

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及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	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	比留間 瞳	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

本研究では、一次粒子径が異なり二次粒子径が同程度の NiO 及び Ni ナノマテリアル懸濁液を用いて、細胞毒性に対する一次粒子径の影響を評価することを目的としている。これまでに、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を作製し細胞毒性試験を行った。そして、二次粒子径サイズが同程度の場合には、一次粒子径サイズが小さいほど毒性が強くなる可能性を見出した。今年度は、それらの懸濁液中 Ni イオンの濃度測定及び Ni イオンの細胞毒性試験を実施し、各ナノマテリアルの細胞毒性に対する Ni イオンの影響を評価した。その結果、一次粒子径が異なり二次粒子径が同程度の NiO-Sigma 懸濁液及び Ni-Alfa 懸濁液では、一次粒子径サイズの小さい Ni-Alfa の方が Ni イオン濃度はやや高い傾向を示した。そして、Ni イオンの細胞毒性試験の結果から、Ni イオンの溶出が各ナノマテリアルの細胞毒性に影響している可能性が考えられた。一方で、先行研究で細胞毒性に違いが認められている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では、懸濁液中の Ni イオン濃度に差は認められなかった。そのため、一連の細胞毒性について、溶出した Ni イオンだけでなく、細胞への各ナノマテリアルの取り込み量も影響しているものと考えられた。

の発現が懸念されている^{2,3)}。

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¹⁾。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

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⁴⁾。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⁵⁾。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⁶⁾。このような背景から、欧州委員会の共同研究センター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⁷⁾。

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、SiO₂ 及び TiO₂ 等は化粧品や塗料等に用いられている⁶⁾。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⁸⁾。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 TiO₂ 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⁹⁾。

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、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、安定性、培地の影響及び適切な用量計測量での評価が求められている⁵⁾。

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¹⁰⁾。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⁸⁾。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。

これまでに、一次粒子径サイズの異なる2種類の NiO ナノマテリアル及び表面が酸化被膜でおおわれている Ni ナノマテリアルの3種類について、二次粒子径サイズが同程度のナノマテリアル懸濁液の調製を検討した。そして、NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の2種類について、濃度 1 mg/mL で懸濁原液の調製が可能であることを見出した¹¹⁾。次に、それらのナノマテリアル懸濁液について細胞毒性試験を実施したところ、二次粒子径サイズが同程度の場合には一次粒子径サイズが小さいほど毒性が強くなる可能性が認められた¹²⁾。今年度は、それらの懸濁液中の Ni イオン濃度測定及び Ni イオンの細胞毒性試験を実施し、各ナノマテリアルの細胞毒性に対する懸濁液中の Ni イオン濃度の影響を評価した。

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 Ni ナノマテリアル (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、メーカー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、一昨年度に酸化皮膜の存在を確認し、NiO と同等に扱えるものと考えた¹¹⁾。これらのナノマテリアルの一次粒子径は、NiO-Sigma (<50 nm) 及び 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砕機を用いた方法¹⁰⁾に従い懸濁液の調製を行った。粉砕機は NP-100 (シンキー製) を用い、粉砕容器はジルコニア製であった。粉砕には、直径が 0.5、0.1 及び 0.05 mm の三種類のジルコニアボールを用いた。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 分間粉砕を行った。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% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、1% non-essential amino acid (NEAA) (GIBCO) を含む Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO) (以降: 10%FBS-MEM) を用いて希釈し、培地懸濁液を作製した。これらの懸濁液中の各ナノマテリアルの平均粒子径及び Zeta 電位を表 2 に示した¹¹⁾。

B.3 培地懸濁液中の Ni イオン濃度測定

NiO-sigma 及び Ni-alfa ナノマテリアルの 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.1 mg/mL) について、調製直後及び 37°C で 24 時間インキュベートしたものについて Ni イオン濃度を測定した。

また、先行研究で細胞毒性試験を実施した一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズが異なる NiO-sigma ナノマテリアル懸濁液 (懸濁原液の調製濃度 10 mg/mL) についても、比較検討のため、培地中の Ni イオン濃度を測定した。

