

1.4 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)

E. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

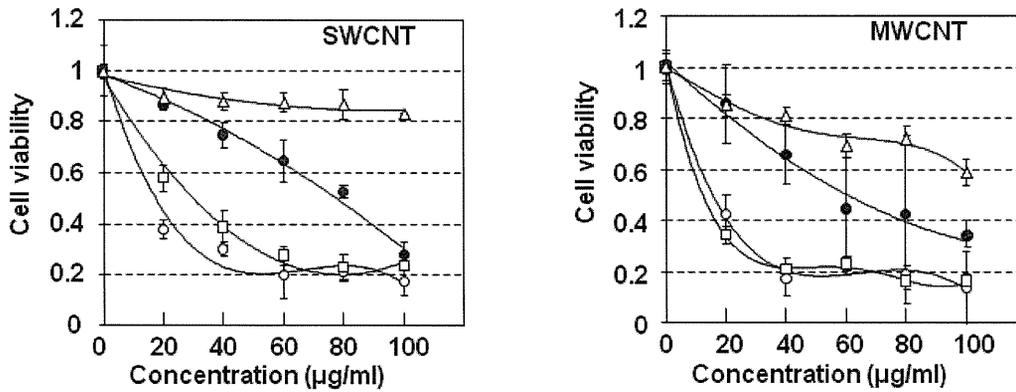


図1 前培養時間による SWCNT および MWCNT の細胞毒性の違い. A549 細胞を DMEM に 5000 cells/cm² の密度で播種し、4 時間 (○)、24 時間 (□)、48 時間 (●) および 72 時間 (△) 前培養した。これら前培養時間が異なる細胞に SWCNT および MWCNT を 20-100 µg/ml の濃度になるように添加し、さらに 24 時間培養後、細胞毒性を WST assay により求めた。

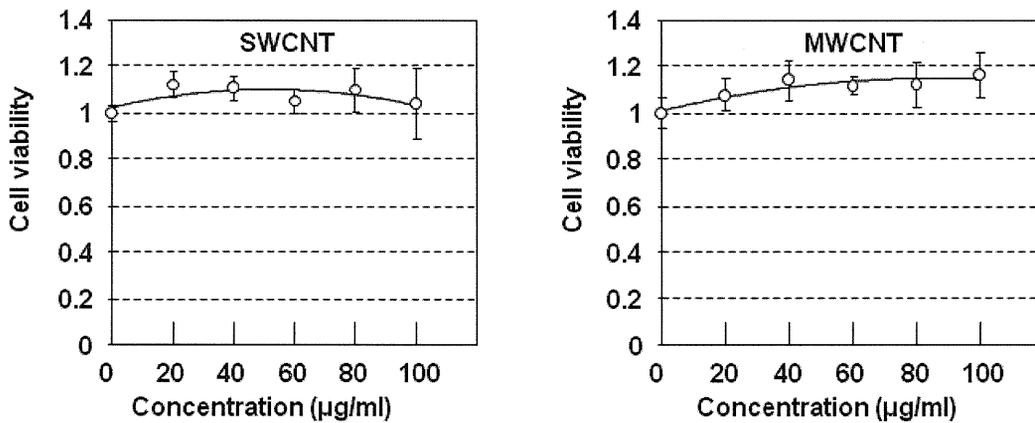


図2 SWCNT および MWCNT を様々濃度で DMEM に添加し、37°C で 24 時間インキュベーション後、遠心分離した。遠心分離で得られた上澄みを、A549 を 4 時間前培養した培地と交換し、さらに 24 培養後、WST assay により細胞毒性を求めた。

