

201329006A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの **in vitro** 評価系構築に向けた基礎研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮島 敦子

平成 26 (2014) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのin vitro 評価系構築に向けた基礎研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

平成 26 (2014) 年 3 月

伊佐間和郎	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長
吉田 緑	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター病理部 室長
宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長
花方 信孝	独立行政法人物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合ステーション ステーション長
河上 強志	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官
戸塚ゆ加里	独立行政法人国立がん研究センター研究所 発がんシステム研究分野 ユニット長
中江 大	東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 部長
渡邊 昌俊	国立大学法人横浜国立大学 工学研究院 教授

目 次

I. 総括研究年度終了報告	
ナノマテリアルのin vitro 評価系構築に向けた基礎研究 -----	1
宮島 敦子	
II. 分担研究年度終了報告	
1. 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析 -----	1 3
河上 強志	
2. ナノマテリアルの細胞内動態の解析 -----	2 7
吉田 緑	
3. ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析 -----	3 8
宮島 敦子	
4. ナノマテリアル暴露による網羅的遺伝子発現解析 -----	5 1
花方 信孝	
5. ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価 -----	6 7
伊佐間和郎	
6. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究 ---	7 9
戸塚ゆ加里	
7. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化のin vivo 評価 -----	8 6
中江 大	
8. 遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究 -----	9 9
渡邊 昌俊	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	1 1 1
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	1 1 5

I. 総括研究年度終了報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究年度終了報告書

ナノマテリアルの *in vitro* 評価系構築に向けた基礎研究

研究代表者 宮島敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長

研究要旨：ナノマテリアルの生体影響については、試験法や評価基準などが定められていないため、現在は断片的な結果の集積に留まっている。特に、ナノマテリアルの化学組成、サイズ、物性等に依存した生体影響が確認されているものの、ナノマテリアルのキャラクタリゼーションが不十分であるため、毒性発現のメカニズム解明には至っておらず、ナノマテリアルの *in vitro* 試験法の開発が課題となっている。そこで、本研究では、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、物性等が細胞応答に及ぼす影響を解明することを目的とする。さらに、有用ナノマテリアルの遺伝毒性を低減化する物理的及び化学的な手法を検討する。今年度の研究では、次のような成果を得た。二次粒子径の異なる金属酸化物ナノ粒子懸濁液を作成し、細胞毒性及び細胞内の金属イオン濃度を測定した。二次粒子径サイズが大きいほど NiO ナノ粒子の細胞内への取り込み量が多く、その結果、細胞毒性が強くなったと考えられた。電子顕微鏡による細胞内動態解析において、ナノ粒子曝露時の細胞内小器官の形態変化について観察した。粒子径の大きい NiO ナノ粒子の曝露は、細胞への影響が強い可能性が示唆された。ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。細胞毒性試験の結果、3種類のナノマテリアルで毒性が観察され、IL-8 の増加が観察された。ヒト肺上皮細胞株 A549 に対する carbon nanotubes (CNTs) の細胞毒性において、前培養時間による CNTs に対する細胞の感受性の違いは細胞の増殖ステージによる生理的状態の違いに依存すると考えられた。SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらも金属塩化物の共存に伴ってゼータ電位が変化した。平均粒子径は変化しなかった。水晶発振子マイクロバラン (QCM) 法による解析から、ゼータ電位の異なる SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらにも CuCl₂ が結合し、それらの結合量に差は認められなかった。マグネタイトの気管内投与によりマウス肺に生成する付加体の網羅的解析を行なったところ、マグネタイト投与群で付加体の総数が上昇し、それらの複数が酸化反応ならびに炎症反応由来であることが分かった。マグネタイトにより誘発される遺伝毒性には、酸化ストレスや炎症が関与する事が裏付けられた。マグネタイトの肺発がんプロモータ活性の有無を明らかにするため、ラット 2 段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。発がんイニシエーションとして DHPN 処置を行った後、マグネタイトの気管内投与を実施した。マグネタイトは、明らかな肺発がんプロモータ活性を有さず、むしろ DHPN の肺発がん性を抑制することが明らかとなった。細胞株を利用した *in vitro* 系で磁性体ナノ粒子 (Fe₃O₄NPs) の細胞毒性および遺伝毒性の解析を行った。前立腺癌細胞株では、PEI 表面修飾により 2 次粒子径が抑えられ、分散能の安定性が高まる事が確認された。A549 細胞に対して、磁性体ナノ粒子を曝露し、cell viability の低下傾向、ROS 産生の上昇、8-OHdG 生成の上昇が認められ、細胞種により磁性体ナノ粒子に対する反応が異なると考えられた。

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

花方 信孝 (独) 物質・材料研究機構
ナノテクノロジー融合ステーション ステーション長

伊佐間 和郎 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部 室長

河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部 主任研究官

戸塚ゆ加里 (独) がん研究センター研究所
発がんシステム研究分野
ユニット長

中江 大 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 部長

渡邊 昌俊 横浜国立大学 工学研究院
教授

研究協力者

加藤 玲子 国立医薬品食品衛生研究所
医療機器部 主任研究官

小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所
医療機器部

多田 幸恵 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 生体影響研究科 主任研究員

猪又 明子 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 生体影響研究科 科長

小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 生体影響研究科 科長補佐

A. 研究目的

ナノマテリアルの生体影響については、試験法や評価基準などが定められていないため、現在は断片的な結果の集積に留まっている。そのため、『ナノマテリアルの安全対策に関する検討会報告書』(2009)では、

