

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
研究協力者 伊佐間 和郎 帝京平成大学薬学部 教授

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。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、2 種類の NiO ナノマテリアル (NiO-Sigma 及び NiO-Alfa) 及び 1 種類のニッケルナノマテリアル (Ni-Alfa) の計 3 種類を用いて、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。試験に先立ち、各ナノマテリアルの表面状態及び形状等を観察し、試験に使用した Ni-Alfa 表面は酸化皮膜に覆われていることを確認し、酸化ニッケルと同等として扱った。そして、φ0.05 mm のジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa について、10%FBS-MEM 培地中で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。こ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、Ni-Alfa の方が細胞毒性はやや強い傾向を示し、二次粒子径が同程度の場合には一次粒子径が小さいほど毒性が強くなる可能性が示唆された。懸濁液に溶出している Ni イオンについては、Ni-Alfa の方が NiO-Sigma よりも Ni イオン濃度が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。

分野の製品に使用されてきた。

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

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^{2,3)}。

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ていない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、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液を作成し、一次粒子径サイズがその細胞毒性に及ぼす影響を評価することを目的とした。

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 及びニッケルナノマテリアル (NiO-Alfa 及び 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) 及び Ni-Alfa (5-20 nm) であった。

B.2 ナノマテリアルの表面状態と形状観察

NiO-Sigma 及び 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。

また、各ナノマテリアルをエタノールに懸濁させ超音波処理した後、マイクログリッド（コロジオン膜）上に滴下して乾燥させ、透過型電子顕微鏡（TEM）にて粒子径及び形状観察を行った。用いた TEM は日立ハイテクノロジーズ製 H-9500 で加速電圧は 200 kV とした。また、各ナノマテリアルの元素組成について、日立ハイテクノロジーズ製 HD2300A を用いた、走査型透過電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線分光法（STEM-EDS）により測定した。電子顕微鏡分析は東芝ナノアナリシス株式会社にて実施した。

B.3 ナノマテリアル懸濁源液の調製

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）及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。平均粒子径及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.4 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、各ナノマテリアル懸濁原液を前述の液体培地で希釈したもの、及び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 (5×10^3 cell/well) し、24 時間後にナノマテリアルもしくは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 μ L 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。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。

B.5 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¹⁰⁾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、懸濁原液及び 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 μm 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 $\mu\text{g/L}$ に希釈したものを内部標準液として用いた。Ni 及び Ag の測定質量電荷比 (m/z) は、60 及び 107 とした。Ni のバックグラウンド濃度は、0.536 $\mu\text{g/L}$ であった。

C. 結果及び考察

C.1 ナノマテリアルの表面状態と形状観察

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及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。

NiO-Sigma の TEM 画像を図 2 に示した。数 nm 程度の大きさの粒子と 10~50 nm 程度の大きさの粒子との 2 群が混在して存在していた。また、粒子カウントによる平均粒子径測定を試みたが、粒子の凝集度合いが強いこと、粒子の輪郭部がはっきりしないことなどから断念した。大きさの異なる 2 群について、元素組成を STEM-EDS にて測定した結果を図 3 に示した。その結果、どちらの群の粒子もニッケル及び酸素の存在割合が同程度 (1:1) となり、どちらの粒子も NiO であることが確認できた。

Ni-Alfa の TEM 画像を図 4 に示した。Ni-Alfa は NiO-Sigma と異なり、一次粒子径が 10 nm 程度の比較的均一な粒子であった。ただし、粒子カウントによる平均粒子径測定については、NiO-Sigma と同様に粒子の凝集度合いが強いこと、粒子の輪郭部がはっきりしないことなどから断念した。

C.2 各ナノマテリアル懸濁液中の二次粒子径の平均粒子径及び粒径分布

各ナノマテリアル懸濁原液の作製にあたって、NiO-Sigma を用いた先行研究条件¹⁰⁾ (10 mg/mL での調製)を試みた。その結果、NiO-Alfa 及び Ni-Alfa の各ナノマテリアル懸濁液は調製後、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、細胞毒性試験等に安定して使用出来得る濃度での調製ができなかった。NiO-Sigma 及び 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 2 に、粒径分布を図 5 にそれぞれ示した。

NiO-Sigma 及び 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、懸濁原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、散乱強度分布及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。

NiO-Sigma 及び 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、平均粒子径及び粒径分

布への影響を検討した (表 2 及び図 6)。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 及び 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 $\phi 0.1$ mm と $\phi 0.5$ 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°C で一日静置した後のナノマテリアルの平均粒子径及び粒径分布を表 2 及び図 7 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 $\phi 0.05$ 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、Ni-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 $\phi 0.1$ mm と $\phi 0.5$ 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 $\phi 0.05$ mm で調製された、NiO-Sigma 及び 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 8)。その結果、散乱強度分布及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.3 各ナノマテリアルの細胞毒性

NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の細胞毒性試験

結果について図 9 に示した。NiO-Sigma の各試料の半数致死濃度 (IC₅₀) は、調製に用いたジルコニアボール径 0.5、0.1 及び 0.05 mm の試料で 23.1、29.3 及び 39.0 µg/mL であった。NiO-Sigma については、ジルコニアボール径が 0.1 mm 及び 0.05 mm の試料では差が認められず、0.5 mm の試料では他に比べてやや細胞毒性が強くなる傾向を示した。Ni-Alfa に関しては、各試料の IC₅₀ は調製に用いたジルコニアボール径が 0.5、0.1 及び 0.05 mm の試料で 18.9、24.0 及び 32.6 µg/mL であった。Ni-Alfa については、各濃度でのデータのばらつきが大きかった。

次に、径が 0.05 mm のジルコニアボールを用いて調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の細胞毒性試験の結果を比較した (図 10)。ばらつきが大きい、Ni-Alfa の方が若干、細胞毒性が強い傾向を示した。

C.4. 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、どちらの懸濁液でも 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、後者の方が Ni

イオン濃度はやや高い傾向を示した。これは、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は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.5 細胞毒性と一次粒子径サイズ及び Ni イオン濃度について

本研究では、径が 0.05 mm のジルコニアボールを用いることで、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。そして、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た。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)。また、Ni イオンそのものの細胞毒性を評価したところ、IC₅₀ 値は 43 µg/mL であった (図 11)。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。しかしながら、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 12)。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

本研究では先行研究でのナノマテリアル懸濁液調製法を利用し、2種類のNiOナノマテリアル(NiO-Sigma及びNiO-Alfa)及び1種類のニッケルナノマテリアル(Ni-Alfa)の計3種類を用いて、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。各ナノマテリアルの表面状態及び形状等を観察し、試験に使用したNi-Alfa表面は酸化皮膜に覆われていることを確認した。φ0.05 mmのジルコニアボールで調製したNiO-Sigma及びNi-Alfaについて、10%FBS-MEM培地中で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。こ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、Ni-Alfaの方が細胞毒性はやや強い傾向を示し、二次粒子径が同程度の場合には一次粒子径が小さいほど毒性が強くなる可能性が示唆された。懸濁液に溶出しているNiイオンについては、Ni-Alfaの方がNiO-SigmaよりもNiイオン濃度が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が、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NiO-Sigma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) R.W. Whatmore. Nanotechnology - what is it? Should we be worried? *Occup. Med.*, 56, 295-299, 2006.
- 2) M. Ema, N. Kobayashi, M. Naya, S. Hanai, J. Nakanishi. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reprod. Toxicol.*, 30, 343-352, 2010.
- 3) C.W. Schmidt. Nanotechnology-related environment, health, and safety research: examining the national strategy, *Environ. Health Perspect.*, 117, A158-A161, 2009.
- 4) A. Dhawan, V. Sharma. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 589-605, 2010.
- 5) D.R. Boverhof, R.N. David. 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) H. Yuan, F. Gao, Z. Zhang, L. Miao, R. Yu, H. Zhao, M. 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) N. Kobayashi, M. Naya, S. Endoh, J. Maru, K. Yamamoto. 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)

G. 研究発表

G.1 論文発表

1. 松岡厚子、児玉幸夫、吉田緑、伊佐間和郎、中嶋富士雄、井上薫、河上強志、松田良枝、五十嵐良明. シリカ、銀及び酸化亜鉛のナノ分散液の *in vitro* 及び *in vivo* 毒性学的評価. 国立衛研報, 134, 33-41, 2016.

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. A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, S. Niimi, K. Isama. 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

4. 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. 二次粒子径の異なる酸化ニッケルナノ粒子に対する THP-1 細胞の応答, 第 43 回日本毒性学会学術年会, 名古屋市, 2016 年 6 月
5. 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
6. 宮島敦子、河上強志、小森谷薫、加藤玲子、薮島由二、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

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 (μm)	外観(色) ^a
酸化ニッケル	ND-Sigma	Sigma-Aldrich	< 50	黒色
	ND-Alpha	Alpha Aesar	100	緑色
ニッケル	Ni-Alpha	Alpha 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^a