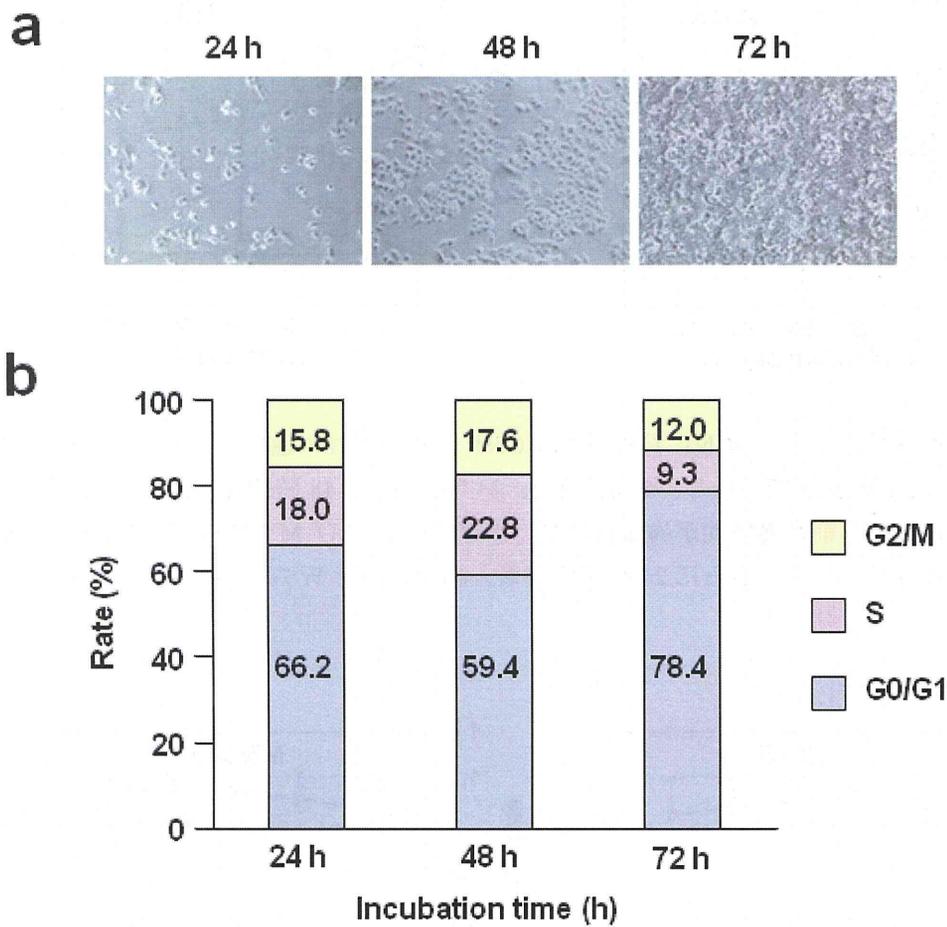


図3 前培養時間が細胞周期の分布に及ぼす影響。(a) A549細胞を5000 cells/cm²で播種し、24時間、48時間および72時間培養したときの細胞。(b) A549細胞を5000 cells/cm²で播種し、24時間、48時間および72時間培養したときの細胞周期の分布。

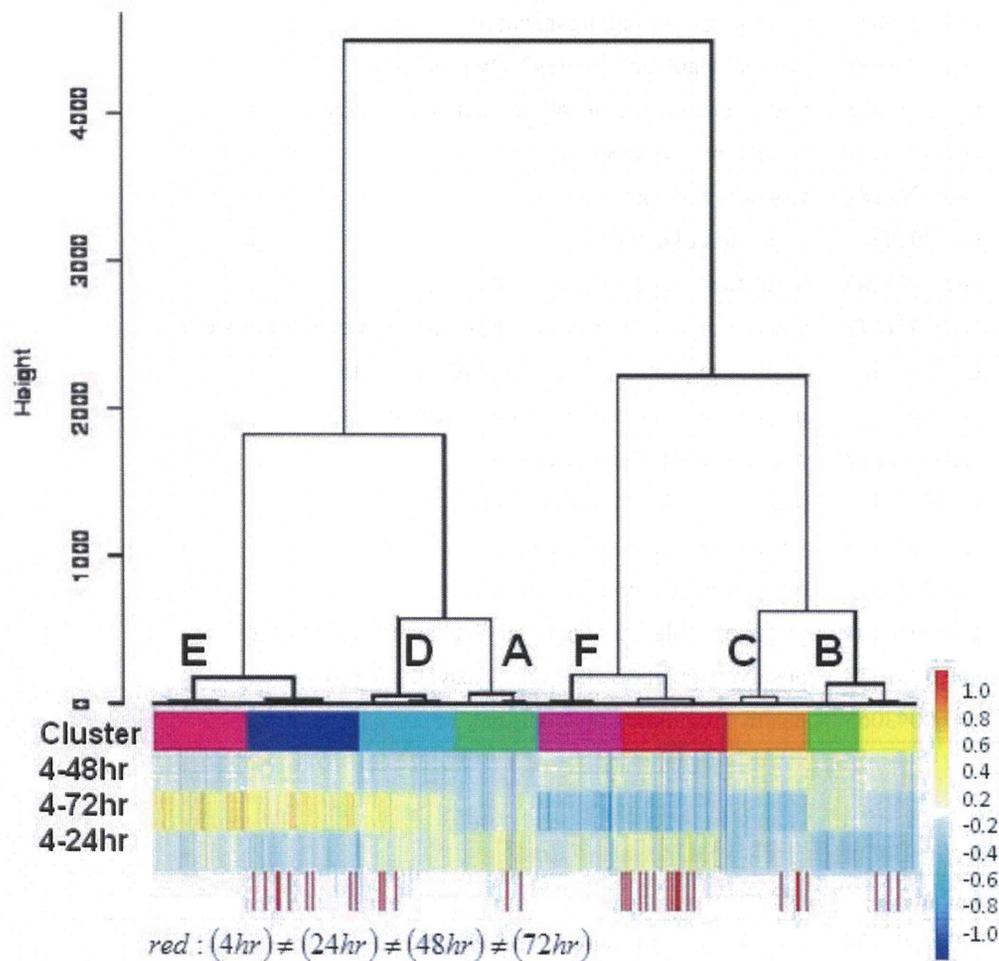


図 4 前培養時間の違いによって発現量が変動する遺伝子のクラスター解析。クラスターA: 前培養時間が 4 時間のときと比べて、24 時間で発現量が高く、48 時間と 72 時間で発現量が低い遺伝子群；クラスターB: 前培養時間が 4 時間のときと比べて、48 時間と 72 時間で発現量が高く、24 時間で発現量が低い遺伝子群；クラスターC: 前培養時間が 4 時間のときと比べて、48 時間でのみ発現量が高い遺伝子群；クラスターD: 前培養時間が 4 時間のときと比べて、48 時間でのみ発現量が低い遺伝子群；クラスターE: 前培養時間が 4 時間のときと比べて、72 時間でのみ発現量が高い遺伝子群；クラスターF: 前培養時間が 4 時間のときと比べて、72 時間でのみ発現量が低い遺伝子群。