今後の具体的な対応のひとつとして、ナノマテリアルの*in vitro* 試験法の開発を挙げている。本研究班の伊佐間らは、平成20年度及び平成21年度の厚生労働省家庭用品規制基準調査事業において、家庭用品に使用されるシリカ、銀及び酸化亜鉛ナノ粒子の安全性評価を実施し、各々100 nm 前後に調製したナノ粒子について、細胞毒性試験、染色体異常試験及びラット気管内投与毒性試験を行った。その結果、*in vitro* では、シリカ < 酸化亜鉛 < 銀の順に強い細胞毒性を示し、酸化亜鉛ナノ粒子のみが染色体の構造異常を示した。また、*in vivo* では、いずれも泡沫細胞集簇や肺胞上皮の増生を伴う肉芽腫性炎症や慢性肺炎が認められ、酸化亜鉛ナノ粒子のみで顕著な慢性肺炎だけでなく気管支上皮の増生を伴う肺の線維化が認められた。また、Karlsson ら

(2009) は、数種の金属酸化物の内、酸化銅ナノ粒子のみがサイズ依存性の細胞毒性を示すことを報告した。また、Xu ら

(2010) は、半導体酸化物ナノ粒子は絶縁体酸化物ナノ粒子より強い細胞毒性を示すことを報告した。さらに、Cho ら

(2012) は、金属酸化物ナノ粒子のハザード評価において、可溶性金属イオンの寄与に重大な相違があることを指摘した。

このように、化学組成、サイズ、物性等に依存したナノマテリアルの生体影響が確認されているものの、試料のキャラクター化が不十分であるため、毒性発現のメカニズム解明には至っていない。そこで、本研究は、単純化された培養細胞系において、十分にキャラクター化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、物性等が細胞応答に及ぼす影響を解明することを目的とする。そのために、金属酸化物を対象に、物理化学的特徴を把握し、細胞内

動態を明らかにした上で、細胞毒性・遺伝毒性、遺伝子発現及び相互作用を総合的に評価する。さらに、有用ナノマテリアルの遺伝毒性を低減化する物理的及び化学的な手法を検討する。以下に平成 25 年度の各分担研究の成果の概要を記載するが、詳細は各分担研究報告書を参照されたい。

B. 研究方法及び結果

1. 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

NiO ナノマテリアルについて、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製を試みた結果、二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液（例: 0.4 mg/mL の平均粒子径 154.8~373.1 nm）が調製できた。そして、それらを A549 細胞に曝露し細胞毒性試験を行った結果、二次粒子径サイズが大きくなるほど細胞毒性が強くなる（IC₅₀: 33.4~147.5 µg/mL）傾向を示した。これらの懸濁液曝露後の細胞について、細胞内の Ni 量を測定したところ、二次粒子径サイズが大きい NiO ナノマテリアル懸濁液を曝露した細胞ほど、細胞内の Ni 量が多いことが明らかとなった。

Milli-Q 水で調製した Al₂O₃、CeO₂、ITO、TiO₂、ZnO-Sigma および ZnO-Alfa 懸濁液（10 mg/mL）について、Tween80 添加および非添加時の等電点（Point of zero charge: PZC）を測定し、その分散状態に対する Tween80 添加の影響について検討した。その結果、Tween80 を添加することで、ZnO-Alfa を除き、各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の PZC 値は非添加時に比べて小さくなった。また、ZnO-Sigma を除き、Tween80 添加により、酸性から塩基性まで幅広い pH 範囲で、各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の平均粒子径サイズに変化は

認められなかった。

2. ナノマテリアルの細胞内動態の解析

昨年度までの研究で検討した培養細胞の電顕観察用標本の作製方法条件で、A549 細胞に酸化亜鉛および酸化ニッケルを 24 時間曝露し電顕観察を行った。その結果、1 および 10 µg 亜鉛曝露群、径 0.05、0.1 および 0.5 µm の酸化ニッケル曝露群ともに細胞壊死、アポトーシスの増加等は観察されず、曝露による明らかな細胞傷害像を特定することはできなかった。ニッケル曝露細胞ではいずれの粒子径群においても同程度の 0.4~0.6 µm の不整形高電子密度物質が観察され、径 0.5 µm 群では細胞突起が乏しい細胞が豊富な細胞突起を有する細胞と混在して観察された。TEM-EDS 解析においては、細胞質内に亜鉛を検出することはできなかった。

3. ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析

ナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。8 種類の酸化金属ナノマテリアルを対象として、THP-1 細胞に曝露し、ATP 法による細胞毒性の評価と培養上清中のサイトカイン測定による免疫応答の検討を行った。細胞毒性試験の結果、3 種類のナノマテリアルで毒性が観察され、その強さは CuO、ZnO、NiO の順であった。細胞培養上清中のサイトカイン量は、CuO、ZnO、NiO 曝露により IL-8 が増加し、その量は、ZnO 曝露で最も高く、次いで NiO、CuO であった。CuO では 48h で 24h に比べて IL-8 量は減少しており、細胞毒性の影響が考えられた。一方、CuO、ZnO、NiO 曝露により TNF-α 量には変化がなかった。次に、ナノマテリアルの細胞内への

