

厚生労働省 労災疾病臨床研究事業費補助金事業

インジウム等レアメタルによる職業性疾患予防および病態  
解明のための疫学研究および動物実験研究

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 田中 昭代

平成 28 (2016) 年 3 月

# 目 次

I.	総括研究報告	
	インジウム等レアメタルによる職業性疾患予防および病態解明のための疫学研究および動物実験研究-----	1
	田中 昭代 (九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・講師)	
II.	分担研究報告	
1.	インジウム曝露者の疫学研究-----	10
	田中 昭代 (九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・講師)	
	清原 裕 (九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・教授)	
	中津 可道 (九州大学大学院 医学研究院基礎放射線医学分野・准教授)	
	平田 美由紀 (九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・助教)	
	米本 孝二 (久留米大学 バイオ統計センター・講師)	
	研究協力者	
	田中 茂 (十文字学園女子大学・教授)	
	宮内 博幸 ((財)産業保健協会・研究開発部長)	
2.	ラットを用いた CIGS、IGZO の亜慢性影響評価-----	25
	田中 昭代 (九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・講師)	
	清原 裕 (九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・教授)	
	中津 可道 (九州大学大学院 医学研究院基礎放射線医学分野・准教授)	
	平田 美由紀 (九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・助教)	
	米本 孝二 (久留米大学 バイオ統計センター・講師)	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表-----	46
IV.	研究成果の刊行物・別冊-----	48

厚生労働省 労災疾病臨床研究事業費補助金事業  
インジウム等レアメタルによる職業性疾患予防および病態解明のための  
疫学研究および動物実験研究  
総括研究報告書

研究代表者 田中 昭代  
(九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・講師)

## 研究要旨

平成27年度の疫学研究では、インジウム製造工場およびリサイクル工場の健康調査および作業環境調査を実施し、動物実験ではレアメタルを含む太陽電池素材である銅・インジウム・ガリウム・セレン (CIGS) や酸化物半導体であるインジウム・ガリウム・亜鉛酸化物 (IGZO) の肺障害について検討を行った。

疫学研究ではインジウム製造工場およびリサイクル工場に勤務する作業者に健康調査を施行し、さらに、インジウム製造工場の1か所では作業環境測定を施行した。本年度の疫学研究調査では、胸部CT結果が契機となった新たな肺がんの診断をされた者はいなかったが、肺がん2名を認めた。すでに調査実施工場では作業環境管理・作業管理が改善され、インジウムの曝露濃度が改善されてきていることから、インジウム曝露開始歴が平成22年以降の者には血清インジウム濃度 (In-S)  $\geq 3 \mu\text{g/L}$  の有所見者はおらず、本集団では労働衛生管理が良好であることが示唆された。また、これまでの影響指標として明瞭な量反応関係、量影響関係を示していた間質性肺炎のバイオマーカーである血清KL-6濃度も同時に低下しており、現曝露群・過去曝露群ともに非曝露群と比して平均値や有所見率に差は認められない。一方、インジウム曝露量の高い過去曝露群では、不可逆性の慢性影響として、閉塞性変化や肺拡散能低下が示唆された。今後も肺発がんを含めた慢性影響評価のために継続した経過観察が必要である。ITO研作作業場において作業環境測定を行った。吸入性粉じん濃度中のインジウム濃度はA測定、B測定の結果、目標濃度の  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  の1.3倍から5.5倍を示し、「速やかに作業環境改善に取り組む必要がある」と評価された。当該事業所での更なる作業環境改善が必要である。

CIGS粒子およびIGZO粒子をラットの気管内に投与し、肺障害について評価した。CIGS粒子およびIGZO粒子の投与により、肺の両粒子含有量は経時的に減少した。一方、両粒子投与により間質性肺炎マーカーである血清SP-D濃度は対照群に比べて有意に上昇し、さらに、肺炎を主体とした組織障害が観察され、肺病変の程度は経時的に進展した。以上の結果より、CIGSおよびIGZOの気管内投与により肺障害が引き起こされ、亜慢性毒性が発現することを認めた。観察された肺病変はITOをはじめとする種々のインジウム化合物投与による肺病変に類似していた。CIGS粒子およびIGZO粒子投与による肺障害発現にはインジウムに加えて各粒子から溶出する構成元素であるガリウム、セレン、亜鉛やCIGS粒子およびIGZO粒子そのものの複合影響も考慮する必要があると考えられた。

研究分担者：

清原 裕	(九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・教授)
中津 可道	(九州大学大学院 医学研究院基礎放射線医学分野・准教授)
平田 美由紀	(九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・助教)
米本 孝二	(久留米大学 バイオ統計センター・講師)

### A. 研究目的

疫学調査や動物実験によりレアメタルであるインジウムの職業性吸入と肺障害の因果関係が確立された。その後、特定化学物質障害予防規則等が改正され、平成25年1月1日よりインジウム化合物(金属インジウムは除く)が特定化学物質の管理第2類物質・特別管理物質に指定され、インジウム化合物の製造・取扱い業務に常時従事する労働者に対して健康診断が義務化された。しかし、インジウムの有害情報が周知されず、労働衛生管理が徹底されていない1990年代～2000年代の防塵マスクを着用していないインジウム作業者は高濃度の曝露を受けていた可能性があると考えられ、健康障害が危惧される。平成26年度はインジウムに高濃度に曝露されていたと考えられる作業者を含むインジウム製造工場やリサイクル工場、金属インジウム工場において疫学調査を実施し、肺がんを含む発がん疾患は認められなかったが、肺機能検査の拘束性/閉塞性障害の所見や血清インジウム濃度高値者の胸部CT所見の改善は乏しく、血清インジウム濃度高値者の不可逆性の変化が示唆された。一方、動物実験ではITO製造のライフサイクルで製造される水酸化インジウムの強い肺障害性を明らかにした。

平成27年度の疫学調査では、前年度に引き続き、インジウム労働者コホートのインジウム製造工場、リサイクル工場に勤務する作業

者に健康調査を施行し、さらに、インジウム製造工場1か所では作業環境測定を施行した。動物実験ではラットを用いて、レアメタルを含む太陽電池や酸化物半導体素材である銅・インジウム・ガリウム・セレン (CIGS) や酸化物半導体であるインジウム・ガリウム・亜鉛酸化物 (IGZO) の肺障害について検討を行った。

### B. 研究方法

#### I インジウム曝露者の疫学調査

平成27年4月～平成28年3月の間に、6事業所 (ITO等インジウム化合物製造 3事業所・リサイクル 3事業所) (A-F工場) で疫学調査を335名に施行した。疫学調査は、曝露指標として血清インジウム濃度 (In-S) 測定および曝露歴、影響指標として呼吸器系自覚症状、胸部高分解能CT (HRCT) 撮影、スパイロメトリー、一酸化炭素肺拡散能試験 (%DLco)、血清KL-6濃度、血清SP-D濃度等を測定した。また、健康調査票にて年齢、性別、身長、喫煙歴を調査した。HRCT撮影は、D工場、E工場のみ施行した。

(倫理面での配慮)

インジウムコホート研究は、「疫学研究に関する倫理指針」に基づき研究計画書を作成し、慶應大学医学部倫理委員会の承認のもとで継続実施した。本研究は、すべての対象者から同意を取得したうえで実施した。

## II IT0等インジウム化合物製造工場の作業環境測定

F工場においてインジウムを対象とした作業環境測定、粒径を考慮したインジウム定点濃度測定、作業中における防じんマスク内側とマスク外側(個人曝露濃度測定)測定を実施した。

## III ラットを用いた CIGS、IGZO の亜慢性影響評価

CIGS の評価では、1 回投与量として CIGS 粒子量 3 mg/kg (3mg 投与群)、10 mg/kg (10mg 投与群)、30 mg/kg (30mg 投与群) の 3 群と対照群の 4 群を設定し、週 2 回、計 5 回、ラットの気管内に投与した。IGZO の評価では、IGZO 粒子 10 mg/kg をラットの気管内に 1 回投与した。CIGS 投与ラットは投与後 12 週間、IGZO 投与ラットは 24 週間にわたって経時的にラット肺、血清インジウム濃度測定、間質性肺炎バイオマーカー血清 SP-D 濃度の測定を行い、肺の病理学的変化について評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針、九州大学動物実験規則および九州大学動物実験規則細則に基づき動物実験計画を作成し、九州大学大学院医学研究院等動物実験委員会の承認を得て行われた。

### C. 研究成果

#### I インジウム曝露者の疫学調査

平成 27 年度の全体健診受診者 (n=335) は、男性は 309 名 (92.2%)、平均年齢は 45.5 歳 (範囲: 25 歳-79 歳)、曝露者 318 名 (現曝露 230 名、過去曝露 88 名)・非曝露者 17 名、平均曝露期間は 9.6 年 (0.6-39.7 年)、

曝露開始からの平均期間は 11.4 年 (0.3-50.2 年)、血清インジウム濃度 (In-S) は算術平均  $2.6 \mu\text{g/L}$  (範囲:  $<0.1 \mu\text{g/L}$ - $51.8 \mu\text{g/L}$ )、 $\text{In-S} \geq 3 \mu\text{g/L}$  の有所見者数は 59 名 (17.6%)、間質性肺炎のマーカーである KL-6 の幾何平均は  $265 \text{ U/mL}$  (正常値  $<500 \text{ U/mL}$ ) (範囲:  $124 \text{ U/mL}$  - $2090 \text{ U/mL}$ )、KL-6 の有所見者数は 22 名 (6.6%)、SP-D の幾何平均は  $47.4 \text{ ng/mL}$  (正常値  $<110 \text{ ng/mL}$ ) (範囲:  $<17.2 \text{ ng/mL}$ - $437.0 \text{ ng/mL}$ )、SP-D の有所見者数は 35 名 (10.5%) であった。肺機能検査は 313 名に施行し、性別、年齢、身長で補正した平成 13 年日本呼吸器学会予測値を使用した。呼吸機能検査ガイドラインに準じて検査を施行し、基準を満たさない検査結果 (n=29) は除外し 284 名で解析した。%VC の算術平均は、101.4% (範囲: 59.1%-137.0%)、%VC  $<80\%$  の有所見者数は 10 名 (3.5%)、%FVC の算術平均は、99.5% (範囲: 54.5%-130.9%)、%FVC  $<80\%$  の有所見者数は 17 名 (6.0%)、%FEV1.0 の算術平均は、94.0% (範囲: 48.7%-127.9%)、%FEV1.0  $<80\%$  の有所見者数は 33 名 (11.6%)、FEV1.0 の算術平均は、81.2% (範囲: 49.2%-99.2%)、FEV1.0  $<70\%$  の有所見者数は 11 名 (3.9%) であった。

平成 27 年度の健診受診者のうち、非曝露者および平成 21 年までにインジウム曝露歴があった者は 247 名であった。男性は 232 名 (93.9%)、平均年齢は 46.3 歳 (範囲: 26 歳-79 歳)、曝露者 231 名 (現曝露 156 名、過去曝露 75 名)・非曝露者 16 名、平均曝露期間は 11.6 年 (0.6-39.7 年)、曝露開始からの平均期間は 13.9 年 (1.6-50.2 年)、平成 27 年の In-S の算術平均値は  $3.5 \mu\text{g/L}$  (範囲:  $<0.1 \mu\text{g/L}$ - $51.8 \mu\text{g/L}$ )、 $\text{In-S} \geq 3 \mu\text{g/L}$  の有所見者数は 59 名 (23.9%) と平成 27 年の In-S 有所見者全員は、平成 21 年以前

からのインジウム曝露歴がある者であった。この247名を平成27年時の曝露状況で、非曝露・現曝露・過去曝露の3群に分類し比較した。非曝露群との平均値の比較は、現曝露群では、曝露指標のIn-Sおよびすべての影響指標（KL-6、SP-D、%VC、%FVC、%FEV1.0、FEV1.0%、%DLco）において有意な差はなかった。しかし、過去曝露群では、非曝露群と比し、平成27年の曝露指標のIn-Sは現在でも有意に高値である。また、影響指標の%DLcoが有意に低く、%FEV1.0およびFEV1.0%が低い傾向にあった。3群での有所見率の比較は、現曝露群では、平均値の比較と同様、曝露指標のIn-Sおよびすべての影響指標（KL-6、SP-D、%VC、%FVC、%FEV1.0、FEV1.0%、%DLco）において有意な差はなかった。しかし、過去曝露群では、平成27年の曝露指標のIn-Sは今なお有意に所見率が高く、また、影響指標の%DLco、%FEV1.0およびFEV1.0%が有意に高かった。喫煙歴で層別化し検討したが、%DLco、%FEV1.0およびFEV1.0%の有所見率の高さは喫煙でのみ説明できる結果ではなく、インジウム曝露の影響が示唆された。

## II ITO等インジウム化合物製造工場の作業環境測定

### a) 作業環境測定

ITO 研削作業場の吸入性粉じん中のインジウム濃度は、午前中に行った研削作業場のA測定幾何平均値(M)は $2.77 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、第1評価値は $54.90 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、B測定値は $13.43 \mu\text{g}/\text{m}^3$ で、第1評価値は目標濃度 $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の約5.5倍、B測定値は約1.3倍であり、当該作業場の評価は「速やかに作業環境改善に取り組む必要がある」と評価された。午後に行った同作業場のA測定幾何平均値(M)

は $3.05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、第1評価値は $15.57 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、B測定はグラインダー研磨作業位置であり、インジウム濃度は $14.34 \mu\text{g}/\text{m}^3$ となった。第1評価値は目標濃度の約1.6倍、およびB測定値は約1.4倍であり、当該作業場の評価は午前中と同様に「速やかに作業環境改善に取り組む必要がある」と評価された。

### b) マスク外(個人曝露濃度測定)とマスク内濃度測定他

マスク内および外の吸入性インジウム濃度を測定した。測定は午前と午後に分けて行った。マスク外濃度(個人曝露濃度)の最大値はA氏(午前)の $24.36 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、最小値はB氏(午前)の $2.76 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。また、マスク内測定の最大値はA氏(午前)の $1.36 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、最小値はB氏(午前)の $0.06 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。また、各々のマスク内濃度/マスク外濃度(個人曝露濃度)は、A氏の午前が5.6%、午後が4.3%、B氏の午前が2.2%、午後が1.5%であった。C氏は午前1.7%、午後1.8%であった。

### c) 粉じんリアルタイム測定

作業員3名のリアルタイム測定を行い、経時的な粉じん個人曝露濃度の推移を評価した。さらにマスク内側についても同様にリアルタイム測定を実施した。A氏はグラインダー研磨作業時に瞬間的に高い濃度( $2.5 \sim 4.0 \text{mg}/\text{m}^3$ )のピークが、B氏では平面研削、エアブロー、ヤスリ掛け時にやや高い濃度( $0.4 \sim 1.0 \text{mg}/\text{m}^3$ )のピークが、C氏はグラインダー研磨作業時、平面研削、エアブロー時にやや高い濃度のピーク( $1.0 \sim 2.0 \text{mg}/\text{m}^3$ )が認められた。しかし、3名ともマスク内側の濃度においては高いピークは認められず、極低濃度にて推移した。

### d) マスク漏れ率測定

午前中の作業開始時における漏れ率の最大値はA氏の0.83%、最小値はB氏の0.08%

であった。また、午前中の作業終了時における最大値は0.37%のA氏、最小値は0.00%のC氏であった。午後の作業前の最大値は0.17%のA氏とB氏、最小値は0.09%のB氏であった。作業後の最大値は0.27%のA氏、最小値は0.04%のC氏であった。

### Ⅲ ラットを用いたCIGS、IGZOの亜慢性影響評価

#### a) CIGS粒子の健康影響評価

CIGS粒子の平均1次粒子径は $0.1\mu\text{m}$ 、2次粒子径は $0.6\mu\text{m}$ であった。投与期間および観察期間中のCIGS 3mg群と10mg群の体重変化は対照群と同様の推移を示したが、CIGS 30mg群では有意に低値で推移し、CIGS投与によって全身性の影響が認められた各CIGS投与群の各評価時点の肺重量は対照群に比べて有意に増加し、経時的に増加した。さらに、0週、12週時において、CIGS 10mg群および30mg群では肺相対重量がCIGS 3mg群に比べて有意に増加した。各群の肺中構成金属量は経時的に減少し、CIGS粒子の肺の半減期はCIGS 3mg群と10mg群は12.8週、CIGS 30mg群では8.5週であった。各時点の血清In濃度は投与量依存性に増加し、各群で経時的に12週目まで血清In濃度が増加した。一方、血清Ga濃度はInとは反対に経時的に減少傾向を示した。血清CuおよびSe濃度はCIGS 30mg群では各時点で対照群に比べて有意に増加したが、CIGS 3mg群と10mg群では対照群と同様の推移を示した。各CIGS投与群では血清SP-D濃度は各時点で対照群に比べて有意に上昇した。肺の病理変化に関し、瀰漫性の細気管支上皮細胞・肺胞上皮細胞の増生を伴った炎症性、肺胞腔内に肺胞マクロファージの壊死片を含む滲出物の貯留、PAS陽性物質の貯留、肺胞内のコレステリン結晶物の貯留、肺胞

腔の拡張、線維組織の増生、肉芽組織の増生が観察された。各病変の程度は投与量依存性に発現した。肺炎の程度は12週目で若干低減したが、他の病変は経時的に進展した。

#### b) IGZO粒子の健康影響評価

IGZO粒子投与量は $3.2 \pm 0.03\text{mg}$  (平均±標準誤差)である。IGZO群の肺重量は観察期間中を通じて、対照群と比べて有意に上昇した。IGZO群の肺の各金属量は経時的に減少し、半減期は42.5週であった。肺の各金属濃度は経時的に減少したが、リンパ節の濃度は1週目から4週目まで増加し、その後横ばいで推移したが、24週では減少した。IGZO群の血清InおよびGa濃度は経時的に緩やかに上昇したが、血清Zn濃度はIGZO粒子の投与によってはほとんど影響を受けなかった。IGZO群の血清SP-D濃度は対照群に比べて有意に上昇した。IGZO群において細気管支・肺胞上皮細胞の増生を伴った肺炎、肺胞マクロファージの肺胞腔内への遊出、肺胞内浸出物の貯留、線維細胞の増生、肉芽組織の増生、肺胞腔の拡張、限局性の細気管支・肺胞上皮細胞の増生、肺胞内にコレステリン結晶物が観察された。これらの肺病変の程度は経時的に進展した。

### D. 考察

作業環境管理・作業管理が改善され、インジウムの曝露濃度が改善されてきている。その結果、インジウム曝露開始歴が平成22年以降の者には $\text{In-S} \geq 3\mu\text{g/L}$ の有所見者はおらず、本集団では労働衛生管理が良好であることが示唆された。これまでの影響指標として明瞭な量反応関係、量影響関係を示していた間質性肺炎のバイオマーカーであるKL-6値も同時に低下してきており、現曝露群および過去曝露群のKL-6

値は非曝露群と比して有意な差を認めない。肺機能検査の拘束性変化（%VC<80%、%FVC<80%）も、現曝露群および過去曝露群で非曝露群と有意な差は認めない。

一方、肺機能検査の閉塞性変化（%FEV1.0、FEV1.0%）や一酸化炭素肺拡散能障害（%DLco）は、インジウム曝露量の多い過去曝露群では有意に低く、これまでに曝露した難溶性化合物の ITO は今も肺内に残存し、5年～9年の追跡研究で気腫性変化が増悪することと（Nakano *et al.* 2014, Amata *et al.* 2015）、一致する結果であった。本年度の胸部 CT 結果が契機となり、新たな肺がんの診断をされた者はいなかったが、本年度の調査では、肺がん2名を認めた。動物実験でも低濃度慢性曝露で発がん性（肺がん）を認めることから（Nagano *et al.* 2011）今後も継続した経過観察が必要である。

ITO 研磨作業場におけるインジウムの作業環境測定結果について、作業場全体的に測定した午前中の A 測定値の第 1 評価値（ $54.90 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ）は目標濃度の約 5.5 倍、B 測定値（平面研削盤作業位置）は目標濃度の約 1.3 倍であり、速やかに作業環境改善に取り組む必要がある結果であった。

午後の A 測定値の第 1 評価値（ $15.57 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ）は目標濃度の約 1.6 倍、特に B 測定のグラインダー研磨作業位置では  $14.34 \mu\text{g}/\text{m}^3$  で約 1.4 倍と高く、午前と同様に工学的な対策が必要な結果となった。特に手持ち式グラインダーによる作業は、局所排気装置の開口面からやや離れた位置にても作業が行われているため、作業者は粉じんにより曝露されている可能性が考えられた。

また、研削装置は湿式であったが、発生したミストはその周辺に付着し乾燥してい

た。乾燥した粉じんは、エアガン等の空気により周辺に飛散する可能性があると思われた。確実な囲い式局所排気装置内での使用が望まれる。

作業環境測定結果と個人曝露濃度の測定では、比較的高いインジウム濃度が認められた箇所があり、当該域はビニールカーテンにより覆われているものの、この域内の十分な換気が必要と考えられた。

電動ファン付き呼吸用保護具による曝露状態の濃度測定（マスク内インジウム濃度）について、マスク内部のインジウム濃度は許容される濃度  $0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$  より低い値であることが確認された。電動ファン付き呼吸用保護具の使用により肺へのインジウム取り込み量はかなり減少していることを示唆する結果であった。また、マスクフィッティングテスターによる大気中の粉じんを用いたマスク面体の漏れ率測定結果では、全て 1.00%以下と良好な装着を示した。このような電動ファン付き呼吸用保護具を適正に装着することにより健康影響を少なくすることができればと思われる。

一方、マスクの面体と顔面との接触面におけるインジウムの付着量は、作業前に比べて作業後には付着量が増加することが確認された。マスク面体について、毎使用時の確実な清拭が重要と考えられる。

ラットを用いた CIGS および IGZO の投与により肺の病理学的変化の程度は観察終了時まで経時的に進展した。肺胞腔内に肺胞マクロファージの壊死片を含む滲出物の貯留は観察され、この変化は観察終了時まで強く持続しているため、CIGS および IGZO 粒子の肺胞マクロファージに対する障害が強く、肺胞マクロファージから放出されるメディエーターによって肺胞上皮細胞が持続的な傷害を受け、慢性炎症が発現してい

ると考えられる。さらに、肺胞内にコレステリン結晶物や PAS 陽性物質の貯留、肺胞腔の拡張、線維組織の増生が観察された。コレステリン結晶物貯留部位に細胞質が細長く伸張したマクロファージが認められることより、コレステリン結晶物貯留は肺胞マクロファージによりサーファクタントが貪食された結果と考えられる。各時点での血清 In と Ga 濃度は投与量依存性に増加したが、血清 Cu、Se、Zn 濃度は明らかな投与量依存性の変化はなかった。このことは血清 In および Ga 濃度は曝露の指標として有用だと考えられる。さらに、CIGS および IGZO の気管内投与により間質性肺炎マーカー血清 SP-D 濃度の上昇が観察され、ヒトと同様に動物においても SP-D は間質性肺炎のマーカーとして有効であることが明らかになった。ラットを用いた CIGS および IGZO の気管内投与によって、肺障害が経時的に進展し、亜慢性影響が発現することが明らかになった。

### E. 結論

本年度の調査では、インジウム曝露歴のある者から肺がん2名が見つかった。肺発がんを含めた慢性影響評価のために継続した経過観察が今後も必要である。CIGS および IGZO の投与によって肺障害が持続的に発現し、亜慢性影響が認められた。

### F. 健康危険情報

- インジウム過去曝露者では閉塞性変化や肺拡散能低下が示唆された。
- インジウム曝露者で肺がん2名を認めた。
- GIGS および IGZO の吸入により亜慢性肺障害が惹起された。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Nakano M, Tanaka A, Hirata M, *et al.* Pulmonary effects in workers exposed to indium metal: a cross-sectional study, J Occup Health, 57, 346-52, 2015.
2. 田中昭代、平田美由紀他、インジウムの健康影響、アレルギー・免疫、22、925-932、2015。
3. T. Amano, T. Sarinont, K. Koga, M. Hirata, A. Tanaka, M. Shiratani, Synthesis of Indium-Containing Nanoparticles in Aqueous Suspension Using Plasmas in Water for Evaluating Their Kinetics in Living Body, J Nanosci Nanotechnol, 15, 9298-9302, 2015.
4. T. Amano, K. Koga, T. Sarinont, H. Seo, N. Itagaki, M. Shiratani, S. Kitazaki, M. Hirata, Y. Nakatsu, A. Tanaka, Synthesis of indium-containingnanoparticles using plasmas in water to study their effects on living body, Proc. 68th GEC/9th ICRP/33rd SPP, 60, LW1.158, 2015.
5. T. Amano, T. Sarinont, K. Koga, M. Hirata, A. Tanaka, M. Shiratani, Production of In, Au, and Pt nanoparticles by discharge plasmas in water for assessment of their bio-compatibility and toxicity, MRS Advances, 6 pages, 2016.
6. Kubokura N, Takahashi-Yanaga F, Arioka M, Yoshihara T, Igawa K, Tomooka K, Morimoto S, Differentiation -inducing factor-3

inhibits intestinal tumor growth in vitro and in vivo, *J. Pharmacol. Sci.*, 127, 446-455, 2015.

## 2. 学会発表

1. 中野真規子、田中昭代、平田美由紀、吉岡範幸他、インジウム曝露と血清 LDH の関係：時間断面観察、第 88 回日本産業衛生学会、2015 年 5 月 13-16 日、大阪市。
2. 岩澤聡子、中野真規子、田中昭代、平田美由紀、田中 茂、宮内博幸、東久保一朗、川澄八重子他、インジウムの吸入性粉塵個人曝露濃度と生物学的モニタリング指標との関係、第88回日本産業衛生学会、2015年5月13-16日、大阪市。
3. 田中昭代、平田美由紀、中野真規子他、インジウム吸入による肺障害、第 26 回日本微量元素学会、2015 年 7 月 4-5 日、札幌市。
4. 田中昭代、平田美由紀、松村 渚、清原裕、インジウムを含む太陽電池素材CIGSの亜慢性影響評価、第88回日本産業衛生学会、2015年5月13-16日、大阪市。
5. 平工雄介、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺におけるマイクロRNA発現の網羅的解析、第88回日本産業衛生学会、2015年5月13-16日、大阪市。
6. A. Tanaka, M. Hirata, N. Matsumura, Y. Kiyohara, Serum surfactant protein D is a marker of lung injury caused by indium chloride, 31th International Congress on Occupational Health, May 31-Jun.5 2015, Seoul, Koera.
7. A. Tanaka, M. Hirata, N. Matsumura, K. Koga, M. Shiratani, Y. Kiyohara, Health Effects of indium nanoparticles (Invited), The 10th Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering (AEPSE2015), Sep. 20-24 2015, Jeju, Korea.
8. Kazunori Koga, Takaaki Amano, Miyuki Hirata, Akiyo Tanaka, Masaharu Shiratani, In vivo kinetics of nanoparticles synthesized by plasma in water, The 20th Korean-Japan Workshop on Advanced Plasma Process and Diagnostics, Oct. 2-5 2015, Seoul, Korea.
9. K. Koga, T. Amano, M. Hirata, A. Tanaka, M. Shiratani, In vivo kinetics of nanoparticles synthesized by plasma in water (Invited), The 21st Korea-Japan Workshop on Advanced Plasma Processes and Diagnostics & The Workshop for NU-SKKU Joint Institute for Plasma-Nano Materials, Oct. 4 2015, Yangyang, Korea.
10. T. Amano, K. Koga, T. Sarinont, H. Seo, N. Itagaki, M. Shiratani, S. Kitazaki, M. Hirata, Y. Nakatsu, A. Tanaka, Synthesis of indium-containing nanoparticles using plasmas in water to study their effects on living body, ICRP-9/GEC-68/SPP-33, Oct. 14 2015, Hawaii, USA.
11. T. Amano, T. Sarinont, K. Koga, M. Hirata, A. Tanaka, M. Shiratani, Deposition Kinetics of Metal Nanoparticles Produced by Discharges in Water, 2015 MRS Fall Meeting, Dec. 3 2015, Boston, USA.

## H. 知的所有の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

## インジウム曝露者の疫学研究

研究代表者 田中 昭代

(九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・講師)

研究分担者

清原 裕

(九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・教授)

中津 可道

(九州大学大学院 医学研究院基礎放射線医学分野・准教授)

平田 美由紀

(九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・助教)

米本 孝二

(久留米大学 バイオ統計センター・講師)

研究協力者

田中 茂

(十文字学園女子大学・教授)

宮内 博幸

( (財) 産業保健協会・研究開発部長)

### 研究要旨

本研究期間中に 6 箇所のインジウム製造工場およびリサイクル工場に勤務する作業者に健康調査を施行し、さらに、1 箇所のインジウム製造工場で作業環境測定調査を施行した。本年度の調査では、肺がん 2 名を認めた。平成 27 年度の結果は、作業環境管理・作業管理が改善され、インジウムの曝露濃度が改善されてきていることから、インジウム曝露開始歴が平成 22 年以降の者には血清インジウム濃度 (In-S)  $\geq 3 \mu\text{g/L}$  の有所見者はおらず、本集団では労働衛生管理が良好であることが示唆された。また、これまでの影響指標として明瞭な量反応関係、量影響関係を示していた間質性肺炎のバイオマーカーである KL-6 値も同時に低下してきており、現曝露群・過去曝露群ともに非曝露群と比して平均値や有所見率に差は認められない。一方、インジウム曝露量の高い過去曝露群では、不可逆性の慢性影響として、閉塞性変化 (%FEV1.0 および FEV1.0%) や肺拡散能低下 (%DLco) が示唆された。肺発がんを含めた慢性影響評価のために継続した経過観察が今後も必要である。ITO 研作作業場において作業環境測定

を行った。吸入性粉じん濃度中のインジウム濃度はA測定、B測定の結果、目標濃度の $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ の1.3倍から5.5倍を示し、「速やかに作業環境改善に取り組む必要がある」と評価された。電動ファン付き呼吸用保護具による曝露状態のマスク内インジウム濃度は許容される濃度 $0.3\mu\text{g}/\text{m}^3$ より低い値を示し、さらに、マスク面体の漏れ率測定では1.00%以下と良好な装着を示し、電動ファン付き呼吸用保護具装着によるインジウム吸入の低減効果が示された。

### A. 研究目的

インジウム肺は、平成22年12月に厚生労働省から「インジウム・スズ酸化物(ITO)等の取扱い作業による健康障害防止に関する技術指針」により間質性肺炎や続発性慢性閉塞性肺疾患の発症防止目的の健診施行を通達された新しい職業性肺疾患である。

その背景は、平成10年に間質性肺炎を発症し、平成13年にその間質性肺炎に併発した両側性気胸を発症し死亡した症例は、インジウムに起因する間質性肺炎として世界で初めてわが国で発生し、日本産業衛生学会英文誌 *Journal of Occupational Health* (Homma *et al.* 2003) に公表された。我々はこの症例発生の情報を得た後、日本の主要ITO製造工場の3社4工場で行った断面疫学調査をおこない、血清中のインジウム濃度(In-S)を曝露指標とし、血清中の間質性肺炎のバイオマーカーであるKL-6等を影響指標とし、非常に明確な量・影響関係、量・反応関係を示した(Hamaguchi *et al.* 2007)。その後、3社4工場以外のインジウム取扱工場で行った疫学調査を実施し、3社4工場での観察結果は再現し、イ

ンジウムによる間質性肺障害の因果関連を世界で初めて確立し(Nakano *et al.* 2009)、現在もそのフィールドを維持継続している。

さらには、ITOの長期曝露動物実験では肺発がん性が証明されたこと(Nagano *et al.* 2011)より、インジウム作業員での発がんの可能性が危惧される。観察開始からまだ10年余りのために評価できていない、肺がんを含む未知の慢性健康影響などの評価は重要な課題である。

平成26年度の本調査研究で、金属インジウム曝露作業員は、科学的な情報が欠落していることから、安衛法の改正においては、法規制から外れたが、高温溶解作業では、同様の肺影響が生じることを示唆した。

本年度は以下の研究を行った。

1. ITO等インジウム化合物製造に関わる作業員の疫学調査
2. ITO等インジウム化合物製造工場の作業環境測定

### B. 研究方法

1. ITO等インジウム化合物製造に関わる作業員の疫学調査

平成27年4月～平成28年3月の間に、6事業所(ITO等インジウム化合

物製造 3事業所・リサイクル 3事業所) (A-F工場) で疫学調査を335名に施行した。

疫学調査は、曝露指標としてIn-S測定および曝露歴、影響指標として呼吸器系自覚症状、胸部高分解能CT (HRCT) 撮影、スパイロメトリー、一酸化炭素肺拡散能試験 (%DLco)、血清KL-6濃度、血清SP-D濃度等を測定した。また、健康調査票にて年齢、性別、身長、喫煙歴を調査した。HRCT撮影は、D工場、E工場のみ施行した。

## 2. ITO等インジウム化合物製造工場の作業環境測定

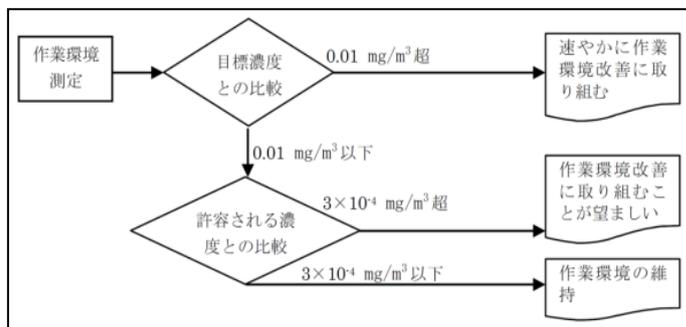
F工場 平成27年12月8日実施  
インジウムを対象とした作業環境測定、粒径を考慮したインジウム定点濃度測定、作業中における防じんマスク内側とマスク外側(個人曝露濃度測定)等をF工場で実施した。

### a) インジウムの作業環境測定

作業環境中のインジウム濃度測定を「インジウム・スズ酸化物等の取

扱い作業による健康障害防止に関する技術指針 平成 22 年 12 月 22 日」に定められている「空気中の ITO 等の濃度の測定方法について」に従い実施した。測定はミニポンプΣ3(柴田科学社製)へ PM-4 NWPS-254 型分粒装置(柴田科学社製)を装着して行った。分粒特性は 50%カット粒径  $4\mu\text{m}$ (流量 2.0L/分)で、 $4\mu\text{m}$ 以下(吸入性インジウム濃度：肺に沈着しやすいインジウム濃度)と  $4\mu\text{m}$ 以上の 2 段階に分けて捕集した。ろ紙は混合セルローズ・エステルメンブレンフィルター No225-1930 25mm(SKC 社製)を使用した。測定場所の概略図および測定位置を図 1、2 に示した。サンプリング時間は原則として継続した 30 分間とした。また、評価も技術指針に因った。すなわち、表 1 より、作業環境測定の A 測定の吸入性インジウム濃度を用いて第 1 評価値を計算するとともに、あわせて B 測定値を各々、目標濃度や許容される濃度と比較した。