表1 クラスタA の遺伝子群の GO term への分類

p-value	GO id	GO term
7.05E-08	GO:0016043	cellular component organization
1.36E-07	GO:0009893	positive regulation of metabolic process
1.68E-07	GO:0031325	positive regulation of cellular metabolic process
2.85E-07	GO:0044267	cellular protein metabolic process
4.96E-07	GO:0042981	regulation of apoptosis
5.62E-07	GO:0010941	regulation of cell death
6.33E-07	GO:0043067	regulation of programmed cell death
9.32E-07	GO:0051173	positive regulation of nitrogen compound metabolic process
1.07E-06	GO:0043068	positive regulation of programmed cell death
1.31E-06	GO:0051254	positive regulation of RNA metabolic process
1.54E-06	GO:0032880	regulation of protein localization
1.71E-06	GO:0009891	positive regulation of biosynthetic process
1.76E-06	GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-dependent
1.91E-06	GO:0010942	positive regulation of cell death
1.92E-06	GO:0010604	positive regulation of macromolecule metabolic process
2.14E-06	GO:0031328	positive regulation of cellular biosynthetic process
2.35E-06	GO:0043065	positive regulation of apoptosis

表2 クラスタB の遺伝子群の GO term への分類

p-value	GO id	GO term
1.36E-08	GO:0006354	transcription elongation, DNA-dependent
1.47E-07	GO:0006368	transcription elongation from RNA polymerase II promoter
2.59E-07	GO:0050434	positive regulation of viral transcription
7.34E-07	GO:0046782	regulation of viral transcription
2.32E-06	GO:0048524	positive regulation of viral reproduction

表 3 クラスターC の遺伝子群の GO term への分類

p-value	GO id	GO term
2.20E-17	GO:0007049	cell cycle
2.53E-17	GO:0000278	mitotic cell cycle
2.75E-15	GO:0022403	cell cycle phase
2.87E-14	GO:0022402	cell cycle process
3.75E-14	GO:0051325	interphase
1.15E-13	GO:0051329	interphase of mitotic cell cycle
4.78E-13	GO:0006139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process
7.28E-13	GO:0006996	organelle organization
5.37E-12	GO:0044248	cellular catabolic process
1.85E-11	GO:0016043	cellular component organization
4.89E-11	GO:0009150	purine ribonucleotide metabolic process
8.80E-11	GO:0009259	ribonucleotide metabolic process
8.99E-11	GO:0009056	catabolic process
1.00E-10	GO:0044419	interspecies interaction between organisms
5.00E-10	GO:0009154	purine ribonucleotide catabolic process
5.48E-10	GO:0009261	ribonucleotide catabolic process
6.94E-10	GO:0009205	purine ribonucleoside triphosphate metabolic process
7.24E-10	GO:0009199	ribonucleoside triphosphate metabolic process
8.61E-10	GO:0009144	purine nucleoside triphosphate metabolic process
1.10E-09	GO:0009203	ribonucleoside triphosphate catabolic process
1.10E-09	GO:0009207	purine ribonucleoside triphosphate catabolic process
1.14E-09	GO:0009146	purine nucleoside triphosphate catabolic process
1.31E-09	GO:0009143	nucleoside triphosphate catabolic process
1.32E-09	GO:0009141	nucleoside triphosphate metabolic process
1.32E-09	GO:0009166	nucleotide catabolic process
1.56E-09	GO:0006195	purine nucleotide catabolic process
1.57E-09	GO:0006163	purine nucleotide metabolic process
4.49E-09	GO:0034655	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid catabolic process
4.49E-09	GO:0034656	nucleobase, nucleoside and nucleotide catabolic process
1.01E-08	GO:0046700	heterocycle catabolic process
1.22E-08	GO:0044270	cellular nitrogen compound catabolic process
1.25E-08	GO:0046907	intracellular transport
1.83E-08	GO:0000086	G2/M transition of mitotic cell cycle
2.27E-08	GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process
2.27E-08	GO:0009117	nucleotide metabolic process
2.43E-08	GO:0044267	cellular protein metabolic process

3.29E-08	GO:0055086	nucleobase, nucleoside and nucleotide metabolic process
3.63E-08	GO:0044265	cellular macromolecule catabolic process
7.00E-08	GO:0032268	regulation of cellular protein metabolic process
7.16E-08	GO:0045184	establishment of protein localization
7.92E-08	GO:0009057	macromolecule catabolic process
1.02E-07	GO:0060255	regulation of macromolecule metabolic process
1.64E-07	GO:0051301	cell division
2.17E-07	GO:0015031	protein transport
2.33E-07	GO:0046483	heterocycle metabolic process
2.44E-07	GO:0033036	macromolecule localization
2.73E-07	GO:0044282	small molecule catabolic process
2.77E-07	GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle
3.97E-07	GO:0051246	regulation of protein metabolic process
4.91E-07	GO:0051649	establishment of localization in cell
5.91E-07	GO:0051641	cellular localization
6.27E-07	GO:0000280	nuclear division
6.27E-07	GO:0007067	mitosis
7.39E-07	GO:0051726	regulation of cell cycle
8.85E-07	GO:0044257	cellular protein catabolic process
8.87E-07	GO:0000279	M phase
9.10E-07	GO:0006886	intracellular protein transport
9.47E-07	GO:0008104	protein localization
1.28E-06	GO:0033554	cellular response to stress
1.45E-06	GO:0048285	organelle fission
1.88E-06	GO:0051603	proteolysis involved in cellular protein catabolic process
2.04E-06	GO:0006511	ubiquitin-dependent protein catabolic process

