

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

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価  
およびリスク低減化に関する研究

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

我々はこれまで NiO ナノマテリアルについて、遊星ボールミル型湿式ナノ粉碎機を用いた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法を開発し、NiO ナノマテリアルの細胞毒性に対する二次粒子径サイズの影響評価を行ってきた。本研究ではその調製法を利用し、3 種類のナノマテリアル[NiO-Sigma（一次粒子径: <50 nm）、NiO-Alfa（同: 100 nm）および Ni-Alfa（同: 5-20 nm、表面が酸化皮膜で覆われ NiO として利用可能）]を用いて、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の作製を試みた。その結果、ミリ Q 水で調製された懸濁原液では、その濃度が 10 mg/mL の場合には NiO-Sigma では問題なかったが、NiO-Alfa および Ni-Alfa は調製後速やかに凝集した。一方、1 mg/mL では NiO-Sigma および Ni-Alfa で懸濁原液の調製が可能であった。また、粉碎に径の異なる 3 種類のジルコニウムボール（0.5 mm、0.1 mm および 0.05 mm）を用いることによって、各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原液が調製できた。そして、それらのうち 0.05 mm のジルコニアボールで調製した NiO-Sigma および Ni-Alfa 懸濁原液を 10%FBS-MEM で希釈した懸濁液（0.2 mg/mL）では、ナノマテリアルの二次粒子径サイズおよび粒径分布が同程度となり、本研究で目的としたナノマテリアルの一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。今後は、これらの懸濁液を用いた細胞毒性試験を実施し、一次粒子径サイズが NiO ナノマテリアルの細胞毒性に与える影響について検討していく予定である。

A. 研究目的

ナノマテリアルは一次粒径が 100 nm 未満と一般的に定義される<sup>1)</sup>。そして、これまでに種々のナノマテリアルが開発され、工業製品、塗料、化粧品、触媒など様々な分野の製品に使用されてきた。

一方で、ナノマテリアルまたはナノマテ

リアルを用いた製品の製造時に、作業員がナノマテリアルに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の発現が懸念されている<sup>2,3)</sup>。

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

リアルな安全性が研究され、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<sup>4)</sup>。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<sup>5)</sup>。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でなく断片的な試験結果の集積に留まっているとして、ナノマテリアルの *in vitro* 試験法の開発が必要とされている<sup>6)</sup>。このような背景から、欧州委員会 (European Commission) の共同研究センター (Joint Research Centre) ではコロニー形成試験法によるナノマテリアルの細胞毒性試験について多機関共同試験による評価が実施されており、ナノマテリアルの統一的な毒性試験方法の検討が進んでいる<sup>7)</sup>。

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開発されており、ZnO、SiO<sub>2</sub> および TiO<sub>2</sub> 等は化粧品や塗料等に用いられている<sup>6)</sup>。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 SiO<sub>2</sub> ナノ粒子による細胞毒性試験を行い、一次粒子径の違いが細胞毒性に影響を及ぼすことを明らかにしている<sup>8)</sup>。また、*in vivo* 試験では、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる TiO<sub>2</sub> ナノ粒子によるラット気管内投与試験で、二次粒子径サイズが異なっても炎症反応に差異は認められないことが報告されている<sup>9)</sup>。

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、毒性試験にはその物性情報として、状態 (粒子径・粒径分布・凝集

体・形状)、材料 (化学組成・結晶性・表面組成・純度)、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、安定性、培地の影響および適切な用量計測での評価が求められている<sup>5)</sup>。

我々はこれまでに、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の解明を目的として、培養細胞試験系に用いる金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の調製方法の検討とその物性解析を行ってきた<sup>10)</sup>。そして、NiO ナノマテリアルについて、遊星ボールミル型粉砕機の粉砕ボール径を変えることで、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製法を開発した。さらに、それらの懸濁液について A549 細胞 (ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞) を用いた細胞毒性試験を実施し、二次粒子径サイズが大きいほど細胞毒性が強くなることや、その要因が NiO ナノマテリアルの細胞内への取り込み量に起因する可能性を明らかにしてきた。

一方で、前述のように金属酸化物ナノマテリアルの細胞毒性に一次粒子径サイズが影響していることが報告されている<sup>8)</sup>。そこで、本研究では NiO ナノマテリアルの A549 細胞に対する細胞毒性について、一次粒子径サイズの影響を評価することを目的とした。本年度は、一次粒子径が異なり二次粒子径サイズが同程度の NiO ナノマテリアル懸濁液の作製を検討した。

## B. 研究方法

### B.1 ナノマテリアル

試験には Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル (NiO-Sigma) 並びに Alfa Aesar 製の NiO およびニッケルナノマテリアル (NiO-Alfa および Ni-Alfa) を用いた。それらの性状等を表 1 に示した。Ni-Alfa については、業者のデータシートによれば、

