

平成 23 年度経済産業省委託事業

平成 23 年度産業技術研究開発（低炭素社会を実現する超軽量・高強度革新的融合材料プロジェクト（NEDO 交付金以外分）ナノ材料の安全・安心確保のための国際先導的安全性評価技術の開発）（国庫債務負担行為に係るもの）

（平成 23 年度分）

成果報告書

平成 24 年 3 月

学校法人産業医科大学

1. 研究項目

平成 23 年度産業技術研究開発「低炭素社会を実現する超軽量・高強度革新的融合材料プロジェクト（NEDO 交付金以外分）ナノ材料の安全・安心確保のための国際先導的安全性評価技術の開発」（国庫債務負担行為に係るもの）

2. 研究目的

ナノ材料は、エレクトロニクスから医薬まであらゆる分野での応用が模索されており、特に製品の軽量化やエネルギー効率の大幅な改善を通じて、低炭素社会を実現するためのキーテクノロジーとなることが期待されている。

一方でナノ材料は、そのサイズや形状から、従来の化学物質や材料とは異なる健康影響を生ずる懸念も指摘されている。近年、ナノ材料の有害性やリスクの評価について、国内外の研究機関や、国際機関の取り組みにより、方法論の構築は一定程度なされてきた。しかし、今後開発される多種多様なナノ材料のリスクを評価・管理するために必要な、行政的な観点からの効率的・合理的な枠組みの構築には至っていない。

ナノ材料の有害性評価においては、工場などの労働現場での吸入暴露による健康影響が最も重要となる。吸入による有害性を検討する上で、気管内注入試験は、比較的簡便な有害性試験手法であり、既知量投与による用量反応関係や生体反応機序の解明を行うのに適しているが、毒性の十分な知見がなく有害性評価は限定的である。よって、本プロジェクトでは、ナノ材料を含めた吸入性化学物質の有害性評価試験のゴールドスタンダードである吸入暴露試験とともに気管内注入試験を行い、データの解析を通して両者の関係を明らかにすることにより、気管内注入試験法を初期有害性情報取得の目的で用いる際のデータ解釈上の留意点を整備する。具体的には、物理化学的特性を十分にキャラクタライズした異なるナノ材料に対しての気管内注入試験と吸入暴露試験を行い、既知量投与による用量反応関係や生体反応などのデータの整合性を検討することにより気管内注入試験の信頼性を高める必要がある。これらの動物試験においては、急性期のみならず慢性期も併せて評価する。その際、炎症・線維化を中心とした肺内反応、肺内の滞留性、他臓器の病理学的所見を総合的に比較検討する。これらの両試験結果の比較を通して気管内注入試験法の初期の有害性情報取得の目的で用いる際のデータ解釈上の留意点について暫定的な見解を策定する。

最終的な目的として、化学物質審査規制法等での適用を想定しつつ、多様なナノ材料のリスクを合理的かつ効率的に評価・管理するための枠組みを構築するため、その基盤となるナノ材料の有害性評価の手法開発を行う。ナノ材料に関する日本主導の安全性評価・管理技術の確立によって産業界の国際競争力の向上に資する。

3. 平成23年度の計画

②初期有害性情報取得のための低コスト・簡便な有害性評価技術の構築

(a) 吸入暴露試験と気管内注入試験の比較検討

1. 気管内注入試験の有害性評価手法の検討

キャラクタリゼーションが終了した代表的な金属酸化物系ナノ材料を、2材料または、1材料（高用量と低用量の2物質）用いる。ラットを用いて、注入群（2群）と材料を注入する際に用いる溶媒のみの投与群に分類し、単回の気管内注入を行う。次に3日、1週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月等の時点でひとつの群からラットを11匹ずつ（うち1匹は電子顕微鏡観察用として産総研に供出）解剖する。評価内容は、肺の病理組織学的検索、生化学的解析、肺障害関連因子の解析等である。また、肝、腎、脾、精巣等に関しても病理組織学的解析を併せて行う。但し、24ヶ月に関しては、1群20匹用意し、病理学的検索を行う。

がん化関連酸化的ストレスの測定の条件設定を検討する。なお、real time PCR装置とフローサイトメトリーを導入して、遺伝子発現解析の条件設定を行う。また、必要に応じて既存の化学物質注入動物モデルでの、病理や遺伝子発現等を行い、ナノ材料の有害性評価のためのデータの蓄積を図る。解析の一部（RNA抽出、病理標本作製、病理組織診断、等）は外注分析機関を利用し、研究の加速をはかる。

2. 吸入暴露試験を用いたナノ材料の有害性評価

キャラクタリゼーションが終了した1材料の代表的な金属酸化物系ナノ材料を、吸入暴露試験装置内での粒子サイズや濃度を測定しこれらの安定した値を確認する。鼻部暴露装置を導入し、粒子の発生状況の検討を行う。また、既存の化学物質吸入暴露動物モデルでの、病理や遺伝子発現、キャラクタリゼーション等を行い、ナノ材料の有害性評価のためのデータの蓄積を図る。

4. 研究開発成果

②初期有害性情報取得のための低コスト・簡便な有害性評価技術の構築

(a) 吸入暴露試験と気管内注入試験の比較検討

1. はじめに

本年度は、気管内注入試験と吸入暴露試験の比較を目的とした実験の検討に着手した。具体的には、代表的な金属酸化物系ナノ材料としてTiO₂ナノ粒子を選択し、キャラクタリゼーションを行うと共に、気管内注入試験を行った。吸入暴露試験については、条件検討としてナノ粒子の懸濁液から、これらの粒子を対象とした吸入暴露試験に供することができるエアロゾル粒子を発生させるための実験的検討を行った。また、鼻部暴露装置の導入および設置を完了し、試運転など検討を開始した（図1）。

