

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590772

研究課題名(和文)新規開発ナノサイズ粒子の有害性予測指標の検索

研究課題名(英文)Effect of surface property on the hazard of nanoparticles

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・講師

研究者番号：20320369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ナノサイズ粒子の吸入による肺有害性において、その粒子の表面の化学的因子の影響を検討するため、表面官能基の異なる3種(なし、NH₂、COOH)のナノ粒子を用いて、肺胞マクロファージによる貪食試験(in vitro試験)およびラットに対して気管内注入試験(in vivo試験)を行った。その結果、in vitro試験では、表面にCOOH基を持つ粒子が最も貪食された。In vivo試験では、注入後最大12か月後まで経時的に、BALF中の炎症細胞数や病理組織変化などの評価を行った結果、3群ともその反応は注入後比較的早い時期におさまっていた。粒子間では、表面官能基なしの群が最も大きな反応を示した。

研究成果の概要(英文)：For investigating the effect of surface property of nanoparticles on the hazard in inhalation, we performed in vitro and in vivo experiments. We selected 3 differentially functionalized nanoparticles; those are amine, carboxyl group and none. At first, in vitro study, we evaluated which functionalized particle is easily phagocytized by rat alveolar macrophage. The results showed the carboxylic functionalized nanoparticles are most phagocytized. Next, we performed intratracheal instillation of 3 functionalized silica nanoparticles to rats, and evaluated the total cell, PMN counts in broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and histopathological change in lung. As a result of this instillation, increase of total cell, PMN count in BALF and histopathological changes were remarkable at 3 days after the instillation but the reactions were gradually diminished. In comparison of 3 types of particle, the particle which does not have functional groups was most reactive.

研究分野：吸入性粒子の有害性評価

キーワード：ナノ粒子 有害性評価 表面官能基 気管内注入試験 貪食能試験

1. 研究開始当初の背景

ナノサイズ粒子は、ミクロンサイズ粒子では持ち得ない電氣的性質や光學的性質を利用して工業製品や医療への応用が期待されている。ナノ粒子を吸入することによる影響は、粒子の表面積に依存することが多数報告されており、このことは即ち、有害性は表面性状に依存することを示唆している。

我々はこれまで、肺に侵入した粒子の肺からの排泄が遅いほど肺への影響が大きく、肺からの排泄速度は投与物質の有害性の指標となることを報告してきた。また、EUの石綿代替繊維の発がん分類基準においても、肺内滞留性が採用されており、肺内滞留性と生体影響の相関が明らかにされている。

肺からの排泄に関係しているのは、粒子の溶解と肺胞マクロファージによる貪食、移動である。難溶性の粒子においてはこの肺胞マクロファージによる貪食、移動が排泄速度を左右する最も大きな因子となるため、粒子の有害性を検討するためには、粒子と肺胞マクロファージとの反応(貪食)を検討する必要がある。この肺胞マクロファージの貪食に関わる化学的因子である粒子の表面官能基については、あまり検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ粒子の表面官能基に焦点をあて、この化学的因子が肺胞マクロファージによる貪食されやすさと有害性にどのように関与するのかを *in vitro* 試験および *in vivo* 試験を行うことにより明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ナノ粒子の表面官能基が肺有害性に与える影響を評価するため、まず、(1)表面官能基の異なる3種(なし、 $-NH_2$ 、 $-COOH$)の蛍光ポリスチレンラテックスを肺胞マクロファージと試験管内で培養し、貪食の割合を定量的に評価した。*(in vitro* 試験)その後、(2)表面官能基の異なる3種(なし、 $-NH_2$ 、 $-COOH$)のメソポーラスシリカ粒子から同じサイズの注入試料を超音波粉碎および遠心分離法により作成し、ラットの気管内に注入し、体重、臓器重量や血液および気管支肺胞洗浄液(BALF)中の炎症細胞数、病理組織変化などの有害性指標を注入後1年後まで観察した。*(in vivo* 試験)

(1) In Vitro 試験

①貪食能試験に用いた粒子

3種の表面官能基の異なる(官能基なし(Plain)、 $-NH_2$ 、 $-COOH$)同じ濃度の25nmの蛍光ラテックスナノ粒子懸濁液を購入。(コアフロント、 1.2×10^{12} 個/ μL)

