

ナノテクノロジー領域の市場規模の拡大は2015年までに1兆ドル²⁾とも、3.1兆ドル³⁾とも言われている。我が国でのナノマテリアルの国内使用量は、2006年の段階でカーボンブラックが約100万トンと圧倒的に多く、次いでシリカ（結晶質および非晶質）が約13,500トン、酸化チタン（TiO₂）（ルチルおよびアナターゼ型）が約1,250トンと続き、この他にも、酸化亜鉛（ZnO）が約480トン、ナノクレイが約250トン、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）が約60トン、銀および無機微粒子が約50トンなどとなっている⁴⁾。

一方で、ナノマテリアルを用いた製品製造時にナノマテリアルに作業員が曝露される可能性や、製品中に含有されるナノマテリアルに消費者が曝露され、ナノマテリアルに特有の毒性（Nanotox）が発現する可能性が懸念されている^{5,6)}。実際に、2007年1月から2008年4月にかけて、中国において十分に防護されていない作業環境下の塗料製造工場で7名の女性工員（18~47歳）がナノマテリアルに持続的に曝露されることにより肺障害を発症し、2名が死亡するという事例⁷⁾が報告されており、肺組織から観察されたナノシリカがその原因と考えられている⁸⁾。このような背景から、様々な*in vivo*ならびに*in vitro*試験系において、ナノマテリアルの安全性が研究され、一部のナノマテリアルについては、化学組成、サイズ、物性等に依存した生体影響が確認されている⁹⁾。しかし、これまでに行われてきたナノマテリアルの生体影響に関する研究について、ナノマテリアルのキャラクター化が不十分なために、研究者の経験則（rules of thumb）に基づいた試験が行われ、異なる実験室間で得られた結果を比較することが難しい事が指摘されている¹⁰⁾。そして、ナノマテリアルの安全性評価については、試験法や評価基準な

どが明確にされておらず、断片的な試験結果の集積に留まっている。そこで、厚生労働省は今後の具体的な対策の一つとして、ナノマテリアルの*in vitro*試験法の開発の必要性を挙げている⁴⁾。

金属酸化物ナノマテリアルは工業材料や消費生活製品材料としての開発が盛んに行われ、ZnOやTiO₂等については化粧品や塗料等に用いられている⁴⁾。これら金属酸化物ナノマテリアルに関して、様々な*in vitro*試験が行われている。例えば、Yuanらは一次粒子径サイズの異なるSiO₂ナノ粒子を作製し細胞毒性試験を行い、一次粒子径が20~80nmで細胞毒性が認められ、140nm以上では細胞毒性は認められなかったと報告している¹¹⁾。一方で、一次粒子径サイズが同程度でも化学組成が異なると細胞毒性が異なることが報告されており^{12,13)}、金属酸化物ナノマテリアルの化学組成が毒性に影響していることが考えられている。また、*in vivo*試験ではあるが、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なるTiO₂ナノ粒子によるラット気管内投与試験では、二次粒子径サイズの違いによる炎症反応の差異は認められないと報告されている¹⁴⁾。

このように、個々の金属酸化物ナノマテリアルの物性が毒性試験の結果に影響を及ぼすことから、毒性試験にはナノマテリアルの物性情報として、①状態（粒子径・粒径分布・凝集体・形状）、②材料（化学組成・結晶性・表面組成・純度）、③周囲に影響する因子（表面積・表面化学特性・表面荷電）の3点に加え、さらに包括的に考慮すべき内容として、安定性、培地の影響および適切な用量計測（dose-metrics）での評価が求められている¹⁰⁾。そこで、本分担研究では金属酸化物ナノマテリアルの培養細胞試験系における細胞応答に及ぼすナノマテリアルの影響を解明すること目的として、培養細胞試験系に用いる金属酸

化物ナノマテリアルの物性解析を行った。

ナノマテリアルのキャラクタリゼーションには様々な手法が用いられている。最も重要な物性情報の一つであるナノマテリアルの粒子径についても、その測定方法は動的な光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS)、電子顕微鏡法、原子間力顕微鏡法、Brunauer-Emmett-Teller (BET) 法およびキャピラリー電気泳動法 (Capillary Electrophoresis: CE) など多くの方法が用いられている⁹⁾。本年度は DLS を用いて細胞培養試験時の液体培地中の粒子径および粒径分布、Zeta 電位を測定した。

B. 研究方法

B.1 金属酸化物ナノマテリアル

試験に用いた金属酸化物ナノマテリアルの入手先を表 1 に示した。CIK ナノテック社製の金属酸化物ナノマテリアルについては、無償提供して頂いた。その他の金属酸化物ナノマテリアルは表 1 に示した会社から購入した。用いた金属酸化物ナノマテリアルの一次粒子径は全て 50 nm 以下であった。

B.2 金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の調製

Al_2O_3 、 CeO_2 、ITO、 SiO_2 、 TiO_2 および CuO については、提供元より日本薬局方注射用水 (大塚製薬製) に懸濁させた状態で入手した。また、2 社から購入した ZnO についても、それぞれ水に懸濁させた状態の製品を購入したが、Sigma-Aldrich 製の ZnO は、分散剤として 2% の 3-Aminopropyltriethoxysilane を含有していた。これらの金属酸化物ナノマテリアル懸濁液を、注射用水を用いてクリーンベンチ内で 10 mg/mL に調製した。

その他の金属酸化物ナノマテリアル (CuO 、 SnO_2 、 Y_2O_3 、 NiO) は、50 mg を滅菌済み 15 mL チューブ (CORNING[®]) に

秤量し、クリーンベンチ内で 10 mg/mL となるように注射用水を 5 mL 加えた。その後、破砕ホーンにスタンダードマイクロチップを装着したプローブ型超音波破砕機 Q700 (QSONICA 社製) を用いて、発振出力 (Amplitude) を 30 に設定し、氷冷しながら 1 分間ずつ 5 回に分けて 1 分間のインターバルをとりながら超音波処理を行った。その際、破砕ホーンおよびその周囲をエタノール滅菌し、消音箱 (ソノボックス) 内でコンタミネーションが起きないように注意して処理した。また、懸濁液中の破砕ホーンの先端位置は処理毎に同じ所になるように注意した。

各金属酸化物ナノマテリアルが 10 mg/mL となるように調製された懸濁液について、平均粒子径 (流体力学粒径)、多分散度指数、粒子径分布および Zeta 電位を測定した。また、その金属ナノマテリアル懸濁液を 10% のウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS) を含む GIBCO 製 Minimum Essential Medium (MEM) を用いて希釈し、同様に各項目を測定した。なお、希釈は段階希釈ではなく、10 mg/mL 懸濁液から細胞毒性試験等に用いる各濃度に直接希釈した。この 10%FBS-MEM で希釈した試料を共同研究者が細胞毒性試験に使用した。

また、細胞毒性試験用とは別に、10%FBS-MEM を用いて CuO、NiO、ZnO-Sigma および ZnO-Alfa の各希釈濃度 (0.2、0.1、0.05 mg/mL) 懸濁液を調製し、それらの物性を測定し希釈の影響を検討した。さらに、それらの室温下 1 日後の物性を測定し経時変化について検討した。

B.3 懸濁液中の金属酸化物ナノマテリアルの物性測定法

大塚電子社製の ELSZ-2NPA を用いて、平均粒子径 (流体力学粒径)、多分散度指

数および粒径分布は動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS)、Zeta 電位は電気泳動光散乱法 (レーザードップラ―法) にて測定した。その際、平均粒子径および多分散度指数は Cumulant 法で、粒径分布は Marquardt 解析法を用いたヒストグラム法でそれぞれ求めた。

平均粒子径、多分散度指数および粒径分布については同一試料を繰り返し 3 回測定した。Zeta 電位については、平均粒子径を測定した後に同一試料を繰り返し 4 回測定して求めた。

