

労災疾病臨床研究事業費補助金

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 26 年度～28 年度 総合研究報告書

研究代表者 田中 昭代

平成 29 (2017) 年 3 月

目 次

I.	総合研究報告 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.	平成26年度 研究報告 -----	4
III.	平成27年度 研究報告 -----	10
IV.	平成28年度 研究報告 -----	19
V.	研究成果の刊行に関する一覧表 -----	29
VI.	研究成果の刊行物・別冊 -----	31

平成26年～28年度
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

総合研究報告書

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

① IT0 等インジウム化合物製造・リサイクル作業者のコホート調査

平成 26 年～平成 28 年の本研究期間中に平成 26 年度 4 工場、平成 27 年度 6 工場、平成 28 年度 10 工場の計 20 箇所（重複あり）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（延べ 672 名）に健康調査を施行した。

調査期間中に認めた肺がんの罹患者数は、平成 26 年度 0 人、平成 27 年度 2 人、平成 28 年度 0 人の計 2 人（3 年間）であった。インジウム曝露と肺がんの関連を検証するには、追跡期間の限界もあり、さらに継続した経過観察が今後必要である。

平成 26 年の調査対象集団の調査では、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るなか、これまでの影響指標として明瞭な量・反応関係、量・影響関係を示した間質性肺炎のバイオマーカーの血清 KL-6 濃度も低下するも量・影響関係は示していた。しかし、平成 27、28 年の調査対象集団の調査では、現曝露群・過去曝露群ともに非曝露群と比して、KL-6 値の平均値や有所見率に有意な差は認めなくなった。一方、肺機能検査は、インジウム曝露量の多い過去曝露群で、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。また、血清インジウム濃度（In-S）高値者は、肺機能検査の拘束性/閉塞性障害、胸部 CT 所見の改善は乏しく、不可逆性の変化となることが示唆された。

平成 27 年、28 年度の調査では、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。インジウム肺障害の診断基準に関しては、本研究で測定した 10 年目の追跡データを基に詳細胸部 CT 画像所見等も加味し確立していく。

② 金属インジウム取扱い作業者の疫学調査

金属インジウム曝露作業者は、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、これまで同様の肺影響が生じることが示唆された。

③ レアメタル（Te、Ga）取り扱い作業者の調査

平成28年度にテルル（Te）、ガリウム（Ga）取り扱い作業者の調査をM工場（31名）で調査

した。Te、Ga取り扱い作業者の曝露評価として曝露歴、血清テルル濃度 (Te-S) および血清ガリウム濃度 (Ga-S) を測定した。Te現曝露群8人中5人、Ga現曝露群12人中9人で血清中にTeまたはGaが検出された。Te-SとGa-Sの中央値は各々 $1.3 \mu\text{g/L}$ (Te)、 $0.3 \mu\text{g/L}$ (Ga)、最高値は、 $45.0 \mu\text{g/L}$ (Te)、 $3.2 \mu\text{g/L}$ (Ga) であった。過去曝露群のTe-SとGa-Sは、ともにほぼ定量下限以下で、非曝露群と過去曝露群の間では明らかな差は認めなかった。Te、Gaの現曝露者では血清中からTeとGaが検出されたことより、血清Te、Ga濃度は曝露の指標として有用であると考えられた。

④ 作業環境測定調査

作業環境濃度測定は、平成 26 年度 1 工場、平成 27 年度 1 工場、平成 28 年度 2 工場の計 4 箇所（重複あり）のインジウム取り扱い工場で施行した。

ITO 研削作業場の作業環境測定、個人曝露濃度（マスク外）およびマスク内の濃度測定を行った。吸入性粉じん中のインジウム濃度測定の結果、各年度とも目標濃度の $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ を上回り、「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。インジウム化合物取り扱い工場の作業環境管理・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が、小規模工場では作業環境測定濃度の改善が鈍化してきていることが示された。

電動ファン付き呼吸用保護具装着時の曝露状態を示すマスク内インジウム濃度は、許容される濃度 $0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ より低い値であることが確認され、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減少していることが示唆された。当該作業場では作業環境濃度の改善が鈍化するなかでも、血清インジウム濃度が低下していることから、電動ファン付き呼吸用保護具による実質的なインジウム曝露の防止効果が認められた。さらに、画像映像と経時的な粉じんの個人曝露濃度推移による解析から平面研削・エアブロー時に高い濃度のピークが確認され、高濃度にインジウム曝露されている作業の特定が可能となった。

⑤ 動物実験

ITO ターゲットリサイクル工程で製造される水酸化インジウム ($\text{In}(\text{OH})_3$) や酸化インジウム (In_2O_3) および ITO ターゲット研削粉 (ITO)、さらに、インジウム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 (Cu-In-Ga-Se:CIGS) や化合物半導体であるインジウム・ガリウム・亜鉛酸化物 (IGZO) をラットの気管内へ投与し、肺障害発現について評価した。

その結果、ITO リサイクル工程で製造されるインジウム化合物の中で $\text{In}(\text{OH})_3$ は ITO や In_2O_3 に比べて肺障害は強く発現し、ITO リサイクル工程の $\text{In}(\text{OH})_3$ 発生作業場では特段の作業環境管理、作業管理が必要であることが示された。さらに、CIGS や IGZO 粒子の投与により肺障害が引き起こされ、これらの粒子の亜慢性毒性発現を初めて確認した。また、CIGS に関しては最小毒性量を求めるために低投与量の CIGS 粒子をラット気管内投与に投与し、最小投与量 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ より肺障害が発現したことより、今回の実験の投与量の範囲での最小毒性量は $0.1\text{mg}/\text{kg}$ であり、CIGS $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ($0.025\text{mgIn}/\text{kg}$) の吸入曝露濃度は $0.014\text{mg}/\text{m}^3$

と推計された。この推計濃度は厚労省の通達の目標濃度（In として $0.01\text{mg}/\text{m}^3$ とほぼ同じレベルであり、低濃度の CIGS 曝露においても十分に注意を払う必要があると考えられた。

一方、疫学調査では作業者の影響指標として間質性肺炎マーカーを評価しているが、今回の一連のインジウム化合物投与実験においても間質性肺炎マーカーの一つである血清 SP-D 濃度の測定を行い、量・反応関係、量・影響関係を示した。ヒトと同様に実験動物においても血清 SP-D 濃度は肺障害の有用な指標であることが明らかになった。

各研究の詳細については、次頁からの 3 年分の総括研究報告を参照されたい。

平成 26 年度
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26年度は疫学調査、環境調査を実施し、動物実験では種々の化学形態のインジウム化合物の肺障害について検討を行った。

疫学調査ではインジウム製造工場、リサイクル工場および金属インジウム合金製造工場に勤務する作業者に健康調査を施行した。インジウム製造工場 1 か所では作業環境測定調査を施行した。本年度の調査では、肺がんを含む発がん疾患は認めなかった。疫学調査の結果から血清インジウム濃度や間質性肺炎のバイオマーカーである血清 KL-6 濃度は低下してきているが、依然として量・影響関係は示している。一方、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 所見の改善は乏しい。過去に曝露した難溶性化合物の IT0 は今も肺内に残存し、肺内炎症は持続している可能性や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るため、今後の継続健診で経過観察する必要がある。また、高温溶解作業の金属インジウム曝露者は、IT0 等のインジウム化合物と同様の影響を認めたため、健康影響に定期的に評価する必要がある。

作業環境調査では、就業期間 1 年以内の新規作業員では血清インジウム濃度高値を認める作業員もあり、さらなる作業環境管理上の工学的な対策を行うとともに、作業管理として作業のやり方・姿勢、使用工具の見直しなどの対策も行い、個人曝露濃度を下げる改善が必要である。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が示唆された。

動物実験においては、IT0 ターゲット廃材の粉碎から酸化インジウム製造のリサイクル工程で精製される水酸化インジウムと IT0 ターゲット研削粉 (IT0)、酸化インジウム (In_2O_3) の肺障害についてラットを用いて比較検討を行った。その結果、水酸化インジウム粒子の反復経気道投与によって、IT0 粒子や In_2O_3 粒子に比べて肺障害は強く発現した。IT0 や In_2O_3 粒子に加えて水酸化インジウム粒子の投与によっても肺障害が引き起こされることが明らかになった。インジウムの化学形態による肺障害の差はあるものの、各インジウム化合物は肺障害を引き起こすため、インジウム化合物の曝露や取り扱いには十分注意を払う必要がある。

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

レアメタルであるインジウムの曝露による死亡事例が平成13年に世界で初めてわが国で発生し、その後の疫学研究によりインジウム化合物吸入と肺障害の因果関係を確立した。一方、主要なインジウム化合物であるITOの動物発がん実験より肺発がん性が明らかになり、今後のインジウム作業員での肺がん発生が非常に危惧される。さらに、これらのインジウム作業員の一部は、IGZO等の化合物半導体、CIGS等の非シリコン系太陽電池等の新素材の開発や生産を行っているため、種々のレアメタルに複合曝露されており、早急にレアメタルの安全性評価が必要である。

本年は疫学調査では、インジウム労働者コホートのインジウム製造工場、リサイクル工場および金属インジウム合金製造工場に勤務する作業員に健康調査を施行し、インジウム製造工場1か所では作業環境測定調査を施行した。さらに、動物実験ではインジウムのライフサイクルで製造されるITOターゲット材の研削粉、酸化インジウム (In_2O_3)、水酸化インジウムをラットの気管内に反復投与し、肺障害について比較検討を行った。

B. 研究方法

① 疫学調査

ITO等インジウム化合物製造工場 3工場 (A工場、B工場、C工場) とリサイクル工

場(D工場)、11の金属インジウム合金製造工場作業員の健康調査を実施した。

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、肺間質性肺炎マーカーである血清 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、B工場とC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

A工場に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)のインジウム濃度測定、マスクの漏れ率測定等を実施した。作業環境中のインジウム濃度測定は「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。

③ 動物実験

被験物質としてITO研削粉 (ITO)、酸化インジウム (In_2O_3)、水酸化インジウム ($\text{In}(\text{OH})_3$) の3物質を用い、実験動物としてWistar rat (♂、8週齢)を用いた。

実験群はITO群、酸化インジウム (In_2O_3) 群、水酸化インジウム ($\text{In}(\text{OH})_3$) 群、対照群 (蒸留水) の4群、各群36匹で構成し、合計144匹のラットを用いた。各被験物質を蒸留水に懸濁し、週2回、計5回、2週間にわたって反復投与した。各群最終投与日の翌日 (0週)、1週、2週、3週目にラットを各群9匹ずつ安楽死させた。各評価時点のラットの肺、血液中のインジウム測定、肺の病理学的変化について評価した。

C. 研究結果

① 疫学調査

1. A工場の結果

健診受診者のうち4名が $\text{In-S} \geq 3 \mu\text{g/L}$ の高値であった。前年と比して大きな変化はなかった。血清KL-6濃度は、4名が高値 ($>500\text{U/ml}$) であった、そのうち3名は、 In-S も高値であった。肺機能検査結果は、前年と比べて、大きな変化はなかった。

2. B工場の結果

In-S は、健診者全員が $1 \mu\text{g/L}$ 未満、かつ間質性肺炎マーカー (KL-6、SP-D) も全員正常範囲だった。過去の In-S 高値者は、ゆるやかに低下傾向で、KL-6 も $\text{In-S} < 3 \mu\text{g/L}$ になる前にすでに低下し、現在は正常範囲内で安定していた。肺機能検査 (努力性肺活量、一秒率ともに) も全員正常範囲で、かつ変化を認めなかった。胸部CTの結果は、多くの者が異常を認めなかった。胸部CTの有所見者も平成20年と比べて変化がなかった。

3. C工場の結果

In-S は、ゆるやかに低下傾向だった。間質性肺炎マーカー (KL-6、SP-D) も、緩やかに低下傾向だった。KL-6 および SP-D の

有所見者1名を除いて、すべてが正常範囲だった。肺機能検査 (努力性肺活量、一秒率とも) は、全員正常範囲だった。肺拡散能は、多くの者が変化なしで、1名は低値でゆるやかに低下傾向であった。胸部CTの結果は、初回検査 $\text{In-S} \geq 10 \mu\text{g/L}$ の作業場でブラがやや増悪していたり、間質性変化は陳旧化しつつも陰影は改善を認めなかったりした。

4. D工場の結果

曝露者の In-S は、平均値、および $\text{In-S} \geq 3 \mu\text{g/L}$ の高値者の値も低下していたが、平成23年より上昇している作業場もいた。非曝露者は、全員 $< 0.1 \mu\text{g/L}$ であった。就業期間1年の作業場では In-S 高値者がおり、作業環境、作業環境管理 (マスク着用・管理なども) を再度確認する必要があった。 In-S 高値継続の作業場は、肺内のインジウムのクリアランスが遅いため、経過観察が必要であった。間質性肺炎マーカー (KL-6、SP-D) は、曝露者の全体の平均、および高値者 (1-2名を除き) の値は、低下していた。間質性肺炎マーカー高値、かつ In-S 高値の作業場は、インジウムの肺からのクリアランスが遅いため、経過観察が必要だった。肺機能検査結果は、全員正常範囲内であった。肺拡散能検査 (DLCO) 結果は、%DLCOの低値者が2名いた。その2名の%DLCO/VA (肺胞面積) はすべて正常範囲内であった。

5. 金属インジウム合金製造工場の結果

高温溶解工程 (1000度以上の高温で溶解を行っている工程) における高濃度曝露者ではITO製造工場作業場と同様の影響を認めた。

② IT0等インジウム化合物製造工場の作業環境測定

A工場での作業環境中のインジウム濃度測定を行った。その結果、午前のIT0研削作業場の幾何平均値： $1.88 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、第1評価値： $12.32 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、午後の幾何平均値： $5.31 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、第1評価値： $25.00 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、午前に比べて午後の濃度が高い値を示した。

電動ファン付き呼吸用保護具による曝露状態のインジウム濃度測定（マスク内インジウム濃度）では、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。

③ 動物実験

$\text{In}(\text{OH})_3$ 群では投与期間中から観察期間中体重増加が著しく抑制され、IT0群、 In_2O_3 群および対照群に比べて有意に減少した。肺の相対重量は、各時点の各インジウム投与群で対照群と比べて有意に増加した。各時点の IT0 群および In_2O_3 群の相対肺重量は、対照群の約 2 倍で推移した。一方、 $\text{In}(\text{OH})_3$ 群では、IT0 群および In_2O_3 群に比べて有意に増加し、経時的に増加していた。血液中インジウム濃度は $\text{In}(\text{OH})_3$ 群では約 $1000 \mu\text{g}/\text{L}$ であり、他のインジウム群に比べて 70 倍～200 倍の高値であった。肺インジウム量は緩やかに経時的に減少した。肺の病理学的評価では、IT0 群、 In_2O_3 群、 $\text{In}(\text{OH})_3$ 群で肺の炎症性変化を主体とする病変が観察され、特に、 $\text{In}(\text{OH})_3$ 群では肺病変の程度が IT0 群および In_2O_3 群に比べて重度であった。

D. 考察

健康影響調査の結果に関しては、作業環境管理・作業管理が改善されたため、作業

環境中のインジウム濃度が低下し、作業者の血清インジウム濃度が低下してきている。その結果、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の血清 KL-6 濃度も同時に低下してきているが、依然として量・影響関係は示している。一方、肺機能検査の拘束性/閉塞性障害の所見や In-S 高値者の胸部 CT 所見の改善は乏しい。これらの結果は、これまでに曝露した難溶性化合物の IT0 は今も肺内に残存し、肺内炎症は持続している可能性や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る。今後の継続健診で経過観察する必要がある。また、就業期間 1 年以内の新規作業者では血清インジウム濃度高値を認める作業者もあり、特にマスク着用などの作業環境管理を定期的に確認する必要がある。

作業環境測定結果では、作業環境中インジウム濃度は、午前より午後の測定時の方が高い結果であった。午前中にインジウムに曝露される作業が多く行われたことに因ると推測される。作業環境管理上の工学的な対策の他、作業のやり方や姿勢、使用工具の見直しなど作業管理上の対策も行い、曝露濃度を下げる改善が必要である。

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）結果について概ね、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ものと考えられる。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%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の未然防止が期待できる。

しかし、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 $1.13 \sim 2.75 \mu\text{g}$ が検出されたものの、午前の作業終了時は $8.92 \sim 13.68 \mu\text{g}$ 、午後の作業終了時は $10.73 \sim 19.74 \mu\text{g}$ 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。

ラットを用いた気管内投与によって、 ITO や In_2O_3 だけでなく、 $\text{In}(\text{OH})_3$ においても肺障害が引き起こされ、さらに ITO や In_2O_3 に比べて肺障害性は著しく強いことが明らかになった。今回、 ITO 、 In_2O_3 および $\text{In}(\text{OH})_3$ は同じモル濃度のインジウム化合物を投与したにも係わらず、 $\text{In}(\text{OH})_3$ 群で毒性は強く発現した。毒性発現の強さは血液中インジウム濃度および粒子径に関連している可能性があり、高濃度の血液中インジウム濃度が観察された理由の一つとしては ITO や In_2O_3 に比べて $\text{In}(\text{OH})_3$ の粒子径が非常に微細であることが考えられる。アメリカ NTP のインジウムリンの吸入曝露および日本における ITO 研削粉の吸入曝露実験において肺の発がん性が認められていることより、インジウムが発がん性に寄与していると推測され、他のインジウム化合物の発がん性の可能性は否定できない。今後、水酸化インジウムを含めたインジウム化合物の発がん性の評価が必要であると考えられる。

E. 結論

本年度の健康調査では、肺がんを含む発がん疾患は認めなかった。しかし、血清イ

ンジウム濃度や血清 KL-6 濃度は低下してきているが、依然として量・影響関係は示し、さらに、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 所見の改善は乏しいため、さらに継続した経過観察をする必要がある。さらに、高温溶解作業の金属インジウム曝露者は、 ITO 等インジウム化合物と同様の呼吸器影響を認めたため、健康影響に定期的に評価する必要がある。インジウム化合物の動物実験結果より $\text{In}(\text{OH})_3$ の急性肺障害が認められたため、 ITO や In_2O_3 に加えて、 $\text{In}(\text{OH})_3$ の健康影響に注意を払う必要があると考える。

F. 健康危険情報

- 追跡調査の結果から、インジウム作業者の血清 KL-6 濃度は低下しているが、依然として量・影響関係を示した。
- 高温溶解作業の金属インジウム曝露者は、血清インジウム濃度と血清 KL-6 濃度が上昇した。
- 肺機能検査の拘束性/閉塞性障害の所見や血清中のインジウム濃度高値者の胸部 CT 所見の改善は乏しい。
- 就業期間 1 年未満の新規就業者において血清中のインジウム濃度が高値である作業者が認められる。
- 水酸化インジウムの吸入により急性肺障害が惹起される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Nakano, K. Uchida, T. Michikawa, N. Yoshioka, M. Hirata, A. Tanaka, *et al.*, Five-year cohort study: emphysematous progression of indium-exposed workers, *Chest*, 146,

1166-1175, 2014.