金属イオン濃度測定の前処理として、懸濁原液および 10%FBS-MEM 懸濁液を冷却超遠心機 (himac CP65 β 、日立工機製) にてアングルローター (P70AT2) を用いて、20°C、50000 rpm (約 170000 \times g) で 1 時間遠心した。その上清 0.5 mL を採取し、5% 硝酸水溶液 4.5 mL を加えて試験溶液とした。なお、5%硝酸水溶液は、和光純薬工業製の有害金属測定用硝酸を Milli-Q 水で希釈して調製した。超遠心処理により得られた試験溶液を、5%硝酸水溶液により適切な濃度に希釈した後に、孔径 0.45 μ m のメンブレンフィルター (ザルトリウス) を用いてろ過してから金属イオン濃度を測定した。金属イオン濃度の測定には、誘導結合プラズマ質量分析計 (Inductively Coupled Plasma Mass spectrometry: ICP-MS) を用いた。また、金属酸化物ナノマテリアルを含まない 10%FBS-MEM について、同様の操作を行ったものを対照試料として測定した。試験は 4 連 (n=4) で実施した。

ICP-MS には Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Inc.) を用いた。測定条件は、高周波出力: 1500W、プラズマガス: Ar 15 L/min、キャリアガス: Ar 0.7 L/min、メイクアップガス: 0.33 L/min、コリジョンガス: He 5mL/min、サンプリング位置: 8 mm、

スプレーチャンバー温度: 2°C、積分時間 0.1 sec/element、測定回数: 3 times とした。Ni の 1000 mg/L 標準液 (和光純薬工業製) を、5%硝酸溶液で段階希釈し標準溶液とした。また、Ag の 1000 mg/L 標準液 (和光純薬工業製) を 5%硝酸で 5 µg/L に希釈したものを内部標準液として用いた。Ni および Ag の測定質量電荷比 (m/z) は、60 および 107 とした。Ni のバックグラウンド濃度は、0.536 µg/L であった。

B.4 Ni イオンの細胞毒性試験

細胞毒性試験には A549 細胞 (JCRB 細胞バンク) を用いた。細胞は 10%FBS-MEM を用いて、37°C、5%CO₂ インキュベーターで培養したものを用いた。試験には和光純薬工業製の塩化ニッケル六水和物を用いた。

始めに、A549 細胞を 96-well プレートに播種 (5×10³ cell/well) し、24 時間後に塩化ニッケルを含む液体培地を添加して 48 時間培養した。培地除去後、100 µL の Phenol Red-free MEM 培地及び 20 µL 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にて測定 (波長 440 nm) した。

C. 結果及び考察

C.1 培地懸濁液中の Ni イオン濃度

NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 濃度を 0.1 mg/mL に調製した 10%FBS-MEM 培地懸濁液中の Ni イオン濃度を表 3 に示した。

NiO-Sigma 懸濁液中の Ni イオン濃度は 2.2 ~ 4.2 µg/mL (直後) 及び 6.1 ~ 8.4 µg/mL (1 日後) で溶出率は 2.8 ~ 5.4% (直後) 及び 7.8 ~ 11% (1 日後) であった。一方、Ni-Alfa 懸濁液中の Ni イオン濃度は

13 ~ 18 µg/mL (直後) 及び 23 ~ 25 µg/mL (1 日後) で溶出率は 13 ~ 18% (直後) 及び 23 ~ 25% (1 日後) であった。なお、ナノマテリアル無しで同じ操作を行ったブランク試料中の Ni イオン濃度は、定量下限値以下 ~ 0.15 µg/mL であった。

調製直後と 1 日後では、NiO-Sigma 及び Ni-Alfa とともに 1 日後の方が Ni イオン濃度は高く、培地中で継時的に Ni イオンが溶出していることが明らかとなった。NiO-Sigma 懸濁液と Ni-Alfa 懸濁液では、Ni-Alfa の方が Ni イオン濃度はやや高い傾向を示した。これは、NiO-Sigma よりも Ni-Alfa の方が一次粒子径が小さいため、全体の表面積が大きくなり溶出しやすかったの でないかと推察された。