C. 結果および考察

C.1 各金属酸化物ナノマテリアルの懸濁液中の平均粒子径、多分散度指数および粒径分布

各金属酸化物ナノマテリアルの懸濁液中の平均粒子径を表 2 に示した。また、散乱強度分布から得られた粒径分布を図 1 に個数分布から得られた粒径分布を図 2 に示し、それらのデータに対応した懸濁液試料の累積 10%、50%および 90%メディアン径を表 3 および 4 に、最大ピークの平均粒径を表 5 に示した。なお、本研究では共同研究者の細胞毒性試験毎に試料調製および物性測定を行っているが、今回表 2~5 および図 1 および 2 に示したのは全体を通しての代表値である。また、表 2 に示した平均粒子径は、Cumulant 解析から得られた試料全体の流体力学粒径を表し、表 5 の平均粒径はヒストグラムから求められた各ピークの平均値 (ピークの最大値ではない) を表している。そのため、それぞれの標準偏差の意味も異なり、表 2 では同一試料の繰り返し 3 回測定でのばらつきを表し、表 5 ではピークの広がりを表している。また、金属酸化物ナノマテリアル非存在下でも、液体培地由来のナノサイズの粒子が DLS 分析によって検出されることが報告されている

¹⁵⁾が、今回 10%FBS-MEM のみでは散乱強度が弱く測定できなかった。

注射用水中での平均粒子径を測定したところ、TiO₂ および SnO₂ を除くいずれの金属酸化物ナノマテリアルは、表 1 に示した一次粒子径よりも粒子径が大きくなっていた。粒子径の測定方法の違いはあるが、注射用水中ではこれらは凝集し、二次粒子として存在していた。これらの二次粒子の平均粒子径については CeO₂、ITO、TiO₂、ZnO-Sigma では 100 nm 以下、それ以外は NiO の 256.8 nm が最大であった。TiO₂ については、一次粒子径 (36 nm) と注射用水中で観察された平均粒子径 (41.0 nm) を比べると、そのサイズは同程度と考えられたが、それぞれの測定手法が異なるため凝集の有無については更なる検討が必要である。SnO₂ については凝集性が高く、超音波処理後の注射用水中で速やかに凝集・沈降し測定が出来なかった。超音波処理した CuO、Y₂O₃ および NiO について、粒径分布をみると若干 1000 nm 以上の大きな粒子が散乱光分布から確認できる (図 1)。これは、超音波処理で完全には分散しなかったためと考えられる。ただし、散乱光は粒子径が大きいほど強度が強くなるため、数としては大きな粒子はほとんど存在していないと考えられる (図 2)。理論上、散乱強度分布よりも個数分布の方が最大ピークの平均粒子径が小さくなるが Y₂O₃ については、散乱強度分布 (148.3 nm) と個数分布 (13.5 nm) で極端に異なっていた。分布を詳しく見ると、どちらの分布でもピークが分かれており、散乱強度分布では 148.3 nm のピーク以外に、15.5 nm の場所にもピークが存在している。理論上、粒子径が小さい場合には個数分布でのピークは相対的に散乱強度分布よりも大きくなるため、個数分布ではこちらが最大ピークとなったと考えられた。ただし、この粒子径が

小さいピークは、一次粒子径 (33 nm) よりも小さいことから、今後は TEM 観察等による粒子径評価も必要と思われる。

10%FBS-MEM 中では、ZnO-Alfa を除く全ての金属酸化物ナノマテリアルの平均粒子径が、注射用水中よりも最大で 8 倍弱程度大きくなっており培地中で凝集していた。一方、SnO₂ は注射用水中では速やかに凝集し測定不能であったが、10%FBS-MEM 中では平均粒子径は 1000 nm を超えているものの、分散状態を保ち測定可能であった。また、CuO、Y₂O₃ および NiO の多分散度指数は、注射用水中よりも 10%FBS-MEM 中で小さくなっており、ピーク形状もシャープになっていた。血清がナノマテリアルの分散剤として効果的であると報告されている¹⁶⁾ことから、培地中の血清がこれらの金属酸化物ナノマテリアルの分散剤として働いていると考えられた。ZnO-Alfa では平均粒子径サイズに変化は無く、そのピーク形状も散乱強度分布 (図 1) および個数分布 (図 2) のどちらでも一致し、10%FBS-MEM 中で凝集が起きていないと考えられた。

金属酸化物ナノマテリアルの 10%FBS-MEM 懸濁液の再現性について、種類によっては平均粒子径で 30 nm 程度のズレが生じる場合が認められた。ただし、粒径分布では大きな差は認められなかった。一方で、大きく平均粒子径が異なる場合も認められており (例えば、ITO では 318.6 nm、TiO₂ では 382.0 nm など)、粒子調製について再現性を高くする調製手法を検討する必要があるものと思われる。

C.2 各金属酸化物ナノマテリアルの懸濁液中の Zeta 電位

各金属酸化物ナノマテリアルの懸濁液中の Zeta 電位を表 2 に示した。注射用水中の SiO₂ および ZnO-Alfa の Zeta 電位は、そ

れぞれ -54.4 mV および -7.5 mV を示した。一方、これら二種類以外の金属酸化物ナノマテリアルの注射用水中の Zeta 電位は 41.9~62.1 mV を示した。ZnO については、メーカーの異なる 2 種類の懸濁液で Zeta 電位の電荷が逆転しており、ZnO-Sigma に分散剤として用いられている 3-aminopropyltriethoxysilane の影響があるものと思われる。

Murdock et al. は一次粒子径が 30 nm の Al₂O₃ および 35 nm の SiO₂ の脱イオン水中 (超音波処理後) での Zeta 電位がそれぞれ 43.0 mV および -23.1 mV を示したと報告している¹⁶⁾。この傾向は本研究と同傾向であった。一方で、彼らは一次粒子径が 39 nm と同一でアナターゼ型の割合が異なる TiO₂ について、脱イオン水中の Zeta 電位がアナターゼ型 100% で -4.95 mV、60% は 13 mV、39% は 17.7 mV と異なることを報告している¹⁶⁾。今回用いた TiO₂ は一次粒子径が 36 nm でアナターゼ型の割合が 80% であったが、Zeta 電位は 49.5 mV と大きく正に傾いていた。Murdock らの TiO₂ 懸濁液の pH は 7.0 であり、今回用いた TiO₂ 懸濁液の pH (10%懸濁液、表 1) は 2.4 と大きく異なっている。Zeta 電位は pH によって変化し、TiO₂ (一次粒子径 ~27 nm、結晶系不明) の MilliQ 水懸濁液での等電点が 5.19 であることから¹⁷⁾、懸濁液中の pH が大きく影響しているものと考えられた。

10%FBS-MEM 中での各金属酸化物ナノマテリアルの Zeta 電位はすべて負電荷を示し、-10.7 mV ~ -22.7 mV の範囲を示した。また、10%FBS-MEM のみの状態で Zeta 電位を測定したところ、-9.6 ± 1.6 mV であった。既存の報告^{13,18)}でも、液体培地中の金属酸化物ナノマテリアルの Zeta 電位は値の大小の違いはあるが負側を示しており、本研究の値と同傾向であった。金属酸化物

ナノマテリアルが存在しない状態での10%FBS-MEMのZeta電位は、主に培地中の血清由来のタンパク質に起因すると考えられ、注射用水中でZeta電位が正を示した金属酸化物ナノマテリアルは、それらのタンパク質を吸着する¹⁹⁾ことでZeta電位が大きく変化したと考えられた。

Zeta電位は粒子表面の電荷状態を表しており、ゼロに近くなるほど粒子間の電気的斥力が弱くなり、分子間力によって粒子が凝集しやすくなる。注射用水中でZeta電位が正を示していた金属酸化物ナノマテリアルは、10%FBS-MEM中でのZeta電位の符号が反転し、かつその絶対値が小さくなったことで、凝集性が上がり平均粒子径が大きくなったものと考えられた。また、注射用水中でZeta電位が負を示したSiO₂については、その絶対値は小さくなったが電荷は変化していないことから、凝集性はほかに比べて小さく、そのため平均粒子径の変化が少なかったものと考えられた。さらに、ZnO-Alfaについては、注射用水中と10%FBS-MEM中とではZeta電位に差が認められず、かつ培地のみZeta電位と値が同程度であることから、10%FBS-MEMで希釈しても凝集することなく平均粒子径が変化しなかったものと考えられた。