2. A. Tanaka, M. Hirata, N. Matsumura, Y. Kiyohara, Tissue distribution of indium after repeated intratracheal instillations of indium-tin oxide into the lungs of hamsters, J Occup Health, 57, 189-192, 2015.
3. A. Tanaka, M. Hirata, N. Matsumura, K. Koga, M. Shiratani, Y. Kiyohara, Comparative study on the pulmonary toxicity of indium hydroxide, indium-tin oxide, and indium oxide following intratracheal instillations into the lungs of rats, MRS Sympodium Proceedings / MRS Online Proceeding Library, 1723, g02-03, 2015.

2. 学会発表

1. 大前和幸、中野真規子、岩澤聡子、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、インジウム：吸入性粉塵個人曝露濃度と生物学的モニタリング指標の関係 許容濃度は提案可能か？、第42回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、2014年10月25-26日、長野市。
2. A. Tanaka, M. Hirata, K. Koga, M. Shiratani, M. Nakano, Y. Kiyohara *et*

al., Adverse Health Effects of Indium Tin Oxide and Copper Indium Gallium Diselenide, The 6th World Conference on Photovoltaic Energy Conversion, Nov. 23-27, 2014, Kyoto, Japan.

3. A. Tanaka, M. Hirata, N. Matsumura, K. Koga, M. Shiratani, Y. KIYOHARA, Pulmonary Toxicity of Indium-Tin Oxide, Indium Oxide and Indium Hydroxide Following Intratracheal Instillations into the Lung of Rats, 2014 MRS Fall Meeting & Exhibits Nov. 30-Dec. 5 2014, Boston, Massachusetts.
4. 古閑一憲、天野孝昭、平田美由紀、田中昭代、白谷正治、ラットに皮下投与した In ナノ粒子の体内輸送、第62回応用物理学会春季学術講演会、2015年3月12日、平塚市。
5. 田中昭代、平田美由紀、松村渚、清原裕、インジウム化合物吸入ラットにおける肺影響指標 SP-D の肺障害マーカーの有効性、第85回日本衛生学会、2015年3月26-28日、和歌山市。

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

平成 27 年度
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。IT0 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 $10 \mu\text{g/m}^3$ 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。当該事業所でのさら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 IT0 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

① 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工場およびE-I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、E工場、F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。

② IT0等インジウム化合物製造工場の作業環境測定

A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。

③ 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 3mg/kg (3mg 投与群)、10mg/kg (10mg 投与群)、30mg/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 10mg/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. 研究結果

① 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 335 名は、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血清 KL-6 濃度の幾何平均は 265U/mL (正常値 $<500\text{U/mL}$) (範囲： 124U/mL - 2090U/mL)、KL-6 の有所見者数は 22 名 (6.6%)、SP-D の幾何平均は 47.4ng/mL (正常値 $<110\text{ng/mL}$) (範囲： $<17.2\text{ng/mL}$ - 437.0ng/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 (29 名) 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。

② IT0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

IT0 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。

③ 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

ある血清 KL-6 濃度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る。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。肺腔内に肺泡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ので、CIGS および IGZO 粒子の肺泡マクロファージに対する障害が強く、肺泡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泡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 名がみつかった。肺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。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. M. Nakano, A. Tanaka, M. Hirata, S. Iwasawa *et al.*, Pulmonary effects in workers exposed to indium metal: a cross-sectional study, J Occup Health, 57, 346-352, 2015.
2. 田中昭代、平田美由紀、中野真規子他、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-containing nanoparticles using plasmas in water to study their effects on living body, Proc. 68th GEC/9th ICRP/33rd SPP, 60, LW1.158, 2015.
5. N. Kubokura, F. Takahashi-Yanaga, M. Arioka, T. Yoshihara, K. Igawa, K. Tomooka, S. Morimoto, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, Y. Nakabeppu, T. Matsumoto, T. Kitazono, T. Sasaguri, Differentiation-inducing factor-3 inhibits intestinal tumor growth in vitro and in vivo, J Pharmacol Sci, 127, 446-455, 2015.
6. 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.

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、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。
4. 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。
5. 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.
6. 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。
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. K. Koga, T. Amano, M. Hirata, A. Tanaka, M. 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.

12. 中野真規子、宮内博幸、衛藤憲人、橋本晴男 近未来の産業衛生分野の研究と実践 インジウム曝露濃度（環境濃度と生物学的モニタリング）から見えること 日本産業衛生学会関東地方会

第 271 回例会 2015 年 12 月 12 日、東京都新宿区。

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

平成 28 年度
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28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および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) 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場に勤務する作業者に健康調査を施行し、さらに金属リサイクル工場ではテルル、ガリウム取り扱い作業者の曝露調査を施行した。さらに、2か所のインジウム取り扱い工場では作業環境測定を施行した。

本年度の調査では、肺がん発症者は認めなかった。また、インジウム曝露開始歴が平成22年以降の者にはIn-S $\geq 3 \mu\text{g/L}$ 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、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有意な差は認められなかった。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、閉塞性変化が継続することが示唆された。今後も肺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。肺障害の診断基準に関しては、本研究で測定した10年目の追跡データを基に詳細胸部CT画像所見等も加味し、確立していく。

テルル (Te)、ガリウム (Ga) 取り扱い作業者の曝露評価では、血清中のTe、Ga濃度測定を行った。現曝露群の血清Te濃度と血清Ga濃度の中央値は各々 $1.3 \mu\text{g/L}$ (Te)、 $0.3 \mu\text{g/L}$ (Ga)、最高値は、 $45.0 \mu\text{g/L}$ (Te)、 $3.2 \mu\text{g/L}$ (Ga) であった。過去曝露群の血清Te濃度と血清Ga濃度は、ともにほぼ定量下限以下で、非曝露群と過去曝露群の間では明らかな差は認めなかった。今後は、レアメタルの曝露指標の精度管理の組織を組み、確立させていく。

2か所のインジウム取り扱い工場の IT0 研削作業場の作業環境測定調査を施行した。さらに、当該作業者のインジウムの曝露状況を把握するために、2工場の5名を対象にして個人曝露濃度測定、粉じんリアルタイム曝露測定、および作業中における防じんマスク内濃度測定などを行った。環境中のインジウム濃度、吸入性粉じん中のインジウム濃度は2作業場ともに「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。電動ファン付き呼吸用保護具のマスク内インジウム濃度は許容される濃度 $0.3 \mu\text{g/m}^3$ より低いか、それに近い値を示し、電動ファン付き呼吸用保護具の使用によりインジウム吸入の低減効果

が示された。ただし、マスクの面体顔面接触部位におけるインジウム付着量は午前より午後の作業後に増加しており、使用毎のマスク面体の確実な清拭や、正しい装着方法の定期的な確認の指導が重要と考えられた。さらに、作業映像とリアルタイム粉じん濃度データを合成させた画像より高濃度にインジウム曝露されている作業を特定することが可能となり、作業環境改善や作業改善を行うに際し、映像を用いた高濃度インジウム曝露作業工程の解析は有用であると考えられた。

太陽電池素材である CIGS のラットを用いた亜慢性影響評価を行った。平成 27 年度に実施した CIGS 亜慢性影響実験において用いた CIGS 粒子の最小投与量 3mg/kg の 1/3 を最大投与量とし、1 回投与量を 0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg の 3 倍の公比で設定し、ラットの気管内に CIGS 粒子を 1 回投与した。その結果、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。以上の結果より、低投与量の CIGS 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。今回の最小投与量 0.1mg/kg の投与により、肺障害が発現したことより、今回の投与量の範囲において最小毒性量は 0.1mg/kg であり、吸入曝露濃度は 0.01mg/m³ と推計された。この推計濃度は厚生労働省の通達目標濃度（In として 0.01mg/m³）とほぼ同じレベルであり、低濃度の CIGS の曝露においても十分に注意を払う必要であると考えられた。

研究分担者：

二宮 利治	（九州大学大学院 医学研究院 衛生・公衆衛生学分野・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	（琉球大学 医学部 先端医学研究センター・特命教授）

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 工場で実施し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係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、ITOの長期曝露動物実験では肺がん率が証明されたこと(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27年度の疫学調査では、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いるが、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。ITO研削作業場の作業環境測定では「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、インジウム取り扱い作業場ではさらなる作業環境改善が必要であることを明らかにした。一方、動物実験では太陽電池素材であるCIGS粒子や化合物半導体IGZO粒子の肺障害性を明らかにした。

平成28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員に健康調査を施行した。一方、インジウム以外のレアメタルの健康影響に関する知見は非常に乏しく、曝露の実態も明らかではない。そこで、金属リサイクル工場においてレアメタルであるTeおよびGa取り扱い作業員

の調査を行なった。さらに、インジウム取り扱い工場2か所では作業環境測定および個人曝露濃度測定を施行した。動物実験ではラットを用いて、低曝露量におけるCIGSの肺障害について検討を行った。

B. 研究方法

① ITO等インジウム化合物製造・リサイクル作業員の疫学調査

平成28年4月～平成29年3月の間に、10事業所(ITO等インジウム化合物製造 7事業所・リサイクル 3事業所)(A工場およびG-0工場)で疫学調査を291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、A工場以外の9工場で行った。

② Te、Ga取り扱い作業員の調査

Te、Gaなどを取り扱うレアメタル曝露作業員の調査をM工場の31名で調査した。影響の指標として、曝露歴、血清Te濃度(Te-S)および血清Ga濃度(Ga-S)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、九州大学医学研究院倫理審査委員会および慶応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。

③ インジウム化合物取り扱い工場の作業環境測定および個人曝露濃度測定

2工場（A工場、O工場）のITO研削作業場において、作業環境測定調査を施行した。また、当該作業者のインジウムの曝露状況を把握するために、2工場の5名を対象にして個人曝露濃度測定、粉じんリアルタイム曝露測定、および作業中における防じんマスク内濃度測定を行った。研削作業時映像とリアルタイム粉じん測定値の同期再生画像より、個人曝露濃度と作業工程との関連について解析した。

④ 動物実験

本年度は昨年度のCIGS粒子1回投与量の最小投与量 3mg/kg の 1/3 を最大投与量とし、1回投与量を 0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg の3倍の公比とし、上記3群と対照群の4群を設定し、ラットの気管内にCIGS粒子を1回投与した。投与後12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、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. 研究結果

① ITO等インジウム化合物製造・リサイクル作業者の疫学調査

平成28年度の全体健診受診者291名、男性は270名（92.8%）、平均年齢は42.9歳（範囲：20歳-74歳）、曝露者280名（現曝

露217名、過去曝露63名）、非曝露者11名、曝露開始からの平均期間は9.4年（0.2-33.2年）、In-Sは算術平均 $1.5 \mu\text{g/L}$ （範囲： $<0.1 \mu\text{g/L}$ - $45.2 \mu\text{g/L}$ ）、 $\text{In-S} \geq 3 \mu\text{g/L}$ の有所見者数は29名（10.0%）、間質性肺炎のマーカーであるKL-6の幾何平均は264U/mL（正常値 $< 500\text{U/mL}$ ）（範囲： 120U/mL - 1940U/mL ）、KL-6の有所見者数は18名（6.2%）、SP-Dの幾何平均は45.8ng/mL（正常値 $< 110\text{ng/mL}$ ）（範囲： $<17.2\text{ng/mL}$ - 207.0ng/mL ）、SP-Dの有所見者数は18名（7.0%）であった。肺機能検査は254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（21名）は除外し233名で解析した。%VCの算術平均は、101.5%（範囲：68.8%-134.6%）、%VC $<80\%$ の有所見者数は9名（3.9%）、%FVCの算術平均は、100.3%（範囲：67.9%-129.8%）、%FVC $<80\%$ の有所見者数は18名（7.7%）、%FEV1.0の算術平均は、95.6%（範囲：54.8% - 125.6%）、%FEV1.0 $<80\%$ の有所見者数は22名（9.4%）、FEV1.0%の算術平均は、82.4%（範囲：62.1%-99.7%）、FEV1.0 $<70\%$ の有所見者数は11名（3.9%）であった。

平成28年健診受診者のうち、平成21年までにインジウム曝露開始歴があった現曝露者および過去曝露者は187名であった。男性は176名（94.1%）、平均年齢は43.3歳（範囲：25歳-74歳）、現曝露者138名、過去曝露者49名、曝露開始からの平均期間は12.5年（6.3-33.2年）、平成28年のIn-Sは算術平均 $2.1 \mu\text{g/L}$ （範囲： $<0.1 \mu\text{g/L}$ - $45.2 \mu\text{g/L}$ ）、 $\text{In-S} \geq 3 \mu\text{g/L}$ の有所見者数は29名（15.5%）と平成28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 187 名を平成 28 年時の曝露状況で、現曝露・過去曝露の 2 群に分類し、平成 28 年の非曝露群との 3 群で比較した。曝露指標の In-S の算術平均値は、非曝露群と比し、現および過去曝露群とも有意に高値であった。しかし、影響指標は、非曝露群と比した現および過去曝露群の平均値の比較は、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。

3 群での有所見率の比較では、曝露指標の In-S で有意な差は認めなかったが、過去曝露群では、9/49 名（18.4 %）が今なお In-S $3 \mu\text{g/L}$ を超えている。また、FEV1.0%を除く影響指標（KL-6、SP-D、%VC、%FVC、%FEV1.0、%DLco）において有意な差はなかった。FEV1.0%は、過去曝露群で閉塞性障害（FEV1.0% < 70%）の有所見率が高い傾向にあった。さらに喫煙歴で層別化し、検討したところ、過去曝露群の非喫煙者で FEV1.0%の有所見率が高い傾向があり、喫煙でのみ説明できる結果ではなく、過去曝露群の FEV1.0%の低下の傾向はインジウム曝露による影響も示唆された。また、過去曝露群の喫煙者で %FEV1.0 < 80%の有所見率が有意に高かった。

② Te、Ga 取り扱い作業者の調査

Te、Ga 取り扱うレアメタル曝露作業者の調査において、Te 曝露者は現曝露群 8 人、過去曝露群 11 人の計 19 人、曝露期間の中央値は現曝露群 4.5 年（範囲：2-52 年）、過去曝露群 6.0 年（同：1-50 年）であった。Te 現曝露群 8 人中 5 人において血清中で Te が検出され、Te-S の中央値は $1.3 \mu\text{g/L}$ であった。Te 過去曝露群および非曝露群の Te-S は全員定量下限以下であった。

Ga 曝露者は現曝露群 12 人、過去曝露群 9

人の計 21 人であった。曝露期間の中央値は現曝露群 6.0 年（範囲：2-16 年）、過去曝露群 6.0 年（同：2-43 年）であった。Ga 現曝露群 12 人中 9 人、過去曝露群 9 人中 1 人（Ga-S）： $0.2 \mu\text{g/L}$ ）、非曝露群 10 人中 1 人（同： $0.8 \mu\text{g/L}$ ）が血清中で Ga が検出された。Ga 現曝露群の Ga-S の中央値は $0.3 \mu\text{g/L}$ であった。

現曝露群の Te-S と Ga-S の最高値は、各々 $45.0 \mu\text{g/L}$ 、 $3.2 \mu\text{g/L}$ であった。過去曝露群の Te-S と Ga-S は、ともにほぼ定量下限以下で、非曝露群と過去曝露群の間では明らかな差は認めなかった。

③ インジウム化合物取り扱い工場の作業環境測定および個人曝露濃度測定

1. A 工場

a) インジウムの作業環境測定

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 $1.91 \mu\text{g/m}^3$ 、第 1 評価値は $19.28 \mu\text{g/m}^3$ 、平面研削盤作業位置にて行った B①測定値は $3.57 \mu\text{g/m}^3$ 、切断作業位置にて行った B②測定値は $7.73 \mu\text{g/m}^3$ であり、各 B 測定値は目標濃度を下回ったものの、第 1 評価値は目標濃度 $10 \mu\text{g/m}^3$ の約 1.9 倍のため、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。

b) マスク外（個人曝露濃度測定）とマスク内濃度測定他

マスク外濃度（個人曝露濃度）の最大値は A 氏（午後）の $20.33 \mu\text{g/m}^3$ 、最小値は C 氏（午前）の $0.14 \mu\text{g/m}^3$ であった。また、マスク内測定の最大値は A 氏（午後）の $0.73 \mu\text{g/m}^3$ 、最小値は C 氏（午前・午後）の $0.01 \mu\text{g/m}^3$ であった。また使用されていたマスク

は重松製作所製 Sy-11V 型で、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 5.9%、午後 3.6%、B 氏の午前が 3.0%、午後 4.9%、C 氏は午前 7.2%、午後 4.0%であった。

c) 粉じんリアルタイム測定

作業員 3 名につい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 氏は研削作業時に瞬間的に高い濃度 ($1.0 \sim 2.0 \text{ mg/m}^3$) のピークが、B 氏も平面研削作業時にやや高い濃度 ($0.5 \sim 1.5 \text{ mg/m}^3$) のピークが、C 氏も当該作業時にやや高い濃度のピーク ($0.5 \sim 3.5 \text{ mg/m}^3$) が認められた。しかし、3 名ともマスク内側の濃度には高いピークが認められず、極く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 0.10%、最小値は B 氏の 0.00%であった。また、午前中の作業終了時における最大値は A 氏の 0.74%、最小値は C 氏の 0.00%であった。午後の作業前最大値は A 氏の 1.57%、最小値は B 氏と C 氏の 0.01%、作業後の最大値は A 氏の 0.38%、最小値は B 氏 0.00%であった。午後の A 氏作業前における 1.57%は、喫煙後の呼気中粉じんの影響を受けていると推測された。それ以外は全員とも 1.0%以下であり、良好なマスクの装着状態と考えられた。

2. 0 工場

a) インジウムの作業環境測定

午前中に行ったインジウム加工室の A 測定幾何平均値 (M) は $4.25 \mu\text{g/m}^3$ 、第 1 評価値は $14.66 \mu\text{g/m}^3$ 、10 時 12 分から行った B