表 4 クラスタ D の遺伝子群の GO term への分類

p-value	GO id	GO term
7.56E-14	GO:0019080	viral genome expression
7.56E-14	GO:0019083	viral transcription
2.61E-12	GO:0043624	cellular protein complex disassembly
2.84E-12	GO:0006415	translational termination
3.15E-12	GO:0043241	protein complex disassembly
3.19E-12	GO:0034623	cellular macromolecular complex disassembly
3.79E-12	GO:0032984	macromolecular complex disassembly
1.66E-11	GO:0031018	endocrine pancreas development
2.24E-11	GO:0019058	viral infectious cycle
1.33E-10	GO:0031016	pancreas development
3.69E-10	GO:0006414	translational elongation
7.44E-10	GO:0022415	viral reproductive process
1.10E-09	GO:0022411	cellular component disassembly
2.13E-08	GO:0016043	cellular component organization
8.24E-08	GO:0035270	endocrine system development
1.10E-07	GO:0034621	cellular macromolecular complex subunit organization
1.44E-07	GO:0043933	macromolecular complex subunit organization
4.77E-07	GO:0016032	viral reproduction
9.43E-07	GO:0048610	cellular process involved in reproduction
1.15E-06	GO:0010605	negative regulation of macromolecule metabolic process
1.31E-06	GO:0009058	biosynthetic process
1.33E-06	GO:0044249	cellular biosynthetic process
1.51E-06	GO:0051179	localization
1.63E-06	GO:0032774	RNA biosynthetic process
1.76E-06	GO:0071822	protein complex subunit organization
2.21E-06	GO:0006412	translation
2.27E-06	GO:0048523	negative regulation of cellular process

表 5 クラスターE の遺伝子群の GO term への分類

p-value	GO id	GO term
6.51E-11	GO:0016043	cellular component organization
6.71E-11	GO:0034623	cellular macromolecular complex disassembly
7.84E-11	GO:0032984	macromolecular complex disassembly
8.06E-11	GO:0006415	translational termination
4.37E-10	GO:0043624	cellular protein complex disassembly
5.12E-10	GO:0043241	protein complex disassembly
1.23E-09	GO:0019080	viral genome expression
1.23E-09	GO:0019083	viral transcription
2.21E-09	GO:0022411	cellular component disassembly
5.52E-09	GO:0006414	translational elongation
4.44E-08	GO:0044267	cellular protein metabolic process
2.38E-07	GO:0019058	viral infectious cycle
2.57E-07	GO:0031018	endocrine pancreas development
4.39E-07	GO:0043933	macromolecular complex subunit organization
6.96E-07	GO:0022415	viral reproductive process
8.15E-07	GO:0048519	negative regulation of biological process
8.33E-07	GO:0031016	pancreas development
1.01E-06	GO:0048523	negative regulation of cellular process
1.03E-06	GO:0007169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway
1.73E-06	GO:0034621	cellular macromolecular complex subunit organization
2.32E-06	GO:0035270	endocrine system development

表 6 クラスターF の遺伝子群の GO term への分類

p-value	GO id	GO term
2.55E-16	GO:0007049	cell cycle
5.42E-16	GO:0006396	RNA processing
1.43E-15	GO:0022403	cell cycle phase
1.80E-15	GO:0022402	cell cycle process
9.63E-15	GO:0000278	mitotic cell cycle
6.09E-14	GO:0016071	mRNA metabolic process
4.53E-12	GO:0051301	cell division
1.84E-11	GO:0000279	M phase
7.07E-11	GO:0008380	RNA splicing
9.24E-11	GO:0006397	mRNA processing
1.20E-10	GO:0051726	regulation of cell cycle
5.48E-10	GO:0000280	nuclear division
5.48E-10	GO:0007067	mitosis
9.38E-10	GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle
1.70E-09	GO:0048285	organelle fission
1.92E-09	GO:0000375	RNA splicing, via transesterification reactions
5.13E-09	GO:0000377	RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nucleophile
5.13E-09	GO:0000398	nuclear mRNA splicing, via spliceosome
8.80E-09	GO:0006996	organelle organization
9.03E-09	GO:0016043	cellular component organization
1.12E-08	GO:0044248	cellular catabolic process
1.50E-08	GO:0006974	response to DNA damage stimulus
1.92E-08	GO:0000236	mitotic prometaphase
2.59E-08	GO:0010564	regulation of cell cycle process
3.17E-08	GO:0034622	cellular macromolecular complex assembly
3.31E-08	GO:0016070	RNA metabolic process
3.94E-08	GO:0043933	macromolecular complex subunit organization
5.09E-08	GO:0000075	cell cycle checkpoint
5.20E-08	GO:0044085	cellular component biogenesis
8.92E-08	GO:0006259	DNA metabolic process
9.61E-08	GO:0009057	macromolecule catabolic process
1.08E-07	GO:0044265	cellular macromolecule catabolic process
1.72E-07	GO:0000082	G1/S transition of mitotic cell cycle
1.98E-07	GO:0008104	protein localization
2.18E-07	GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis
3.55E-07	GO:0009056	catabolic process