取り込みについて検討するため、A549 細胞を用いて、ZnO による細胞毒性に対するサイトカラシン D (CytoD) 処理の影響について検討した。

CytoD 処理 3 時間後に ZnO (100 µg/mL) を曝露させたところ、ZnO 曝露 24 時間後の細胞生存率は CytoD の前処理により約 80% に回復した。

4. ナノマテリアル暴露による網羅的遺伝子発現解析

ヒト肺上皮細胞株 A549 に対する carbon nanotubes (CNTs) の細胞毒性について検討した。A549 細胞を予め 4、24、48 および 72 時間前培養し、その後、single wall CNTs (SWCNTs) および multi wall (MWCNTs) を添加すると、4 および 24 時間前培養した細胞においてこれらの CNTs の感受性が大きくなり、前培養時間が長い細胞ほど CNTs に対する感受性が低下した。また、一定時間前培養した細胞にこれらの CNTs を曝露時間を変えて処理すると、SWCNT では、24 時間曝露したときに比べて、48 時間曝露したときの細胞毒性が低減された。一方、MWCNT では、曝露時間が細胞毒性に及ぼす影響は観察されなかった。前培養時間が異なると細胞密度が異なることから、前培養時間による CNTs に対する細胞の感受性の違いが、細胞密度の違いによるのか、あるいは細胞の生理的状態の違いによるのかを網羅的遺伝子解析および細胞周期解析を行った。

5. ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価

ナノ粒子の物理化学的性質に及ぼす共存する金属塩化物の影響を明らかにするため、金属塩化物 (AlCl₃、CuCl、CuCl₂ 及び ZnCl₂) の共存に伴う SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子の粒子径及びゼータ電位の変

化を解析した。さらに、SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子を固定化した水晶発振子マイクロバラン (QCM) センサーを作製し、QCM 法によりこれらのナノ粒子に対する CuCl₂ の吸着挙動を解析した。その結果、SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらも金属塩化物の共存に伴って平均粒子径は変化しなかった。また、SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらも金属塩化物の共存に伴ってゼータ電位が変化した。TiO₂ ナノ粒子では共存前後とも正の値で変化量も少なかったのに対して、SiO₂ ナノ粒子では共存前の負の値から共存後の正の値への反転を伴う大きな変化が認められた。しかし、これらのゼータ電位の変化は、粒子径には影響しなかった。さらに、QCM 法からゼータ電位の異なる SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらにも CuCl₂ が結合し、それらの結合量に差は認められなかった。

6. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究

質量分析機器を用いて DNA 付加体を網羅的に解析する方法を用いて、マグネタイトの気管内投与によりマウス肺に生成する付加体の解析を行なったところ、マグネタイト投与群で付加体の総数がコントロールと比べ上昇したこと、および、それらの複数が酸化反応ならびに炎症反応由来であることが分かった。更に、炎症のバイオマーカーである抗ニトロチロシン抗体を用いて免疫染色を行なったところ、マグネタイト投与群でニトロチロシン陽性細胞が観察された。

7. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の *in vivo* 評価

昨年度は、マグネタイトが明らかな肺発がんイニシエータ活性を有しないことを見出した。本年度は、マグネタイトの肺発が

ンプロモータ活性の有無を明らかにする目的で、さらなる検索を行った。試験は、当センターの動物飼育施設内のナノ物質取り扱いエリアにおいて、当センターのナノマテリアルの取扱いに関する作業規定及び試験管理マニュアルに従って、F344/DuCrjCrlj 雄性ラット（6週齢）に *N*-bis (2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)

(0.1%混水) による2週間の発がんイニシエーション処置を行った後、マグネタイトを0 (対照群)、5.0、1.0 mg/kg 体重の用量で4週間に1回、計7回の気管内投与を実施し、試験開始後30週の時点で肺における腫瘍性病変の発生を病理組織学的に検索した。その結果、肺の肉眼観察においては、DHPN 投与により結節が多発性に観察されたが、マグネタイト 5.0 mg 併用群で結節数が減る傾向を示し、径 3 mm 以上の結節数に関して統計学的に有意な減少を示した。病理組織学的検索においては、DHPN 投与により肺胞上皮過形成及び肺の腺腫・腺癌が発生し、マグネタイト併用投与群で、腫瘍の発生頻度と個体当たりの腫瘍数がマグネタイトの用量に依存した減少傾向を示した。特に、マグネタイト 5.0 mg 併用群の個体当たりの全腫瘍数は、統計学的に有意に減少した。

8. 遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究

細胞株を利用した *in vitro* 系で磁性体ナノ粒子 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$) の細胞毒性および遺伝毒性の解析を行ってきた。本研究では、(1) ポリエチレンイミン(PEI)修飾ナノ粒子を利用した細胞毒性の解析、(2) A549 細胞に対して、磁性体ナノ粒子を曝露し、細胞毒性及び遺伝毒性を評価した。実験内容は、8-OHdG 生成の測定、細胞生存率、活性酸素種(ROS)の測定等の解析である。まず、PEI 表面修飾を行った磁性体