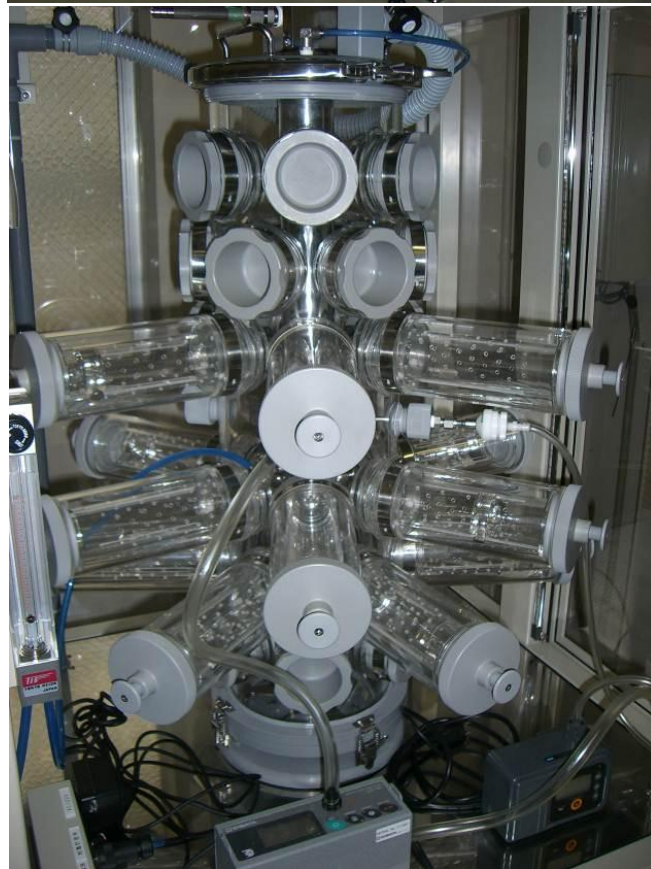


図 1．設置を完了した鼻部暴露装置

2. 二酸化チタン (TiO₂) の気管内注入試験の有害性評価手法の検討

2. 1. TiO₂懸濁液の調製

2. 1. 1. 懸濁液の調製

本年度は、まず始めに陰性対照として TiO₂ ナノ粒子を選択し、気管内注入による基礎データの収集を行い、気管内注入用の安定で均一な TiO₂ 懸濁液を調製した。TiO₂ ナノ粒子は、Evonik Degussa GmbH (Essen, Germany) によって製造された P90 を使用した (以後、TiO₂ P90 と称する)。メーカーによる一次粒子径は 14 nm、BET 比表面積は 102.0 m²/g、純度は TiO₂ として 100.1% であった。

紫外線滅菌した TiO₂ P90 原粉 9g に 300ml の滅菌超純水を加え、超音波ホモジナイザーにより 15 分照射、5 分休憩のサイクルを 3 回行い、TiO₂ P90 を水中に懸濁した。次に、8900×g、20 分間の遠心分離により大きな凝集塊を除いた。水面から 4cm 以内の遠心上清を回収し、孔径 1 μm のフィルターにより吸引ろ過によりさらに粒子径を整え、回収したろ液を TiO₂ 懸濁原液とした。遠心後の上清について Stokes の沈降速度式 (1) により、48nm 未満の粒径をもつ TiO₂ P90 が含まれると計算された。

$$D^2 = 18\mu L / t (\rho_s - \rho_f) g \quad (1)$$

D=限界粒子径 (cm)、 μ =媒体の粘性係数 (g/cm・s)、L=粒子の沈降距離 (cm)、T=粒子の沈降時間 (s)、 ρ_s =粉体の密度 (g/cm³)、 ρ_f =媒体の密度 (g/cm³)、g=重力加速度 (cm/s²)

2. 1. 2. 懸濁液の性状決定

2. 1. 1 により調製した TiO₂ P90 懸濁液について、TiO₂ 濃度および粒径分布を決定した。重量は、試料 10ml を乾燥させ、重量を測定することにより決定した。2 回の測定の平均値から、TiO₂ 懸濁原液中に含まれる TiO₂ 濃度は 6.25mg/ml と算出された。気管内注入のために、この懸濁原液を蒸留水により希釈し、濃度を 2.5mg/ml (1mg/0.4ml) および 0.5mg/ml (0.2mg/0.4ml) とした。

懸濁液中の粒子径は動的光散乱 (DLS) により測定した。この結果、懸濁液中の平均粒子径は、数平均粒子径として 22.7nm であった。また、希釈による大きな粒径の変化は見られなかった。

2. 2. 気管内注入試験

2. 2. 1. TiO₂ P90 気管内注入ラットの臓器および体重の変化

TiO₂ P90 懸濁液をラットあたり 0.2mg および 1.0mg の用量で Wistar 系雄性ラットに、単回注入した。用量は、先行して行われた NEDO プロジェクト「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」における投与量を吟味して決定した。また、陰性対照群としては蒸留水を注入した。注入後 3 日、1 週間、1 ヶ月後に各群 11 匹ずつ解剖を行った (うち 1 匹は電子顕微鏡観察用として産総研に

供出した)。肺に関しては、10匹を5匹ずつの2群に分けた。

このうち1群（各処理群5匹ずつ）を気管支肺胞洗浄液（BALF）の採取に供した。BALFは全肺から自然落下によって採取した。シリンジに生理食塩水を入れ、気道に挿入したカニューラを経由して肺が完全に膨らむように重力によって定圧で肺内に生理食塩水を注入後、自然落下によって洗浄液を回収した。およそ15mlの洗浄液を回収した。回収した液量は重量を測定し、細胞数などの補正に用いた。

もう1群（各処理群5匹ずつ）については、右肺を4葉に分け、がん化関連酸化的ストレスの測定、生化学的解析のための組織タンパク質の抽出および遺伝子発現解析のための mRNA 抽出に用いた。左肺は病理組織標本を作製するため、10%ホルマリンで定圧固定を行った。肺以外の臓器に関しては、肝臓、腎臓、脾臓、精巣の湿重量を電子天秤で測定後、ホルマリンにて固定し、病理標本の作成を行った。本年度は3日、1週間および1ヶ月までの解剖を終了し、このうち3日、1週間までの評価を行った。注入1週間目までの肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣および体重について対照群と投与群との間に有意な差は認められなかった（図2から7）。

