが観察期間を通して上昇傾向を認め、特に 1 週間と 3 ヶ月にピークがあった。

ケモカインにおいては、肺組織の CINC-1 濃度では、観察期間を通して酸化ニッケル曝露により上昇を示している。特に 3 日目と 3 ヶ月、6 ヶ月後では、有意な上昇を示しており、

2 峰性のパターンを呈している。CINC-2 においても同様であり、これは観察期間を通して有意な濃度上昇があり、3 日目と 3 ヶ月、6 ヶ月後は特に高かった。CINC-3 に関しては、急性期(3 日目)にピークがあり、その後徐々に低下したが、6 か月後においても有意差をもって陰性対照群よりは高かった。BALF のケモカインは、CINC-1 も CINC-2 も観察期間を通して有意な上昇を示しているが、肺組織と異なり、1 ヶ月後、3 ヶ月後にピークを認めた。CINC-3 に関しては、検出限界以下のものもあり、差を認めなかった。

肺の病理所見に関しては、3 日目には好中球や肺胞マクロファージを中心とした炎症細胞が小葉中心性に浸潤を認めたが、granuloma や線維化の所見は認められなかった。その後、炎症は進展し、泡沫化肺胞マクロファージや浸出液が肺胞腔内を占めるようになった。間質も肺胞腔内に炎症を認める領域を中心に肥厚を認め、肺胞上皮細胞の過形成を認めた。血管周囲にも炎症細胞浸潤を認めた。

酸化ニッケルナノ粒子注入したラットモデルにおいて、著明な好中球を中心とした炎症細胞浸潤と CINC ファミリーの持続的亢進を認めた。これも陽性対照物質である結晶質シリカと同様に炎症が強く、CINC1-3 のすべての好中球ケモカインでの亢進を認めた。以前行った酸化ニッケルナノ粒子(定量)の低用量を気管内注入したモデルにおいて、軽度の炎症であり、ケモカインに関しては、CINC-1、CINC-2 の亢進のみであった。よって、これから、CINC-3 が、炎症増強作用を有していることが示唆された。

ナノ粒子の有害性を評価するのに、陽性対照物質となりうるものは、著者らが知りうる限りないと思われる。しかし、酸化ニッケルナノ粒子は、1) ナノ粒子の凝集体レベルでも、100nm 以下(ナノレベル)にサイズを制御でき、長期間(3 週間)において維持できること。2) 長期吸入曝露試験において肺腫瘍の発生を認めたこと、3) 気管内注入試験等で持続的な炎症を認めていること、4) 粉じんによる肺傷害に大きく関与するフリーラジカルの著明な生成亢進を認めること、から陽性対照物質の候補として十分条件を備えていると考えられる。この酸化ニッケルナノ粒子の気管内注入モデルにおいてケモカインの産生が亢進したことは、ナノ粒子による肺傷害にケモカインが関与することが示唆された。

二酸化チタン

BALF の総細胞数では、3 日後では、用量依存性に増加し、以後のタイムコースでは有意な陰性対照群と曝露群では一貫した差は認められなかった。また、好中球数では、高用量

である 1mg、3mg で有意な上昇を認め、特に 3mg では 6 ヶ月まで持続的な上昇を認めた。好中球のケモカインに関しても、肺組織の CINC-1、CINC-2、CINC-3 において 3 日目に高用量(1mg、3mg)で有意に濃度上昇を認め、その後は低下した。特に、3mg において、3 つのケモカインとも好中球数と同様に持続的な上昇を認めた。BALF に関しては、CINC-1 は組織と同様に高用量で 3 日目に増加し、その後低下したが、3mg は観察期間を通して持続して有意な上昇を認めた。CINC-2 は、3 日目に高用量で濃度上昇を認めたが、その後は一貫した差異は認めなかった。

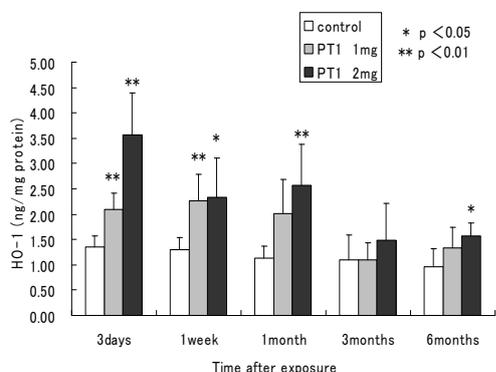
3 日目の肺の病理学的な所見としては、0.1mg、0.2mg の低用量では、好中球を含む軽度の炎症細胞浸潤が、肺胞道から周囲の肺胞付近で認められた。間質の肥厚は認められなかった。1mg では、低用量と同様の所見ではあるが、炎症が進展し、より多くの周囲の肺胞領域で炎症細胞の浸潤が認められ、茶褐色調の大型の肺胞マクロファージが肺胞腔にみられた。明確な Granuloma は認められなかった。3mg では、さらなる炎症細胞浸潤を認め、茶褐色調の granuloma が肺胞道から周囲の肺胞で認められ、間質の部分的肥厚(肺胞の虚脱か?)が認められた。