先行研究¹⁰⁾条件 (懸濁原液の調製濃度: 10 mg/mL) における NiO-Sigma 懸濁液の Ni イオン濃度を表 4 に示した。調製直後の Ni イオン濃度は 0.82 ~ 19 µg/mL で溶出率は 1.0 ~ 24% であった。また、調製から 1 日後では Ni イオン濃度は 3.3 ~ 36 µg/mL で溶出率は 4.2 ~ 46% であった。懸濁液中の NiO-Sigma 濃度が高くなるほど、懸濁液中に溶出した Ni イオン濃度も高くなっていった。一方で、一次粒子径が同じで二次粒子径サイズの異なる各ナノマテリアル懸濁液について、ナノマテリアルの濃度が同じ懸濁液同士を比較すると、Ni イオン濃度に差は認められなかった。

C.2 細胞毒性と Ni イオン濃度

これまでに、径が 0.05 µm のジルコニアボールを用いることで、二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた¹¹⁾。そして、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ナノマテリアル懸濁液では、一次粒子径サイズが小さいと細胞毒性が強い可能性が示唆されている¹²⁾。この懸濁液中の Ni イオン濃度を比較すると、前述

のように一次粒子径が小さい Ni-Alfa の方が Ni イオン濃度は高い傾向を示した (表 3 及び図 1)。また、塩化ニッケルを用いて、Ni イオンの細胞毒性を評価したところ、IC₅₀ 値は 43 µg/mL であった (図 2)。そのため、Ni イオンの溶出が細胞毒性に影響している可能性が考えられた。一方で、NiO-Sigma の二次粒子径サイズの異なる懸濁液では、細胞毒性には違いが認められているが¹⁰⁾、懸濁液中の Ni イオン濃度に差は認められなかった (表 4 及び図 3)。そのため、一連の細胞毒性について、溶出した Ni イオンの影響だけでなく、各ナノマテリアルの細胞への取り込み量も影響しているものと考えられた。

D. まとめ

NiO-Sigma 及び Ni-Alfa ナノマテリアルについて、液体培地中の Ni イオン濃度測定及び Ni イオンの細胞毒性試験を実施した。NiO-Sigma 懸濁液と Ni-Alfa 懸濁液では、Ni-Alfa の方が Ni イオン濃度はやや高い傾向を示した。Ni イオンの細胞毒性試験の結果から、Ni イオンの溶出が細胞毒性に影響している可能性が考えられた。一方で、先行研究で細胞毒性に違いが認められている、二次粒子径サイズの異なる懸濁液では、懸濁液中の Ni イオン濃度には差は認められなかったそのため、一連の細胞毒性について、溶出した Ni イオンの影響だけでなく、各ナノマテリアルの細胞への取り込み量も影響しているものと考えられた。

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-TiO₂ 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・酒井恵子・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総合報告書 (H23-化学-一般-006)
- 11) 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 27 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (H27-化学-一般-008)
- 12) 河上強志・宮島敦子・小森谷薫・比留間瞳・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 28 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (H27-化学-一般-008)

G. 研究発表

G.1 論文発表

なし

G.2 学会発表

- (1) 宮島敦子・河上強志・小森谷薫・加藤玲子・齋島由二・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に対する THP-1 の細胞応答, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月.
- (2) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, H. Haishima, K. Isama. Effects of different secondary particle sized nickel oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune responses. (EUROTOX 2017, Bratislava, Slovak, Sep., 2017)

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 ^a (nm)	外観 (色) ^a
酸化ニッケル	NiO-Sigma	Sigma-Aldrich	< 50	黒色
ニッケル	Ni-Alfa	Alfa Aesar	5-20	シルバーグレー

^a 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¹⁾

ナノマテリアル ^b	平均粒子径 (nm)	Zeta電位 (mV)			
		懸濁原液 (1 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)		
NiO-Sigma	(φ0.05 mm)	149.9 ± 3.2	249.1 ± 9.1	19.8 ± 0.1	-11.7 ± 0.6
	1日後 ^a	—	229.2 ± 19.6	—	—
	(φ0.1 mm)	216.7 ± 8.7	266.1 ± 4.5	24.8 ± 0.4	-10.7 ± 0.2
	1日後 ^a	—	323.7 ± 13.3	—	—
Ni-Alfa	(φ0.5 mm)	329.2 ± 5.8	405.6 ± 22.0	19.4 ± 0.5	-9.7 ± 0.7
	1日後 ^a	—	424.3 ± 57.7	—	—
	(φ0.05 mm)	192.4 ± 6.4	246.9 ± 22.0	22.8 ± 0.6	-8.4 ± 0.4
	1日後 ^a	—	176.7 ± 2.2	—	—
Ni-Alfa	(φ0.1 mm)	280.0 ± 4.7	361.2 ± 33.5	23.6 ± 0.7	-13.8 ± 0.4
	1日後 ^a	—	262.3 ± 15.5	—	—
	(φ0.5 mm)	357.7 ± 17.2	436.2 ± 89.4	22.1 ± 1.4	-10.8 ± 0.2
	1日後 ^a	—	313.8 ± 16.7	—	—