表面から深さ 0.5 ~ 1.0 nm まで酸化被膜に覆われているとされており、NiO と同等に扱えるものと考えた。これらのナノマテリアルの一次粒子径は、NiO-Sigma (<50 nm)、NiO-Alfa (100 nm) および Ni-Alfa (5-20 nm) であった。

## B.2 ナノマテリアル懸濁液の調製

これまでに我々が開発した、遊星ボールミル型湿式ナノ粉碎機を用いた方法に従い懸濁液の調製を行った。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 10 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 2000 rpm 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 400 rpm の条件で 1 分間混合し、懸濁原液 (1 mg/mL) を作製した。また、その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、培地懸濁液を作製した。

これらの懸濁液について、大塚電子社製の ELSZ-2 を用い、ナノマテリアルの平均粒子径 (流体力学粒径) および粒径分布を動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS) で、Zeta 電位は電気泳動光散乱法 (レーザードップラー法) 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。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。

## B.3 各ナノマテリアル表面状態の確認

用いたナノマテリアルについて、NiO-Sigma および NiO-Alfa では外観 (色調) が異なっていること、Ni-Alfa については表面酸化被膜を確認する必要があることから、これらのナノマテリアルについてその表面状態を X 線光電子分光法 (XPS) にて分析した。分析には島津製作所製 ESCA-3200 を用いた。

## C. 結果および考察

### C.1 ナノマテリアルの表面状態

試験に用いた 3 種類のナノマテリアルの XPS 分析結果を図 1 に示した。どの試料についてもニッケルおよび酸素のピークが認められた。また、そのスペクトルも全て類似していたことから、Ni-Alfa を含め今回使用したナノマテリアルの表面はいずれも酸化ニッケルであることが確認できた。

### C.2 各ナノマテリアル懸濁原液中の二次粒子径の平均粒子径および粒径分布

各ナノマテリアル懸濁原液の作製にあたって、これまで試験してきた NiO-Sigma と同様に NiO-Alfa および Ni-Alfa について、10 mg/mL での調製を試みた。その結果、どちらのナノマテリアル懸濁液も調製後、速やかに凝集し試験に供試できなかった。そこで、ナノマテリアル濃度を変えて検討した結果、Ni-Alfa については 1 mg/mL で懸濁液の調製が可能であった。一方、NiO-Alfa については、0.1 mg/mL でかつ用いるジルコニウムボールが 0.5 mm の条件でのみ、分散状態を維持した懸濁液の調製が可能であった (データ未掲載)。NiO-Sigma および Ni-Alfa について、1 mg/mL で調製した懸濁原液中ナノマテリアル粒子

の平均粒子径を表 1 に、粒径分布を図 2 にそれぞれ示した。

NiO-Sigma および Ni-Alfa は、どちらについてもこれまでの研究と同様に、粉碎に用いるジルコニウムボール径が小さくなるほど、懸濁液中ナノマテリアルの二次粒子の平均粒子径が小さくなる傾向が認められた。また、粒径分布についてもジルコニウムボール径が小さくなるほど、散乱強度分布および個数分布共にピークが粒径の小さい側に分布していた。このように、NiO-Sigma だけでなく Ni-Alfa についてもナノマテリアルの二次粒子径サイズが異なる懸濁液の作製できた。また、NiO-Sigma については、これまで 10 mg/mL で調製した懸濁原液に比べると、どのジルコニウムボール径を用いたときも、1 mg/mL で調製した懸濁液中のナノマテリアル粒子の方が平均粒子径は若干大きくなる傾向が認められた。

なお、今回調製した 1 mg/mL の懸濁原液については、分散状態はやや不安定であり、数時間から 1 日後には凝集・沈降が認められている。そのため、細胞毒性試験等に用いる際には、調製後速やかに培地で希釈する必要があると思われる。

### C.3 各ナノマテリアル 10%FBS-MEM 懸濁液中の二次粒子径の平均粒子径および粒径分布

NiO-Sigma および Ni-Alfa 懸濁原液 (1 mg/mL) について、10%FBS-MEM にて 0.2 mg/mL に希釈し、平均粒子径および粒径分布への影響を検討した (表 1 および図 3)。全ての懸濁液で懸濁原液よりもナノマテリアルの平均粒子径は大きくなり、10%FBS-MEM による凝集の影響が考えられた。ただし、その平均粒子径は懸濁原液と同様に粉碎に用いたジルコニウムボール径が小さくなるにつれて小さくなる傾向を

示した。一方、粒径分布では散乱強度分布で NiO-Sigma および Ni-Alfa とともにピークが一部重なる傾向が認められた。また、個数分布でも Ni-Alfa では 0.1 mm と 0.5 mm でピークが重なっていた。