①(平面研削盤作業員位置)測定値は $3.57 \mu\text{g/m}^3$ となった。B①測定値は目標濃度 $10 \mu\text{g/m}^3$ の約 1/3 倍、第 1 評価値は約 1.5 倍となり、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 $6.47 \mu\text{g/m}^3$ 、第 1 評価値は $20.32 \mu\text{g/m}^3$ 、13 時 48 分から行った B②測定は仕上げ研磨作業員位置で、インジウム濃度は $5.61 \mu\text{g/m}^3$ となった。第 1 評価値は約 2.0 倍、B②測定値は目標濃度の約 1/2 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) IT0 の平面研削作業員 2 名についてのマスク内側およびマスク外側(個人曝露)のインジウム濃度測定

D 氏のマスク外濃度(個人曝露濃度)は午前が $1.49 \mu\text{g/m}^3$ 、午後が $11.04 \mu\text{g/m}^3$ であった。また、マスク内は午前が $0.28 \mu\text{g/m}^3$ 、午後は $0.52 \mu\text{g/m}^3$ であった。E 氏のマスク外濃度(個人曝露濃度)は午前が $1.83 \mu\text{g/m}^3$ 、午後は $6.76 \mu\text{g/m}^3$ 、マスク内は午前が $0.32 \mu\text{g/m}^3$ 、午後は $0.44 \mu\text{g/m}^3$ であった。

これらより求めたマスク内濃度／マスク外濃度(個人曝露濃度)は、D 氏の午前が 19.1%、午後が 4.7%、E 氏の午前が 17.4%、午後が 6.5%であった。

c) マスク内側およびマスク外側(個人曝露)の経時的な粉じん濃度の推移および研削作業時映像とリアルタイム粉じん測定値の同期再生

作業員 1 名の経時的な粉じんの個人曝露濃度推移より、特に平面研削・エアブロー時に高い濃度のピークが確認された。この研磨作業時の動画データとリアルタイムの

粉じん濃度データを合成させた画像よりも確認された。

d) マスク漏れ率測定

使用していたマスクの漏れ率に関し、D 氏の午前作業前における電動ファン停止時の漏れ率は 4.43%、終了では 6.33%であった。それに比べ、ファン稼働時は 作業前後とも 0.06%であった。午後の作業前と後のファン停止時の漏れ率は 26.79%、28.86%と高値であったのに比べ、ファン稼働時は 作業前 0.10%、作業後 0.04%であった。

E 氏の午前作業前における電動ファン停止時の漏れ率は 6.88%、作業後では 5.40%であったのに比べ、ファン稼働時は作業前 0.09%、作業後 0.03%であった。午後の作業前と後のファン停止時の漏れ率は 21.25%、11.64%と高値であったのに比べ、ファン稼働時は各々 0.06%、0.04%であった。

④ 動物実験：ラットを用いた CIGS の亜慢性影響評価

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。

各群の総投与量は粒子量として CIGS 0.1mg 群； $0.03\pm 0.0\text{mg}$ （平均 $\pm$ 平均偏差）、CIGS 0.3mg 群； $0.08\pm 0.0\text{mg}$ 、CIGS 1mg 群； $0.27\pm 0.0\text{mg}$ であった。

投与期間および観察期間中の体重推移に関し、各 CIGS 群は対照群と同様の推移を示し、CIGS 投与による全身性の影響が認められなかった。

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、各評価時点において、CIGS 0.3mg 群および 1mg 群では肺相対重量が CIGS 0.1mg 群に比べて有意に増加した。投与期間および観察期間中の体重推移に関し、

各 CIGS 群は対照群と同様の推移を示し、CIGS 投与による全身性の影響が認められなかった。

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、1 週、5 週、12 週時において、CIGS 0.3mg 群および 1mg 群では肺相対重量が CIGS 0.1mg 群に比べて有意に増加した。

各群の投与 1 週目の肺内 CIGS 粒子沈着率は 0.1mg 群；58%、0.3mg 群；57%、1mg 群；27%、投与 12 週目は 0.1mg 群；52%、0.3mg 群；28%、1mg 群；22%であり、肺 CIGS 粒子量は経時的に減少した。CIGS 粒子の肺の半減期は CIGS 0.1mg 群；68 週、0.3mg 群；11 週、1mg 群；29 週であった。各時点の血清 In および Ga 濃度は CIGS 投与量依存性に上昇したが、血清 Cu および Se 濃度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、1 週から 5 週まで増加した。5 週目から 12 週では横ばいで推移した。

各群の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、肺胞腔の拡張、線維組織の増生が観察された。肺胞腔の拡張は 1 週目では発現しなかったが、5 週目以降観察された。各病変の程度は投与量依存性に発現した。肺病変の程度は 12 週目まで経時的に進展した。

D. 考察

本年度の健康調査の結果からインジウム曝露開始歴が平成 22 年以降の者には In-S $\geq 3\mu\text{g/L}$ 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かった。肺機能検査の拘束性変化 (%VC<80%、%FVC<80%)、一酸化炭素肺拡散能障害 (%DLco) 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かった。一方、肺機能検査の閉塞性変化 (%FEV1.0、FEV1.0%) は、インジウム曝露量の多い過去曝露群で低い傾向にあり、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 年の追跡研究での気腫性変化の増悪 (Nakano *et al.* 2014, Amata *et al.* 2015) が継続する結果であった。

本年度の胸部 CT 結果含む調査が契機となり、新たな肺がんの診断をされた者、および新たな肺がん罹患者は認めなかった。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。

肺障害の診断基準に関しては、本研究で測定した 10 年目の追跡データを基に詳細胸部 CT 画像所見等も加味し今後確立していく。

Te、Ga を取り扱い作業員の調査では、Te の現曝露群 8 人中 5 人、Ga の現曝露者 12 人中 9 人の血清中に Te または Ga が検出されたことより、Te-S や Ga-S は曝露の指標となる可能性が示唆された。また、Te、Ga の過去曝露群の Te-S や Ga-S はともにほぼ定量下限以下であり、Te や Ga の体内動態は明らかではないが、In に比べて排泄が早いため過去曝露者では血清中に Te や Ga が検出されなかった可能性も否定できない。一方、

Ga-S に関して Ga 曝露者 1 名と非曝露者の管理職の 1 名に血清中で Ga が検出された。工場内の Ga の汚染による曝露なのか、過去曝露時の Ga 粉塵が肺内に沈着している結果なのか、検討する必要があると考えられる。今後は、レアメタルの曝露指標の精度管理の組織を組み、確立させていく。

インジウム化合物取り扱い工場の作業環境管理・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が、作業環境濃度測定の結果から小規模工場では作業環境測定濃度の改善が鈍化してきている。しかし、In-S は改善していることから、電動ファン付き呼吸用保護具による実質的なインジウム曝露の防止効果が認められた。さらに、作業映像とリアルタイム粉じん濃度データを合成させた画像解析より高濃度にインジウム曝露されている作業の特定が可能になり、映像を用いた高濃度インジウム曝露作業工程の解析は今後の作業環境改善や作業改善に有用であると考えられた。

本年度の動物実験の結果から CIGS 投与による体重推移に及ぼす影響は観察されなかったが、最小投与量 0.1mg/kg 投与群から肺重量や血清 SP-D 濃度の上昇、肺病変の発現が観察された。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。このことより血清 In および Ga 濃度は曝露の指標として有用だと考えられた。2 年間の吸入曝露で、ラットの呼吸量を 561mL 分/kg 体重、肺への沈着率を 60%とした場合、CIGS 0.1mg/kg

(0.025mgIn/kg) では In の吸入曝露濃度は 0.014mg/m³ と推計される。この推計濃度は厚労省の通達の目標濃度 (In として 0.01mg/m³) とほぼ同じレベルであり、低濃度の CIGS の曝露においても十分に注意

を払う必要があると考えられた。

今回、肺で観察された病理学的変化はITOや酸化インジウムの吸入によって引き起こされる肺病変と類似し、主にはCIGS粒子から溶出してきたインジウムによって肺病変が引き起こされたと推測されるが、インジウムに加えて、他のCIGS構成元素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。

ラットを用いたCIGS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。さらに、今回CIGS最小投与量0.1mg/kg投与群から肺障害が発現したことから、低濃度のCIGSの曝露においても注意を払う必要があると考えられた。

E. 結論

本年度の調査では、新規肺がん罹患者はいなかった。追跡期間による限界も有り、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。

Te、Gaの現曝露者では血清中からTeとGaが検出されたことより、Te-S、Ga-Sは曝露の指標として有用であると考えられた。

電動ファン付き呼吸用保護具による実質的なインジウム曝露の防止効果が認められた。

低濃度のCIGSの吸入性曝露においても健康障害が発現する可能性があり、注意が必要である。

F. 健康危険情報

- インジウム曝露量の多い過去曝露群で肺機能検査の閉塞性変化が認められ、気腫性変化の増悪が継続していた。
- レアメタル取り扱い作業者ではTeおよびGaの曝露が認められた。

- 小規模のインジウム取り扱い工場では作業環境測定濃度の改善が鈍化してきている。
- 低濃度GIGS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. M. Nakano, A. Tanaka, M. Hirata, H. Kumazoe, K. Wakamatsu, D. Kamada, *et al.*, An advanced case of indium lung disease with progressive emphysema, *J Occup Health*, 58, 477-481, 2016.
2. S. Iwasawa, M. Nakano, H. Miyauchi, S. Tanaka, Y. Kawasumi, I. Higashikubo, A. Tanaka, M. Hirata, *et al.*, Personal indium exposure concentration in respirable dusts and serum indium level, *Ind Health*, 55, 87-90, 2017.

2. 学会発表

1. 中野真規子、田中昭代、平田美由紀、吉岡範幸、岩澤聡子他、インジウム曝露と新規肺がん発生についての現状報告：コホート研究（10年観察）、第86回日本衛生学会、2016年5月11-13日、旭川市。
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発現の網羅的解析と標的遺伝子の探索、第86回日本衛生学会、2016年5月11-13日、旭川市。
3. 田中昭代、平田美由紀、松村渚、清原裕、インジウムを構成元素とする化合物半導体IGZOの亜慢性毒性評価、第

- 89 回日本産業衛生学会、2016 年 5 月 24-27 日、福島市。
4. 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 と標的遺伝子の発現解析、第 89 回日本産業衛生学会、2016 年 5 月 24-27 日、福島市。
 5. 中野真規子、田中昭代、平田美由紀、吉岡範幸他、インジウム曝露と腎影響の関係：時間断面観察、第 89 回日本産業衛生学会、2016 年 5 月 24-27 日、福島市。
 6. 田中昭代、平田美由紀、松村渚、古閑一憲、白谷正治、インジウムナノ粒子のラット皮下投与による体内動態、第 27 回日本微量元素学会、2016 年 7 月 30-31 日、京都市。
 7. 田中茂、インジウム曝露軽減のための電動ファン付き呼吸用保護具のマスク内容濃度の測定、第 75 回全国産業安全衛生大会、2016 年 10 月 21 日、仙台市。
 8. K. Koga, A. Tanaka, M. Hirata, T. Amano, T. Sarinont, H. Seo, N. Itagaki, M. Shiratani, Long-term evaluation of In nanoparticle transport in living body, IS Plasma 2017 /IC-PLANTS 2017, March 1-5, 2017, Aichi, Japan.
 9. 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遺伝子発現の網羅的解析、第 87 回日本衛生学会、2017 年 3 月 26-28 日、宮崎市。

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

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
M. Nakano, K. Uchida, T. Michikawa, N. Yoshioka, M. Hirata, A. Tanaka, <i>et al.</i>	Five-year cohort study : emphysematous progression of indium-exposed workers	Chest	146(5)	1166-1175	2014
A. Tanaka, M. Hirata, N. Matsumura, Y. Kiyohara	Tissue distribution of indium after repeated intratracheal instillations of indium-tin oxide into the lungs of hamsters	J Occup Health	57	189-192	2015
A. Tanaka, M. Hirata, N. Matsumura, K. Koga, M. Shiratani, Y. Kiyohara	Comparative study on the pulmonary toxicity of indium hydroxide, indium-tin oxide, and indium oxide following intratracheal instillations into the lungs of rats	MRS Symposium Proceedings /MRS Online Proceeding Library、 CAMBRID GE UNIVERSI TY PRESS	1723	mrsf14-17 23-g02-03	2015
M. Nakano, A. Tanaka, M. Hirata, S. Iwasawa, <i>et al.</i>	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、中野真規子他	インジウムの健康影響	アレルギー・免疫	22	925-932	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 Nanotechno l	15	9298-9302	2015
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
N. Kubokura, F. Takahashi-Yanaga, M. Arioka, T. Yoshihara, K. Igawa, K. Tomooka, S. Morimoto, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, Y. Nakabeppu, T. Matsumoto, T. Kitazono, T. Sasaguri	Differentiation-inducing factor-3 inhibits intestinal tumor growth in vitro and in vivo	J Pharmacol Sci	127	446-455	2015
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	-	6pages	2016
M. Nakano, A. Tanaka, M. Hirata, H. Kumazoe, K. Wakamatsu, D. Kamada, <i>et al.</i>	An advanced case of indium lung disease with progressive emphysema	J Occup Health	58	477-481	2016
S. Iwasawa, M. Nakano, H. Miyauchi, S. Tanaka, Y. Kawasumi, I. Higashikubo, A. Tanaka, M. Hirata, <i>et al.</i>	Personal indium exposure concentration in respirable dusts and serum indium level	Ind. Health	55	87-90	2017

Five-Year Cohort Study

Emphysematous Progression of Indium-Exposed Workers

Makiko Nakano, MD, PhD; Kazuyuki Omae, MD, PhD; Kazuhiko Uchida, MD, PhD; Takehiro Michikawa, MD, PhD; Noriyuki Yoshioka, DVM; Miyuki Hirata, PhD; and Akiyo Tanaka, DVM, PhD

BACKGROUND: Dose-dependent adverse lung effects due to indium exposure have been reported in a cross-sectional study. This is a 5-year longitudinal cohort study of indium-exposed and unexposed workers, assessing indium exposure levels and its clinical lung effects.

METHODS: From 2008 to 2011, a 5-year follow-up study was conducted on 40 unexposed and 240 workers formerly or currently exposed to indium at 11 factories. Indium exposure was assessed by serum indium (In-S) ($\mu\text{g/L}$). Lung effects were assessed by subjective symptoms, serum biomarkers, spirometry, and chest high-resolution CT scan. Effect biomarkers used were Krebs von den Lungen and surfactant protein D.

RESULTS: Mean values of In-S, Krebs von den Lungen, and surfactant protein D among the workers exposed to indium at baseline declined during the 5-year follow-up by 29.8%, 27.2%, and 27.5%, respectively. Of the exposed subjects with In-S levels $> 20 \mu\text{g/L}$, 26.3% experienced emphysematous progression on high-resolution CT scan. Ninety percent (18 of 20) of workers with emphysematous progression during follow-up were current smokers at baseline, and a trend of increasing incidence of emphysematous progression at higher In-S levels was observed among the smokers ($P = .005$). Emphysematous changes among subjects with In-S levels $> 20 \mu\text{g/L}$ were likely to progress, after adjusting for age, mean duration since initial indium exposure, and smoking history (OR = 10.49, 95% CI = 1.54-71.36).

CONCLUSIONS: Long-term adverse effects on emphysematous changes were observed. The results suggest workers exposed to indium with In-S levels $> 20 \mu\text{g/L}$ should be immediately removed from exposure.

CHEST 2014; 146(5):1166-1175

Manuscript received October 18, 2013; revision accepted May 22, 2014; originally published Online First June 19, 2014.

ABBREVIATIONS: HRCT = high-resolution CT; In-S = serum indium; ITO = indium-tin oxide; KL-6 = Krebs von den Lungen; SP-D = surfactant protein D

AFFILIATIONS: From the Department of Preventive Medicine and Public Health (Drs Nakano, Omae, Uchida, Michikawa, and Yoshioka), School of Medicine, Keio University, Tokyo; Environmental Epidemiology Section (Dr Michikawa), Center for Environmental Health Sciences, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba; and Environmental Medicine (Drs Hirata and Tanaka), Graduate School of Medical Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

FUNDING/SUPPORT: This study was supported by Grants-in-aid for Scientific Research (Project Nos. 15390191, 17390179, 20249039, and

23249033) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan [2003-4, 2005-6, 2008-10, and 2011] and in part by donations for research in preventive and environmental medicine from two of the surveyed companies.

CORRESPONDENCE TO: Makiko Nakano, MD, PhD, Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 1608582, Japan; e-mail: nakano.makiko@z8.keio.jp

© 2014 AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS. Reproduction of this article is prohibited without written permission from the American College of Chest Physicians. See online for more details.

DOI: 10.1378/chest.13-2484

Indium is a rare metal used in the form of indium-tin oxide (ITO) as the electrode in flat panel displays. Japan is the largest consumer of indium accounting for 85% of global demand.¹ To our knowledge, the first (and fatal) case of indium-related lung disease (indium lung) was reported in Japan in 2003.² As of 2011,³ seven more cases have been reported in Japan,^{4,5} two in the United States,⁶ and one in China.⁷ In Japan, a study of indium-exposed workers was conducted at the ITO-processing factory where, to our knowledge, the first case was reported,⁸ as well as a multicenter study of indium-exposed and unexposed workers in other ITO-processing and ITO-recycling plants.⁹ The multicenter cross-sectional cohort study was later expanded and found dose-dependent adverse lung effects due to indium exposure.¹⁰ The

harmful effect of indium was further brought to light by a 2-year ITO inhalation experiment, revealing ITO as a lung carcinogen in rats.¹¹ Based on these findings, in 2010, the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare established a prevention guideline for ITO-processing workers¹² and, in 2013, added indium to the list of substances regulated by the Ordinance on Prevention of Hazards due to Specified Chemical Substances.^{13,14}

The long-term effects of indium exposure on the lungs remain largely unknown. This is a 5-year follow-up study of the largest cohort of indium-exposed and unexposed workers. Our objective is to assess the association between exposure levels of indium and its clinical effects on the lungs.

Materials and Methods

This study was approved by the ethical committee of the School of Medicine at Keio University (approval numbers 15-46 and 20110268). Written informed consent was obtained from all subjects.

Study Design and Subjects

In comparison with the multicenter baseline study conducted at 12 factories and one research laboratory between 2003 and 2006,¹⁰ this longitudinal study added workers from an additional factory and removed cohort members from three factories due to logistics. The resulting dataset covered 11 plants, including 383 exposed and 159 unexposed workers. Approximately 5 years after the baseline study (2003-2006), we conducted a follow-up study at these 11 plants between 2008 and 2011, involving 247 exposed and 63 unexposed workers (follow-up rates 64.5% and 39.6%). Among the subjects with high baseline serum indium (In-S) levels (≥ 20 $\mu\text{g/L}$), the follow-up rate was 82.6% (Fig 1).

