

# 金属酸化物粒子の健康影響に関する研究

Toxicological study on ultrafine particles of metal oxides

王 瑞生\*1 健康障害予防研究グループ

■WANG, Rui-Sheng

二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) ナノ粒子 (NPs) をはじめとする吸入性金属酸化物粒子状物質のリスク評価及びそれに基づく規制・管理は労働衛生上重要な課題である。リスク評価では、懸念される有害性の有無を確認し、また、用量反応性に基づいて「閾値」を判断する。本研究はこの評価および基準値設定にエビデンスを提供することを目的とする。代表的な金属酸化物粒子として発がん性が報告されている TiO<sub>2</sub> NPs を対象とし、動物実験により、肺や肝臓などの主要臓器における影響を炎症反応と遺伝毒性に焦点をあてて調べる。また、発がん性とともに懸念が示されている生殖器や神経系への影響を確認する。マウスに、NEDO 調整法で作成した一次粒径が約 21 nm の TiO<sub>2</sub> NPs を静脈注射または気管内投与したところ、3 か月が経過しても肝臓や肺に残留しており、細胞内では細胞質に局在していることが観察された。しかし、これらの組織や骨髄などでは DNA の早期損傷や遺伝子突然変異などの遺伝毒性は検出されなかった。一方、NEDO 調製法で作製した試料では、脳や生殖器への明確な粒子の移行像を確認することができなかったため、新たに肺胞サーファクタントや生理食塩水での分散・調製法を確立し、さらに蛍光標識を行った。この方法で調製した試料を用いてラットに気管内投与したところ、脳等の組織に粒子の移行像が確認され、また細胞マーカーとの併用で特異細胞への粒子の取り込みを検討することができた。生殖器への影響では、精子運動能や成熟した精子数の有意な減少が検出された。これらの結果は、TiO<sub>2</sub> NPs は長期にわたって肺や肝臓などの組織に残留するが、遺伝毒性を示さず、精子生成に影響を与えることが判明した。今後、粒子サイズなどによる組織と細胞内動態の違いや特異細胞における影響の解明に期待したい。

## 1 はじめに

吸入性粒子状物質の管理は労働衛生上重要な課題であるが、厚生労働省による化学物質のリスク評価事業では、二酸化チタンのナノ粒子等を対象に、発がん性の報告等を考慮して、リスク評価が行われる。評価にあたっては、懸念される有害性の有無を確認する必要があるとともに、評価基準となる「評価値」の決定のためには有害性発現機序を考慮することが求められている。遺伝毒性の有無に基づいて「閾値」の有無を判断するといったことが重要となる。このような判断の基盤となる情報が求められている。

二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) 粒子は代表的な金属酸化物粒子であり、粒径サイズが 1-100 nm のものは工業用ナノマテリアルのナノ粒子 (nanoparticles, NPs) 分類に属し、それより大きいものは微粒子 (fine particles, FPs) になる<sup>1,2)</sup>。ナノ粒子の TiO<sub>2</sub> は重要な工業材料として、化粧品、塗料、食品、光触媒など幅広い用途で利用され、その使用が今後、ますます増大することが予想される<sup>3,4)</sup>。一般的に TiO<sub>2</sub> FPs は毒性が低いと思われる。一方で、TiO<sub>2</sub> NPs はサイズが小さい上、強い光触媒作用などの性質を持っているため、そのばく露による人への健康影

響が懸念されている<sup>5)</sup>。ナノサイズの TiO<sub>2</sub> (10-50 nm) を実験動物 (ラット) へ慢性的に吸入ばく露すると、肺がんが増加したという報告<sup>6)</sup>があるため、国際がん研究機関 (IARC) は 2006 年に TiO<sub>2</sub> をグループ 2B (人に対して発がん性の可能性がある) に格上げした<sup>7)</sup>。この発がん作用は肺への過負荷による肺の炎症反応が発がんの前提となるとの仮説が示されている<sup>8)</sup>。しかし、発がん にいたる各段階における機序は未解明である。また、ラットへの鼻腔投与から粒子の脳への移行や脳内における生化学的な変化が生じたとの報告もあった<sup>9,10)</sup>。しかし、粒子の神経系への移行の詳細や神経組織の機能障害についての情報は不十分である。精子生成など生殖系への影響については殆ど報告されていない。