C.3 数種の金属酸化物ナノマテリアルに対する10%FBS-MEM中での希釈の影響

10%FBS-MEM中の各希釈濃度(0.2、0.1、0.05 mg/mL)におけるCuO、NiO、ZnO-SigmaおよびZnO-Alfaの平均粒子径および多分散度指数、Zeta電位を表6に、粒径分布を図3に示した。

CuOはどの濃度でも平均粒子径は変わらず、ZnO-Alfaについても0.05 mg/mLで若干小さいもののほとんど変わらず、これらは希釈の影響を受けていないと考えられた。また、NiOは全体的にばらつきが大き

いことを考慮すると、希釈の影響は受けていないと考えられた。一方、ZnO-Sigmaについては、濃度が低下するにつれて平均粒子径が小さくなる傾向を示し、多分散度指数の変化も他に比べて大きかった。ZnO-Sigmaは原液に分散剤が使用されており、そのために希釈の影響を受けているのではないかと推察された。粒径分布をみると、個数分布では10 nmから数十 nm程度の粒子の影響がZnO-SigmaおよびZnO-Alfaでは出ているが、散乱光分布で見ると概ねピーク形状は一致しており、粒径分布への希釈の影響はほとんど無いものと考えられた。また、Zeta電位についても希釈の影響は認められなかった。

C.4 数種の金属酸化物ナノマテリアルの10%FBS-MEM中での経時変化

10%FBS-MEM中の各希釈濃度(0.2、0.1、0.05 mg/mL)におけるCuO、NiO、ZnO-SigmaおよびZnO-Alfaについて、懸濁液調製から一日後(室温下)の平均粒子径および多分散度指数、Zeta電位を表7に、粒径分布を図4に示した。表6のデータと比較すると、平均粒子径はZnO-Sigmaの0.05 mg/mLで若干粒子径が大きくなっていた。また、NiOの平均粒子径については標準偏差が大きく、図4の散乱光分布では数千 nm付近にピークが出現している。ただし、個数分布では無視できるほどであった。そのため、全体としては懸濁液調製後、室温下で1日経過したこれらの懸濁液中では凝集はほとんど起きていないと考えられた。多分散度指数について、CuOでは一日後の方が若干大きくなり、その他は若干小さくなったが、図4を見てわかるように調製直後と一日後ではピーク形状に大きな変化は無かった。そのため、粒径分布についても室温下一日後では特に変化はしていないと考えられた。また、Zeta電位につい

でも大きな変化は認められなかった。

D. まとめ

一次粒子径がいずれも 50 nm 以下の金属酸化物ナノマテリアル 10 種類 (Al₂O₃、CeO₂、ITO、SiO₂、TiO₂、CuO、SnO₂、Y₂O₃、NiO、ZnO)、11 試料 (ZnO については入手先の異なる 2 試料) について、注射用水中および 10%FBS-MEM 中でのそれら粒子の物性解析を目的として、平均粒子径 (流体力学径)、多分散度指数、粒径分布および Zeta 電位を測定した。

注射用水中では各金属酸化物ナノマテリアルは主に二次粒子として存在し、CeO₂、ITO、TiO₂ および ZnO-Sigma は平均粒子径が 100 nm 以下、その他は NiO の 256.8 nm が最大であり、SnO₂ は速やかに凝集し測定出来なかった。10%FBS-MEM 中では ZnO-Alfa を除く全ての金属酸化物ナノマテリアルの平均粒子径が注射用水中よりも大きくなり、培地中での凝集が確認された。

各金属酸化物の注射用水中の Zeta 電位は、SiO₂ および ZnO-Alfa は負の値を示したのに対して、その他は正の値を示した。一方で、10%FBS-MEM 中では全ての金属酸化物ナノマテリアルが負の値を示し、その絶対値が小さくなった。そのため、金属酸化物ナノマテリアル表面の電気的反発力が小さくなり凝集したものと考えられた。これらは、液体培地中のタンパク質等の影響を受けていると考えられ、一部の金属酸化物ナノマテリアルでは血清が分散剤として作用していると考えられた。

CuO、NiO、ZnO-Sigma および ZnO-Alfa について、10%FBS-MEM 中での希釈の影響および経時変化を検討した。その結果、これらの金属酸化物ナノマテリアルに対して希釈の影響はほとんどない事を明らかにした。そして、これら金属酸化物ナノマテリアルの懸濁液調製後、一日経過した段階

では各物性値にはほとんど変化は無かった。

これらの金属酸化物ナノマテリアルの各条件での物性データは培養細胞試験にとって有用な情報となり得るものと考えられた。

E. 謝辞

CIK ナノテックから試験に供試した金属酸化物ナノマテリアルを提供して頂きました。ここに謝意を表します。

F. 引用文献

- 1) Whatmore R.W.: Nanotechnology - what is it? Should we be worried? *Occup. Med.*, 56, 295-299, 2006
- 2) Aitken R.J., Chaudhry M.Q., Boxall A.B.A., Hull M.: Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends, *Occup. Med.*, 56, 300-306, 2006
- 3) Lux Report.: Nanomaterials State of the Market Q3 2008: Stealth Success, Broad Impact, https://portal.luxresearchinc.com/research/document_excerpt/3735, 2008"
- 4) ナノマテリアルの安全対策に関する検討会: ナノマテリアルの安全対策に関する検討会報告書, <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2009/03/dl/h0331-17c.pdf>, 2009
- 5) Ema M., Kobayashi N., Naya M., Hanai S., Nakanishi J.: Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials, *Reprod. Toxicol.*, 30, 343-352, 2010
- 6) Schmidt C.W.: Nanotechnology-related environment, health, and safety research: examining the national strategy, *Environ. Health Perspect.*, 117, A158-A161, 2009
- 7) Song Y., Li X., Du X.: Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma, *Eur. Respir. J.*, 34, 559-567, 2009

- 8) Song Y., Li X., Wang L., Rojanasakul Y., Castranova V., Li H., Ma J.: Nanomaterial in humans: Identification, characteristics, and potential damage, *Toxicol. Pathol.*, 39, 841-849, 2011
- 9) Dhawan A., Sharma V.: Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 589-605, 2010
- 10) Boverhof D.R., David R.N.: Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 953-961, 2010
- 11) Yuan H., Gao F., Zhang Z., Miao Ledu, Yu R., Zhao H., Lan M.: Study on controllable preparation of silica nanoparticles with multi-sizes and their size-dependent cytotoxicity in pheochromocytoma cells and human embryonic kidney cells, *J. Health Sci.*, 56, 632-640, 2010
- 12) Karlsson H.L., Gustafsson J., Cronholm P., Möller L.: Size-dependent toxicity of metal oxide particles - A comparison between nano- and micrometer size, *Toxicol. Lett.*, 188, 112-118, 2009
- 13) Xu M., Fujita D., Kajiwara S., Minowa T., Li X., Takemura T., Iwai H., Hanagata N.: Contribution of physicochemical characteristics of nano-oxides to cytotoxicity, *Biomaterials*, 31, 8022-8031, 2010
- 14) Kobayashi N., Naya M., Endoh S., Maru J., Yamamoto K., Nakanishi J.: Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results, *Toxicology*, 264, 110-118, 2009
- 15) Hanagata N., Zhuang F., Connolly S., Li Je., Ogawa N., Xu M.: Molecular responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis, *ACS Nano*, 5, 9326-9338, 2011
- 16) Murdock R.C., Braydich-Stolle L., Schrand A.M., Schlager J.J., Hussain S.M.: Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique, *Toxicol. Sci.*, 101, 239-253, 2008
- 17) Berg J.M., Romoser A., Banerjee N., Zebda R., Sayes C.M.: The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to *in vitro* toxicological evaluations, *Nanotoxicology*, 3, 276-283, 2009
- 18) Cho W.S., Duffin R., Poland C.A., Duschl A., Oostingh G.J., Macnee W., Bradley M., Megson I.L., Donaldson K.: Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions *in vitro* and *in vivo*; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs, *Nanotoxicology*, 6, 22-35, 2012
- 19) Horie M., Nishio K., Fujita K., Endoh S., Miyauchi A., Saito Y., Iwahashi H., Yamamoto K., Murayama H., Nakano H., Nakashima N., Niki E., Yoshida Y.: Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells, *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 543-553, 2009