表 1 評価基準



作業環境測定結果：第 1 評価値又は B 測定値

目標濃度  $0.01\text{ mg/m}^3 = 10\mu\text{ g/m}^3$

許容される濃度  $3\times 10^{-4}\text{ mg/m}^3 = 0.3\mu\text{ g/m}^3$

図1 F工場 作業環境測定（午前）概略図

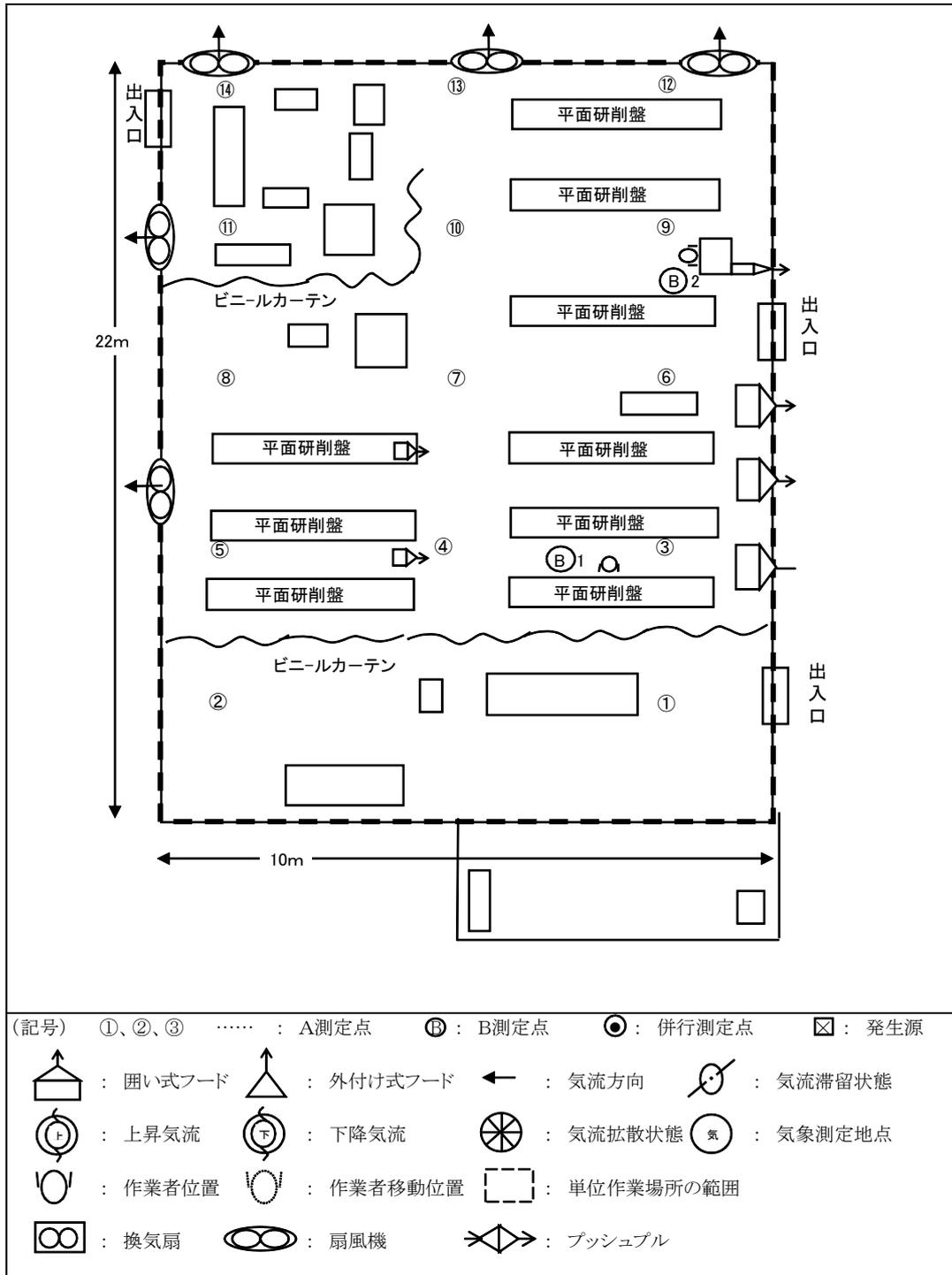
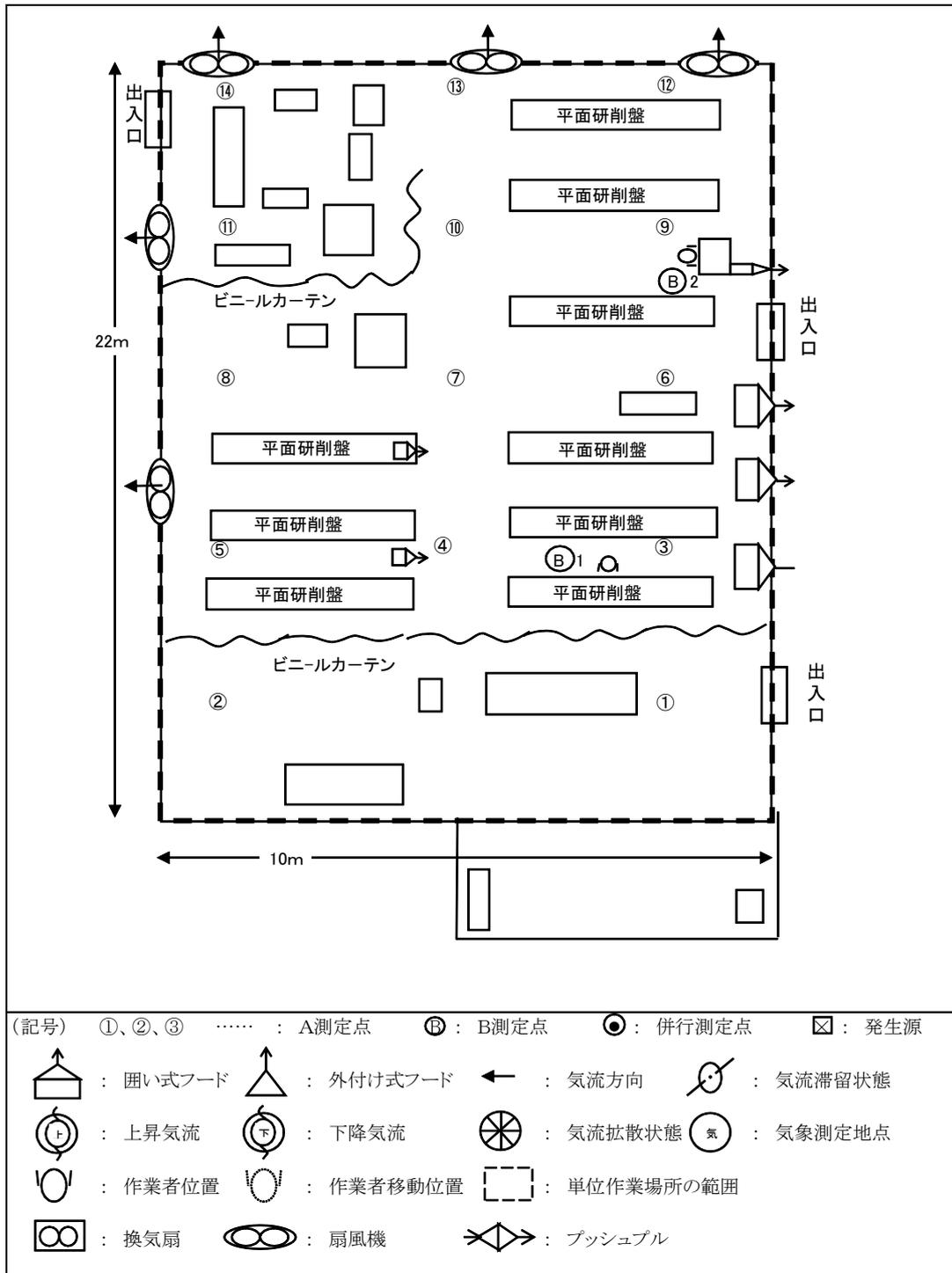


図2 F工場 作業環境測定（午後）概略図



b) インジウム含有製品の取扱い者 3 名についてのマスク内側およびマスク外側(個人曝露濃度測定)のインジウム濃度測定

作業着襟元に捕集部(分粒装置)、腰にポンプを装着し、シフト作業中連続的に捕集し、吸入性粉じん中のインジウム濃度を測定した。またポンプに連結したチューブをマスク面体に取り付け、マスク面体内のインジウム濃度についても同様に測定した。測定は午前と午後に分けて行い、装置は以下を用いた。さらに、午前の作業開始前、作業終了後、午後の作業開始前、作業終了後に使用していたマスク内側をアルコール綿にて清拭し、マスク内側へのインジウム付着の有無を確認した。

- ・ミニポンプΣ3型 柴田科学社製
- ・PM4 NWPS-254 型分粒装置 柴田科学社製

c) 粉じんリアルタイム測定

作業着 3 名にリアルタイム測定が可能なパーソナルダストセンサー(柴田科学製 LD-6N)を装着した。また、10 秒間隔での平均粉じん濃度を測定し、経時的な粉じんの個人曝露濃度の推移を測定した。さらにマスク内側についても同様にリアルタイム測定を実施した。

d) マスク漏れ率測定

作業着について、マスクフィッティングテスター MT-03 型 柴田科学社製にて、午前の作業開始時、作業

終了時、午後の作業開始時、作業終了時の面体からのマスク漏れ率測定を実施した。

インジウム濃度分析方法

a) フィルター

試料は 4 分の 1 量を用いた。硝酸 4mL および過酸化水素水 1mL を添加して、マイクロ波試料分解装置 Multiwave3000(Anton Paar 製)で前処理を行った。前処理液は PTFE 0.45 μm フィルター(ADVANTEC 製)でろ過した。ろ過した前処理液を適当濃度に希釈して、ICP-MS(Agilent 7500ce)でインジウム濃度を測定した。

b) アルコール綿(脱脂綿)

試料は細切した一部を用いた。1 試料につき 2 重測定を行い、各約 0.1g を用いた。各試料に硝酸 4mL および過酸化水素水 1mL を添加して、マイクロ波試料分解装置 Multiwave 3000(Anton Paar 製)で前処理を行った。前処理液は PTFE 0.45 μm フィルター(ADVANTEC 製)でろ過した。ろ過した前処理液を適当濃度に希釈して、ICP-MS(Agilent 7500ce)でインジウム濃度を測定した。

(倫理面での配慮)

インジウムコホート研究は、「疫学研究に関する倫理指針」に基づき研究計画書を作成し、慶應大学医学部倫理委員会の承認のもとで継続実施した。本研究は、すべての対象者か

ら同意を取得したうえで実施した。

### C. 研究結果

#### 1. ITO等インジウム化合物製造に関わる作業者の疫学調査

平成 27 年度の全体健診受診者 (n=335)、男性は 309 名 (92.2%)、平均年齢は 45.5 歳 (範囲: 25 歳-79 歳)、曝露者 318 名 (現曝露 230 名、過去曝露 88 名)・非曝露者 17 名、平均曝露期間は 9.6 年 (0.6-39.7 年)、曝露開始からの平均期間は 11.4 年 (0.3-50.2 年)、血清インジウム濃度 (In-S) は算術平均  $2.6 \mu\text{g/L}$  (範囲:  $< 0.1 \mu\text{g/L}$ - $51.8 \mu\text{g/L}$ )、In-S  $\geq 3 \mu\text{g/L}$  の有所見者数は 59 名 (17.6%)、間質性肺炎のマーカーである KL-6 の幾何平均は  $265 \text{ U/mL}$  (正常値  $< 500 \text{ U/mL}$ ) (範囲:  $124 \text{ U/mL}$ - $2090 \text{ U/mL}$ )、KL-6 の有所見者数は 22 名 (6.6%)、SP-D の幾何平均は  $47.4 \text{ ng/mL}$  (正常値  $< 110 \text{ ng/mL}$ ) (範囲:  $< 17.2 \text{ ng/mL}$ - $437.0 \text{ ng/mL}$ )、SP-D の有所見者数は 35 名 (10.5%) であった。肺機能検査は 313 名に施行し、性別、年齢、身長で補正した平成 13 年日本呼吸器学会予測値を使用した。呼吸機能検査ガイドラインに準じて検査を施行し、基準を満たさない検査結果 (n=29) は除外し 284 名で解析した。%VC の算術平均は、101.4% (範囲: 59.1%-137.0%)、%VC  $< 80\%$  の有所見者数は 10 名 (3.5%)、%FVC の算術平均は、99.5% (範囲: 54.5%-130.9%)、%FVC  $< 80\%$  の有所見者数は 17 名 (6.0%)、%FEV1.0 の算術平

均は、94.0% (範囲: 48.7%-127.9%)、%FEV1.0  $< 80\%$  の有所見者数は 33 名 (11.6%)、FEV1.0% の算術平均は、81.2% (範囲: 49.2%-99.2%)、FEV1.0%  $< 70\%$  の有所見者数は 11 名 (3.9%) であった。

平成 27 年年健診受診者のうち、非曝露者および平成 21 年までにインジウム曝露歴があった者は 247 名であった。男性は 232 名 (93.9%)、平均年齢は 46.3 歳 (範囲: 26 歳-79 歳)、曝露者 231 名 (現曝露 156 名、過去曝露 75 名)・非曝露者 16 名、平均曝露期間は 11.6 年 (0.6-39.7 年)、曝露開始からの平均期間は 13.9 年 (1.6-50.2 年)、平成 27 年の In-S は算術平均  $3.5 \mu\text{g/L}$  (範囲:  $< 0.1 \mu\text{g/L}$ - $51.8 \mu\text{g/L}$ )、In-S  $\geq 3 \mu\text{g/L}$  の有所見者数は 59 名 (23.9%) と平成 27 年の In-S 有所見者全員は、平成 21 年以前からのインジウム曝露歴がある者であった。

この 247 名を平成 27 年時の曝露状況で、非曝露・現曝露・過去曝露の 3 群に分類し比較した。非曝露群と比した平均値の比較は、現曝露群では、曝露指標の In-S およびすべての影響指標 (KL-6、SP-D、%VC、%FVC、%FEV1.0、FEV1.0%、%DLco) において有意な差はなかった。しかし、過去曝露群では、非曝露群と比し、平成 27 年の曝露指標の In-S 現在でも有意に高値である、また影響指標の %DLco が有意に低く、%FEV1.0 および FEV1.0% が低い傾向にあった。(表 2)

3 群での有所見率の比較は、現曝露群では、平均値の比較と同様、曝露指標の In-S およびすべての影響指標 (KL-6、SP-D、%VC、%FVC、%FEV1.0、FEV1.0%、%DLco) において有意な差はなかった。しかし、過去曝露群では、平成 27 年の曝露指標の In-S は今なお有意に所見率が

高く、また影響指標の %DLco、%FEV1.0 および FEV1.0% が有意に高かった。また、喫煙歴で層別化し検討したが、%DLco、%FEV1.0 および FEV1.0% の有所見率の高さは喫煙でのみ説明できる結果ではなく、インジウム曝露の影響が示唆された。(表 3)

表 2 曝露群別の平均値

	非曝露(n=16) 平均(標準偏差)	現曝露(n=156) 平均(標準偏差)	過去曝露(n=75) 平均(標準偏差)
In-S	0.05(0.03)	1.95(3.68)	<b>7.31(11.4)**</b>
KL-6 <sup>&amp;</sup>	268(1.59)	268(1.45)	316(1.67)
SP-D <sup>&amp;</sup>	46.7(1.97)	43.5(1.88)	63.4(2.23)
%VC	101.3(11.2)	102.6(13.2)	99.12(12.6)
%FVC	99.6(11.8)	100.(12.7)	96.2(12.5)
%FEV1.0	96.5(10.8)	95.7(11.7)	<b>89.1(14.0)</b>
FEV1.0%	82.3(4.6)	82.0(5.5)	<b>78.7(7.7)</b>
%DLco	95.7(12.6)	95.7(13.4)	<b>83.8(18.2)*</b>

&: 幾何平均(幾何標準偏差)、\*、\*\*: P <0.05, .01 Dunnett test 使用(非曝露群と比して)。%DLco: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) の補正式使用。

表 3 曝露群別の有所見率

	非曝露(n=16)	現曝露(n=156)	過去曝露 (n=75)	p
	n(%)	n(%)	n(%)	
In-S	0(0.0)	27(17.3)	32(42.7)	<0.001
KL-6	1(6.3)	10(6.4)	9(12.0)	0.332
SP-D	2(12.5)	10(6.4)	18(24.0)	0.001
%VC	0(0.0)	5(3.7)	3(4.8)	0.667
%FVC	0(0.0)	9(6.6)	4(6.3)	0.572
%FEV1.0	0(0.0)	11(8.1)	15(23.8)	0.002
非喫煙者	0(0.0)	1(2.6)	3(20.0)	0.056
喫煙者	0(0.0)	10(10.3)	12(25.0)	0.024
FEV1.0%	0(0.0)	3(2.2)	6(9.5)	0.039
非喫煙者	0(0.0)	0(0.0)	2(13.3)	0.045
喫煙者	0(0.0)	3(3.1)	4(8.3)	0.279
%DLco	0(0.0)	3(3.4)	12(16.9)	0.004
非喫煙者	0(0.0)	1(4.3)	4(22.2)	0.112
喫煙者	0(0.0)	2(3.0)	8(15.1)	0.032

P <0.05, .001 Pearson  $\chi^2$  test 使用. Reference: %DLco<70、National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) の補正式使用。

2. ITO等インジウム化合物製造工場の作業環境測定

a) 作業環境測定

ITO 研削作業場の作業環境測定結果として吸入性粉じん中のインジウム濃度等を表 4 に、測定位置の概略を図 1、2 に示した。午前中に行った研削作業場の A 測定幾何平均値 (M) は  $2.77 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、第 1 評価値は  $54.90 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、B①(平面研削盤作業位置)測定値は  $13.43 \mu\text{g}/\text{m}^3$  で、第 1 評価値は目標濃度  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  の約 5.5 倍、B①測定値は約 1.3 倍であり、当

該作業場の評価は「速やかに作業環境改善に取り組む必要がある」と評価された。午後に行った同作業場の A 測定幾何平均値 (M) は  $3.05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、第 1 評価値は  $15.57 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、13 時 17 分から行った B①測定はグラインダー研磨作業位置であり、インジウム濃度は  $14.34 \mu\text{g}/\text{m}^3$  となった。第 1 評価値は目標濃度の約 1.6 倍、および B 測定値は約 1.4 倍であり、当該作業場の評価は午前中と同様に「速やかに作業環境改善に取り組む必要がある」と評価された。

表 4 インジウム作業環境測定結果

定点 番号	開始	終了	作業内容 幾何平均値、評価値等	吸入性In濃度 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	総In濃度 ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	吸入性In/総In の割合(%)
A①	9:40	11:20	ITO研削作業場  幾何平均値:2.77 幾何標準偏差:6.19 第1評価値:54.90 (参考:第2評価値:14.41) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	0.20	0.23	88.2
②				0.06	144.22	0.0
③				16.59	3863.88	0.4
④				3.24	5.70	56.9
⑤				1.86	366.16	0.5
⑥				8.92	15.67	56.9
⑦				6.75	7.16	94.3
⑧				1.94	2.83	68.7
⑨				1.38	4.11	33.5
⑩				1.93	3.58	54.0
⑪				25.45	28.27	90.0
⑫				2.49	2.75	90.8
⑬				2.40	5.77	41.7
⑭				23.46	26.67	87.9
B①	9:47	9:57	平面研削盤作業(○氏)位置	13.43	16.55	81.1
A①	13:15	14:55	ITO研削作業場  幾何平均値:3.05 幾何標準偏差:2.70 第1評価値:15.57 (参考:第2評価値:4.98) ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	1.20	1.65	72.8
②				1.31	1.86	70.5
③				2.40	26.80	9.0
④				1.59	63.01	2.5
⑤				1.76	156.47	1.1
⑥				2.09	160.85	1.3
⑦				4.52	804.24	0.6
⑧				1.49	405.61	0.4
⑨				8.84	159.99	5.5
⑩				7.13	236.01	3.0
⑪				2.59	112.70	2.3
⑫				4.82	181.48	2.7
⑬				4.87	565.84	0.9
⑭				10.42	1667.67	0.6
B①	13:17	13:27	グラインダー研磨作業者(A氏)位置	14.34	2015.53	0.7
B②	13:37	13:47	グラインダー研磨作業者(C氏)位置	7.62	1270.22	0.6

b) マスク外(個人曝露濃度測定)とマスク内濃度測定他

表5にマスク内の吸入性インジウム濃度およびマスク外の吸入性インジウム濃度の測定結果を示した。測定は午前と午後に分けて行った。マスク外濃度(個人曝露濃度)の最大値はA氏(午前)の $24.36\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、最小値はB氏(午前)の $2.76\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。また、マスク内測定の最大値はA氏(午前)の $1.36\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、最小値はB氏(午前)の $0.06\mu\text{g}/\text{m}^3$ で

あった。また各々のマスク内濃度/マスク外濃度(個人曝露濃度)は、A氏(興研製 サカエ式電動ファンBL-321H型)の午前が5.6%、午後が4.3%、B氏(重松製作所製 Sy-11V型)の午前が2.2%、午後が1.5%であった。C氏(重松製作所製 Sy-11V型)は午前1.7%、午後1.8%であった。また、マスクの面体と顔面との接触面におけるインジウム付着量を表6に示した。

表 5 マスク内側と外側のインジウム濃度測定およびマスク漏れ率測定結果

作業 者	作業 内容	使用したマスクの種類		マスク内外のIn濃度測定結果					マスクフィッティングテスターによるマ スク漏れ率測定結果(%) (括弧内はPAPR停止時)	
		PAPR	フィルター捕 集効率(%)	作業時刻	マスク	In濃度	In濃度/許容さ れる濃度	内/外	作業開始時	作業終了時
						( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )				
A氏	ITO研磨、 切断	興研製サカエ式電動ファン BL-321H型	95.0	午前	外	24.36	81.2	5.6	0.83	0.37 (25.3)
					内	1.36	4.5			
		興研製サカエ式電動ファン BL-321H型	95.0	午後	外	12.96	43.2	4.3	0.17	0.27 (23.7)
					内	0.56	1.9			
B氏	研削、グ ラインダ ー	重松製Sy-11V型	99.97	午前	外	2.76	9.2	2.2	0.08	0.24 (33.9)
					内	0.06	0.2			
		重松製Sy-11V型	99.97	午後	外	6.15	20.5	1.5	0.17	0.11
					内	0.09	0.3			
C氏	研削、研 磨	重松製Sy-11V型	99.97	午前	外	15.19	50.6	1.7	0.11	0.00
					内	0.26	0.9			
		重松製Sy-11V型	99.97	午後	外	6.04	20.1	1.8	0.09	0.04
					内	0.11	0.4			

表 6 マスクの面体と顔面との接触面におけるインジウム付着量測定結果

作業 者	測定時	In付着量( $\mu\text{g}$ )	マスクの種類
A氏	午前作業 終了後	45.79	サカエ式電動ファンBL-321H型(興研製)
B氏		3.26	Sy-11V型(重松製作所製)
C氏		0.53	Sy-11V型(重松製作所製)
A氏	午後作業 終了後	27.37	サカエ式電動ファンBL-321H型(興研製)
B氏		3.69	Sy-11V型(重松製作所製)
C氏		12.08	Sy-11V型(重松製作所製)

c) 粉じんリアルタイム測定

作業員 3 名にリアルタイム測定が可能なパーソナルダストセンサー(柴田科学製 LD-6N)を装着し、10秒間隔での平均粉じん濃度を測定して、経時的な粉じん個人曝露濃度の推移を測定した。さらにマスク内側についても同様にリアルタイム測定を実施した。A 氏の測定結果を図 3、B 氏を図 4、C 氏を図 5 に示した。A 氏はグラインダー研磨作業時に瞬間

的に高い濃度 ( $2.5\sim 4.0\text{ mg}/\text{m}^3$ ) のピークが、B 氏では平面研削、エアブロー、ヤスリ掛け時にやや高い濃度 ( $0.4\sim 1.0\text{ mg}/\text{m}^3$ ) のピークが、C 氏はグラインダー研磨作業時、平面研削、エアブロー時にやや高い濃度のピーク ( $1.0\sim 2.0\text{ mg}/\text{m}^3$ ) が認められた。しかし、3 名ともマスク内側の濃度においては高いピークは認められず、極低濃度にて推移した。

図3 A氏リアルタイム測定結果 PAPER サカエ式電動ファンBL-321H型(興研製)使用

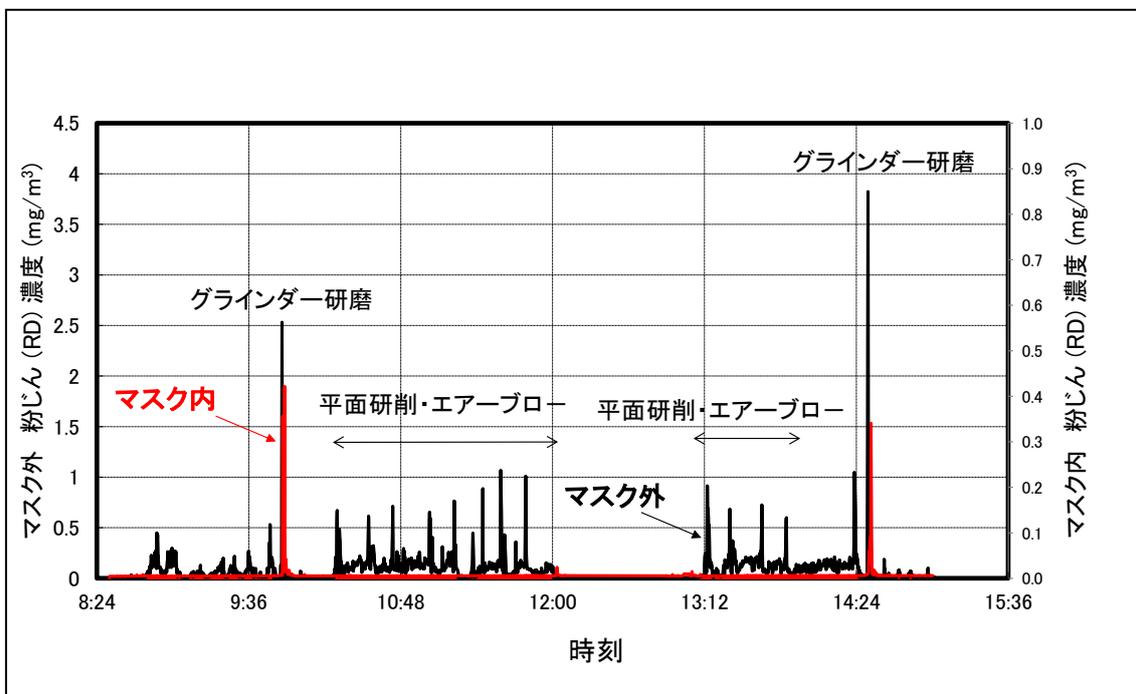


図4 B氏リアルタイム測定結果 PAPER Sy-11V型(重松製作所製)使用

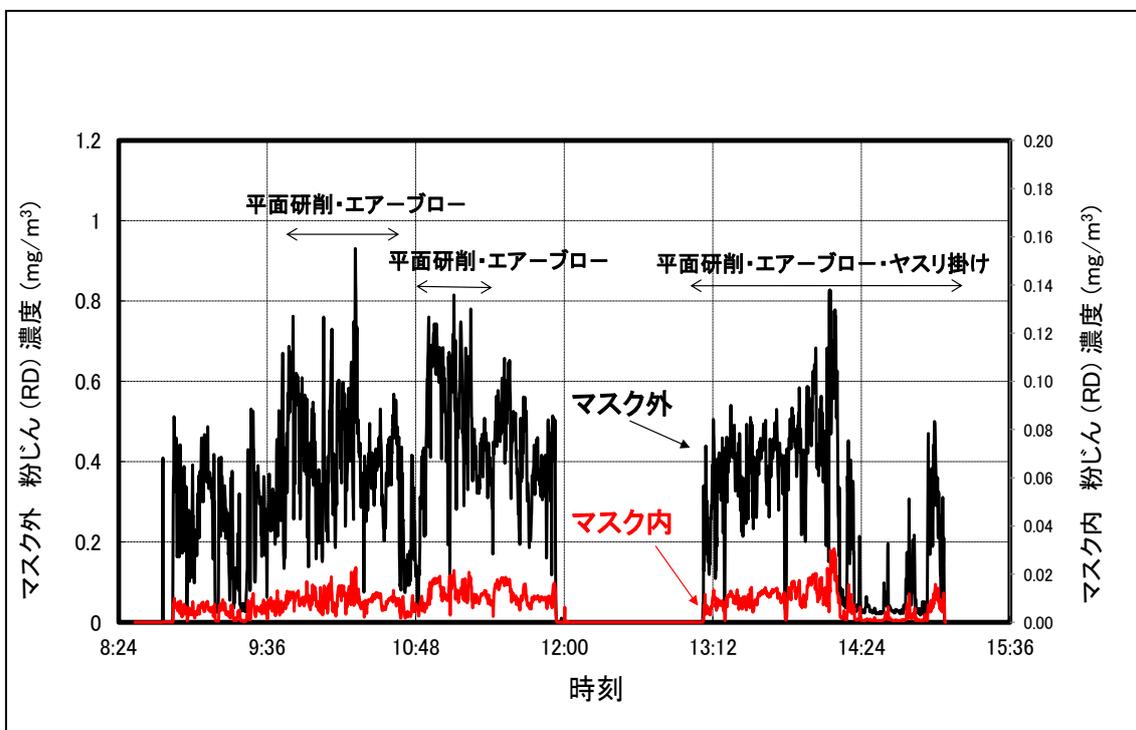
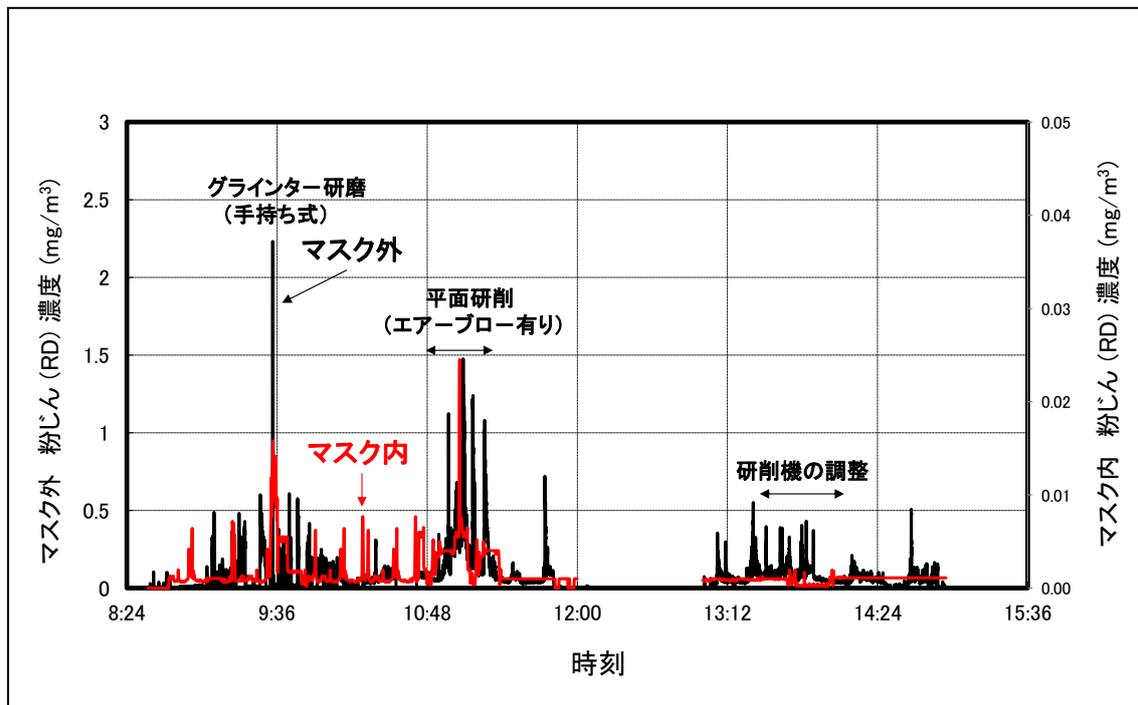


図5 C氏リアルタイム測定結果 PAPR Sy-11V型（重松製作所製）使用



#### d) マスク漏れ率測定

表5にマスクフィッティングテスト MT-03型によるマスクの漏れ率測定を示した。午前中の作業開始時における漏れ率の最大値はA氏の0.83%、最小値はB氏の0.08%であった。また、午前中の作業終了時における最大値は0.37%のA氏、最小値は0.00%のC氏であった。午後の作業前の最大値は0.17%のA氏とB氏、最小値は0.09%のB氏であった。作業後の最大値は0.27%のA氏、最小値は0.04%のC氏であった。

### D. 考察

#### 1. ITO等インジウム化合物製造に関わる作業者の疫学調査

作業環境管理・作業管理が改善され、インジウムの曝露濃度が改善さ

れてきている。その結果、インジウム曝露開始歴が平成22年以降の者には  $In-S \geq 3 \mu g/L$  の有所見者はおらず、本集団では労働衛生管理が良好であることが示唆された。これまでの影響指標として明瞭な量反応関係、量影響関係を示していた間質性肺炎のバイオマーカーである KL-6 値も同時に低下してきており、現曝露群および過去曝露群の KL-6 値は非曝露群と比して有意な差を認めない。肺機能検査の拘束性変化 ( $\%VC < 80\%$ 、 $\%FVC < 80\%$ ) も、現曝露群および過去曝露群で非曝露群と有意な差は認めない。

一方、肺機能検査の閉塞性変化 ( $\%FEV1.0$ 、 $FEV1.0\%$ ) や一酸化炭素肺拡散能障害 ( $\%DLco$ ) は、インジウム曝露量の多い過去曝露群では

有意に低く、これまでに曝露した難溶性化合物の ITO は今も肺内に残存し、5 年～9 年の追跡研究で気腫性変化が増悪することと (Nakano *et al.* 2014, Amata *et al.* 2015)、一致する結果であった。本年度の胸部 CT 結果が契機となり、新たな肺がんの診断をされた者はいなかったが、肺がん 2 名を認めた。動物実験でも低濃度慢性曝露で発がん性 (肺がん) を認めることから (Nagano *et al.* 2011) 今後も継続した経過観察が必要である。

## 2. ITO等インジウム化合物製造工場の作業環境測定

ITO 研磨作業場におけるインジウムの作業環境測定結果について、作業場全体的に測定した午前中の A 測定値の範囲は、測定点 No2 の  $0.06 \mu\text{g}/\text{m}^3$  から測定点 No11 の  $25.45 \mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。第 1 評価値 ( $54.90 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) は目標濃度の約 5.5 倍、B 測定値 (平面研削盤作業位置) は目標濃度の約 1.3 倍であり、速やかに作業環境改善に取り組む必要がある結果であった。

午後の A 測定値の範囲は、測定点 No1 の  $1.20 \mu\text{g}/\text{m}^3$  から測定点 No14 の  $10.42 \mu\text{g}/\text{m}^3$  であった。第 1 評価値 ( $15.57 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) は目標濃度の約 1.6 倍、特に B①グラインダー研磨作業位置では  $14.34 \mu\text{g}/\text{m}^3$  で約 1.4 倍と高く、午前と同様に工学的な対策が必要な結果となった。特に手持ち式グラインダーによる作業は、局所

排気装置の開口面からやや離れた位置にても作業が行われているため、作業者は粉じんにより曝露されている可能性が考えられた。

また、研削装置は湿式であったが、発生したミストはその周辺に付着し乾燥していた。乾燥した粉じんは、エアガン等の空気により周辺に飛散する可能性があると思われた。確実な囲い式局所排気装置内での使用が望まれる。

作業環境測定結果と個人曝露濃度 (マスク外の濃度) の測定結果について、午前中に行われていた研削作業位置 (B 測定位置) 付近の No11 と No14 にて、比較的高いインジウム濃度が認められた。当該域はビニールカーテンにより覆われているものの、この域内の十分な換気が必要と考えられた。

電動ファン付き呼吸用保護具による曝露状態の濃度測定 (マスク内インジウム濃度) について、A 氏以外は、マスク内部のインジウム濃度は許容される濃度  $0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$  より低い値であることが確認された。電動ファン付き呼吸用保護具の使用により肺へのインジウム取り込み量はかなり減少していることを示唆する結果であった。また、マスクフィッティングテスターによる大気中の粉じんを用いたマスク面体の漏れ率測定結果では、全て 1.00%以下と良好な装着を示した。このような電動ファン付き呼吸用保護具を適正に装着することにより健康影響を少なくするこ

とができればと思われる。

一方、マスクの面体と顔面との接触面におけるインジウムの付着量は、ブランクである午前の作業前にも  $0.90\sim 3.22\ \mu\text{g}$  が検出されたものの、午前の作業終了時は  $0.53\sim 45.79\ \mu\text{g}$ 、午後の作業終了時は  $3.69\sim 27.37\ \mu\text{g}$  と作業後には付着量が増加することが確認された。マスク面体について、毎使用時の確実な清拭が重要と考えられる。

### E. 結論

本年度の調査では、曝露歴のある者から肺がん 2 名がみつかった。肺発がんを含めた慢性影響評価のために継続した経過観察が今後必要である。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- ① Nakano M, Tanaka A, Hirata M, *et al.* Pulmonary effects in workers exposed to indium metal: a cross-sectional study, *J Occup Health*, 57, 346-52, 2015.