3.58E-07	GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly
3.59E-07	GO:0031145	anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process
3.64E-07	GO:0051329	interphase of mitotic cell cycle
4.86E-07	GO:0051325	interphase
4.91E-07	GO:0034660	ncRNA metabolic process
5.14E-07	GO:0051340	regulation of ligase activity
6.89E-07	GO:0010467	gene expression
7.25E-07	GO:0007346	regulation of mitotic cell cycle
1.01E-06	GO:0010941	regulation of cell death
1.01E-06	GO:0034470	ncRNA processing
1.08E-06	GO:0034621	cellular macromolecular complex subunit organization
1.12E-06	GO:0043067	regulation of programmed cell death
1.56E-06	GO:0000077	DNA damage checkpoint
1.70E-06	GO:0022607	cellular component assembly
1.81E-06	GO:0042981	regulation of apoptosis
1.81E-06	GO:0051438	regulation of ubiquitin-protein ligase activity
2.03E-06	GO:0006753	nucleoside phosphate metabolic process
2.03E-06	GO:0009117	nucleotide metabolic process
2.09E-06	GO:0033036	macromolecule localization
2.27E-06	GO:0007093	mitotic cell cycle checkpoint

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

ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価

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

ナノマテリアルは産業界において様々な用途に使用されているものの、ナノマテリアルの安全性はまだ十分には解明されていない。近年、ナノマテリアル単独の毒性は徐々に明らかになりつつあるが、ナノマテリアルと他の化学物質との相互作用は不明である。また、ナノマテリアルは化学組成が同じでも、物理化学的性質が異なることによって生体影響が変化する可能性がある。そのため、同一のナノマテリアルを用いても、試験条件によって結果が異なることが予測される。したがって、ナノマテリアルの生体影響を評価するための試験では、ナノマテリアルの物理化学的性質を正確に把握する必要がある。そこで今年度は、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（ AlCl_3 、 CuCl 、 CuCl_2 及び ZnCl_2 ）の共存に伴う SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 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、 SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 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 CuCl_2 の吸着挙動を解析した。その結果、 SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 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、 SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 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。しかし、 TiO_2 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、 SiO_2 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 SiO_2 ナノ粒子及び TiO_2 ナノ粒子のどちらにも CuCl_2 が結合し、それらの結合量に差は認められなかった。このように、 SiO_2 ナノ粒子において金属塩化物の共存に伴うゼータ電位の特異な変化が認められたが、金属塩化物の細胞毒性及び細胞内取り込み量に及ぼすナノ粒子の影響との間に関連は見出せなかった。

A. 研究目的

ナノマテリアルは産業界において様々な用途に使用されているばかりか、一般消費者向け製品にも幅広く使用されている。しかしながら、これまでにナノマテリアルの *in vivo* 及び *in vitro* 毒性試験が実施されているものの、ナノマテリアルの安全性はま

だ十分には解明されていないのが現状である。

近年、一部のナノマテリアルについて、化学組成、粒子サイズ、物性等に依存した生体影響が確認され、ナノマテリアル単独の毒性は徐々に明らかになりつつある¹。しかしながら、ナノマテリアルと他の化学

物質との相互作用による生体影響は不明である。そこで、本研究では共存する金属塩化物の細胞毒性に及ぼすナノマテリアルの影響を調査する。

昨年度までに、ナノ粒子共存下における金属塩化物の細胞毒性及び細胞内取り込み量を評価した^{2,4}。その結果、SiO₂ ナノ粒子が共存すると、AlCl₃、CuCl 及び CuCl₂ の細胞毒性強度は増強した。一方、TiO₂ ナノ粒子が共存しても、AlCl₃、CrCl₃、CuCl、CuCl₂、FeCl₂、FeCl₃、NiCl₂ 及び ZnCl₂ の細胞毒性強度は変化しなかった。また、SiO₂ ナノ粒子共存下で CuCl 及び CuCl₂ を曝露すると、V79 細胞内への銅の取り込み量は増加した。一方、TiO₂ ナノ粒子共存下で CuCl、CuCl₂ 及び ZnCl₂ を曝露しても、細胞内への銅及び亜鉛の取り込み量は変化しなかった。これらのことから、SiO₂ ナノ粒子は、共存する一部の金属塩化物の細胞内取り込み量を増加させることによって、細胞毒性を増強させることが明らかになった^{2,4}。

ナノマテリアルは化学組成が同じでも、一次粒子及び二次粒子のサイズやその分布、結晶構造、形態、比表面積、表面電荷、溶解度、分散性、凝集状態などの物理化学的性質が異なることによって生体影響が変化する可能性が指摘されている¹。そのため、同一のナノマテリアルを安全性試験に用いても、曝露条件によって試験の結果が異なることが容易に予測できる。したがって、ナノマテリアルの生体影響を評価するための試験では、ナノマテリアルの物理化学的性質を正確に把握することが必須である⁵。そこで今年度は、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、昨年度までの検討において、ナノ粒子共存下で細胞毒性が増強した金属塩化物及び細胞毒性が変化しなかった金属塩化物について、共存に伴

う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、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 法によりナノ粒子に対する金属塩化物の吸着挙動を解析した。

B. 研究方法

1. 試料

二酸化ケイ素 (SiO₂) ナノ粒子 (一次平均粒子径 25 nm) 及び二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子 (一次平均粒子径 36 nm) の 10% 水懸濁液を CIK ナノテック株式会社から入手した。なお、これらのナノ粒子水懸濁液は、分散剤その他の添加物等を含まない。

金属塩化物として、昨年度までの検討において SiO₂ ナノ粒子共存下で細胞毒性が増強した、塩化アルミニウム (AlCl₃)、塩化銅 (I) (CuCl) 及び塩化銅 (II) (CuCl₂) (いずれも和光純薬工業株式会社) を用いた。さらに、SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子共存下で細胞毒性が変化しなかった塩化亜鉛 (ZnCl₂) (和光純薬工業株式会社) を用いた。