^a 37°Cで一日放置後

^b カッコ内は粉碎に用いたジルコニアボールの粒子径

表3. ND-S gma及びNi-A lfa懸濁液 (0.1 mg/mL) 中のNiイオン濃度及び溶出率

ナノマテリアル ^a		直後		1日後 ^b	
		Niイオン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	溶出率 (%)	平均値	溶出率 (%)
ND-S gma	$\phi 0.05\text{ mm}$)	4.2 ± 0.15	5.4	8.4 ± 0.27	11
	$\phi 0.1\text{ mm}$)	3.3 ± 0.066	4.2	6.1 ± 0.28	7.8
	$\phi 0.5\text{ mm}$)	2.2 ± 0.17	2.8	7.0 ± 0.46	8.9
Ni-A lfa	$\phi 0.05\text{ mm}$)	18 ± 0.58	18	25 ± 0.58	25
	$\phi 0.1\text{ mm}$)	16 ± 0.84	16	23 ± 1.6	23
	$\phi 0.5\text{ mm}$)	13 ± 0.64	13	23 ± 0.90	23

^a カッコ内は粉碎に用いたジルコニアボールの粒子径

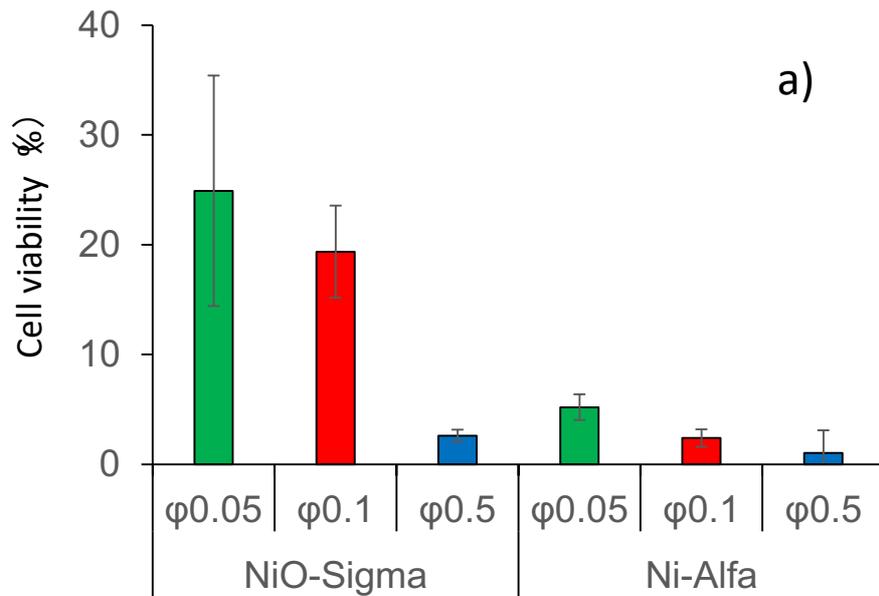
^b 37°Cで一日放置後

表4. 先行研究¹⁰⁾条件におけるND-S gma懸濁液中のNiイオン濃度及び溶出率^a

粉碎ジルコニア ボール径	ナノマテリアル 濃度	直後		1日後 ^b	
		Niイオン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	溶出率 (%)	Niイオン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	溶出率 (%)
$\phi 0.5\text{ mm}$	0.05 mg/mL	0.82 ± 0.084	1.0	3.9 ± 0.27	5.0
	0.1 mg/mL	1.8 ± 0.19	2.3	5.7 ± 1.5	7.3
	0.2 mg/mL	4.5 ± 0.15	5.7	14 ± 0.85	18
	0.4 mg/mL	8.0 ± 0.46	10	30 ± 2.2	38
$\phi 0.1\text{ mm}$	0.05 mg/mL	1.5 ± 0.71	1.9	3.3 ± 0.50	4.2
	0.1 mg/mL	4.1 ± 0.89	5.2	6.1 ± 0.63	7.8
	0.2 mg/mL	5.3 ± 0.77	6.8	11 ± 0.95	14
	0.4 mg/mL	11 ± 1.0	14	25 ± 2.2	32
$\phi 0.05\text{ mm}$	0.05 mg/mL	2.4 ± 0.043	3.1	4.7 ± 0.41	6.0
	0.1 mg/mL	4.9 ± 0.23	6.3	8.8 ± 0.49	11
	0.2 mg/mL	8.0 ± 0.35	10	18 ± 1.6	23
	0.4 mg/mL	19 ± 1.4	24	36 ± 2.2	46

^a 懸濁原液濃度は10 mg/mL

^b 37°Cで一日放置後



ナノマテリアル濃度を100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製した
各懸濁液の細胞毒性結果 (48時間後)