- ② 田中昭代、平田美由紀他、インジウムの健康影響、アレルギー・免疫、22、925-932、2015。

#### 2. 学会発表

- ① 中野真規子、田中昭代、平田美由紀、吉岡範幸他、インジウム曝露と血清 LDH の関係：時間断面観察、第 88 回日本産業衛生学会、2015 年 5 月 13-16 日、大阪市。
- ② 岩澤聡子、中野真規子、田中昭代、平田美由紀、田中 茂、宮内博幸、東久保一郎、川澄八重子他、インジウムの吸入性粉塵個人曝露濃度と生物学的モニタリング指標との関係、第 88 回日本産業衛生学会、2015 年 5 月 13-16 日、大阪市。
- ③ 田中昭代、平田美由紀、中野真規子他、インジウム吸入による肺障害、第 26 回日本微量元素学会、2015 年 7 月 4-5 日、札幌市。

### G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

## ラットを用いた CIGS、IGZO の亜慢性影響評価

研究代表者 田中 昭代

(九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・講師)

研究分担者

清原 裕

(九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・教授)

中津 可道

(九州大学大学院 医学研究院基礎放射線医学分野・准教授)

平田 美由紀

(九州大学大学院 医学研究院環境医学分野・助教)

米本 孝二

(久留米大学 バイオ統計センター・講師)

### 研究要旨

太陽電池素材である銅・インジウム・ガリウム・セレン (Cu・In・Ga・Se:CIGS) や酸化物半導体であるインジウム・ガリウム・亜鉛酸化物 (IGZO) はその構成元素にレアメタルで肺障害惹起金属のインジウムを含んでいるものの、実用化が優先したため、これらの物質の健康影響の知見は非常に乏しい。そこで、ラットを用いて、CIGS および IGZO をラットの気管内に投与し、経気道性曝露による健康影響を評価した。

CIGS 粒子および IGZO 粒子をラットの気管内に投与し、CIGS 投与ラットは投与後 12 週間、IGZO 投与ラットは 24 週間にわたり、経時的な肺障害の推移について検討した。

CIGS 粒子投与により、肺の CIGS 粒子は経時的に減少した。血清 In と Ga 濃度は経時的に増加した。血清 Cu と Se 濃度は経時的な上昇は観察されなかったが、対照群に比べて有意に上昇した。CIGS 投与群では間質性肺炎マーカーである血清 SP-D 濃度は対照群に比べて有意に上昇し、さらに、肺炎を主体とした組織障害が観察され、肺病変の程度は経時的に進展した。

IGZO 群の肺 IGZO 粒子沈着量は経時的に減少し、血清 In および Ga 濃度は経時的に緩やかに上昇したが、血清 Zn 濃度は IGZO 粒子の投与によってはほとんど影響を受けなかった。IGZO 粒子投与により血清 SP-D 濃度は対照群に比べて有意に上昇し、肺の病理学的検索では、肺炎を主体とした組織障害が観察され、肺

病変の程度は経時的に進展した。以上の結果より、CIGS 粒子および IGZO 粒子の気管内投与により肺障害が引き起こされ、亜慢性毒性が発現することを認めた。

CIGS 粒子および IGZO 粒子投与によって肺障害が発現することが明らかになり、観察された肺病変は ITO をはじめとする種々のインジウム化合物投与による肺病変に類似していた。In に加えて、Ga、Se の各粒子から溶出する金属や CIGS 粒子および IGZO 粒子そのものの複合影響も考慮する必要があると考えられた。

### A. 研究目的

今までの動物実験や疫学研究よりインジウム化合物が発がん性や強い肺炎惹起性を示すことが明らかになってきた。一方、太陽光発電など自然エネルギーへの期待が高まり、特に銅・インジウム・ガリウム・セレン (Cu・In・Ga・Se:CIGS) を発電層に使った太陽電池は変換効率が高いため、近年、生産が急増している。さらに、インジウム (In)・ガリウム (Ga)・亜鉛 (Zn) 酸化物 (IGZO) は In、Ga、Zn により構成される酸化物半導体であり、電子移動度が高く、タッチパネルの高精度化、低消費電力化に不可欠であるため、生産量は増加している。CIGS や IGZO は肺炎症惹起金属である In を構成元素として含んでいるが、CIGS や IGZO の生体影響の知見が乏しく、CIGS や IGZO の健康影響評価は喫緊の課題であると考えられる。CIGS や IGZO の職業性曝露はその製造工程と製造装置の保守点検時が最も曝露の機会が高いと考えられる。我々は CIGS 粒子 1 回投与量 0.5 mg/kg、5 mg/kg、50 mg/kg の 10 倍の公比で設定し、経気道性曝露による 3 週間の亜急性影響について評価した (Tanaka

et al. 2012)。その結果、CIGS 粒子の投与によって、肺障害が発現し、CIGS 粒子の肺からのクリアランスは遅いことが示唆された。

本研究において、①CIGS 粒子の健康影響評価；1 回投与量は 3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg の 3 倍の公比で設定、さらに、②IGZO の健康影響評価；1 回投与量は 10mg/kg を設定し、ラットを用いて経気道性曝露による肺障害について検討した。

### B. 実験方法

#### ① CIGS 粒子の健康影響評価

被験物質として CIGS 粒子 (龍谷大より供与、平均粒子径  $0.1 \mu\text{m}$ ) を用いた。CIGS 粒子のモル%は Cu : In : Ga : Se = 24 : 18 : 8 : 50 (CIGS 100 mg 中 Cu:19.7 mg; In: 25 mg; Ga: 6.4 mg, Se: 49 mg) である。

実験動物として雄 Wistar ラット (Kyudo, Tosu) 128 匹を 7 週齢で購入し、8 週齢で投与を行った。1 回投与量は粒子量として 3 mg/kg (In として 0.75 mg/kg ; 3mg 投与群)、10 mg/kg (同、2.5 mg/kg ; 10mg 投与群)、30 mg/kg (同、7.5 mg/kg ; 30mg 投与群) の 3 倍の公比で投与量を設定した。実

験群は各 CIGS 投与群 3 群と対照群を加えた 4 群、1 群 32 匹で構成した。

各被験物質は蒸留水で懸濁し、1 mL/kg の懸濁液を投与した。対照群には蒸留水のみを 1 mL/kg 投与した。

8 週齢より投与を開始し、週 2 回、5 回にわたって気管内投与を行い、最終投与日の翌日 (0 週)、1 週、4 週、12 週目に各群 8 匹ずつ (CIGS 30mg 投与群、12 週目のみ 7 匹) 安楽死させた。

ラットは安楽死直後に後大静脈より採血し、主要臓器を摘出した。金属分析用の血清と臓器は  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。病理用臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、常法により病理標本を作製した。HE 染色、PAS 染色、病理学的評価を行った。各時点の肺の病理学的変化について評価した。肺病変の程度は - から 3+ までの 5 段階 (- : none, ± : slight, + : mild, 2+ : moderate, 3+ : severe、slight = 1-10%, mild = 11-24%, moderate = 25-50%, and severe = 51-100%) で評価した。

**SP-D 測定** : ELISA にて血清 SP-D 濃度測定を行った。

**肺金属量 (Cu, In, Ga, Se) 分析** : 肺上葉を分析に用いた。超高純度の硝酸 10mL の中に肺上葉を一晩浸漬し、浸漬液 0.1mL を前処理に用いた。その後、血清と同じ手法で金属濃度を測定した。肺上葉の金属量より肺全体の金属量を算出した。金属濃度が定量下限値の統計解析には下限値の 1/2 値を用いた。

**血清金属 (Cu, In, Ga, Se) 分析** : 血

清 1mL を用いて、超高純度の硝酸 6mL および過酸化水素 0.5mL を添加後、マイクロウェーブ分解装置を用いて、灰化 (前処理) を行った。灰化液は内標準物質のロジウムを添加後、20mL に定容し、ICP-MS 装置を用いて金属濃度を測定した。定量下限は Cu: 6 ng/mL, In: 0.1ng/mL, Ga: 0.2 ng/mL, , Se: 30 ng/mL である。金属濃度が定量下限値の統計解析には下限値の 1/2 値を用いた。

投与期間および観察期間中の体重変化、肺重量、肺の病理変化、血清 SP-D 濃度、肺の各金属量、血清金属濃度より呼吸器影響について評価を行った。

体重と臓器重量の統計解析には分散分析後 Student' s *t*-test を用い、有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## ② IGZO 粒子の健康影響評価

被験物質として IGZO 粒子 (国内非鉄金属メーカーより供与、平均粒子径  $4.6 \mu\text{m}$ ) を用いた。IGZO 粒子は  $\text{In}_2\text{O}_3 : \text{Ga}_2\text{O}_3 : \text{ZnO}$  を 1 : 1 : 1 のモル比 (IGZO 100 mg 中 In: 37 mg; Ga: 22 mg, Zn: 21 mg) で混合し、焼成したものである。

実験動物として雄 Wistar ラット (Kyudo, Tosu) 40 匹を 6 週齢で購入し、8 週齢で投与を行った。1 回投与量は IGZO 粒子量として 10 mg/kg BW (In として 3.7 mg/kg) を設定した。実験群は IGZO 投与群と対照群の 2 群、各群 20 匹で構成した。各被験物質は蒸留水で懸濁し、1 mL/kg の懸濁液を 1

回投与した。対照群には蒸留水のみを 1 mL/kg 投与した。

8 週齢時に 1 回の気管内投与を行い、1 週、4 週、12 週、24 週目に各群 5 匹ずつ安楽死させた。ラットは安楽死直後に後大静脈より採血し、主要臓器を摘出した。金属分析用の血清と臓器は  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。病理用臓器は 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、常法により病理標本を作製した。HE 染色、病理学的評価を行った。各時点の肺の病理学的変化について評価した。肺病変の程度は 5 段階 (-: none,  $\pm$ : slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: severe、slight = 1-10%, mild = 11-24%, moderate = 25-50%, and severe = 51-100%) で評価した。

**肺金属量 (In, Ga, Zn) 分析**：右葉と副葉を分析に用いた。湿式灰化後、ICP-MS で各金属濃度を測定した。肺上葉と副葉の金属量より肺全体の金属量を算出した。

**リンパ節 (In, Ga, Zn) 分析**：リンパ節 0.01 g を用いて湿式灰化後、ICP-MS で各金属濃度を測定した。金属濃度が定量下限値の統計解析には下限値の 1/2 値を用いた。

**血清金属 (In, Ga, Zn) 分析**：血清 1mL を用いて、湿式灰化後、ICP-MS で各金属濃度を測定した。金属濃度が定量下限値の統計解析には下限値の 1/2 値を用いた。

**SP-D 測定**：ELISA にて血清 SP-D 濃度測定を行った。

投与期間および観察期間中の体重変化、肺重量、肺金属量、血清 SP-D

濃度、血清およびリンパ節金属濃度、肺の病理変化より呼吸器影響について評価を行った。

各指標の統計解析には分散分析後 Student' s *t*-test を用い、有意水準は  $p < 0.05$  とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針、九州大学動物実験規則および九州大学動物実験規則細則に基づき動物実験計画を作成し、九州大学大学院医学研究院等動物実験委員会の承認を得て行われた。

## C. 結果

### ① CIGS 粒子の健康影響評価

CIGS 粒子の平均 1 次粒子径は BET 法による測定で  $0.1\ \mu\text{m}$ 、2 次粒子径はレーザー解析・散乱式粒度分布形による測定で  $0.6\ \mu\text{m}$  であった。各群の総投与量は粒子量として CIGS 3mg 群： $5.0 \pm 0.2\ \text{mg}$  (平均  $\pm$  平均偏差)、CIGS 10mg 群  $16.5 \pm 0.6\ \text{mg}$ 、CIGS 30mg 群  $49.5 \pm 2.0\ \text{mg}$  であった (Fig. 1)。

投与期間および観察期間中の CIGS 3mg 群と 10mg 群の体重変化は対照群と同様の推移を示したが、CIGS 30mg 群では有意に低値で推移し、CIGS 投与によって全身性の影響が認められた (Fig. 2)。

各 CIGS 投与群の各評価時点の肺重量は対照群に比べて有意に増加し、経時的に増加した。さらに、0 週、12 週時において、CIGS 10mg 群および 30mg

群では肺相対重量が CIGS 3mg 群に比べて有意に増加した (Fig. 3)。

各群の肺中構成金属量は経時的に減少し、CIGS 粒子の肺の半減期は CIGS 3mg 群と 10mg 群は 12.8 週、CIGS 30mg 群では 8.5 週であった (Fig. 4, 5)。各時点の血清 In 濃度は投与量依存性に増加し、各群で経時的に 12 週間目まで血清 In 濃度が増加した。一方、血清 Ga 濃度は In とは反対に経時的に減少傾向を示した。血清 Cu および Se 濃度は CIGS 30mg 群では各時点で対照群に比べて有意に増加したが、CIGS 3mg 群と 10mg 群では対照群と同様の推移を示した (Fig. 6)。各 CIGS 投与群では血清 SP-D 濃度は各時点で対照群に比べて有意に上昇し、0 週から 4 週まで増加したが、4 週目から 12 週までは横ばいで推移した (Fig. 7)。

Table 1 に各群の病変の経時的変化の推移を示している。病理変化に関し、瀰漫性の細気管支上皮細胞・肺胞上皮細胞の増生を伴った炎症性、肺胞腔内に肺胞マクロファージの壊死片を含む滲出物の貯留、PAS 陽性物質の貯留、肺胞内のコレステリン結晶物の貯留、肺胞腔の拡張、線維組織の増生、肉芽組織の増生が観察された (Fig. 8)。PAS 陽性物質の貯留、肺胞内のコレステリン結晶物の貯留は 0 週、1 週では発現しなかったが、4 週目よりこれらの病変が観察された。各病変の程度は投与量依存性に発現した。肺炎の程度は 12 週目で若干低減したが、他の病変は経時的に進展した。

## ② IGZO 粒子の健康影響評価

IGZO 粒子投与量は  $3.2 \pm 0.03$  mg

(平均±標準誤差) である。観察期間中のラットの死亡はなく、体重の増加の推移に関しては 2 群間で有意な差は認められなかった。IGZO 群の肺重量は観察期間中を通じて、対照群と比べて有意に上昇した (Fig. 9)。

IGZO 群の肺の各金属量は経時的に減少し、半減期は 42.5 週であった (Fig. 10)。Fig. 11 に肺および肺近接リンパ節の In、Ga、Zn 濃度の推移を示している。肺の各金属濃度は経時的に減少したが、リンパ節の濃度は 1 週目から 4 週目まで増加し、その後横ばいで推移したが、24 週では減少した。IGZO 群の血清 In および Ga 濃度は経時的に緩やかに上昇したが、血清 Zn 濃度は IGZO 粒子の投与によってはほとんど影響を受けなかった (Fig. 12)。IGZO 群の血清 SP-D 濃度は 1 週目から 4 週目にかけて上昇し、4 週目以降は低下し、12 週から 24 週は横ばいで推移した。IGZO 群 1 週目と 24 週目では対照群に比べて有意に上昇した (Fig. 13)。

Table 2 に各群の病変の経時的変化の推移を示している。IGZO 群において投与後 1 週目より細気管支・肺胞上皮細胞の増生を伴った肺炎、肺胞マクロファージの肺胞腔内への遊出、肺胞内浸出物の貯留、線維細胞の増生が観察され、4 週目より肉芽組織の増生、肺胞腔の拡張、限局性の細気管支・肺胞上皮細胞の増生が発現し、12 週目で肺胞内にコレステリン結晶物が観察された。これらの肺病変の程度は経時的に進展した。

## D. 考察

ラットを用いた CIGS および IGZO の気管内投与によって、肺障害が経時的

に進展し、亜慢性影響が発現することが明らかになった。

### ① CIGS 粒子の健康影響評価 CIGS 投与による全身性の影響

投与期間および観察期間中の CIGS 3mg 群と 10mg 群の体重変化は対照群と同様の推移を示したが、CIGS 30mg 群では有意に低値で推移し、CIGS 投与によって全身性の影響が認められた。

#### 肺病変

肺の病理学的変化の程度は 12 週目まで経時的に進展した。肺胞腔内に肺胞マクロファージの壊死片を含む滲出物の貯留は観察され、この変化は 12 週まで強く持続しているため、CIGS 粒子の肺胞マクロファージに対する障害が強く、肺胞マクロファージから放出されるメディエーターによって肺胞上皮細胞が持続的な傷害を受け、慢性炎症が発現していると考えられる。さらに、肺胞内にコレステリン結晶物や PAS 陽性物質の貯留、肺胞腔の拡張、線維組織の増生が観察された。コレステリン結晶物貯留部位に細胞質が細長く伸張したマクロファージが認められることより、コレステリン結晶物貯留は肺胞マクロファージによりサーファクタントが貪食された結果と考えられる。Yamazaki et al. (2000) らは InAs や InP の投与によって経時的に肺胞腔が拡張し、その内部に PAS 陽性物質が貯留する肺胞蛋白症様の病変が認められたと報告し、さらに、最近の In 吸入による症例報

告 (Cummings et al., 2010, Xiao et al., 2010) では、肺胞蛋白症を認めている。今回、線維組織の増生や肺胞腔の拡張を伴っていることから典型的な肺胞蛋白症とは確定できないが、肺胞腔内に肺胞マクロファージの壊死片が多数観察されることから、肺胞内に沈着した CIGS 粒子を貪食することによって肺胞マクロファージが壊死に陥り、肺胞マクロファージが制御していた肺胞 II 型上皮細胞および Clara 細胞から分泌されるサーファクタントの産生・代謝のバランスが壊れ、肺胞内にサーファクタントが蓄積したものと考えられる。ヒトの疫学調査 (Chonan et al., 2007, Hamaguchi et al., 2008, Nakano et al., 2009) により、インジウム曝露者では間質性肺炎に加えて、気腫化病変が観察されているので、肺胞腔の拡張は気腫化へ繋がる病変と推測される。一方、ラット用いた酸化ガリウムの鼻部曝露 (23 mg/m<sup>3</sup>) の 1 日 2 時間、週 5 日、4 週間の曝露では曝露終了後 1 日目の肺で肺胞蛋白症が観察され、終了 6 から 12 か月後で肺病変の程度は増悪し、肺線維症が観察された (Wolff et al. 1988)。さらに、ラットを用いた酸化銅や硫酸銅の気管内投与では BAL 中の肺胞マクロファージの増加、タンパク量の増加が観察された (Hiratano et al., 1990, 1993)。ラット、モルモット、ウサギを用いた Se 粉塵について曝露濃度 30 mg/m<sup>3</sup>、16 時間の吸入曝露実験では軽度の間質性肺炎が引き起こされ (Hall et al., 1951)、

酸化セレン 150-600 mg/m<sup>3</sup> の吸入曝露ではすべてのラットが死亡したとの報告 (Filatova, 1951) がある。今回の肺で観察された病理学的変化は今までの疫学研究や動物実験でインジウム化合物吸入によって引き起こされる肺病変と類似しているが、粒子より溶出した In 単独によって引き起こされた病変というよりは CIGS 構成元素や粒子そのものの複合影響と考えられる。

### 肺金属量

今回、CIGS 粒子の肺の半減期は約 8 週から 12 週であることが示された。肺の CIGS 粒子が経時的に減少するにも係わらず、肺重量は経時的に増加し、肺病変の程度は、12 週目まで持続している。12 週目まで肺に残存している CIGS 粒子によって崩壊した肺胞マクロファージより活性酸素や種々のサイトカインが放出され、持続的に肺胞上皮細胞を刺激、傷害することによって慢性的炎症が進展すると考えられる。また、肺近接リンパ節で CIGS 粒子の移行が観察されているので、肺からの CIGS のクリアランスは CIGS 粒子の肺からの呼出、溶解に加えて CIGS 粒子の肺組織からリンパ節へ移行によるものが考えられる。CIGS 粒子径は 0.1 μm とナノサイズレベルではあるが、粒子自体が肺内の毛細血管壁を通過し、血管中へ移行しているかどうかは明らかではない。

### 血清金属濃度

各時点での血清 In と Ga 濃度は投与量依存性に増加したが、血清 Cu と Se

濃度は明らかな投与量依存性の変化はなかった。このことは血清 In および Ga 濃度は曝露の指標として有用だと考えられる。さらに、血清 In 濃度は投与終了後も各群で経時的に 12 週間目まで増加し、ハムスターを用いた ITO や酸化インジウムの慢性実験結果と同様であった。一方、血清 Ga 濃度は In とは反対に経時的に減少傾向を示した。InAs や InP の動物実験 (Yamazaki et al., 2000) より血清 In 濃度の半減期は約 1 年との報告があり、また、ヒトや動物における Ga の代謝研究において、血液や組織中から早期に排泄されるとの報告がある (Krakoff et al., 1979, Battele Pacific Northwest Laboratories, 1990)。今回の結果から血清 In の半減期は求められなかったが、CIGS 粒子から溶出する In と Ga の血中の挙動は異なり、血清中の In のクリアランスは遅いが、Ga は比較的早いことが示唆された。

また、CIGS の亜急性毒性実験 (Tanaka et al., 2012) においては血清 Cu および Se 濃度は 0 週から 3 週までほぼ同じレベルで推移し、これらの金属濃度は CIGS の投与によって増加しなかった。しかし、今回、高投与量群である CIGS 30mg 投与群では血清 Cu および Se 濃度は対照群に比べて有意に増加した。この結果は実験に用いた CIGS 粒子の粒子径の違いに起因している可能性が考えられる。前回用いた CIGS 粒子の平均粒子径は 1.6 μm であったが、今回は 0.1 μm であった。

CIGS 粒子は難溶性ではあり、CIGS 粒子自体の体内移行も否定できないが、粗大CIGS粒子に比べて微小のCIGS粒子の方がその構成元素が生体内でより溶出すると考えられる。CuとSeは必須元素であるが、多量のCuの摂取では肝障害を引き起こし（Chuttani et al., 1965）、Seの急性中毒では神経毒性を示すという報告（Patty, 1963）があり、過剰なCuやSeは主に肝臓で蓄積され、体内の恒常性を保っている（Beliles, 1994）と考えられるが、今回、CIGSの大量投与によって血中のCuとSe濃度が上昇しているため、肝臓を含めた遠隔臓器の影響に留意する必要があると考えられる。

## ② IGZO の健康影響評価 肺病変

肺重量は観察期間中を通じて、対照群と比べて有意に上昇し、さらに、肺病変の程度は経時的に徐々に進展した。ITOの投与によって発現した肺病変（肺胞内にコレステリン結晶物や肺胞内浸出物の貯留、肺胞腔の拡張）がIGZOの投与によっても認められたことより、インジウム化合物の化学形態が異なってもインジウム化合物から溶出するInに起因する病変は基本的には同じであることが推測された。さらに、肺胞腔内に肺胞マクロファージの壊死片を含む滲出物の貯留が観察され、この変化は24週まで持続しているため、Inの肺胞マクロファージに対する障害が強く、肺胞マクロファージから放出されるメディエーター

によって肺胞上皮細胞が持続的な傷害を受け、慢性炎症が発現していると考えられる。In vitro 実験において肺胞マクロファージがIn含有粒子を貪食した結果、壊死やアポトーシスを誘発し、Inイオンを細胞外に放出し、フリーラジカルや活性酸素種により酸化ストレスを引き起こすが、肺胞上皮細胞ではこれらの現象は観察されなかったという報告（Gwinn et al. 2013）がある。今回の観察結果を支持するものと考えられる。肺病変は主にはIGZO粒子から溶出してきたInによって肺病変が引き起こされたと推測されるが、Inに加えて、Gaや粒子そのものの複合影響も考慮する必要があると考えられた。

## 肺金属量の推移

肺の各金属量の推移（半減期：42.5週）から肺からのIGZOの排泄は非常に遅いことが明らかになった。肺病変より肺胞マクロファージの崩壊像が多数観察され、マクロファージの崩壊によって肺胞内に放出されたIGZO粒子は他のマクロファージに取り込まれるという過程を繰り返し、さらに、24週の時点においてもIGZO粒子は肺胞中隔や細気管支、血管周囲の結合組織に沈着が観察されることより、IGZOの肺の半減期を長くしている要因の一つであると推測される。

## 血清SP-D濃度の推移

IGZO群の1週と24週時点での血清SP-D濃度は対照群と比較して上昇し、さらにIGZO群4週時点では他の3時点に比べて上昇していたことより、

SP-D は亜慢性の影響評価、特に、吸入より 1 か月の亜急性期の有効な指標であることが示唆された。

### 血清金属濃度の推移

血清 In および Ga 濃度は経時的に緩やかに上昇したが、血清 Zn 濃度は IGZO の投与によってはほとんど上昇しなかった。Zn は必須元素であり、体内では恒常性維持機構が強いため、体外排泄が促進されたと考えられるが、肺以外の臓器に蓄積している可能性がある。今後、遠隔臓器での Zn 濃度の推移と影響を評価する必要があると考えられた。

IGZO 10 mg/kg (0.025 mgIn/kg) は 2 年間の吸入曝露で、ラットの呼吸量を 561 mL/分/kg BW、肺への沈着率 30% とした場合、In の吸入曝露濃度は 1.1 mg/m<sup>3</sup> と推計される。この推計濃度は厚労省通達の目標濃度 (In として 0.01 mg/m<sup>3</sup>) の約 100 倍のレベルであるが、特定化学物質障害予防規則改正前にはインジウム作業場では 1 mgIn/m<sup>3</sup> を超すインジウム作業場の報告がある。IGZO 作業場の環境改善が行われていない場合には、曝露の可能性があり、今回の投与量の範囲においても十分に注意を払う必要であると考えられた。

### E. 結論

CIGS 粒子および IGZO 粒子の投与によって肺障害が持続的に発現し、亜慢性影響が認められた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. T. Amano, T. Sarinont, K. Koga, M. Hirata, A. Tanaka, M. Shiratani, Synthesis of Indium-Containing Nanoparticles in Aqueous Suspension Using Plasmas in Water for Evaluating Their Kinetics in Living Body, *J Nanosci Nanotechnol*, 15, 9298-9302, 2015.
2. T. Amano, K. Koga, T. Sarinont, H. Seo, N. Itagaki, M. Shiratani, S. Kitazaki, M. Hirata, Y. Nakatsu, A. Tanaka, Synthesis of indium-containing nanoparticles using plasmas in water to study their effects on living body, *Proc. 68th GEC/9th ICRP/33rd SPP*, 60, LW1.158, 2015.
3. T. Amano, T. Sarinont, K. Koga, M. Hirata, A. Tanaka, M. Shiratani, Production of In, Au, and Pt nanoparticles by discharge plasmas in water for assessment of their bio-compatibility and toxicity, *MRS Advances*, 6 pages, 2016.
4. Kubokura N, Takahashi-Yanaga F, Arioka M, Yoshihara T, Igawa K, Tomooka K, Morimoto S, Differentiation-inducing factor-3 inhibits intestinal tumor growth in vitro and in

- vivo, *J. Pharmacol. Sci*, 127, 446-455, 2015.
2. 学会発表
    1. 田中昭代、平田美由紀、松村 渚、清原 裕、インジウムを含む太陽電池素材CIGSの亜慢性影響評価、第88回日本産業衛生学会、2015年5月13-16日、大阪市。
    2. 平工雄介、田中昭代、平田美由紀、村田真理子、インジウム曝露ラット肺におけるマイクロRNA発現の網羅的解析、第88回日本産業衛生学会、2015年5月13-16日、大阪市。
    3. A. Tanaka, M. Hirata, N. Matsumura, Y. Kiyohara, Serum surfactant protein D is a marker of lung injury caused by indium chloride, 31th International Congress on Occupational Health, May 31-Jun. 5 2015, Seoul, Korea.
    4. A. Tanaka, M. Hirata, N. Matsumura, K. Koga, M. Shiratani, Y. Kiyohara, Health Effects of indium nanoparticles (Invited), The 10th Asian-European International Conference on Plasma Surface Engineering (AEPSE2015), Sep. 20-24 2015, Jeju, Korea.
    5. Kazunori Koga, Takaaki Amano, Miyuki Hirata, Akiyo Tanaka, Masaharu Shiratani, In vivo kinetics of nanoparticles synthesized by plasma in water, The 20th Korean-Japan Workshop on Advanced Plasma Process and Diagnostics, Oct. 2-5 2015, Seoul, Korea.
    6. K. Koga, T. Amano, M. Hirata, A. Tanaka, M. Shiratani, In vivo kinetics of nanoparticles synthesized by plasma in water (Invited), The 21st Korea-Japan Workshop on Advanced Plasma Processes and Diagnostics & The Workshop for NU-SKKU Joint Institute for Plasma-Nano Materials, Oct. 4 2015, Yangyang, Korea.
    7. T. Amano, K. Koga, T. Sarinont, H. Seo, N. Itagaki, M. Shiratani, S. Kitazaki, M. Hirata, Y. Nakatsu, A. Tanaka, Synthesis of indium-containing nanoparticles using plasmas in water to study their effects on living body, ICRP-9/GEC-68/SPP-33, Oct. 14 2015, Hawaii, USA.
    8. T. Amano, T. Sarinont, K. Koga, M. Hirata, A. Tanaka, M. Shiratani, Deposition Kinetics of Metal Nanoparticles Produced by Discharges in Water, 2015 MRS Fall Meeting, Dec. 3 2015, Boston, USA.
  - G. 知的所有権の取得状況
    1. 特許取得 なし
    2. 実用新案登録 なし

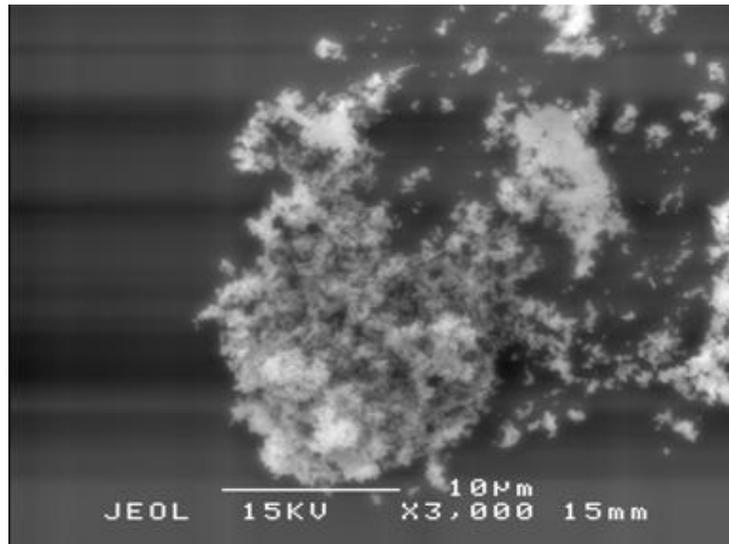


Fig.1 SEM photograph of CIGS particle

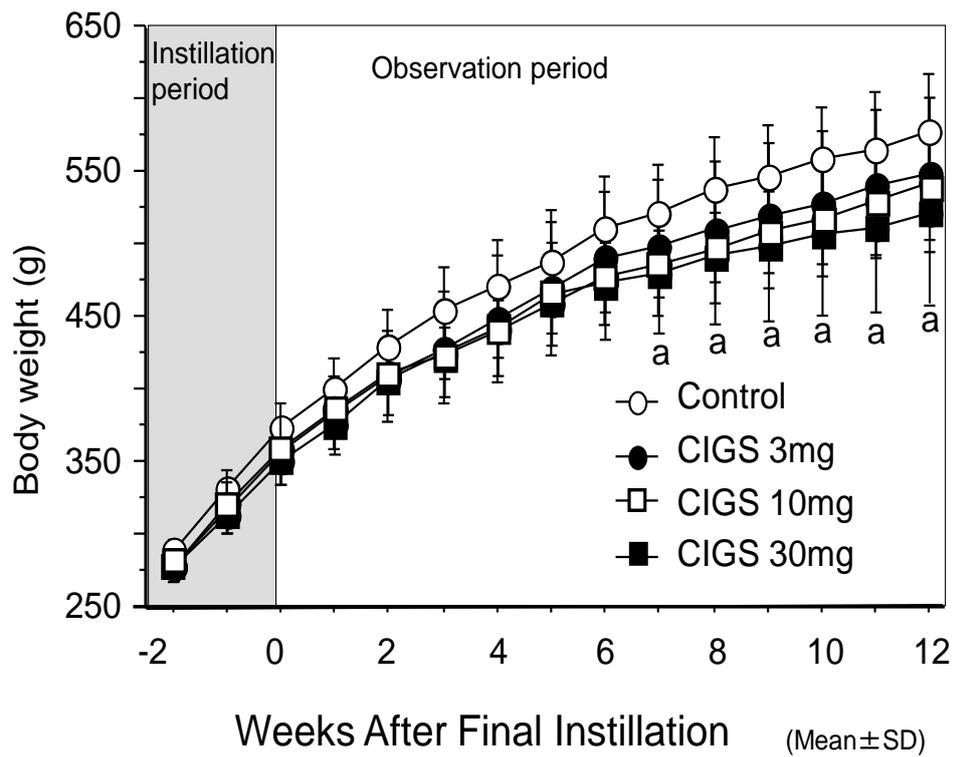


Fig.2 Changes in body weight gain during instillation and observation period. The results shown are mean  $\pm$  S.D.

a: Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ )

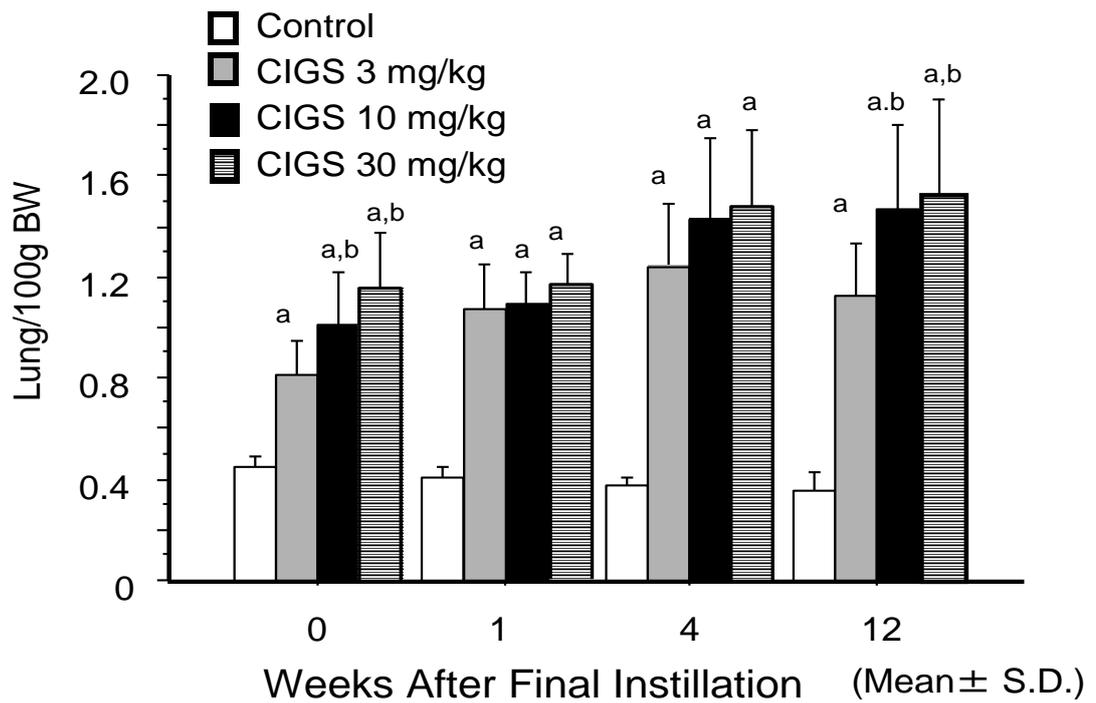


Fig.3 Changes in relative lung weights from the final instillation. The results are shown as mean  $\pm$  SD of rats euthanized at each time point

a: Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ )

b: Significantly different from the CIGS 3 mg group ( $P < 0.05$ )

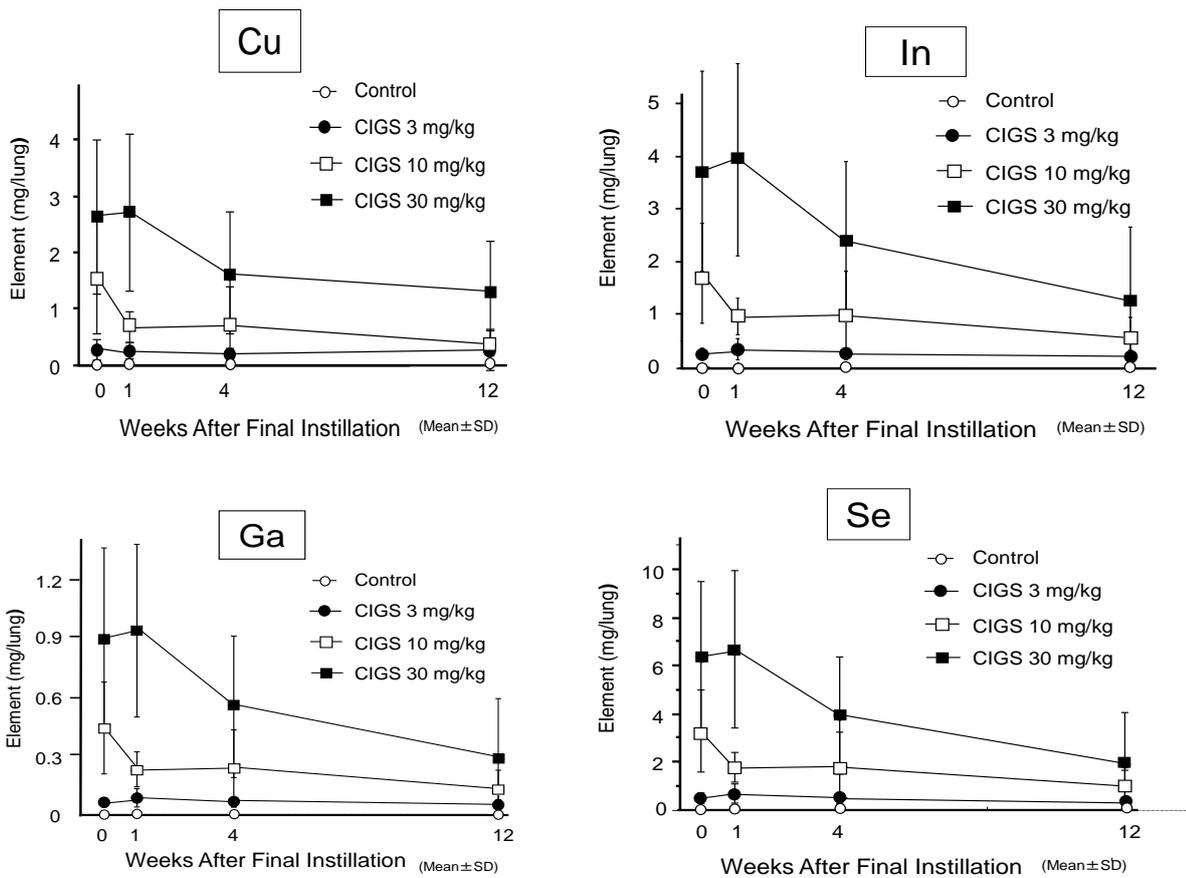


Fig.4 Metal contents of Cu, In, Ga and Se in the lung from the final instillation

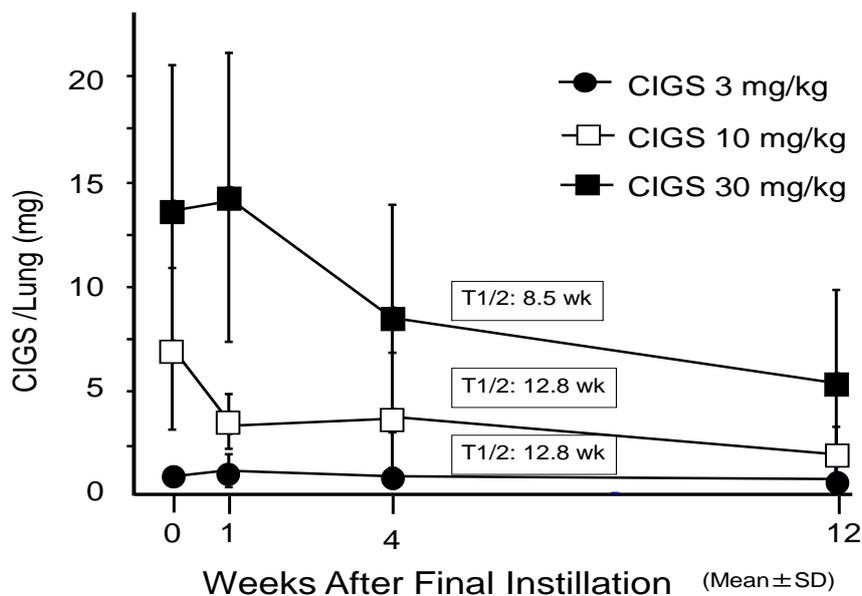


Fig. 5 Change of CIGS particles contents in the lung from the final instillation

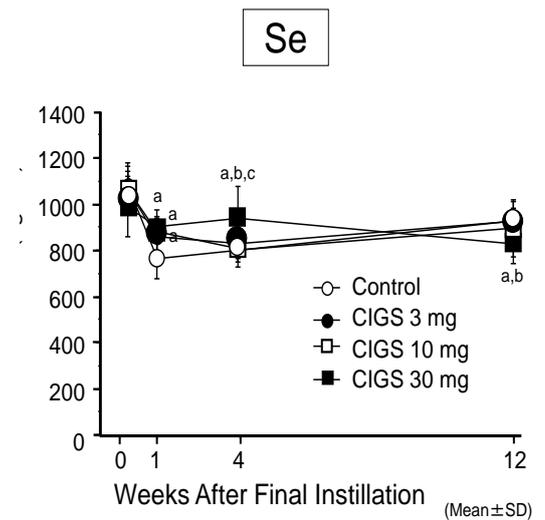
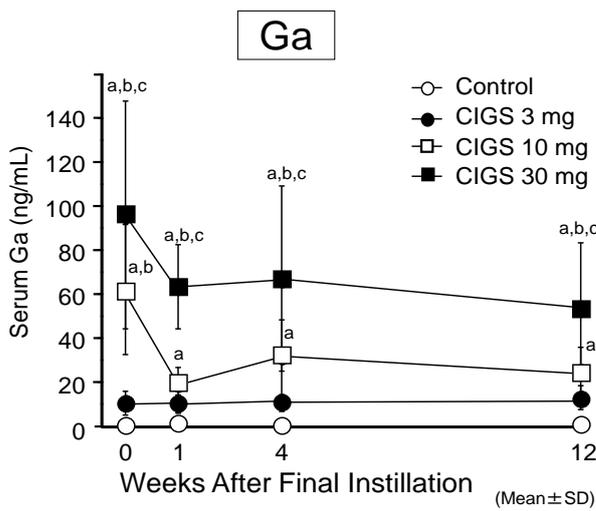
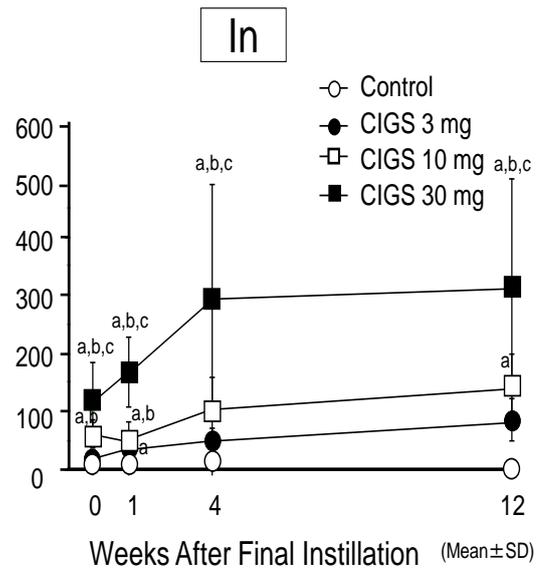
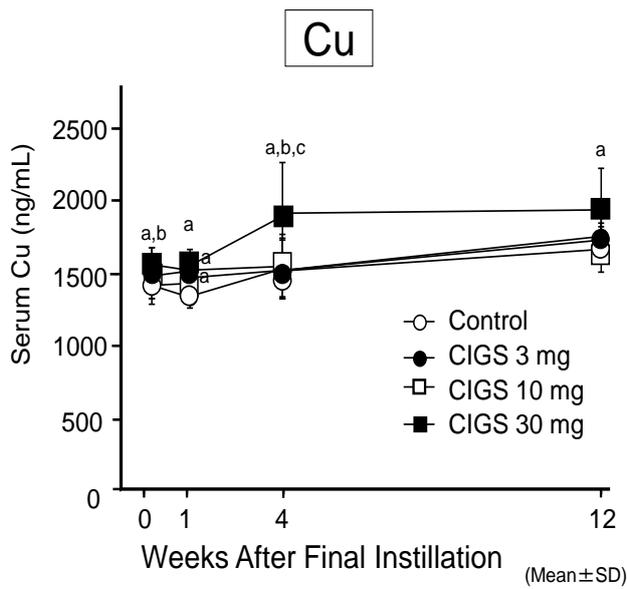