次に、10%FBS-MEM で希釈して調製した懸濁液を 37 で一日静置した後のナノマテリアルの平均粒子径および粒径分布を表 1 および図 4 に示した。懸濁液中ナノマテリアルの平均粒子径は NiO-Sigma では 0.05 mm で若干小さくなり、その他は若干大きくなる傾向を示した。一方、NiO-Alfa では一日後のほうが全て平均粒子径は小さくなり、その変化も NiO-Sigma よりも大きかった。ただし、その平均粒子径は粉碎に用いたジルコニウムボール径に応じた傾向を維持していた。また、粒径分布では Ni-Alfa の個数分布で調製直後と同様に 0.1 mm と 0.5 mm でピークが重なっていた。

本研究では、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の調製を目的としている。そこで、平均粒子径が同程度のジルコニアボール径 0.05 mm で調製された、NiO-Sigma および Ni-Alfa の 10%FBS-MEM 懸濁液について、粒径分布を比較してみた (図 5)。その結果、散乱強度分布および個数分布共にほぼピークが一致しており、ナノマテリアルの一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。

### C.4 各ナノマテリアル懸濁液の Zeta 電位

NiO-Sigma および Ni-Alfa の懸濁原液および 10%FBS-MEM で調製した懸濁液中ナノマテリアルの Zeta 電位を表 1 および図 5 に示した。各懸濁原液中ナノマテリアルの Zeta 電位は正の値を示し、19.4 ~ 24.8 mV の範囲であった。一方、10%FBS-MEM 懸濁液では、全ての試料で負の値を示した。

この傾向は、これまでの研究でも認められており、懸濁液中のタンパク質が粒子に吸着した影響と考えられる<sup>11)</sup>。

#### D. まとめ

我々はこれまでに、NiO ナノマテリアルを用いて、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法を開発し、それを用いて NiO ナノマテリアルの細胞毒性に対する二次粒子径サイズの影響評価を行ってきた。本研究では、一次粒子径サイズの異なる 3 種類の NiO ナノマテリアル ( NiO-Sigma、NiO-Alfa および Ni-Alfa ) を用いて、二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の作製を試みた。その結果、一部の懸濁液ではナノマテリアルの一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズおよび粒径分布が同程度の懸濁液が調製できた。今後は、これらの懸濁液を用いた細胞毒性試験を実施し、一次粒子径サイズが NiO ナノマテリアルの細胞毒性に与える影響について検討していく予定である。

#### E. 謝辞

株式会社シンキーから湿式粉碎に用いた直径 0.05 mm のジルコニアボー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) Ema M., Kobayashi N., Naya M., Hanai S., Nakanishi J.: Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials, *Reprod. Toxicol.*, 30, 343-352, 2010
- 3) Schmidt C.W.: Nanotechnology-related environment, health, and safety research: examining the national strategy, *Environ.*

- Health Perspect.*, 117, A158-A161, 2009
- 4) Dhawan A., Sharma V.: Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 589-605, 2010
- 5) Boverhof D.R., David R.N.: Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 953-961, 2010
- 6) 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
- 7) European Commission: JRC SCIENCE AND POLICY REPORTS “Interlaboratory comparison study of the colony forming efficiency assay for assessing cytotoxicity of nanomaterials”, 2014
- 8) 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
- 9) Kobayashi N., Naya M., Endoh S., Maru J., Yamamoto K., Nakanishi J.: Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO<sub>2</sub> particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results, *Toxicology*, 264, 110-118, 2009
- 10) 河上強志・伊佐間和郎・宮島敦子・小森谷薫・加藤玲子: 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析, 平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 ( H23-化学-一般-006 )
- 11) Horie M., Nishio K., Fujita K., Kato H., Nakamura A., Kinugasa S., Endoh S., Miyauchi A., Yamamoto K., Murayama H., Niki E., Iwahashi H., Yoshida Y., Nakanishi

J.: Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity in vitro by cellular uptake and subsequent Ni(II) release, Chem. Res. Toxicol., 22, 1415-1426, 2009

## G. 研究発表

### G.1 論文発表

なし

### G.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 ナノ粒子の二次粒子径が細胞毒性に及ぼす影響, 第24回環境化学討論会, 札幌市, 2015年6月
2. 宮島敦子・河上強志・小森谷薫・加藤玲子・新見伸吾・伊佐間和郎, 物理化学的性質の異なる酸化亜鉛ナノマテリアルの細胞応答, 第42回日本毒性学会

学術大会, 金沢市, 2015年6月

3. Miyajima-Tabata, A., Kawakami T., Komoriya K., Kato R., Niimi S., Isama K. Effects of zinc oxide nanomaterials on the cellular responses in THP-1 cells, 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, USA, March, 2016

## 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

なし

表1. 実験に用いたナノマテリアルの製造(販売)先、一次粒子径および外観(色)