At the 5-year follow-up, in accordance with the baseline study, a medical interview, questionnaire, blood test, spirometry, and high-resolution CT (HRCT) scan examination of the lungs were all conducted on 240 exposed and 40 unexposed subjects, excluding seven subjects with undetermined exposure duration and 23 unexposed workers exposed during follow-up. One unexposed and 10 exposed workers were excluded from final analysis of the lung function test results due to inadequate test maneuvers or a medical history of surgical lung resection. Of the 280 subjects, baseline HRCT scans for 207 workers were obtained, allowing direct comparison with the follow-up scans. Thirty-five unexposed and 172 exposed workers had HRCTs from both the baseline and follow-up.

Categorization of exposed workers into currently or formerly exposed groups was based on their exposure status at baseline. Job history was based on the job records at the plants, or if unavailable, based on physician's interview about occupational history.

Exposure Indexes

In-S ($\mu\text{g/L}$) was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry at the Center of Advanced Instrumental Analysis, Kyushu University.⁹ 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 Indexes and Confounding Factors

Medical examinations conducted at the 5-year follow-up were the same as those at the baseline study. Serum Krebs von den Lungen-6 (KL-6) (EIDIA Co, Ltd)^{15,16} and serum surfactant protein D (SP-D) (Yamasa Corporation)¹⁷ were used as biomarkers for interstitial changes in the

lungs and evaluated at a major commercial clinical laboratory (Special Reference Laboratory).

Spirometry was performed using electronic spirometers (HI-701 or HI-801; CHEST M.I. Inc) based on American Thoracic Society guidelines. Age and height-adjusted predicted values of FVC and FEV₁ were determined by sex, using the regression formula recommended by the Japanese Respiratory Society¹⁸; and percentages of predicted FVC and FEV₁ were calculated.

At nine of the plants, HRCT scanning was performed in a specially assembled vehicle, using the same multislice CT scanner as the baseline study¹⁰ at 120 kV, 200 mA, and a slice thickness of 1 mm. For the other two plants, HRCT scanning was performed at nearby hospitals with a helical or multislice CT scanner. All HRCT scans were carried out at three lung levels (the upper, middle, and lower lung fields) as recommended by the Japanese Respiratory Society. The same technique was used in the baseline study.¹⁰

In accordance with the Japanese Respiratory Society guideline for the diagnosis and management of COPD,¹⁹ interstitial changes, including interlobular septal thickening, ground-glass appearance, and nodular infiltrate, as well as emphysematous changes in the upper, middle, and lower bilateral lung fields²⁰ were jointly assessed by a Japan Radiologic Society-certified radiologist and a Japanese Respiratory Society-certified pulmonologist. The two experts assessed all the scans together, comparing side by side the clearly defined lung fields on the baseline and follow-up HRCT scans for each subject. Emphysematous change was defined as an emergence of a new or enlarged low attenuation area on any one of the six HRCT scan slices. Worsening of the follow-up CT scan compared with the baseline CT scan was labeled "progression of interstitial changes" or "progression of emphysematous changes," and an improvement or no change was labeled "no progression."

Using the Japanese version²¹ of the American Thoracic Society-Division of Lung Disease questionnaire²² and supplementary questions, the following were investigated: respiratory symptoms, smoking history, and confounding factors including sex, age, medical history, and history of exposure to other materials.

Statistical Analysis

Nonnormally distributed data were transformed to an approximately normal distribution before analysis. The Student *t* test or the Mann-Whitney *U* test was used to compare continuous variables between exposed and unexposed groups. The χ^2 test or Fisher exact method was used to compare proportions, prevalence, or incidence.

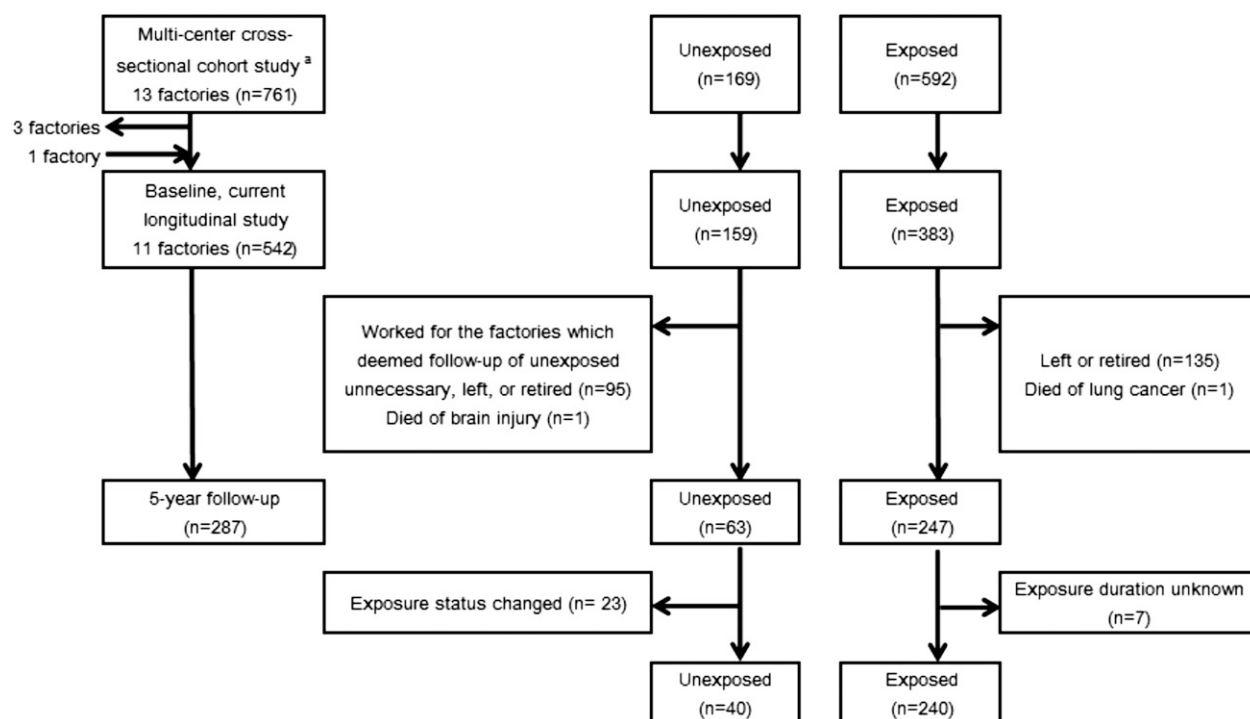


Figure 1 – Study population. The flow of the subjects. ^aNakano et al.¹⁰

Based on the classification criteria of In-S adopted in our baseline study,¹⁰ the exposed subjects were stratified into six In-S categories: In-S level < 1.0 µg/L, 1.0 to 2.9 µg/L, 3.0 to 4.9 µg/L, 5.0 to 9.9 µg/L, 10.0 to 19.9 µg/L, and > 20.0 µg/L. These six categories were used to assess the risk of indium exposure on the effect variables, as well as their dose-response relationship.

Mean values of 5-year differences in biomarkers and lung functions among the exposed subjects were stratified by the aforementioned six In-S categories and compared with the unexposed subjects using the Dunnett test. Incidence of abnormalities (change from normal to abnormal values) by exposure group for the biomarkers, lung function, and HRCT scan progression was analyzed, using the following cutoff for abnormal values:

KL-6 ≥ 500 U/mL, SP-D ≥ 110 ng/mL, FEV₁/FVC < 70%, %FVC < 80%, and %FEV₁ < 80%. Test for trend in the In-S categories was performed using the Cochran-Armitage test for categorical data.

Based on the test for trend in the In-S categories, as well as the analysis of exposure and effect indexes with respect to HRCT scan progression, the relationship between In-S and HRCT scan progression was further analyzed, using a logistic regression model. Adjusted variables were age, mean duration since initial indium exposure, and smoking.

Statistical significance was assessed by two-tailed analysis with $P < .05$. All statistical analyses were performed using SPSS, version 19 (IBM) and JMP, version 10.0.2 (SAS Institute Inc).

Results

Table 1 shows the characteristics of the study subjects and the pulmonary effects of indium at baseline and at 5-year follow-up. The mean duration since first indium exposure was 5.5 years for the currently exposed group at baseline and 12.1 years for the formerly exposed. The currently exposed subjects were younger than the unexposed workers ($P < .05$). No difference in the proportion of male subjects and smoking history was observed between the exposed and unexposed subjects.

At baseline, the mean values for KL-6, SP-D, and pulmonary symptoms in the exposed group were significantly higher than in the unexposed group. For the mean values of pulmonary function test results, no difference was observed between the two groups.

At follow-up, the mean values of In-S, KL-6, and SP-D among the currently exposed workers declined from baseline by 29.8%, 27.2%, and 27.5%; those among the formerly exposed declined by 39.4%, 24.7%, and 21.9%, respectively. The significant difference observed at baseline in KL-6 between the unexposed and the exposed groups disappeared at follow-up. Mean values of FEV₁/FVC, %FVC, and %FEV₁ in the exposed group slightly decreased during follow-up.

Table 2 shows the 5-year differences and incidence of abnormal values in serum biomarkers and lung function, stratified by In-S levels. Those with baseline In-S levels above 3 µg/L displayed a notable 5-year decline in In-S. With increasing baseline In-S levels,

TABLE 1] Characteristics, Exposure Levels, Biomarkers of Effect, and Lung Function of Unexposed and Indium-Exposed Subjects at Baseline and at 5-Year Follow-up

Characteristics	Baseline Study			Follow-up Study		
	Unexposed (n = 40)	Currently Exposed (n = 207)	Formerly Exposed (n = 33)	Unexposed (n = 40)	Currently Exposed (n = 207)	Formerly Exposed (n = 33)
Age (SD), y	44.5 (10.5)	36.8 ^a (10.5)	40.4 (8.8)	49.9 (10.6)	41.9 ^a (11.9)	45.2 (8.4)
Male, %	90.0	90.8	97.0	...	...	...
In-S (range), µg/L	0.4 (<0.1, 1.5)	10.4 ^a (<0.1, 117)	17.5 ^a (<0.1, 83.3)	0.1 (<0.1, 0.5)	7.3 ^a (<0.1, 132)	10.6 ^a (<0.1, 64.4)
Mean duration (SD), y						
Since initial indium exposure	...	5.5 (0.1, 38.6)	12.1 ^a (0.6, 23.8)	...	10.5 (3.8, 44.3)	16.8 ^a (5.5, 27.7)
Since exposure cessation	...	...	5.2 (0.2, 16.8)	...	3.7 (0.3, 13.1)	9.7 ^a (0.3, 20.9)
Smoking, No. (%)						
Never smokers	13 (32.5)	65 (31.4)	7 (21.2)	12 (30.0)	60 (29.0)	5 (15.2)
Ex-smokers	11 (27.5)	24 (11.6)	6 (18.2)	15 (37.5)	50 (24.2)	10 (30.3)
Current smokers	16 (40.0)	118 (57.0)	20 (60.6)	13 (32.5)	97 (46.9)	18 (54.5)
Exposure status at follow-up, No. (%)						
Currently exposed	...	...	...	...	158 (76.3)	6 (18.2)
Formerly exposed	...	...	...	...	49 (23.7)	27 (81.8)
Cough or sputum, No./total (%)	6/40 (15.0)	69/206 (33.5)	10/32 (31.3)	5/40 (12.5)	21/202 (10.4)	3/32 (9.4)
Biomarkers of effect, geometric mean (geometric SD)						
KL-6, U/mL	245.8 (1.5)	382.4 ^a (2.1)	373.9 ^b (2.2)	229 (1.5)	278.2 (1.7)	281.7 (1.7)
SP-D, ng/mL	42.4 (1.7)	62.9 ^a (2.0)	80.7 ^a (2.3)	39.9 (1.8)	45.6 (2.0)	63.0 ^a (2.0)
Lung function, % (SD)						
FEV ₁ /FVC	80.7 (6.7)	82.8 (6.0)	82.2 (5.0)	80.3 (6.2)	82.0 (6.2)	80.9 (5.2)
%FVC	100.1 (12.8)	100.0 (12.3)	99.3 (12.5)	100.5 (12.7)	99.2 (11.8)	98.2 (10.6)
%FEV ₁	93.7 (12.9)	94.5 (11.8)	93.9 (11.4)	94.9 (12.8)	94.1 (12.3)	92.3 (10.5)

In-S = serum indium; KL-6 = Krebs von den Lungen; SP-D = surfactant protein D.

^a*P* < .05 by Student *t* test, χ^2 test, or Fisher exact method with respect to unexposed subjects.

^b*P* < .01 by Student *t* test, χ^2 test, or Fisher exact method with respect to unexposed subjects.

TABLE 2] Five-Year Differences and Incidence of Abnormal Values in Biomarkers and Lung Function, Stratified by In-S Categories

Findings	Unexposed (n = 40)	Exposed Workers by In-S Categories (N = 240)						P Value for Trend
		<1.0 (n = 70)	1.0-2.9 (n = 43)	3.0-4.9 (n = 20)	5.0-9.9 (n = 34)	10.0-19.9 (n = 35)	≥ 20.0 (n = 38)	
In-S								
Mean difference (range), µg/L	-0.28 (-1.5, 0.2)	0.26 (-0.5, 5.6)	0.50 (-1.8, 8.3)	-0.86 (-4.0, 5.6)	-2.12 (-7.6, 8.0)	5.66 (-15.0, 4.9)	16.38 ^a (-78.9, 32.4)	...
KL-6								
Mean difference (SD), U/mL	-19.2 (84.3)	-36.7 (152.5)	-28.5 (269.6)	-105.4 (126.7)	-169.5 (213.7)	-300.7 ^b (396.5)	-747.3 ^a (1036.3)	...
Incidence of abnormal values, ^c No. (%)	1/40 (2.5)	0/70 (0.0)	2/43 (4.7)	0/20 (0.0)	0/34 (0.0)	2/35 (5.7)	0/38 (0.0)	.909
Currently exposed at baseline	...	0/65 (0.0)	2/36 (5.6)	0/19 (0.0)	0/29 (0.0)	2/28 (7.1)	0/30 (0.0)	.781
Formerly exposed at baseline	...	0/5 (0.0)	0/7 (0.0)	0/1 (0.0)	0/5 (0.0)	0/7 (0.0)	0/8 (0.0)	.444
SP-D								
Mean difference, ng/mL (SD)	-0.42 (20.1)	-8.14 (18.5)	-14.13 (31.2)	-19.53 (21.2)	-19.69 (19.4)	-25.17 ^a (37.4)	-54.92 ^a (63.6)	...
Incidence of abnormal values, ^c No. (%)	2/40 (5.0)	0/70 (0.0)	0/43 (0.0)	0/20 (0.0)	1/34 (2.9)	0/35 (0.0)	0/38 (0.0)	.246
Currently exposed at baseline	...	0/65 (0.0)	0/36 (0.0)	0/19 (0.0)	1/29 (3.4)	0/28 (0.0)	0/30 (0.0)	.296
Formerly exposed at baseline	...	0/5 (0.0)	0/7 (0.0)	0/1 (0.0)	0/5 (0.0)	0/7 (0.0)	0/8 (0.0)	.276
FEV₁/FVC								
Mean difference, % (SD)	-0.37 (2.93)	-0.69 (3.65)	-0.18 (3.70)	-0.82 (2.42)	-1.06 (2.95)	-0.56 (3.93)	-2.26 (5.07)	...
Incidence of abnormal values, ^c No. (%)	1/39 (2.6)	1/69 (1.4)	0/42 (0.0)	0/20 (0.0)	2/33 (6.1)	0/33 (0.0)	4/33 (12.1)	.034
%FVC								
Mean difference (SD), %	0.39 (6.73)	-0.41 (7.96)	-1.65 (5.82)	-0.28 (6.89)	-3.58 ^b (5.52)	-0.84 (5.22)	1.81 (4.77)	...
Incidence of abnormal values, ^c No. (%)	0/39 (0.0)	0/69 (0.0)	1/42 (2.4)	0/20 (0.0)	1/33 (3.0)	0/33 (0.0)	0/33 (0.0)	.796

(Continued)

TABLE 2] (continued)

Findings	Unexposed (n = 40)	Exposed Workers by In-S Categories (N = 240)						P Value for Trend
		<1.0 (n = 70)	1.0-2.9 (n = 43)	3.0-4.9 (n = 20)	5.0-9.9 (n = 34)	10.0-19.9 (n = 35)	≥ 20.0 (n = 38)	
%FEV ₁								
Mean difference (SD), %	1.11 (5.69)	0.46 (6.39)	-0.82 (5.58)	-0.27 (6.40)	-3.63 ^a (4.68)	-0.37 (4.81)	0.17 (6.92)	...
Incidence of abnormal values, ^c No. (%)	0/39 (0.0)	0/69 (0.0)	1/42 (2.4)	0/20 (0.0)	1/33 (3.0)	2/33 (6.1)	2/33 (6.1)	.012

See Table 1 legend for expansion of abbreviations.

^aP < .05 by Dunnett test (for categorized In-S) with respect to unexposed subjects.^bP < .01 by Dunnett test (for categorized In-S) with respect to unexposed subjects.^cCutoff for abnormal values: KL-6 ≥ 500 U/mL, SP-D ≥ 110 ng/mL, FEV₁/FVC < 70%, %FVC < 80%, %FEV₁ < 80%.

increasing incidence of abnormal lung functions (FEV₁/FVC and %FEV₁) was observed ($P < .05$).

Table 3 shows the incidence of progression on HRCT scan findings during 5-year follow-up stratified by In-S categories. Incidences of emphysematous progression in unexposed and exposed workers were two of 35 (5.7%) and 20 of 172 (11.6%). Dose-dependent increase of the incidence was observed (P for trend = .002). Among the exposed subjects with In-S levels above 20 $\mu\text{g/L}$, 26.3% experienced emphysematous progression, and the crude OR was 5.89 (95% CI = 1.19-29.17). Of 20 exposed workers with emphysematous progression, 18 were ex- or current smokers at baseline. A statistically significant trend of increasing incidence was observed for smokers ($P = .005$). When exposed to high levels of indium (In-S $\geq 20 \mu\text{g/L}$), nine of 31 smokers (29.0%) experienced emphysematous progression, compared with one of seven (14.3%) never smokers. Meanwhile, incidence of interstitial progression was two of 35 (5.7%) among the unexposed and 10 of 172 (5.8%) among the exposed workers. No statistically significant trend was observed.

Table 4 compares, within the exposed workers, the baseline indium exposure levels, serum biomarkers, and lung functions between those with and without HRCT scan progression. Compared with those without an emphysematous deterioration, those who experienced emphysematous progression exhibited significantly higher In-S levels, were older in age, had higher KL-6 levels, and lower %FEV₁. Regarding those with and without progression in interstitial changes, there was no statistical difference in In-S and in KL-6, while those with interstitial changes had statistically higher SP-D levels ($P < .01$) and lower FEV₁/FVC ($P < .05$).