Fig.6 Metal concentrations of Cu, In, Ga and Se in serum from the final instillation

a: Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ )

b: Significantly different from the CIGS 3 mg group ( $P < 0.05$ )

c: Significantly different from the CIGS 10 mg group ( $P < 0.05$ )

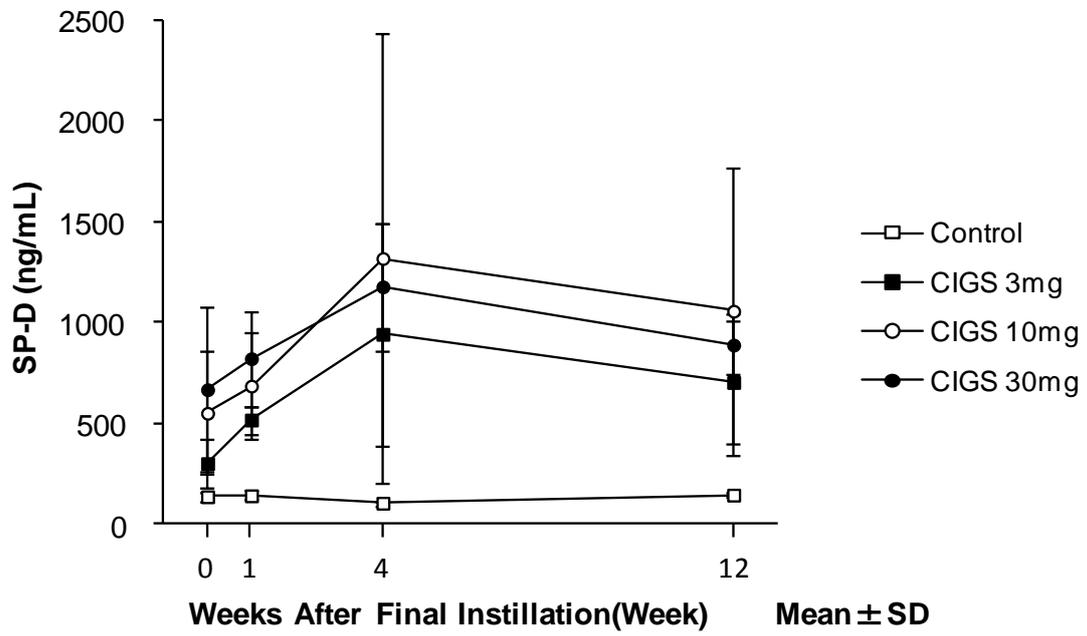


Fig.7 Change of serum SP-D level after final intratracheal instillation of CIGS

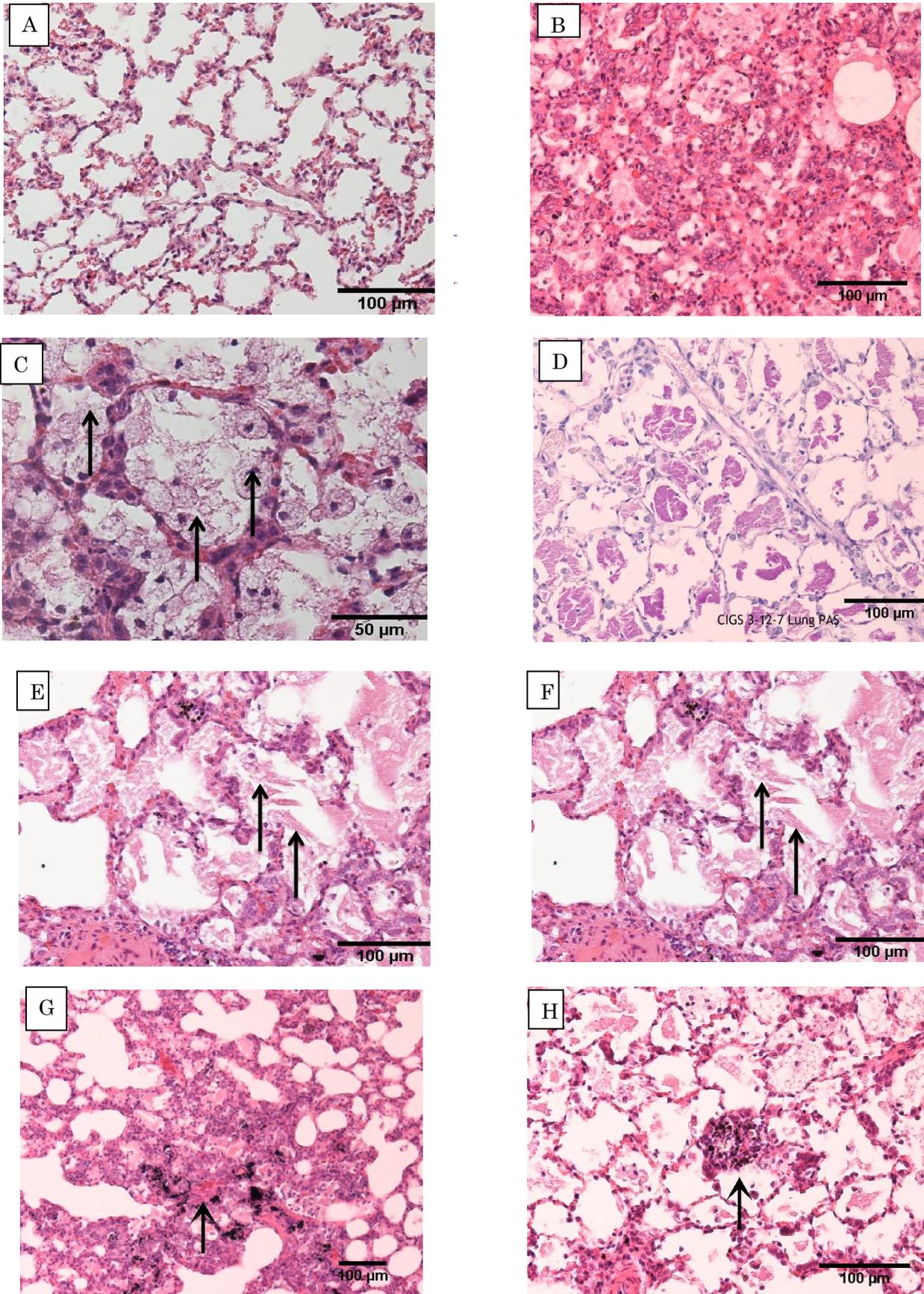


Fig. 8 Photomicrograph of the lung. (A) Lung of a rat in the control group at 12 wk. H & E stain. (B) Inflammation with diffuse bronchiolo-alveolar cell hyperplasia in the CIGS 3 mg group at 12 wk. H & E stain. (C) Necrotic cell debris in the alveolar spaces in the CIGS 10 mg group at 12 wk. H & E stain. (D) PAS positive mucinous exudation in the CIGS 3 mg group at 12 wk. PAS stain. (E) Cholesterol clefts in the in the alveolar spaces in the CIGS 30 mg group at 12 wk. H & E stain. (F) Expansion of alveolar spaces in the CIGS 10 mg group at 12 wk. H & E stain. (G) Interstitial fibrotic proliferation and CIGS particles deposition in the CIGS 30 mg group at 12 wk. H & E stain. (H) Granuloma formation in the CIGS 3 mg group at 12 wk. H & E stain. Table 1 Pathological changes in the rat lung after intratracheal instillation of CIGS.

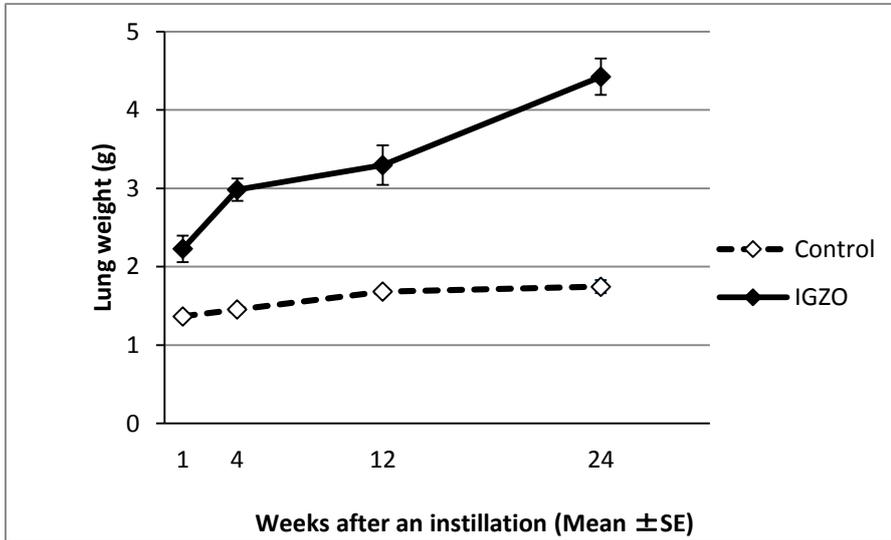


Fig.9 Change of lung weight after an intratracheal instillation of IGZO

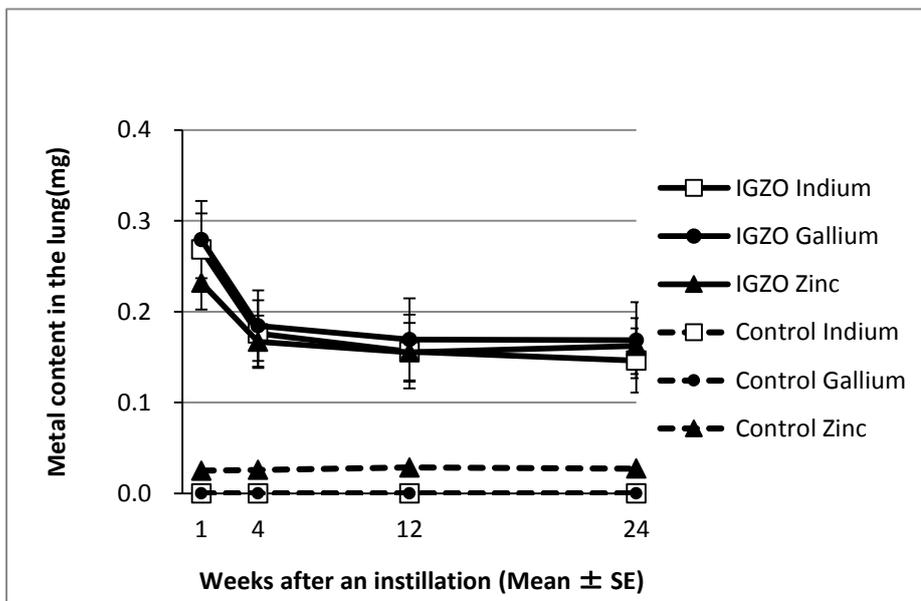


Fig.10 Change of metal content in the lung after an intratracheal instillation of IGZO.

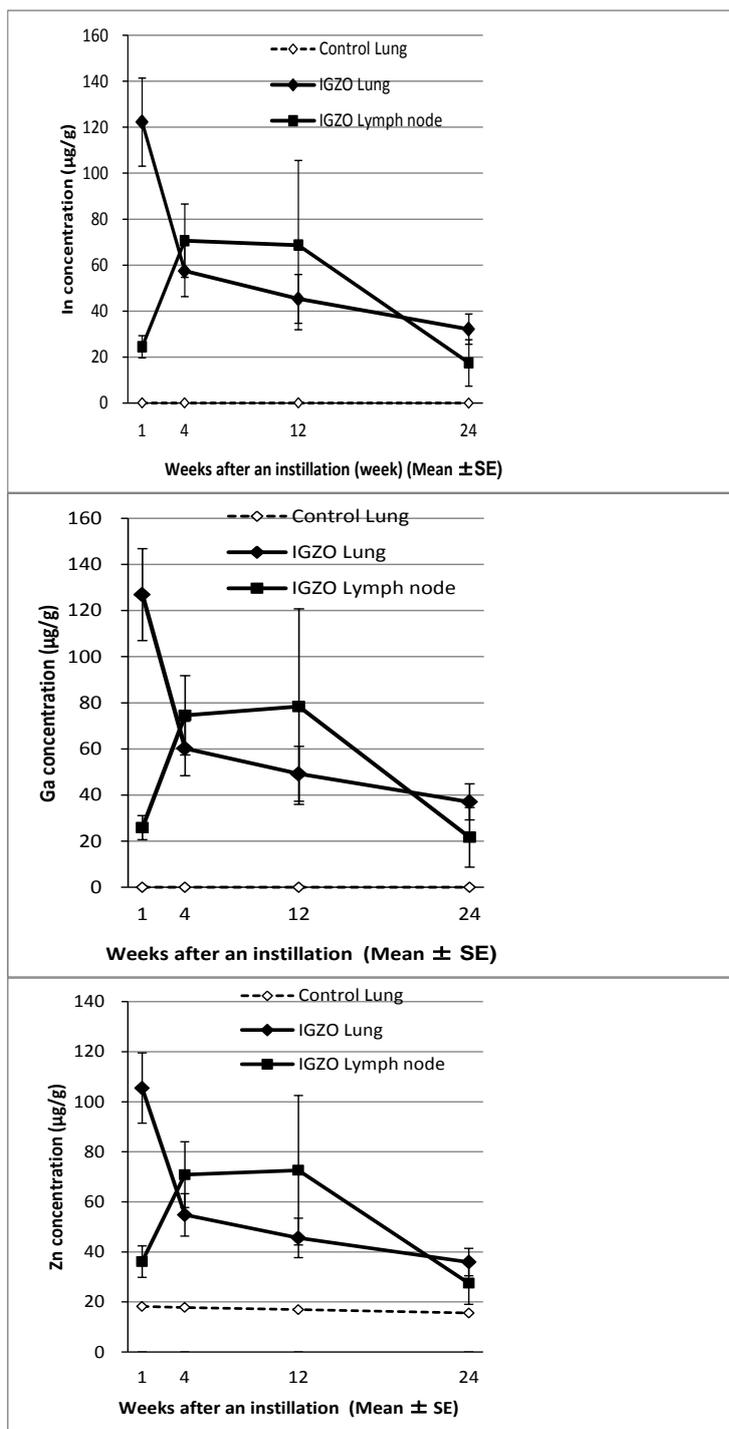


Fig.11 Metal concentration of In, Ga and Zn in the lung and the lymph node from an instillation.

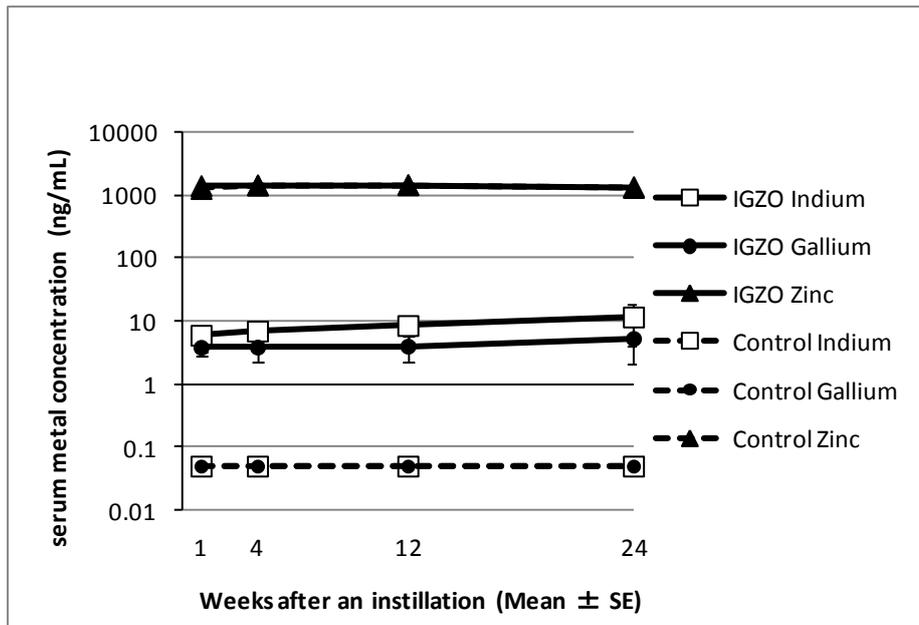


Fig.12 Change of serum metal concentration after an intratracheal instillation of IGZO.

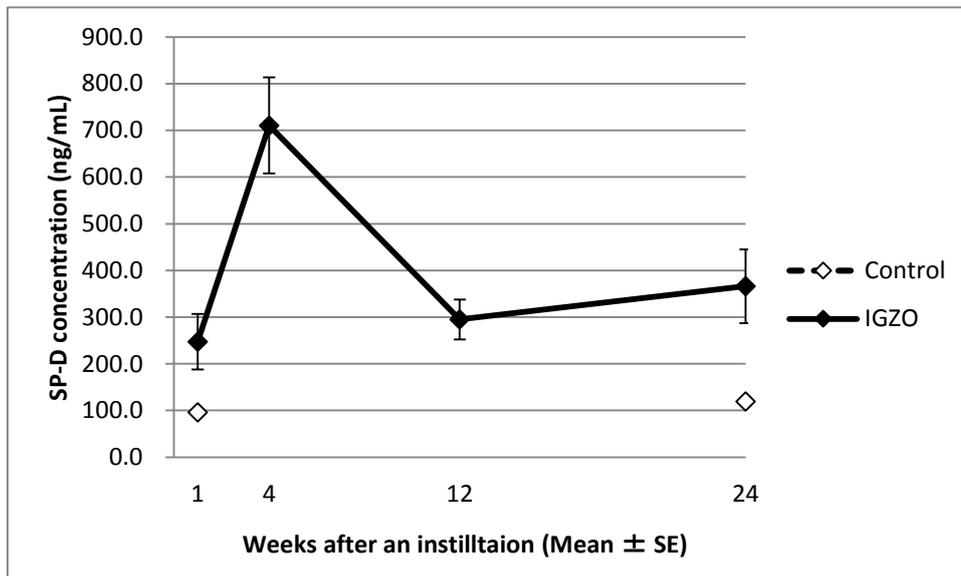


Fig.13 Change of SP-D in serum after an intratracheal instillation of IGZO.

Table 1 Pathological changes in the rat lung after repeated intratracheal instillations of CIGS.

Pathological Changes	Group	Weeks after final instillation (W)			
		0	1	4	12
Inflammatory response with diffuse hyperplasia of bronchiolo-alveolar epithelium	CIGS 3 mg	+	+	2+	+
	CIGS 10 mg	2+	2+	3+	2+
	CIGS 30 mg	3+	3+	3+	2+
Exudation with necrotic debris	CIGS 3 mg	+	+	2+	2+
	CIGS 10 mg	2+	2+	3+	3+
	CIGS 30 mg	3+	2+	3+	3+
PAS positive mucinous exudation	CIGS 3 mg	—	—	+	+
	CIGS 10 mg	—	—	2+	3+
	CIGS 30 mg	—	—	3+	3+
Cholesterol clefts	CIGS 3 mg	—	—	—	—
	CIGS 10 mg	—	—	—	+
	CIGS 30 mg	—	—	+	+
Expansion of alveolar spaces	CIGS 3 mg	—	—	+	±
	CIGS 10 mg	—	—	±	+
	CIGS 30 mg	—	±	+	+
Interstitial fibrotic proliferation	CIGS 3 mg	—	±	±	±
	CIGS 10 mg	+	±	+	+
	CIGS 30 mg	+	+	2+	+
Granuloma	CIGS 3 mg	+	±	±	+
	CIGS 10 mg	+	+	±	±
	CIGS 30 mg	+	+	±	±

- : none, ±:slight, +: mild, 2+:moderate, 3+:severe

Table 2 Pathological changes in the rat lung after an intratracheal instillation of IGZO

Pathological Changes	Group	Weeks after an instillation (W)			
		1	4	12	24
Inflammatory response with diffuse hyperplasia of bronchiolo-alveolar epithelium	IGZO	+	+	+	+
	Control	-	-	±	±
Accumulation of macrophage	IGZO	+	+	2+	2+
	Control	-	-	-	-
Exudation	IGZO	±	2+	2+	3+
	Control	-	-	-	-
Cholesterol clefts	IGZO	-	-	±	±
	Control	-	-	-	-
Granuloma	IGZO	-	+	±	-
	Control	-	-	-	-
Expansion of alveolar spaces	IGZO	-	±	±	±
	Control	-	-	-	-
Interstitial fibrotic proliferation	IGZO	+	2+	2+	+
	Control	+	+	+	±
Bronchiolo-alveolar cell hyperplasia	IGZO	-	±	±	+
	Control	-	-	-	-

- : none, ±:slight, +: mild, 2+:moderate, 3+:severe

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
特になし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakano M, Tanaka A, Hirata M, Iwasawa S	Pulmonary effects in workers exposed to indium metal: a cross-sectional study	J Occup Health	57	346-352	2015
田中昭代、平田美由紀、中野真規子	インジウムの健康影響	アレルギー・免疫	22	925-932	2015
Amano T, Sarinont T, Koga K, Hirata M, Tanaka A, Shiratani M	Synthesis of indium-containing nanoparticles in aqueous suspension using plasmas in water for evaluating their kinetics in living body	J Nanosci Nanotechnol	15	9298-9302	2015
Amano T, Koga K, Sarinont T, Seo H, Itagaki N, Shiratani M, Kitazaki S, Hirata M, Nakatsu Y, Tanaka A	Synthesis of indium-containing nanoparticles using plasmas in water to study their effects on living body	Proc. 68th GEC/9th ICRP/33rd SPP	60	LW1.158	2015
Amano T, Sarinont T, Koga K, Hirata M, Tanaka A Shiratani M	Production of In, Au, and Pt nanoparticles by discharge plasmas in water for assessment of their bio-compatibility and toxicity	MRS Advances	-	6pages	2016

Kubokura N, Takahashi-Yanaga F, Arioka M, Yoshihara T, Igawa K, Tomooka K, Morimoto S, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Nakabeppu Y, Matsumoto T, Kitazono T, Sasaguri T	Differentiation-inducing factor-3 inhibits intestinal tumor growth in vitro and in vivo	J. Pharmacol. Sci	127	446-455	2015
---	--	-------------------------	-----	---------	------

## Pulmonary effects in workers exposed to indium metal: A cross-sectional study

Makiko NAKANO<sup>1</sup>, Akiyo TANAKA<sup>2</sup>, Miyuki HIRATA<sup>2</sup>, Satoko IWASAWA<sup>1</sup> and Kazuyuki OMAE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Preventive Medicine and Public Health, Keio University School of Medicine, Japan and <sup>2</sup>Environmental Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Japan

**Abstract: Pulmonary effects in workers exposed to indium metal: A cross-sectional study: Makiko NAKANO, et al. Department of Preventive Medicine and Public Health, Keio University School of Medicine—Objectives:** Indium was added to the list of substances regulated by the Ordinance on Prevention of Hazards due to Specified Chemical Substances (OPHSCS) in 2013. Indium metal (IM), however, is not regulated by the OPHSCS due to insufficient information on pulmonary effects following exposure. **Methods:** From 2011 to 2013, a cross-sectional study was conducted on 141 IM-exposed workers at 11 factories. Subjective symptoms were assessed, including levels of serum biomarkers, spirometry readings and total and diffuse lung capacity. Krebs von den Lungen-6 (KL-6) and surfactant protein D (SP-D) were selected as biomarkers of interstitial pneumonia. Indium serum concentration (In-S) and personal air sampling data were used to estimate exposure. Subjects were categorized into 5 groups based on occupation and type of exposure: smelting, soldering, dental technician, bonding and other. **Results:** The highest level of In-S was 25.4  $\mu\text{g/l}$ , and the mean In-S level was significantly higher in the smelting group than in other groups. In the smelting group, the prevalence of increased In-S levels was 9.1%, while that of abnormal KL-6 was 15.2%. A significant dose-effect relationship was observed between the In-S and KL-6 levels. No marked differences were observed between any of the groups in SP-D values, pulmonary symptoms, or pulmonary func-

tion test results. A total of 31% of the subjects worked in an environment with IM levels exceeding 0.3  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , which requires a protective mask to be worn. **Conclusions:** For workers exposed to IM, work environments should be monitored, appropriate protective masks should be worn, and medical monitoring should be conducted according to the OPHSCS. (J Occup Health 2015; 57: 346–352)

**Key words:** Cross-sectional study, Indium metal, Indium concentration, Interstitial pneumonia, Krebs von den Lungen-6 (KL-6), Surfactant protein D (SP-D)

Indium lung disease is a newly described occupational lung disease that affects workers exposed to indium compounds, such as indium tin oxide (ITO), which is used to manufacture electrodes to produce flat-panel displays, and indium oxide, indium hydroxide, and indium chloride, which are involved in the production or reclamation of ITO. The Japanese Society of Occupational Health recommended an exposure limit for indium and indium compounds of 3.0  $\mu\text{g}/\text{l}^{(1)}$  based on monitoring of the dose-effect relationship between the level of serum indium (In-S; exposure index) and the serum biomarker of interstitial pneumonia (Krebs von den Lungen, KL-6) associated with adverse pulmonary effects<sup>2–4)</sup> in 2007. An inhalation experiment conducted in rats over 2 years identified ITO with an indium concentration of 0.01  $\text{mg}/\text{m}^3$  as a lung carcinogen<sup>5)</sup>. Based on these findings, the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare established prevention guidelines for workers exposed to ITO and other indium compounds in 2010<sup>6)</sup>. In addition, indium compounds were added to the list of substances regulated by the Ordinance on Prevention of Hazards due to Specified Chemical Substances (OPHSCS) in 2013<sup>7–8)</sup>. Under the OPHSCS, employers at indium-processing factories are required to measure indium concentrations in the respirable dust fraction at their sites and to

Received Nov 21, 2014; Accepted Mar 14, 2015

Published online in J-STAGE May 8, 2015

Correspondence to: M. Nakano, Department of Preventive Medicine and Public Health School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan (e-mail: nakano.makiko@keio.jp)

Abbreviations: IM, indium metal. In-S, serum indium concentration. ITO, indium-tin oxide. In-A, 8-hour time-weighted average personal indium concentration in respirable dust fractions. KL-6, Krebs von den Lungen-6. SP-D, surfactant protein D. OPHSCS, Ordinance on Prevention of Hazards due to Specified Chemical Substances.

conduct health checks twice a year. These health checks consisted of a review of job career and working conditions; a review of past medical history, including pulmonary symptoms of coughing, sputum, dyspnea, cyanosis and clubbed fingers; evaluation of current pulmonary symptoms, including coughing, sputum, dyspnea, cyanosis, and clubbed fingers; and measurement of In-S and KL-6 values of workers. In addition, X-Ray or computed tomography of the chest was conducted at the start and end of employment. However, due to insufficient information on the pulmonary effects of indium metal (IM) exposure, IM and indium alloys are not listed in the OPHSCS. To our knowledge, no studies have been conducted in IM-processing factories.

Here, we determined whether or not IM exposure induces adverse pulmonary effects similar to the effects of non-IM indium compounds. We measured In-S and pulmonary effects of IM exposure and evaluated the relationship between IM exposure and markers of pulmonary effects at IM-processing factories.

## Methods

This study was approved by the Ethics Committee of the School of Medicine at Keio University (approval number 20110268). Written informed consent was obtained from all subjects.

### Study design and subjects

This multicenter study was conducted at 11 IM-processing factories, including 2 dental technician shops, 1 electric contact plant, 1 indium alloy target manufacturing plant, 3 lead-free solder manufacturing plants using an alloy containing less than 10% indium, 3 dental manufacturing plants using an alloy containing less than 25% indium, and 1 indium-free target plate bonding plant using 100% indium as an adhesive material. This study was conducted from 2011 to 2013. There were 142 subjects, and the proportions of subjects enrolled were dependent on the size of each factory and ranged from 2 to 41. One of the subjects was excluded from the statistical analysis due to a history of exposure to non-IM indium compounds.

Study subjects were categorized into five groups, as follows: high-temperature ( $\geq 1,000^{\circ}\text{C}$ ) alloy smelting workers (smelting workers), soldering workers, dental technicians, bonding workers and other workers.

All subjects underwent a health check, which consisted of a medical interview, questionnaire, blood test, spirometry examination and evaluation of total lung capacity (TLC) and diffuse lung capacity for carbon monoxide (DLCO). To investigate the relationship between the levels of In-S and serum biomarkers of interstitial pneumonia (KL-6 or surfactant protein

D [SP-D]), subjects were divided into currently and formerly exposed workers according to their exposure status. Job history was based on records at the plants or, if unavailable, on findings from the interview regarding occupational history.

### Exposure indices

In-S ( $\mu\text{g/l}$ ) was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) at the Center of Advanced Instrumental Analysis, Kyushu University<sup>3,6)</sup> or the Japan Industrial Safety and Health Association<sup>6)</sup>. In-S below the detection limit ( $0.1 \mu\text{g/l}$ ) was ascribed an arbitrary value of  $0.05 \mu\text{g/l}$  for statistical analysis.

### Effect indices and confounding factors

KL-6 (EIDIA Co., Ltd., Tokyo, Japan)<sup>9,10)</sup> and SP-D (Yamasa Corporation, Tokyo, Japan)<sup>11)</sup> were used as biomarkers for assessing interstitial changes in the lungs and were evaluated at a major commercial clinical laboratory (Special Reference Laboratory, Tokyo, Japan). SP-D levels were not measured in 26 subjects due to logistics.

Spirometry was performed using an electronic spirometer (HI-801; Chest MI, Tokyo, Japan) based on the standards of the Japanese Respiratory Society<sup>12)</sup>. TLC was determined by helium dilution lung volume tests, and DLCO was determined by single breath diffusing capacity tests performed using a portable compact machine (EasyOne Pro<sup>®</sup>, ndd Medical Technologies, Zurich, Switzerland) based on the standards of the American Thoracic Society/European Respiratory Society<sup>13)</sup>. TLC and DLCO were not measured in 12 workers due to rib fractures ( $n=1$ ) or lack of measurement at the factory due to logistics ( $n=11$ ). Spirometry was not evaluated in 5 workers due to rib fracture ( $n=1$ ) or lack of measurement at the factory due to logistics ( $n=4$ ). Age- and height-adjusted predicted values of vital capacity (VC), forced vital capacity (FVC), and forced expiratory volume in one second ( $\text{FEV}_{1,0}$ ) were determined by sex, using the regression formula recommended by the Japanese Respiratory Society<sup>14)</sup>. TLC was determined by sex, using reference values generated from the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)<sup>15)</sup>. DLCO and DLCO/VA were determined by sex, using the regression formula of Nishida for Japanese subjects<sup>16)</sup>. Predictions were calculated for VC, FVC,  $\text{FEV}_{1,0}$ , TLC, DLCO and DLCO/VA.

Respiratory symptoms, smoking history and confounding factors of sex, age, medical history and history of exposure to indium metal and other materials were investigated using the Japanese version<sup>17)</sup> of the American Thoracic Society Division of Lung Disease questionnaire<sup>18)</sup> and supplementary questions.

### Personal indium exposure concentration in respirable dust fraction

Eight-hour time-weighted average personal indium concentrations in respirable dust fractions (In-A) were measured in 35 study subjects using respirable dust samplers (GS-3 Respirable Dust Cyclone; SKC Inc., Eighty Four, PA, USA) and ICP-MS (Agilent 7500i; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) by the Japan Industrial Safety and Health Association according to guidelines<sup>6)</sup> at approximately the same time as the health checks. An In-A level below the detection limit ( $0.006 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) was ascribed an arbitrary value of  $0.006 \mu\text{g}/\text{m}^3$  for statistical analysis.

### Statistical analysis

Non-normally distributed data for KL-6 and SP-D were log-transformed to an approximately normal distribution before analysis. In-S and values of lung function were not log-transformed before analysis. Differences between occupational groups were assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) for KL-6, SP-D, and values of lung function or the Kruskal-Wallis test (non-normal distribution) for age, exposure duration, time since last exposure and In-S. The Chi-square test was used to compare the proportion and prevalence of sex, smoking habits, exposure status, pulmonary symptoms, increased In-S levels and abnormal KL-6 and SP-D levels. A single regression model was used to evaluate the dose-effect relationship between In-S and KL-6 or SP-D levels by exposure status and between In-A and KL-6 or S-D levels.

Based on the adopted reference value of In-S<sup>4)</sup>, subjects were classified as either In-S <  $3.0 \mu\text{g}/\text{l}$  or

$\geq 3.0 \mu\text{g}/\text{l}$ . In-S  $\geq 3.0 \mu\text{g}/\text{l}$  was used to assess the risk of indium exposure on the effect variables. The prevalence of abnormalities for biomarkers and lung function was analyzed using the following cutoffs for abnormal values: KL-6  $\geq 500 \text{ U}/\text{ml}$ , SP-D  $\geq 110 \text{ ng}/\text{ml}$ ,  $\text{FEV}_{1.0}/\text{FVC} < 70\%$ ,  $\% \text{VC} < 80\%$ ,  $\% \text{FVC} < 80\%$ ,  $\% \text{FEV}_{1.0} < 80\%$ ,  $\% \text{TLC} < 80\%$ ,  $\% \text{DLCO} < 70\%$  and  $\% \text{DLCO}/\text{VA} < 70\%$ .

The reference value of In-A was set as  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  based on the target indium concentration in respirable dust for immediately improved workplace environments or as  $\geq 0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$  based on the acceptable exposure limits calculated according to the exposure concentration found to be potentially carcinogenic in rats, as established in the technical guidelines of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare<sup>6)</sup>.

Statistical significance was assessed by two-tailed analysis, with  $p < 0.05$ . All statistical analyses were performed using SPSS version 19 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

### Results

Tables 1 and 2 show the characteristics of study subjects and the pulmonary effects for each group. The mean age of the subjects was 40.9 years, and 88.7% were male. The mean duration from the start to end of indium exposure for all workers was 7.5 years. For currently exposed workers, the duration of indium exposure was calculated from the start to the time of the health check. The proportion of formerly exposed workers who were no longer experiencing indium exposure at the time of the health check was 24.2% in the smelting group, 31.3% in the bond-

**Table 1.** Study subjects by occupational group

Occupational group	Smelting (n=33)	Soldering (n=37)	Dental technician (n=5)	Bonding (n=16)	Other (n=50)	<i>P</i>
Age (yr), mean (SD)	39.5 (14.5)	38.7 (11.3)	41.6 (15.7)	39.5 (13.1)	43.9 (11.5)	0.334
Male, n (%)	33 (100.0)	29 (78.4)	2 (40.0)	16 (100.0)	45 (90.0)	<0.001
Exposure duration (yr), mean (range)	7.9 (0.08–33.2)	10.2 (0.83–34.8)	16.1 (0.75–32.7)	5.4 (0.25–17.8)	4.9 (0.33–36.2)	0.001
Time since last exposure (yr), mean (range)	6.6 (0.83–29.6)	—	—	9.7 (4.67–22.7)	6.4 (1.17–12.6)	0.122
In-S ( $\mu\text{g}/\text{l}$ ), mean (range)	2.2 (0.1>–25.4)	0.1 (0.1>–0.4)	0.1 (0.1>–0.5)	0.1 (0.1>–0.5)	0.1 (0.1>–0.9)	<0.001
Smoking habit, n (%)						0.438
Nonsmokers	10 (30.3)	16 (43.2)	2 (40.0)	3 (18.8)	15 (30.0)	
Ex-smokers	10 (30.3)	6 (16.2)	2 (40.0)	8 (50.0)	15 (30.0)	
Current smokers	13 (39.4)	15 (40.5)	1 (20.0)	5 (31.3)	20 (40.0)	
Exposure status, n (%)						<0.001
Currently exposed	25 (75.8)	37 (100.0)	5 (100.0)	11 (68.8)	30 (60.0)	
Formerly exposed	8 (24.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (31.3)	20 (40.0)	

Prev, prevalence; SD, standard deviation; In-S, serum indium; yr, year; exposure duration, duration from start to end of indium exposure or to time of health check. *p*-value by one-way analysis of variance, Kruskal-Wallis test, or chi-square test among all groups.