本研究は、これらの問題点について、リスク評価の基盤とすることを念頭に、動物を用いてのばく露実験を行った。また、特異組織・細胞への移行や取り込みを高感度に検出するため、新たな試料分散・標識方法を確立した。各実験結果の詳細は本概要に続く稿を参照されたい。

以下では主な研究内容と成果について述べる。

## 2 研究の概要

### 1) 毒性実験のための二酸化チタン分散液の調製法の検討

\*1 Mechanism of Health Effects Research Group,

National Institute of Occupational Safety and Health, Japan

実験に使用する TiO<sub>2</sub> NPs 試料の分散方法について検討した。試料は P25 (アナターゼ・ルチル結晶相混在型 TiO<sub>2</sub>)、分散液は超純水 (UPW)、0.2%リン酸水素二ナトリウム水 (DSP)、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、生理食塩水 (S)、0.05%界面活性剤添加生理食塩水 (ST) の 5 種類を対象として各組み合わせの懸濁液を超音波処理・遠心分離によって得られた上澄液を回収し、動的光散乱法による散乱強度分布の測定を実施した。また超音波処理時間および容量の最適条件、長期的な安定性を検討した。その結果から、P25 は UPW および DSP において平均粒径 70-80 nm 付近で単一ピークとなる安定的な粒径分布を示した。PBS、S および ST については、ピークが不検出あるいは複数のピークが検出され、良好な粒径分布は得られなかった。また、超音波処理時間および容量の最適条件については、懸濁液を 10 ml の容量、30 分間の超音波処理を行い、遠心分離後の上澄液を用いると、調製 0 日から 90 日後に至るまでほぼ一定の安定な粒子径を示した。

## 2) 二酸化チタンナノ粒子を尾静脈投与したマウスにおける遺伝毒性について

粒子サイズが 100 nm 以下の TiO<sub>2</sub> NPs は比表面積が大きいため、表面活性が増大し、生体に悪影響を及ぼす可能性が懸念されている。ラットの吸入ばく露後、肺がんの発生が上昇したという報告があり、その遺伝毒性・発がん性に対する関心が高い。本研究では、種々の組織での変異が解析できるトランスジェニックマウス (*gpt* Delta マウス) に、TiO<sub>2</sub> NPs を尾静脈投与し、末梢血及び肝臓について各種遺伝毒性の解析を行った。小核を有する網状赤血球の出現頻度や赤血球膜上の変異マーカーである *Pig-a* 遺伝子突然変異の頻度は、TiO<sub>2</sub> NPs の投与による変化は見られなかった。また、肝臓においても DNA 損傷性、*gpt* 遺伝子突然変異 (点突然変異) 頻度及び *Spi*-変異体 (欠失突然変異) 頻度の有意な増加は見られなかった。IL6 や TNF $\alpha$  などの炎症マーカーを解析したが、肝臓における炎症反応は特に観察されなかった。これらの結果は、TiO<sub>2</sub> NPs は、骨髄及び肝臓では遺伝毒性を示さないことを示唆している。

## 3) 二酸化チタンナノ粒子の気管内投与後のマウス肺における影響について

TiO<sub>2</sub> NPs は呼吸器系ばく露後、肺の急性炎症反応を誘発することが動物実験で観察されている。また、肺に入った粒子は排出や他の臓器への移行もあるが、一部は長期にわたって肺に留まることも知られている。本研究では TiO<sub>2</sub> NPs の気管内投与後に肺組織における炎症作用や遺伝子突然変異などについて検討した。TiO<sub>2</sub> NPs を超音波で蒸留水に分散し、マウスに気管内投与した。投与 3 日及び 90 日後マウスを解剖し、肺組織 Ti 定量、病理観察、肺胞洗浄液 (BALF) 解析、遺伝子点突然変異などの解析を行った。BALF 解析や肺病理検査の結果、最終投与 90 日後に軽微ながらも炎症反応が認められ、また光学および電子顕微鏡

では肺組織に TiO<sub>2</sub> 粒子の凝集体が観察された。一方、肺組織における遺伝子突然変異頻度の上昇は TiO<sub>2</sub> NPs 投与群では特に認められなかった。これらの結果から、気管内投与された TiO<sub>2</sub> NPs は、3か月後も肺に残留しており、軽微な炎症が伴っていることが判明した。遺伝毒性作用については、より長期にわたって観察する必要がある。