Discussion

The 5-year follow-up study of indium-exposed and unexposed workers revealed a long-term effect of indium on the lungs in the form of HRCT scan progression in emphysematous changes, despite a significant decline in In-S likely due to the workplace improvements enforced after our baseline study. The dose-response trend between In-S levels and incidence of emphysematous progression indicated that indium inhalation is a serious risk factor for emphysematous progression, especially among the highly exposed workers (In-S $\geq 20 \mu\text{g/L}$). Due to the very slow clearance of hardly soluble indium particles from the lungs,^{11,23,24} both the currently and formerly exposed workers were

TABLE 3] Incidence of Progression of HRCT Scan Findings During 5-Year Follow-up, Stratified by In-S Categories

Findings	Unexposed (n = 35)	Exposed Workers by In-S Categories (N = 172)						P Value for Trend
		<1.0 (n = 27)	1.0-2.9 (n = 36)	3.0-4.9 (n = 16)	5.0-9.9 (n = 23)	10.0-19.9 (n = 32)	≥ 20.0 (n = 38)	
Emphysematous progression, incidence rate (%)								
All subjects, No./total (%)	2/35 (5.7)	2/27 (7.4)	1/36 (2.8)	0/16 (0.0)	3/23 (13.0)	4/32 (12.5)	10/38 (26.3)	.002
Crude OR (95% CI)	1	1.32 (0.17, 10.03)	0.47 (0.04, 5.45)	1.37 (0.22, 8.75)		2.36 (0.40, 13.85)	5.89 (1.19, 29.17)	...
Adjusted OR (95% CI)	1	1.65 (0.20, 13.96)	0.78 (0.06, 10.13)	1.86 (0.24, 14.45)		3.48 (0.48, 25.08)	10.49 (1.54, 71.36)	...
Currently exposed at baseline	...	2/23 (8.7)	1/29 (3.4)	0/15 (0.0)	2/18 (11.1)	4/25 (16.0)	10/30 (33.3)	<.001
Formerly exposed at baseline	...	0/4 (0.0)	0/7 (0.0)	0/1 (0.0)	1/5 (20.0)	0/7 (0.0)	0/8 (0.0)	.690
Ex-/current smokers at baseline	2/24 (8.3)	1/16 (6.3)	1/23 (4.3)	0/16 (0.0)	3/18 (16.7)	4/24 (16.7)	9/31 (29.0)	.005
Never smokers at baseline	0/11 (0.0)	1/11 (9.1)	0/13 (0.0)	0/0 (0.0)	0/5 (0.0)	0/8 (0.0)	1/7 (14.3)	.506
Interstitial progression, incidence rate (%)								
All subjects, No./total (%)	2/35 (5.7)	2/27 (7.4)	3/36 (8.3)	0/16 (0.0)	0/23 (0.0)	3/32 (9.4)	2/38 (5.3)	.852
Crude OR (95%CI)	1	1.32 (0.17, 10.03)	1.50 (0.24, 9.57)		0.73 (0.12, 4.57)		0.92 (0.12, 6.88)	...
Adjusted OR (95% CI)	1	1.20 (0.13, 10.72)	2.09 (0.25, 17.14)		1.68 (0.20, 14.27)		2.58 (0.24, 27.90)	...
Currently exposed at baseline	...	2/23 (8.7)	2/29 (6.9)	0/15 (0.0)	0/18 (0.0)	2/25 (8.0)	2/30 (6.7)	.911
Formerly exposed at baseline	...	0/4 (0.0)	1/7 (14.3)	0/1 (0.0)	0/5 (0.0)	1/7 (14.3)	0/8 (0.0)	.928
Ex-/current smokers at baseline	1/24 (4.2)	1/16 (6.3)	0/23 (0.0)	0/16 (0.0)	0/18 (0.0)	2/24 (8.3)	2/31 (6.5)	.465
Never smokers at baseline	1/11 (9.1)	1/11 (9.1)	3/13 (23.1)	0/0 (0.0)	0/5 (0.0)	1/8 (12.5)	0/7 (0.0)	.516

Adjusted OR: adjusted variables are age, mean duration since initial indium exposure, and smoking history at baseline. In-S categories with zero incidence were combined to assess the ORs using logistic regression models. See Table 1 legend for expansion of abbreviation.

TABLE 4] Exposure and Effect Indexes at Baseline Among Exposed Workers With or Without Progression of HRCT Scan Findings During Follow-up Period

Characteristics	Emphysematous Changes		Interstitial Changes	
	Progressed	No Progression	Progressed	No Progression
Total subjects, No.	20	152	10	162
In-S (SD), $\mu\text{g/L}$	34.4 ^a (36.0)	12.4 (17.0)	13.3 (16.6)	15.0 (21.5)
Mean duration since initial indium exposure (SD), y	9.0 (5.8)	6.8 (6.3)	7.0 (4.9)	7.1 (6.3)
Age (SD), y	45.1 ^a (11.7)	37.8 (12.0)	52.7 ^b (11.7)	37.8 (11.6)
Smoking status, No. (%)				
Never smokers	2 (10.0)	42 (27.6)	5 (50.0)	39 (24.1)
Smokers	18 (90.0)	110 (72.4)	5 (50.0)	123 (75.9)
Ex-smokers	2 (10.0)	21 (13.8)	2 (20.0)	21 (13.0)
Current smokers	16 (80.0)	89 (58.6)	3 (30.0)	102 (63.0)
Cough or sputum, No./total (%)	4/20 (20.0)	50/150 (33.3)	1/10 (10.0)	53/160 (33.1)
Biomarkers, geometric mean (geometric SD)				
KL-6, U/mL	651.6 ^b (2.3)	405.4 (2.1)	518.3 (1.6)	423.4 (2.2)
SP-D, ng/mL	100.0 (1.9)	73.0 (2.0)	132.4 ^b (1.8)	73.2 (2.0)
Lung function, mean (SD)				
FEV ₁ /FVC	79.0 (6.8)	82.4 (5.2)	78.1 ^a (7.8)	82.3 (5.2)
%FVC	94.5 (10.5)	99.8 (11.7)	94.6 (9.5)	99.6 (11.7)
%FEV ₁	86.6 ^a (9.7)	94.5 (11.9)	87.0 (10.1)	94.0 (11.9)

See Table 1 legend for expansion of abbreviations.

^a $P < .05$ by Student *t* test, Mann-Whitney *U* test, χ^2 test, or Fisher exact method, with respect to subjects with no progression.

^b $P < .01$ by Student *t* test, Mann-Whitney *U* test, χ^2 test, or Fisher exact method, with respect to subjects with no progression.

being continually exposed to indium by the particles in their lungs, even after the reduction of occupational exposures to indium. Indium particles in the lungs perpetuated the phagocytosis and phagolysosomal acidification²⁵ cycle by the alveolar macrophages. The proteases released by the macrophages and the cytotoxicity of indium may have promoted macrophage-mediated elastolysis, which is known to cause inflammation and destruction of the lung parenchyma,²⁶ leading to emphysematous deterioration.

Smoking is a major risk factor of COPD,²⁷ and the current study showed that smoking is also an important effect modifier of the risk of emphysematous progression among indium-exposed workers. Due to the small number of emphysematous progression in the unexposed workers, we could not assess the interaction between indium exposure and smoking using the logistic regression model. However, in addition to the statistically significant dose-response trend of the incidence among smokers, the incidence ratio of emphysematous progression between smokers and nonsmokers among the highly exposed workers ($\text{In-S} \geq 20$) was 2.03 (95% CI = 0.31-13.5) (data not shown).

In contrast to the emphysematous progression, the incidence rate of progression in interstitial changes was not detected, although a causal relationship between indium exposure and interstitial changes has been previously identified.¹⁰ KL-6 is known to increase in the active phase of interstitial pneumonia and decrease in the inactive phase.¹⁶ In the current study, KL-6 among the indium-exposed subjects declined by 25% after the baseline study and subsequent intervention. These results imply that once indium exposure is eliminated or drastically reduced, KL-6 may significantly decline, although not to the level of the unexposed. Despite no statistically significant exposure-response relationship for interstitial changes across the categories of In-S, 10 exposed workers did have progression of interstitial change, of which four also experienced emphysematous progression. When restricted to $\text{In-S} \geq 10 \mu\text{g/L}$, three of five had both interstitial and emphysematous progression. This raises the concern that interstitial changes and emphysematous changes coexist among highly exposed workers with interstitial progression.

The response rate of the unexposed group was low (40 of 159, 25.2%). Of the 119 workers who contribute to the low response rate, 23 were removed from the analysis because they switched to an exposed environment during follow-up. The remaining 96 unexposed workers lost to follow-up were due to the decision made by a few factories that further follow-up of the unexposed workers was unnecessary. This suggests that self-selection on ill health was unlikely, but the implication of selection bias remains a substantial limitation of the study.

The 5-year follow-up rate was also low at 57.2%. Sub-analysis showed that the baseline mean In-S of the subjects lost to follow-up was significantly lower than that of the workers retained at follow-up (2.6 $\mu\text{g/L}$ vs 9.1 $\mu\text{g/L}$). Additionally, 73 of the 280 followed-up subjects had no baseline HRCT scans. It is not possible to conclude whether including those lost to follow-up and those without baseline scans would have lowered or increased the risk reported in the current study.

Some of the unexposed workers exhibited measurable In-S up to 1.5 $\mu\text{g/L}$ at baseline. The possibility of contamination of unexposed subjects' workplace and exposure misclassification remains.

While a 5-year assessment is insufficient to predict clinical outcomes after longer periods, the current

study results provide significant rationale to immediately remove highly exposed workers (In-S $\geq 20 \mu\text{g/L}$) from indium exposure. The increased prevalence of progression was also evident at lower In-S levels and suggest that an In-S level between 5 $\mu\text{g/L}$ and 19.9 $\mu\text{g/L}$ is a warning sign for action. A larger sample size may have provided the statistical power to lower the preventive recommendation below 20 $\mu\text{g/L}$. Additionally, high levels of biomarker and abnormal lung function warrant attention as potential predictors of emphysematous changes.

The agenda for future research includes monitoring new clinical cases of indium lung, following further progression of emphysematous and interstitial changes in the current cohort, and studying the occurrence of lung cancer.

Conclusions

This 5-year cohort study of indium workers suggests that In-S burden is a risk factor for progression of emphysematous changes, particularly in smokers, and persists after In-S decreases. The study results provide the basis to immediately remove indium workers with In-S above 20 $\mu\text{g/L}$ from indium exposure and monitor their lung conditions, as well as to consider In-S levels between 5 $\mu\text{g/L}$ and 19.9 $\mu\text{g/L}$ as a warning sign for action.

Acknowledgments

Author contributions: M. N. takes responsibility for the integrity and accuracy of the data and manuscript, had primary responsibility for the design of the study and drafting of the article, and contributed to fieldwork management, acquisition, analysis, and interpretation of data, and critical revision of the manuscript. K. O. had primary responsibility for the conception and design of the study and contributed to fieldwork management; K. U. contributed to analysis and interpretation of data; T. M. contributed to data acquisition; N. Y. contributed to data acquisition; M. H. assisted in the study design and contributed to acquisition, analysis, and interpretation of data; and A. T. assisted in the study design and contributed to fieldwork management and acquisition, analysis, and interpretation of data.

Financial/nonfinancial disclosures: The authors have reported to *CHEST* that no potential conflicts of interest exist with any companies/organizations whose products or services may be discussed in this article.

Role of sponsors: The sponsor had no role in the design of the study, the collection and analysis of the data, or the preparation of the manuscript.

Other contributions: We thank the staff members and participants at all factories for their helpful and cordial cooperation. We also thank Mutsuko Yamada, PhD, for assistance with critical revision of the manuscript.

References

1. Minami H. *Demand, Supply, and Price Trend of Indium and Gallium* [in Japanese]. Tokyo, Japan: Japan Oil, Gas and Metals National Corporation; 2010.
2. Homma T, Ueno T, Sekizawa K, Tanaka A, Hirata M. Interstitial pneumonia developed in a worker dealing with particles containing indium-tin oxide. *J Occup Health*. 2003;45(3):137-139.
3. Omae K, Nakano M, Tanaka A, Hirata M, Hamaguchi T, Chonan T. Indium lung—case reports and epidemiology. *Int Arch Occup Environ Health*. 2011; 84(5):471-477.
4. Cummings KJ, Nakano M, Omae K, et al. Indium lung disease. *Chest*. 2012;141(6):1512-1521.
5. Chonan T, Amano A, Modera H, Kanehara A, Honma K. Interstitial pneumonia due to an inhalation of indium compounds [in Japanese]. *Japanese J Chest Dis*. 2010;69(9):851-855.
6. Cummings KJ, Donat WE, Ettensohn DB, Roggli VL, Ingram P, Kreiss K. Pulmonary alveolar proteinosis in workers at an indium processing facility. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(5): 458-464.
7. Xiao YL, Cai HR, Wang YH, Meng FQ, Zhang DP. Pulmonary alveolar proteinosis in an indium-processing worker. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(10):1347-1350.
8. Chonan T, Taguchi O, Omae K. Interstitial pulmonary disorders in indium-processing workers. *Eur Respir J*. 2007;29(2):317-324.
9. 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(1):51-55.
10. Nakano M, Omae K, Tanaka A, et al. Causal relationship between indium compound inhalation and effects on the lungs. *J Occup Health*. 2009;51(6): 513-521.
11. 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(3): 175-187.
12. Ministry of Health, Labor, and Welfare. *Technical Guideline for Preventing Health Impairment of Workers Engaged in the Indium Tin Oxide Handling Processes* [in Japanese]. Tokyo, Japan: Government of Japan; 2010.
13. 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* [in Japanese]. Tokyo, Japan: Government of Japan; 2013.
14. Sakurai H. Occupational safety and health in Japan: current situations and the future. *Ind Health*. 2012;50(4):253-260.
15. Kobayashi J, Kitamura S. KL-6: a serum marker for interstitial pneumonia. *Chest*. 1995;108(2):311-315.
16. 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(3):378-381.
17. 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): 1860-1866.
18. The Clinical Pulmonary Functions Committee. Standard criteria for spirometry and arterial blood gas partial pressure measurement in Japanese [in Japanese]. *J Jap Respir Soc*. 2001;39(5): 383-399.
19. The Japanese Respiratory Society. *Guidelines for the Diagnosis and Treatment of COPD*. 2nd ed. Tokyo, Japan: Medical Review; 2004.
20. Goddard PR, Nicholson EM, Laszlo G, Watt I. Computed tomography in pulmonary emphysema. *Clin Radiol*. 1982;33(4):379-387.
21. Japan Public Health Association. *Research on Method Of Measuring Influence On Health Due To Air Pollution* [in Japanese]. Tokyo, Japan: Japan Public Health Association; 1979.
22. Ferris BG. Epidemiology Standardization Project (American Thoracic Society). *Am Rev Respir Dis*. 1978;118(6 pt 2):1-120.
23. National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of indium phosphide (CAS No. 22398-90-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*. 2001;(499):7-340.
24. Tanaka A, Hirata M, Homma T, Kiyohara Y. Chronic pulmonary toxicity study of indium-tin oxide and indium oxide following intratracheal instillations into the lungs of hamsters. *J Occup Health*. 2010;52(1):14-22.
25. Gwinn WM, Qu W, Shines CJ, et al. Macrophage solubilization and cytotoxicity of indium-containing particles in vitro. *Toxicol Sci*. 2013;135(2):414-424.
26. Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(4):L867-L873.
27. Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(4):347-365.

Brief Report

Tissue distribution of indium after repeated intratracheal instillations of indium-tin oxide into the lungs of hamsters

Akiyo TANAKA¹, Miyuki HIRATA¹, Nagisa MATSUMURA¹ and Yutaka KIYOHARA¹

¹Department of Environmental Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Japan

Abstract: Tissue distribution of indium after repeated intratracheal instillations of indium-tin oxide into the lungs of hamsters: Akiyo TANAKA, et al. Department of Environmental Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University—

Objectives: The aim of this study was to analyze the tissue distribution of indium after intratracheally instilling indium-tin oxide (ITO) into the lungs of hamsters. **Methods:** Male Syrian hamsters received an intratracheal dose of 3 mg/kg or 6 mg/kg of ITO particles containing 2.2 mg/kg or 4.5 mg/kg of indium, twice weekly for 8 weeks. In parallel, control hamsters received only an intratracheal dose of distilled water. A subset of hamsters was euthanized periodically throughout the study from 8 up to 78 weeks after the final instillation. The distribution of indium in the lungs, liver, kidneys and spleen, as well as pathological changes in the liver, kidneys, and spleen, was determined. **Results:** The contents of indium in the lungs in the two ITO groups gradually decreased over the 78-week observation period, with elimination half-lives of approximately 142 weeks for the 3 mg/kg ITO group and 124 weeks for the 6 mg/kg ITO. The indium concentrations in the liver, kidneys, and spleen gradually increased throughout the observation period. Although foci of the lesions were observed histopathologically in the extrapulmonary organs among the two ITO groups, the control group showed similar lesions. **Conclusions:** The results clearly demonstrate that the clearance of indium from the body is extremely slow after intratracheal instillation in hamsters. (J Occup Health 2015; 57: 189–192)

Key words: Hamsters, Indium, Indium-tin oxide, Intratracheal instillation, Lung clearance, Tissue indium concentration

Indium is an essential rare metal that is commonly

used in the electronics industry; the use of indium compounds, most notably indium-tin oxide (ITO), has risen sharply since the 1990s¹⁾. Several case reports and epidemiological studies of workers exposed to ITO have heightened awareness of the potential hazards of occupational exposure to this metal^{2–4)}. Although evidence of pulmonary lesions has been reported after respiratory ITO exposure in animals and humans^{2–7)}, it is not clear whether indium can further distribute throughout the body. In our previous study, pulmonary toxicity in hamsters was demonstrated over a four-month period of repeated intratracheal instillation of 3 mg/kg or 6 mg/kg doses of ITO (2.2 mg/kg or 4.5 mg/kg as indium, respectively)⁶⁾. The serum indium concentrations among the two test groups gradually increased throughout the observation period, and the severity of pulmonary pathologies increased over time. The present study evaluated the long-term peripheral organ distribution of indium from 8 to 78 weeks after repeated intratracheal instillation of ITO into the lungs of hamsters as reported in our previous study⁶⁾.

