



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1019 号
氏名	沼野 琢旬
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>Comparative study of toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> (アナターゼ型およびルチル型ナノサイズ二酸化チタン粒子の <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> における毒性影響の比較)</p> <p>Asian Pac J Cancer Prev, in press.</p>
論文審査担当者	主査： 高橋 智 副査： 上島 通浩, 酒々井 眞澄

論文内容の要旨

【背景と目的】二酸化チタン (TiO_2) 粒子は塗料・化粧品の材料として広く利用されている。しかし、WHO 国際がん研究機関 (IARC) は、 TiO_2 粒子をラットに吸入曝露した場合に肺発がん性を示すことから Group2B (ヒトに対して発がんの可能性はある) と分類している。鉱物として製錬された TiO_2 粒子は製造過程で熱処理によりアナターゼ型、ルチル型およびブルカイト型に分けられ、アナターゼ型 (anTiO_2) は主として塗料に、ルチル型 (rTiO_2) は化粧品等に用いられている。これまでに私たちは rTiO_2 はラットにおいて肺発がんプロモーション作用をもち、その機序には rTiO_2 を貪食したマクロファージの産生するラジカルによる細胞障害、および分泌される炎症性タンパク (MIP1 α) の細胞増殖作用が関与する事を明らかにしてきた。一方、 anTiO_2 はヒト皮膚線維芽細胞およびヒト肺がん細胞に対して UV 照射下で rTiO_2 に比べて 100 倍以上の細胞毒性を有するという報告がある。 anTiO_2 の光触媒活性を利用して、塗料として広く用いられる様になってきたが、毒性学的影響についての知見は乏しく実際のリスクは不明である。本研究では anTiO_2 の毒性について *in vivo* および *in vitro* の実験系において rTiO_2 との比較検討を行った。

【材料と方法】 anTiO_2 および rTiO_2 は日本化粧品工業会より提供された。1) *In vivo* の系ではラットに 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 0.5 mL 生食懸濁液を肺内噴霧し、2 週間に計 8 回噴霧した後に屠殺剖検した。肺組織の HE 標本にて肺包内に誘導されたマクロファージ数をカウントした。肺組織において MIP1 α の mRNA 発現 (RT-PCR 法)、タンパク発現 (ELISA 法) および 8-OHdG 量 (ELISA 法) の解析を実施した。2) *In vitro* の系ではラット培養肺マクロファージ (PAM)、ヒト肺がん細胞株 A549 およびヒト皮膚線維芽細胞を両粒子に曝露し、細胞毒性を比較した。細胞増殖への影響は、初代培養ラット肺マクロファージに両粒子を曝露させた培養上清を回収し、ヒト肺がん細胞株 A549 の増殖活性を、細胞の酵素活性測定法にて検討した。さらに、両粒子の UVB 照射下での A549 に対する細胞毒性を比較検討した。

【結果と考察】電顕像において anTiO_2 は卵円型、 rTiO_2 は細い棒状を呈し、元素分析によって Ti が検出された。本実験で曝露された粒子の凝集体の平均粒子径は、 anTiO_2 が $5.4\pm 2.7\mu\text{m}$ 、 rTiO_2 が $3.8\pm 2.2\mu\text{m}$ ($P<0.05$) であり、形状およびサイズが異なることがわかった。1) HE 染色の結果、肺胞内では、 anTiO_2 および rTiO_2 を貪食したマクロファージ数は対照より有意に増加し、MIP1 α 発現量および 8-OHdG 量も増加した。肺組織の生化学的解析では、マクロファージ誘導能、MIP1 α 発現量 ($P<0.01$)、8-OHdG 量への影響は rTiO_2 が anTiO_2 より顕著であった。2) rTiO_2 と比較して anTiO_2 の初代培養マクロファージに対する細胞毒性は高かった。 anTiO_2 および rTiO_2 を初代培養マクロファージに曝露した培養上清 (conditioned media) を用い A549 細胞を培養したところ、増殖活性は、 anTiO_2 の方が rTiO_2 に比べて低かった。マクロファージおよびその conditioned media 中で分泌される MIP1 α タンパク量は anTiO_2 では rTiO_2 よりも低かった。UVB 照射下での細胞毒性には両者の差は認められなかった。