試料	略名	製造(販売)先	一次粒子径 <sup>a</sup> (nm)	外観(色) <sup>a</sup>
酸化ニッケル	NiO-Sigma	Sigma-Aldrich	< 50	黒色
	NiO-Alfa	Alfa Aesar	100	緑色
ニッケル	Ni-Alfa	Alfa Aesar	5-20	シルバークレー

<sup>a</sup> 各メーカーカタログより(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)

表2. ナノマテリアル懸濁液中の平均粒子径(流体力学径)およびZeta電位<sup>a</sup>

ナノマテリアル <sup>b</sup>	平均粒子径 (nm)		Zeta電位 (mV)	
	懸濁原液 (1 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)	懸濁原液 (1 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)
( 0.05 mm)	149.9 ± 3.2	249.1 ± 9.1	19.8 ± 0.1	-11.7 ± 0.6
	1day	229.2 ± 19.6		
NiO-Sigma ( 0.1 mm)	216.7 ± 8.7	266.1 ± 4.5	24.8 ± 0.4	-10.7 ± 0.2
	1day	323.7 ± 13.3		
( 0.5 mm)	329.2 ± 5.8	405.6 ± 22.0	19.4 ± 0.5	-9.7 ± 0.7
	1day	424.3 ± 57.7		
( 0.05 mm)	192.4 ± 6.4	246.9 ± 22.0	22.8 ± 0.6	-8.4 ± 0.4
	1day	176.7 ± 2.2		
Ni-Alfa ( 0.1 mm)	280.0 ± 4.7	361.2 ± 33.5	23.6 ± 0.7	-13.8 ± 0.4
	1day	262.3 ± 15.5		
( 0.5 mm)	357.7 ± 17.2	436.2 ± 89.4	22.1 ± 1.4	-10.8 ± 0.2
	1day	313.8 ± 16.7		