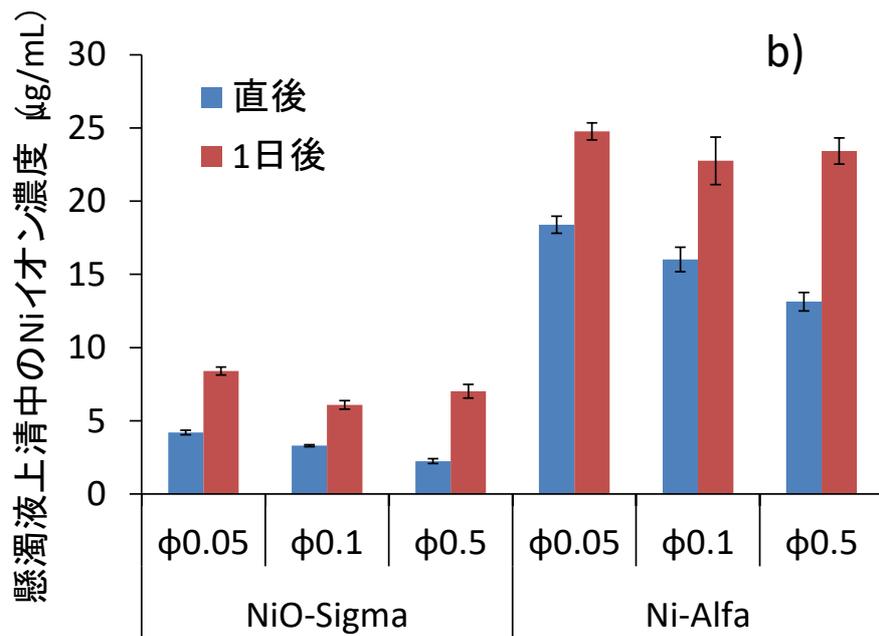


図1. ナノマテリアル濃度を 0.1 mg/mL に調製した各懸濁液の
a)細胞毒性結果¹²⁾ (48 時間後) 及び b)上清中の Ni イオン濃度

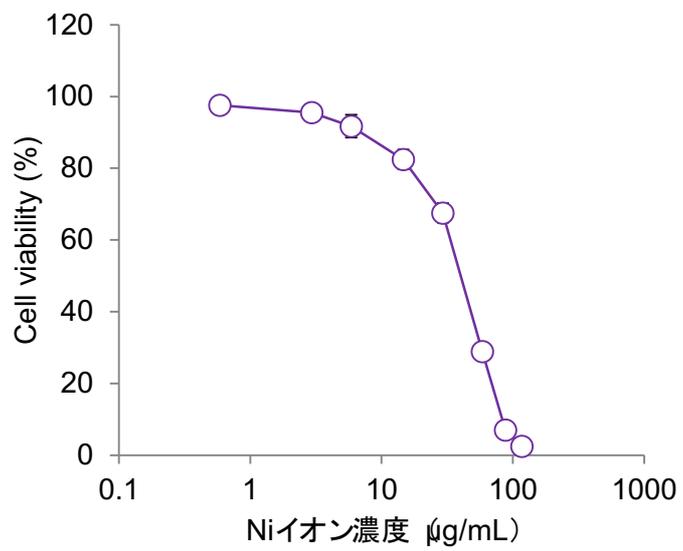


図 2. Ni イオンの細胞毒性試験結果