②貪食能測定試験に用いたラット肺胞マクロファージの採取および調製

ラット(Wistar系雄性、8w週齢)5匹からBALFを採取し、遠心分離により細胞成分のみ

を回収した。その際、各ラットから採取した最初のBALFの上澄み液は後の貪食能試験に用いるため保存した。回収した細胞成分は最終的にPMN Bufferで2mLに調製した。その後トリパンブルー染色を行い、生細胞を計数した(4×10^6 細胞/mL)。

③貪食能評価試験

予備試験を行い、反応1ウェルあたり 1×10^8 粒子/細胞であれば、2時間の貪食試験において、貪食能が測定可能であることを確認した後、本実験では、12wellプレートに培地(RPMI1640)および前述のBAL液上澄みを1mL入れた後、ラットから回収した細胞懸濁液を等量(125 μL)加え、これに3種の蛍光ナノ粒子を細胞当たり 1×10^8 個強になるように50 μL ずつ加えた。粒子を加えないウェルを陰性対照とし各2ウェル調製した(合計16ウェル)。37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 、飽和蒸気下で2時間インキュベートし、細胞を回収した。細胞は最終的に1mLのPBSで懸濁してフローサイトメトリー用サンプルとした。

④ラット肺胞マクロファージ中の粒子の定量方法

フローサイトメーター(EC800セルアナライザー、ソニー)を用いて、マクロファージ1万個に取り込まれた蛍光粒子の蛍光強度を測定(488nm励起、蛍光フィルター525nm)し、マクロファージ1個当たりの平均蛍光強度を算出した。

(2) In Vivo 試験

①気管内注入試料の作製

Sigma-Aldrichより、表面がアミノ基、カルボキシル基で修飾されたメソポーラスシリカおよび処理なしの同粒子を購入した。公称粒子径は200nmであった。今後それぞれを SiO_2 、 SiO_2-NH_2 、 SiO_2-COOH と表記する。

この3種の粒子を蒸留水に分散させ、遠心分離を行い、その上澄みから注入粒子の作製を試みたが、 SiO_2-NH_2 のpHが1~2と低く、このままではpHが低いことが肺に影響をおよぼし、粒子による影響が正確に評価されない懸念があった。様々試みた結果、粒子を蒸留水で何度か洗浄すると、pHが中性近くになったので、この洗浄した粒子から注入試料の作製を行った。注入試料は、蒸留水に分散させた上記3種類の粒子を SiO_2-NH_2 、 SiO_2-COOH については、2000rpmで10分の遠心分離を行い、上清の小さい粒子の分散液を採取した。 SiO_2 は、1500rpm、10分と1700rpm、10分の上清混合溶液とした。作製した粒子溶液の重量濃度は、1昼夜乾燥後の重量を測定し、濃度を決定した。 SiO_2 、 SiO_2-NH_2 、 SiO_2-COOH の重量濃度は、それぞれ1.22、1.25、1.25mg/mLであり、0.8mLを注入することにより1mgの粒子をラットに等量注入できることが確認できた。

気管内注入試料の粒度分布は、Zetasizer Nano-S (Malvern製)を用いて、ゼータポテン

シヤルおよび pH は Zetasizer Nano ZS (Malvern 製)を用いて測定した。

②気管内注入試験

Wistar 系ラット(8週齢)を麻酔後、上記の方法で作成した3種の粒子懸濁液を、気管内に1.0 mg/0.8 ml 蒸留水の投与量で注入を行った。ラット匹数は、それぞれ50匹とした。注入後3日後、1、3、6、12ヶ月後に各群10匹の解剖を行った。解剖時にすべてのラットは体重を測定し、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、その重量の測定を行った。また各群5匹は解剖時に血液を採取し、血液中の白血球数、好中球数を計測した。また各群5匹の肺を摘出し、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レ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、細胞分画を計数し、好中球数(PMN)を算定した。

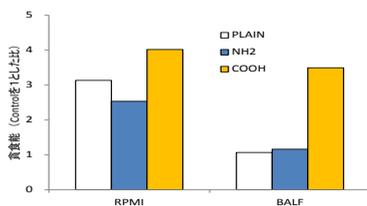
④病理組織切片の作製

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3μm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