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

^a 1day: 37°Cで一日放置後

^b カッコ内は粉碎に用いたジルコニウムボールの粒子径

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

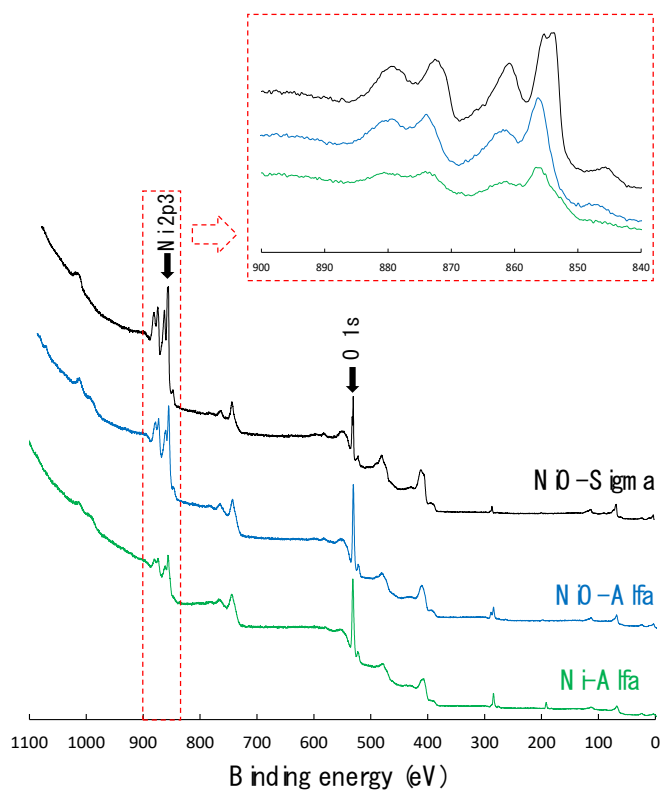
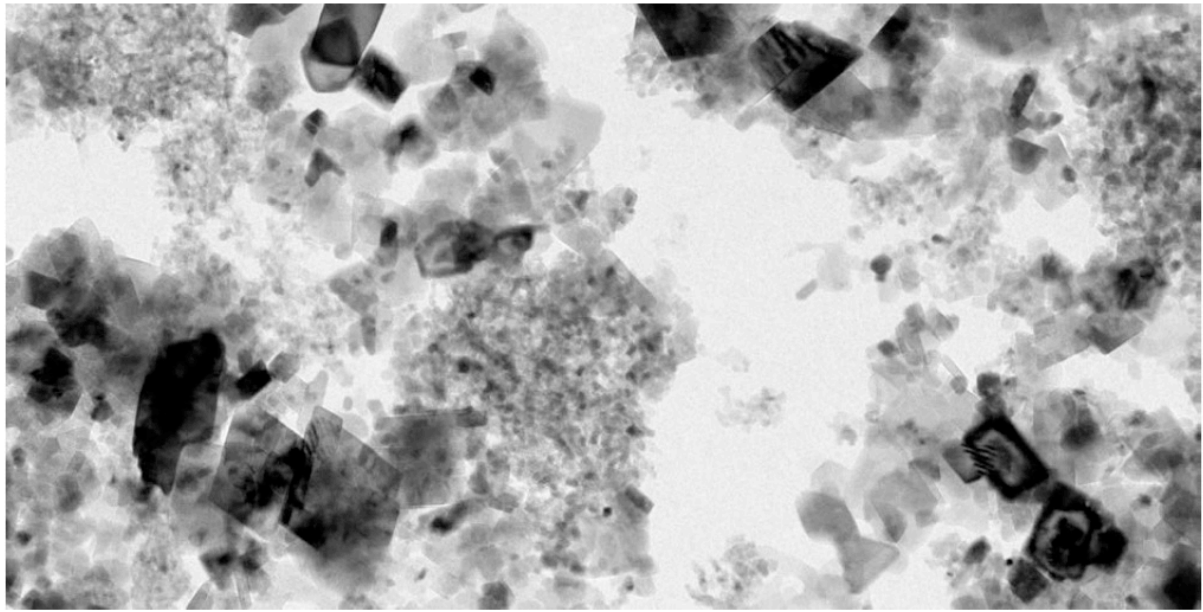
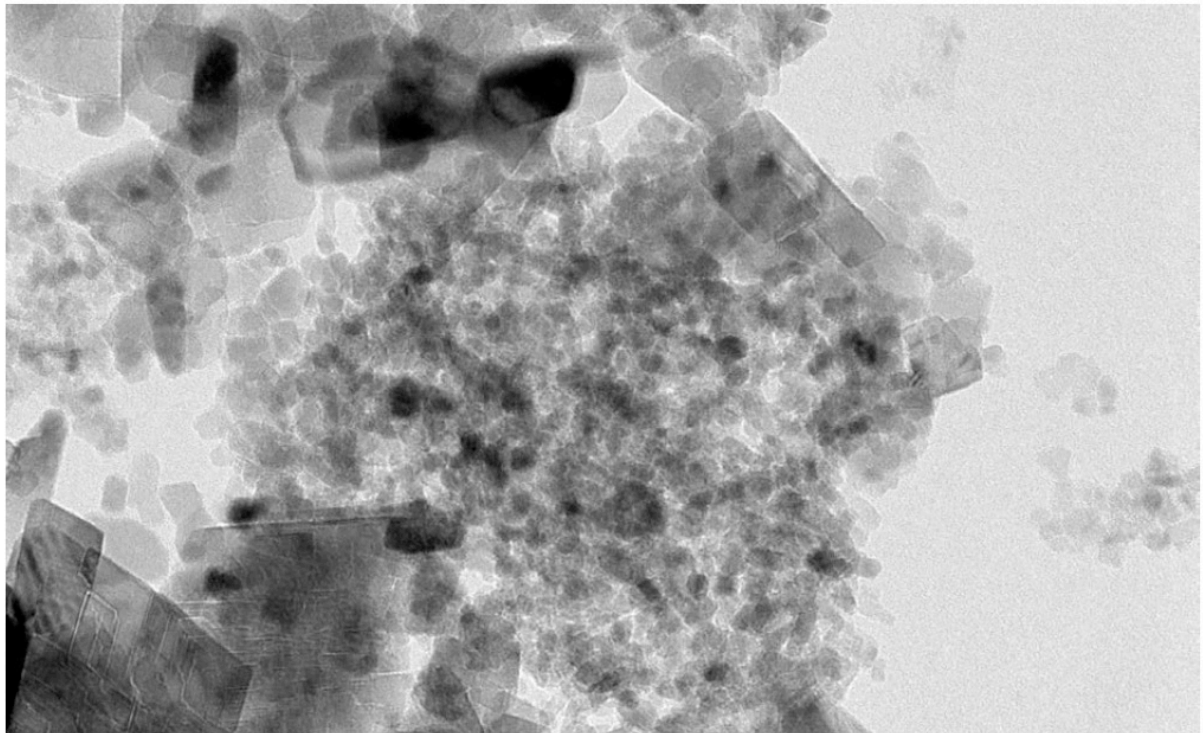