## 4) 二酸化チタンナノ粒子による中枢神経系への影響について

TiO<sub>2</sub> NPs の中枢神経系への影響については、鼻腔内投与による細胞間移行や経母体ばく露による血液脳関門 (BBB) 形成以前の胎仔の脳内への移行と神経伝達への影響を確認した文献はある。本研究では TiO<sub>2</sub> NPs を成熟マウスに投与した場合、脳内への移行や神経伝達系への影響の有無について検討した。一次粒子が 21 nm の TiO<sub>2</sub> NP をマウス尾静脈より 4 回投与し、一定期間後脳を前脳、後脳、中脳、延髄、小脳の 5 部位に分けてモノアミンとアミノ酸の濃度を分析した。最終投与 3 日後の脳内 Ti 濃度は、高用量群では有意に上昇し、TiO<sub>2</sub> の脳内への移行が示唆された。投与後 9 日では、ベンゼン環を有するアミノ酸の濃度はすべての部位で投与量依存的に減少したが、分枝鎖アミノ酸はほとんど変化がなかった。モノアミンのドーパミンやノルエピネフリンは小脳では投与量依存的に減少したが、他の部位ではほとんど影響はなかった。投与後 3 か月ではアミノ酸の脳内濃度はほぼ回復した。これらの結果から、TiO<sub>2</sub> NPs の投与によって、アミノ酸の取り込みが一時的に阻害されたが、アミノ酸およびモノアミンの神経伝達系への影響は軽微であることが示唆された。

## 5) 二酸化チタンナノ粒子の精巣毒性について

TiO<sub>2</sub> NPs は肝臓や肺などの主要臓器への障害についての報告が散見されるものの、雄性生殖機能への影響に関する情報は乏しい。本研究では TiO<sub>2</sub> NPs が精巣機能に与える影響を、マウスを用いて検討した。超音波処理でリン酸二ナトリウム液に分散させた TiO<sub>2</sub> NPs をマウスに週 1 回、合計 4 回尾静脈投与し、最終投与 9 日後に精巣及び精巣上体尾部を摘出して精巣への影響を解析した。精巣機能の指標としては、精子数及び精子運動能を用いた。なお精子運動能は、全精子中の運動精子数の割合 (motile percent: MP) 及び運動精子中の良好精子の割合 (progressive percent: PP) の 2 つのパラメーターについて検討した。その結果、TiO<sub>2</sub> NPs の投与は精巣及び精巣上体尾部ともに精子数を有意に減少させた。また、精巣上体尾部から遊出させた成熟精子の運動能は、MP 及び PP の両パラメーターとも有意に低下した。これらの結果から、TiO<sub>2</sub> NPs が精巣機能障害を引き起こす可能性がマウスを用いて示された。なお、本実験の結果の一部は *Fundamental Toxicological Sciences* 誌に掲載された<sup>11)</sup>。

## 6) 二酸化チタンナノ粒子の中枢神経系への生物学的蓄積性について

TiO<sub>2</sub> NPsの体内における動態ならびに移行部位での影響は未解明な点が多い。従来使用されているNEDO調製法で作製したTiO<sub>2</sub> NPs試料を用いて行った動物実験では、脳、生殖器への明確な粒子の移行像の確認はできなかった。本研究では、呼吸により肺内に侵入したナノ粒子が、肺表面に沈着し、そこでサーファクタントを吸着する生理的な現象を利用し、ナノ粒子の新規調製方法を確立する。肺サーファクタントや生理食塩水を用いて粒子の分散・調製を行った後、蛍光物質を加えて標識した。このように調製したTiO<sub>2</sub> NPsをラットに気管内投与し、脳などへの移行を蛍光顕微鏡法で解析した。吸着したTiO<sub>2</sub> NPsが、空気・血液関門を透過して、脳血管付近の神経系細胞に取込まれており、脳実質に移行することが明らかとなった。細胞に取り込まれた粒子はその後どのような挙動を示すか、また粒子の蓄積がある細胞または脳組織全体にどのような影響が出るかについて不明な点が多く残されており、今後の解明に期待したい。