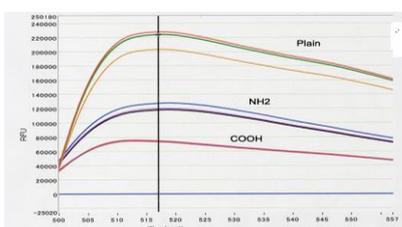
(1) 食食能評価試験結果

下図にフローサイトメトリーにより得られた肺胞マクロファージに食食された粒子の蛍光強度を示した。

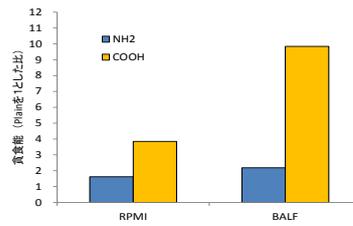


RPMI 培地、BALF 上清ともに COOH 基を持つ粒子が最も食食されていた。

しかし、3種の粒子の蛍光強度はそれぞれ異なっており、500~560nm における蛍光強度の測定を行った。結果を以下に示す。



実験結果を525nmの強度で補正し、官能基なしを「1」として再計算し、以下の結果を得た。



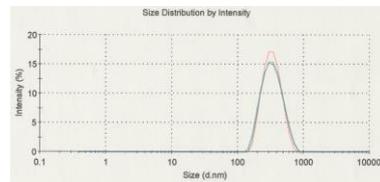
この結果から、NH₂基で表面修飾された粒子は、表面修飾されない基に比較して肺胞マクロファージに食食されやすさは、あまり変化しないが、COOH基で表面修飾された粒子は、食食されやすくなると考えられる。

(2) 気管内注入試験結果

①気管内注入試料の粒径分布

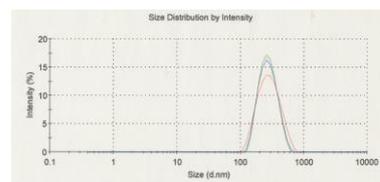
遠心分離により得られた各粒子の蒸留水懸濁液の粒子径分布の結果を以下に示す。

《SiO₂》



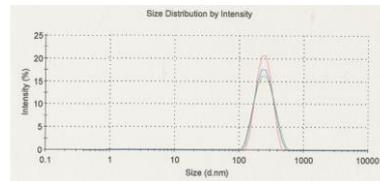
粒子径
311.5nm

《SiO₂-NH₂》



粒子径
259.5nm

《SiO₂-COOH》



粒子径
230.7nm

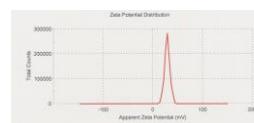
②気管内注入試料のゼータポテンシャルおよび pH

《SiO₂》



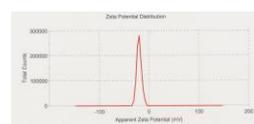
測定値(2回測定)
-34.5 mV
-33.1 mV
(pH: 7.1)

《SiO₂-NH₂》



測定値(2回測定)
29.1 mV
31.9 mV
(pH: 6.0)

《SiO₂-COOH》



測定値(2回測定)
-20.0 mV
-21.5 mV
(pH: 6.7)