図 1. ナノマテリアルの XPS スペクトル



50nm



20 nm

図 2. NiO-Sigma の TEM 画像
(上 : 400 倍、下 : 1000 倍)

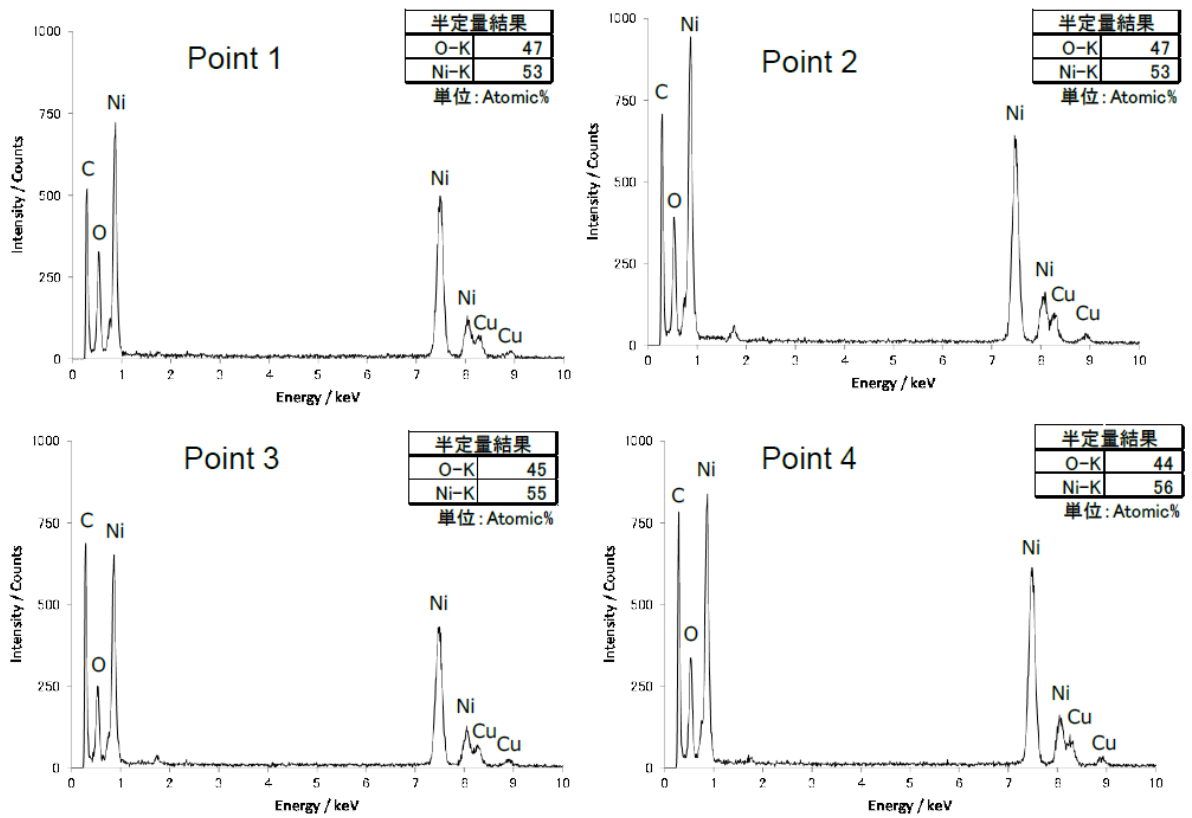