### 3 今後の展望

代表的な金属酸化物粒子であるTiO<sub>2</sub> NPsについて、実験動物を用いてその体内における組織移行、様々な臓器・組織における毒性影響などを評価した。さらに毒性研究に用いる試料の調製・標識方法、安定性、分散媒の生体影響などについても検討を行った。遺伝子損傷については本研究で検討した条件下では明確な作用が示されなかったことから、遺伝毒性はないと考えられる。しかし、肺などの組織においてTiO<sub>2</sub> NPsは長期にわたって蓄積していることや弱い炎症反応が伴っていることから、より長期に観察する必要性が示唆された。また、明確な精巢毒性が示され、雄性生殖機能への影響を詳細に検討する必要がある。TiO<sub>2</sub> NPsは投与後、血液脳関門を通過することが初めて明らかとなり、今後到達した各種細胞・部位においてどのような影響を及ぼすか、興味深い。

本研究から多くの結果が得られ、TiO<sub>2</sub> NPsのリスク評価及びそのばく露基準値の設定に資すると考えられる。一方で、研究の過程でTiO<sub>2</sub> NPsの生体影響に関する新たな疑問・課題が提起され、今後、二酸化チタンナノ粒子のばく露による健康影響のさらなる解明に繋がっていくことを期待したい。

### 4 謝辞

本研究プロジェクトは3年間にわたって行われたが、研究代表者は最初の2年は宮川宗之氏（現在、帝京大学医療技術学部）であったが、最後の1年は筆者が務めた。期間中、延べ12名の研究員と外部の共同研究者が研究に参加し、研究目標の達成に貢献した。この場を借りて謝意を表したい。

### 参考文献

- 1) EU. European Commission Recommendation on the definition of nanomaterial. <http://osha.europa.eu/en/news/eu-european-commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomaterial>.
- 2) Riu J, Maroto A, Rius FX. Nanosensors in environmental analysis. *Talanta*. 2001; 69:288-301.
- 3) Kisin ER, Murray AR, Keane MJ, Shi XC, Schwegler-Berry D, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, Wallace WE, Kagan VE, Shvedova AA. Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J Toxicol Environ Health A*. 2007; 70:2071-2079.
- 4) Robertson TA, Sanchez WY, Roberts MS. Are commercially available nanoparticles safe when applied to the skin? *J Biomed Nanotechnol*. 2010; 6:452-468.
- 5) Maynard AD, Kuempel ED. Airborne nanostructured particles and occupational health. *J Nanopart Res*. 2015; 6:587-614.
- 6) Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) by inhalation for two years. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1985; 79:179-192.
- 7) IARC. Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide. *IARC Sci Publ*. 2006; 86.
- 8) Participants IRSIW. The relevance of the rat lung response to particle overload for human risk assessment: a workshop consensus report. *Inhal Toxicol*. 2000; 12:1-17.
- 9) Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, et al. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Toxicology*. 2008; 254:82-90.
- 10) Wang J, Chen C, Liu Y, Jia F, Li W, Lao F, Lia Y, Lia B, Ge C, Zhou G, et al. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases. *Toxicol Lett*. 2008; 183:72-80.
- 11) Miura N, Ohtani K, Hasegawa T, et al. Hazardous effects of titanium dioxide nanoparticles on testicular function in mice. *Fund Toxicol Sci*. 2014; 1: 81-85.