③各解剖時期における体重および臓器重量

《体重》			
	SiO ₂ 注入群	SiO ₂ -NH ₂ 注入群	SiO ₂ -COOH注入群
3日後	338 ± 19	358 ± 18	342 ± 13
1ヶ月後	418 ± 37	462 ± 21	448 ± 27
3ヶ月後	568 ± 75	561 ± 48	548 ± 31
6ヶ月後	688 ± 73	674 ± 53	772 ± 89
12ヶ月後	743 ± 65	874 ± 175	811 ± 51
(g)			
《肺》			
	SiO ₂ 注入群	SiO ₂ -NH ₂ 注入群	SiO ₂ -COOH注入群
3日後	1.52 ± 0.11	1.48 ± 0.03	1.44 ± 0.09
1ヶ月後	1.34 ± 0.03	1.36 ± 0.03	1.36 ± 0.10
3ヶ月後	1.50 ± 0.11	1.51 ± 0.11	1.53 ± 0.08
6ヶ月後	1.70 ± 0.16	1.70 ± 0.07	1.81 ± 0.14
12ヶ月後	1.84 ± 0.11	1.86 ± 0.08	1.80 ± 0.12
(g)			
《肝臓》			
	SiO ₂ 注入群	SiO ₂ -NH ₂ 注入群	SiO ₂ -COOH注入群
3日後	15.0 ± 2.1	16.2 ± 1.0	14.8 ± 1.0
1ヶ月後	14.5 ± 1.8	15.8 ± 1.0	15.2 ± 1.0
3ヶ月後	16.5 ± 2.6	17.0 ± 2.3	16.0 ± 1.0
6ヶ月後	21.1 ± 3.3	19.4 ± 1.6	21.2 ± 2.8
12ヶ月後	19.8 ± 2.5	22.6 ± 4.4	20.3 ± 3.9
(g)			
《腎臓》			
	SiO ₂ 注入群	SiO ₂ -NH ₂ 注入群	SiO ₂ -COOH注入群
3日後	2.26 ± 0.22	2.41 ± 0.18	2.42 ± 0.19
1ヶ月後	2.62 ± 0.15	2.87 ± 0.44	2.77 ± 0.20
3ヶ月後	3.00 ± 0.29	3.06 ± 0.32	2.95 ± 0.15
6ヶ月後	3.43 ± 0.36	3.32 ± 0.24	3.53 ± 0.39
12ヶ月後	3.47 ± 0.24	3.75 ± 0.58	3.70 ± 0.37
(g)			
《脾臓》			
	SiO ₂ 注入群	SiO ₂ -NH ₂ 注入群	SiO ₂ -COOH注入群
3日後	0.810 ± 0.061	0.860 ± 0.075	0.810 ± 0.059
1ヶ月後	0.856 ± 0.132	0.735 ± 0.096	0.798 ± 0.089
3ヶ月後	0.835 ± 0.062	0.897 ± 0.070	0.878 ± 0.113
6ヶ月後	0.872 ± 0.112	0.944 ± 0.066	0.960 ± 0.075
12ヶ月後	0.974 ± 0.109	1.127 ± 0.184	1.090 ± 0.129
(g)			

体重および肺、肝臓、腎臓、脾臓の臓器重量において、Mann-Whitney の U 検定を行った結果、すべての解剖時期において、3 群間で有意の差異は認められなかった。

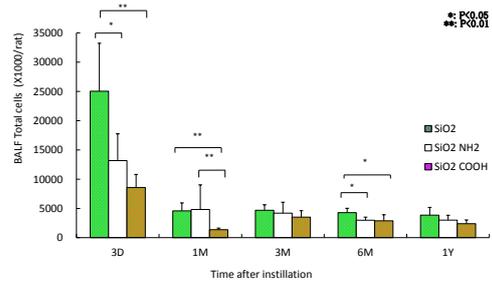
以降、検定は同方法を行う。

④血液中の白血球数および好中球数

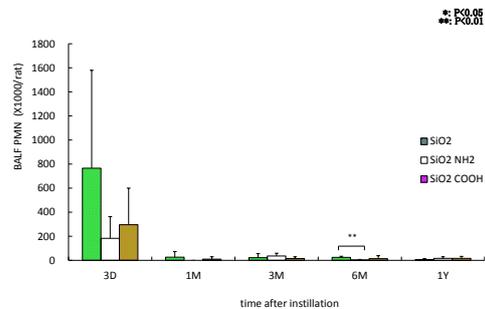
解剖時に採取した血液中の白血球数および好中球数を計測した結果、一点を除いて、各解剖時において 3 群間で有意の差は認められなかった。有意差が認められたのは、注入後 12 カ月後に SiO₂ 注入群に比較して、SiO₂-COOH 注入群において、白血球数の減少が認められたが、その減少は、全解剖時期を通して、この時期、この群間のみであり、注入物質の影響とは考えにくい。

⑤気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数

(1) 総細胞数



(2) 好中球数



総細胞数、好中球数ともに、その誘導は注入後比較的早い時期におさまっていた。粒子間比較では、表面官能基なしの群が他の 2 群に比べて、最も反応が大きかった。

⑥病理組織評価

(1) 注入後 3 日、1、3 か月後まで

SiO₂、SiO₂-NH₃ および SiO₂-COOH 注入群とも、主な変化は肺胞マクロファージの出現、好酸球浸潤および気管支上皮杯細胞の増加であり、いずれも 3 日後群で顕著で、時間の経過と共に軽減し、3 ヶ月後群では全注入物質群ともほぼ消失していた。また、注入物質群間の比較では、SiO₂ 注入群が変化の程度および発現例数とも最も強く、他の 2 群は同程度であった。