G. 研究発表

G.1 論文発表

1. Matsuoka, A., Kodama, Y., Yoshida, M., Isama, K., Inoue, K., Kawakami, T., Nishikawa, A. Toxicological studies of nanosuspensions of silica, silver and zinc oxide. Proceedings of 24th European Conference on Biomaterials, 87-90, 2011

G.2 学会発表

1. Matsuoka A., Kodama Y., Yoshida M., Isama, K., Inoue K., Kawakami T., Nishikawa A.: *In vitro* and *in vivo* toxicity studies of nanomaterials used in household products, International Conference on Materials for Advanced Technology, Suntec City, Singapore, Jun 2011.
2. 伊佐間和郎・河上強志・児玉幸夫・中嶋富士雄・吉田緑・井上薫・西川秋佳・松岡厚子, 家庭用品に用いられるナノ粒子の安全性評価, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会, パシフィック横浜, 神奈川, 2011年7月
3. Matsuoka, A., Kodama, Y., Yoshida, M., Isama, K., Inoue, K., Kawakami, T., Nishikawa, A. Toxicological studies of nanosuspensions of silica, silver and zinc oxide. 24th European Conference on Biomaterials, Dublin, Ireland. Sep. 2011
4. 宮島敦子・酒井恵子・河上強志・加藤玲子・松岡厚子・尾崎正康・宇佐見誠・伊佐間和郎, A549細胞を用いたナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系の検討, 日本薬学会第132年会, 北海道大学, 札幌, 2012年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

H.1 特許取得

なし

H.2 実用新案登録

なし

H.3 その他

表1. 実験に用いた金属酸化物ナノ材料の性状、販売元、一次粒子径など

金属酸化物 ^a	製造(販売)先	一次粒子径 ^b (nm)	比表面積 ^b (m ² /g)	比表面積 ^c (m ² /g)	入手時濃度 (重量%)	pH ^c	形状 ^b	外観(色)
酸化アルミニウム	Al ₂ O ₃	31	55	50.4	10%	4.7	球状	無色
酸化セリウム	CeO ₂	14	60	84.4	10%	4.3	多面体	淡黄白色
酸化インジウムスズ	ITO	30	30	44.4	15%	4.3	角状	黒みがかかった灰色～緑色固体
二酸化ケイ素	SiO ₂	25	110	95.7	10%	7.8	球状	白色
二酸化チタン	TiO ₂	36	45	41.6	10%	2.4	球状 (アナターゼ80%)	白色
酸化銅	CuO	48	20	14.5	-	-	多面体	黒色
二酸化スズ	SnO ₂	21	45	50.2	-	-	角状	類白色
酸化イットリウム	Y ₂ O ₃	33	35	40.3	-	-	球状	白色
酸化ニッケル	NiO	< 50	-	-	-	-	-	黒色
酸化亜鉛 ^d	ZnO-Sigma	< 35	-	-	50%	-	-	白色
酸化亜鉛	ZnO-Alfa	40	-	-	40%	-	-	白色

^a 下線の無いものは水に懸濁させた状態で入手し、下線のある金属酸化物ナノ材料試料は粉体を秤量後に注射用水中で超音波処理した

^b 各メーカーカタログより(Sigma-AldrichおよびAlfa Aesarの金属酸化物の1次粒子径はエアロダイナミックパーティクルサイザー(APS)によるデータ)

^c メーカーの検査成績表より

^d 3-Aminopropyltriethoxysilaneを分散剤として2%含有

表2. 各金属酸化物ナノマテリアルの注射用水および10%FBS-MEM中の平均粒子径(流体力学粒径)、多分散度指数およびZeta電位^a

金属酸化物	平均粒子径 (nm)		多分散度指数		Zeta電位 (mV)	
	注射用水 (10 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)	注射用水 (10 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)	注射用水 (10 mg/mL)	10%FBS-MEM ^b (0.2 mg/mL)
Al ₂ O ₃	120.9 ± 1.2	325.9 ± 6.3	0.163 ± 0.009	0.233 ± 0.007	62.1 ± 0.5	-14.0 ± 1.7
CeO ₂	63.5 ± 1.5	407.2 ± 8.2	0.212 ± 0.006	0.286 ± 0.006	55.0 ± 0.3	-21.7 ± 0.7
ITO	98.4 ± 1.5	158.3 ± 2.5	0.217 ± 0.004	0.247 ± 0.007	59.8 ± 1.4	-18.7 ± 1.7
SiO ₂	141.7 ± 0.5	189.7 ± 1.8	0.188 ± 0.019	0.243 ± 0.010	-54.4 ± 0.4	-10.7 ± 0.4
TiO ₂	41.0 ± 0.3	152.9 ± 0.5	0.146 ± 0.012	0.234 ± 0.009	49.5 ± 1.9	-13.1 ± 0.9
CuO	156.4 ± 1.9	242.2 ± 2.9	0.211 ± 0.007	0.144 ± 0.015	51.9 ± 0.9 ^c	-10.8 ± 0.5
SnO ₂	— ^d	1388.6 ± 52.4	—	0.336 ± 0.017	—	-12.9 ± 0.9
Y ₂ O ₃	105.1 ± 2.0	374.5 ± 9.4	0.352 ± 0.005	0.162 ± 0.005	49.3 ± 0.7	-22.7 ± 0.4
NiO	256.8 ± 13.0	403.6 ± 2.6	0.219 ± 0.057	0.188 ± 0.004	41.6 ± 0.7 ^c	-18.2 ± 0.3
ZnO-Sigma	65.8 ± 0.7	184.9 ± 0.8	0.166 ± 0.005	0.230 ± 0.006	44.9 ± 0.5	-13.9 ± 0.6
ZnO-Alfa	164.9 ± 0.5	163.9 ± 1.8	0.216 ± 0.003	0.201 ± 0.006	-7.5 ± 0.5	-10.7 ± 0.5

^a 平均値 ± SD^b 10%FBS-MEMのZeta電位(-9.6 ± 1.6 mV)^c 0.1 mg/mL (10 mg/mLでは測定不可)^d -: 測定不可

表3. 各金属酸化物ナノマテリアルの注射用液中のメディアン径 (nm)^a

金属酸化物	散乱強度分布			個数分布		
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀
Al ₂ O ₃	67.7	112.9	205.4	46.3	59.4	83.5
CeO ₂	36.1	65.1	121.7	24.3	30.1	42.8
ITO	50.5	95.8	207.6	36.6	43.3	61.6
SiO ₂	76.7	135.7	262.3	55.8	67.4	95.4
TiO ₂	24.0	39.2	67.4	16.4	21.2	30.2
CuO	85.9	149.8	312.1	64.9	78.1	105.8
SnO ₂	- ^b	-	-	-	-	-
Y ₂ O ₃	44.6	111.9	365.9	10.4	11.9	38.8
NiO	128.3	237.1	641.9	86.2	109.3	151.5
ZnO-Sigma	39.1	64.8	116.3	28.9	35.9	49.4
ZnO-Alfa	82.8	164.9	365.7	55.8	67.1	95.9