ナノ粒子を前立腺癌細胞株 DU145 に曝露し、細胞毒性を評価した。PEI 表面修飾により2次粒子径が抑えられ、分散能の安定性が高まる事が確認された。また、活性酸素種(ROS)が抑えられたが、cell viability は低下傾向を示した。肺癌細胞株 A549 に磁性体ナノ粒子を曝露した時に、濃度依存的に cell viability の低下傾向、ROS 産生の上昇、8-OHdG 生成の上昇を認めた。一方、細胞膜損傷は高濃度曝露(100 $\mu\text{g/ml}$)で始めて認められた。抗酸化関連遺伝子として、HO-1 遺伝子の発現は濃度依存的に上昇を認めた。

C. 結論

細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析では、二次粒子径の異なる金属酸化物ナノ粒子懸濁液を作成し、細胞毒性及び細胞内の金属イオン濃度を測定した。二次粒子径サイズが大きいほど NiO ナノ粒子の細胞内への取り込み量が多く、その結果、細胞毒性が強くなったと考えられた。ナノマテリアルの細胞内動態の解析では、電子顕微鏡による細胞内動態解析において、ナノ粒子曝露時の細胞内小器官の形態変化について観察した。粒子径の大きい NiO ナノ粒子の曝露は、細胞への影響が強い可能性が示唆された。ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析では、ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。細胞毒性試験の結果、3種類のナノマテリアルで毒性が観察され、IL-8 の増加が観察された。ナノマテリアル暴露による網羅的遺伝子発現解析では、ヒト肺上皮細胞株 A549 に対する carbon nanotubes (CNTs) の細胞毒性において、前培養時間による CNTs に対する細胞の感受性の違いは細胞の増殖ステージによる生理的状態

の違いに依存すると考えられた。ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価では、SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらも金属塩化物の共存に伴ってゼータ電位が変化したが、平均粒子径は変化しなかった。水晶発振子マイクロバラン (QCM) 法による解析から、ゼータ電位の異なる SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらにも CuCl₂ が結合し、それらの結合量に差は認められなかった。ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究では、マグネタイトの気管内投与によりマウス肺に生成する付加体の網羅的解析を行なったところ、マグネタイト投与群で付加体の総数が上昇し、それらの複数が酸化反応ならびに炎症反応由来であることが分かった。マグネタイトにより誘発される遺伝毒性には、酸化ストレスや炎症が関与する事が裏付けられた。ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の *in vivo* 評価では、マグネタイトの肺発がんプロモータ活性の有無を明らかにするため、ラット 2 段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。発がんイニシエーションとして DHPN 処置を行った後、マグネタイトの気管内投与を実施した。マグネタイトは、明らかな肺発がんプロモータ活性を有さず、むしろ DHPN の肺発がん性を抑制することが明らかとなった。遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究では、細胞株を利用した *in vitro* 系で磁性体ナノ粒子 (Fe₃O₄NPs) の細胞毒性および遺伝毒性の解析を行った。前立腺癌細胞株では、PEI 表面修飾により 2 次粒子径が抑えられ、分散能の安定性が高まる事が確認された。A549 細胞に対して、磁性体ナノ粒子を曝露し、cell viability の低下傾向、ROS 産生の上昇、8-OHdG 生成の上昇が認められ、細胞種により磁性体ナノ粒子に対する反応が異なると考えられた。

D. 健康危害情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 河上強志、伊佐間和郎、五十嵐良明：EU における繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の違反事例の特徴、国立衛研報、131、66-74 (2013)
- 2) Kitamura K, Maruyama K, Hamano S, Kishi T, Kawakami T, Takahashi Y, Onodera S.: Effect of hypochlorite oxidation on cholinesterase-inhibition assay of acetonitrile extracts from fruits and vegetables for monitoring traces of organophosphate pesticides. *J. Toxicol. Sci.*, 39, 71-81 (2014)
- 3) 味村真弓、中島晴信、吉田仁、吉田俊明、河上強志、伊佐間和郎：有害物質含有家庭用品規制法で規制されている繊維製品中のトリス (2,3-ジブロムプロピル) ホスフェイト分析法の改定に向けた検討、薬学雑誌、134、259-268 (2014)
- 4) Usami M, Mitsunaga K, Irie T, Miyajima A, Doi O.: Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos, in press
- 5) Li X, Xu L, Shao A, Wu G, Hanagata N.: Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on primary Syrian hamster embryo (SHE) cells, *Journal of Nanotechnology and Nanoscience*, 13, 161-170 (2013)
- 6) Xu M, Li J, Hanagata N, Su H, Chen H, Fujita D.: Challenge to assess the toxic