【結論】これらの結果から anTiO_2 は *in vivo* の系では肺マクロファージ、MIP1 α 発現および 8-OHdG に対する誘導能、A549 細胞増殖亢進作用は rTiO_2 より小さい事が示された。

論文審査の結果の要旨

【目的】 二酸化チタン (TiO_2) 粒子は製造過程における熱処理によってアナターゼ型、ルチル型およびブルカイト型に分類されており、アナターゼ型 (anTiO_2) は主として塗料、ルチル型 (rnTiO_2) は化粧品等に使用されている。 rnTiO_2 は rnTiO_2 貪食マクロファージが産生するラジカルおよび炎症性タンパク MIP1 α を介して、ラット肺発がんプロモーション作用を発揮する事が明らかにされている。一方、 anTiO_2 による毒性知見は乏しいことから、本研究では anTiO_2 の毒性学的影響について rnTiO_2 を対照に比較検討した。

【材料と方法】 <実験1>ラットに anTiO_2 あるいは rnTiO_2 を 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で肺内噴霧し、2週間に計8回噴霧した後に屠殺剖検した。HE標本にて肺胞内マクロファージ数を計測し、肺組織における MIP1 α の mRNA 発現、タンパク発現 (ELISA法) および 8-OHdG 量 (ELISA法) を解析した。<実験2>初代培養ラット肺マクロファージ (PAM)、ヒト肺がん細胞株 A549 およびヒト肺線維芽細胞 (CCD34) に対して anTiO_2 あるいは rnTiO_2 を曝露し、細胞毒性を比較した。また、PAM に anTiO_2 あるいは rnTiO_2 を曝露させた培養上清を用いて、A549 の増殖活性に対する影響を検討した。

【結果】 電顕像では anTiO_2 は卵円型、 rnTiO_2 は細い棒状を呈し、本実験で用いた粒子凝集体の平均径は、 anTiO_2 が $5.4 \pm 2.7 \mu\text{m}$ 、 rnTiO_2 が $3.8 \pm 2.2 \mu\text{m}$ ($P < 0.05$) であった。<実験1> anTiO_2 あるいは rnTiO_2 曝露により肺胞内マクロファージ数、MIP1 α 発現量および 8-OHdG 量は対照群に比較して有意に増加し、いずれも rnTiO_2 が anTiO_2 より顕著であった。<実験2> anTiO_2 の PAM に対する細胞毒性は rnTiO_2 に比較して高かった。 anTiO_2 および rnTiO_2 を PAM に曝露した培養上清を用いた実験では、A549 細胞増殖活性は、 $\text{anTiO}_2 < \text{rnTiO}_2$ であり、PAM およびその培養上清中で分泌される MIP1 α タンパク量も $\text{anTiO}_2 < \text{rnTiO}_2$ であった。

【結論】 ラットにおける肺胞マクロファージ、MIP1 α 発現および酸化ストレス誘導能、A549 細胞増殖に対する影響において、 anTiO_2 は rnTiO_2 より毒性学的影響が低い事が示された。

【審査内容】 主査の高橋から、今回の研究では肺胞マクロファージおよびマクロファージが産生する MIP1 α に焦点を当てて研究を進めているが、 TiO_2 投与による異物反応により様々な炎症性サイトカインも誘導されると思われるが、そのような因子の影響は全く考慮する必要がないのか、アスベスト曝露においても MIP1 α が関与する報告があるが、微粒子による発がん全般に MIP1 α が関与していると考えてよいのか、など18項目、第一副査の上島教授からは、今回の研究で明らかにした新しい知見は具体的に何か、アナターゼ型・ルチル型による作用の違いを決定する因子は TiO_2 粒子のサイズそれとも形状なのか、など17項目、さらに第二副査の酒々井教授からは国際がん研究機関 (IARC) におけるリスク分類、ヒトに対するリスク評価における動物モデルの有用性、新規物質に対するリスク評価のシステム構築についての質問があった。これらの質問に対して申請者から概ね適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解していると判断した。本研究は、塗料などに使用されている anTiO_2 が化粧品等に利用されている rnTiO_2 より肺に対する毒性学的影響が低い事を明らかにした。よって、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者には博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判定した。