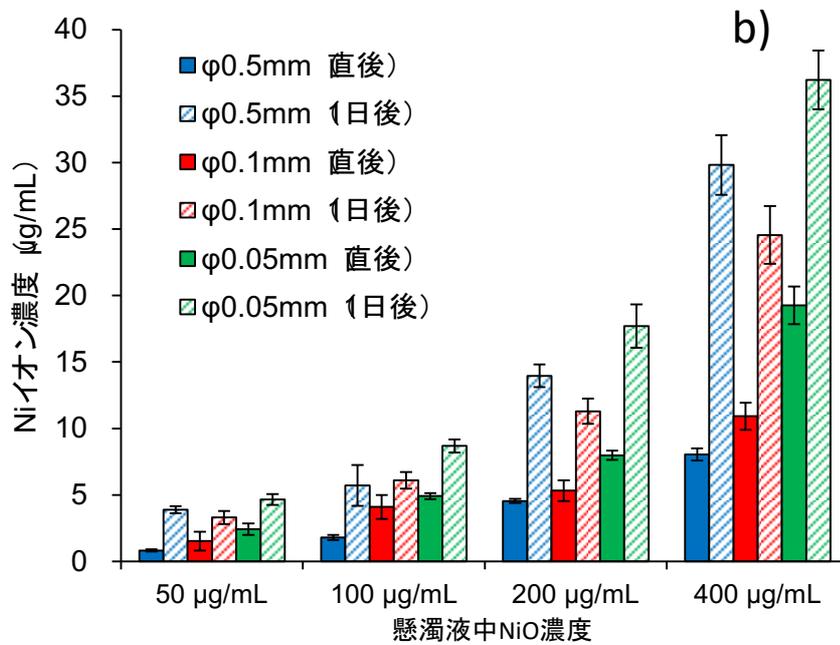
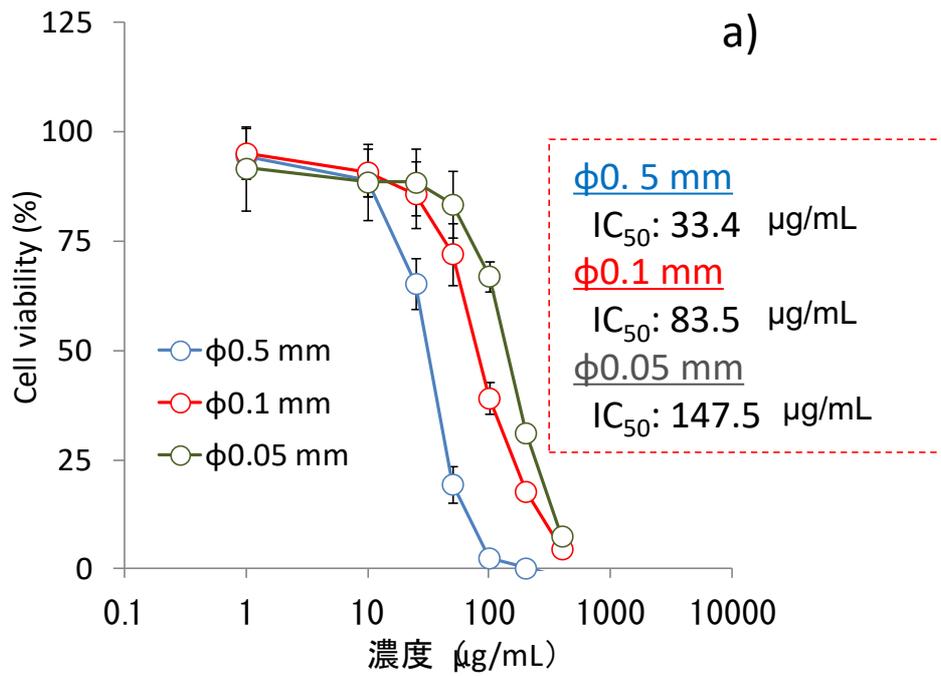


図3. 二次粒子径の異なる NiO-Sigma 懸濁液を用いた a) 細胞毒性試験 (A549 細胞、48 時間 MTS アッセイ)¹⁰⁾及び b) 懸濁液中 Ni イオン濃度