2. 粒子径

金属塩化物共存下及び非共存下におけるナノ粒子の流体力学的粒子径は、ゼータ電位・粒径測定システム ELSZ-2 (大塚電子株式会社) を用いて、動的光散乱法により測定した。昨年度までの検討結果を考慮して、測定時のナノ粒子及び金属塩化物の濃度は、それぞれ 100 µg/mL 及び 1 mmol/L とした。なお、測定には粒子径セルユニットを使用し、積算回数 100 回及び測定温度 25°C の条件で測定した。

2. ゼータ電位

金属塩化物共存下及び非共存下におけるナノ粒子のゼータ電位は、ゼータ電位・粒

径測定システム ELSZ-2 を用いて、電気泳動光散乱法（レーザードップラー法）により測定した。測定時のナノ粒子及び金属塩化物の濃度は、粒子径測定時と同様に、それぞれ 100 µg/mL 及び 1 mmol/L とした。なお、測定にはゼータ電位微量ディスプレイユニットを使用し、サンプリング時間 400 µsec、積算回数 10 回及び測定温度 25°C の条件で測定した。

3. 吸着挙動

QCM センサー用の金電極付き水晶板（株式会社イニシウム）にナノ粒子を固定化した。この水晶板を水晶分離型センサーセル（株式会社イニシウム）に設置し、電極表面にナノ粒子を固定化した QCM センサーを作製した。なお、固定化前後の水晶振動子の振動数変化から算出した SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子の有効固定化量は、52～55 µg/cm² であった。

作製したナノ粒子固定化 QCM センサーセルを分子間相互作用解析装置 AFFINIX QNµ（株式会社イニシウム）に設置した。センサーセルに超純水 490 µL を加え、セル温度及び攪拌速度をそれぞれ 25°C 及び 300 rpm に設定した。QCM センサーが安定した後、500 mmol/L の CuCl₂ 水溶液を 10 µL ずつ添加し、水晶振動子の共振振動数を 1 sec ごとに測定した。

データ解析ソフトウェア AQUA Version 2.0（株式会社イニシウム）を用いて、CuCl₂ 水溶液の逐次添加時における濃度（[Guest]）と振動数変化量（ΔF）との関係をプロットし、Langmuir の等温吸着式（1）に従って非線形回帰計算による曲線フィッティングを行い、解離定数（K_d）を算出した⁶。

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{\max} \cdot [\text{Guest}]}{K_d + [\text{Guest}]} \quad \text{----- (1)}$$

さらに、関係式（2）により結合定数（K_a）を算出した⁶。

$$K_a = \frac{1}{K_d} \quad \text{----- (2)}$$

4. 統計学的検定

ナノ粒子の粒子径及びゼータ電位について、一元配置分散分析及び金属塩化物非共存群を対照群とした Dunnett の多重比較を行った。いずれの検定においても有意水準は危険率 5% 未満とした。

C. 研究結果及び考察

1. 粒子径

金属塩化物共存下及び非共存下における SiO₂ ナノ粒子の粒子径散乱強度分布及び粒子径個数分布をそれぞれ図 1 及び図 2 に示した。散乱強度分布及び個数分布ともに 100 nm 前後に分布のピークが認められ、どちらも金属塩化物の共存に伴う顕著な分布の差は認められなかった（図 1 及び図 2）。Cumulant 法により金属塩化物共存下及び非共存下における SiO₂ ナノ粒子の平均粒子径を算出したが、金属塩化物共存群と非共存群との間に有意な差は認められなかった（表 1）。

金属塩化物共存下及び非共存下における TiO₂ ナノ粒子の粒子径散乱強度分布及び粒子径個数分布をそれぞれ図 3 及び図 4 に示した。散乱強度分布及び個数分布ともに 10～100 nm の間に分布のピークが認められ、どちらも ZnCl₂ の共存に伴って粒子径が大きくなる方向に分布がシフトする傾向が認められた（図 3 及び図 4）。しかし、Cumulant 法により金属塩化物共存下及び非共存下における TiO₂ ナノ粒子の平均粒子径を算出したが、金属塩化物共存群と非共存群との間に有意な差は認められなかつ

た (表 1)。

平成 23 年度は細胞培養用の培地中で金属塩化物と共存するナノ粒子の粒子径を測定したが²、純水中においても 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 (表 1)。したがって、1 mmol/L 程度の金属塩化物の共存は、ナノ粒子の粒子径に影響しないと考えられる。

2. ゼータ電位

金属塩化物共存下及び非共存下における SiO₂ ナノ粒子のゼータ電位の分布を図 5 に示した。金属塩化物非共存下では -40 mV 付近にピークが認められたが、金属塩化物共存下ではいずれの金属塩化物でも 5 mV 付近にピークが認められ、金属塩化物の共存に伴う顕著な分布の差が認められた (図 5)。さらに、いずれの金属塩化物においても、金属塩化物共存群と非共存群との間に SiO₂ ナノ粒子のゼータ電位に有意な差が認められた (表 2)。

金属塩化物共存下及び非共存下における TiO₂ ナノ粒子のゼータ電位の分布を図 6 に示した。金属塩化物共存下及び非共存下ともに 30 mV 付近にピークが認められ、金属塩化物の共存に伴う顕著な分布の差は認められなかった (図 6)。しかし、いずれの金属塩化物においても、金属塩化物共存群と非共存群との間に TiO₂ ナノ粒子のゼータ電位に有意な差が認められた (表 2)。