^a D₁₀: 累積10%、D₅₀: 累積50%、D₉₀: 累積90%

^b -: 測定不可

表4. 各金属酸化物ナノマテリアルの10%FBS-MEM中のメディアン径 (nm)^a

金属酸化物	散乱強度分布			個数分布		
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀
Al ₂ O ₃	182.8	361.6	713.2	119.2	144.5	205.8
CeO ₂	196.0	450.5	1189.2	116.2	144.2	205.3
ITO	71.4	140.9	365.4	45.8	57.2	80.8
SiO ₂	113.8	191.1	354.3	86.7	104.2	142.7
TiO ₂	85.2	150.4	329.8	64.8	77.0	105.4
CuO	140.4	238.8	420.6	106.1	127.9	175.3
SnO ₂	814.1	1144.5	25170.0	691.7	821.9	1071.8
Y ₂ O ₃	183.0	242.7	4486.4	159.1	190.1	235.6
NiO	217.5	344.3	5026.2	169.6	204.4	281.4
ZnO-Sigma	100.3	174.4	362.4	69.2	85.7	120.6
ZnO-Alfa	88.0	174.0	323.5	55.6	68.8	99.6

^a D₁₀: 累積10%、D₅₀: 累積50%、D₉₀: 累積90%

表5. 各金属酸化物ナノマテリアルの各頻度分布における最大ピークの平均粒子径 (nm)^a

金属酸化物	散乱強度分布		個数分布	
	注射用水	10%FBS-MEM	注射用水	10%FBS-MEM
	(10 mg/mL)	(0.2 mg/mL)	(10 mg/mL)	(0.2 mg/mL)
Al ₂ O ₃	139.0 ± 58.2	452.2 ± 229.7	70.0 ± 18.0	172.9 ± 46.3
CeO ₂	81.0 ± 37.3	647.0 ± 462.9	35.9 ± 9.4	172.1 ± 47.2
ITO	126.7 ± 70.3	162.3 ± 68.7	53.1 ± 12.5	72.4 ± 19.1
SiO ₂	171.1 ± 80.4	229.7 ± 97.1	80.3 ± 19.5	121.8 ± 28.2
TiO ₂	47.6 ± 18.8	177.6 ± 81.0	25.0 ± 6.5	90.0 ± 20.7
CuO	186.4 ± 90.7	287.3 ± 118.8	90.8 ± 20.8	149.5 ± 35.2
SnO ₂	- ^a	1145.0 ± 221.0	-	928.3 ± 160.0
Y ₂ O ₃	148.3 ± 84.0	242.6 ± 39.8	13.5 ± 1.8	209.3 ± 31.0
NiO	319.4 ± 196.2	340.8 ± 87.9	128.6 ± 32.6	232.9 ± 50.8
ZnO-Sigma	77.7 ± 32.6	228.8 ± 120.0	41.1 ± 9.8	101.6 ± 25.5
ZnO-Alfa	219.5 ± 128.0	190.7 ± 88.5	80.5 ± 20.4	81.1 ± 22.3

^a -: 平均値 ± SD

^b -: 測定不可

表6. 各金属酸化物ナノマテリアルの10%FBS-MEM中の濃度別平均粒子径、多分散度指数およびZeta電位^a

	濃度 (mg/mL)	金属酸化物			
		CuO	NiO	ZnO-Sigma	ZnO-Alfa
平均粒子径 (nm)	0.05	222.9 ± 1.3	417.6 ± 25.7	90.4 ± 1.2	148.1 ± 0.4
	0.1	227.4 ± 1.0	436.9 ± 17.8	134.0 ± 1.3	161.6 ± 0.2
	0.2	230.1 ± 1.7	358.5 ± 29.4	148.2 ± 1.3	165.2 ± 0.4
多分散度指数	0.05	0.146 ± 0.008	0.192 ± 0.010	0.327 ± 0.006	0.292 ± 0.006
	0.1	0.138 ± 0.006	0.199 ± 0.006	0.255 ± 0.003	0.241 ± 0.001
	0.2	0.114 ± 0.022	0.198 ± 0.043	0.195 ± 0.013	0.214 ± 0.006
Zeta電位 (mV)	0.05	-10.0 ± 0.4	-14.3 ± 0.4	-13.8 ± 0.2	-8.0 ± 0.7
	0.1	-8.0 ± 0.7	-13.2 ± 0.6	-14.0 ± 0.3	-7.7 ± 0.3
	0.2	-8.9 ± 0.3	-12.0 ± 0.2	-12.8 ± 1.0	-7.7 ± 0.9

^a -: 平均値 ± SD

表7. 調製1日後(室温下)の各金属酸化物ナノマテリアルの10%FBS-MEM中の濃度別平均粒子径、多分散度指数およびZeta電位^a

	濃度 (mg/mL)	金属酸化物			
		CuO	NiO	ZnO-Sigma	ZnO-Alfa
平均粒子径 (nm)	0.05	215.7 ± 2.3	394.9 ± 49.9	104.6 ± 4.5	150.1 ± 0.8
	0.1	225.1 ± 1.6	398.6 ± 18.7	138.0 ± 0.6	163.1 ± 1.0
	0.2	229.8 ± 2.3	386.9 ± 4.2	150.3 ± 1.1	167.0 ± 1.1
多分散度指数	0.05	0.178 ± 0.013	0.183 ± 0.016	0.277 ± 0.046	0.288 ± 0.009
	0.1	0.159 ± 0.011	0.182 ± 0.007	0.245 ± 0.003	0.233 ± 0.005
	0.2	0.128 ± 0.007	0.176 ± 0.005	0.192 ± 0.010	0.199 ± 0.006
Zeta電位 (mV)	0.05	-9.8 ± 0.8	-15.9 ± 0.8	-11.7 ± 0.9	-8.7 ± 0.3
	0.1	-11.3 ± 0.6	-14.9 ± 0.3	-14.6 ± 0.5	-8.7 ± 0.5
	0.2	-8.3 ± 0.8	-14.0 ± 0.5	-13.9 ± 0.8	-9.4 ± 0.5