(2) 注入後 6、12 か月後

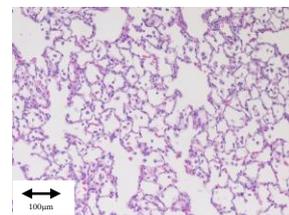
SiO₂、SiO₂-NH₃ および SiO₂-COOH 注入群とも、主な変化は肺胞マクロファージの出現であった。しかし、ごく軽度の肺胞マクロファージ出現は正常例でも認められる軽微な変化であった。

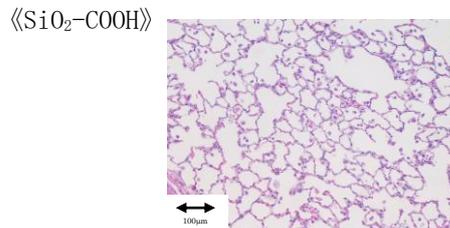
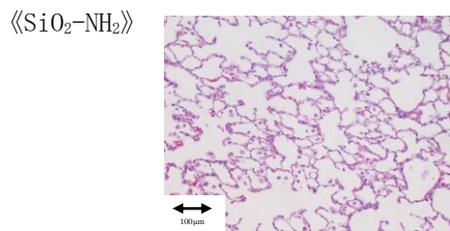
すべての群、すべての解剖時期において、腫瘍性の病変は観察されなかった。

以下に肺の代表的な写真を示す。

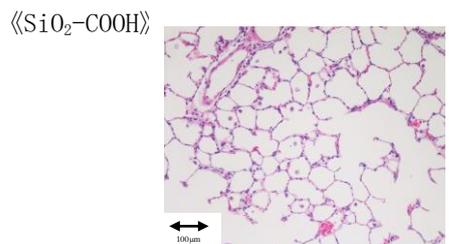
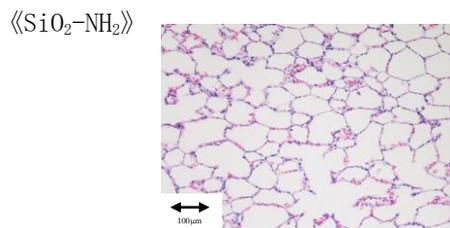
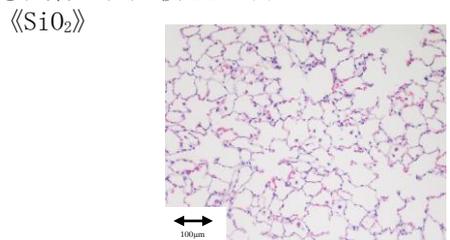
◎気管内注入後 3 日目

《SiO₂》





◎気管内注入後 12 か月



(3) 結果のまとめ

ナノサイズ粒子の吸入による肺有害性において、その粒子の表面官能基の影響を評価するために、本研究では、表面官能基の異なるナノ粒子を用いて、以下の検討を行った。①表面官能基の異なる(なし、-NH₂、-COOH)3種の蛍光ポリスチレンラテックスを用いた肺胞マクロファージによる貪食試験 (in vitro試験) および②表面官能基の異なる(なし、-NH₂、-COOH)3種のメソポーラスシリカ粒子をラットに気管内注入試験 (in vivo試験) を行った。

その結果、in vitro試験では、表面にCOOH基を持つ蛍光ポリスチレンラテックス粒子が、ラット肺胞マクロファージに最も高い割合で取り込まれることが認められた。

また、in vivo試験では、表面官能基の異なる3種の粒子径がほぼ同程度のシリカ粒子分散液を同量、ラットに気管内注入し、3

日、1、3、6、12か月後に気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞数や病理組織変化の評価を行ったが、3種ともに肺傷害の指標となると考えられている気管支肺胞洗浄液中の好中球数の増加や、病理組織における肺胞マクロファージの出現、好酸球浸潤、気管支上皮杯細胞の増加などの反応が注入後比較的早い時期におさまっていた。粒子間比較では、表面官能基なしの群が他の2群に比べて、気管支肺胞洗浄液中の細胞数増加や病理組織変化において、最も反応が大きかった。すべての群、すべての解剖時期において、腫瘍性の病変は観察されなかった。また、体重や肺、肝臓、腎臓、脾臓の臓器重量については、3群間で有意の差異は認められなかった。

本気管内注入試験では、表面官能基による反応の差は、有意差はあるものの著しいものではなかったため、表面官能基による影響を明らかにするためには、試料とする粒子の有害性をもう少し高いものに変更するなど、今後さらなる検討が必要と思われた。

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・講師
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