以下に各臓器および体重測定の結果を示す。

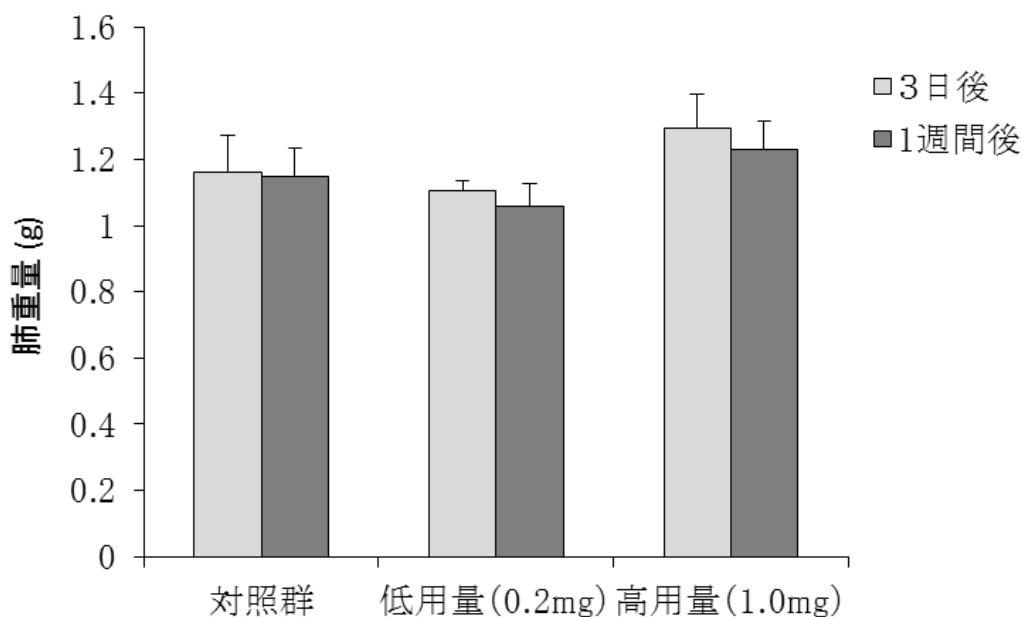


図2. TiO_2 P90 を気管内投与したラットの肺重量変化
各処理群間に有意差は認められなかった。

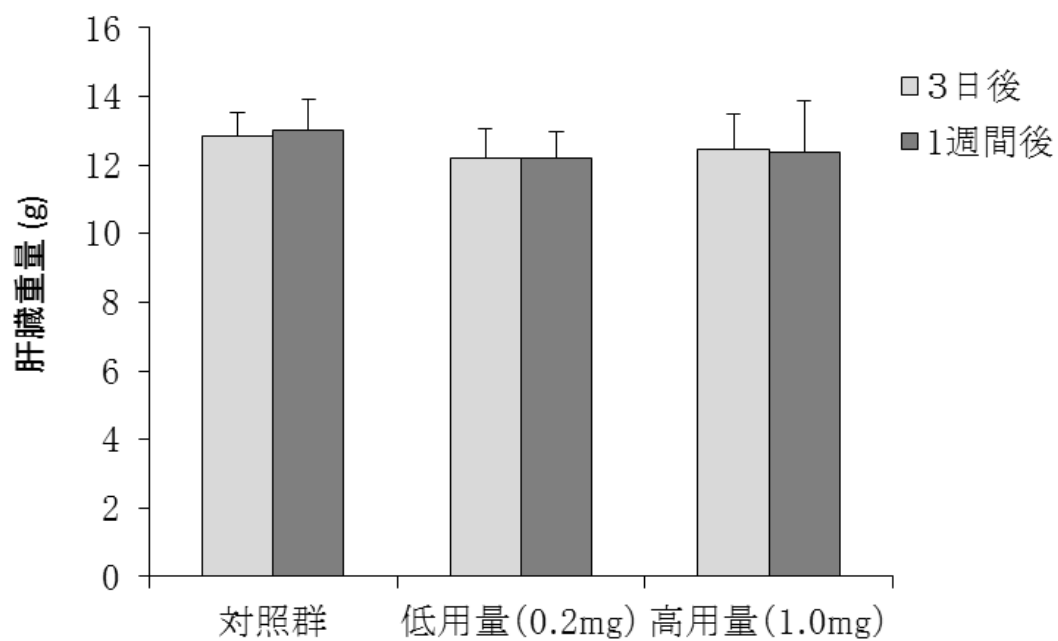


図3. TiO₂ P90 を気管内投与したラットの肝臓重量変化
各処理群間に有意差は認められなかった。

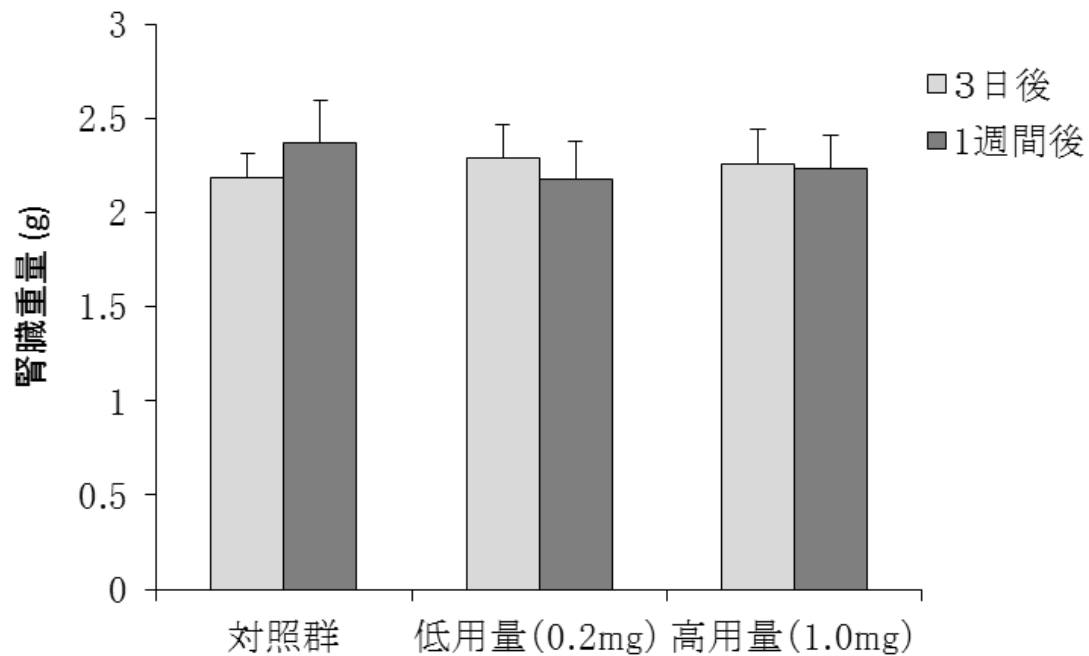


図4. TiO₂ P90 を気管内投与したラットの腎臓重量変化
各処理群間に有意差は認められなかった。

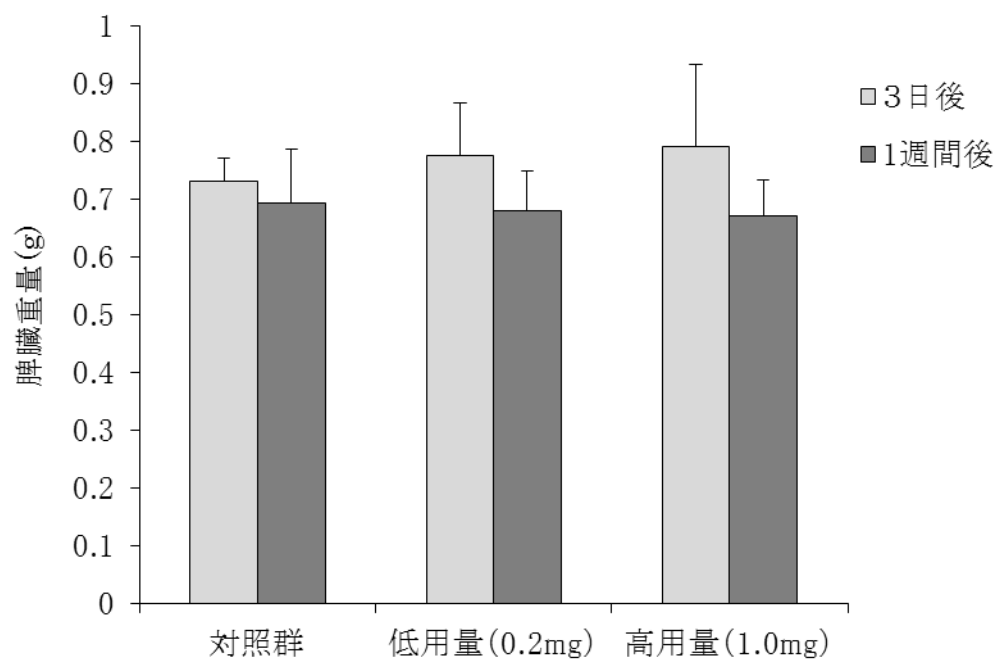


図5. TiO_2 P90 を気管内投与したラットの脾臓重量変化
各処理群間に有意差は認められなかった。

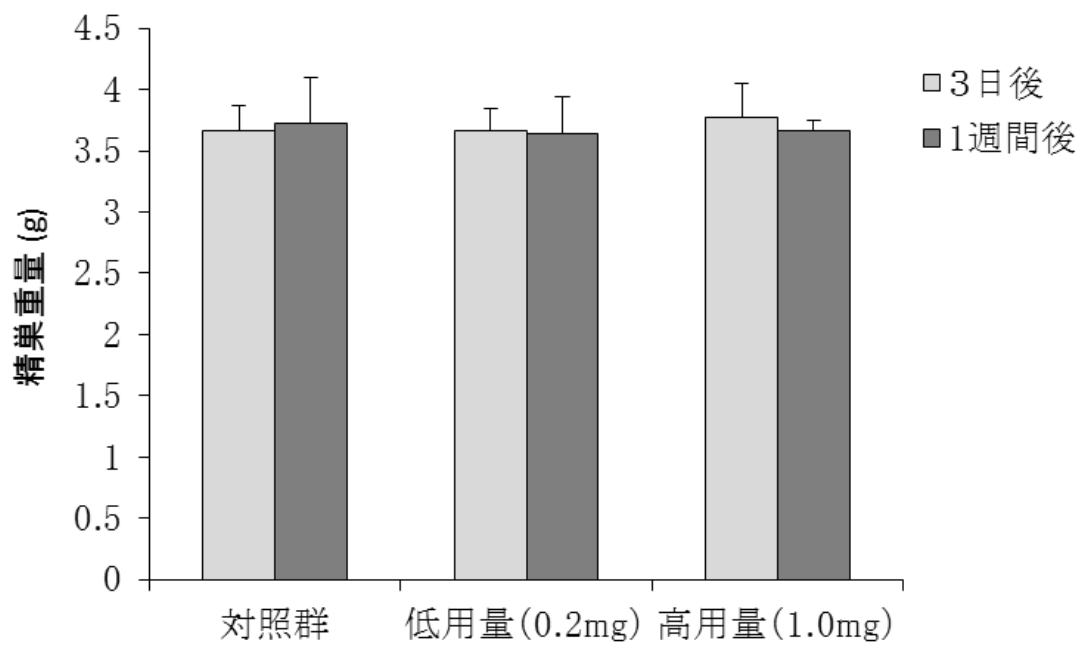


図6. TiO_2 P90 を気管内投与したラットの精巣重量変化
各処理群間に有意差は認められなかった。