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。それらのゼータ電位の変化量は、TiO₂ ナノ粒子では -8.05 ~ 4.49 mV であったのに対して、SiO₂ ナノ粒子では 41.75 ~ 46.23 mV と大きかった。さらに、TiO₂ ナノ粒子では共存前後とも正の値 (25.70 ~ 38.24 mV) であったのに対して、SiO₂ ナノ粒子では共存前の負の値 (-38.08

mV) から共存に伴って正の値 (3.67 ~ 8.15 mV) に反転していた (表 2)。このように SiO₂ ナノ粒子は、金属塩化物との共存によってゼータ電位が負から正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と考えられる (表 1)。

3. 吸着挙動

SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子を固定化した QCM センサーセルに CuCl₂ 水溶液を添加した際の QCM センサーグラムを図 7 に示した。SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらも添加直後から QCM センサーの振動数が減少し、CuCl₂ がどちらのナノ粒子にも結合することが確認され、SiO₂ ナノ粒子と TiO₂ ナノ粒子との間に CuCl₂ の結合量に顕著な差は認められなかった (図 7)。

SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のどちらも、CuCl₂ の濃度と振動数変化量との関係は、関係式 (1) とよくフィッティングした (図 8)。これらの曲線から算出した SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子に結合する CuCl₂ の解離定数 (K_d) 及び結合定数 (K_a) を表 3 に示した。TiO₂ ナノ粒子への結合と比べて、SiO₂ ナノ粒子への結合の方が解離定数 (K_d) は小さく、結合定数 (K_a) は大きかった (表 3)。

ゼータ電位の異なる SiO₂ ナノ粒子と TiO₂ ナノ粒子との間で CuCl₂ の結合量に差がなかったのは、粒子径及びゼータ電位の測定時に比べて、CuCl₂ の濃度が高かったことが影響していた可能性が考えられる。何れにせよナノ粒子は水中で金属塩化物 (正確には、金属イオンと塩化物イオン) を結合することが確認された。

D. 結論

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、金属塩化物の共存に伴う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、ナノ粒子を固定化した QCM センサーを製作し、QCM 法によりナノ粒子に対する金属塩化物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。このように、SiO₂ ナノ粒子において金属塩化物の共存に伴うゼータ電位の特異な変化が認められたが、金属塩化物の細胞毒性及び細胞内取り込み量に及ぼすナノ粒子の影響^{2,3}との間に関連は見出せなかった。

謝辞 本研究に用いた SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子の水懸濁液をご提供いただきました CIK ナノテック株式会社に深謝いたします。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Rumi Sawada, Ken Kono, Kazuo Isama, Yuji Haishima, Atsuko Matsuoka: 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)
- 2) Yuji Haishima, Kazuo Isama, Chie Fukui, Toshiyasu Yuba, Atsuko Matsuoka: 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)
- 3) 河上強志、伊佐間和郎、五十嵐良明：EU 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、国立医薬品食品衛生研究所報告、131、66-74 (2013)
- 4) 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-ジブロモプロピル) ホスフェイト分析法の改定に向けた検討、*薬学雑誌*、134(2)、259-268 (2014)
- 5) 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)、印刷中 (2014)

- 6) Yuji Haishima, Tsuyoshi Kawakami, Chie Hasegawa, Akito Tanoue, Toshiyasu Yuba, Kazuo Isama, Atsuko Matsuoka, Shingo Niimi: 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.
- 7) Yuji Haishima, Chie Hasegawa, Yusuke Nomura, Tsuyoshi Kawakami, Toshiyasu Yuba, Tomoko Shindo, Keisuke Sakaguchi, Takahiro Tanigawa, Kaori Inukai, Mika Takenouchi, Kazuo Isama, Atsuko Matsuoka, Shingo Niimi: Development and performance evaluation of a positive reference material for hemolysis testing, Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials, in press.
2. 学会発表
- 1) Midori Yoshida, Kaoru Inoue, Kazuo Isama, Tsuyoshi Kawakami, Yukio Kadama, Atsuko Matsuoka: Comparison of Lung Lesions in Rat Treated with Nano-suspensions of Silica, Silver and Zinc oxide, 32nd Annual Symposium on the Society of Toxicologic Pathology (2013.6, Portland)
- 2) 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、千葉市）
- 3) Kazuo Isama, Tsuyoshi Kawakami, Atsuko Miyajima, Atsuko Matsuoka: Effect of SiO₂ and TiO₂ nanoparticles on the cytotoxicity of metal chlorides, International Conference on Materials for Advanced Technologies (2013.7, Singapore)
- 4) 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、富山市）
- 5) 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 年会（2014.3、熊本市）
- 6) 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に対する A549 細胞の細胞毒性および遺伝毒性、日本薬学会第 134 年会（2014.3、熊本市）
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、東京、pp.303-307（2013）
- F. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

参考文献

- 1) Dhawan A., Sharma V.: Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 589-605 (2010)
- 2) 伊佐間和郎、河上強志：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、平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（H23-化学-一般-006）分担研究報告書（2012）
- 3) 伊佐間和郎、河上強志：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、平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（H23-化学-一般-006）分担研究報告書（2013）
- 4) 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)、印刷中（2014）
- 5) Boverhof D.R., David R.M.: Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 953-961 (2010)
- 6) 岡畑恵雄：バイオセンシングのための水晶発振子マイクロバランス法—原理から応用例まで、講談社（2013）

表 1 金属塩化物共存下における SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子の平均粒子径 (nm)