^a -: 平均値 ± SD

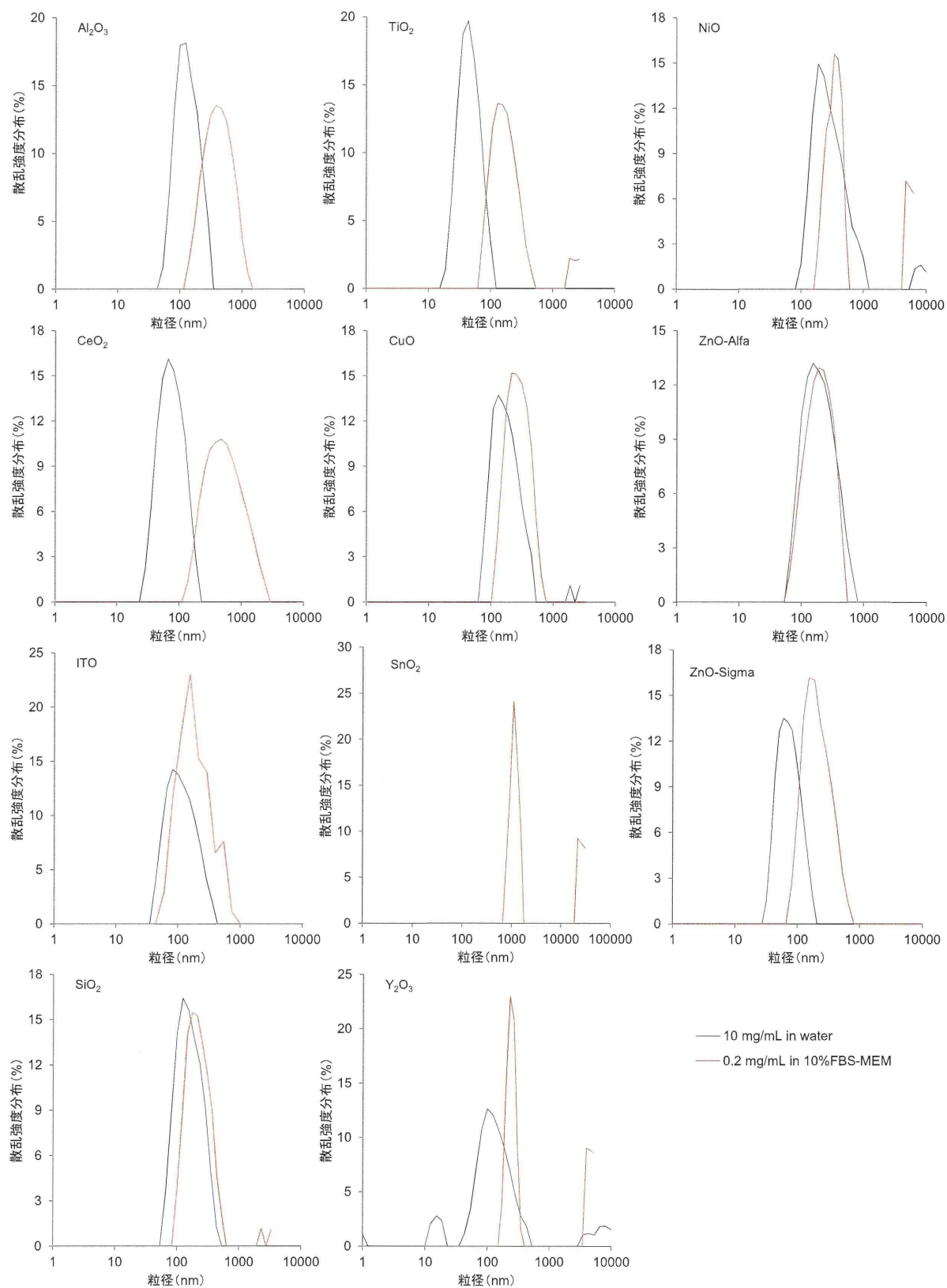


図1. 各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液中の粒径分布（散乱強度分布）

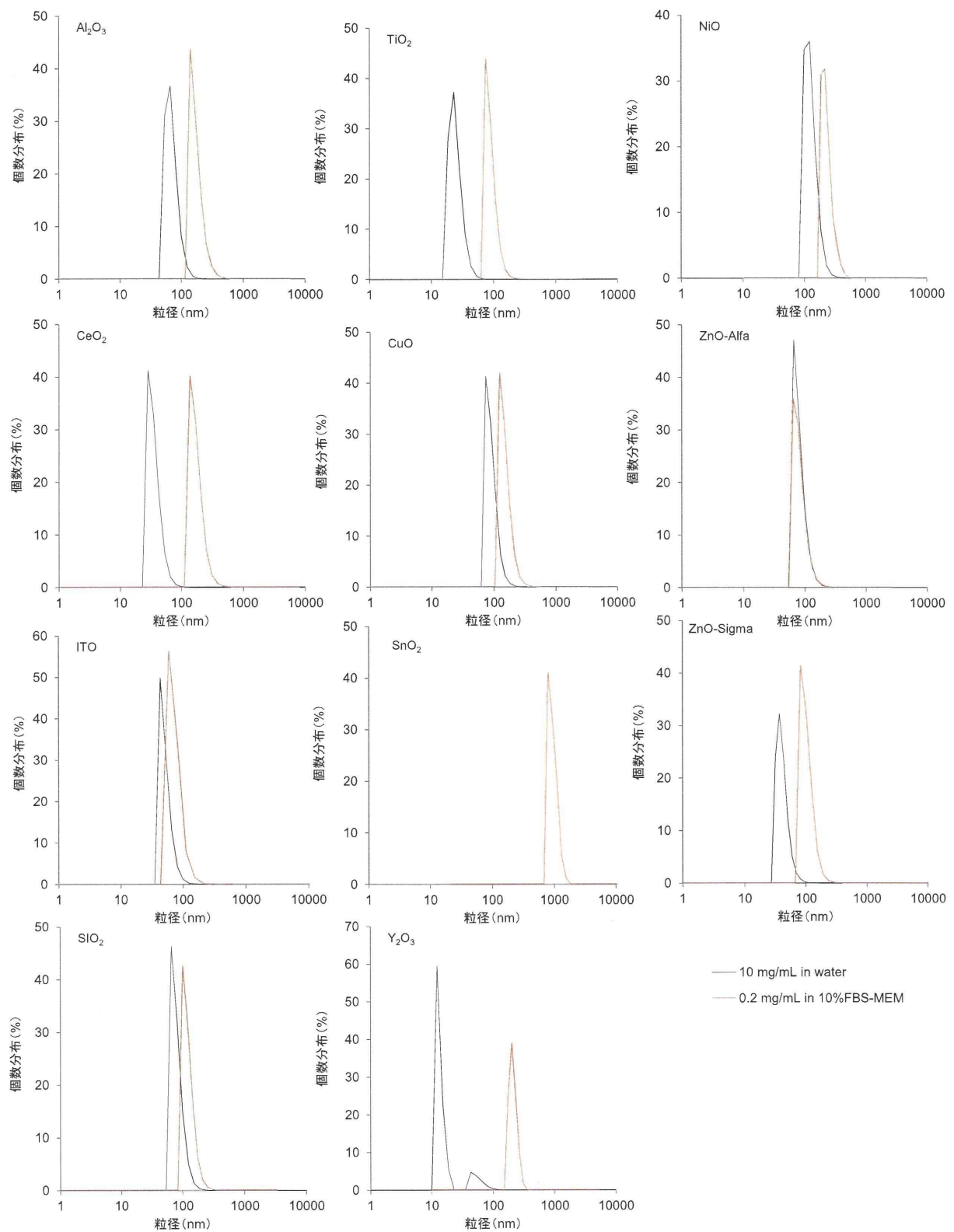


図 2. 各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液中の粒径分布（個数分布）

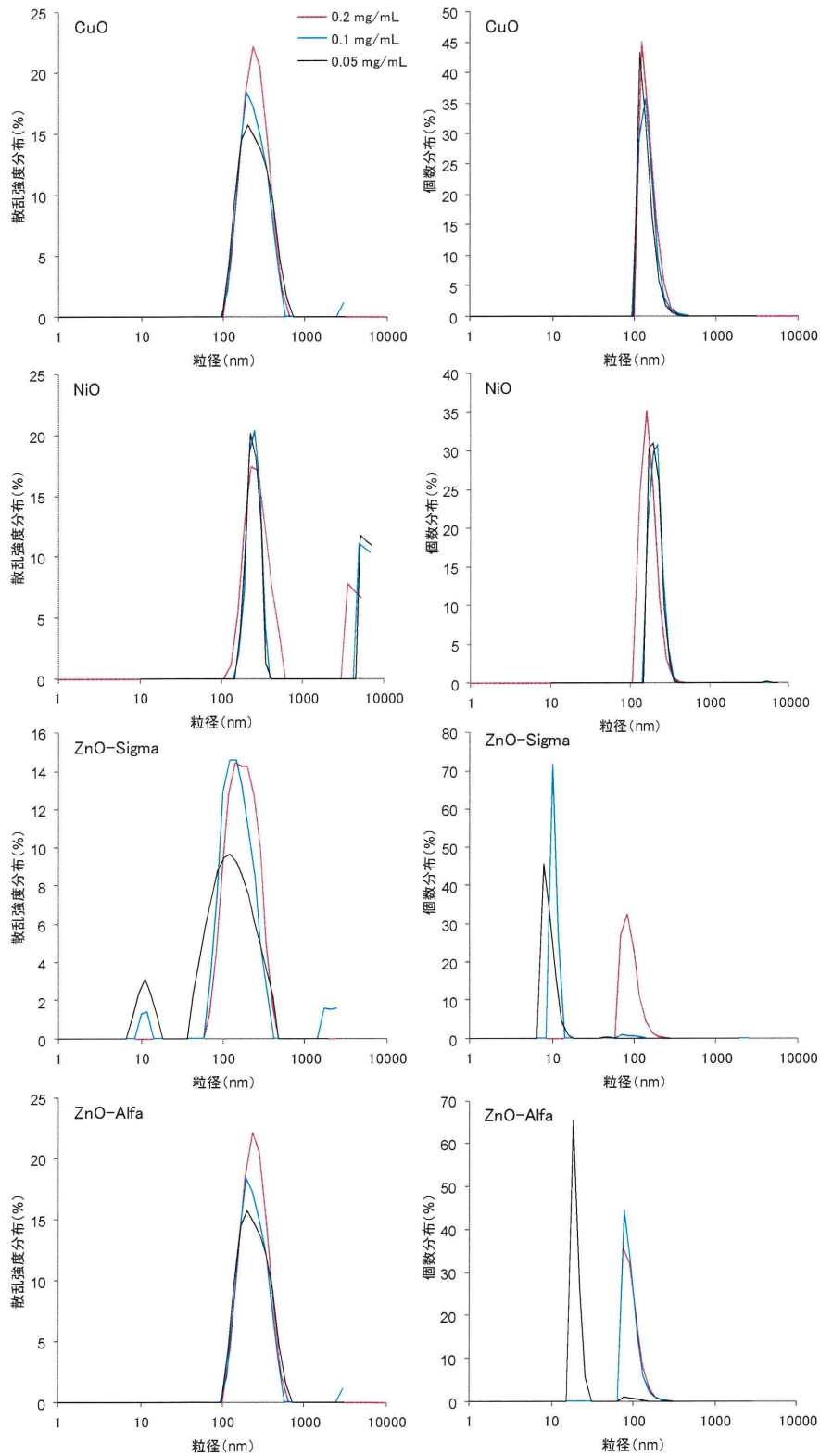


図 3. CuO、NiO、ZnO-Sigma および ZnO-Alfa の 10%FBS-MEM 中における濃度別粒径分布 (左:散乱光分布、右:個数分布)

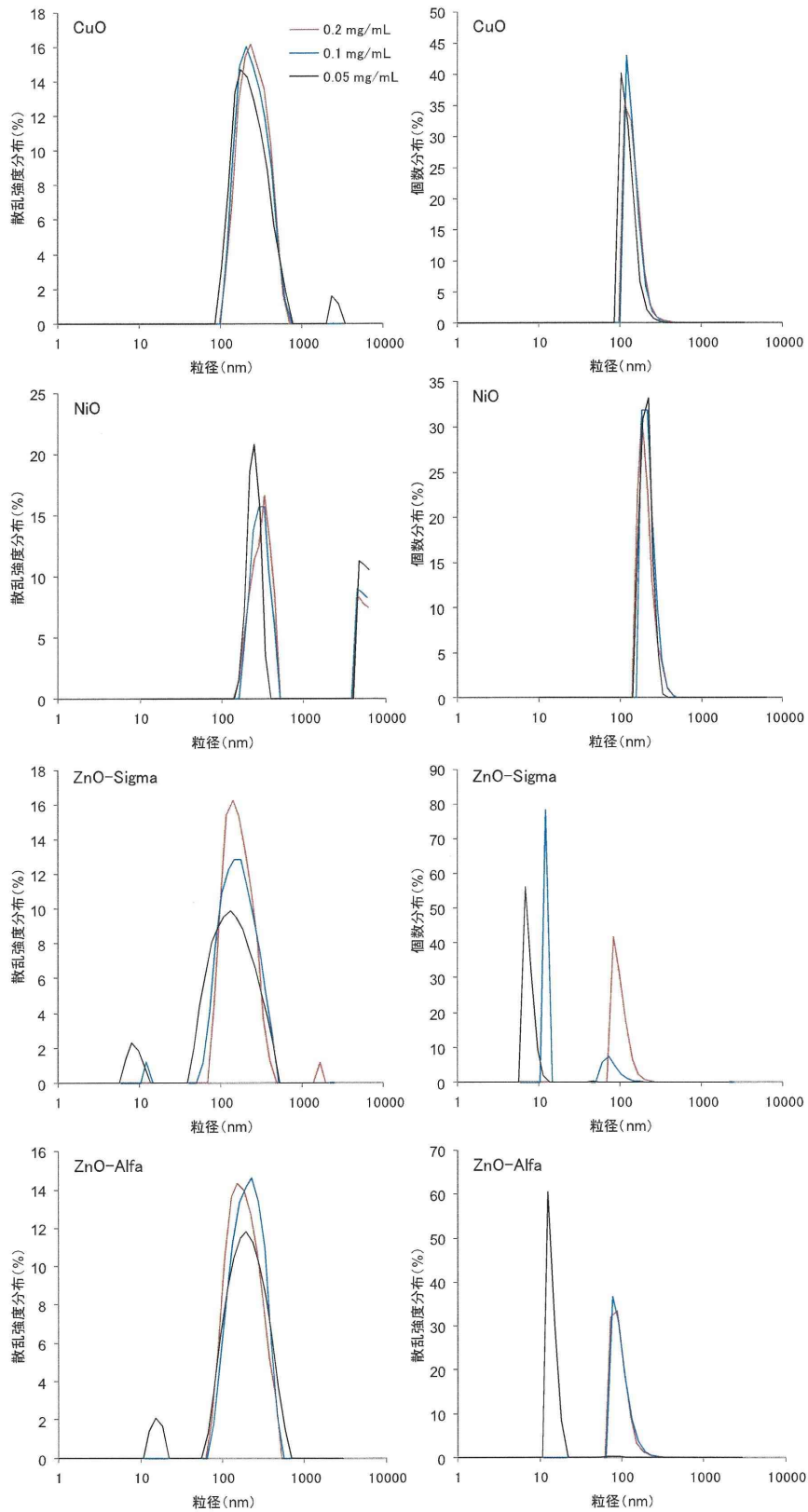


図 4. 調製から 1 日後の CuO、NiO、ZnO-Sigma および ZnO-Alfa の 10%FBS-MEM 中における濃度別粒径分布 (左:散乱光分布、右:個数分布)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

ナノマテリアルの細胞内動態の解析

研究分担者 吉田 緑 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨：物理化学的特徴を十分に把握した種々のナノマテリアルに暴露された培養細胞における細胞内動態を透過型電子顕微鏡 - エネルギー分散型 X 線分析 (TEM-EDS) を用いて超微形態的に明らかにするための予備検討として、亜鉛および銀を経気道的に反復暴露したラットの肺材料を用いて TEM-EDS 解析を行った。その結果、両物質とも光学顕微鏡では顕著な肺の炎症性変化が観察されたが、投与物質の細胞内局剤について、銀では肺胞マクロファージ内の局在が確認できたが、亜鉛をマクロファージ内のライソゾーム内に検出ことはできなかった。しかし、細胞に直接曝露する *in vitro* 培養系においては細胞の局在性は *in vivo* より把握しやすいと考えられるが、短時間の固定など標本作製条件に留意する必要があると考えられた。

A. 研究目的

本研究は、単純化された培養細胞系において、十分にキャラクタリゼーションされたナノマテリアルによる細胞応答を捉え、ナノマテリアルの化学組成、サイズ、物性等と細胞への影響との関係を明確にすることを目的とするが、その中で分担研究者は、物理化学的特徴を十分に把握した種々のナノマテリアルを培養細胞に暴露し、細胞内動態を超微形態的に明らかにすることを目的として本研究を行う。超微形態学的検索手法として、透過型電子顕微鏡 - エネルギー分散型 X 線分析 (TEM-EDS) にて、細胞内のナノマテリアルの局在を明らかにする。

初年度である平成 23 年度は、*in vitro* 研究の基礎として、ナノマテリアルを経気道反復暴露したラットの肺という *in vivo* の材料を用いて、TEM-EDS による細胞動態の確認を行った。