<sup>a</sup> 1day: 37 °C で一日放置後

<sup>b</sup> カッコ内は粉碎に用いたジルコニウムボールの粒子径

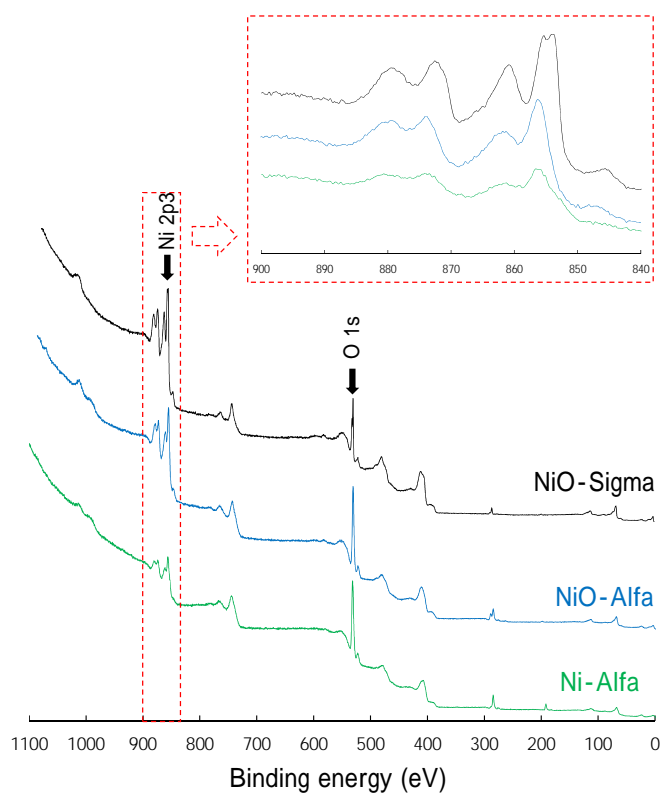


図 1. ナノマテリアルの XPS スペクトル



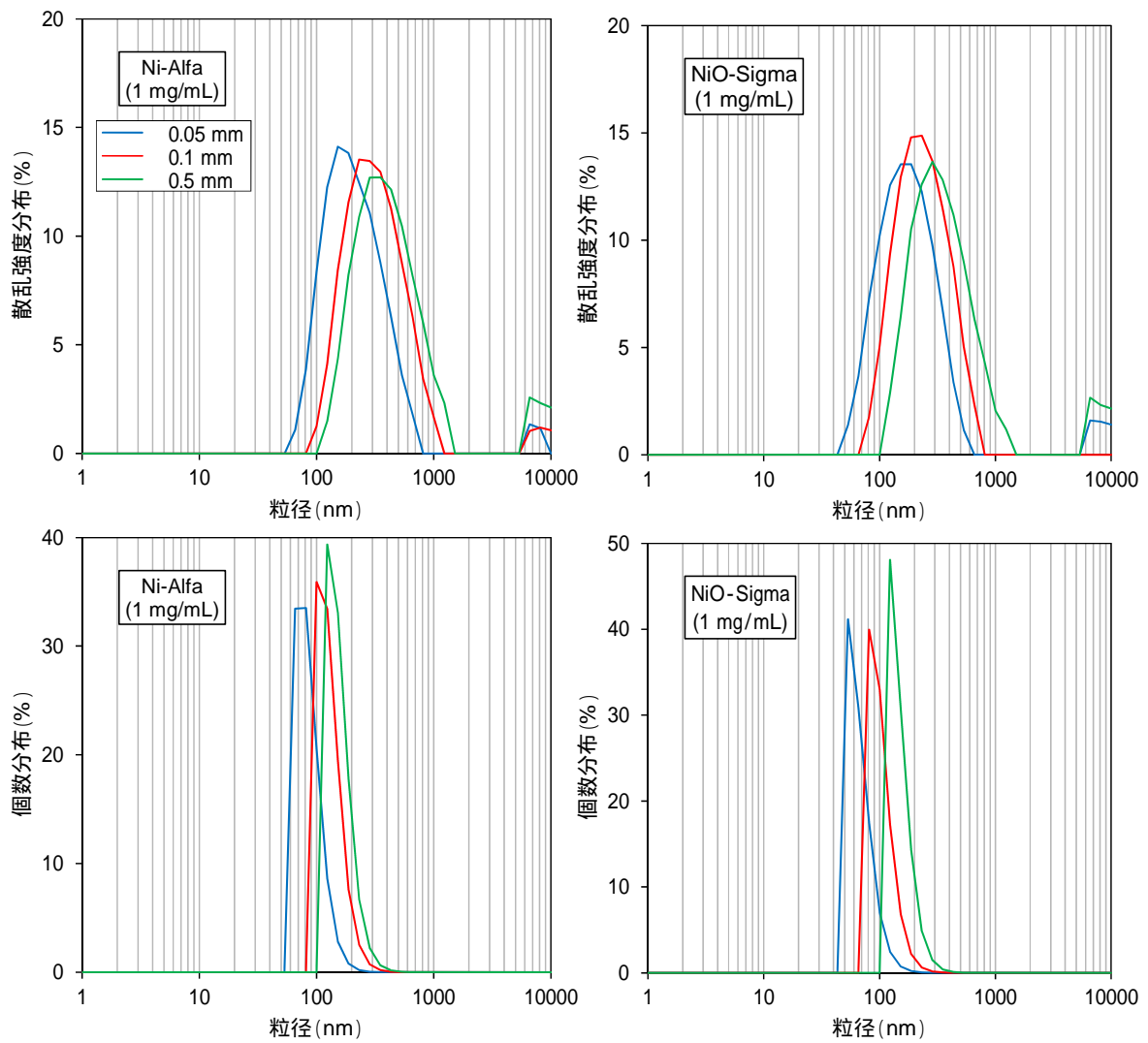


図 2.Ni-Alfa および Ni-Sigma 懸濁原液 ( 1 mg/mL ) の粒径分布  
 ( 上 : 散乱強度分布、下 : 個数分布 )