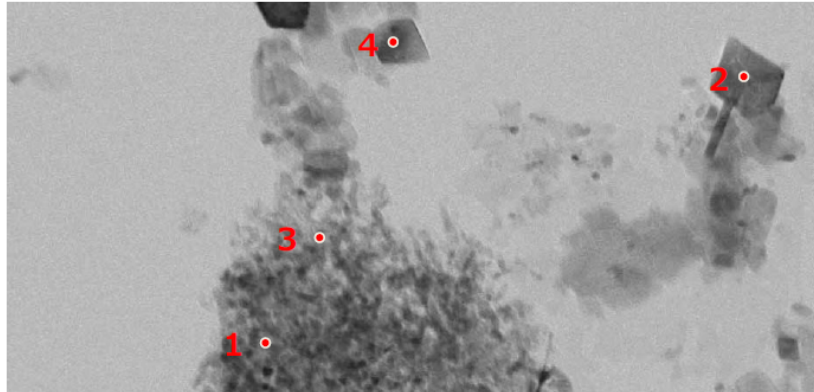
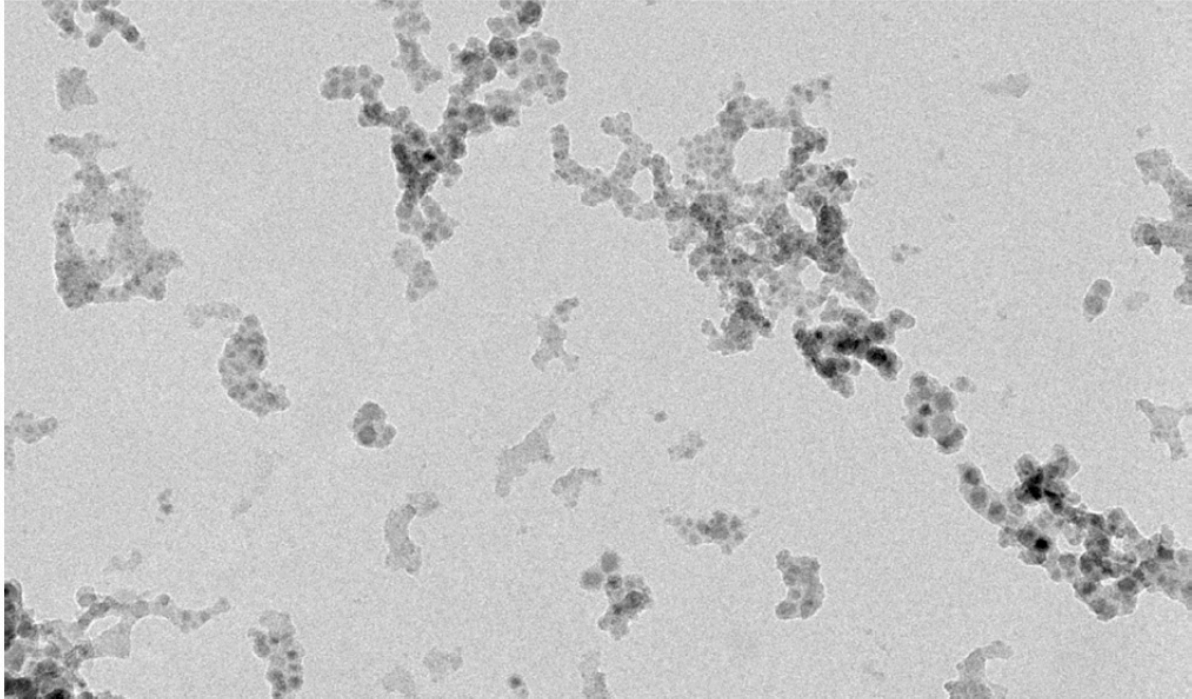
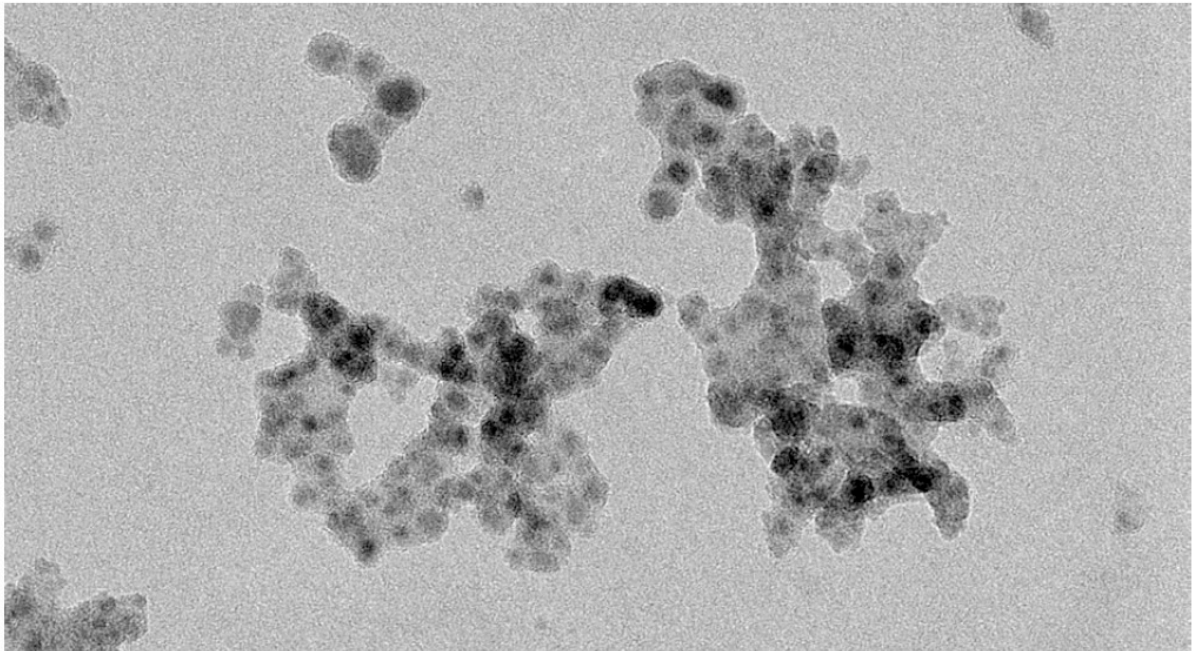