**Table 2.** Effective markers by occupational group

Occupational group	Smelting (n=33)	Soldering (n=37)	Dental technician (n=5)	Bonding (n=16)	Other (n=50)	<i>P</i>
In-S $\geq 3.0 \mu\text{g/l}$ , n (%)	3/33 (9.1)	0/37 (0.0)	0/5 (0.0)	0/16 (0.0)	0/50 (0.0)	0.040
Cough or sputum, n (%)	2/33 (6.1)	3/37 (8.1)	0/5 (0.0)	0/15 (0.0)	3/50 (6.0)	0.805
<b>Biomarkers</b>						
KL-6 (U/ml), GM (GSD)	322.0 (1.7)	216.5 (1.3)	181.0 (1.2)	237.6 (1.4)	261.8 (1.4)	<0.001
KL-6 $\geq 500$ U/ml, n (%)	5/33 (15.2)	0/37 (0.0)	0/5 (0.0)	0/16 (0.0)	2/50 (4.0)	0.034
SP-D (ng/ml), GM (GSD)	55.7 (2.2)	38.1 (1.8)	28.4 (1.5)	43.0 (2.0)	41.5 (1.7)	0.105
SP-D $\geq 110$ ng/ml, n (%)	7/33 (21.2)	0/14 (0.0)	0/5 (0.0)	1/15 (6.7)	3/48 (6.3)	0.094
<b>Lung function, mean (SD)</b>						
%VC	104.8 (12.5)	109.7 (11.3)	105.8 (13.0)	111.1 (12.7)	105.1 (12.2)	0.224
%FVC	101.8 (11.5)	108.3 (11.8)	103.4 (12.0)	107.9 (9.9)	103.0 (11.9)	0.112
%FEV <sub>1.0</sub>	97.0 (12.8)	103.0 (12.6)	99.5 (19.0)	103.0 (10.4)	99.7 (11.6)	0.314
FEV <sub>1.0</sub> /FVC	82.7 (5.8)	82.4 (5.4)	82.4 (11.3)	82.8 (4.6)	83.5 (7.0)	0.951
%TLC	94.8 (8.8)	94.2 (8.6)	94.3 (7.9)	98.6 (9.7)	94.2 (10.1)	0.743
%DLCO	96.9 (13.4)	89.9 (12.8)	95.8 (11.6)	94.9 (11.4)	91.5 (15.2)	0.260
%DLCO/VA	93.6 (9.5)	87.0 (14.1)	91.2 (13.5)	87.3 (12.0)	90.6 (14.2)	0.294

Prev, prevalence; SD, standard deviation; KL-6, Krebs von den Lungen-6; SP-D, surfactant protein D; VC, vital capacity; FVC, forced vital capacity; FEV<sub>1.0</sub>, forced expiratory volume in one second; TLC, total lung capacity; DLCO, diffusing lung capacity for carbon monoxide; VA, alveolar volume. *p*-value by one-way analysis of variance, Kruskal-Wallis test, or chi-square test among all groups. %VC, %FVC, %FEV<sub>1.0</sub> and FEV<sub>1.0</sub>/FVC measured in the smelting (n=32), soldering (n=37), dental technician (n=5), bonding (n=14) and other groups (n=48) (total, n=136). %TLC, %DLCO and %DLCO/VA measured in the smelting (n=32), soldering (n=37), dental technician (n=5), bonding (n=10) and other groups (n=45) (total, n=129).

ing group, 40.0% in the “other” group and 0% in the remaining two groups. No marked differences in smoking history or age were observed among groups. The highest level of In-S in the smelting group was 25.4  $\mu\text{g/l}$ , and the highest level of In-S among all other groups, excluding the smelting group, was less than 1.0  $\mu\text{g/l}$ , with In-S levels below the detection limit being found in 82% of workers (89/108). The In-S level in the smelting group was significantly higher than that in all other groups ( $p < 0.001$ ). The KL-6 level in the smelting group was also significantly higher than that in the other groups ( $p < 0.001$ ). However, no marked differences were observed in the SP-D level, pulmonary symptoms or pulmonary function test results among all groups.

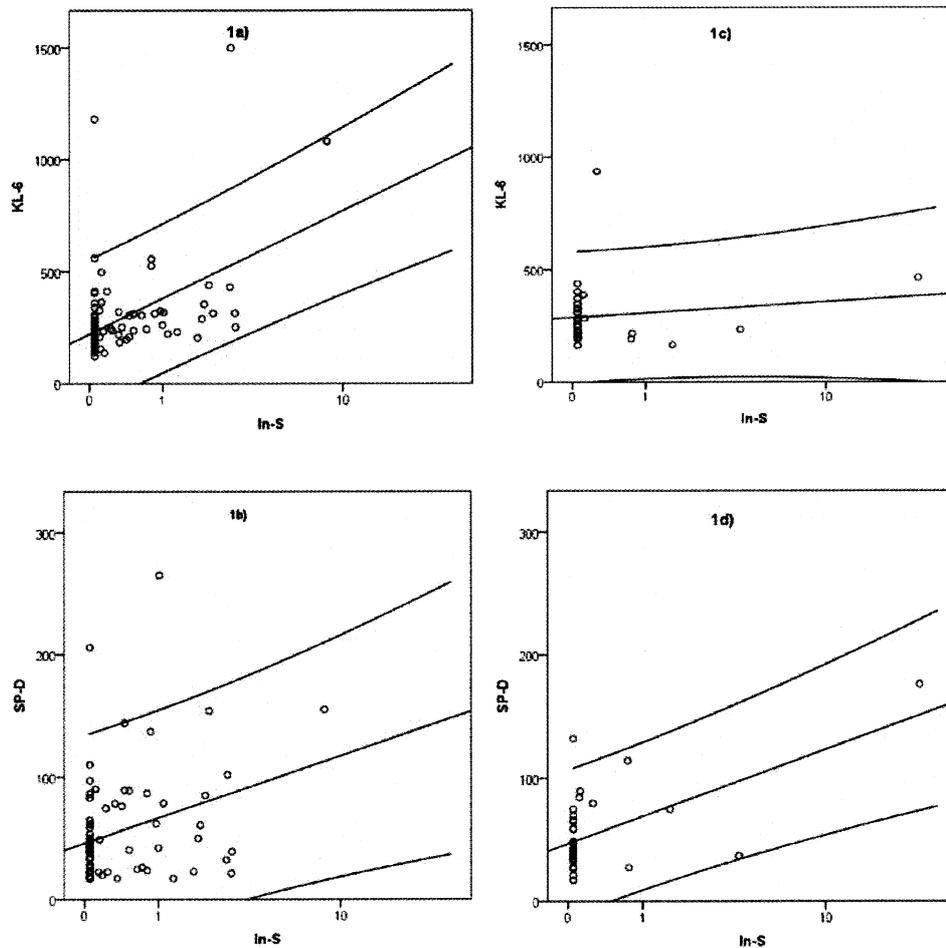
For each group, the respective proportions of subjects with abnormal levels of In-S, KL-6 and SP-D stratified by occupation type were as follows: 9.1, 15.2 and 21.2% (smelting); 0.0, 0.0, and 0.0% (soldering); 0.0, 0.0, and 0.0% (dental technicians); 0.0, 0.0, and 6.7% (bonding); and 0.0, 4.0, and 6.3% (other). The proportion of increased In-S and abnormal KL-6 levels were significantly higher in the smelting group than in the other groups ( $p = 0.040$  and  $p = 0.034$ , respectively).

Figure 1 shows a scattergram comparing the levels of In-S and KL-6 or SP-D by exposure status (currently and formerly exposed workers). In currently exposed workers, significant increases in KL-6 levels were

observed with increasing In-S levels ( $p < 0.001$ ). Dose-effect relationships between In-S and SP-D levels in currently and formerly exposed workers ( $p = 0.018$  and 0.014, respectively) were also observed. However, in formerly exposed workers, no significant dose-effect relationship between In-S and KL-6 levels was observed ( $p = 0.192$ ).

The Mean In-A level (n=35) was 15.93  $\mu\text{g/m}^3$ , with values ranging from <0.006 (undetectable) to 510.28  $\mu\text{g/m}^3$  and differing significantly between groups ( $p = 0.006$ ). In-A in the smelting group (mean, 68.36  $\mu\text{g/m}^3$ ; standard deviation, 178.75  $\mu\text{g/m}^3$ ; range, 0.12–510.28  $\mu\text{g/m}^3$ ) represented the highest level of exposure to respirable indium dust among groups. The proportions of workers with In-A levels exceeding 10  $\mu\text{g/m}^3$  (target indium concentration criteria requiring immediate improvement of work environments) in each group were as follows: 25% (smelting), 0% (soldering), 0% (dental technicians), 0% (bonding) and 0% (other). The proportions of workers with In-A levels exceeding 0.3  $\mu\text{g/m}^3$  (acceptable exposure concentration limit not requiring an appropriate mask) in each group were as follows: 63% (smelting), 14% (soldering), 20% (dental technicians), 17% (bonding), and 33% (other).

Figure 2 shows a scattergram comparing In-A and KL-6 or SP-D levels by occupation groups in currently exposed workers. Although increasing In-A levels were associated with increasing KL-6 and SP-D



**Fig. 1.** Dose-effect relationships between In-S and biomarkers by exposure status  
 1a) and 1b) Scattergrams between In-S and KL-6 or SP-D in currently exposed workers. 1c) and 1d) Scattergrams between In-S and KL-6 or SP-D in formerly exposed workers. Cut-off values: KL-6, 500 U/ml, and SP-D, 110 U/ml. A single regression model was used to evaluate the dose-effect relationship between In-S and KL-6 or SP-D levels.

levels, the relationships between these parameters were not significant ( $p=0.687$  and  $p=0.657$ , respectively).

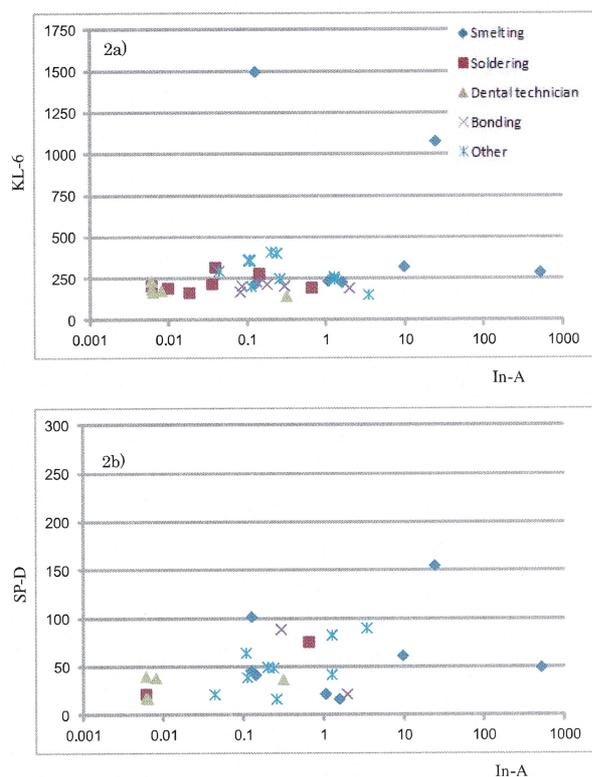
### Discussion

In currently exposed workers, a dose-effect relationship between the levels of In-S and KL-6 was observed. In particular, in the smelting group, the level of In-S increased to over  $20 \mu\text{g/l}$ , which is a risk factor for interstitial pneumonia and progression of emphysematous changes<sup>2-4, 19</sup>. Workers in the smelting group were involved in constructing indium alloys with palladium, gold, silver and other metals. Although the melting point of indium is  $157^\circ\text{C}$ , the dissolution temperature in the melting process is dependent on the other mixed metals in the alloy and exceeds  $1,000^\circ\text{C}$ . Although exposure to indium metal at room temperature is generally not harmful

to workers, indium melts at  $157^\circ\text{C}$ , and indium vapor is generated at higher temperature<sup>20</sup>. The vapor is cooled down in air and ultimately becomes airborne respirable particles. These respirable particles might contribute to increases in In-A and In-S levels.

In the smelting group, 25% of workers required immediate improvement to their work environment according to prevention guidelines<sup>6</sup>. In addition, regardless of occupational group, approximately 31% of workers exposed to IM exceeding  $0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$  were required to wear a protective mask according to prevention guidelines<sup>6</sup>. Based on these results, for workers exposed to IM, periodical monitoring of the work environment including monitoring of whether or not they wear an appropriate protective mask and medical monitoring is required.

In this study, IM-exposed workers who were work-



**Fig. 2.** Dose-effect relationships between In-A and biomarkers by occupational group  
 2a) Scattergram between In-A and KL-6 levels in currently exposed workers. 2b) Scattergram between In-A and SP-D levels in currently exposed workers. Target concentration for indium according to prevention guidelines:  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Acceptable exposure limit for concentration of indium according to prevention guidelines:  $0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . A single regression model was used to evaluate the dose-effect relationship between In-A and KL-6 or S-D levels.

ing without improvement of the workplace environment or use of a protective mask were investigated. The level of exposure to respirable indium dust might be directly reflected in the amount of dust inhaled in the lungs. Although an increase in In-A levels resulted in an increase in KL-6 and SP-D levels, this change was not significant. The In-A levels were considered to be low, with only a small proportion of subjects having levels in excess of  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . A metric of cumulative exposure might have a preference for In-S levels over In-A levels.

Although hamsters exposed to indium oxide<sup>21)</sup> and workers formerly exposed to indium compounds have been found to have elevated In-S levels for a prolonged period of time<sup>4, 19)</sup>, the dose-effect relationship between In-S and KL-6 levels was not significant in the formerly exposed workers in the present

study. Clearance of the indium burden on the lungs may be more rapid following the inhalation of mist containing indium oxide<sup>22)</sup> than that of dust containing ITO or indium oxide at room temperature. In addition, the amount of indium inhaled into the lungs by IM-exposed workers in this study might be lower than that by ITO-exposed workers observed in previous studies<sup>4, 19)</sup>.

Full evaluation with high-resolution computed tomography (HRCT) of the chest was not conducted in the present study. However, one IM-exposed worker with high In-S levels ( $\geq 20 \mu\text{g}/\text{l}$ ) visited a hospital and underwent chest HRCT, which showed interlobular septal thickening and a mild reticular shadow. IM-exposed workers with high In-S levels might therefore suffer adverse effects that are similar to those of workers with noted exposure to indium compounds at ITO-processing factories<sup>2-4)</sup>.

Due to the cross-sectional nature of our study, a longitudinal observational study is also required. We recommend that future studies monitor the lung conditions of workers following the reduction of occupational exposure to IM.

## Conclusions

We observed a dose-effect relationship between In-S and KL-6 levels in workers currently exposed to IM. The results of this study indicate that workers exposed to IM require monitoring of their work environment, appropriate protective masks and ongoing medical checks according to the OPHSCS to prevent indium lung disease.

*Acknowledgments:* We thank the staff members and participants at all factories for their cooperation. We also thank Dr. Mutsuko Yamada, PhD, for her assistance and communication with nnd Medical Technologies.

*Funding:* This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (Project No.'s 23249033 and 24590758) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (2011-13 and 2012-13), and in part by donations for research in preventive and environmental medicine from one of the surveyed companies.

*Conflicts of interests:* None of the authors have any conflicts of interest to disclose.

## References

- 1) Recommendation of occupational exposure limits (2007–2008). *J Occup Health* 2007; 49: 328–44.
- 2) Chonan T, Taguchi O, Omae K. Interstitial pulmonary disorders in indium-processing workers. *Eur*

- Respir J 2007; 29: 317–24.
- 3) Hamaguchi T, Omae K, Takebayashi T, et al. Exposure to hardly soluble indium compounds in ITO production and recycling plants is a new risk for interstitial lung damage. *Occup Environ Med* 2008; 65: 51–5.
  - 4) Nakano M, Omae K, Tanaka A, et al. Causal relationship between indium compound inhalation and effects on the lungs. *J Occup Health* 2009; 51: 513–21.
  - 5) Nagano K, Nishizawa T, Umeda Y, et al. Inhalation carcinogenicity and chronic toxicity of indium-tin oxide in rats and mice. *J Occup Health* 2011; 53: 175–87.
  - 6) Ministry of Health, Labor, and Welfare. Technical guideline for preventing health impairment of workers engaged in the indium tin oxide handling processes. Tokyo, Japan: Government of Japan. [Online]. 2010 [cited 2014 Nov 17]; Available from: URL: <http://www.mhlw.go.jp/bunya/roudoukijun/anzeneisei42/dl/03.pdf>
  - 7) Sakurai H. Occupational safety and health in Japan: current situations and the future. *Ind Health* 2012; 50: 253–60.
  - 8) Ministry of Health, Labor, and Welfare. Amendment to Ordinance on Industrial Safety and Health Law and to Ordinance on Prevention of Hazards due to Specified Chemical Substances. Tokyo: Government of Japan. [Online]. 2013 [cited 2014 Nov 17]; Available from: URL: <http://www.mhlw.go.jp/bunya/roudoukijun/anzeneisei48/dl/anzeneisei48-01.pdf> (in Japanese)
  - 9) Kobayashi J, Kitamura S. KL-6: a serum marker for interstitial pneumonia. *Chest* 1995; 108: 311–5.
  - 10) Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, et al. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 378–81.
  - 11) Honda Y, Kuroki Y, Matsuura E, et al. Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(6 Pt 1): 1860–6.
  - 12) The Japanese Respiratory Society. Guidelines for pulmonary function testing. Tokyo, Japan: Medical Review; 2004 (in Japanese).
  - 13) Macintyre N, Crapo RO, Viegi G, et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung. *Eur Respir J*. 2005; 26: 720–35.
  - 14) The Clinical Pulmonary Functions Committee. Standard criteria of spirometry and arterial blood gas partial pressure measurement in Japanese. *J Jap Respir Soc* 2001; 39: 383–99.
  - 15) Department of Health and Human Services (DHHS). 1996. National Center for Health Statistics. Third National Health and Nutrition Examination survey, 1988–1994, NHANES III Adult and Examination Data Files (CD-ROM). Public Use Data File Documentation Number 76200. Hyattsville (MD): Centers for Disease Control and Prevention.
  - 16) Nishida O. A clinical study of the carbon monoxide diffusing capacity. The 3rd reports. *Medical Journal of Hiroshima University* 1970; 18: 223–33 (in Japanese).
  - 17) Japan Public Health Association. Research on Method Of Measuring Influence On Health Due To Air Pollution. Tokyo: Japan Public Health Association; 1979 (in Japanese).
  - 18) Ferris BG. Epidemiology Standardization Project (American Thoracic Society). *Am Rev Respir Dis* 1978; 118(6 Pt 2): 1–120.
  - 19) Nakano M, Omae K, Uchida K, et al. Five-year cohort study: emphysematous progression of indium-exposed workers. *Chest* 2014; 146: 1166–75.
  - 20) Iida et al. Steam pressure. *Physical Constants New Edition*; Tokyo: Asakura Publishing Co., Ltd; 1978. p. 133 (in Japanese).
  - 21) Tanaka A, Hirata M, Homma T, et al. Chronic pulmonary toxicity study of indium-tin oxide and indium oxide following intratracheal instillations into the lungs of hamsters. *J Occup Health* 2010; 52: 14–22.
  - 22) Indium Oxide. *Patty's toxicology Fifth Edition*; New York (USA): John Wiley & Sons, Inc; 2001. p. 471–5.

## Ⅱ. 高濃度化学物質曝露に起因する中毒性疾患

### 1. インジウムの健康影響

Tanaka Akiyo

田中 昭代\*<sup>1)</sup>

Nakano Makiko

中野真規子\*\*<sup>1)</sup>

Hirata Miyuki

平田美由紀\*<sup>2)</sup>

Omae Kazuyuki

大前 和幸\*\*<sup>3)</sup>\*九州大学大学院医学研究院環境医学分野 <sup>1)</sup> 講師 <sup>2)</sup> 助教  
\*\*慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室 <sup>1)</sup> 講師 <sup>3)</sup> 教授

#### Summary

2001年にインジウム・スズ酸化物 (Indium-tin oxide : ITO) の微粒子の吸入による間質性肺炎死亡例が世界で初めて我が国で発生し、インジウムによる健康影響が注目される契機となった。動物実験においてインジウム化合物の肺障害性と肺発がん性が認められ、インジウム作業者の一連の疫学研究からインジウム化合物粉じんの吸入によって間質性肺障害が惹起されることが明らかになり、職業病である「インジウム曝露による肺障害 (インジウム肺)」の因果関係が確立した。

#### Key Words

ITO/インジウム/インジウム肺/間質性肺炎/肺気腫

#### はじめに

インジウムは希少金属であり、原子番号 49、分子量 114.82、比重 7.3 (20℃)、融点 156.6℃、沸点 2,072℃、水に不溶の光沢のある銀白色の金属である。亜鉛精錬の副産物として産出される。薄膜化した際の高い導電性と透明性により液晶ディスプレイのほか、低融点合金、ボンディング用途、ヒューズ、歯科用合金、化合物半導体、電池材料、太陽電池など広く用いられ、2013年度のインジウムの国内需要は1990年代後半に比べ

て約10倍に増大し、インジウムの約90%がインジウム・スズ酸化物 (Indium-tin oxide : ITO) として用いられている<sup>1)</sup>。ITOは酸化インジウム ( $\text{In}_2\text{O}_3$ ) 90%、酸化スズ ( $\text{SnO}_2$ ) 10%の組成の焼結体で代表的な透明電極用材料であり、1990年代半ば頃から、液晶テレビ、プラズマテレビ、パソコンのフラットディスプレイ、タッチパネル等に広く用いられている。

インジウムの健康影響は1990年代半ばまで毒性情報が極めて少なかったためにインジウム取り扱い作業者のインジウムの安全性についての配慮

ITO (Indium-tin oxide : インジウム・スズ酸化物)  
 $\text{SnO}_2$  (酸化スズ)

$\text{In}_2\text{O}_3$  (酸化インジウム)

表1 インジウム肺症例報告

	報告者	国	年齢/ 性別	曝露期間 (年)	主な作業内容	KL-6 (U/mL)	血清In濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	その他の情報
1	Homma et al. (2003) <sup>2)</sup>	日本	27M	3	ITO 研磨	—	290	両側気胸 (死亡例)
2	Homma et al. (2005) <sup>6)</sup>	日本	30M	4	ITO 研磨	799	51	
3	田口ら (2006) <sup>7)</sup>	日本	31M	12	ITO 研磨	1,930	40	
4	田口ら (2006) <sup>7)</sup>	日本	39M	12	ITO 研磨	3,570	127	
5	田口ら (2006) <sup>7)</sup>	日本	28M	8	ITO 研磨	1,190	99	気胸
6	中野ら (2007) <sup>8)</sup>	日本	43M	4	In <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , ITO 製造	3,450	64	
7	武内 (2008) <sup>9)</sup>	日本	47M	20	研究開発	—	92	
8	長南ら (2010) <sup>10)</sup>	日本	45M	7	ITO 研磨	476	32.8	気胸
9	Cummings et al. (2010) <sup>11)</sup>	U.S.	49M	1	In リサイクル	—	測定せず	肺胞蛋白症 (死亡例)
10	Cummings et al. (2010) <sup>11)</sup>	U.S.	39M	1	ITO 製造	—	< 5	肺胞蛋白症, 抗 GM-CSF 抗体 (+)
11	Xiao et al. (2010) <sup>12)</sup>	China	29M	2	LSD サンドプラスト	—	152	肺胞蛋白症, Si と混合曝露
12	船島ら (2011) <sup>13)</sup>	日本	45M	5	In <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3,830	71	気腫性変化

— : 測定値なし, GM-CSF : granulocyte macrophage colony-stimulating factor

我が国で公表されたインジウム肺は9例にのぼる。また, 表に示した12例のうち, 2例は死亡例である。

(文献2, 6~13より筆者作成)

は乏しく, インジウムは“安全な金属”として認識されていた。しかし, 2001年に世界で初めてITOの吸入に起因すると考えられる間質性肺炎の死亡例が我が国で発生し<sup>2)</sup>, さらに, 動物実験では肺障害性や肺発がん性が報告され<sup>3)~5)</sup>, インジウムの肺炎惹起性が明らかになってきた。本稿では, インジウム化合物による健康影響についてインジウム作業者の疫学調査と動物実験から得られた知見について述べる。

## I. 症例報告

表1に国内外のインジウム肺の症例報告事例を示している。国内では, 公表されたインジウム肺

は9例<sup>2), 6)~10), 13)</sup>にのぼり, 海外では米国で公表されたのは2例<sup>11)</sup>, 中国では1例<sup>12)</sup>である。症例報告の中で2例は死亡例である。2001年に世界で初めて報告されたインジウム化合物吸入による症例は日本で発生した<sup>2)</sup>。この症例では, 1994年から1997年の約3年間ITOの加工, 研磨に従事していた。肺の生検による病理組織検査では, 間質性肺炎の病像を示し, 肺に微細粒子が多数散在した。SEM-EDX (走査型電子顕微鏡 / エネルギー分散型X線分光法) による分析の結果, 沈着した微粒子からインジウムとスズが検出され, 微粒子はITOと同定された。さらに, 血清インジウム濃度は290 $\mu\text{g/L}$  (健康人では量下限0.1 $\mu\text{g/L}$ 以下<sup>14)</sup>)

SEM-EDX (走査型電子顕微鏡 / エネルギー分散型X線分光法)



例<sup>12)</sup>では肺胞蛋白症を発症している。米国の死亡例では血清インジウム濃度の測定は行われず、米国2例目では、抗GM-CSF(顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)中和抗体陽性、血清インジウム濃度は定量下限以下(報告時の米国の定量下限: 5 μg/L)、肺組織中インジウム濃度は29.3 μg/gであり、インジウム吸入による原発性肺胞蛋白症発症の増悪が示唆される。さらに、中国の症例では大量の結晶質シリカとインジウムの混合曝露である。日本の症例では肺胞蛋白症の合併の報告はなく、インジウム肺と肺胞蛋白症との関連については日本からの報告を注視したい。

## II. 疫学研究

インジウム作業者の健康調査は日本<sup>16)~21)</sup>、米国<sup>22)</sup>、台湾<sup>23)</sup>、韓国<sup>24)</sup>で行われ、いずれの結果もインジウム作業者の血清インジウム濃度の上昇に従い、肺間質性肺炎マーカーであるKL-6またはSurfactant protein D (SP-D)が上昇し、特に血清インジウム濃度とKL-6の間で強い相関を認めた。

インジウムが安全とされ、労働衛生管理が徹底されていない1990年代~2000年代では、防塵マスクを着用していないインジウム作業従事者は高濃度の曝露を受けていた可能性が考えられる。そこで、Nakanoら<sup>19)</sup>は労働衛生管理としてインジウム曝露量軽減の影響として、労働衛生管理の開始前からインジウム作業を行っていた者(開始前群)と、労働衛生管理終了後にインジウム作業を行った者(終了後群)との間で、検査値や有所見率を比較・検討した。その結果、血清インジウム濃度やKL-6、SP-Dが開始前群に比べて終了後群で有意な低下が認められた。KL-6の有所見率も

開始前群の29.6%に対し終了後群では3.8%、SP-Dもそれぞれ20.5%に対し5.7%と有意な低下が認められた。インジウム曝露量を軽減する作業環境改善によって肺障害や有所見率の低下が認められたことから、インジウムと肺障害との因果関係がより強くなった。

一方、当初の研究でインジウム化合物粉じんの吸入により間質性肺障害の発生が有意に観察されたが、Nakanoら<sup>20)</sup>は5年間の追跡研究から、HRCT上での気腫性変化増悪率は非曝露群5.7%(2/35人)に対して、インジウム曝露群では11.6%(20/172人)であり、気腫性変化増悪率は初回調査時の血清インジウム濃度の量依存性に伴い上昇した。血清インジウム濃度20 μg/L以上のインジウム高曝露群では増悪率は26.3%、その中で90%は調査時には喫煙者または過去喫煙者であり、両者のみの解析では血清インジウム濃度と気腫性変化増悪率との間では有意な量-反応関係が認められた。さらに、非曝露群に比べて気腫性変化増悪率の年齢・喫煙調整オッズ比が10.46であった。これらの結果から、喫煙はインジウム曝露による気腫性変化へ交互作用を示し、喫煙者の気腫性変化増悪には注意する必要があると考えられた(図2)。

金属インジウム作業者の健康影響については有害情報が欠如していたが、最近、調査結果が報告された<sup>21)</sup>。金属インジウムとはハンダ、歯科用合金、低融点合金として用いられ、種々のインジウム化合物の原材料である。141名の金属インジウム作業者を職種により高温合金精錬作業(精錬作業)、溶解作業、ボンディング作業、歯科技工士、その他の5つのグループに分け、肺障害について解析した。精錬作業群の中で血清イン

GM-CSF (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子)

SP-D (Surfactant protein D)

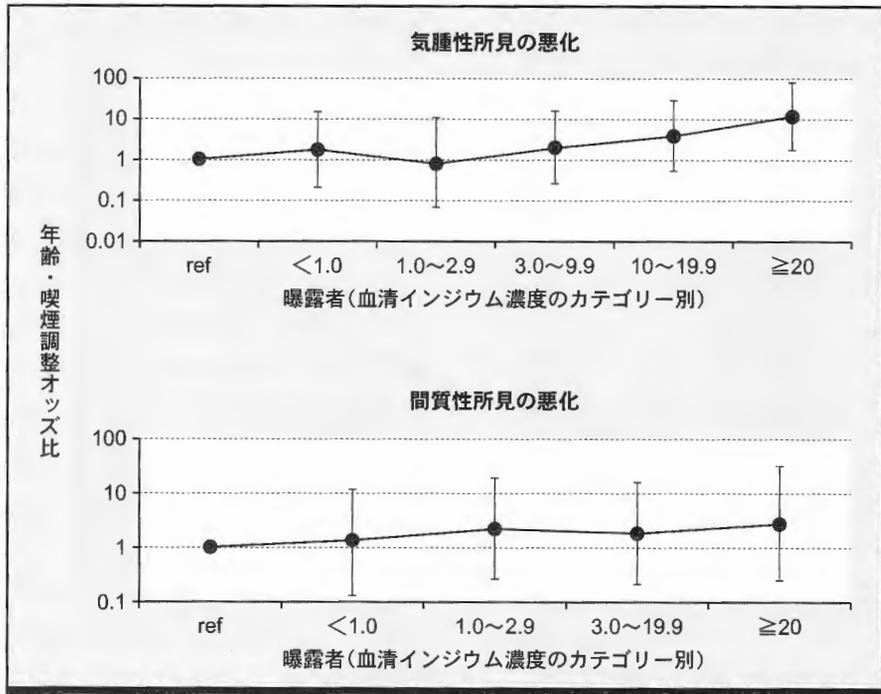


図2 5年間追跡調査研究によるHRCT所見悪化の年齢・喫煙調整オッズ比(95%CI) 間質性変化に比べて気腫性変化がより強く進展した。

(文献 20 より改変)

ジウム濃度  $3 \mu\text{g/L}$  以上を示す作業者は 9.1%, KL-6 の異常値 (基準値:  $500 \text{ U/mL}$ ) を示す作業者は 15.2% であり, 血清インジウム濃度と KL-6 の間で量-影響関係が認められた。金属インジウム作業者の 31% が防塵マスクの装着を必要とする  $3 \times 10^4 \text{ mg/m}^3$  を超す環境で作業しており, 金属インジウム作業での適切な曝露防止対策が必要だと考えられた。

米国において Cummings ら<sup>22)</sup> は, 短期間の ITO 製造に従事した作業者のインジウム曝露と初期肺病変の関連について報告した。健診対象者 87 名中 53 名 (61%) はアスベストやシリカの過去作業歴があり, 従事期間の中央値は 2 年, 血漿インジウム濃度は同,  $1.0 \mu\text{g/L}$  である。血漿インジウム濃度  $1.0 \mu\text{g/L}$  以上の作業者は  $1.0 \mu\text{g/L}$  未満の作業

者に比べて息苦しさを訴える者の割合が高く, 一秒率, 一秒量が有意に低下し, さらに, KL-6, SP-D が有意に上昇した。今回の研究より従来の健康調査から求められた結果に比べて, 短い作業期間, 低濃度のインジウム曝露, 低濃度の血漿インジウム濃度を示す ITO 作業で呼吸器症状が観察され, 肺機能指標の低下, KL-6 および SP-D の上昇が認められたことより, 粉じん作業の職歴のある低濃度曝露者の健康影響に留意する必要があると考えられた。

### III. 動物実験

種々のインジウム化合物の毒性実験が行われ, 肺障害性や肺発がん性が報告されている。発がん性に関しては化合物半導体であるインジウムリン

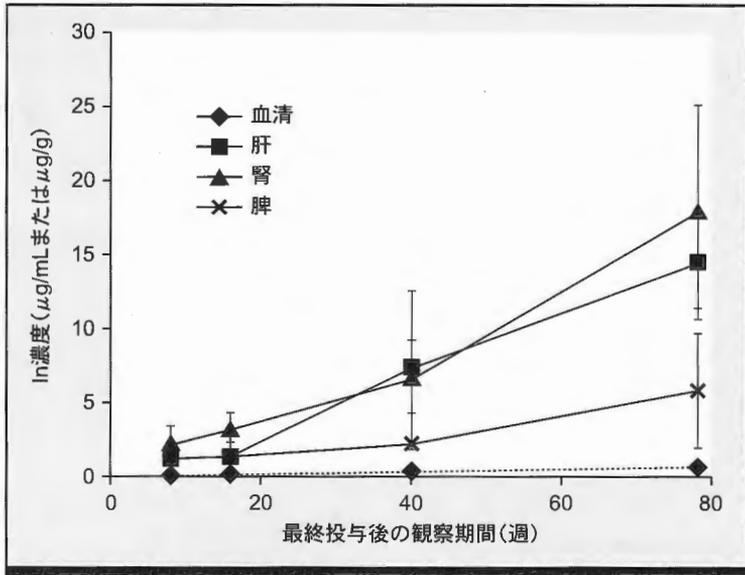


図3 ITO気管内投与後のハムスター臓器中インジウム濃度の推移 (ITO 6 mg/kg 投与群)

肝臓・腎臓・脾臓中のインジウム量は経時的に増加した。

(文献 26 より改変)

(InP)とITOの吸入曝露実験で発がん性が報告されている。米国ではInPのラットとマウスを用いた吸入曝露実験が実施され、ラットおよびマウスで肺発がん性が報告された<sup>4)</sup>。その結果を受けて、国際がん研究機関 (IARC) では「ヒトに対しておそらく発がん性がある」とされるグループ2Aと評価した<sup>25)</sup>。さらに、日本においてはITO研削粉のラットとマウスを用いた吸入曝露実験が行われた<sup>5)</sup>。曝露濃度はITOとして0.01, 0.03, 0.1 mg/m<sup>3</sup>であり、6時間/日、5日/週、104週間(0.1 mg/m<sup>3</sup>群のみ26週間曝露)の吸入曝露を行った。その結果、最低濃度の0.01 mg/m<sup>3</sup>より肺の細気管支・肺胞上皮腺腫と細気管支・肺胞上皮癌の発生が雌雄のラットで観察され、悪性・良性腫瘍発

生率は曝露濃度依存性に伴い増加した。一方、マウスでは明らかな肺腫瘍発生増加は観察されなかった。これらの結果より、ITOの吸入曝露実験でラットでは肺発がん性が明らかになった。

今まで、ITO吸入後のインジウムの体内動態の知見がなかったが、最近、ITOをハムスターの気管内に投与した場合のインジウムの長期にわたる体内動態が報告された<sup>26)</sup>。肺のインジウムのクリアランスは非常に長く、生物学的半減期は194.7週(3.7年)であった。一方、肝臓、腎臓、脾臓中インジウム量は経時的に増加した(図3)。ITOの経気道性吸入ではインジウムの肺クリアランスは非常に遅く、肺以外の臓器の蓄積性が高いことが明らかになった。

## IV. 学会、行政の対応

我が国において、一連のインジウム化合物吸入による疫学研究の結果より、平成19年に日本産業衛生学会はインジウムおよびその化合物の血清インジウムとしての生物学的許容値 $3\mu\text{g/L}$ を勧告した<sup>27)</sup>。さらに、平成22年12月に厚生労働省より「インジウム・スズ酸化物等の取扱い作業による健康障害防止に関する技術指針」<sup>28)</sup>が定められた。対象物質はインジウム及びその化合物のうち、ITOの製造、使用、回収等の過程で製造し、又は取り扱うITO、金属インジウム、水酸化インジウム、酸化インジウム、塩化インジウム等であって、吸入性粉じんである。インジウム取扱い事業所において適切な健康障害防止対策が実施されるよう作業環境管理及び作業管理、健康管理を行い、ITO等の取扱い作業における当面の作業環境の改善の目標とすべき濃度基準（目標濃度）は、吸入性粉じんとして $0.01\text{ mg/m}^3$ （Inとして）としている。目標濃度以下となった作業場においても、発がん実験より算定した曝露が許容される濃度 $3\times 10^{-4}\text{ mg/m}^3$ を越える場合には、作業環境改善に取り組むことが望ましいとしている。健康管理ではITO等取扱いに常時従事する労働者に対しては、雇い入れ時、配置換え時および6カ月以内ごとに1回、医師による健康診断を行い、血清インジウム濃度が $3\mu\text{g/L}$ 以上の場合であって医師が必要と認める場合や間質性肺炎又は気腫性変化に伴う呼吸器系の自覚症状を呈し、血清KL-6値が $500\text{ U/mL}$ 以上又は肺機能検査や胸部CT検査等によりインジウムによる異常の所見が認められ、医師が必要と認める場合には医師による就労制限等の措置が取られる場合もあるとしている。

さらに、特定化学物質障害予防規則等が改正<sup>29)</sup>され、平成25年1月1日よりインジウム化合物

（金属インジウムは除く）が特定化学物質の管理第2類物質・特別管理物質に指定され、インジウム化合物の製造・取扱い業務に常時従事する労働者に対して健康診断が義務化された。平成26年1月1日から呼吸用保護具の着用、作業環境測定および発散抑制措置、平成27年1月1日から作業主任者選任が義務化された。

## おわりに

我が国は世界の中ではインジウム使用量が多いことから、インジウム肺の報告が際立っているが、国内インジウム取扱い事業所ではインジウム曝露対策がすすめられていることから、曝露対策後に就業した作業員からのインジウム肺発症は予防できると期待できる。しかし、未だ、インジウム肺の情報が十分に周知されておらず、高濃度インジウム吸入を認識していない曝露者からの新規インジウム肺発症が危惧される。動物実験でITOの肺発がん性が明らかになったが、インジウム作業員の肺発がん性は現在のところ明らかにされておらず、インジウムによる肺発がんのメカニズムの解明が重要である。さらに、インジウムの肺クリアランスは非常に遅いことから、過去および現在のインジウム作業員の長期にわたる追跡研究が必要である。

## 文献

- 1) 白坂茂泰：インジウム：工業レアメタル，No.130，アルム出版社，東京，2014，p122-123.
- 2) Homma T, Ueno T, Sekizawa K et al : Interstitial pneumonia developed in a worker dealing with particles containing indium-tin oxide. *J Occup Health* 45 : 137-139, 2003.
- 3) Tanaka A, Hirata M, Kiyohara Y et al : Review of pulmonary toxicity of indium compounds to animals and humans. *Thin Solid Films* 518 : 2934-2936, 2010.