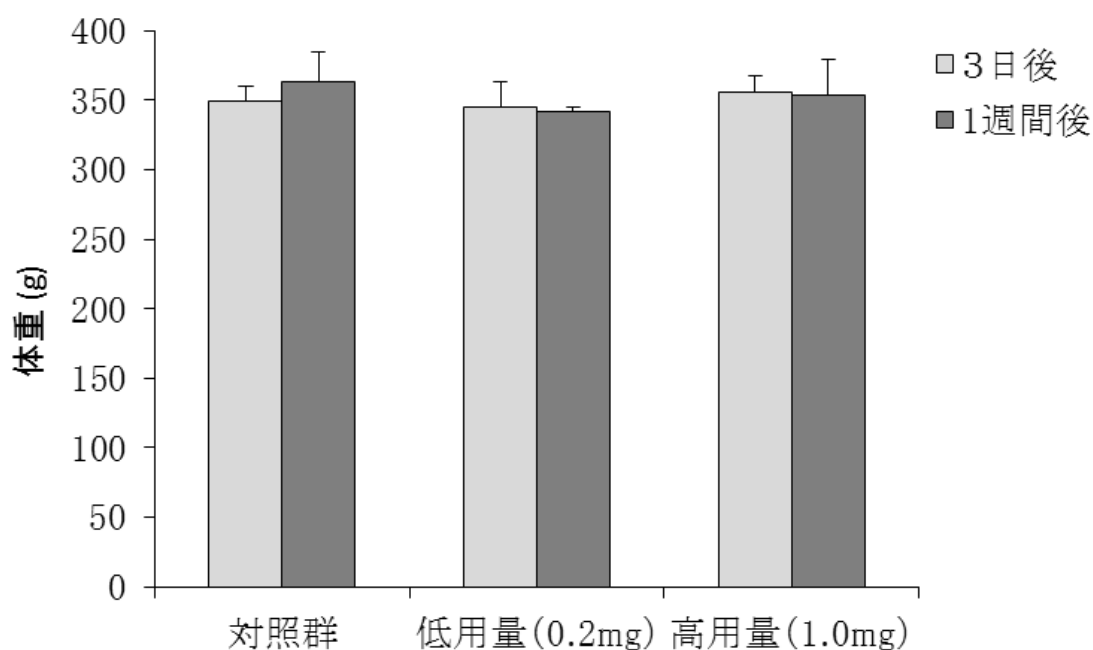


図7. TiO_2 P90 を気管内投与したラットの体重変化
各処理群間に有意差は認められなかった。

2. 2. 2. BALF 中の細胞数および細胞分画

BALF 中の総細胞数は、3日後の高用量でのみ有意な増加が見られた。1週間後では、低用量、高用量とも有意な増加は認められなかった。好中球数は高用量でのみ、3日後、1週間後共に有意に増加したが、1週間後では減少傾向にあった。マクロファージは3日後、高用量でのみ有意に増加した。以下に BALF 中の細胞数の測定手順と、BALF 中の各細胞の代表的な光学顕微鏡像を示す (図8)。

①解剖によって取りだされたラット肺の気管にカテーテルを挿入する。

20cmH₂O の定圧で 20ml の生理食塩水を数回にわけて肺内へ注入し、BALF を回収する。

②回収された BALF のうち、10ml を 1500rpm で 15 分間遠心し上清と細胞成分に分離する。

③細胞成分に 1ml の PMN buffer を加えて懸濁し細胞浮遊液を作成する。

④細胞浮遊液中の総細胞数を計数する。