Materials and Methods

ITO particles were prepared as previously reported⁶⁾ and were obtained by donation from a corporate source. All animal studies were conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experiments in the Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, and in compliance with Law No. 105 and Notification No. 6 of the Government of Japan. Eighty-seven 6-week-old male Syrian hamsters were purchased from the colony of Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan) to be used in this study. The animals were housed in a specific pathogen-free environment at the Laboratory of Animal Experiments in the Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University. The lighting, food supply and drinking water were maintained under the same conditions as described previously⁶⁾. Intratracheal instillation of ITO began after a 2-week acclimatization period when

Received May 29, 2014; Accepted Nov 4, 2014

Published online in J-STAGE Jan 10, 2015

Correspondence to: A. Tanaka, Department of Environmental Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, EC Bldg 2F, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan (e-mail: atanaka@envmed.med.kyushu-u.ac.jp)

the animals were 8 weeks old.

The hamsters were randomly divided into 3 groups: a control group (n=29), a 3 mg/kg ITO treatment group (2.2 mg/kg as indium; n=29) and a 6 mg/kg ITO treatment group (4.5 mg/kg as indium; n=29). There was no significant difference in body weight among the groups at the start of the study. A vehicle or test agent was instilled into the trachea of ether-anesthetized hamsters twice weekly over 8 weeks for a total of 16 doses. The control group received 1.0 ml/kg of distilled water. Six to eight surviving hamsters in each group were euthanized using carbon dioxide gas and autopsied at 8, 16, 40 or 78 weeks after their final dose. The indium concentrations were measured in the organs of the ITO-treated hamsters, as were the total organ weights, and histopathological examination of the liver, kidneys and spleen was also completed for all hamsters. To measure lung indium content, one apical lobe was soaked in 10 ml of 68% ultrapure nitric acid (TAMAPURE-AA-100, Tama Chemicals Co., Ltd., Kawasaki, Kanagawa, Japan) overnight, and 0.1 ml of lung soak solution, 0.02 g of liver tissue, 0.1 g of kidney, 0.1 g of spleen tissue or 1 ml of serum was digested with 6 ml of 68% ultrapure nitric acid (TAMAPURE-AA-100, Tama Chemicals Co., Ltd., Kawasaki, Kanagawa, Japan) and 0.5 ml of 35% ultrapure hydrogen peroxide (TAMAPURE-AA-100, Tama Chemicals Co., Ltd., Kawasaki, Kanagawa, Japan) using a microwave digestion apparatus (Multiwave 3000, PerkinElmer, Yokohama, Japan). Digested samples were then diluted into ultrapure water for a total volume of 20 ml and injected into an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS, Agilent 7500ce, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) at the Center of Advanced Instrumental Analysis, Kyushu University. Rhodium was used as an internal standard for indium measurements. The lower limit of quantitative detection for indium was $0.04 \mu\text{g/g}$ for the lungs, $0.005 \mu\text{g/g}$ for the liver, $0.001 \mu\text{g/g}$ for the kidneys and $0.001 \mu\text{g/g}$ for the spleen. In the cases where the indium concentrations were below the limit of detection, a value equal to one-half of the limit of

detection was used for statistical calculations. The distribution of indium in the lungs was calculated as the concentration of indium in lung tissue.

Samples of the liver, kidneys and spleen were fixed in 10% neutral buffered formalin and processed in paraffin for histopathological examination, which included an evaluation of the severity of lesions as reported in a previous study⁶⁾. Briefly, histopathological findings in these organs were scored as present or absent; if they were absent, findings were expressed as 0. In the case of lesions, the severity of each of the lesions was graded on a 4-point scale ranging from slight to severe. Slight lesions were expressed as 1, mild lesions were expressed as 2, moderate lesions were expressed as 3, and severe lesions were expressed as 4.

For the statistical analyses of organ weights and indium content in the lung, indium concentrations in the liver, kidneys and spleen and score of the severity of the lesions, one-way analysis of variance followed by a Fischer's least significant difference test was applied. In all the statistical comparisons, a *p* value of <0.05 was considered to represent a significant difference.

Results

Over the course of 8 weeks, hamsters received mean indium doses of $4.8 \pm 0.4 \text{ mg}$ (mean $\pm$ SD) and $9.5 \pm 0.9 \text{ mg}$ per animal in the 3 mg/kg and 6 mg/kg ITO treatment groups, respectively. The data collected in the course of the study for body weight, lung weight, mortality, serum indium concentration and lung lesions were presented in our previous study⁶⁾. The liver, kidney and spleen weights were not significantly different throughout the course of the study among the two ITO-treated groups and the control group. The indium content in the lungs decreased slowly from 8 to 78 weeks in both ITO-treated groups (Table 1). Although the concentrations of indium in the lung for the 6 mg/kg ITO group were slightly higher at 78 weeks than at 40 weeks, the clearance of indium from the lungs fit a biphasic exponential rate

Table 1. Indium content in the lungs after the final instillation of ITO

Organ	Group	Weeks after final instillation (weeks)			
		8	16	40	78
In (mg/whole lung)	ITO 3 mg/kg	3.850 ± 1.425 (8) ^a	3.183 ± 0.709 (8)	3.219 ± 0.440 (7)	2.587 ± 0.443 (6)
	ITO 6 mg/kg	6.633 ± 1.595 (8) ^b	4.404 ± 1.750 (7)	3.690 ± 1.040 (7)	4.078 ± 0.636 (7) ^b
% of In dose	ITO 3 mg/kg	82.6 ± 30.5	69.8 ± 18.1	66.5 ± 7.7	56.3 ± 8.3
	ITO 6 mg/kg	64.5 ± 17.1	49.7 ± 18.9	39.4 ± 11.3 ^b	44.6 ± 7.3 ^b

The results are shown as means $\pm$ SD. a: The number of hamsters examined. b: Statistically different between the ITO 3 mg/kg group and the ITO 6 mg/kg group.

model for both ITO-treated groups. The elimination half-life of indium from the lungs was 142 weeks in the 3 mg/kg ITO group and 124 weeks in the 6 mg/kg ITO group. Indium was not detected in the lungs of the control group hamsters at any time during the observation period.

The indium concentrations in the serum, which were reported in our previous study⁶⁾, liver, kidneys and spleen gradually increased during the observation period, with the concentrations at least 7-fold higher at 78 weeks than at 8 weeks for both ITO treatment groups. However, the accumulation ratio of indium in the liver, kidneys and spleen for the total dose instilled was very low; that is, it was less than 2% at 78 weeks (Table 2). No indium was detected in the organs of control group hamsters at any point during the observation period. There was one renal adenocarcinoma in the ITO 3 mg/kg group at 16 weeks and one cavernous hemangioma of the liver in the ITO 6 mg/kg group at 78 weeks. The pathological evaluations revealed some lesions in the organs that increased in severity as the study progressed. There were no significant differences between the ITO-treated groups and the control group (data not shown).

Discussion

In this study, the long-term tissue distribution of indium was assessed after repeated intratracheal administration of ITO in hamsters. This is the first study of long-term indium distribution following respiratory exposure. Indium was found to be absorbed and retained in the lungs for a long time. The half-life of indium elimination from the lungs was more than two years and was similar for the two different

levels of ITO dosing. Although the indium accumulation ratio in the liver, kidneys and spleen for the total instillation dose was very low and quantity of indium excretion in feces and urine was not clear, indium accumulation in these organs indicated that translocation from the lungs occurred, but there was no gradual elimination from these organs during the observation period. These results are consistent with our previous study in which it was reported that ITO-induced lung lesions and that serum indium levels increased significantly after exposure⁶⁾. It may be that the low solubility of ITO particles leads to long-term deposition in the lungs.

To date, a few studies have assessed lung indium levels among workers who handle indium or its derivatives occupationally. These studies have reported indium levels of up to 31.2 $\mu\text{g/g}$ among recycling workers⁸⁾ or 29.3 $\mu\text{g/g}$ in an ITO-handling worker⁹⁾. Furthermore, although there is some data assessing indium levels in peripheral organs at a single point in time^{7, 10)}, the data do not clarify whether there was long-term absorption of indium in tissue. In the present study, it was demonstrated that indium was significantly absorbed in peripheral organs after respiratory exposure and that the absorption continued to increase long after ITO instillation. Interestingly, Yamazaki *et al.*¹¹⁾ reported a gradual decrease in serum indium concentrations after the cessation of dosing with indium arsenide (InAs) or indium phosphide (InP). It may be that serum and peripheral organ absorption depend upon the species of indium compound to which the animals are exposed. Further clarification will be needed to elucidate a trend between absorption or excretion and the properties of various indium compounds.

Table 2. Indium concentrations in the liver, kidneys and spleen after the final instillation of ITO

Organ	Group	Weeks after final instillation (weeks)			
		8	16	40	78
Liver ($\mu\text{g In/g}$)	ITO 3 mg/kg	0.538 $\pm$ 0.163 (8) ^a	1.055 $\pm$ 0.455 (7)	3.094 $\pm$ 1.222 (7)	8.370 $\pm$ 2.504 (6)
	ITO 6 mg/kg	1.130 $\pm$ 0.573 (8) ^b	1.293 $\pm$ 0.869 (7)	7.181 $\pm$ 5.165 (7)	14.420 $\pm$ 3.199 (7) ^b
Kidney ($\mu\text{g In/g}$)	ITO 3 mg/kg	1.435 $\pm$ 0.177 (8)	1.423 $\pm$ 0.249 (7)	4.684 $\pm$ 0.949 (7)	9.362 $\pm$ 3.879 (6)
	ITO 6 mg/kg	2.210 $\pm$ 1.110 (8)	3.177 $\pm$ 0.997 (7) ^b	6.639 $\pm$ 2.419 (7)	17.773 $\pm$ 7.236 (7) ^b
Spleen ($\mu\text{g In/g}$)	ITO 3 mg/kg	0.612 $\pm$ 0.260 (8)	0.822 $\pm$ 0.382 (7)	1.617 $\pm$ 0.337 (7)	2.910 $\pm$ 1.217 (6)
	ITO 6 mg/kg	1.067 $\pm$ 0.477 (8) ^b	1.083 $\pm$ 0.792 (7)	2.071 $\pm$ 0.397 (7) ^b	5.682 $\pm$ 3.832 (7)
Serum ^c ($\mu\text{g In/ml}$)	ITO 3 mg/kg	0.060 $\pm$ 0.019 (8)	0.070 $\pm$ 0.029 (8)	0.184 $\pm$ 0.062 (7)	0.237 $\pm$ 0.127 (6)
	ITO 6 mg/kg	0.080 $\pm$ 0.022 (8)	0.087 $\pm$ 0.018 (8)	0.213 $\pm$ 0.089 (7)	0.436 $\pm$ 0.149 (7) ^b
% of In dose in the liver, kidneys, and spleen	ITO 3 mg/kg	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.4
	ITO 6 mg/kg	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.3

The results are shown as means $\pm$ SD. a: The number of hamsters examined. b: Statistically different between the ITO 3 mg/kg group and the ITO 6 mg/kg group. c: Data from this study were shown as a part of our previous study⁶⁾.

The degree of lesions observed in the liver, kidneys or spleen was not significantly different between the two dose levels of ITO and was similar to that of lesions observed in the same organs of the control animals in this study. This finding is consistent with a previous report that no exposure-related organ lesions were observed outside the lungs in mice and rats⁷⁾. It is conceivable that the toxic effect on extrapulmonary tissues is relatively weak with the instillation doses delivered herein.

In conclusion, the present study presents the first real evidence that indium is eliminated from the lungs very slowly and does accumulate in extrapulmonary organs over a long period of time after respiratory exposure to ITO.

Acknowledgments: This study was funded in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (24108009) and Grants-in-Aid for Scientific Research (B) (23390164) and (A) (23249033) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan and the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) Incorporated Administrative Agency under the Ministry of Economy, Trade and Industry (METI).

References

- 1) Tolcin AC. Indium. In: 2011 Minerals year book. US. Geological Survey, US. Department of the Interior. [Online]. 2013 [cited 2014 Jan 22]; Available from: URL:<http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/indium/myb1-2011-indiu.pdf>
- 2) Omae K, Nakano M, Tanaka A, Hirata M, Hamaguchi T, Chonan T. Indium lung-case reports and epidemiology. *Int Arch Occup Environ Health* 2011; 84: 471–7.
- 3) Choi S, Won YL, Kim D, Yi GY, Park JS, Kim EA. Subclinical interstitial lung damage in workers exposed to indium compounds. *Ann Occup Environ Med* 2013; 25: 24–30.
- 4) Cummings KJ, Suarathana E, Edwards N, et al. Serial evaluations at an indium-tin oxide production facility. *Am J Ind Med* 2013; 56: 300–7.
- 5) Tanaka A, Miyuki H, Kiyohara Y, et al. K. Review of pulmonary toxicity of indium compounds to animals and humans. *Thin Solid Films* 2010; 518: 2934–6.
- 6) Tanaka A, Hirata M, Homma T, Kiyohara Y. 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.
- 7) 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.
- 8) Nogami H, Shimoda T, Shoji S, Nishima S. Pulmonary disorders in indium-processing workers. *J JPN Respir Soc* 2008; 46: 60–4 (in Japanese).
- 9) Cummings KJ, Donat WE, Etensohn DB, Roggli VL, Ingram P, Kreiss K. Pulmonary alveolar proteinosis in workers at an indium processing facility. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 458–64.
- 10) Hoet P, Graef ED, Swennen B, et al. Occupational exposure to indium: what does biomonitoring tell us? *Toxicol Lett* 2012; 213: 122–8.
- 11) Yamazaki K, Tanaka A, Hirata M, et al. Long term pulmonary toxicity of indium arsenide and indium phosphide instilled intratracheally in hamsters. *J Occup Health* 2000; 42: 169–78.

Comparative Study on the Pulmonary Toxicity of Indium Hydroxide, Indium-Tin Oxide, and Indium Oxide Following Intratracheal Instillations into the Lungs of Rats

Akiyo Tanaka¹, Miyuki Hirata¹, Nagisa Matsumura¹, Kazunori Koga², Masaharu Shiratani², and Yutaka Kiyohara¹

¹ Department of Environmental Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, EC Building 2F, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan

² Department of Electronics, Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University, 744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan

ABSTRACT

We studied the pulmonary toxicity of indium hydroxide ($\text{In}(\text{OH})_3$), which is produced during a recycling process of indium-tin oxide (ITO), in comparison with that of ITO or indium oxide (In_2O_3), two raw materials of flat panel displays. One hundred and forty-four male Wistar rats were intratracheally given equivalent doses of 10 mg/kg indium as $\text{In}(\text{OH})_3$, ITO, or In_2O_3 particles, twice a week, for a total of 5 times for 2 weeks. Control rats were given distilled water as a vehicle. After 3 weeks, these rats were serially euthanized, and toxicological effects were determined. Body weight gain was significantly suppressed in the $\text{In}(\text{OH})_3$ -treated rats compared to that in the control group, but not in the ITO- or In_2O_3 -treated rats. Relative lung weights in all the indium-treated groups significantly increased compared to those in the control group throughout the observation period. Furthermore, lung weights in the $\text{In}(\text{OH})_3$ group were significantly higher than those in either the ITO or In_2O_3 group. Blood indium levels in the $\text{In}(\text{OH})_3$ -treated rats were much higher, 70- to 200-fold, than those in the In_2O_3 - or ITO-treated rats at each time point. Although the lung indium content decreased gradually during the observation periods, the content in the $\text{In}(\text{OH})_3$ group was significantly higher than that in either the ITO or In_2O_3 group. A histopathological analysis revealed foci indicating a slight to severe pulmonary inflammatory response, including exudation to alveolar spaces, were present in all the indium-treated groups. Interstitial fibrotic proliferation was seen only in the $\text{In}(\text{OH})_3$ -treated rats. The severity of these lesions in the $\text{In}(\text{OH})_3$ -treated rats was greater than that in either the ITO- or In_2O_3 -treated rats.

The results of our study clearly demonstrated that $\text{In}(\text{OH})_3$ particles caused severe pulmonary toxicity when repeated intratracheal instillations were performed in rats. Furthermore, the toxic potency of $\text{In}(\text{OH})_3$ in the lung was much higher than that of ITO and In_2O_3 . Accordingly, the toxicity of $\text{In}(\text{OH})_3$ particles should be considered in addition to that of ITO and

In₂O₃ particles when indium exposure occurs.

INTRODUCTION

Indium hydroxide is produced during the recycling process of indium-tin oxide (ITO) target, which is a sintered alloy containing a large portion of indium oxide (In₂O₃) and a small portion of tin oxide, and is mostly used for thin-film coatings of liquid-crystal displays (LCDs) or mobile phone displays. In 2013, the indium demand for ITO was reported to have been 90% of the total indium demand in Japan, and ITO production is expected to increase significantly owing to the increasing need for its use in electronic devices, such as LCDs [1]. Due to this increased production of ITO, recovery of indium from ITO may increase.

Since the mid-1990s, data have become available indicating that indium compounds can be toxic to animals [2]. In 2003, the first case of interstitial pneumonia caused by occupational exposure to ITO was reported [3]. In our previous study, which has been the only study regarding the chronic toxicity of ITO or In₂O₃, we demonstrated chronic lung toxicity of ITO or In₂O₃ particles in hamsters after repeated intratracheal instillations [4].

On the other hand, indium is recovered from the ITO target remainder by sputtering to a thin-film coating. About 60% of the indium consumed in 2013 was supplied by recycling of waste ITO target or other indium products in Japan [1]. Indium hydroxide is an intermediate product of the recycling process, and In₂O₃, which is a raw material of ITO, is generated in the next step of the recycling process. In this study, we evaluated the comparative lung toxicity of In(OH)₃, ITO, and In₂O₃ when administered repeatedly into the trachea of rats. These indium compounds were administered at the equivalent dose of 10 mg/kg of indium.

MATERIALS AND METHODS

Test materials: In(OH)₃ and ITO particles were obtained from a company. ITO contained 74.4% (wt%) indium and 7.8% tin, with the remainder being oxygen, and In(OH)₃ was 99.9% pure. Indium oxide, over 99.99% pure, was purchased from Katayama Chemicals, Osaka, Japan. The mean diameters of In(OH)₃, ITO, and In₂O₃ particles were 0.04, 0.56, and 0.14 μm, respectively.

Animals: One hundred forty-four male Wistar rats aged 6 weeks were purchased from the colony of Kyudo Co. (Tosu, Japan) and housed within a conventional laboratory room at the Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University. Intratracheal instillations were started once the rats reached the age of 8 weeks.

Intratracheal instillation of materials: Each material was suspended in 1.0 mL/kg body weight

distilled water and instilled into the trachea of rats anesthetized with ether, twice a week, for a total of 5 times during for 2 weeks. Each instillation per animal performed at a dose of 10 mg/kg body weight indium. The control rats received 1.0 mL/kg body weight distilled water only. All the rats were randomized into 4 groups, with each group consisting of 36 rats.