- contribution of metal cation released from nanopaterials for nanotoxicity, a case of ZnO nanoparticles, *Nanoscale*, 5, 4763-4769 (2013)
- 7) Hanagata N.: Biological interpretation of the in vitro assessment of nanotoxicity, *Nano Biomedicine*, 5, 1-10 (2013)
 - 8) Zhang J, Zhu Y, Li J, Zhu M, Tao C, Hanagata N.: Preparation and characterization of multifunctional magnetic mesoporous calcium silica materials, *Science and Technology of Advanced Materials*, 14, 055009 (2013)
 - 9) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A.: The effect of calcium ions incorporation into titanium surface by chemical treatment on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 101, 2573-2585 (2013)
 - 10) Haishima Y, Isama K, Fukui C, Yuba T, Matsuoka A.: A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 101, 2630-2643 (2013)
 - 11) 伊佐間和郎 : ナノマテリアルの in vitro 安全性評価のための基礎研究—金属酸化物ナノ粒子に対する細胞応答—、薬学雑誌、134(6) (2014) 印刷中
 - 12) Haishima Y, Kawakami T, Hasegawa C, Tanoue A, Yuba T, Isama K, Matsuoka A, Niimi S.: Screening study on hemolysis suppression effect of an alternative plasticizer for the development of a novel blood container made of polyvinyl chloride, *Journal of Biomedical Materials Research Part B - Applied Biomaterials*, in press
 - 13) Haishima Y, Hasegawa C, Nomura Y, Kawakami T, Yuba T, Shindo T, Sakaguchi K, Tanigawa T, Inukai K, Takenouchi M, Isama K, Matsuoka A, Niimi S.: Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing, *Journal of Biomedical Materials Research, Part B - Applied Biomaterials*, in press
 - 14) Kato T, Totsuka Y, Hasei T, Watanabe T, Wakabayashi K, Kinae N, Masuda S.: In vivo examination of the genotoxicity of the urban air and surface soil pollutant, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, with intraperitoneal and intratracheal administration, *Environ, Toxicol*, 28:588-94 (2013)
 - 15) Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H.: Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China, *J Epidemiol*, 23, 233-242 (2013)
 - 16) Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K.: Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems, *Nanotoxicology*, 7: 452-461 (2013)
 - 17) Kawanishi M, Ogo S, Ikemoto M, Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Yagi T.: Genotoxicity and reactive oxygen species production induced by magnetite nanoparticles in mammalian cells, *J Toxicol Sci.*, 38(3), 503-511 (2013)
 - 18) Totsuka Y, Watanabe T, Coulibaly S, Kobayashi S, Nishizaki M, Okazaki M, Hasei T, Wakabayashi K, Nakagama H.: In vivo genotoxicity of a novel heterocyclic amine, aminobenzoazepinoquinolinone-

- derivative (ABAO), produced by the Maillard reaction between glucose and l-tryptophan, *Mutat Res* (2014) in press
- 19) Totsuka Y, Ishino K, Kato T, Goto S, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.: Magnetite Nanoparticles Induce Genotoxicity in the Lung of Mice via Inflammatory Response, *Nanomaterials*, (2014) in press
- 20) Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Inomata A, Ogata A, Nakae D.: Long-term pulmonary responses to quadweekly intermittent intratracheal spray instillations of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles for 52 weeks in Fischer 344 rats, *Journal of Toxicologic Pathology* 26, 393-403 (2013)
- 21) Nakagawa Y, Suzuki T, Nakajima K, Inomata A, Ogata A, Nakae D.: Effects of *N*-acetyl-L-cysteine on target sites of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes, *Archives of Toxicology* 88, 115-126 (2014)
- 22) Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Toda Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K.: Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems, *Nanotoxicology*, 7(4), 452-461 (2013)
- 23) Sato A, Itcho N, Ishiguro H, Okamoto D, Kobayashi N, Kawai K, Kasai H, Kurioka D, Uemura H, Kubota Y, Watanabe M.: Magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death. *Int. J. Nanomed*, 8, 3151-3160 (2013)
- 24) Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, Kurioka D, Nittami T, Hirokawa H, Shiraishi T, Kawai K, Kasai H, Y. Totsuka.: Effects of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14(8), 15546-15560 (2013)
- 25) Ota S, Takahashi Y, Tomitaka A, Yamada T, Kami D, Watanabe M, Takemura Y.: Transfection efficiency influenced by aggregation of DNA/polyethylenimine max/magnetic nanoparticle complexes. *J. Nanopart. Res*, 15, 1653-1664 (2013)
2. 学会発表
- 1) 河上強志、宮島敦子、小森谷薫、加藤玲子、伊佐間和郎：NiO ナノ粒子の細胞毒性に及ぼす懸濁液中の二次粒子径の影響、日本薬学会第 134 回年会 (2014.3、熊本)
- 2) Yoshida M, Inoue K, Isama K, Kawakami T, Kadama Y, Matsuoka A.: Comparison of Lung Lesions in Rat Treated with Nano-suspensions of Silica, Silver and Zinc oxide. 32nd Annual Symposium, Society of Toxicologic Pathology (2013, Portland)
- 3) Miyajima-Tabata A, Kato R, Sakai K, Matsuoka A.: Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. *Eurotox 2013* (2013.9, Interlaken)
- 4) 宮島敦子、河上強志、加藤玲子、酒井恵子、小森谷薫、新見伸吾、伊佐間和郎：酸化金属ナノマテリアルの A549 細胞に対する細胞毒性および遺伝毒性 日本薬学会第 134 年会 (2014.3、熊本)
- 5) 伊佐間和郎、河上強志、宮島敦子、松岡厚子：金属塩の細胞毒性に及ぼす SiO₂ 及び TiO₂ ナノ粒子の影響、第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013.6、千葉)
- 6) Isama K, Kawakami T, Miyajima A, Matsuoka A.: Effect of SiO₂ and TiO₂