図 3. NiO-Sigma の大きさの異なる二次粒子の STEM-EDX 分析結果
(Cu は試料ホルダー起因のバックグラウンド)



50nm



20nm

図 4. Ni-Alfa の TEM 画像
(上 : 400 倍、下 : 1000 倍)

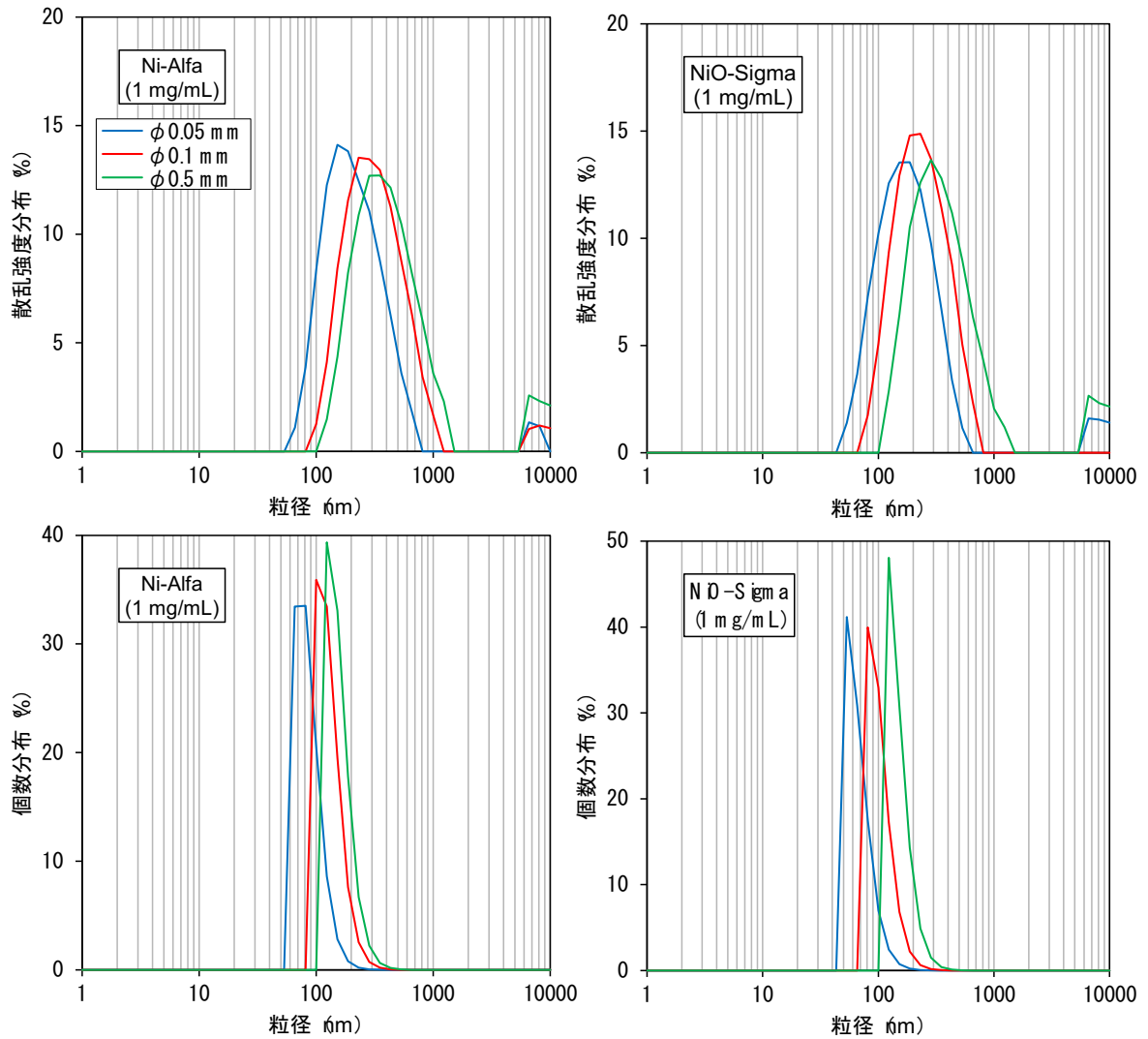


図 5.Ni-Alfa および Ni-Sigma 懸濁原液 (1 mg/mL) の粒径分布