⑤さらに細胞浮遊液をサイトスピンでスライドガラスへ塗布し塗沫標本を作成する。

⑥塗沫標本をディフクイック染色し、光学顕微鏡目視下に細胞分画を測定。2～3 視野で計 200 個の細胞をカウントし細胞分画の比率を算出する。

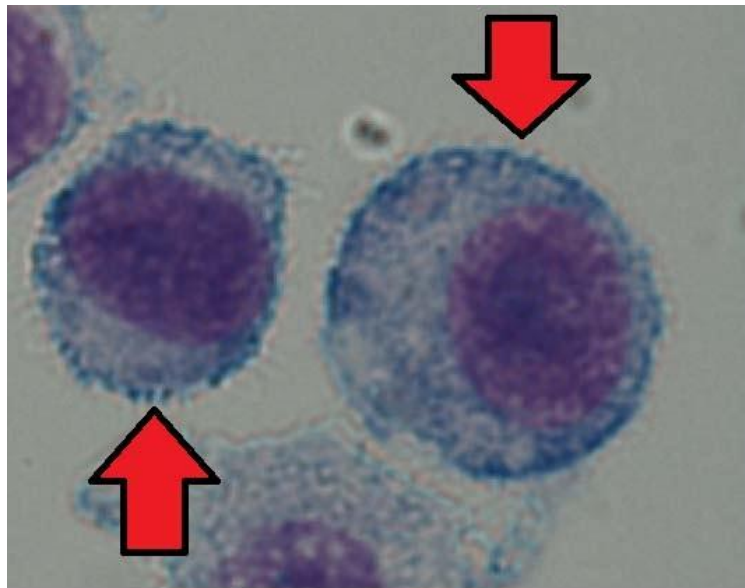
BALF 中の細胞数の計数は、改良ノイバウエル血球計算盤 (図9) を用いて、以下の手順により

行った。

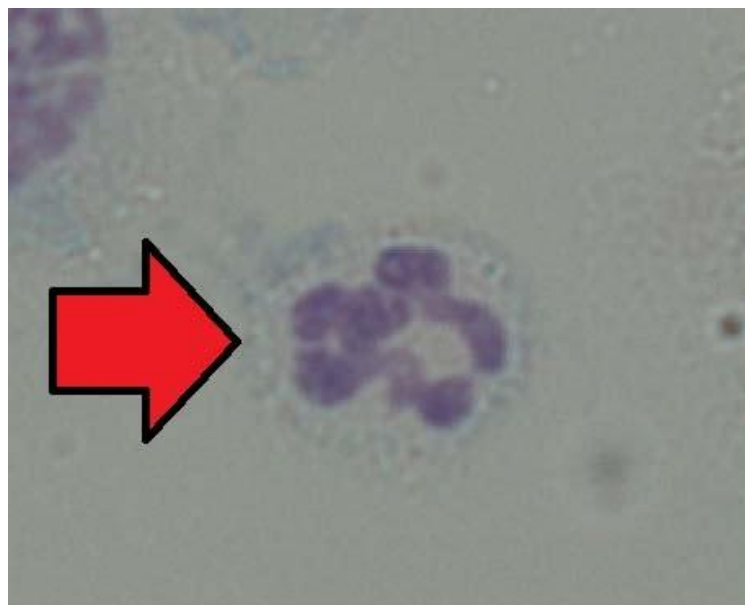
- ①1ml の PMN buffer に懸濁した細胞を 0.4w/v%トリパンブルー溶液で 10 倍希釈する。
- ②計算盤に付属のカバーガラスを計算盤にセットし、サンプル液を毛細管現象によって静かに注入する。
- ③倒立顕微鏡で観察下、計算室内の細胞数を数える。
- ④ 4 区画の計算室内の細胞数を計数後、以下の式により、細胞数を算定する。

$$X (\text{個/ml}) = (\text{4 区画の合計細胞数}) / 4 \times 10 (\text{希釈倍率}) \times 10^4$$