## 研究業績リスト

### 課題名：金属酸化物粒子の健康障害に関する研究

平成26年度(2014年)		
1	原著論文	Nobuhiko Miura, Katsumi Ohtani, Tatusya Hasegawa, Rieko Hojo, Yukie Yanagiba, Tetsuya Suzuki, Megumi Suda, Rui-Sheng Wang (2014) Hazardous effects of titanium dioxide nanoparticles on testicular function in mice. Fund Toxicol Sci, 1, 81-84.
2	国内外の研究集会発表	三浦伸彦, 大谷勝己, 鈴木哲矢, 柳場由絵, 北條理恵子, 須田 恵, 王 瑞生(2014)チタンナノ粒子P25が示す精巣機能障害, フォーラム2014衛生薬学・環境トキシコロジー, 講演要旨集, p231
3	国内外の研究集会発表	Rui-Sheng Wang, Tetsuya Suzuki, Nobuhiko Miura, Rieko Hojo, Yukie Yanagiba, Megumi Suda (2014) Assessment of the Genotoxicity of TiO2 nanoparticles with gpt Delta transgenic mice. NanoCon 2014 6th International Conference, Conference Proceedings, p153.
4	国内外の研究集会発表	長谷川也須子, 久保田久代, 小林健一, 宮川宗之 (2014) 二酸化チタンナノ粒子のラットへの生体影響(1)-光学顕微鏡による検索-. 第87回日本産業衛生学会, 産業衛生学会誌 56巻348ページ.
5	国内外の研究集会発表	久保田久代, 長谷川也須子, 小林健一, 宮川宗之 (2014) 二酸化チタンナノ粒子のラットへの生体影響(1)-電子顕微鏡による検索-. 第87回日本産業衛生学会, 産業衛生学会誌 56巻348ページ.
6	国内外の研究集会発表	長谷川也須子, 久保田久代, 小林健一, 宮川宗之 (2014)ラットにおける二酸化チタンナノ粒子の反復静脈内投与による肝臓への影響. 第157回日本獣医学会学術集会, 講演要旨集, p349.
7	国内外の研究集会発表	鈴木健一郎 (2014) ナノマテリアルの血液脳関門透過性に関する研究. 第19回労働安全衛生総合研究所-産業生態科学研究所研究交流会.
平成25年度(2013年)		
1	国内外の研究集会発表	小林健一, 長谷川也須子, 久保田久代, 宮川宗之 (2013) 有害性評価のための酸化チタンナノ粒子分散液の調製法の検討 -粒子径の解析およびリン酸水素二ナトリウム水の毒性-. 第86回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 55 (Suppl.), p364.
2	国内外の研究集会発表	長谷川也須子, 久保田久代, 小林健一, 宮川宗之 (2013) 雄ラットにおける二酸化チタンナノ粒子の反復静脈内投与による影響. 第156回日本獣医学会学術集会, 講演要旨集, p224.
3	国内外の研究集会発表	Tetsuya Suzuki et al. (2013) The in vitro toxicity of stably dispersed and large agglomerated titanium dioxide nanoparticles. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Abstracts, 85.
4	国内外の研究集会発表	Nobuhiko Miura et al, Investigation of adverse effect of nanosized titanium dioxide on testicular function in mice. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Abstracts, 78.
5	国内外の研究集会発表	Rui-Sheng Wang et al, (2013) Analysis of the genotoxic effect of nanosized TiO2 as intravenously administered in mice. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Abstracts, 72.

6	国内外の研究集会発表	Kenichi Kobayashi, Yasuko Hasegawa-Baba, Hisayo Kubota, Muneyuki Miyagawa (2013) Optimized sample preparation of nanosized titanium dioxide for in vivo toxicological studies. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Abstracts, p61.
7	国内外の研究集会発表	Hisayo Kubota, Yasuko Hasegawa-Baba, Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa (2013) Effects of nanosized titanium dioxide particles after repeated intravenous injections in adult rats. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Abstracts, p 76.
8	国内外の研究集会発表	Yasuko Hasegawa-Baba, Hisayo Kubota, Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa (2013) Effects of nanosized TiO <sub>2</sub> after repeated intravenous injections in pregnant rats. The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Abstracts, p 78.
9	国内外の研究集会発表	Nobuhiko Miura, Katsumi Ohtani, Tetsuya Suzuki, Yukie Yanagiba, Rieko Hojo, Megumi Suda, Muneyuki Miyagawa and Rui-Sheng Wang (2013) Adverse Effect of Nanosized Titanium Dioxide on Testicular Function in Mice, The XIII International Congress of Toxicology, Abstract Book, p. 250.
平成24年度(2012年)		
1	国内外の研究集会発表	小林健一, 長谷川也須子, 久保田久代, 北條理恵子, 宮川宗之(2013) 有害性評価のためのTiO <sub>2</sub> 分散液の調製法(1) - 粒子径の解析 -. 第83回日本衛生学会学術総会講演集, S211.
2	国内外の研究集会発表	宮川宗之, 久保田久代, 長谷川也須子, 小林健一(2013) 有害性評価のためのTiO <sub>2</sub> ナノ粒子分散液の調製法(2) - リン酸水素二ナトリウム水の毒性 -. 第83回日本衛生学会学術総会講演集, S212.