(上：散乱強度分布、下：個数分布)

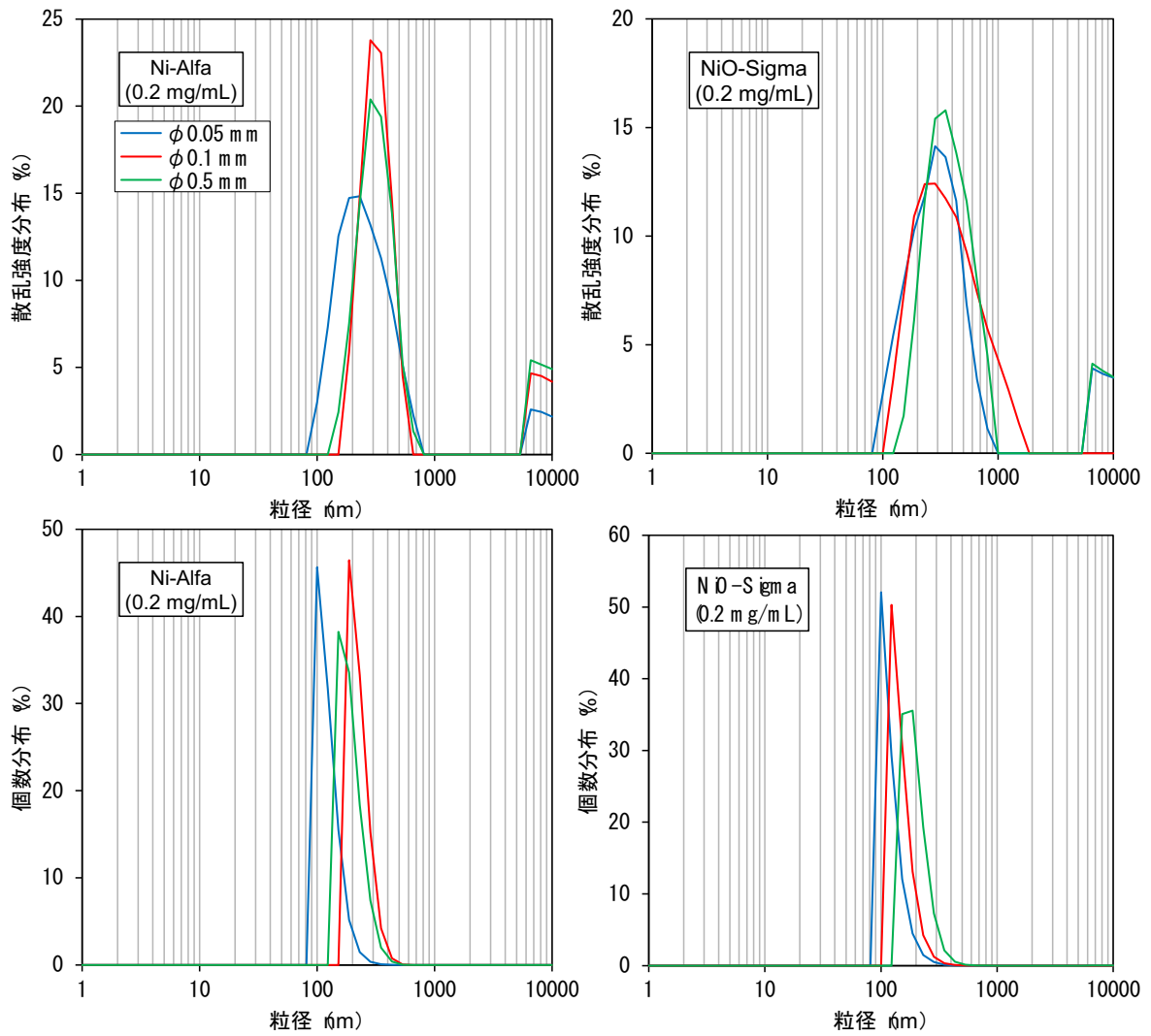


図 6. Ni-Alfa および NiO-Sigma の 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.2 mg/mL) の粒径分布
(上：散乱強度分布、下：個数分布)