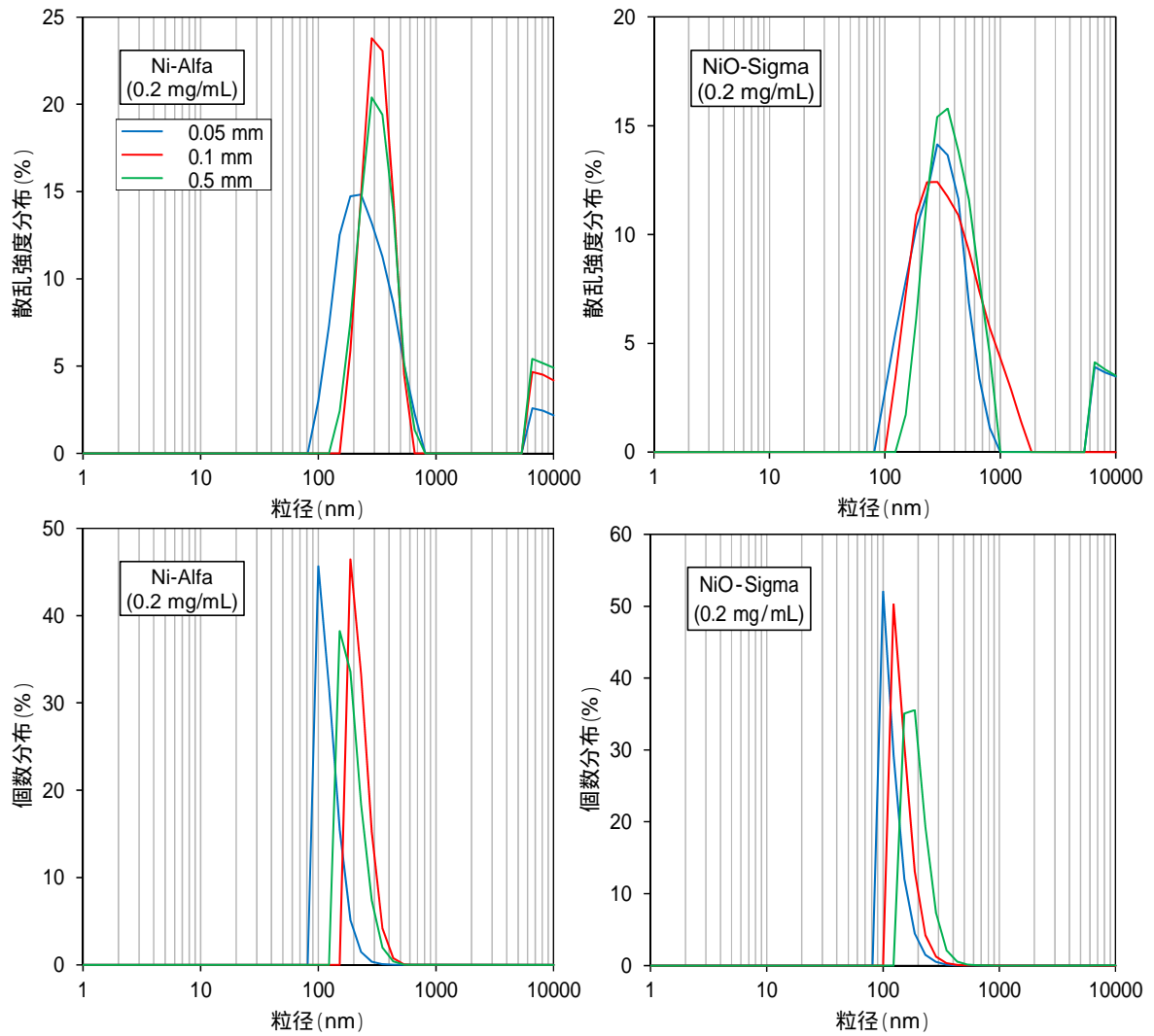


図 3. Ni-Alfa および NiO-Sigma の 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.2 mg/mL) の粒径分布  
(上：散乱強度分布、下：個数分布)