B. 研究方法

材料: 2.0mg/kg の酸化亜鉛あるいは 0.5mg/kg 銀の懸濁液を雄性成熟ラットに反復投与することにより誘発した肺病変の一部(肉眼的異常部位)を細切して 2.5%グルタルアルデヒド・リン酸緩衝作用に一晩固定した。その後、1%オスミウム酸で後固定し、アルコール脱水後ブチルグリジルエーテルで置換し、エポキシ樹脂に包埋した。

準超薄切片を作成し、トルイジンブルー染色後光学顕微鏡で観察し、肺胞マクロファージ集簇を伴う肉芽腫性炎症発現部位をトリミングした。

電顕観察: トリミングした部位を超薄し、銅製メッシュに乗せ酢酸ウラニル・鉛染色を施して JEM-14000(JEOL)にて 100KV にてマクロファージを中心に観察した (x1500 から x15000 くらい)。病変部の数

か所について、TEM-EDSにて元素解析を実施した。

(倫理面への配慮)

(倫理面への配慮)

実験中に動物に与える苦痛は最小限にとどめるよう配慮した。動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

C. 研究結果

酸化亜鉛

光学顕微鏡レベルで酸化亜鉛投与ラットの肺では顕著な肉芽腫性炎症および気管支過形成が認められ(Fig.1)、炎症部周囲には泡沫状の肺泡マクロファージの集簇も観察された。

電顕観察においても、肉芽腫性病変では、多くのマクロファージが認められた。

数か所のマクロファージについて、EDSによる元素解析を実施したが、細胞全体にもZnは検出されず(Fig.2, 4)、ライソゾームのみを囲んでもZnのピークは検出されなかった(核、その他の細胞質も同様)(Fig.3)。

銀

光学顕微鏡レベルで酸化亜鉛投与ラットの肺では明らかな肉芽腫性炎症が認められ、炎症部周囲には泡沫状の肺泡マクロファージの集簇も観察された(Fig.5)。

電顕観察においても、銀投与群の肺病変

においても、肉芽腫性病変では、多くのマクロファージが認められた。

酸化亜鉛と同様に、数か所のマクロファージについて、EDSによる元素解析を実施したところ、高いピークではないものの細胞全体に銀が検出され(Fig.6)、ライソゾームのみを囲んだ解析においても銀のピークが検出された(Fig.7)。核、その他の細胞質には検出されなかった(Fig.8)。

今回の結果より、細胞に直接曝露するin vitro培養系においては細胞の局在性はin vivoより把握しやすいと考えられるが、電子顕微鏡レベルにおいても同様な形態像であるマクロファージで元素が検出されなかった。正確に細胞内局剤を把握するためには、短時間の固定など標本作製条件に留意する必要があると考えられた。

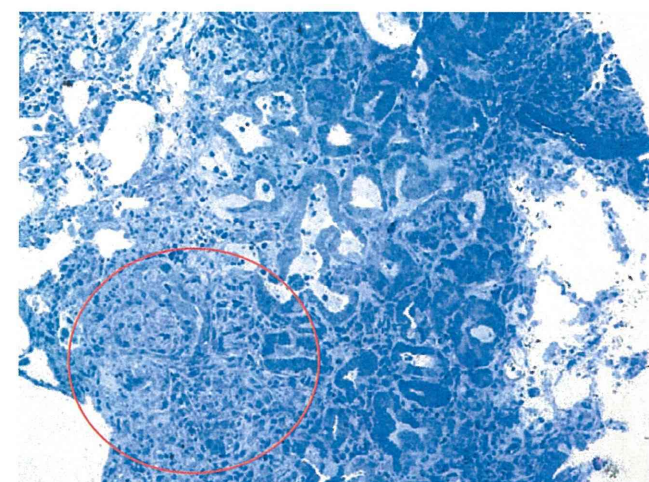
D. 研究発表

1. 論文発表
なし

E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

Zn 経気道反復暴露ラット肺における Zn の局在の検討



TEM-EDS解析部位

電顕用厚切り切片(トルイジンブルー染色)

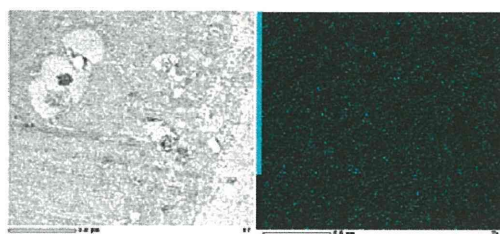
顕著な肉芽腫性炎症および気管支上皮過形成が認められる

Fig. 1 準超薄切片による電顕観察部位

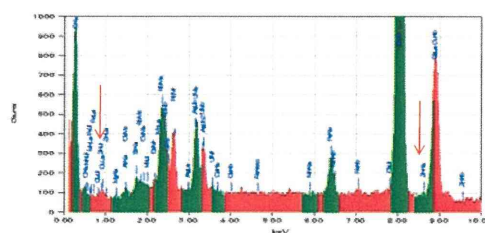
マクロファージNo.1



細胞全体にZnの分布はなし。
ライソゾーム内(*)にもZn高密度に分布している像はなし。



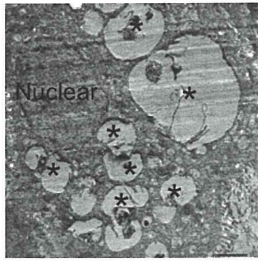
Znの分布



EDS (Zn ↓)

Fig. 2 肺胞マクロファージおよび細胞内の EDS 解析結果 1

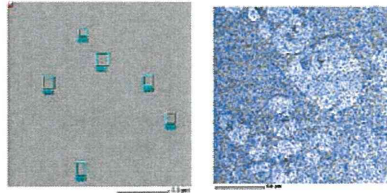
マクロファージNo.2



泡沫状マクロファージ(ライソゾーム内(*)に残渣などを貪食した状態)

泡沫状マクロファージの膨らんだライソゾーム内にZnは検出できなかった

ライソゾーム内の黒色物を囲んだ(No.1-4), No.5は核、No.6はライソゾーム外の細胞質



Znの分布と重ねたが、分布差はない

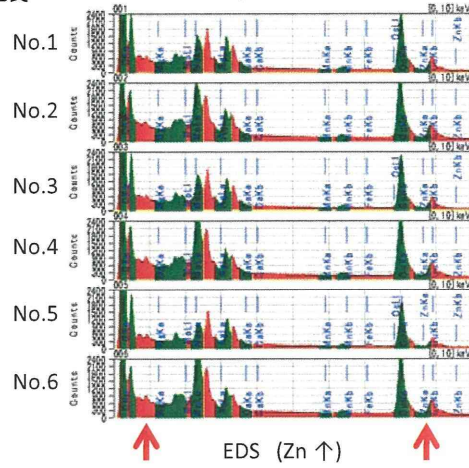
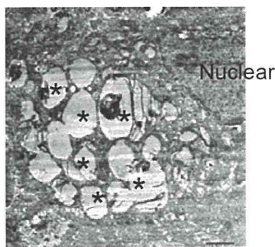
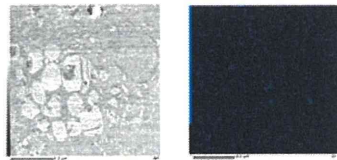


Fig. 3 肺泡マクロファージおよび細胞内の EDS 解析結果 2

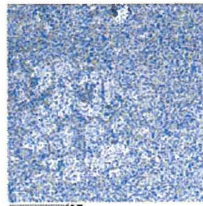
マクロファージNo.3



泡沫状マクロファージの膨らんだライソゾーム内(*)にZnは検出できなかった



Znの分布



Znの分布と重ねたが、分布差はない

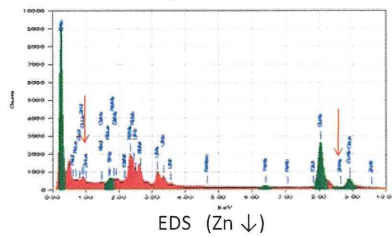


Fig. 4 肺泡マクロファージおよび細胞内の EDS 解析結果 3