二酸化チタンナノ粒子を用いて気管内注入をした結果、0.1mg、0.2mg の低用量では、軽度な炎症のみしか認めず、1mg ではさらに炎症が亢進し、3mg では著明な亢進で granuloma も認められた。二酸化チタンは、工業用ナノ材料の中でも、毒性の低い物質であること、ミクロンサイズの粉じんであれば、一定の用量以上投与すると、たとえ毒性が低くても炎症、線維化、がんをひきおこすことが報告(閾値が存在する)されていることから、1mg 前後が、工業用ナノ材料を動物曝露試験で投与する上での、生理的投与量の閾値付近であると考えられる。過剰投与による肺障害の機序として、肺胞マクロファージによるクリアランスが遅延することが考えられている。大量に肺内に粒子が沈着し、肺胞マクロファージの食食・運搬能をこえると長期的に肺内に粉じんが滞留し肺に傷害をひきおこす機会が増加することである。病理所見としても高用量で粉じんを食食した肺胞マクロファージが認められており、ナノ粒子においても過剰投与における肺障害があることが考えられた。

チタン酸カリウムウイスカ

1mg、2mg のチタン酸カリウムウイスカの注入にて、好中球を中心とした肺の炎症は、3 日後から認められ、持続はするが、徐々に軽減していった。一方、酸化ストレスの指標である Heme oxygenase-1 (HO-1) も同様に 3 日後から上昇するがその後は徐々に低下し

た。肺の炎症も HO-1 の発現も、持続はしているが、陽性対照である結晶質シリカよりは低く、陰性対照である二酸化チタン（ミクロン粒子）よりは高かった。本試験より、結晶質シリカほど炎症能は強くはないが、チタン酸カリウムウイスカは、持続的炎症能を認め、有害性を有す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 4 件)

- ① Morimoto Y, Hirohashi M, Ogami A, Oyabu T, Myojo T, Hashiba M, Mizuguchi Y, Kambara T, Lee BW, Kuroda E, Tanaka I. Pulmonary Toxicity Following an Intratracheal Instillation of Nickel oxide Nanoparticle Agglomerates. J Occup Health. 査読有、2011、in press
- ② Obata Y, Morimoto Y, Hirohashi M, Ogami A, Oyabu T, Myojo T, Kawanami S, Horie S, Nagatomo H, Murakami M, Tanaka I. Expression of Heme Oxygenase-1 in the lungs of Rats Exposed to Potassium Octatitanate whiskers. J Occup Health. 査読有、2011、in press
- ③ 森本 泰夫、大神 明、幸地 勇、内山 鉄朗、井出 玲子、明星 敏彦、東 敏昭、トナー粒子における生体影響の解説と労働衛生管理への対応—継続的文献調査による検討—、産業衛生学雑誌、査読有、2010、52(5):201-208
- ④ 森本 泰夫、喜多村 紘子、空閑 玄明、井出 玲子、明星 敏彦、東 敏昭、佐藤 敏彦、相澤 好治、トナー粒子における新たな生体影響調査と労働衛生管理について、産業衛生学雑誌、査読有、2009、51(1):1-10

[学会発表] (計 3 件)

- ① 森本 泰夫、ナノ粒子の生体影響 —炎症と線維化を中心に—、第 9 回 分子予防環

境医学研究会、2010.1.22-23 (東京)

- ② 小畑 泰子、森本 泰夫、長友 寛子、村上 昌宏、廣橋 雅美、大神 明、田中 勇武、チタン酸カリウムウイスカ(PT1)気管内注入によるヘムオキシゲナーゼ(HO-1)の発現、第 82 回 日本産業衛生学会、2009.5.20-22 (福岡)
- ③ 轟木 基、森本 泰夫、村上 昌宏、大神 明、大藪 貴子、明星 敏彦、廣橋 雅美、山崎 小由美、西 賢一郎、角谷 力、山本 誠、田中 勇武、粒径の異なる結晶質シリカ曝露による肺障害における酸化ストレスマーカーの有用性 —肺組織におけるHO-1 の発現—、第 81 回日本産業衛生学会、2008.6.25-27 (札幌)

[その他]

ホームページ

<http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/kbyotai/work/frame09.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 泰夫 (MORIMOTO YASUO)
産業医科大学・産業生態科学研究所・教授
研究者番号：30258628

(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
(H22)

橋場 昌義 (HASHIBA MASAYOSHI)
産業医科大学・産業生態科学研究所・
専門修練医
研究者番号：90566431
(H21→H22)

田中 勇武 (TANAKA ISAMU)
産業医科大学・産業生態科学研究所・
名誉教授
研究者番号：00038035
(H20→H21)

廣橋 雅美 (HIROHASHI MASAMI)
産業医科大学・産業生態科学研究所・
教務職員
研究者番号：50389475
(H20)