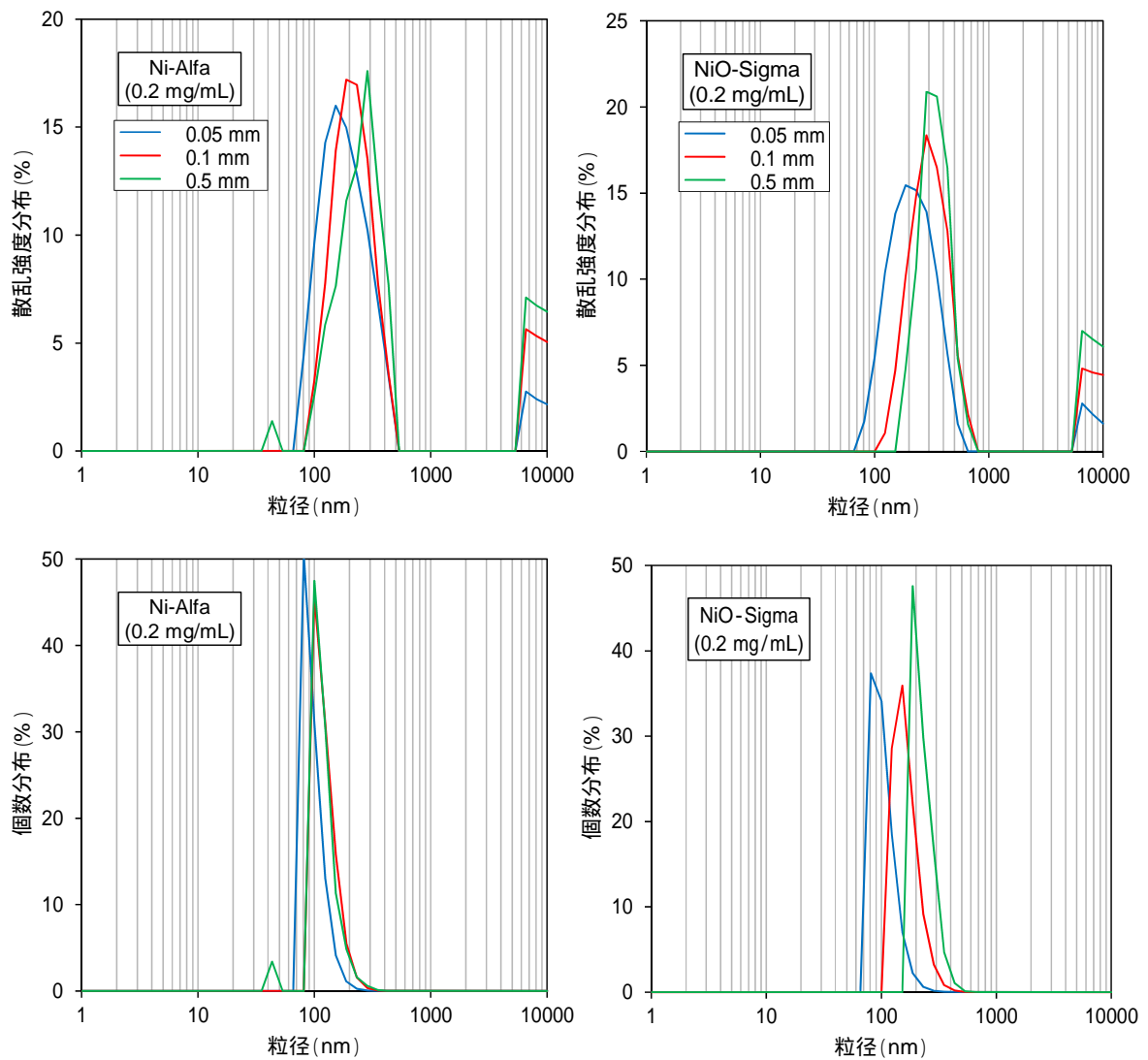


図 4.37 で 1 日静置後の Ni-Alfa および NiO-Sigma の  
 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.2 mg/mL) の粒径分布  
 (上: 散乱強度分布、下: 個数分布)