- 4) National Toxicology Program (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of indium phosphide (CAS No. 22398-80-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies), NTP TR 499. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health, 2001, p.1-348.
- 5) Nagano K, Nishizawa T, Umeda Y et al : Inhalation carcinogenicity and chronic toxicity of indium-tin oxide in rats and mice. *J Occup Health* **53** : 175-187, 2011.
- 6) Homma S, Miyamoto A, Sakamoto S et al : Pulmonary fibrosis in an individual occupationally exposed to inhaled indium-tin oxide. *Er Respir J* **25** : 200-204, 2005.
- 7) 田口 治, 長南達也 : インジウム肺の3例. *日本呼吸器学会雑誌* **44** : 532-536, 2006.
- 8) 中野真規子, 鎌田浩史, 齋藤史武ほか : インジウム検診で発見されたインジウム肺の1例. *産業医学ジャーナル* **30** : 25-29, 2007.
- 9) 武内浩一郎 : インジウムの肺障害. *呼吸* **27** : 599-603, 2008.
- 10) 長南達也, 天田敦子, 野寺博志ほか : インジウム化合物吸入による間質性肺炎. *日本胸部臨牀* **69** : 851-855, 2010.
- 11) Cummings KJ, Donat WE, Etensohn DB et al : Pulmonary alveolar proteinosis in workers at an indium processing facility. *Am J Respir Crit Care Med* **181** : 458-464, 2010.
- 12) Xiao YL, Cai HR, Wang YH et al : Pulmonary alveolar proteinosis in an indium-processing worker. *Chinese Med J* **123** : 1347-1350, 2010.
- 13) 鮫嶋慎吾, 梅田幸寛, 梅村朋弘ほか : インジウム肺の一例. *びまん性肺疾患の臨床* 第4版(びまん性肺疾患研究会編), 金芳堂, 京都, 2011, p526-529.
- 14) 千葉百子 : 必須微量元素の血中濃度と測定法概論. *日本臨牀* **54** : 179-185, 1996.
- 15) Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y et al : New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6. *Chest* **96** : 68-73, 1989.
- 16) Chonan T, Taguchi O, Omae K : Interstitial pulmonary disorders in indium-processing workers. *Eur Respir J* **29** : 317-324, 2007.
- 17) Hamaguchi T, Omae K, Takebayashi T et al : Exposure to hardly soluble indium compounds in ITO production and recycling plants is a new risk for interstitial lung damage. *Occup Environ Med* **65** : 51-55, 2008.
- 18) 野上裕子, 下田照文, 庄司俊輔ほか : インジウム吸入による肺障害について. *日本呼吸器学会雑誌* **46** : 60-64, 2008.
- 19) Nakano M, Omae K, Tanaka A et al : Causal relationship between indium compound inhalation and effects on the lungs. *J Occup Health* **51** : 513-521, 2009.
- 20) Nakano M, Omae K, Uchida K et al : Five-year cohort study : emphysematous progression of indium-exposed workers. *Chest* **146** : 1166-1175, 2014.
- 21) Nakano M, Tanaka A, Hirata M et al : Pulmonary effects in workers exposed to indium metal : a cross-sectional study. in press.
- 22) Cummings KJ, Virji MA, Trapnell BC et al : Early changes in clinical, functional, and laboratory biomarkers in workers at risk of indium lung disease. *AnnalsATS* **11** : 1395-1403, 2014.
- 23) Liu HH, Chen CY, Chen GI et al : Relationship between indium exposure and oxidative damage in workers in indium tin oxide production plants. *Int Arch Occup Environ Health* **85** : 447-453, 2012.
- 24) Choi S, Won YL, Kim D et al : Subclinical interstitial lung damage in workers exposed to indium compounds. *Ann Occup Environ Med* **25** : 24, 2013.
- 25) IARC. Indium phosphide, Cobalt in hard metals and cobalt sulfate, gallium arsenide, indium phosphide and vanadium pentoxide. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 86. Lyon : IARC ; 2006. p.197-224.
- 26) Tanaka A, Hirata M, Matsumura N et al : Tissue distribution of indium after repeated intratracheal instillations of indium-tin oxide into the lungs of hamsters. *J Occup Health* **57** : 189-192, 2015.
- 27) 日本産業衛生学会 許容濃度委員会 : インジウムおよびその化合物. *産業衛生学雑誌* **49** : 196, 2007.
- 28) 厚生労働省 : インジウム・スズ酸化物等の取扱い作業による健康障害防止に関する技術指針, 基安発 1222 第2号, 東京, 日本, 2010. (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/roudoukijun/anzeneisei42/dl/02.pdf>).
- 29) 厚生労働省 : 特定化学物質障害予防規則等の改正(インジウム化合物, コバルトおよびその無機化合物, エチルベンゼン), 東京, 日本, 2012. (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/roudoukijun/anzeneisei48/dl/anzeneisei48-01.pdf>).

# Synthesis of Indium-Containing Nanoparticles in Aqueous Suspension Using Plasmas in Water for Evaluating Their Kinetics in Living Body

Takaaki Amano<sup>1,\*</sup>, Thapanut Sarinont<sup>1</sup>, Kazunori Koga<sup>1</sup>, Miyuki Hirata<sup>2</sup>,  
Akiyo Tanaka<sup>2</sup>, and Masaharu Shiratani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University, Motoooka 744, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan*

<sup>2</sup>*Faculty of Medical Science, Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan*

Nanoparticles have great potential for medical applications such as cancer therapy, whereas their toxic effects on human body are pointed out. To study kinetics and toxicity of nanoparticles in living body, we synthesized indium-containing nanoparticles in aqueous suspension using pulsed electrical discharge plasmas in water, because no indium compounds exist in the living body in the normal situation and hence indium-containing nanoparticles are useful tracer materials for analyzing kinetics of nanoparticles in living body. The mean size of synthesized primary nanoparticles is 7 nm, whereas the mean size of secondary nanoparticles is 315 nm. EDX and XRD analysis reveal that nanoparticles are indium crystalline and indium hydroxide crystalline with the mass ratio of 8:2. Preliminary subcutaneous administration of nanoparticles to mice shows that indium is transported from subcutaneous to blood. These results show that synthesized indium-containing nanoparticles are useful for analyzing kinetics of nanoparticles in living body.

**Keywords:** Nanoparticles, Indium, Indium Hydroxide, Discharge Plasma in Water, Nanotoxicology.

## 1. INTRODUCTION

In recent years, nanoparticles have attracted much attention because of their great potential for applications in medical fields.<sup>1–4</sup> For cancer therapy, nanoparticles enable us to detect cancer cells and to treat cancer cells by delivering drugs or generating heat.<sup>5,6</sup> However, toxic effects of nanoparticles on human body are pointed out.<sup>7</sup> For instance, we have found that CIGS nanoparticles cause subacute pulmonary toxicity by installing into lung.<sup>8,9</sup> It is important to study kinetics and toxicity of nanoparticles in living body to prepare safety guidelines of nanoparticle applications in medical fields. Although several studies of kinetics and toxicity of nanomaterials such as carbon nanotube,<sup>10</sup> TiO<sub>2</sub> nanoparticles,<sup>11</sup> and gold nanoparticles<sup>12–14</sup> have been reported, very limited nanomaterials are employed for the studies. Since the specific physico-chemical properties at the nanoscale are expected

to result in increased reactivity with biological systems, kinetics and toxicity of various nanomaterials should be examined.

There are various methods for producing nanoparticles. The methods are categorized into three: condensation from gas,<sup>15–21</sup> chemical synthesis in liquid phase,<sup>22,23</sup> and solid-state processes such as milling and attrition.<sup>24</sup> The condensation and chemical synthesis are bottom-up processes, whereas solid-state processes are top-down ones. Synthesis of nanoparticles using electrical discharge plasmas in water is a condensation method which has drawn great attention for various technological applications because of a simplicity of apparatus, no need for vacuum equipment, environmental safety, high-throughput and cost-effective procedure to generate high yield of nanoparticles.<sup>25,26</sup> Synthesis of nanoparticles using electrical discharge plasmas in aqueous suspension, being useful for their administration to animals.

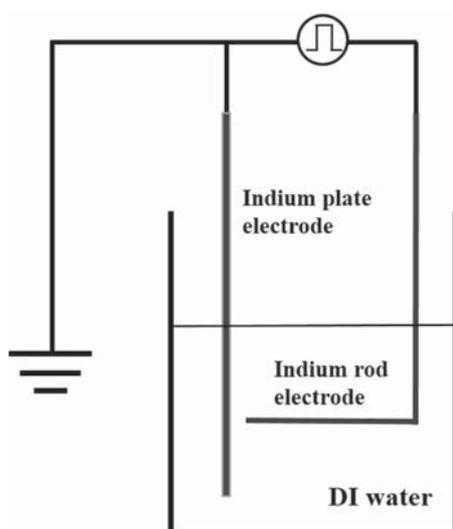
\*Author to whom correspondence should be addressed.

Here we report on synthesis of indium-containing nanoparticles in aqueous suspension using pulsed electrical discharge plasmas in water, because

- (1) indium and its compounds are widely employed in electronic applications such as transparent conducting oxides,
- (2) there is little information of kinetics and toxicity of indium-containing nanoparticles, and
- (3) no indium compounds exist in living body and hence indium-containing nanoparticles are useful tracer materials for analysis of kinetics of nanoparticles in living body.

## 2. EXPERIMENTAL DETAILS

Synthesis of indium-containing nanoparticles using pulsed electrical discharge plasmas in deionized (DI) water was carried out with a device shown in Figure 1. An indium rod electrode of 3 mm in diameter and an indium plate electrode of 1 mm in thickness were immersed into DI water. The discharges were generated between these electrodes by applying an AC high voltage with a high voltage source (Logy Electric, LHV-10AC). The discharge voltage and the discharge current were measured with a high voltage probe (Tektronix, P0615A) and a Rogowski coil (U\_RD, CTL-28-S90-05Z-1R1-CL1), respectively. The frequency of the applied voltage was 7.6 kHz, and its peak to peak voltage was 15.2 kV. The discharge power density was 5.1 W deduced from voltage/charge Lissajous plots. Optical emissions from the plasma were collected with an optical fiber and their spectra were measured with a spectroscope of spectral resolution of 1 nm (Hamamatsu photonics, C7473-36). Optical emission spectra were measured 5 times to check the reproducibility. We deduced electron density of the discharge plasmas from the



**Figure 1.** Schematic of experimental setup for synthesis of indium-containing nanoparticles using pulsed electrical discharge plasmas in DI water.

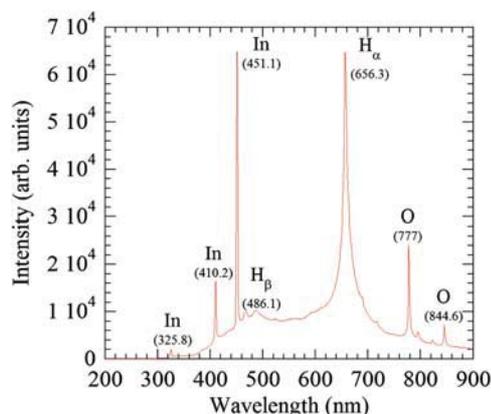
Stark broadening of  $H_{\alpha}$  and  $H_{\beta}$  line. The generation rate of nanoparticles was 42 mg/min. The color of water gradually became brown with the discharges. The large particles were precipitated quickly just after the discharges.

After 3 min discharge, we sampled supernatant of the solution with a pipette and collected nanoparticles desiccating the solution on TEM-meshes and Si substrates. Nanoparticles collected on TEM-meshes and Si substrates were observed by TEM (JEOL, JEM-2010) and SEM/EDX (Hitachi High-Technologies, SU8000), respectively. Size distribution of secondary nanoparticles was measured by the dynamic light scattering method (Otsuka Electronics, ELSZ-0S).<sup>27,28</sup> To obtain chemical and structural information of nanoparticles, we measured x-ray diffraction (XRD) spectra (Bruker, D8 DISCOVER-KU/I 3kw) of nanoparticles collected on Si substrates.

Synthesized nanoparticles were administrated towards mice for a preliminary examination of kinetics of nanoparticles in living body. Solution of nanoparticles was condensed at the concentration of 10 mg/ml by vaporizing water with heat. Subcutaneous administration was carried out to 13-week-old mice (Crj:ICR) after 7 weeks acclimation. The dose of administration was 1 mg/10 g BW per each mouse. We collected the blood of the mice 10 days after the administration. The collected blood was washed with nitric acid, and indium content in the blood was measured by ICP-MS (Agilent 7500c).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 shows an optical emission spectrum of plasmas with an exposure time of 0.5 s. Atomic emission lines of indium (325.8 nm, 410.2 nm, and 451.1 nm),<sup>29</sup> oxygen (777 nm and 844.6 nm), and hydrogen ( $H_{\alpha}$  656.3 nm and  $H_{\beta}$  486.1 nm) exist in the spectrum. There also exist weak molecular emission bands in the wavelength ranges of 390–550 nm and 540–588 nm referred to radiation of  $H_2O$  and  $H_2$  molecules, respectively. Apart from the Stark

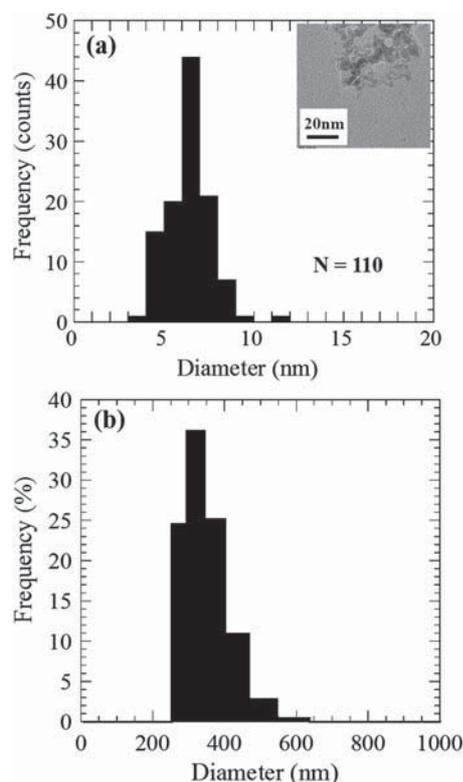


**Figure 2.** Optical emission spectrum of pulsed electrical discharge plasma in DI water.

broadening, any emission line spontaneously emitted by plasma can be broadened by other mechanisms, and the total broadening of the line profile is due to the combined contribution of all causes.<sup>30</sup> Each mechanism can produce a shift in the energy levels of the emitter atoms and the relative importance of these broadening depends on the plasma conditions. In our case, for plasmas at atmospheric pressure with moderate electron density and temperature, the important sources of broadening of the  $H_{\alpha}$  line are the Doppler effect with FWHM of 0.008 nm, and the van der Waals broadening with FWHM of 0.04 nm.<sup>30,31</sup> Similarly, the important sources of broadening of the  $H_{\beta}$  line are the Doppler effect with FWHM of 0.006 nm, and the van der Waals broadening with FWHM of 0.06 nm.<sup>30,31</sup> The broadenings due to other less important effects are neglected, such as the natural broadening and the resonant broadening. The instrumental broadening is 1 nm. We have evaluated Stark broadening by deconvoluting the measured spectra with taking other important line broadening effects. The Stark broadening of  $H_{\alpha}$  and  $H_{\beta}$  line are  $5.39 \pm 0.23$  nm and  $12.0 \pm 0.55$  nm. The electron density deduced from the Stark broadening of the  $H_{\alpha}$  and  $H_{\beta}$  line are  $(5.28 \pm 0.34) \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$  and  $(4.64 \pm 0.31) \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ , respectively.<sup>30,32,33</sup> The electron density deduced from the Stark broadening of the  $H_{\alpha}$  is more reliable, because the  $H_{\alpha}$  line intensity is much stronger than the background emissions.

Figure 3(a) shows a typical TEM image of the synthesized nanoparticles and the size distribution of primary nanoparticles. The size distribution is the Gaussian one and the mean size of the primary nanoparticles is 7 nm. The morphology of nanoparticles are mostly spherical or distorted spherical. The nanoparticles are single or multi-crystallines and have no core-shell structure. Figure 3(b) shows the size distribution of secondary nanoparticles. The size distribution is the log-normal one and the mean size of secondary nanoparticles is 315 nm. EDX spectrum of the nanoparticles is shown in Figure 4. The peaks of indium and oxygen were observed from the spectra, showing that the synthesized nanoparticles contain indium and oxygen.

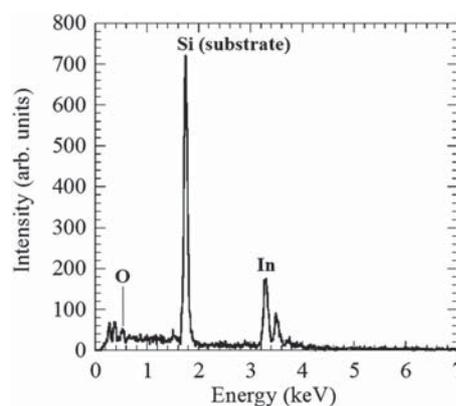
Further chemical and structural information of the synthesized nanoparticles is obtained from Figure 5. This figure shows an XRD pattern of the synthesized nanoparticles. The presence of sharp peaks on the XRD patterns is usually connected with a crystal structure in the samples. The peaks of In (JCPDS card No. 85-1409), and  $\text{In}(\text{OH})_3$  are observed in the XRD pattern.<sup>34,35</sup> These results indicate that the nanoparticles are indium crystalline (In) and indium hydroxide ( $\text{In}(\text{OH})_3$ ) crystalline. The mass ratio of indium nanoparticles to indium hydroxide nanoparticles is 8:2, deduced from the XRD pattern using the normalized relative intensity ratio method.<sup>36,37</sup> These two kinds of nanoparticles might have different kinetics in living body. To clarify kinetics of each kind of nanoparticles, we need



**Figure 3.** (a) TEM image of indium-containing nanoparticles and size distribution of primary nanoparticles, and (b) size distribution of secondary nanoparticles.

to control the mass ratio of these two kinds of nanoparticles. We will develop such control in the future.

Although up to now no direct experimental evidence has been obtained indicating a specific mechanism for the formation of nanoparticles in pulsed electrical discharge plasmas in DI water, we can hypothesize that the following processes take place during the discharges.



**Figure 4.** EDX spectrum of synthesized nanoparticles.

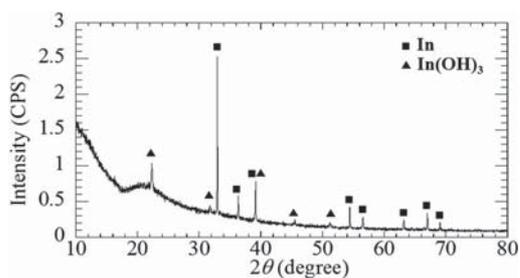


Figure 5. XRD pattern of synthesized nanoparticles.

During the discharge, the indium electrodes are heated, melted at the indium melting point of 156 °C, and vaporized. Near the electrodes, the water is also vaporized as a result of exposure to high temperature. Due to this vaporization of water, we observed many bubbles near the electrodes during the discharges. The discharge plasmas take place in a gas mixture consisting of the water vapor and indium, with a temperature gradient from a high temperature region near the electrodes to the boiling point of the liquid at the gas mixture-liquid boundary. The gas mixture can contain indium, H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. Moreover, H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> can be dissociated into OH, O, and H by electron impact in discharge plasmas and thermal decomposition.

Nanoparticles are formed in the gas mixture as a result of the sequential change from nucleation to growth to coalescence to aggregation. The growth of nanoparticles stops as a result of interaction with the cold water surrounding the discharge zone. We measured temperature rise of water during discharges with an electrical thermometer. The temperature increases from 25 °C to 38 °C after 5 min discharge. Therefore, the average temperature of water surrounding the discharge zone is in this range. Some molecules and atoms originated from water vapor in the gas mixture react with indium and lead to nanoparticles of indium hydroxide (In(OH)<sub>3</sub>).

Synthesized nanoparticles were administrated towards mice for a preliminary examination of kinetics of nanoparticles in living body. The subcutaneous administration was well tolerated and no adverse effects were observed during the 10 days observation period. The preliminary examination shows that indium of 1.2–1.6 ng/ml is transported from subcutaneous to blood in 10 days. These results show that synthesized nanoparticles are useful for analyzing kinetics of nanoparticles in living body.

#### 4. CONCLUSION

We synthesized indium-containing nanoparticles in aqueous suspension using pulsed electrical discharge plasmas in DI water. We obtained the following conclusions.

(1) Nanoparticles of 7 nm in primary nanoparticle size and 315 nm in secondary nanoparticle size are produced using pulsed electrical discharge plasmas in water

with the indium plate electrode and the indium rod electrode.

(2) EDX, and XRD analysis indicate that the synthesized nanoparticles are indium (In) crystalline and indium hydroxide (In(OH)<sub>3</sub>) crystalline with the mass ratio of 8:2.

(3) Synthesized nanoparticles are useful for analyzing kinetics of nanoparticles in living body.

The remaining issues are to reveal the mechanisms of synthesis of nanoparticles using pulsed electrical discharge plasmas in water in detail, to control the mass ratio of indium nanoparticles to indium hydroxide nanoparticles, and to carry out further experiments to reveal kinetics and toxicity of nanoparticles as a parameter of size of primary and secondary nanoparticles.

**Acknowledgments:** This study was partly supported by JSPS KAKENHI Grant Numbers 24340143 and 24108009.

#### References and Notes

1. N. Komatsu, *J. Surf. Sci. Soc. Jpn.* 30, 273 (2009), (in Japanese).
2. O. V. Salata, *J. Nanobiotechnol.* 2, 3 (2004).
3. L. Zhang, F. X. Gu, J. M. Chan, A. Z. Wang, R. S. Langer, and O. C. Farokhzad, *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 761 (2008).
4. M. Sivasankar, *IJRPBS* 1, 41 (2010).
5. I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 631 (2005).
6. A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Föhling, and R. Felix, *J. Magn. Magn. Mater.* 201, 413 (1999).
7. K. Iwai, *J. Jpn. Soc. Atmos. Environ.* 35, 321 (2000), (in Japanese).
8. A. Tanaka, M. Hirata, M. Shiratani, K. Koga, and Y. Kiyohara, *J. Occup. Health* 54, 187 (2012).
9. A. Tanaka, M. Hirata, Y. Kiyohara, M. Nakano, K. Omae, M. Shiratani, and K. Koga, *Thin Solid Films* 2934, 518 (2010).
10. C. W. Lam, J. T. James, R. McCluskey, and R. L. Hunter, *Toxicol. Sci.* 77, 126 (2004).
11. J. Wu, W. Liu, C. Xue, S. Zhou, F. Lan, L. Bi, H. Xu, X. Yang, and F. D. Zeng, *Toxicol Lett.* 191, 1 (2009).
12. G. Sonavane, K. Tomoda, A. Sano, H. Ohshima, H. Terada, and K. Makino, *Colloids Surf. B: Biointerf.* 65, 1 (2008).
13. G. Sonavane, K. Tomoda, and K. Makino, *Colloids Surf. B: Biointerf.* 66, 274 (2008).
14. W. H. De Jong, W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. A. M. Sips, and R. E. Geertsma, *Biomater.* 29, 1912 (2008).
15. Y. Watanabe, M. Shiratani, Y. Kubo, I. Ogawa, and S. Ogi, *Appl. Phys. Lett.* 53, 1263 (1988).
16. M. Shiratani, S. Maeda, K. Koga, and Y. Watanabe, *Jpn. J. Appl. Phys.* 39, 287 (2000).
17. K. Koga, Y. Matsuoka, T. Tanaka, M. Shiratani, and Y. Watanabe, *Appl. Phys. Lett.* 77, 196 (2000).
18. H. Kawasaki, J. Kida, K. Sakamoto, T. Fukuzawa, M. Shiratani, and Y. Watanabe, *J. Appl. Phys.* 83, 5665 (1998).
19. S. Nunomura, K. Koga, M. Shiratani, Y. Watanabe, Y. Morisada, N. Matsuki, and S. Ikeda, *Jpn. J. Appl. Phys.* 44, L1509 (2005).
20. S. Nunomura, M. Shiratani, K. Koga, M. Kondo, and Y. Watanabe, *Phys. Plasma* 15, 080703 (2008).
21. T. Suzuki, K. Okazaki, S. Suzuki, T. Shibayama, S. Kuwabata, and T. Torimoto, *Chem. Mater.* 22, 5209 (2010).
22. X. Yang, H. Konishi, H. Xu, and M. Wu, *Eur. J. Inorg. Chem.* 11, 2229 (2006).

## Synthesis of indium-containing nanoparticles using plasmas in water to study their effects on living body

**Takaaki Amnao<sup>1</sup>, Kazunori Koga<sup>1</sup>, Thapanut Saronont<sup>1</sup>, Hyunwoong Seo<sup>1</sup>, Naho Itagaki<sup>1</sup>, Masaharu Shiratani<sup>1</sup>, Satoshi Kitazaki<sup>2</sup>, Miyuki Hirata<sup>3</sup>, Yoshimichi Nakatsu<sup>3</sup>, and Akiyo Tanaka<sup>3</sup>,**

<sup>1</sup> Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University, Kyushu University, Motoooka 744, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan.

Phone/FAX: +81-92-802-3723/+81-92-802-3723 E-mail: t.amano@plasma.ed.kyushu-u.ac.jp

<sup>2</sup> Graduate School of Electrical Engineering, Fukuoka Institute of Technology, Wajiro-higashi 3-30-1, Higashi-ku, Fukuoka 811-0295, Japan.

<sup>3</sup> Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.

We synthesized indium-containing nanoparticles using discharge plasmas with indium electrodes immersed in deionized water and administrated nanoparticles to rats to analyze their kinetics in living body. We succeeded in producing indium and indium hydroxide crystalline nanoparticles with the mass ratio of 8:2. The size of primary nanoparticles is 7nm. The synthesized nanoparticles were administrated subcutaneously toward rats. Purchased  $\text{In}_2\text{O}_3$  nanoparticles, whose size is around 100 nm, were also administrated to compare with the results of the synthesized ones. Indium content of the synthesized ones in the urine is much higher than those of purchased ones. Our results show that synthesized nanoparticles are easily transported in living body and are useful for analyzing kinetics of nanoparticles in living body.

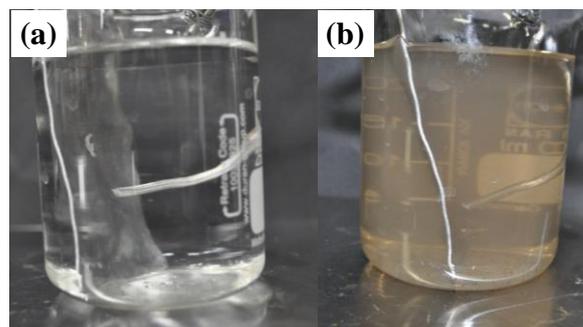
### 1. Introduction

Nanoparticles have gathered much attention because of their great potential for applications in medical fields such as cancer therapy and drug delivering systems (DDS) [1-4]. However, toxic effects of nanoparticles on living body have been also pointed out [5-7]. It is important to study kinetics and effects of nanoparticles in living body for safe applications in medical fields. Synthesis of nanoparticles using discharge plasmas in water offers a simple way to synthesize nanoparticles in aqueous suspension which is useful for their administration to living bodies. Here, we report on synthesis of indium-containing nanoparticles using discharge plasmas with indium electrodes immersed in deionized (DI) water. We also report on administrating nanoparticles to rats to analyze their kinetics in living body, because indium and its compounds are widely employed in electronic applications and no indium and its compound exists in living body.

### 2. Experimental

Synthesis of nanoparticles was carried out by using pulsed discharge plasmas in DI water as shown in Fig. 1. An indium rod electrode of 3 mm in diameter and an indium plate electrode of 1 mm in thickness were immersed into DI water. The discharges were generated between the electrodes by applying an AC high voltage. The frequency of the applied voltage was 7.6 kHz, and its voltage was 15.2kVpp. The discharge power was 5.1 W deduced from voltage/charge Lissajous plots. Optical emissions from the plasma were measured with a spectrometer. After 3 min discharge, we sampled the supernatant of the solution with a pipette and dripped on grid mesh for transparent electron microscopy (TEM) measurements and Si substrate for energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) and X-ray

diffraction (XRD) measurements. We also prepare the purchased  $\text{In}_2\text{O}_3$  nanoparticles for comparison. To examine their kinetics of nanoparticles in living body, 10 mg/ml solution of nanoparticles was administrated subcutaneously towards 8-week-old rats. The dose of administration was 1 mg/10 gBW per each rat. We collected the urine for 12 weeks after the administration. The collected urine was wet-ashed with nitric acid, and indium content in the blood was measured by ICP-MS.



**Fig. 1. Schematics of plasmas in water for synthesizing indium-containing nanoparticles. (a) before the discharges, (b) after the 3min discharges.**

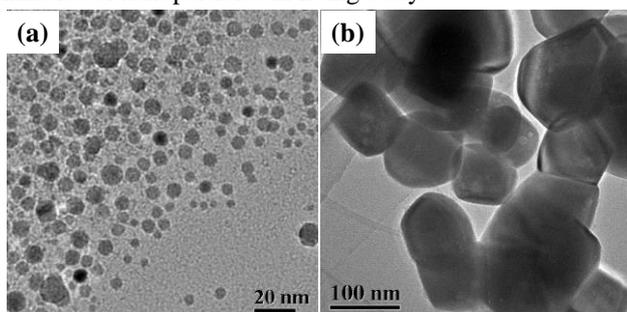
### 3. Results and Discussion

Atomic emission lines of In (325.8 nm, 410.2 nm, and 451.1 nm), O (777 nm and 844.6 nm), and H ( $H_\alpha$  656.3 nm and  $H_\beta$  486.1 nm) were observed from the optical emission spectra of the discharge plasma. Emission from In indicates that the In atoms are evaporated by interactions between plasmas and electrode materials, leading to formation of In nanoparticles. The generation rate of nanoparticles was 42 mg/min. The electron density deduced from the stalk

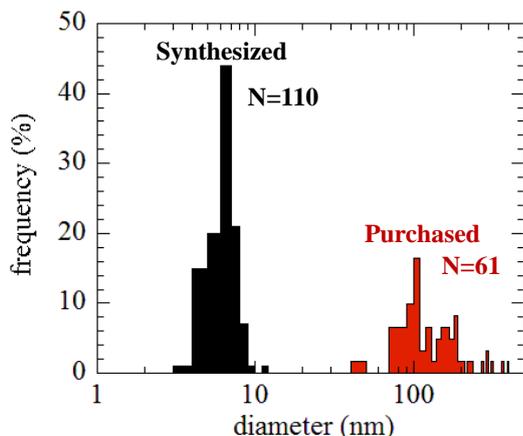
broadenings of hydrogen emissions was  $5 \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ .

Figure 2 shows the TEM image of the synthesized nanoparticles and purchased  $\text{In}_2\text{O}_3$  nanoparticles. Figure 3 shows the size distribution of primary nanoparticles of synthesized nanoparticles and purchased nanoparticles. The size distributions are the Gaussian ones and the mean size of the primary nanoparticles of synthesized nanoparticles and purchased nanoparticles are 6.2 and 149.5 nm, respectively. From the XRD pattern, the peaks of In and  $\text{In}(\text{OH})_3$  are observed [8,9]. In and O in nanoparticles are also confirmed from the EDX spectra. These results indicate that the nanoparticles are indium crystalline and indium hydroxide crystalline. The mass ratio of indium nanoparticles and indium hydroxide nanoparticles is 8:2, deduced from the XRD pattern using the normalized relative intensity ratio method [10, 11].

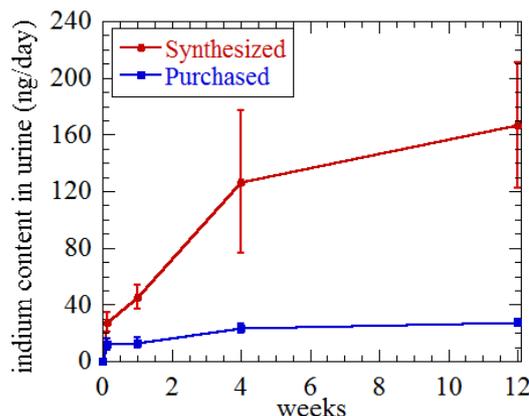
Synthesized nanoparticles were administrated towards rats to study effects of nanoparticles in living body. Figure 4 shows the indium contents in the urine after the administration. The indium content in urine for the synthesized nanoparticles monotonically increases with time and is much higher than that for the purchased nanoparticles. The synthesized nanoparticles are well transported from subcutaneous to urine. These results show that synthesized nanoparticles dispersed in water are useful for analyzing kinetics of nanoparticles in living body.



**Fig. 2. TEM image of the nanoparticles; (a) synthesized nanoparticles, (b) purchased  $\text{In}_2\text{O}_3$  nanoparticles.**



**Fig. 3. Size distribution of primary nanoparticles of synthesized nanoparticles and purchased nanoparticles.**



**Fig. 4. Indium contents in urine after administration of nanoparticles towards rats.**

#### 4. Conclusions

We synthesized indium-containing nanoparticles using discharge plasmas with indium electrodes immersed in DI water. We administrated nanoparticles to rats to analyze their kinetics in living body. We obtained the following conclusions.

1. Nanoparticles of 7 nm in primary nanoparticle size are produced by the discharge plasmas in water with the indium plate electrode and the indium rod electrode.
2. The synthesized nanoparticles were indium crystalline and indium hydroxide crystalline with the mass ratio of 8:2.
3. Synthesized nanoparticles are transported from subcutaneous to urine. The indium contents of the synthesized nanoparticles in urine is much higher than the contents of the purchased nanoparticles.

#### Acknowledgements

This work was partly supported by KAKENHI Grant Numbers 24340143 and 24108009.

#### References

- [1] O. V. Salata: *J. Nanobiotechnol* **2** (2004) 3.
- [2] L. Zhang, F. X. Gu, J. M. Chan, A. Z. Wang, R.S. Langer, O.C. Farokhzad: *Clin. Pharmacol. Ther.* **83** (2008) 761.
- [3] M. Sivasankar: *IJRPBS* **1** (2010) 41.
- [4] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur: *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54** (2005) 631.
- [5] K. Iwai: *J. Jpn. Soc. Atmos. Environ.* **35** (2000) 321. (in Japanese)
- [6] A. Tanaka, M. Hirata, M. Shiratani, K. Koga, Y. Kiyohara: *J. Occup. Health* **54** (2012) 187.
- [7] A. Tanaka, M. Hirata, Y. Kiyohara, M. Nakano, K. Omae, M. Shiratani, K. Koga: *Thin Solid Films* **2934** (2010) 518.
- [8] Y. Zhao, J. Zhang, H. Dang: *J. Phys. Chem. B* **107** (2003) 7574.
- [9] W. Yin, J. Su, M. Cao, C. Ni, S. G. Cloutler, Z. Huang, X. Ma, L. Ren, C. Hu, B. Wei: *J. Phys. Chem. C* **113** (2009) 19493.
- [10] F. H. Chung: *J. Appl. Cryst.* **8** (1975) 17.
- [11] C. Shifu, Y. Xiaoling, Z. Huaye, L. Wei: *J. Hazard. Mater.* **180** (2010) 735.

## **Production of In, Au, and Pt nanoparticles by discharge plasmas in water for assessment of their bio-compatibility and toxicity**

Takaaki Amano<sup>1</sup>, Thapanut Sarinont<sup>1</sup>, Kazunori Koga<sup>1</sup>, Miyuki Hirata<sup>2</sup>, Akiyo Tanaka<sup>2</sup>, and Masaharu Shiratani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University, 744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan

<sup>2</sup>Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

### **ABSTRACT**

Nanoparticles have great potential for biomedical applications such as early detection, accurate diagnosis, and personalized treatment of cancer. Assessment of bio-compatibility and toxicity of nanoparticles body is an emerging topic for these applications. To study kinetics of nanoparticles in body, we synthesized indium, gold and platinum nanoparticles in aqueous suspension using pulsed electrical discharge plasmas in water. The average size of synthesized primary nanoparticles for indium, gold, and platinum are 6.2 nm, 6.7 nm, and 5.4 nm, whereas the average size of secondary nanoparticles for indium, gold, and platinum are 315 nm, 72.3 nm, and 151 nm, respectively. Synthesized indium nanoparticles are transported from subcutaneous to serum and brain. The indium content in serum for the synthesized nanoparticles is much higher than that for the In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles of 150 nm in primary size. For gold and platinum nanoparticles, preliminary examination of intratracheal administration revealed that administration of synthesized nanoparticles with 10 mg/kg BW (body weight) may cause bleedings and/or emphysema in lung.

### **INTRODUCTION**

Nowadays, nanoparticles have gathered much attention in biomedical applications, because of their size-dependent physical and chemical properties and they are much smaller than cells of 10 μm in size and comparable to proteins of 5 nm in size [1-2]. There are, for instance, possible applications of detecting cancer cells by nanoparticles with antibody or treatment the affected area by delivering drugs or generating heat [3,4]. On the other hands, the toxicities of nanoparticles are also pointed out [5]. We have formed nanoparticles of various materials such as Si, Ge, SiCH<sub>x</sub> and core-shell nanoparticles of Si/SiN, Si/SiC, Ge/GeN using plasma processes and have applied them to solar cells and porous dielectric [6-9]. Moreover, we have found that installation of copper indium gallium selenide (CIGS) nanoparticles in lung cause subacute pulmonary toxicity [10,11]. To provide safety guidelines of nanoparticles, we must assess bio-compatibility and toxicity of nanoparticles of various kinds of materials.