- nanoparticles on the cytotoxicity of metal chlorides, International Conference on Materials for Advanced Technologies (2013.7, Singapore)
- 7) 伊佐間和郎、河上強志、宮島敦子：金属塩の細胞毒性に及ぼす SiO₂ 及び TiO₂ ナノ粒子の影響、第 50 回全国衛生化学技術協議会年会 (2013.11、富山)
 - 8) 石野孔祐、戸塚ゆ加里、松島芳隆、鰐淵英機、魏民、山野莊太郎、中森正二、柴田龍弘、土原一哉、落合淳志、中釜斉：職業性胆管がんの原因候補物質であるハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体及び変異原性の解析、第 72 回日本癌学会学術総会 (2013.10、横浜)
 - 9) 中釜斉、戸塚ゆ加里、三牧幸代、中森正二、鈴木 穰、柴田龍弘、落合淳志、土原一哉；1,2-DCP, DCM 曝露歴のある印刷工胆管癌に認められた高頻度ゲノム変異、第 72 回日本癌学会学術総会 (2013.10、横浜)
 - 10) 戸塚ゆ加里、石野孔祐、中江大、渡辺昌俊、若林敬二、中釜斉：マグネタイトナノ粒子は炎症反応を介してマウス肺に遺伝毒性を誘発する、第 72 回日本癌学会学術総会 (2013.10、横浜)
 - 11) Totsuka Y, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.: Mechanisms of genotoxicity in the lungs by nanomaterials, 11th ICEM (2013.11, Foz do Iguassu)
 - 12) Totsuka Y, Ishino K, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.: Magnetite nanoparticles induce genotoxicity in the lung of mice via inflammatory response, NanOEI (2013.10、名古屋)
 - 13) 後藤正憲、松島芳隆、中釜斉、戸塚ゆ加里：ジクロロメタン由来の DNA 付加体を含むシャトルプラスミドを用いたヒト細胞内変異原性試験、第 42 回日本環境変異原学会 (2013.11、岡山)
 - 14) 馬場明、後藤純雄、松島芳隆、中釜斉、戸塚ゆ加里：職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性及び変異スペクトラムの解析、第 42 回日本環境変異原学会 (2013.11、岡山)
 - 15) 辻田俊寛、石野孔祐、加藤護、柴田龍弘、後藤純雄、魏民、松島芳隆、中釜斉、戸塚ゆ加里：職業性胆管がん発生に關与するハロゲン系炭化水素の DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析)、第 42 回日本環境変異原学会 (2013.11、岡山)
 - 16) 坂本義光、小縣昭夫、西村哲治、広瀬明彦、猪又明子、中江大：繊維長の異なる多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発性の検討、第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013.6、千葉)
 - 17) 藤谷知子、安藤弘、久保喜一、猪又明子、小縣昭夫、広瀬明彦、西村哲治、中江大：マウスにおけるナノマテリアルの催奇形性に関する研究、第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013.6、千葉)
 - 18) 山本行男、坂本義光、大貫文、小縣昭夫、猪又明子、広瀬明彦、中江大：多層カーボンナノチューブ投与により誘発したラット中皮腫におけるプロテオーム解析 (第三報)、第 86 回日本生化学会大会 (2013.9、横浜)
 - 19) 坂本義光、小縣昭夫、西村哲治、広瀬明彦、中江大：ラットにおける 7 種の多層カーボンナノチューブ(MWCNT) の腹腔内投与による中皮腫誘発性に関する検討、第 72 回日本癌学会学術総会 (2013.10、横浜)
 - 20) 坂本義光、小縣昭夫、湯澤勝廣、久保喜一、安藤弘、長澤明道、高橋博、矢