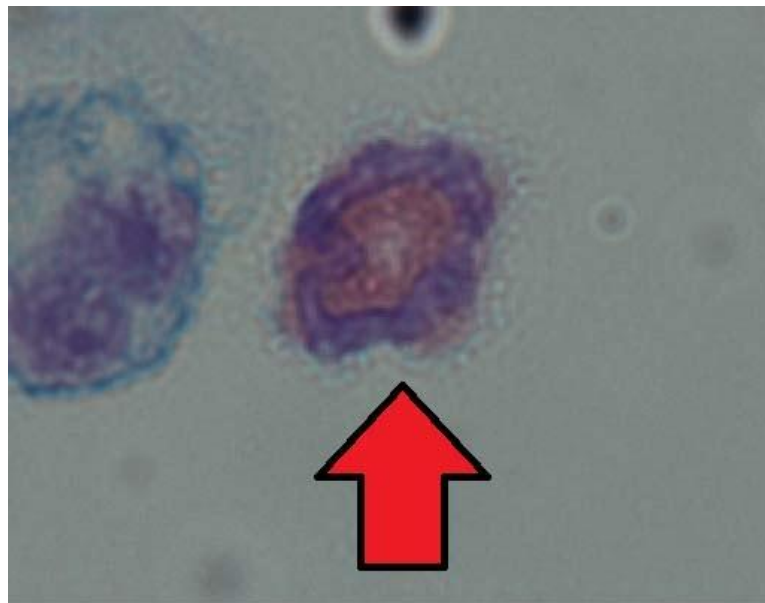
マクロファージ



好中球



好酸球



リンパ球

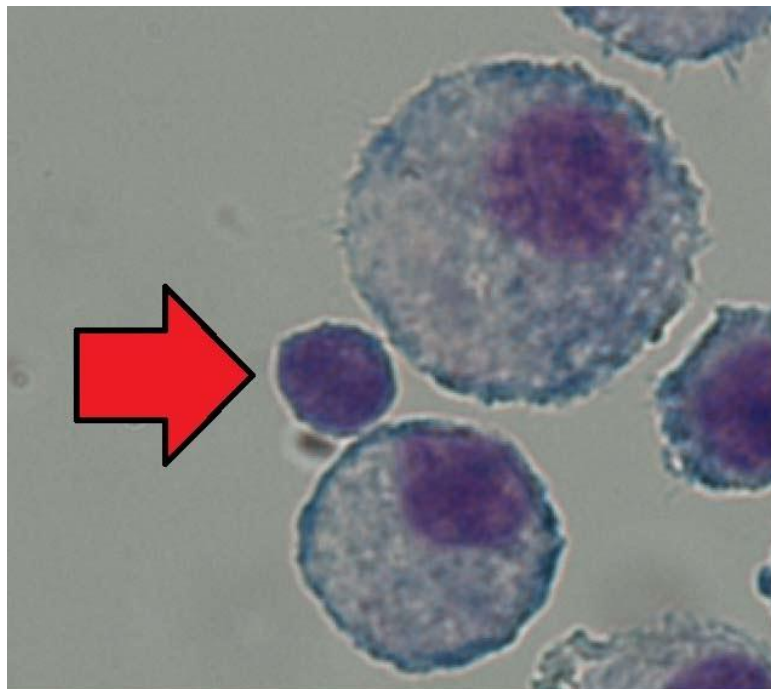


図8．BALF 中の代表的な細胞

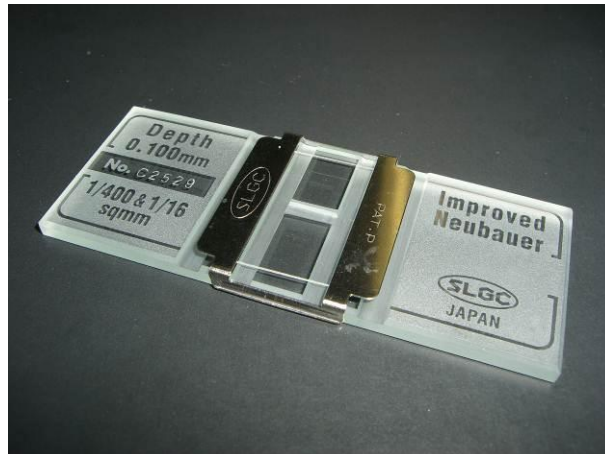


図 9. 改良ノイバウエル血球計算盤

また本年度は来年度からの試験準備として、フローサイトメーターによる BALF 中の細胞分画の条件検討を行った。以下に手順を示す。

フローサイトメーターによる BALF 中のマクロファージおよび好中球の分画
試薬：

- ①Anti-Rat Macrophage Marker PE (eBioscience 12-0660)
- ②Anti-Rat Granulocyte Marker FITC (eBioscience 11-0570)
- ③Mouse IgG2aK Isotype Control PE (eBioscience 12-4724)
- ④Mouse IgM Isotype control FITC (eBioscience 11-4752)

プロトコル

- ①BALF 15 ml 中の細胞を回収し、1 ml の PMN バッファに再懸濁する。
- ②ピペットで 500 μ l をとり、フィルターを通して組織片等の夾雑物を除く。
- ③PBS で 2 倍希釈した非動化済みのマウス血清を 5 μ l (1 μ l / 100 μ l BALF) 加え、室温で 10 分間保持する。
- ④各の蛍光標識抗体を下記の通り混合する。(実際には下記の用量でサンプル数 + 1 本分の試薬をまとめて調製する)

染色用

Anti-Rat Granulocyte Marker FITC	0.5 μ l
Anti-Rat Macrophage Marker PE	2.5 μ l
PBS	7 μ l