Synthesis of nanoparticles using electrical discharge plasmas in water is categorized into a bottom-up nanotechnology. This method has several merits; no need of complicated equipment such as vacuum equipment and cost-effective procedure to generate high yield of nanoparticles [12,13]. Moreover, it offers a simple way to prepare nanoparticles in aqueous suspension, being useful for their administration to body.

Indium and its compounds are widely used for electrical applications such as indium tin oxide (ITO) transparent conducting oxides or CIGS solar cells. Furthermore, no indium compounds exist in body and hence indium-containing nanoparticles are useful tracer materials

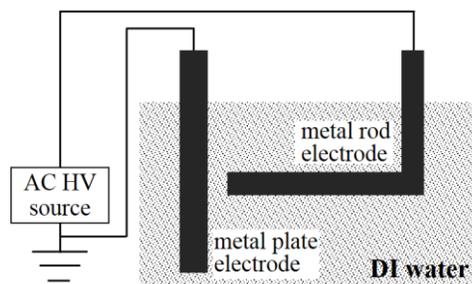
for analysis of kinetics of nanoparticles in body. Au, and Pt nanoparticles are promising nanomaterials for medical applications because of their stability and catalytic effects.

Here we report synthesis of indium (In), gold (Au), and platinum (Pt) nanoparticles using some metal electrodes to study their kinetics in body, and some results of administrating the synthesized nanoparticles to rats.

## EXPERIMENTAL DETAILS

Nanoparticles were synthesized using pulsed electrical discharge plasmas in deionized (DI) water [14]. The schematic of the discharge device is shown in Fig. 1. A rod electrode and a plate electrode were immersed into DI water. The diameter of rod electrode and the thickness of plate electrode for In, Au, and Pt were 3, 1, 1 mm and 1, 0.3, 0.3 mm, respectively. The discharges were generated between the electrodes by applying an AC high voltage with a high voltage source (Logy Electric, LHV-10AC). The discharge voltage was measured with a high voltage probe (Tektronix, P0615A). The frequency of the applied voltage was 10 kHz, and its peak to peak voltage was approximately 10 kV. The wave is sinusoidal at positive while the voltage is positive and nearly square while the voltage is negative. The rise time and pulse width, and duty ratio of the square wave pulse is around 5.6  $\mu$ s and 82  $\mu$ s. Optical emissions from the plasma were collected with an optical fiber and their spectra were measured with a spectroscopy of spectral resolution of 1 nm (Hamamatsu photonics, C7473-36). Optical emission spectra were measured 5 times to check the reproducibility. We deduced electron density of the discharge plasmas from the Stark broadening of  $H_{\alpha}$  line (656.3 nm) [15-17]. The generation rate of In, Au, and Pt nanoparticles were 42 mg/min, 0.47 mg/min, and 0.25 mg/min, respectively. The water was gradually changed from transparent to opaque with time after the discharge ignition. The large particles were precipitated quickly just after the discharges. After the discharge, we sampled supernatant of the solution with a pipette and collected nanoparticles desiccating the solution on TEM-meshes. Nanoparticles collected on TEM-meshes were observed with TEM (JEOL, JEM-2010). Size distribution of secondary nanoparticles was measured by the dynamic light scattering method (Otsuka Electronics, ELSZ-0S/ELSZ-2000ZS) [18, 19]. To obtain chemical and structural information of nanoparticles, we measured x-ray diffraction (XRD) spectra (Bruker, D8 DISCOVER-KU/I 3kw) of nanoparticles collected on quartz substrates.

Synthesized nanoparticles were administrated towards rats for a preliminary examination of kinetics of nanoparticles in body. Solution of nanoparticles was condensed at the concentration of 10 mg/ml by vaporizing water with heat. Subcutaneous administration was carried out to 8-week-old Wistar rat ( $\sigma$ ) after 2 weeks acclimation. The dose of administration was 10 mg/kg BW (body weight) per each rat. We collected the organs of the rats after the administration. The collected organs were wet-ashed with nitric acid, and the contents of metals in the organs were measured by ICP-MS (Agilent 7500c).



**Figure 1.** Schematic of pulsed electrical discharge plasmas in water for synthesizing metal nanoparticles.

## RESULTS AND DISCUSSION

Figure 2 shows optical emission spectra of plasma with an exposure time of 0.5 s. Atomic emission lines of O (777 nm and 844.6 nm), and H ( $H_{\alpha}$  656.3 nm and  $H_{\beta}$  486.1 nm) exist in the spectra. There are also atomic lines of metals of In (325.8 nm, 410.2 nm, and 451.1 nm), Au (312.3 nm, 479.3 nm, 406.5 nm, and 523.0 nm), or Pt (306.5 nm). There also exist weak molecular emission bands in the wavelength ranges of 390–550 nm ( $H_2O$ ) and 540–588 nm ( $H_2$ ). We have evaluated Stark broadening by deconvoluting the measured spectra with taking other important line broadening effects of the instrumental broadening with FWHM of 1 nm, Doppler effect with FWHM of 0.008 nm, and the van der Waals broadening with FWHM of 0.04 nm [15, 20]. The Stark broadenings of  $H_{\alpha}$  line for In, Au, Pt electrodes are  $5.39 \pm 0.23$  nm,  $3.40 \pm 0.05$  nm,  $3.84 \pm 0.17$  nm, respectively. The electron density deduced from the Stark broadening are  $(5.28 \pm 0.34) \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ ,  $(2.64 \pm 0.57) \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ ,  $(3.18 \pm 0.22) \times 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ , respectively.

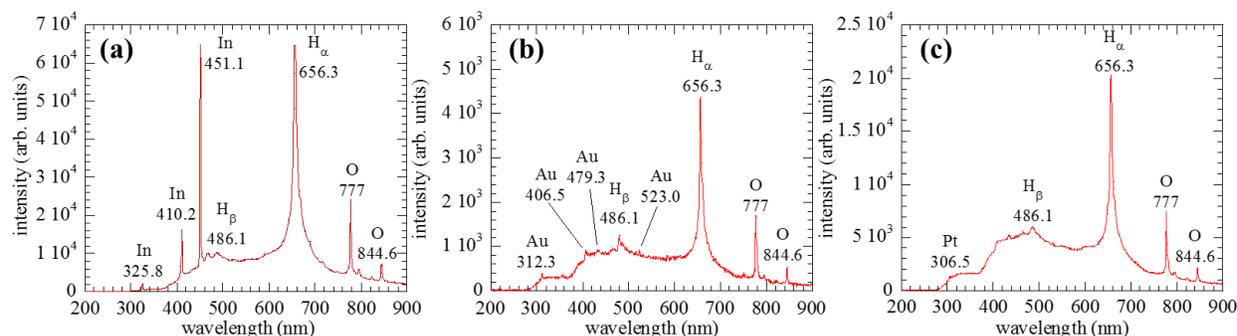
Figures 3(a)-(c) show typical TEM images of In, Au, Pt nanoparticles and their size distribution of primary nanoparticles. The average size of the primary nanoparticles for In, Au, Pt are 6.2 nm, 6.7 nm, and 5.4 nm, respectively. The aggregation of the particles were also observed from dynamic light scattering, and the average size of the secondary nanoparticles for In, Au, Pt are 315 nm, 72.3 nm, and 151 nm, respectively.

Figures 4(a)-(c) show the XRD spectrum of each synthesized nanoparticles. For indium (Figure 4(a)), the peaks of In, and  $In(OH)_3$  are observed in the XRD pattern. This results indicate that the nanoparticles are indium cubic crystalline (In) and indium hydroxide ( $In(OH)_3$ ) tetragonal crystalline. The mass ratio of indium nanoparticles to indium hydroxide nanoparticles is 8:2, deduced from the XRD pattern using the normalized relative intensity ratio method [21,22]. For Au, the peaks of gold are observed in the XRD pattern, indicating that the nanoparticles are gold (Au) cubic crystalline. For Pt, the peaks of platinum are observed in the XRD pattern, indicating that the nanoparticles are platinum (Pt) cubic crystalline.

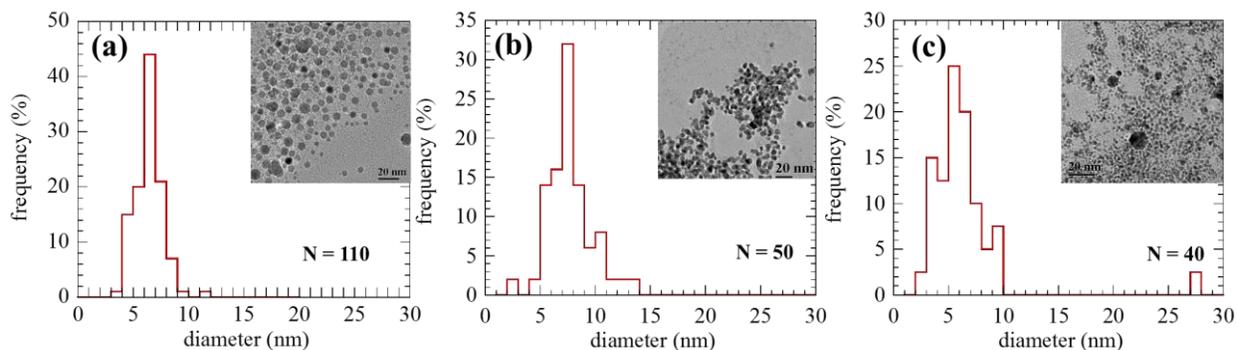
Synthesized In containing nanoparticles were administrated towards rats for the examination of kinetics of nanoparticles in body. Figure 5 shows the indium contents in serum and brain for 4 weeks after the administration. For comparison, large  $In_2O_3$  nanoparticles (Sigma-Aldrich, 150 nm in average size of primary nanoparticles, deduced from our TEM measurements) were also administrated. The indium content in serum for the synthesized nanoparticles increases linearly with time and is much higher than that for the  $In_2O_3$  nanoparticles. For brain, indium was detected only for synthesized nanoparticles at 4 weeks after administration. Here we propose a tentative model for the kinetics of In nanoparticles in body. Aggregated In nanoparticles or  $In_2O_3$  particles in the subcutaneous tissue of rats dissolved slowly and a dissolved form of indium or In nanoparticles itself appeared in the serum, increasing over time. The quite low In content in serum and no trace of In in brain for  $In_2O_3$  nanoparticles are

probably because they have a low mobility in body owing to their large primary particle size of 150 nm. Although mobility of the synthesized primary nanoparticles is high due to their small size of 6.2 nm, begin comparable to the size of proteins; most primary nanoparticles are agglomerated to form the secondary nanoparticles of 315 nm in size and such secondary nanoparticles have low mobility due to their large size. In containing nanoparticles have a long residence time in body and some primary nanoparticles are likely to be detached from secondary nanoparticles and they are transported towards serum and brain with a long time constant of 4 weeks. Our results in Fig. 5 suggest that small nanoparticles of around 6 nm in size are quite mobile and easily distributed over body, even in brain.

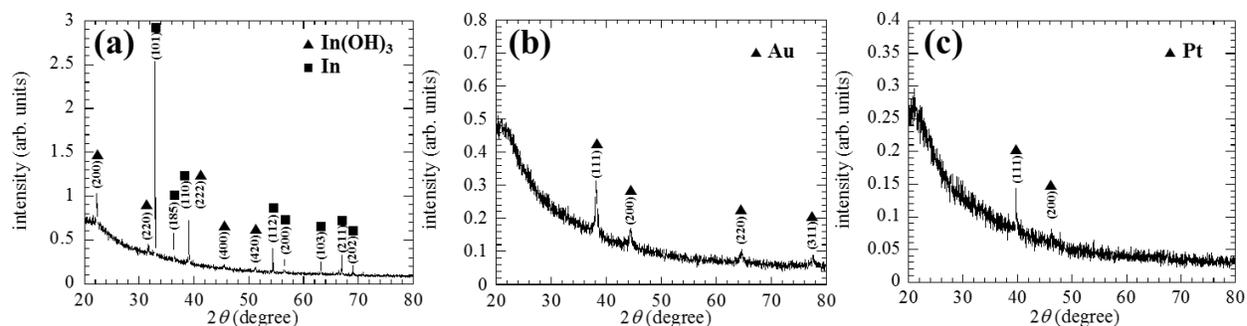
We also administrated Au and Pt nanoparticles intratracheally for preliminary examination. Figure 6 shows the images of lungs of the rat 1day after the administration. Aggregations were observed in the lung. Bleedings and/or emphysema were also observed for each lung. These results indicate that these aggregated nanoparticles induce damages in body, although Au and Pt nanoparticles have been widely studied for biomedical applications. Therefore, we must assess bio-compatibility and toxicity of these nanoparticles in body more in detail.



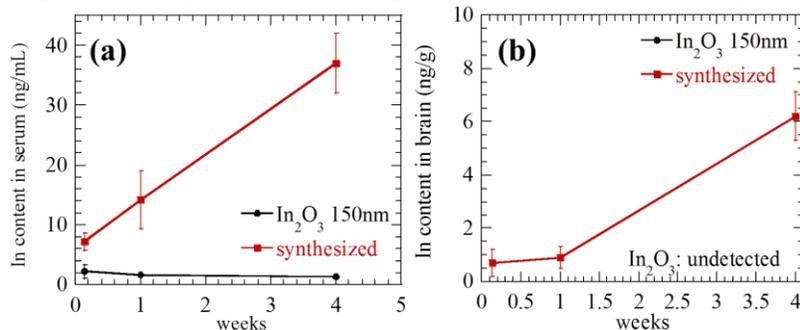
**Figure 2.** Optical emission spectra of discharge plasma for (a) indium, electrode (b) gold electrode, and (c) platinum electrode.



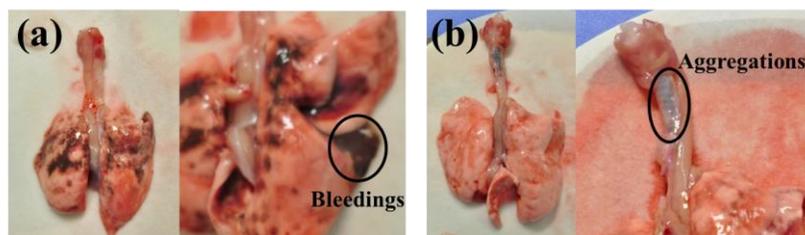
**Figure 3.** TEM images and primary size distributions of synthesized nanoparticle for (a) indium electrode, (b) gold electrode, and (c) platinum electrode.



**Figure 4.** XRD pattern of synthesized nanoparticles of (a) indium, (b) gold, (c) platinum.



**Figure 5.** Indium contents for 4 weeks after administration in (a) serum and (b) brain.



**Figure 6.** Lungs of rats 1 day after intratracheal administration of synthesized nanoparticles for (a) gold and (b) platinum.

## CONCLUSIONS

We synthesized indium, gold, and platinum nanoparticles in aqueous suspension using pulsed electrical discharge plasmas in DI water. We obtained the following conclusions.

For indium,

- 1) Indium/ Indium hydroxide nanoparticles of 6.2nm in primary size and 315 nm in secondary size are produced using pulsed electrical discharge plasmas in water with the indium electrodes.
- 2) Synthesized nanoparticles are transported from subcutaneous to serum and brain. The indium content of the synthesized nanoparticles is much higher than that of  $\text{In}_2\text{O}_3$  nanoparticles of 150 nm in primary size.

For gold and platinum,

- 1) Gold nanoparticles of 6.7 nm in primary size and 72.3 nm in secondary size are produced using pulsed electrical discharge plasmas in water with the gold electrodes. Platinum of 5.4 nm in primary size and 151 nm in secondary size are produced using pulsed electrical discharge plasmas in water with the platinum electrodes.

- 2) Preliminary examination of intratracheal administration of the gold and platinum nanoparticles shows that administration of nanoparticles with 10 mg/kgBW may cause bleedings and/or emphysema in lungs.

These results indicate that gold and platinum nanoparticles induce damages in body, although they have been widely studied for biomedical applications. Therefore, we must assess bio-compatibility and toxicity of these nanoparticles in body more in detail.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by MEXT KAKENHI grant number 24108009 and JSPS KAKENHI grant number 24340143.

## REFERENCES

1. C. Chen, B. Liang, D. Lu, A. Ogino, X. Wang, M. Nagatsu, *Carbon*, 48, 939 (2010).
2. L. Zhang, F. X. Gu, J. M. Chan, A. Z. Wang, R.S. Langer, and O.C. Farokhzad, *Clin. Pharmacol. Ther.* 83, 761 (2008).
3. I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 631 (2005).
4. A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Föhling, and R. Felix, *J. Magn. Magn. Mater.* 201, 413 (1999).
5. K. Iwai, *J. Jpn. Soc. Atmos. Environ.* 35, 321 (2000). (in Japanese)
6. Y. Watanabe, M. Shiratani, Y. Kubo, I. Ogawa, S. Ogi, *Appl. Phys. Lett.* 53, 1263 (1988).
7. M. Shiratani, H. Kawasaki, T. Fukuzawa, T. Yoshioka, Y. Ueda, S. Singh, Y. Watanabe, *J. Appl. Phys.* 79, 104 (1996).
8. M Shiratani, K Koga, S Iwashita, G Uchida, N Itagaki, K Kamataki, *J. Phys. D*, 44, 174038 (2011).
9. H. Seo, Y. Wang, G. Uchida, K. Kamataki, N. Itagaki, K. Koga, M. Shiratani, *Electrochim. Acta.*, 95, 43 (2013).
10. A. Tanaka, M. Hirata, M. Shiratani, K. Koga, and Y. Kiyohara, *J. Occup. Health* 54, 187 (2012).
11. A. Tanaka, M. Hirata, Y. Kiyohara, M. Nakano, K. Omae, M. Shiratani, and K. Koga, *Thin Solid Films*, 2934, 518 (2010).
12. V. Burakov, A. Butsen, V. Hamisch, P. Misakov, E. Nevar, M. Rosenbaum, N. Savastenko, and N.V. Tarasenko, *J. Nanopart. Res.* 10, 881 (2008).
13. M. Mardaniana, A. A. Nevar, M. Nedel'ko, N. V. Tarasenko, *Eur. Phys. J. D* 67, 208 (2013).
14. T. Amano, T. Sarinont, K. Koga, M. Hirata, A. Tanaka, and M. Shiratani, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11, 9298 (2015).
15. N. Balcon, A. Aanesland, and R. Boswell, *Plasma Sources Sci. Technol.* 16, 217 (2007).
16. J. Torres, J. M. Palomares, A. Sola, J. J. A. M. van der Mullen, and A. Gamero, *J. Phys. D* 40, 5929 (2007).
17. S. Hofman, A.H. van Gessel, T. Verreychen, and P. Bruggeman, *Plasma Source Science and Technology* 20, 065010 (2011).
18. R. Pecora, *J. Nanopart. Res.* 2, 123 (2000).
19. R. C. Murdock, L. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, J. J. Schlager, S. M. Hussain, *Toxicol. Sci.* 101, 239 (2008).
20. C. Yubero, M.C. Garcia, and M.D. Calzada, *Spectrochimica Acta Part B.* 61, 540 (2006).
21. F. H. Chung, *J. Appl. Cryst.* 8, 17 (1975).
22. C. Shifu, Y. Xiaoling, Z. Huaye, and L. Wei, *J. Hazard. Mater.* 180, 735 (2010).

HOSTED BY



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Pharmacological Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jphs](http://www.elsevier.com/locate/jphs)

## Full paper

Differentiation-inducing factor-3 inhibits intestinal tumor growth *in vitro* and *in vivo*

Naoya Kubokura <sup>a,b</sup>, Fumi Takahashi-Yanaga <sup>a,c,\*</sup>, Masaki Arioka <sup>a</sup>, Tatsuya Yoshihara <sup>a</sup>, Kazunobu Igawa <sup>d</sup>, Katsuhiko Tomooka <sup>d</sup>, Sachio Morimoto <sup>a</sup>, Yoshimichi Nakatsu <sup>e</sup>, Teruhisa Tsuzuki <sup>e</sup>, Yusaku Nakabeppu <sup>f</sup>, Takayuki Matsumoto <sup>g</sup>, Takanari Kitazono <sup>b</sup>, Toshiyuki Sasaguri <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, 812-8582, Japan

<sup>b</sup> Department of Medicine and Clinical Science, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

<sup>c</sup> Global Medical Science Education Unit, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, 812-8582, Japan

<sup>d</sup> Department of Molecular and Material Science, Institute for Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, Kasuga, 816-8580, Japan

<sup>e</sup> Department of Medical Biophysics and Radiation Biology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, 812-8582, Japan

<sup>f</sup> Division of Neurofunctional Genomics, Department of Immunobiology and Neuroscience, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, 812-8582, Japan

<sup>g</sup> Division of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, 020-0023, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 November 2014

Received in revised form

13 March 2015

Accepted 18 March 2015

Available online 24 March 2015

## Keywords:

c-Myc

cyclin D1

DIF-3

TCF7L2

Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

## ABSTRACT

Differentiation-inducing factor-1 (DIF-1) produced by *Dictyostelium discoideum* strongly inhibits the proliferation of various types of cancer cells by suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin signal transduction pathway. In the present study, we examined the effect of differentiation-inducing factor-3 (DIF-3), a monochlorinated metabolite of DIF-1 that is also produced by *D. discoideum*, on human colon cancer cell lines HCT-116 and DLD-1. DIF-3 strongly inhibited cell proliferation by arresting the cell cycle at the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. DIF-3 reduced the expression levels of cyclin D1 and c-Myc by facilitating their degradation via activation of GSK-3 $\beta$  in a time and dose-dependent manner. In addition, DIF-3 suppressed the expression of T-cell factor 7-like 2, a key transcription factor in the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, thereby reducing the mRNA levels of cyclin D1 and c-Myc. Subsequently, we examined the *in vivo* effects of DIF-3 in *Mutvh*<sup>-/-</sup> mice with oxidative stress-induced intestinal cancers. Repeated oral administration of DIF-3 markedly reduced the number and size of cancers at a level comparable to that of DIF-1. These data suggest that DIF-3 inhibits intestinal cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, probably by mechanisms similar to those identified in DIF-1 actions, and that DIF-3 may be a potential novel anti-cancer agent.

© 2015 The Authors. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Japanese Pharmacological Society. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway plays essential roles in cell proliferation and differentiation, embryonic development, maintenance of tissue homeostasis, and several other biological processes. In cell proliferation, activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin

pathway results in upregulation of its target genes, such as cyclin D1 and c-myc, which play key roles in the initiation and progression of G<sub>1</sub> phase in the cell cycle (1, 2).

Under physiological conditions, the activity of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is tightly controlled by the  $\beta$ -catenin destruction complex in which glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) phosphorylates  $\beta$ -catenin to induce its proteasomal degradation in cooperation with axin and adenomatous polyposis coli (APC). However, mutations in components of the destruction complex or  $\beta$ -catenin itself can lead to hyperactivation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and promotion of cancer development (3–7). Indeed, the Wnt/ $\beta$ -

\* Corresponding author. Tel.: + 81 92 642 6887

E-mail address: [yanaga@clipharm.med.kyushu-u.ac.jp](mailto:yanaga@clipharm.med.kyushu-u.ac.jp) (F. Takahashi-Yanaga).

Peer review under responsibility of Japanese Pharmacological Society.

catenin pathway is constitutively active in most colorectal cancers, as well as in other types of malignant tumors (8–12).

Differentiation-inducing factors (DIFs) were identified in *D. discoideum* as morphogens required for differentiation to stalk cells (13, 14), and have been shown to strongly inhibit the proliferation of mammalian cells, regardless of whether they are normal or cancerous (7,15–25). DIF-1 [1-(3, 5-dichloro-2, 6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-1-hexanone] was the first identified member of the DIF family. We have reported that DIF-1 activates GSK-3 $\beta$  to phosphorylate and induce degradation of cyclin D1, c-Myc, and  $\beta$ -catenin, which leads to inhibition of *cyclin D1* and *c-Myc* transcription (16–23). Recently, we found that DIF-1 inhibits the expression of T-cell factor 7-like 2 (TCF7L2), a key transcription factor in the induction of Wnt target genes, which might explain why DIF-1 suppresses the proliferation of colon cancer cells with constitutive activation of  $\beta$ -catenin signaling (22–24). Indeed, repeated oral administration of DIF-1 inhibits oxidative stress-induced intestinal tumor growth *in vivo* in a dose-dependent manner (24).

*D. discoideum* metabolizes DIF-1 to the monochlorinated analogue DIF-3 [1-(3-chloro-2, 6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-1-hexanone] (14). We have previously reported that DIF-3 also exerts a strong antiproliferative effect on the human cervical cancer cell line HeLa by inducing cyclin D1 degradation and inhibiting *cyclin D1* mRNA expression (16). In some types of cancer cells, DIF-3 has been reported to exert more powerful antiproliferative effects than DIF-1 (16, 25).

Therefore, in the present study, we examined whether DIF-3 exerts antiproliferative effects on human colon cancer cell lines HCT-116 and DLD-1, which exhibit constitutive inactivation of the  $\beta$ -catenin destruction complex, and analyzed downstream components of the Wnt/ $\beta$ -catenin signal transduction pathway. Furthermore, we examined the effect of repeated oral administration of DIF-3 on intestinal cancer in *MutY*-deficient (*MutY*<sup>-/-</sup>) mice (26), which lack the MutY homolog (MUTYH), a mammalian DNA glycosylase that initiates base excision repair, and are thus susceptible to oxidative stress-induced carcinogenesis (27–29).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and antibodies

DIF-1 and DIF-3 were synthesized as described previously (13, 14). MG132 was purchased from the Peptide Institute (Osaka, Japan). SB216763 was purchased from BIOMOL International (Farmingdale, NY, USA). A monoclonal and a polyclonal anti-cyclin D1 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). A monoclonal anti-c-Myc antibody was purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). A monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin antibody was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). A monoclonal anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) antibody was purchased from Abcam (Cambridge, UK). A monoclonal anti-TCF7L2 antibody was purchased from Merck Millipore (Billerica, MA, USA). A monoclonal anti- $\beta$ -catenin antibody was purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

### 2.2. Cell culture

Human colon cancer cell lines HCT-116 (expressing wild-type APC and mutant  $\beta$ -catenin) and DLD-1 (expressing mutant APC and wild-type  $\beta$ -catenin) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin G, and 0.1  $\mu$ g/mL streptomycin.

### 2.3. Cell proliferation assay

HCT-116 or DLD-1 cells were seeded in 24-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well) and treated with various concentrations of DIF-1 or DIF-3 for the indicated periods. Cells were harvested by trypsin/EDTA treatment and counted using an automated cell counter (TC10; Bio-Rad, Tokyo, Japan).

### 2.4. Flow cytometry

Cells were suspended in a hypotonic solution containing 50  $\mu$ g/mL propidium iodide (PI), 0.1% sodium citrate, and 0.1% Triton X-100. PI-stained samples ( $1 \times 10^5$  cells) were analyzed for fluorescence with a FACScalibur (Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

### 2.5. Western blotting

Samples were separated by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred to a polyvinylidene fluoride membrane using a semidry transfer system (1 h at 12 V). Immunoreactive proteins were visualized by treatment with a detection reagent (LumiGLO; Cell Signaling Technology). Densitometric analysis was performed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### 2.6. Real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen). Reverse transcription was carried out using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, DriveRockville, MD, USA). Quantitative PCR was performed using TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix II, TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (*cyclin D1*, Hs0075553\_m1; *c-Myc*, Hs00153408\_m1; *GAPDH*, Hs99999905\_m1), and an ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). PCR conditions were initial denaturation for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. The expression levels of target genes were calculated from the  $\Delta\Delta C_t$  values. *GAPDH* was used as an internal control.

### 2.7. Plasmids

TOPflash (TCF reporter plasmid) and FOPflash (negative control for TOPflash) were purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). A cyclin D1 pGL3 basic luciferase reporter plasmid was a generous gift from Drs. O. Tetsu and F. McCormick (University of California, San Francisco, CA, USA). A TCF7L2 overexpression plasmid was generated as described previously (22).

### 2.8. Luciferase reporter assay

Cells were transfected with luciferase reporter plasmids and pRL-SV40, a *Renilla* luciferase expression plasmid as a control for transfection efficiency, using Lipofectamine Plus reagent (Invitrogen, Life Technologies). After 24 h, the cells were stimulated with DIF-3 for the indicated periods. Luciferase activity was determined with a luminometer (Lumat LB 9507; Berthold Technologies, Barsinghausen, Germany) and normalized against *Renilla* luciferase activity.

### 2.9. Intestinal tumor model

Induction of intestinal tumor formation (adenomas and carcinomas) in *MutY*<sup>-/-</sup> mice was carried out by a previously reported method (26). Briefly, KBrO<sub>3</sub> dissolved in water at a concentration of

2 g/L was administered to 4-week-old mice for 12 weeks. At 16 weeks of age, the mice were randomly divided into two groups (eight mice including four male mice and four female mice in each group). Mice in the test group were orally administered DIF-3 suspended in a 0.25% methylcellulose solution once a day for 5 days/week over 4 weeks. Control mice received the vehicle only. The body weight of the mice was monitored weekly. At 20 weeks of age, all mice were sacrificed to obtain blood and intestinal samples. Blood samples were analyzed for blood cell counts by a Celltac-alpha MEK-6358 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan). Intestines were fixed in 4% formaldehyde, and the tumors were observed under a microscope. Images of the tumors were obtained and analyzed using ImageJ software.

### 2.10. Histological analyses

Tumors of 1.0–2.0 mm in diameter, which had developed 3.0–5.0 cm distal from the pylorus, were resected from formaldehyde-fixed intestines. Samples were embedded in paraffin and subjected to hematoxylin-eosin (HE) and immunohistochemical staining. Briefly, the sections were incubated with the anti-TCF7L2 antibody (1:2000 dilution) or polyclonal anti-cyclin D1 antibody (1:100 dilution) overnight at 4 °C, followed by incubation with the secondary antibody (Histofine, Nichirei, Tokyo, Japan) for 1 h. The sections were then analyzed with a Biozero microscope (Keyence, Osaka, Japan).

### 2.11. Statistical analyses

Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analysis of differences between two mean values was performed using the Student's *t*-test. Multiple mean values were compared by one-way analysis of variance with the Dunnett's multiple comparison test (GraphPad Prism 5.0; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). *P*-values of less than 0.05 were considered statistically significant.

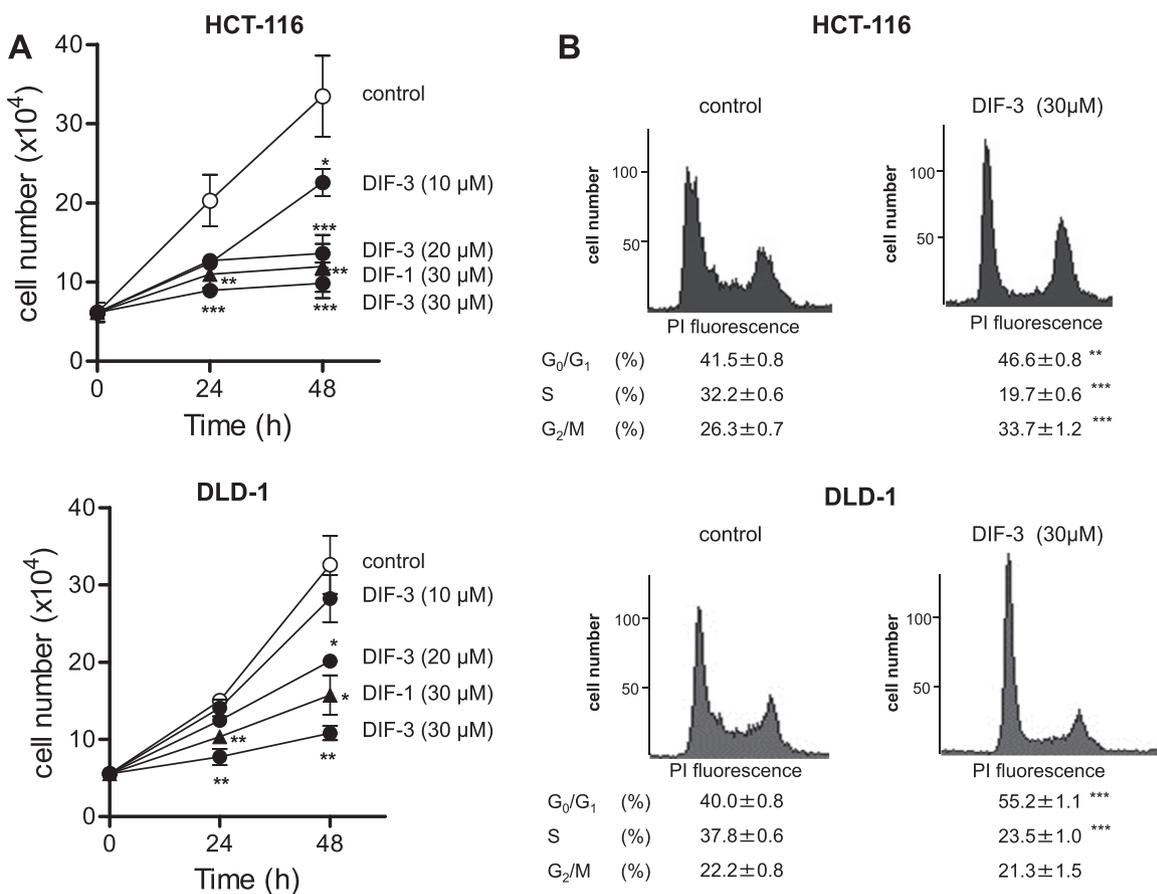
### 2.12. Ethics statement

This study protocol was approved by the Committee of Ethics on Animal Experiments at Kyushu University (Permit Number: A22-046-0). Animal handling and procedures were carried out in compliance with the Guidelines for Animal Experiments, Kyushu University, and the Law (No. 105) and Notification (No. 6) of the Japanese Government. All surgeries were performed under sodium pentobarbital anesthesia while making all efforts to minimize suffering.

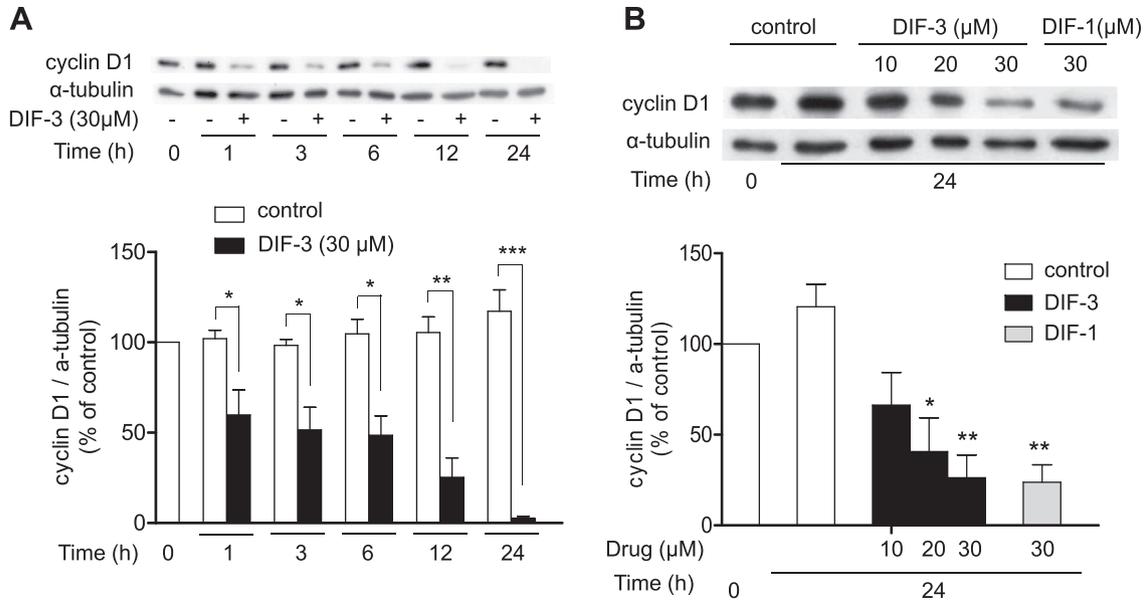
## 3. Results

### 3.1. Antiproliferative effect of DIF-3 on human colon cancer cells

First, we examined the effect of DIF-3 on the proliferation of the human colon cancer cell lines, HCT-116 and DLD-1. As shown in



**Fig. 1.** Antiproliferative effect of DIF-3 on human colon cancer cells. (A) Cell proliferation assay. HCT-116 and DLD-1 cells were seeded on a 24-well plate and treated with the indicated concentrations of DIF-1 or DIF-3 for the indicated periods. (B) Flow cytometric analysis. Cells were treated with DIF-3 (30  $\mu$ M) for 24 h and then harvested by trypsin/EDTA treatment. The cells were stained with PI and nuclear fluorescence was measured by flow cytometry. The percentages of cells in the various cell cycle phases are shown. The results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs. control.

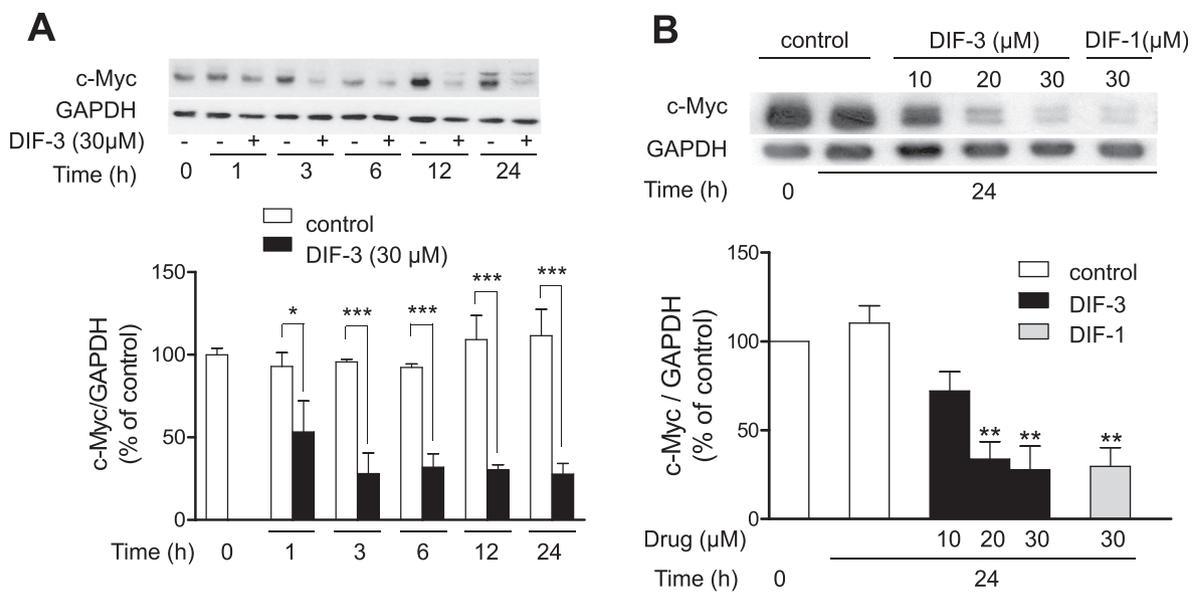


**Fig. 2.** DIF-3 suppresses the expression of cyclin D1 in HCT-116 cells. (A) Time course. HCT-116 cells were treated with or without DIF-3 (30  $\mu$ M) for the indicated periods. (B) Dose dependency. HCT-116 cells were treated with the indicated concentrations of DIF-1 or DIF-3 for 24 h. Protein samples were subjected to Western blot analysis using anti-cyclin D1 and anti- $\alpha$ -tubulin antibodies. Protein bands were quantified and are shown as the percentage of the control level at time 0. The results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control.