- 野範男、西村哲治、広瀬明彦、井上義之、橋爪直樹、猪又明子、中江大：ラットにおいて多層カーボンナノチューブの経気管噴霧反復投与が及ぼす影響、第30回日本毒性病理学会年次学術集会（2014.1、徳島）
- 21) 多田幸恵、矢野範男、高橋 博、湯澤勝廣、安藤弘、久保喜一、長澤明道、海鋒藤文、北條幹、猪又明子、小縣昭夫、中江大：N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)でイニシエートされたラットにおいて磁性ナノ粒子マグネタイトの気管内スプレー投与が及ぼす影響、第30回日本毒性病理学会年次学術集会（2014.1、徳島）
- 22) 中江大：様々な発がん要因と最近の知見、食品・ナノマテリアル・化学物質、浜松毒性試験フォーラム 2014（2014.2、浜松）
- 23) Watanabe M, Sato A, Okamoto D, Kurioka D, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y.: Synergistic effect of carboxyl-modified magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells in vitro No.784 AACR (2013.4, Washington DC)
- 24) Watanabe M, Endo Y, Kurioka D, Sato A, Iwasaki A, Okamoto D, Watanabe N.: Nanomedicine in prostate cancer therapy (Invited), in the Symposia entitled "Genomics & Proteomics-, 101st Indian Science Congress, Jammu, (2014.2, India)
- 25) 小坂俊仁、芳野純治、乾和郎、若林貴夫、小林隆、三好広尚、服部信幸、友松雄一郎、山本智支、成田賢生、鳥井淑敬、森智子、林繁和、白石泰三、山本隆行、渡邊昌俊：直腸型潰瘍性大腸炎と遺伝子多型との関連、第99回日本消化器病学会総会（2013.3、鹿児島）
- 26) 渡邊昌俊：組織切片共培養における前立腺癌細胞 DU145 と LNCaP の挙動、3-G5-2 第102回日本病理学会総会（2013.6、札幌）
- 27) 渡邊昌俊、竹村泰司：医工連携の華、ナノメディシン、第36回日本がん疫学・分子疫学研究会総会、シンポジウム（2013.6、岐阜）
- 28) 佐藤明子、堀恭樹、森田駿、菅原健太郎、讚良茂浩、新田見匡、竹澤俊明、渡邊昌俊：組織切片担体と前立腺がん細胞株 DU-145 との相互作用について、J-3035 第72回日本癌学会学術総会（2013.10、横浜）
- 29) 岡本大樹、古田奈緒、山口創、岩崎有由美、佐藤明子、河合一明、葛西宏、渡邊昌俊：前立腺癌細胞におけるカルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子とドセタキセルの併用効果、P-2296 第72回日本癌学会学術総会（2013.10、横浜）
- 30) 岩崎有由美、古田奈緒、山口創、岡本大樹、深井瑛美、佐藤明子、河合一明、葛西宏、石黒斉、上村博司、窪田吉信、渡邊昌俊：前立腺癌における磁性体ナノ粒子と各種化学療法の併用効果、E-1082 第72回日本癌学会学術総会（2013.10、横浜）
- 31) 諸橋彩香、佐藤明子、岩崎有由美、河井一明、葛西宏、石黒斉、古林直人、渡邊昌俊：P-1309 磁性体ナノ粒子が曝露したがん細胞における抗酸化酵素遺伝子および活性酸素種酸性の変化について、J-1309 第72回日本癌学会学術総会（2013.10、横浜）
- 32) 堀恭樹、森田駿、新田見匡、遠藤宣広、石黒斉、上村博司、窪田吉信、渡邊昌俊：脂肪細胞由来の液生因子の前立腺がん挙動への影響について、E-2100 第72回日本癌学会学術総会（2013.10、横浜）

- 33) 落合雅子、渡邊昌俊、中釜齊、筆宝義隆：新規 ACF を用いた異型性病変の検出と大腸がん早期病変の連続的評価、J-2095 第 72 回日本癌学会学術総会（2013.10、横浜）。
- 34) 讃良茂浩、菅原健太郎、堀恭樹、森田駿、栗岡大輔、新田見匡、高木陽光、渡邊昌俊：前立腺がんスフェロイドの抗癌剤抵抗性への plk2 遺伝子の関与について、E-3018 第 72 回日本癌学会学術総会（2013.10、横浜）
- 35) 古田奈緒、山口創、岩崎有由美、岡本大樹、深井瑛美、佐藤明子、河合一明、葛西宏、戸塚ゆ加里、渡邊昌俊：磁性体ナノ粒子は高濃度曝露で A549 細胞における抗酸化システムを阻害し、細胞毒性をもたらす、P-3040 第 72 回日本癌学会学術総会（2013.10、横浜）
- 36) 渡邊昌俊、中野洋、白石泰三：脂肪細胞由来液生因子の前立腺癌細胞 spheroid 形成への影響の基礎的解析、181 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会（2014.10、神戸）
- 37) 栗岡大輔、渡邊昌俊、横田淳、中釜齊、土屋直人：マイクロ RNA 標的遺伝子スクリーニングによる p53 変異がん細胞の増殖制御因子の同定、1P-0276 第 36 回日本分子生物学年会（2013.12、神戸）
- 38) 藤原優子、西田百代、渡邊昌俊、河野隆志、中釜齊、土屋直人：がん抑制的 miR-101 による p53 依存的チェックポイントの活性化機構、1P-0432 第 36 回日本分子生物学年会（2013.12、神戸）
- 39) 上大、木谷友、大多哲史、富田あさひ、渡邊昌俊、竹村泰司、五條理志：磁性ナノ粒子を用いた ex vivo gene therapy の開発、O-3-2 第 13 回日本再生医療学会総会（2014.3、京都）

3. その他

- 1) 伊佐間和郎：金属系材料の細胞毒性の評価、佐藤章弘企画編集「体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件」技術情報協会、pp.303-307（2013、東京）

F. 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
なし

Ⅱ. 分担研究年度終了報告

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 in vitro 評価系構築に向けた基礎研究

細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

研究分担者	河上 強志	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部	主任研究官
研究協力者	伊佐間 和郎	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部	室長
研究協力者	宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	室長
研究協力者	小森谷 薫	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	
研究協力者	加藤 玲子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	主任研究官