Nanoparticles	w/o metal chlorides	w/ AlCl ₃	w/ CuCl	w/ CuCl ₂	w/ ZnCl ₂
SiO ₂	133.9±0.6	127.9±3.2	164.4±27.9	130.9±2.5	131.4±0.9
TiO ₂	45.7±2.1	55.9±18.6	56.2±6.2	46.5±2.7	67.7±6.7

表 2 金属塩化物共存下における SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子のゼータ電位 (mV)

Nanoparticles	w/o metal chlorides	w/ AlCl ₃	w/ CuCl	w/ CuCl ₂	w/ ZnCl ₂
SiO ₂	-38.08±2.42	3.83±0.69**	3.67±0.74**	8.15±0.81**	6.37±0.66**
TiO ₂	33.75±0.20	38.24±2.22*	25.70±0.84**	29.32±2.21*	26.37±0.11**

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

表 3 SiO₂ ナノ粒子及び TiO₂ ナノ粒子に結合する CuCl₂ の平衡定数

Nanoparticles	K _d (M)	K _a (M ⁻¹)
SiO ₂	6.72E-03	1.49E+02
TiO ₂	7.52E-03	1.33E+02

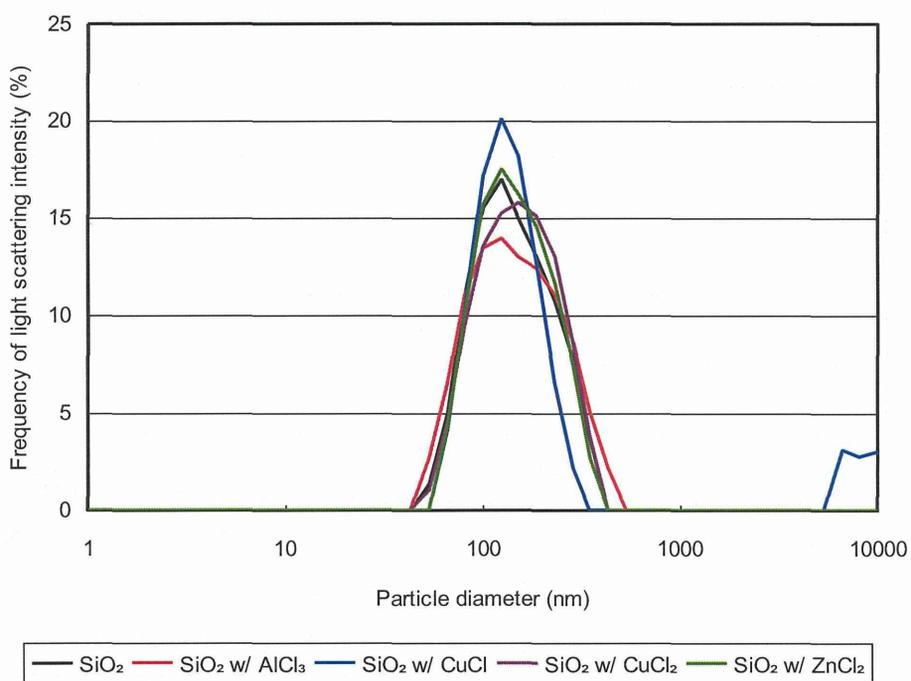


図 1 金属塩化物共存下における SiO₂ ナノ粒子の粒子径分布 (散乱強度分布)

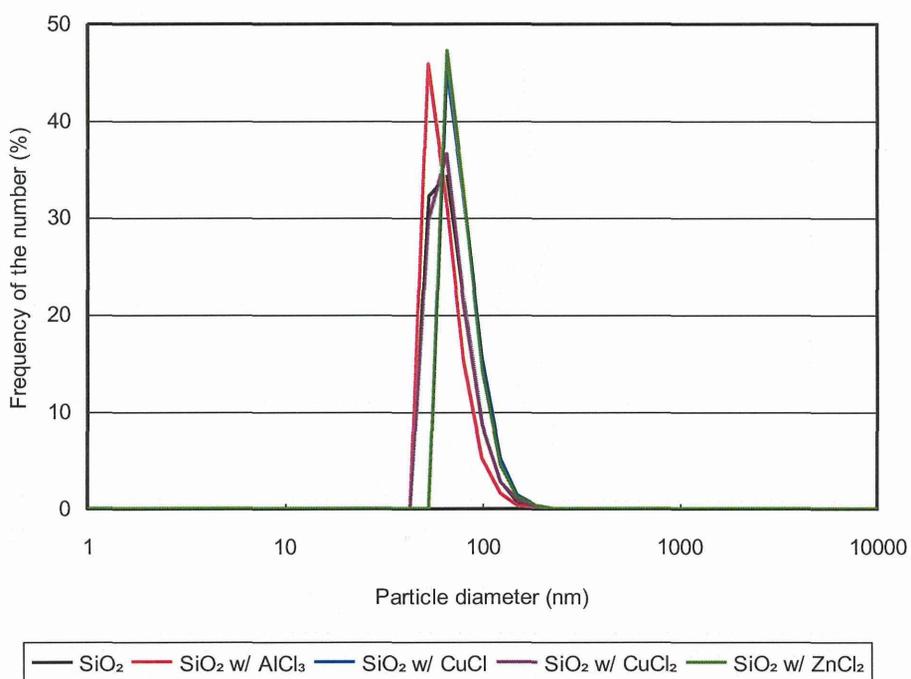


図 2 金属塩化物共存下における SiO₂ ナノ粒子の粒子径分布 (個数分布)