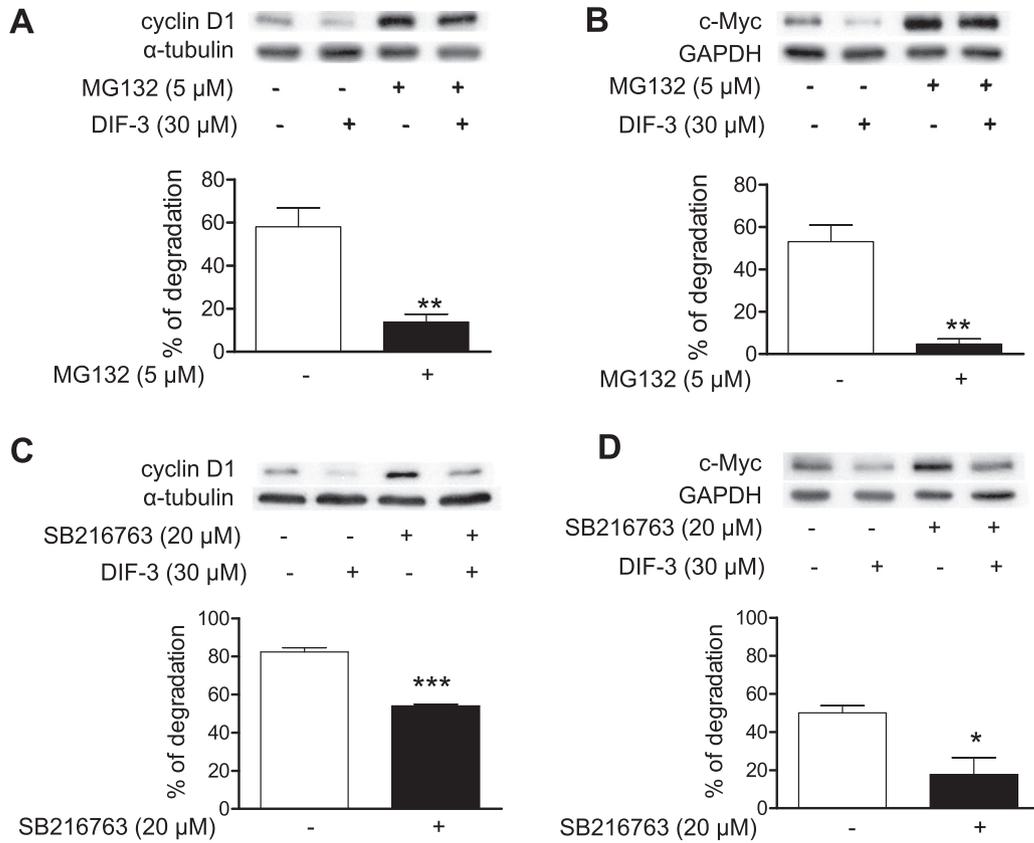
**Fig. 1A,** DIF-3 strongly inhibited proliferation in a dose-dependent manner in both cell lines. The effect of DIF-3 was slightly stronger than that of DIF-1, and HCT-116 cells were more sensitive to DIF-3 than DLD-1 cells. Flow cytometry showed that treatment with DIF-3 significantly increased the number of cells in  $G_0/G_1$  phase and decreased those in S phase in both cell lines (Fig. 1B). Although DIF-3 also significantly increased the number of cells in  $G_2$  phase when HCT-116 cells were employed, this effect was not observed by using DLD-1 cells. These results indicated that DIF-3 arrested the cell cycle at  $G_0/G_1$  phase.

**3.2. DIF-3 induces proteolysis of cyclin D1 and c-Myc in HCT-116 cells via activation of GSK-3 $\beta$**

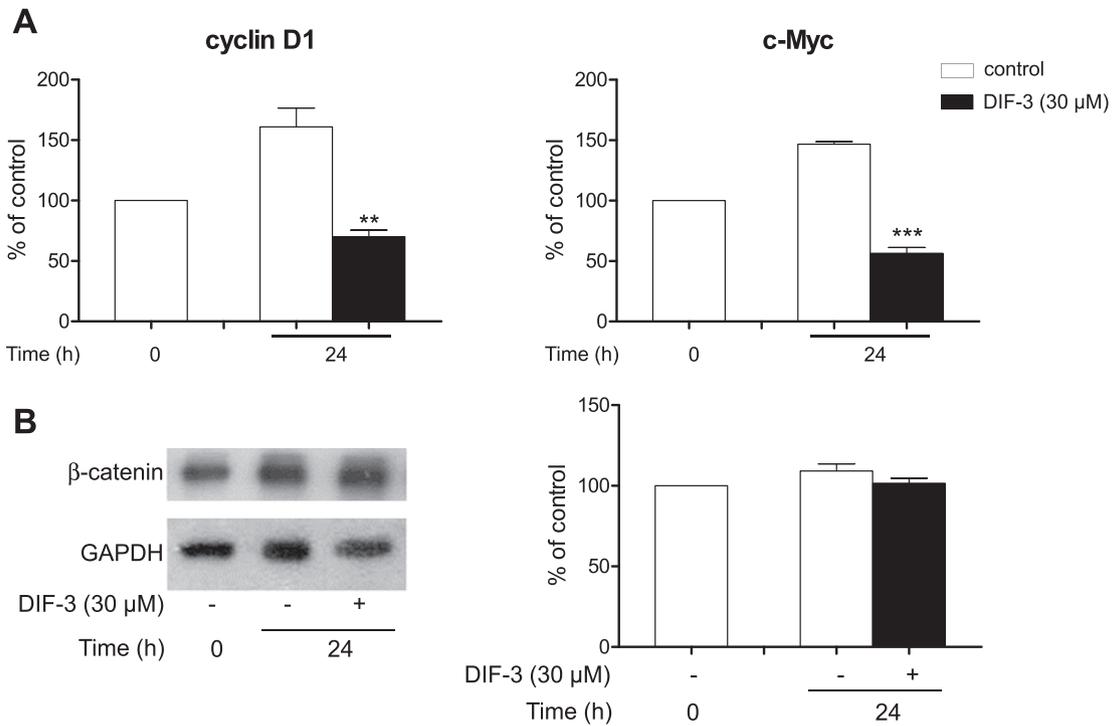
Because DIF-3 induces cell cycle arrest at  $G_0/G_1$  phase by suppressing cyclin D1 expression in HeLa cells (16), we examined the effect of DIF-3 on the expression of cyclin D1 in HCT-116 cells, in which  $\beta$ -catenin is constitutively active. As shown in Fig. 2A and B, a rapid and marked reduction in the amount of cyclin D1 protein in a time and dose-dependent manner was induced by DIF-3. Furthermore, treatment with DIF-3 resulted in a strong reduction in the



**Fig. 3.** DIF-3 suppresses the expression of c-Myc in HCT-116 cells. (A) Time course. Cells were treated with or without DIF-3 (30  $\mu$ M) for the indicated periods. (B) Dose dependency. Cells were treated with the indicated concentrations of DIF-1 or DIF-3 for 24 h. Protein samples were subjected to Western blot analysis using anti-c-Myc and anti-GAPDH antibodies. Protein bands were quantified and are shown as the percentage of the control level at time 0. The results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control.



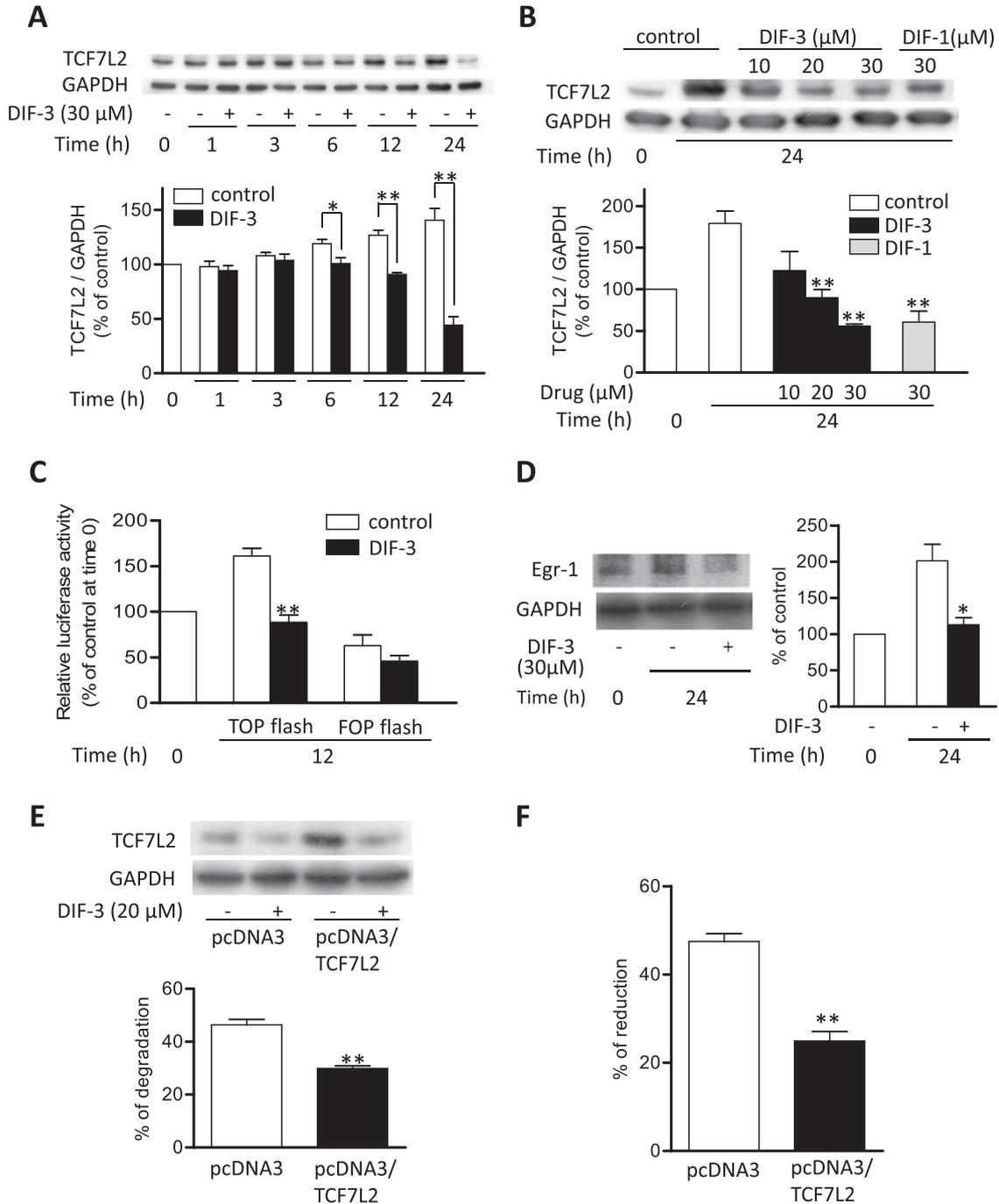
**Fig. 4.** DIF-3 induces degradation of cyclin D1 and c-Myc in HCT-116 cells. Cells pretreated with MG132 for 1 h (A and B) or SB216763 for 3 h (C and D) were treated with or without DIF-3 (30  $\mu$ M) for 1 h. Samples were subjected to Western blot analysis using anti-cyclin D1 and anti- $\alpha$ -tubulin antibodies (A and C) or anti-c-Myc and GAPDH antibodies (B and D). Protein bands were quantified and are shown as the percentages of the degraded amounts. Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control.



**Fig. 5.** DIF-3 represses the expression of *cyclin D1* and *c-Myc* mRNA without decreasing the amount of  $\beta$ -catenin protein in HCT-116 cells. (A) mRNA expression. Cells were treated with or without 30  $\mu$ M DIF-3 for 24 h. Total RNA was isolated and subjected to quantitative PCR to analyze *cyclin D1*, *c-Myc*, and *GAPDH* mRNA expression. The levels of mRNA expression were quantified and are shown as the percentage of the control level at time 0. (B)  $\beta$ -catenin protein. Cells were treated with or without DIF-3 (30  $\mu$ M) for 24 h. Protein samples were subjected to Western blot analysis using anti- $\beta$ -catenin and anti-GAPDH antibodies. Protein bands were quantified and are shown as the percentage of the control level at time 0. Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control.

expression levels of c-Myc in a time and dose-dependent manner (Fig. 3A and B). DIF-3 decreased the expression of cyclin D1 and c-Myc to a level comparable to the reduction induced by DIF-1 (Figs. 2B and 3B).

To determine the mechanisms of the DIF-3-induced reduction in the expression levels of cyclin D1 and c-Myc, we examined the effect of MG132, a ubiquitin-proteasome inhibitor, on the actions of DIF-3. As shown in Fig. 4A and B, pretreatment with MG132



**Fig. 6.** DIF-3 inhibits the expression of TCF7L2 and suppresses TCF-dependent transcription in HCT-116 cells. (A) Time course. Cells were treated with or without DIF-3 (30 μM) for the indicated periods. (B) Dose dependency. Cells were treated with or without the indicated concentrations of DIF-1 or DIF-3 for 24 h. Protein samples were subjected to Western blot analysis using anti-TCF7L2 and anti-GAPDH antibodies. Protein bands were quantified and are shown as the percentage of the control level at time 0. (C) Effects of DIF-3 on TCF-dependent transcriptional activity. TOPFlash or FOPFlash were co-transfected with pRL-SV40 into HCT-116 cells. After 24 h of incubation, the cells were stimulated with 20 μM DIF-3 for 12 h. Luciferase activity is shown as the percentage of the control level at time 0. (D) Egr-1 protein. Cells were treated with or without DIF-3 (30 μM) for 24 h. Protein samples were subjected to Western blot analysis using anti-Egr-1 and anti-GAPDH antibodies. Protein bands were quantified and are shown as the percentage of the control level at time 0. (E) TCF7L2 overexpression. The pcDNA3 or pcDNA3/TCF7L2 plasmid was transfected into HCT-116 cells. After 24 h, the cells were treated with or without DIF-3 (20 μM) for 12 h. Protein samples were subjected to Western blotting using anti-TCF7L2 and anti-GAPDH antibodies. Protein bands were quantified and shown as percentage of the decrease in the amount of TCF7L2. (F) Cyclin D1 promoter activity using TCF7L2-overexpressed cells. Cyclin D1 promoter and pcDNA3 or pcDNA3/TCF7L2 plasmids were co-transfected with pRL-SV40 into HCT-116 cells. After 24 h of incubation, the cells were treated with or without DIF-3 (20 μM) for 12 h. Data are shown as percentages of the reduction in luciferase activity. Values are the mean ± SEM of three independent experiments. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs. control.

markedly attenuated the effects of DIF-3, indicating that DIF-3 accelerated ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis of cyclin D1 and c-Myc. Because GSK-3 $\beta$  has been reported to trigger proteolysis of cyclin D1 and c-Myc (30, 31), we determined whether GSK-3 $\beta$  was involved in the DIF-3-induced degradation of cyclin D1 and c-Myc using the GSK-3 $\beta$  inhibitor SB216763. As shown in Fig. 4C and D, pretreatment with SB216763 (20  $\mu$ M for 3 h) attenuated the effect of DIF-3, indicating the involvement of GSK-3 $\beta$  in the DIF-3-induced degradation of cyclin D1 and c-Myc.

### 3.3. DIF-3 suppresses TCF-mediated transcription in HCT-116 cells

Interestingly, DIF-3 not only accelerated the proteolysis of cyclin D1 and c-Myc, but also reduced their mRNA levels (Fig. 5A). These effects could not be explained by inhibition of  $\beta$ -catenin, because the mutant  $\beta$ -catenin expressed in HCT-116 cells is resistant to the  $\beta$ -catenin destruction complex. In fact, DIF-3 had no effect on the expression level of  $\beta$ -catenin (Fig. 5B).

To solve this enigma, we examined the effect of DIF-3 on the expression of TCF7L2, a key transcription factor in the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. The amount of TCF7L2 increased gradually over time in control cells, but it was markedly reduced by DIF-3 in a time and dose-dependent manner (Fig. 6A and B). Consistently, the TCF-mediated transcription measured by the TOPflash assay was strongly suppressed in cells treated with DIF-3 (Fig. 6C). Furthermore, we investigated the effect of DIF-3 on early growth response-1 (Egr-1), because we had previously found that DIF-1 suppresses TCF7L2 expression by decreasing the expression

of Egr-1, a transcription factor of TCF7L2 (22). As shown in Fig. 6D, treatment with DIF-3 for 24 h reduced the protein level of Egr-1.

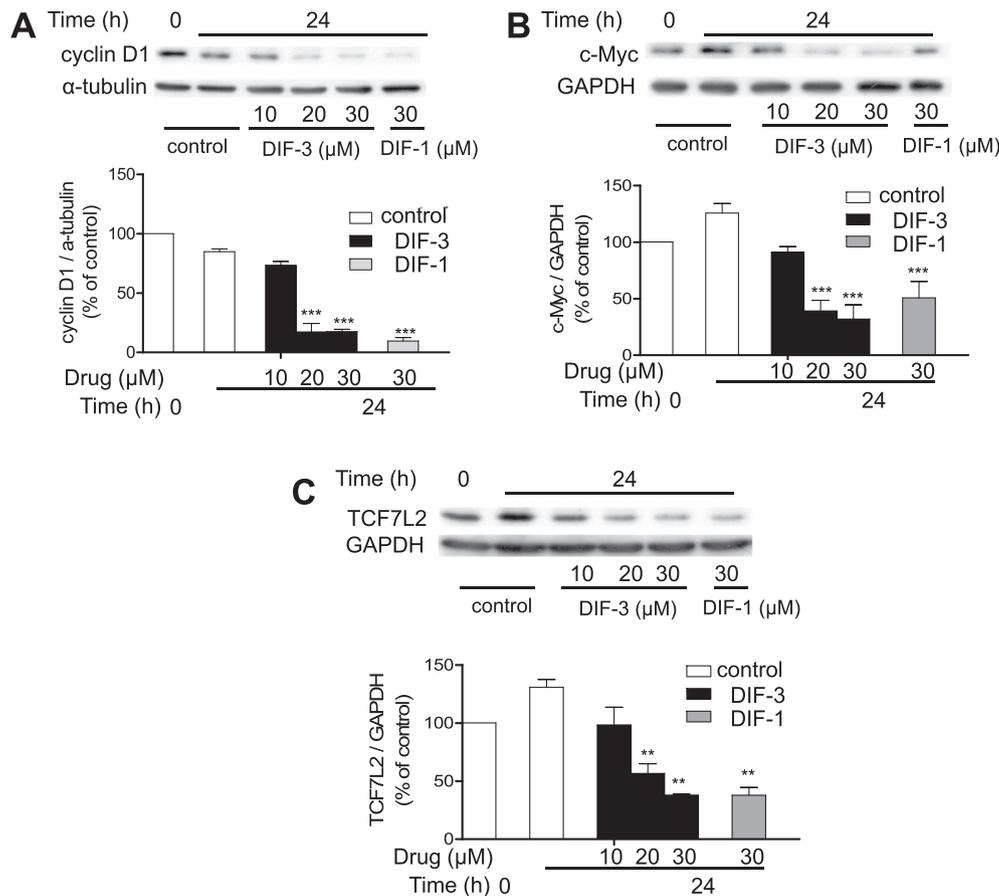
Next, we overexpressed TCF7L2 to confirm its involvement in the action of DIF-3. As shown in Fig. 6E, stimulation with DIF-3 for 12 h reduced the expression level of TCF7L2 in cells transfected with the empty pcDNA3 vector, whereas this effect was attenuated in cells transfected with pcDNA3/TCF7L2. Subsequently, we examined the effect of DIF-3 on cyclin D1 promoter activity. Compared with cells transfected with the empty pcDNA3 vector, the effect of DIF-3 was attenuated in cells overexpressing TCF7L2 (Fig. 6F). These results suggested that the DIF-3-induced reduction of TCF7L2 was associated with the transcriptional inhibition of cyclin D1 mRNA in HCT-116 cells.

### 3.4. DIF-3 inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway-related proteins in DLD-1 cells

We next examined the mechanism by which DIF-3 inhibited the proliferation of DLD-1 cells in which the function of the  $\beta$ -catenin destruction complex is impaired by mutant APC. As demonstrated in Fig. 7, similar to its effect on HCT-116 cells, DIF-3 markedly reduced the expression levels of cyclin D1, c-Myc, and TCF7L2 in DLD-1 cells.

### 3.5. Inhibitory effect of DIF-3 on oxidative stress-induced tumors in *Mutyh*<sup>-/-</sup> mice

To investigate the anti-tumor effect of DIF-3 *in vivo*, we used mice deficient for MUTYH (*Mutyh*<sup>-/-</sup>), an enzyme that prevents the



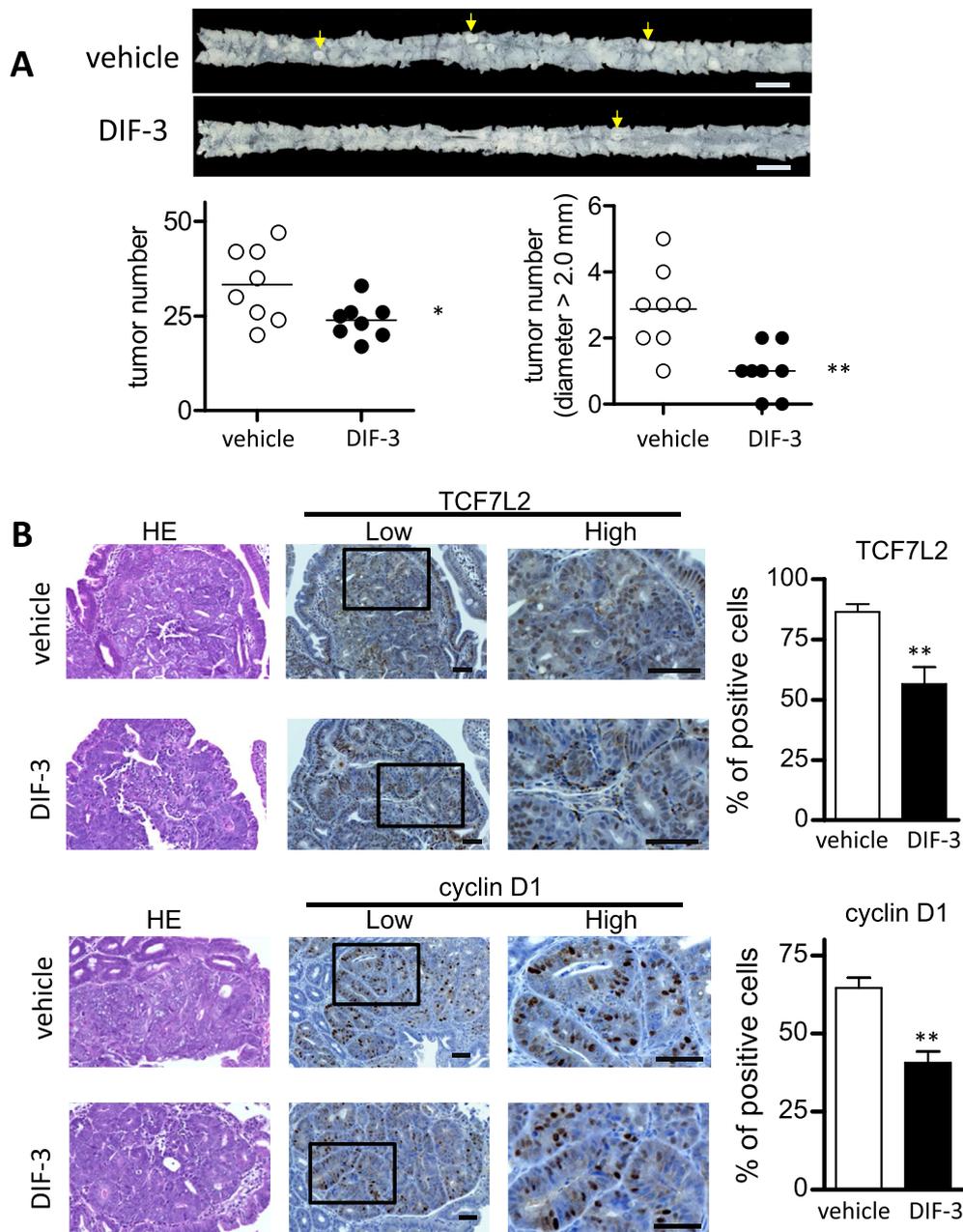
**Fig. 7.** Effect of DIF-3 in DLD-1 cells. DLD-1 cells were treated with the indicated concentrations of DIF-1 or DIF-3 for 24 h. Protein samples were subjected to Western blot analysis using anti-cyclin D1 (A), anti-c-Myc (B), or anti-TCF7L2 (C) antibodies. Protein bands were quantified and are shown as the percentage of the control at time 0. Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control.

formation of oxidative stress-induced DNA lesions. Previous studies have shown that MUTYH deficiency may be involved in the development of colorectal adenomas and carcinomas in humans (27–29). Furthermore, we have previously reported dramatic increases in the occurrence of oxidative stress-induced carcinomas in the small intestines of *Mutyh*<sup>-/-</sup> mice in comparison with normal mice (24, 26).

Twelve weeks of treatment with 0.2% KBrO<sub>3</sub>, a strong oxidant, induced numerous intestinal tumors in *Mutyh*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 8A). To evaluate the effect of DIF-3 on these tumors, DIF-3 or the vehicle only were orally administered to *Mutyh*<sup>-/-</sup> mice for 4 weeks.

Treatment with DIF-3 (150 mg/kg/day for 4 weeks) markedly reduced the number of intestinal tumors, especially the number of large tumors with a diameter of >2.0 mm (Fig. 8A). There were no differences in the appearance, activity, body weight, or blood cell counts between DIF-3-treated mice and the controls (Supplementary Figure 1).

Subsequently, we performed immunohistochemical analyses of the tumors. As shown in Fig. 8B, the numbers of TCF7L2- and cyclin D1-positive nuclei in tumors were significantly decreased in the DIF-3-treated group compared with the control, which was consistent with the *in vitro* experimental results.



**Fig. 8.** Effect of DIF-3 on intestinal tumors induced by KBrO<sub>3</sub> in *Mutyh*<sup>-/-</sup> mice. (A) Upper panels: proximal region of the small intestines. Arrows indicate tumors of >2.0 mm in diameter. Scale bar: 1 cm. Lower left panel: tumor numbers were plotted for each mouse. Lower right panel: the number of tumors of >2.0 mm in diameter was plotted for each mouse. Horizontal bars indicate the mean of each group (n = 8). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. vehicle. (B) Histological analyses of intestinal tumors. Tumor samples (n = 5 in each group) were stained with anti-TCF7L2 (upper) or anti-cyclin D1 (lower) antibodies. Black square indicates the magnified area. Scale bar: 50 μm. More than 100 nuclei were counted in each tumor sample and percentages of stained nuclei was shown. Values are shown as the mean ± SEM of five individual samples. \*\*P < 0.01 vs. vehicle.

#### 4. Discussion

Based on our earlier investigations on the DIF family, we hypothesized that DIFs arrest the cell cycle by inducing degradation of proteins essential for cell proliferation such as cyclin D1 and  $\beta$ -catenin. Degradation of  $\beta$ -catenin further prevents TCF-mediated transcription of several genes required for cell proliferation (15–21). According to this hypothesis, the action of DIFs appears to require an intact  $\beta$ -catenin destruction complex. Therefore, we speculated that DIFs would be unable to inhibit colorectal cancer cell proliferation because of the impaired functions of the  $\beta$ -catenin destruction complex in most colorectal cancers, including MUTYH-associated polyposis, which are caused by mutations in its components such as  $\beta$ -catenin and APC (7–12,27–29). However, in contrast to this hypothesis, we found that DIF-1 strongly inhibited the proliferation of colorectal cancer cells through suppression of TCF7L2 transcription by downregulation of Egr-1 levels in the nucleus, resulting in the inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway (22). Consistent with our study, Saegusa et al (32) reported that TCF7L2 promoter activity is regulated by Egr-1. According to these observations, downregulation of Egr-1 expression might be one of the important actions of DIF-1 in suppression of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

Thus, we determined whether only DIF-1 inhibits the proliferation of colon cancer cells irrespective of the  $\beta$ -catenin destruction complex or whether this action is shared by other DIF family members, particularly DIF-3, because DIF-3 exerts stronger effects than DIF-1 on suppression of human cancer cell proliferation (16, 25). Specifically, we investigated whether DIF-3 can inhibit the proliferation of colorectal cancers with impaired  $\beta$ -catenin destruction machinery with respect to its effect on TCF7L2. DIF-1 and DIF-3 demonstrated essentially the same effects. DIF-3 also had an antiproliferative effect on HCT-116 and DLD-1 cells, and reduced the expression levels of cyclin D1, c-Myc, and TCF7L2 despite the mutant  $\beta$ -catenin or APC. In addition, DIF-3, but not DIF-1, led to a significant increase in the number of HCT-116 cells in G<sub>2</sub> phase, whereas this effect was not seen in DLD-1, HeLa or bovine aortic endothelial cells in which proliferation is strongly inhibited by DIF-3 (16). Therefore, cell cycle arrest at G<sub>2</sub>/M phase may not be essential for the action of DIF-3. Moreover, DIF-3 exhibited an anti-tumor effect in *Mutyh*<sup>-/-</sup> mice, a useful animal model for colorectal adenocarcinoma, without apparent adverse drug reactions. Oral administration of DIF-3 markedly reduced the number of intestinal tumors, especially that of large tumors (>2.0 mm in diameter), suggesting that DIF-3 has potential as a novel anti-cancer agent.

We expected that the anti-tumor effect of DIF-3 on colorectal cancer cells, if any, would be stronger than that of DIF-1, because it has been reported that DIF-3 has more powerful effects than DIF-1 to inhibit the proliferation of HeLa cells (16) and the human leukemia cell line K562 (25). However, in the present study, the efficacy of DIF-3 was comparable to that of DIF-1 in HCT-116 and DLD-1 cells. Moreover, the *in vivo* effects of DIF-3 in the oxidative stress-induced intestinal tumor model appeared to be weaker than those of DIF-1 (24). Although we cannot exactly explain the reason for these results, we speculate that the presence or absence of mutations in the  $\beta$ -catenin destruction complex could have caused the difference in sensitivity to DIF-1 and DIF-3 between the cell lines. The  $\beta$ -catenin destruction complex is impaired in HCT-116 and DLD-1 cells, but it is intact in HeLa and K562 cells. Therefore, the anti-tumor effect of DIF-3 may be more dependent on suppression of  $\beta$ -catenin signaling than that of DIF-1. Further studies are required to examine this issue.

Similar to DIF-1, we assume that DIF-3 is a potential lead compound as a novel oral anti-cancer drug with unique mechanisms of action. However, to identify and develop an optimal compound, it is

critical to identify the target molecule(s) of the DIF family. Despite our and others' efforts, the target molecule(s) of the DIF family, which mediate their antiproliferative effect on cancer cells, have not been identified. Shimizu *et al.* have suggested that PDE1 (calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase) may be a target of DIFs (33). In addition, we have reported that mitochondrial malate dehydrogenase may be one of the target molecules of DIF-1 (34). However, the effects of DIFs on these molecules does not appear to correlate with their antiproliferative effects (33, 34). Identification of these target molecule(s) may not only reveal the precise mechanisms of action of the DIF family, but also facilitate the design of novel anticancer drugs with unique mechanisms of action.

#### Conflicts of interest

The authors indicated no potential conflicts of interest.

#### Acknowledgments

This work was supported by Kakenhi grants from the Japan Society for the Promotion of Science (21590284 and 25460334 to FTY).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphs.2015.03.005>.

#### References

- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 1996;274:1672–1677.
- Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:976–990.
- Barnes DM, Gillett CE. Cyclin D1 in breast cancer. *Brest Cancer Res Treat*. 1998;52:1–15.
- Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*. 1999;18:3004–3016.
- Utsunomiya T, Doki Y, Takemoto H, Shiozaki H, Yano M, Sekimoto M, et al. Correlation of  $\beta$ -catenin and cyclin D1 expression in colon cancers. *Oncology*. 2001;61:226–233.
- Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004;145:5439–5447.
- Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. Drug development targeting the glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )-mediated signal transduction pathway: inhibitors of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway as novel anticancer drugs. *J Pharmacol Sci*. 2009;109:179–183.
- Logan CV, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:781–810.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of  $\beta$ -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in  $\beta$ -catenin or APC. *Science*. 1997;275:1787–1790.
- Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet*. 2000;24:245–250.
- McDonald SA, Preston SL, Lovell MJ, Wright NA, Jankowski JA. Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006;3:267–274.
- Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene*. 2006;25:7531–7537.
- Morris HR, Taylor GW, Masento MS, Jermyn KA, Kay RR. Chemical structure of the morphogen differentiation inducing factor from *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. 1987;328:811–814.
- Morris HR, Masento MS, Taylor GW, Jermyn KA, Kay RR. Structure elucidation of two differentiation inducing factors (DIF-2 and DIF-3) from the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem J*. 1988;249:903–906.
- Miwa Y, Sasaguri T, Kosaka C, Taba Y, Ishida A, Abumiya T, et al. Differentiation-inducing factor-1, a morphogen of dictyostelium, induces G<sub>1</sub> arrest and differentiation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000;86:68–75.
- Takahashi-Yanaga F, Taba Y, Miwa Y, Kubohara Y, Watanabe Y, Hirata M, et al. Dictyostelium differentiation-inducing factor-3 activates glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and degrades cyclin D1 in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2003;278:9663–9670.

- (17) Yasmin T, Takahashi-Yanaga F, Mori J, Miwa Y, Hirata M, Watanabe Y, et al. Differentiation-inducing factor-1 suppresses gene expression of cyclin D1 in tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338:903–909.
- (18) Matsuzaki E, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Hirata M, Watanabe Y, Sato N, et al. Differentiation-inducing factor-1 alters canonical Wnt signaling and suppresses alkaline phosphatase expression in osteoblast-like cell lines. *J Bone Min Res.* 2006;21:1307–1316.
- (19) Takahashi-Yanaga F, Mori J, Matsuzaki E, Watanabe Y, Hirata M, Miwa Y, et al. Involvement of GSK-3 $\beta$  and DYRK1B in differentiation-inducing factor-3-induced phosphorylation of cyclin D1 in HeLa cells. *J Biol Chem.* 2006;281:38489–38497.
- (20) Mori J, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Watanabe Y, Hirata M, Morimoto S, et al. Differentiation-inducing factor-1 induces cyclin D1 degradation through the phosphorylation of Thr<sup>286</sup> in squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res.* 2005;310:426–433.
- (21) Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Shiraishi F, Morimoto S, Watanabe Y, Hirata M, et al. Anti-angiogenic effects of differentiation-inducing factor-1 involving VEGFR-2 expression inhibition independent of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Mol Cancer.* 2010;9:245.
- (22) Jingushi K, Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Shiraishi F, Watanabe Y, Hirata M, et al. DIF-1 inhibits the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by inhibiting TCF7L2 expression in colon cancer cell lines. *Biochem Pharmacol.* 2012;83:47–56.
- (23) Jingushi K, Nakamura T, Takahashi-Yanaga F, Matsuzaki E, Watanabe Y, Yoshihara T, et al. Differentiation-inducing factor-1 suppresses the expression of c-Myc in the human cancer cell lines. *J Pharmacol Sci.* 2013;121:103–109.
- (24) Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Jingushi K, Igawa K, Tomooka K, Watanabe Y, et al. DIF-1 inhibits tumor growth in vivo reducing phosphorylation of GSK-3 $\beta$  and expressions of cyclin D1 and TCF7L2 in cancer model mice. *Biochem Pharmacol.* 2014;89:340–348.
- (25) Kubohara Y. Effects of differentiation-inducing factors of *Dictyostelium discoideum* on human leukemia K562 cells: DIF-3 is the most potent anti-leukemic agent. *Eur J Pharmacol.* 1999;381:57–62.
- (26) Sakamoto K, Tominaga Y, Yamauchi K, Nakatsu Y, Sakumi K, Yoshiyama K, et al. MUTYH-deficient mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress induced intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2007;67:6599–6604.
- (27) Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G: C $\rightarrow$ T: a mutations in colorectal tumors. *Nat Genet.* 2002;30:227–232.
- (28) Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet.* 2003;362:39–41.
- (29) Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RK, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med.* 2003;348:791–799.
- (30) Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1997;11:957–972.
- (31) Gregory MA, Qi Y, Hann SR. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J Biol Chem.* 2003;278:51606–51612.
- (32) Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Hamano M, Watanabe J, Kawaguchi M, et al. Transcription factor Egr1 acts as an upstream regulator of  $\beta$ -catenin signaling through up-regulation of TCF4 and p300 expression during trans-differentiation of endometrial carcinoma cells. *J Pathol.* 2008;216:521–532.
- (33) Shimizu K, Murata T, Tagawa T, Takahashi K, Ishikawa R, Abe Y, et al. Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphatase (PDE1) is a pharmacological target of differentiation-inducing factor-1, an antitumor agent isolated from *Dictyostelium*. *Cancer Res.* 2004;64:2568–2571.
- (34) Matsuda T, Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Maenaka K, Watanabe Y, Miwa Y, et al. *Dictyostelium* differentiation-inducing factor-1 binds to mitochondrial malate dehydrogenase and inhibits its activity. *J Pharmacol Sci.* 2010;112:320–326.