Toxicological evaluations: All the surviving rats in each group were euthanized by exposure to carbon dioxide gas at 0, 1, 2, or 3 weeks after the final instillation and were then autopsied. Although blood indium concentrations were measured in all the rats, lung indium concentrations were measured in 5 rats and pulmonary pathological evaluation was performed in 4 rats of each group. Indium concentrations in digested lung or blood samples were measured using an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS, Agilent 7500ce, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) at the Center of Advanced Instrumental Analysis, Kyushu University. Lung indium content was determined as the concentration of indium in lung tissue.

Histopathological findings in the lungs were scored as present or absent; a score of 0 was recorded if findings were absent. In the case of lesions, the severity of each of the lesion was graded as slight to severe on a 4-item scale.

These experiments were conducted according to the Guidelines for Animal Experiments at the Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University and under the Law (No. 105) and Notification (No. 6) of the Government of Japan.

RESULTS

The mean total indium dosage per animal (mean $\pm$ S.E.) was 15.1 ± 0.2 mg in the $\text{In}(\text{OH})_3$ group, 15.6 ± 0.2 mg in the ITO group, and 15.6 ± 0.2 mg in the In_2O_3 group. No rats died during the observation period, except 2 that died due to emaciation in the $\text{In}(\text{OH})_3$ group. Finally, 36 animals in the ITO, In_2O_3 , and the control groups and 34 animals in the $\text{In}(\text{OH})_3$ group were examined. Changes in the body weights of the surviving rats in each group at each time point during the instillation and observation periods are shown in Fig. 1. The body weight of the $\text{In}(\text{OH})_3$ group did not increase from the start of the instillation period and was extremely suppressed during the observation period. Trends in body weight change were significantly different ($P < 0.05$) between the $\text{In}(\text{OH})_3$ group and the ITO- or In_2O_3

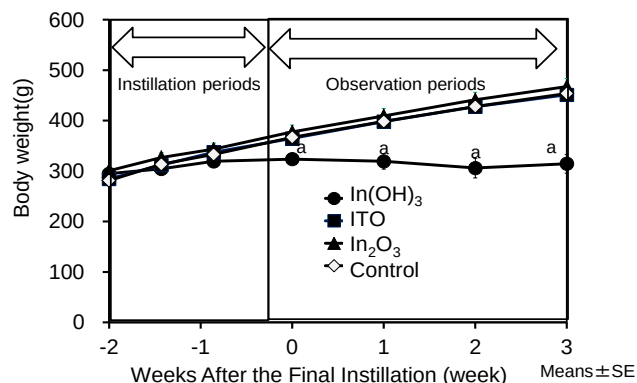


Fig.1 Changes in body weight gain among the $\text{In}(\text{OH})_3$, ITO and In_2O_3 groups during the instillation and observation periods.
a: Significantly different from the control group.

group, or the control group between weeks 0 and 3 after the final instillation. In the ITO and In_2O_3 groups, the trend in body weight change was similar to that observed in the control group throughout the observation period.

Changes in lung weight during the observation period are shown in Fig. 2. The lung weights in the $\text{In}(\text{OH})_3$ -, ITO and In_2O_3 groups were significantly greater than that in the control group at each corresponding time point. Moreover, the $\text{In}(\text{OH})_3$ group showed significantly greater lung weight than that shown by the ITO and In_2O_3 groups at each corresponding time point.

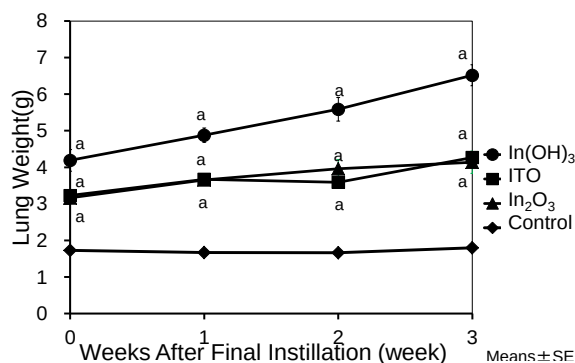


Fig.2 Changes in lung weight from the final instillation of $\text{In}(\text{OH})_3$, ITO and In_2O_3 .
a: Significantly different from the control.

Blood indium concentrations during the observation period are shown in Fig. 3. The blood indium concentration gradually increased from week 0 to 3 following the final instillation in all the indium-treated groups.

Furthermore, blood indium levels in the $\text{In}(\text{OH})_3$ group were 70- or 200-fold higher than those in the In_2O_3 or ITO group, respectively, throughout the observation period. At the end of the observation period, blood indium levels were 1137.6 ± 167.8 ng/g (mean $\pm$ SE) in the $\text{In}(\text{OH})_3$ group, 6.5 ± 1.3 ng/g in the ITO group, and 13.8 ± 2.0 ng/g in the In_2O_3 group. The differences in the blood indium levels between the $\text{In}(\text{OH})_3$, ITO, and In_2O_3 groups at each time point were significant. Indium was not detected in the blood of the animals in the control group at any time point.

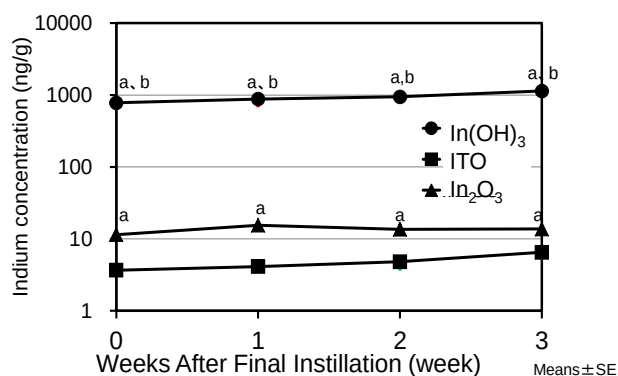


Fig.3 Change in blood indium concentration from the final instillation of $\text{In}(\text{OH})_3$, ITO and In_2O_3 .
a: Significantly different from the ITO group.
b: Significantly different from the In_2O_3 group.

The indium content in the lungs during the observation period is shown in Fig. 4. Although the lung indium content for the In_2O_3 group was higher at week 1 or 3 than that at week 0, it gradually decreased from week 0 to 3 in both the $\text{In}(\text{OH})_3$ and ITO groups. Indium was not detected in the lungs from the control group at any time during the observation period.

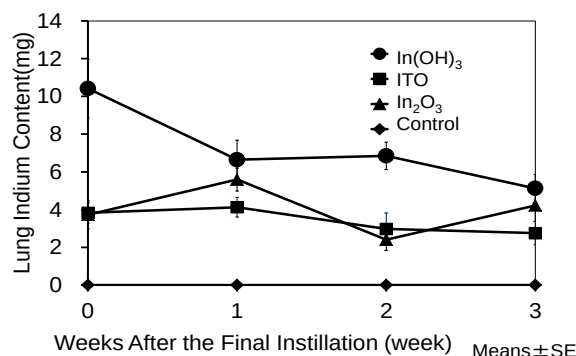


Fig.4 Change of indium content in the lungs after the final instillation of $\text{In}(\text{OH})_3$, ITO and In_2O_3 .

The severity of the pathologic change in the lungs is shown in Table 1. Diffuse foci of slight to severe inflammation were present in all indium-treated rats during the observation periods. Slight to severe exudation was seen within the alveolar spaces in the indium-treated groups. Mild to moderate interstitial fibrotic proliferation was apparent from weeks 0 to 3 in the $\text{In}(\text{OH})_3$ group. Although a slight inflammatory response was observed in the control group, neither interstitial fibrosis nor exudation was evident.

Table 1 Pathological changes in the rats lung after intratracheal instillation of $\text{In}(\text{OH})_3$, ITO and In_2O_3 .

Pathological Changes	Group	Weeks after final instillation(Wk)			
		0	1	2	3
Inflammatory response	$\text{In}(\text{OH})_3$	3+	3+	3+	3+
	ITO	+	+	+	+
	In_2O_3	+	+	+	+
	Control	±	±	±	±
Interstitial fibrotic proliferation	$\text{In}(\text{OH})_3$	+	2+	3+	3+
	ITO	—	—	—	—
	In_2O_3	—	—	—	—
	Control	—	—	—	—
Exudation	$\text{In}(\text{OH})_3$	2+	3+	3+	3+
	ITO	±	2+	+	+
	In_2O_3	±	±	+	+
	Control	—	—	—	—

The severity of the lung lesions was evaluated by five grades:
 -:negative; ±: slight; +: mild; 2+: moderate; 3+: severe

DISCUSSION

In this study, the acute toxic effect of $\text{In}(\text{OH})_3$ was assessed after repeated intratracheal instillation in rats. This is the first study of acute pulmonary toxicity of $\text{In}(\text{OH})_3$ following respiratory exposure. Of the three indium compounds evaluated in this study, $\text{In}(\text{OH})_3$ had the greatest degree of systemic toxicity, causing significant decreases in body weight and 2 deaths during the instillation period. $\text{In}(\text{OH})_3$ was also the most toxic compound for the lung, causing significant increases in lung weight and severe manifestation of lung lesions. On the other hand, when the same indium dosage as that of $\text{In}(\text{OH})_3$, ITO, or In_2O_3 was instilled, the blood indium level in the $\text{In}(\text{OH})_3$ -treated rats was much higher than that in either the ITO- or In_2O_3 -treated rats. A high concentration of blood indium in the $\text{In}(\text{OH})_3$ -treated rats may be correlated with the severe toxicological damage in $\text{In}(\text{OH})_3$ -treated rats. Furthermore, it was thought that the fact that $\text{In}(\text{OH})_3$ particles had the smallest diameter might contribute to a more severe toxic profile among the three indium compounds. Although there was no additional exposure to these indium compounds after the final instillation, blood indium levels of three indium-treated rats gradually increased up to the end of the observation period. This finding was consistent with the results of Tanaka et al.[4] who reported that serum indium levels among ITO- or In_2O_3 -treated hamsters increased gradually until week 78 week following the final instillation. Since $\text{In}(\text{OH})_3$, ITO, or In_2O_3 particles are insoluble in water [5], these findings would seem to be related to the low solubility of these particles within the lung. Due to the slow clearance of these indium compound particles from the lung, it is suspected that the long-term persistence of these particles within the lung resulted in continuous damage to the alveolar epithelial cells. On the other hands, it is thought that the pulmonary indium content was not stable at early observation periods because

inhaled indium compounds might be removed by mucociliary transport from the trachea and swallowed into the stomach just after intratracheal instillations of indium compounds. Further clarification is needed regarding the pulmonary clearance of these particles and the influence of particle size on the development of lung damage.

To date, the evidence of lung disorders has been reported after respiratory ITO exposure in animals and humans [2,6]. Although a few studies have reported pulmonary disorders among indium recycling workers [7,8], it is not clear whether these recycling workers inhaled $\text{In}(\text{OH})_3$ particles, or if they were exposed to several kinds of indium compounds.

In conclusion, the acute pulmonary toxicity of $\text{In}(\text{OH})_3$ particles was confirmed when repeated intratracheal instillations of $\text{In}(\text{OH})_3$ were performed in rats, and the toxic potency of $\text{In}(\text{OH})_3$ was much higher than that of either ITO or In_2O_3 . These findings suggest a need to pay much greater attention to the danger of human exposure to indium compounds.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (24108009) from MEXT, and Grants-in-Aid for Scientific Research (B) (23390164) and (A) (23249033) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

REFERENCES

1. Arumu Publishing Co. Indium: In: Industrial rare metals, No. 130, Tokyo, Arumu Publishing Co., 2014; p. 122-123 (in Japanese).
2. A. Tanaka, M. Hirata, Y. Kiyohara, M. Nakano, K. Omae, M. Shiratani, K. Koga, *Thin Solid Films* **518**, 2934 (2010).
3. T. Homma, T. Ueno, K. Sekizawa, A. Tanaka, M. Hirata, *J. Occup. Health* **45**, 137 (2003).
4. A. Tanaka, M. Hirata, T. Homma, Y. Kiyohara, *J. Occup. Health* **52**, 14 (2010).
5. Indium Oxide. In: Budavari S. editor. The Merk Index. 12th Edition. Merk & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ. 850 (1996).
6. K. Omae, M. Nakano, A. Tanak, M. Hirata, T. Hamaguchi, T. Chonan. *Int Arch Occup Environ Health* **84**, 471 (2010).
7. H. Nogami, T. Shimoda, S. Shoji, S. Nishima, *J. Jpn. Respir. Soc.* **46**, 60 (2008) (in Japanese).
8. K.J. Cummings, W.E. Donat, D.B. Ettensohn, V.L. Roggli, P. Ingram, K. Kreiss, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 458 (2010).

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

Makiko NAKANO¹, Akiyo TANAKA², Miyuki HIRATA², Satoko IWASAWA¹ and Kazuyuki OMAE¹

¹Department of Preventive Medicine and Public Health, Keio University School of Medicine, Japan and ²Environmental 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 µg/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 µg/m³, 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 µg/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^(2–4) in 2007. An inhalation experiment conducted in rats over 2 years identified ITO with an indium concentration of 0.01 mg/m³ as a lung carcinogen⁽⁵⁾. 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⁽⁶⁾. 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^(7,8). 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^{3,6)} or the Japan Industrial Safety and Health Association⁶⁾. 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)^{9,10)} and SP-D (Yamasa Corporation, Tokyo, Japan)¹¹⁾ 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 Society¹²⁾. 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[®], ndd Medical Technologies, Zurich, Switzerland) based on the standards of the American Thoracic Society/European Respiratory Society¹³⁾. 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 Society¹⁴⁾. TLC was determined by sex, using reference values generated from the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)¹⁵⁾. DLCO and DLCO/VA were determined by sex, using the regression formula of Nishida for Japanese subjects¹⁶⁾. 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 version¹⁷⁾ of the American Thoracic Society Division of Lung Disease questionnaire¹⁸⁾ 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 guidelines⁶⁾ 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-S⁴⁾, 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 $\geq 110 \text{ ng}/\text{ml}$, $\text{FEV}_{1.0}/\text{FVC} < 70\%$, $\%VC < 80\%$, $\%FVC < 80\%$, $\%FEV_{1.0} < 80\%$, $\%TLC < 80\%$, $\%DLCO < 70\%$ and $\%DLCO/VA < 70\%$.

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 Welfare⁶⁾.

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
Biomarkers						
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 ≥ 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 ≥ 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
Lung function, mean (SD)						
%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 _{1.0}	97.0 (12.8)	103.0 (12.6)	99.5 (19.0)	103.0 (10.4)	99.7 (11.6)	0.314
FEV _{1.0} /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_{1.0}, 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_{1.0} and FEV_{1.0}/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

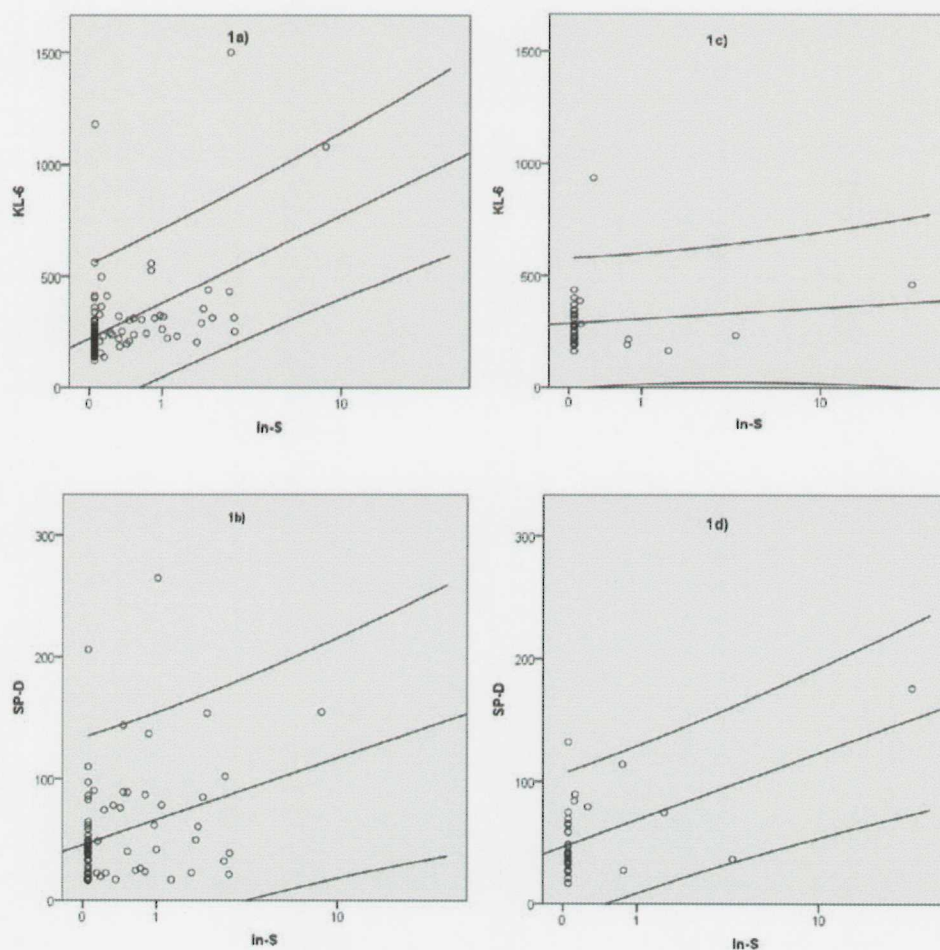


Fig. 1. Dose-effect relationships between In-S and biomarkers by exposure status
 1a) and 1b) Scattergrams between In-S and KL-6 or SP-D in currently exposed workers. 1c) and 1d) Scattergrams between In-S and KL-6 or SP-D in formerly exposed workers. Cut-off values: KL-6, 500 U/ml, and SP-D, 110 U/ml. 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^{2-4, 19}. 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°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°C , and indium vapor is generated at higher temperature²⁰. 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 guidelines⁶. In addition, regardless of occupational group, approximately 31% of workers exposed to IM exceeding $0.3 \mu\text{g/m}^3$ were required to wear a protective mask according to prevention guidelines⁶. 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-

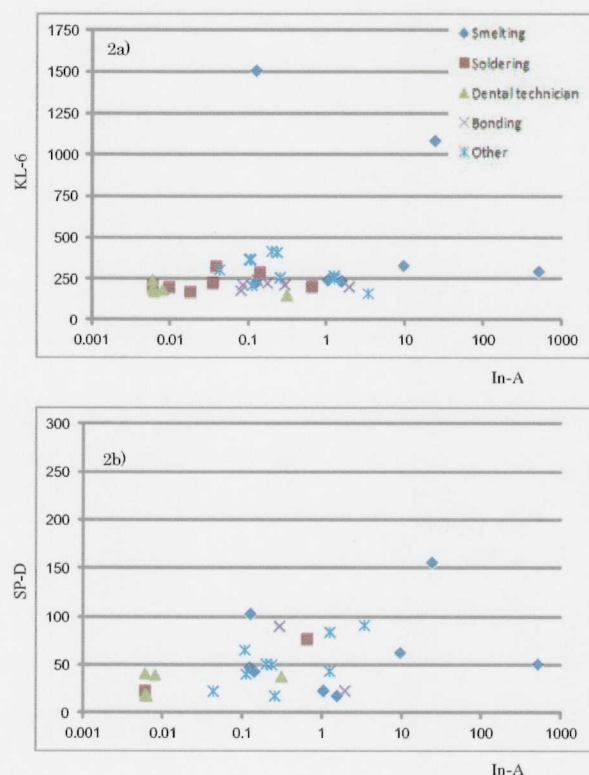


Fig. 2. Dose-effect relationships between In-A and biomarkers by occupational group
 2a) Scattergram between In-A and KL-6 levels in currently exposed workers. 2b) Scattergram between In-A and SP-D levels in currently exposed workers. Target concentration for indium according to prevention guidelines: $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$. 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 oxide²¹⁾ and workers formerly exposed to indium compounds have been found to have elevated In-S levels for a prolonged period of time^{4, 19)}, 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 oxide²²⁾ 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^{4, 19)}.