Isotype control 用 (バックグラウンド補正用)

Mouse IgM Isotype control FITC	0.5 μ l
--------------------------------	-------------

Mouse IgG2aK Isotype Control PE 2.5 μ l

PBS 7 μ l

上記試薬をまとめて調製した場合は、サンプル数分用意した新しいチューブに各 10 μ l ずつ分注する。

上記の他、補正用のポジティブコントロールとして、Macrophage および好中球が含まれると考えられるサンプルについて、新しいチューブ 4 本に 100 μ l ずつ細胞懸濁液を分注する。これらのチューブについて、1 本ずつ

1. Anti-Rat Macrophage Marker PE 2.5 μ l

2. Anti-Rat Granulocyte Marker FITC 0.5 μ l

3. Mouse IgG2aK Isotype Control PE 2.5 μ l

4. Mouse IgM Isotype control FITC 0.5 μ l

を加える。

⑤④で用意した各のチューブに③の BALF を 1 0 0 μ l 加える。

⑥よく混合して、4℃で30分間保持する。

⑦2 ml の PBS を加え、1 5 0 0 r p m、5 分間の遠心により洗浄する。

⑧デカントで上清を捨て、1 ml の PBS を加え、軽くボルテックスして再懸濁する。

⑨フローサイトメーターで測定を行う。

以上の手順により得たフローサイトメーターの図を以下に示す (図 1 0)。

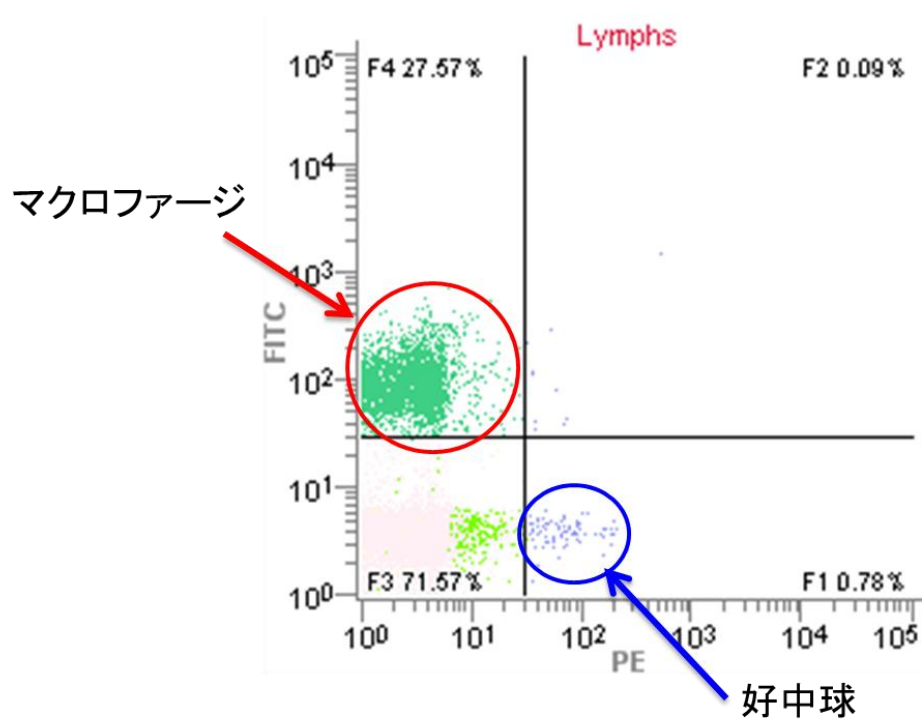


図 1 0 . 細胞分画に用いたフローサイトメーターと代表的な細胞分画

今回の検討から、フローサイトメーターにより BALF 中の細胞を分画できる事が示された。来年度以降、詳細な条件設定を行い、顕微鏡観察による従来の方法と比較することによってより正確かつ迅速な評価を試みる。さらに、フローサイトメーターでは蛍光標識抗体を用いた BALF 中の細胞やタンパク質の解析が可能である事から、来年度以降さらに遺伝子発現解析のための基礎的検討を行う。本年度はまず細胞分画により、抗体を用いた分析の条件設定を行った。図 10 に示されるように、フローサイトメーターが遺伝子発現解析のための標的遺伝子の検索に有効である事が示された。

2. 2. 3. 肺組織中のタンパク質抽出と H0-1 の測定

BALF および肺組織中の H0-1 濃度については、BALF 中では 3 日後に高用量でのみ有意に増加し、1 週間後には有意差は認められなかった。肺組織中では、高用量のみで 3 日後および 1 週間後において有意に増加した。また、既存の吸入暴露モデルとして、カーボンナノチューブ (CNT) の吸入暴露モデルから採取した BALF についても H0-1 および CINC 濃度の測定を行った。来年度についても同様の測定を行い、比較検討する。

以下に組織からのタンパク質の抽出手順と ELISA 法による H0-1 タンパク質の測定手順を示す。
肺組織からのタンパク質の抽出

- ① Homogenizing Buffer の作成 : T-PER Tissue Protein Extraction (Thermo Scientific) に、タンパク質分解酵素阻害剤カクテルタブレットを溶かす。液を 2 つに分け、一方にプロテアーゼ阻害物質 (PIC) を入れ、抽出バッファとする。もう一方は洗浄用バッファとし、氷上で保存する。
- ② 氷上で解凍した肺組織 をホモジナイズ瓶に入れ、抽出バッファ 500 μ l を加える。
- ③ ホモジナイズ瓶を氷中で冷やしながらホモジナイズする。
- ④ おおよその固形分が無くなったら、溶液を 2ml チューブに移し、ホモジナイズ瓶を 500 μ l の洗浄用バッファで洗浄し、洗浄液も 2ml チューブに加える。
- ⑤ 15000 rpm, 10 分, 4℃で遠心を行い、不溶性の画分を除去する。
- ⑥ 上清を新しい 1.5 ml チューブに回収する。
- ⑦ ブラッドフォード法もしくはローリー法でタンパク質濃度を測定する。
- ⑧ 使用時まで-80℃で保存する。