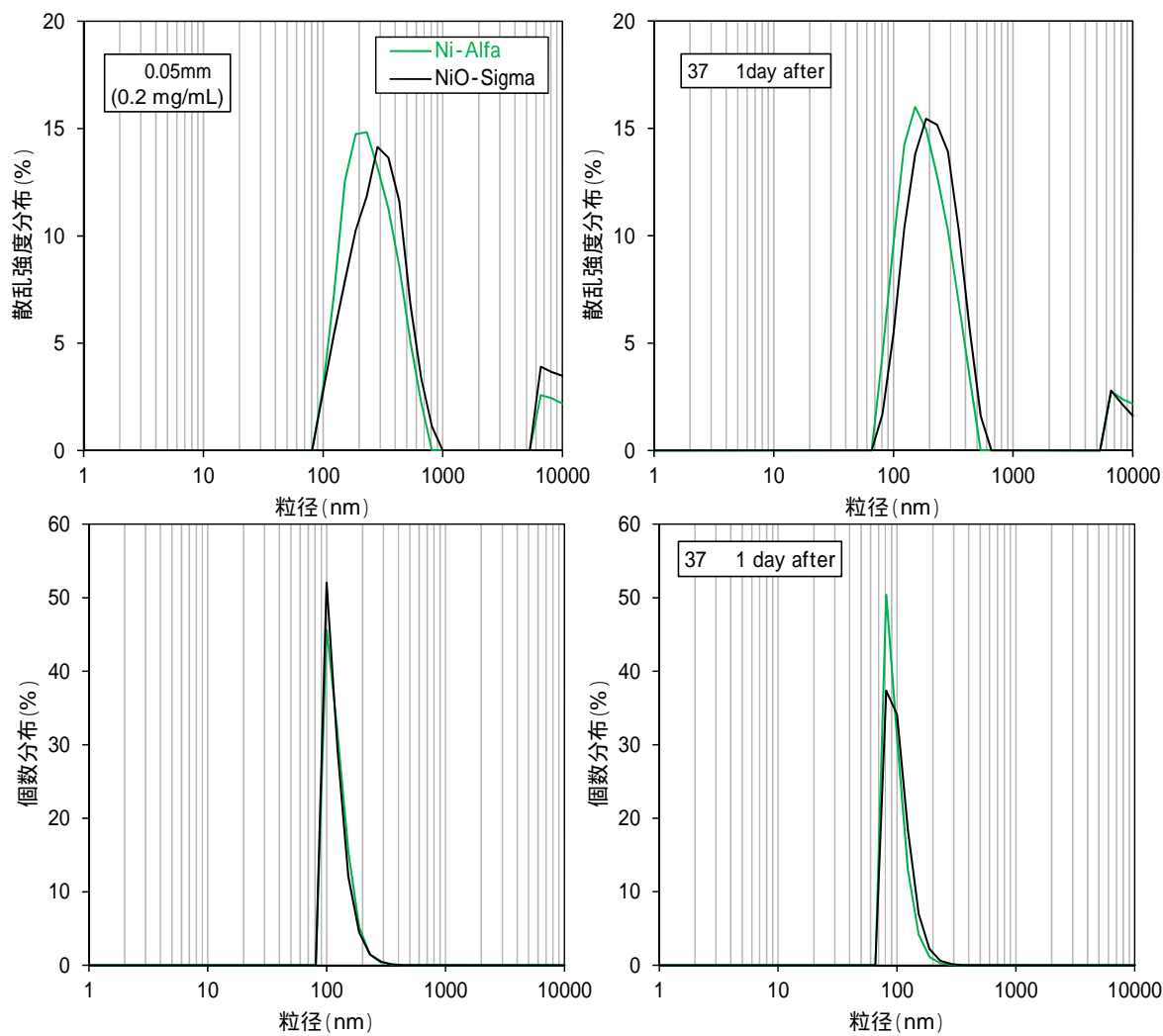


図 5. 粉碎に 0.05 mm のジルコニアボールを用いた Ni-Alfa および NiO-Sigma の 10%FBS-MEM 懸濁液の調製後（左）および 37 で 1 日静置後（右）の粒径分布（上：散乱強度分布、下：個数分布）

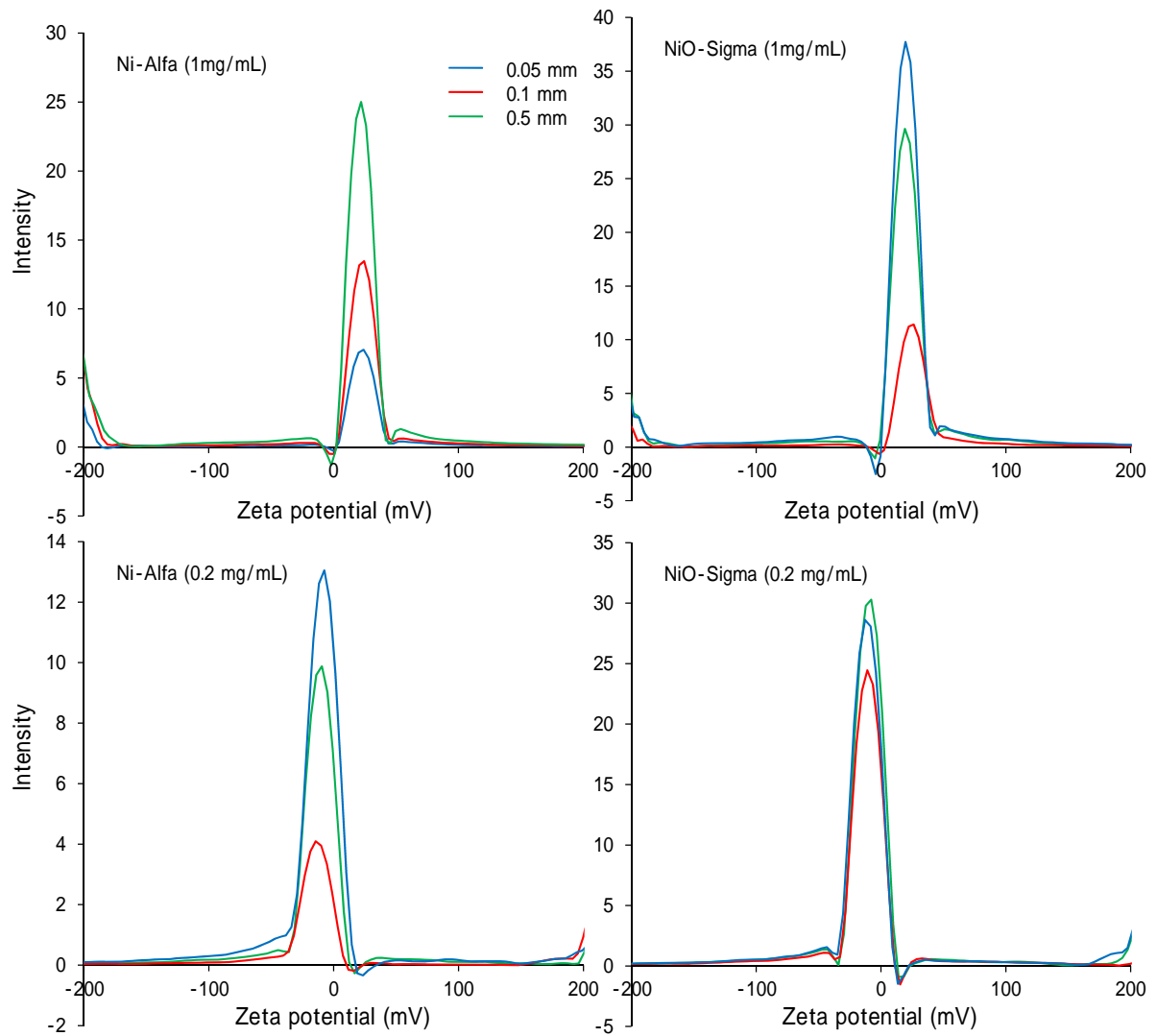


図 6. Ni-Alfa および NiO-Sigma の懸濁原液および 10%FBS-MEM 懸濁液の Zeta 電位