NiO ナノマテリアルについて、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製を試みた結果、二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液（例: 0.4 mg/mL の平均粒子径 154.8~373.1 nm）が調製できた。そして、それらを A549 細胞に曝露し細胞毒性試験を行った結果、二次粒子径サイズが大きくなるほど細胞毒性が強くなる（IC₅₀: 33.4~147.5 µg/mL）傾向を示した。これらの懸濁液曝露後の細胞について、細胞内の Ni 量を測定したところ、二次粒子径サイズが大きい NiO ナノマテリアル懸濁液を曝露した細胞ほど、細胞内の Ni 量が多いことが明らかとなった。このため、二次粒子径サイズが大きいほど NiO ナノマテリアルの細胞内への取り込み量が多く、その結果、細胞毒性が強くなったと考えられた。

Milli-Q 水で調製した Al₂O₃、CeO₂、ITO、TiO₂、ZnO-Sigma および ZnO-Alfa 懸濁液（10 mg/mL）について、Tween80 添加および非添加時の等電点（Point of zero charge: PZC）を測定し、その分散状態に対する Tween80 添加の影響について検討した。その結果、Tween80 を添加することで、ZnO-Alfa を除き、各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の PZC 値は非添加時に比べて小さくなった。また、ZnO-Sigma を除き、Tween80 添加により、酸性から塩基性まで幅広い pH 範囲で、各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の平均粒子径サイズに変化は認められなかった。そのため、Tween80 には金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の pH 変化による凝集を抑制する効果があると考えられた。

A. 研究目的

一般的にナノマテリアルは一次粒径が 100 nm 未満と定義されており¹⁾、様々な種類のナノマテリアルが開発され、工業製品、化粧品、触媒、塗料など様々な製品に使用されるようになってきた。これら、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。我が国のナノマテリアル国

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の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、中国では2007年1月から2008年4月にかけて、塗料製造工場において不十分な防護での作業環境下で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リゼーションが不十分なために、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20~80 nm で細胞毒性が認められ、140 nm 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ている。

平成23昨年度は、10種類 (11試料) の金属酸化物ナノマテリアルについて、動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: 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。平成24年度は、9種類 (10試料) の金属酸化物ナノマテリアルについて、二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製を試み、Tween80 を分散剤として用いたり、遊星ボールミル型粉碎機の粉碎ボール径を変えた

りすることで、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の調製に成功した。

本年度は、一次粒子径サイズが同じ NiO ナノマテリアルについて、二次粒子径サイズの異なる懸濁液を調製し、二次粒子径サイズの違いが細胞毒性に与える影響を検討した。また、5 種類 (6 試料) の金属酸化物ナノマテリアル懸濁液について、Tween80 添加および非添加時の等電点 (Point of zero charge: PZC) 等を測定し、その分散状態に対する Tween80 添加の影響についても検討したので報告する。

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や性状を表 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 二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液の調製

平成 24 年度に開発した遊星ボールミル型湿式粉碎機を用いる方法を用いた。粉碎機は NP-100 (シンキー製) を用い、粉碎容器はジルコニア製であった。粉碎には、直径が 0.5、0.1 および 0.05 mm の三種類のジルコニアボールを用いた。始めに、金属酸化物ナノマテリアル試料 100 mg をジルコニア容器に量り採り、そこに Tween80 を 0.1% (w/v) 含む Milli-Q 水を 2.5 mL 加えた。次に、ジルコニアボールを 2.5 g 加えた後、MILL/MIX モードで公転速度 2000rpm の条件で 2 分間粉碎を行った。その後、Milli-Q 水を 7.5 mL 加えた後、

MILL/MIX モードで公転速度 400rpm の条件で 1 分間混合し、懸濁原液 (10 mg/mL) を作製した。この懸濁原液について、大塚電子社製の ELSZ-2 を用い、平均粒子径 (流体力学粒径) および粒径分布を動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS) にて測定した。その際、平均粒子径は 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。

B.3 二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液の細胞毒性

細胞毒性試験には A549 細胞 (ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞: JCRB 細胞バンク) を用いた。細胞は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、1% non-essential amino acid (NEAA) (GIBCO 製) を含む Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO 製) (以降: 10%FBS-MEM) にて、37°C、5%CO₂ インキュベーターで培養したものをを用いた。試験液には、NiO 懸濁原液を前述の液体培地で希釈したものをを用いた。

始めに、A549 細胞を 96-well プレートに播種 (5×10^3 cell/well) し、24 時間後に試験液を添加して 48 時間培養した。培地除去後、100 μ L の Phenol Red-free MEM 培地および 20 μ L の Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Reagent (MTS 試薬、Promega) を添加し、5%CO₂ インキュベーターで 37°C、1 時間反応させた。その後、生成したフォルマザンをマイクロプレートリーダー ($\lambda=490$ nm) で測定した。そして、培地のみで細胞を培養した well を対照として、細胞生存率を算出した。

細胞毒性試験とは別に、細胞内への NiO ナノマテリアルの取り込み量を測定するために、A549 細胞を 6-well プレートに播種