ELISA 法による H0-1 タンパク質の測定

H0-1 の測定は、Enzo Life Sciences 社製 H0-1(rat), EIA kit を用い、添付のプロトコルに従った。

①検量線用 H0-1 標準液の調製

1. 1.5ml チューブ 7 本を用意し、キャップにそれぞれ 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78, 0.39,

0.195, 0 ng/mL と書く。

2. 「12.5」と書いたチューブに 1,995 μ l の Sample Diluent を加える。
3. 残りのチューブに 500 μ l ずつ、Sample Diluent を加える。
4. 「12.5」と書いたチューブに、5 μ l の H0-1 標準原液（キットに添付）を加え、タッピングなどでよく混ぜる。
5. 「12.5」と書かれたチューブから、500 μ l の液をとり、「6.25」のチューブに移し、ピペッティングでよく混合する。Vortex は使用しない。
6. 以下、同じように 2 倍ずつ段階希釈し、「0.195」までの標準液を作成する。

②Wash Buffer の調製

1. 20X Wash Buffer を室温に戻し、瓶を静かに回して混合する。
2. MiliQ 水で 20 倍希釈し、1X Wash Buffer とする。
- ③抗ラット H0-1 イムノアッセイプレートについて、使用するウェルの数だけ枠から外し、新しい枠に装着する。残りのウェルはアルミ袋に包み、速やかに冷蔵庫に戻す。1 サンプルにつき 2 ウェルを使用する。
- ④各ウェルに 100 μ l ずつ、サンプル（組織抽出液）および標準液（0ng/ml を含む）を添加する。

組織抽出液サンプルは、測定したタンパク質濃度に基づき、2000 μ g/ml の濃度となるように Sample Diluent で希釈調製しておく。

- ⑤粘着フィルムでふたをし、室温で 30 分保持する。
- ⑥ウェルのサンプル液および標準液をデカントで除く。ペーパータオルで、水分をよく除く。
- ⑦300 μ l/well の 1X Wash Buffer で 4 回、洗浄する。
- ⑧洗浄後はペーパータオルなどで水分をよく除く。
- ⑨各ウェルに 100 μ l ずつ、Anti-rat H0-1 antibody solution を添加する。
- ⑩粘着フィルムでふたをし、室温で 1 時間保持する。
- ⑪ウェルの Anti-rat H0-1 antibody solution をデカントで除く。ペーパータオルで水分をよく除く。
- ⑫300 μ l/well の 1X Wash Buffer で 4 回、洗浄する。
- ⑬洗浄後はペーパータオルなどで水分をよく除く。
- ⑭各ウェルに 100 μ l ずつ、Rat H0-1 conjugate を添加する。
- ⑮新しい粘着フィルムでふたをし、室温で 30 分保持する。
- ⑯ウェルのサンプル液および標準液をデカントで除く。ペーパータオルで、水分をよく除く。
- ⑰300 μ l/well の 1X Wash Buffer で 4 回、洗浄する。
- ⑱洗浄後はペーパータオルなどで水分をよく除く。
- ⑲各ウェルに 100 μ l ずつ、TMB Substrate を添加する。添加後、1 分程度で発色が見える。
- ⑳発色の程度を見ながら、室温で 15 分程度保持する。

- ⑪各ウェルに 100 μ l ずつ、Stop Solution 2 を添加する。
- ⑫30 分以内に、マイクロプレートリーダーで 450nm の吸光を測定する。

2. 2. 4. Real-time PCR による遺伝子発現解析の条件設定

また、TiO₂ P90 気管内注入 3 日、1 週間、1 ヶ月後までのサンプルについて、外注により肺組織からの mRNA 抽出を完了した。mRNA は品質について Agilent Technologies 社 Bioanalyzer2100 による RNA 分解の確認がなされており、濃度も今後の real-time PCR による遺伝子発現解析が行える量を得た。来年度以降、real-time PCR により各種遺伝子発現解析を行う。以下に Real-time PCR 装置 (図 1 1) を示す。遺伝子発現解析の条件設定として、これまでに抽出済みの mRNA を用い、H0-1 遺伝子を標的として real-time PCR による発現検討を行った。この結果、以下の条件により real-time PCR を行うことで、遺伝子発現解析が行えるとの結論を得た。

- 1. 逆転写反応時の RNA 濃度は 10ng/ μ l とする。
- 2. PCR 反応時の鋳型は逆転写終了後のサンプルを超純水で 10 倍希釈して用いる。



図 1 1. リアルタイム PCR 装置

3. 吸入暴露試験を用いたナノ材料の有害性評価

3-1. 吸入暴露試験条件検討

本年度は、エアロゾル発生系の特性を把握しつつ、発生粒子のサイズや濃度の制御を行うため、および気管内注入試験との比較を目的とした吸入暴露試験の実施を可能にするための対策の検討に着手した。広島大学の研究グループにより、TiO₂ ナノ粒子懸濁液を用いてエアロゾルを発生させた結果、暴露チャンバに発生装置 (図 1 2) からの粒子を安定に供給できたことが示された。

吸入暴露試験で目標とすべき粒子濃度や粒子径については、今後広島大学と協議しつつ検討する。



図 1 2．吸入暴露装置

4．情報収集の結果

4－1．国内外の動向の把握

なし

4－2．研究開発推進委員会等における参加

推進委員会（1回）および調査報告会（4回）に参加し、有識者およびプロジェクト関係者とプロジェクトの方針および方向性について討議した。具体的には、気管内注入法および BALF 採取方法の統一化、使用するラットの系統の選定について討議した。次年度以降、これらの決定事項に基づいて試験を推進する。

5．目標に達する達成度

平成 23 年度の気管内注入試験計画として 1 材料（2 用量）を気管内注入し、その後も解剖を順次実施しており、計画通り進行している。吸入暴露試験においても広島大学とナノ粒子の発生状況を確認しており、これに関しても順調に実行できている。

6. 研究発表・講演、文献、特許等の状況

a. 研究発表・講演

なし

b. 文献（論文、書籍）

総説

1. 森本泰夫、堀江祐範、小林憲弘、篠原直秀、工業用ナノマテリアルの生体影響とリスクアセスメント、産業医学レビュー、24(4)、229-252、2012.

c. 特許等

なし

d. その他の公表

なし

（産業医科大学）