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 factories²⁻⁴⁾.

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 ndd 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*¹⁾

Nakano Makiko

中野真規子**¹⁾

Hirata Miyuki

平田美由紀*²⁾

Omae Kazuyuki

大前 和幸**³⁾*九州大学大学院医学研究院環境医学分野 ¹⁾ 講師 ²⁾ 助教**慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室 ¹⁾ 講師 ³⁾ 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¹⁾。ITOは酸化インジウム (In_2O_3) 90%、酸化スズ (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)
 SnO_2 (酸化スズ)

In_2O_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 (μg/L)	その他の情報
1	Homma et al. (2003) ²⁾	日本	27M	3	ITO 研磨	—	290	両側気胸 (死亡例)
2	Homma et al. (2005) ⁶⁾	日本	30M	4	ITO 研磨	799	51	
3	田口ら (2006) ⁷⁾	日本	31M	12	ITO 研磨	1,930	40	
4	田口ら (2006) ⁷⁾	日本	39M	12	ITO 研磨	3,570	127	
5	田口ら (2006) ⁷⁾	日本	28M	8	ITO 研磨	1,190	99	気胸
6	中野ら (2007) ⁸⁾	日本	43M	4	In ₂ O ₃ , ITO 製造	3,450	64	
7	武内 (2008) ⁹⁾	日本	47M	20	研究開発	—	92	
8	長南ら (2010) ¹⁰⁾	日本	45M	7	ITO 研磨	476	32.8	気胸
9	Cummings et al. (2010) ¹¹⁾	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) ¹¹⁾	U.S.	39M	1	ITO 製造	—	< 5	肺胞蛋白症, 抗 GM-CSF 抗体 (+)
11	Xiao et al. (2010) ¹²⁾	China	29M	2	LSD サンドブラスト	—	152	肺胞蛋白症, Si と混合曝露
12	飴島ら (2011) ¹³⁾	日本	45M	5	In ₂ O ₃	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²⁾、さらに、動物実験では肺障害性や肺発がん性が報告され^{3)~5)}、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^{2), 6)~10), 13)}にのぼり、海外では米国で公表されたのは2例¹¹⁾、中国では1例¹²⁾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²⁾。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 μg/L(健常人では量下限0.1 μg/L以下¹⁴⁾)

SEM-EDX (走査型電子顕微鏡/エネルギー分散型X線分光法)

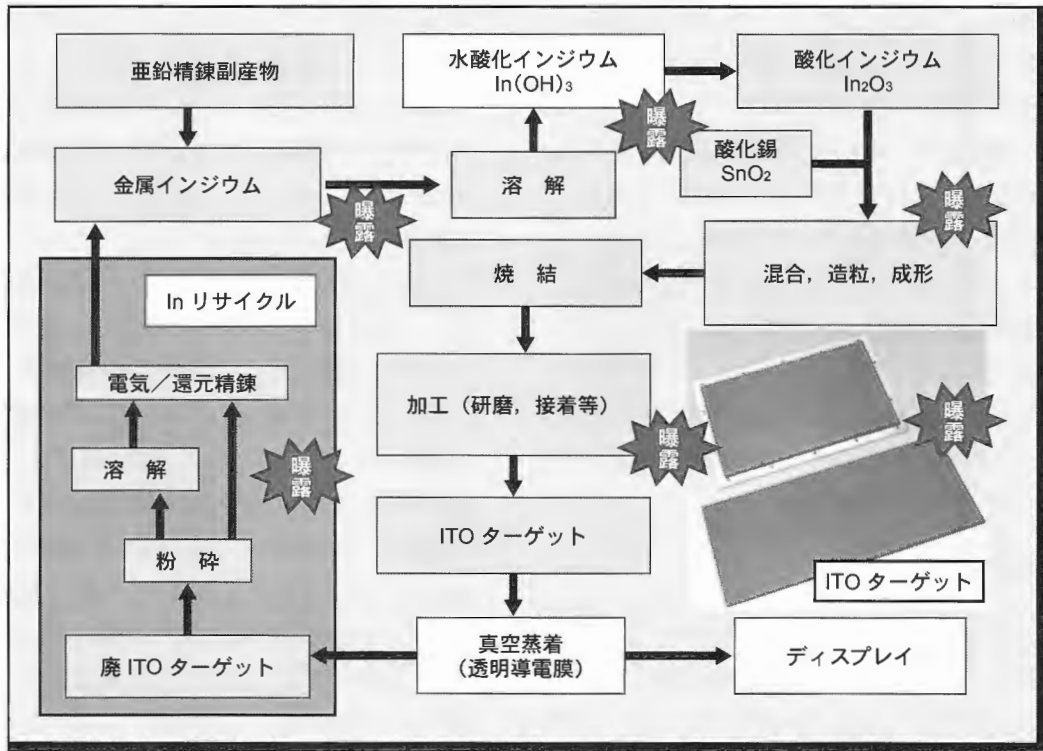


図1 インジウムのライフサイクルと曝露の機会がある作業工程

今まで報告されたインジウム肺症例は大部分がITO 研削作業に従事していた。最近の報告では In_2O_3 製造作業のみの症例もあり、インジウム化合物によるインジウム肺発症も危惧されている。

(筆者作成)

と高値を示し、2001年に両側性の気胸により死亡している。

図1にインジウムのライフサイクルを示している。ITO 製造でインジウム曝露を受けやすい工程は、 In_2O_3 と SnO_2 との混合・造粒・成形の工程、研削やボンディングといった加工作業の工程と廃ITO ターゲット材から金属インジウムを精製するリサイクル工程があり、今まで報告されたインジウム肺の症例では大部分がITO 研削作業に従事していた。しかし、最近、 In_2O_3 製造作業のみに従事していた症例¹³⁾が報告され、ITOに加えて In_2O_3

吸入においてもインジウム肺が発症することが明らかになり、ITOや In_2O_3 以外のインジウム化合物によるインジウム肺発症も危惧される。インジウム肺症発症者はおおむね発症時の年齢が比較的若く、従事期間は短く、血清インジウム濃度および Krebs von den Lungen-6 (KL-6) 値が高値であることが特徴である。しかし、KL-6は日本で発見された間質性肺炎のマーカーであるため¹⁵⁾、諸外国においては日常診療でのKL-6測定は普及は低く、日本と海外の症例におけるKL-6値の一律の評価は難しい。一方、米国¹¹⁾および中国の症

例¹²⁾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^{16)~21)}、米国²²⁾、台湾²³⁾、韓国²⁴⁾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¹⁹⁾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¹⁾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²⁰⁾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²¹⁾。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)

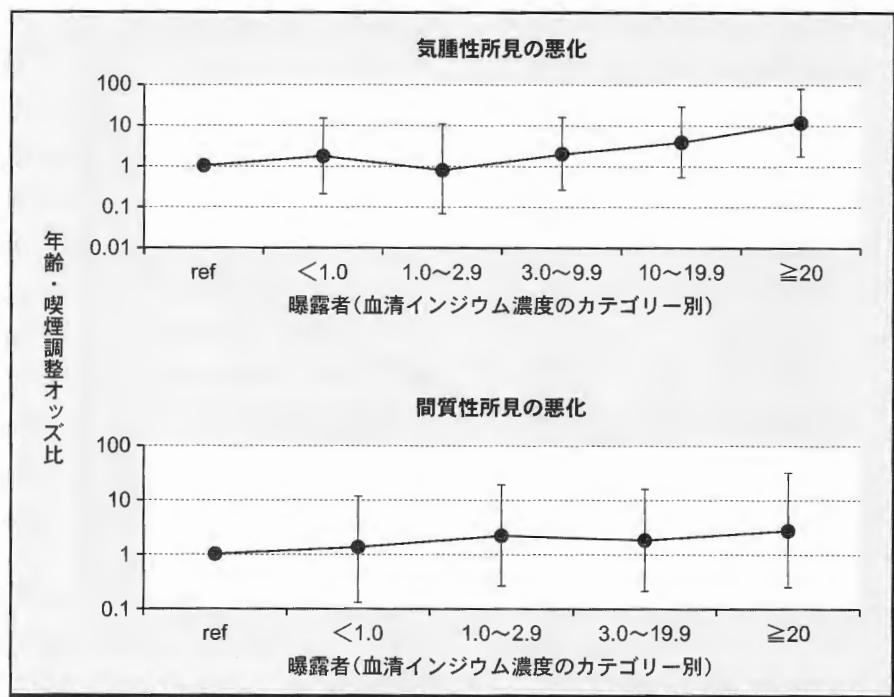


図2 5年間追跡調査研究によるHRCT所見悪化の年齢・喫煙調整オッズ比(95%CI)
間質性変化に比べて気腫性変化がより強く進展した。

(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 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²²⁾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 作業場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

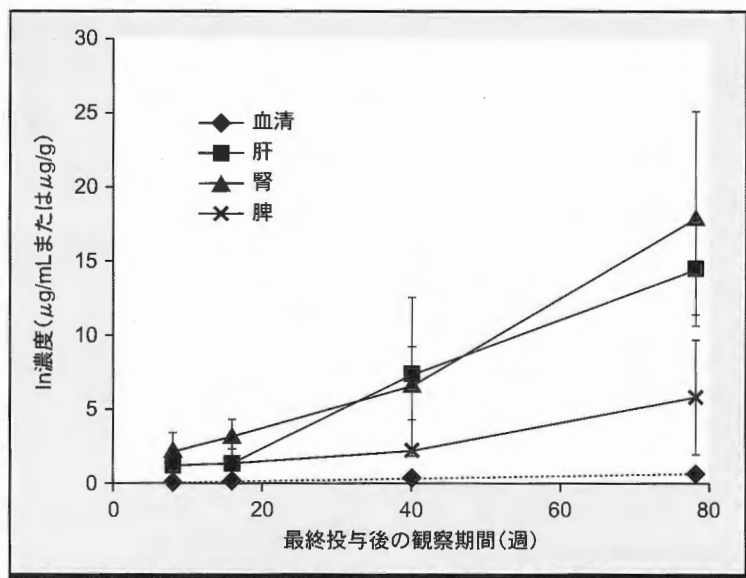


図3 ITO気管内投与後のハムスター臓器中インジウム濃度の推移 (ITO 6 mg/kg 投与群)

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⁴⁾。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²⁵⁾。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⁵⁾。曝露濃度はITOとして0.01, 0.03, 0.1 mg/m³であり、6時間/日、5日/週、104週間(0.1 mg/m³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/m³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²⁶⁾。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²⁷⁾。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」²⁸⁾ 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 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他覚症状を呈し、血清 KL-6 値が 500 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²⁹⁾ 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. *日本胸部臨床* **69** : 851-855, 2010.
- 11) Cummings KJ, Donat WE, Ettensohn 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. *日本臨床* **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・スズ化合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/anzenisei42/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/anzenisei48/dl/anzenisei48-01.pdf>).

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

Takaaki Amano^{1,*}, Thapanut Sarinont¹, Kazunori Koga¹, Miyuki Hirata²,
Akiyo Tanaka², and Masaharu Shiratani¹

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

²*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.^{1–4} For cancer therapy, nanoparticles enable us to detect cancer cells and to treat cancer cells by delivering drugs or generating heat.^{5,6} However, toxic effects of nanoparticles on human body are pointed out.⁷ For instance, we have found that CIGS nanoparticles cause subacute pulmonary toxicity by installing into lung.^{8,9} 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,¹⁰ TiO₂ nanoparticles,¹¹ and gold nanoparticles^{12–14} 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,^{15–21} chemical synthesis in liquid phase,^{22,23} and solid-state processes such as milling and attrition.²⁴ 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.^{25,26} Synthesis of nanoparticles using electrical discharge plasmas in water offers a simple way to prepare nanoparticles 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 Electoric, 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

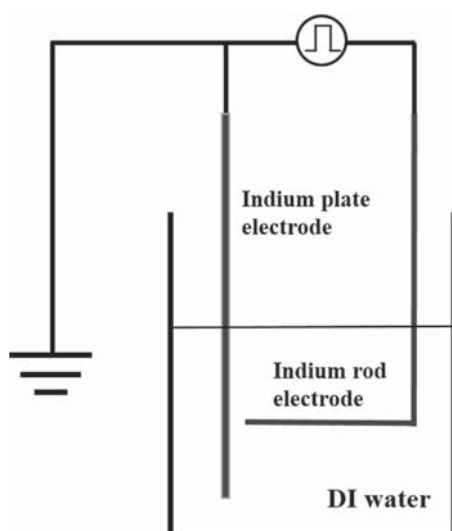


Figure 1. Schematic of experimental setup for synthesis of indium-containing nanoparticles using pulsed electrical discharge plasmas in DI water.

Stark broadening of H_{α} and H_{β} 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).^{27,28} 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 wet-ashed 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),²⁹ oxygen (777 nm and 844.6 nm), and hydrogen (H_{α} 656.3 nm and H_{β} 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

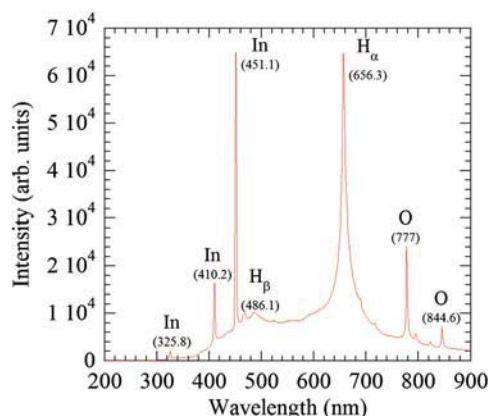


Figure 2. Optical emission spectrum of pulsed electrical discharge plasma in DI water.

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.³⁰ 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_α line are the Doppler effect with FWHM of 0.008 nm, and the van der Waals broadening with FWHM of 0.04 nm.^{30,31} Similarly, the important sources of broadening of the H_β line are the Doppler effect with FWHM of 0.006 nm, and the van der Waals broadening with FWHM of 0.06 nm.^{30,31} 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_α and H_β line are 5.39 ± 0.23 nm and 12.0 ± 0.55 nm. The electron density deduced from the Stark broadening of the H_α and H_β 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.^{30,32,33} The electron density deduced from the Stark broadening of the H_α is more reliable, because the H_α 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.^{34,35} 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.^{36,37} These two kinds of nanoparticles might have different kinetics in living body. To clarify kinetics of each kind of nanoparticles, we need

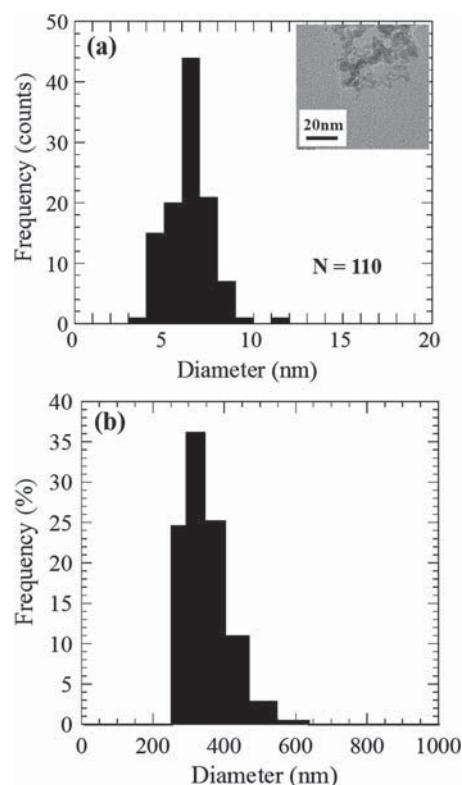


Figure 3. (a) TEM image of indium-containing nanoparticles and size distribution of primary nanoparticles, and (b) size distribution of secondary nanoparticles.

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.

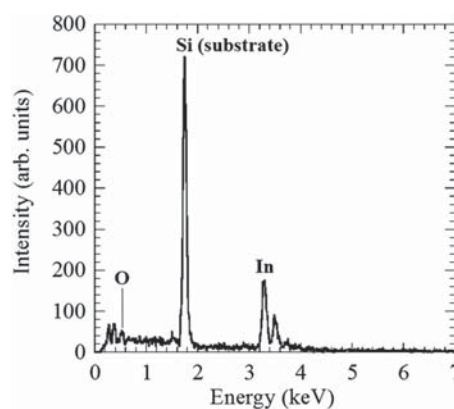


Figure 4. EDX spectrum of synthesized nanoparticles.

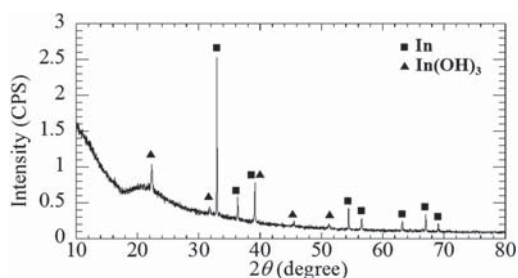


Figure 5. XRD pattern of synthesized nanoparticles.

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, H₂O, O₂ and H₂. Moreover, H₂O, O₂ and H₂ 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)₃).

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)₃) 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).