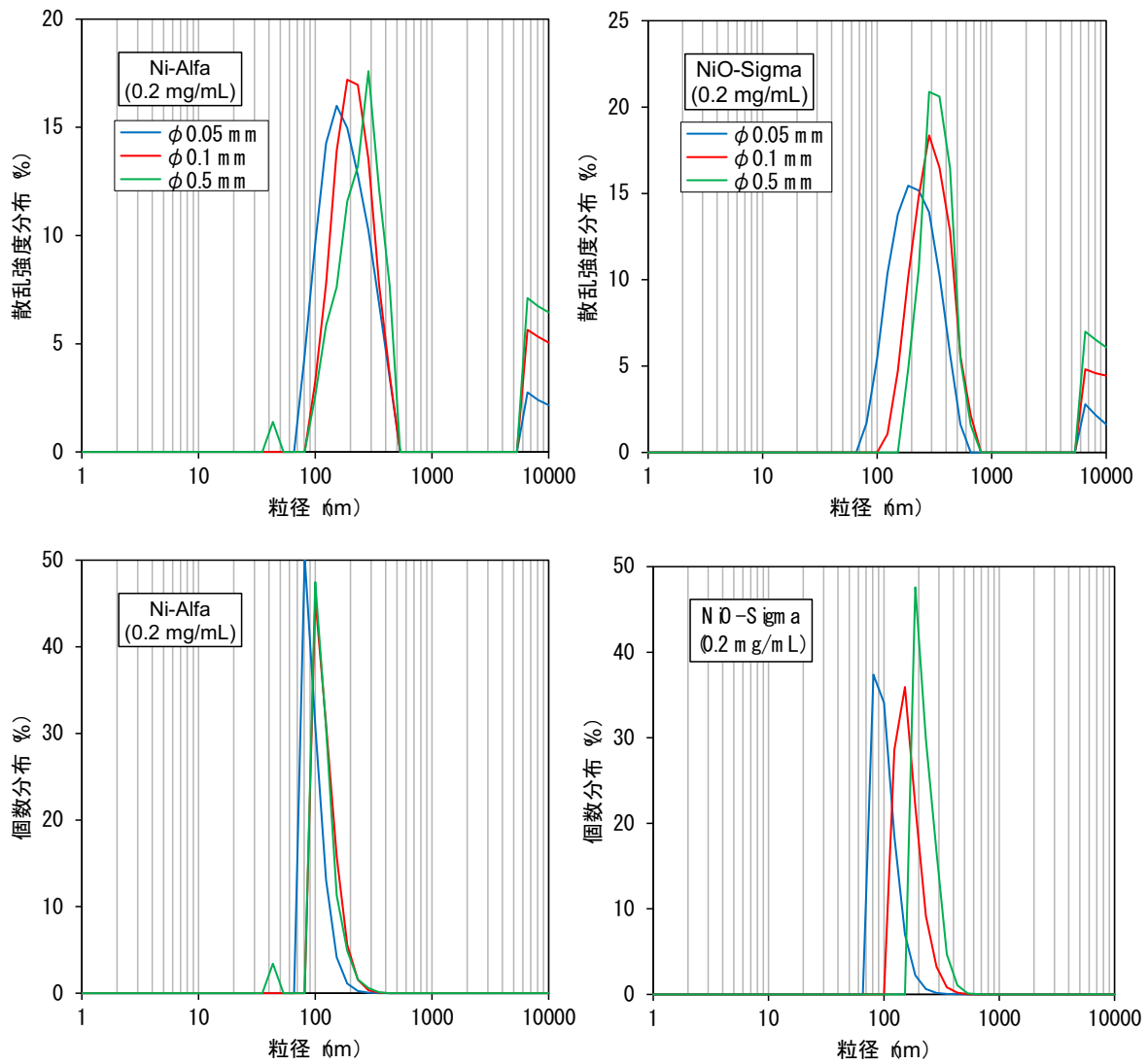


図 7. 37°Cで1日静置後のNi-AlfaおよびNiO-Sigmaの
10%FBS-MEM懸濁液(0.2 mg/mL)の粒径分布
(上: 散乱強度分布、下: 個数分布)

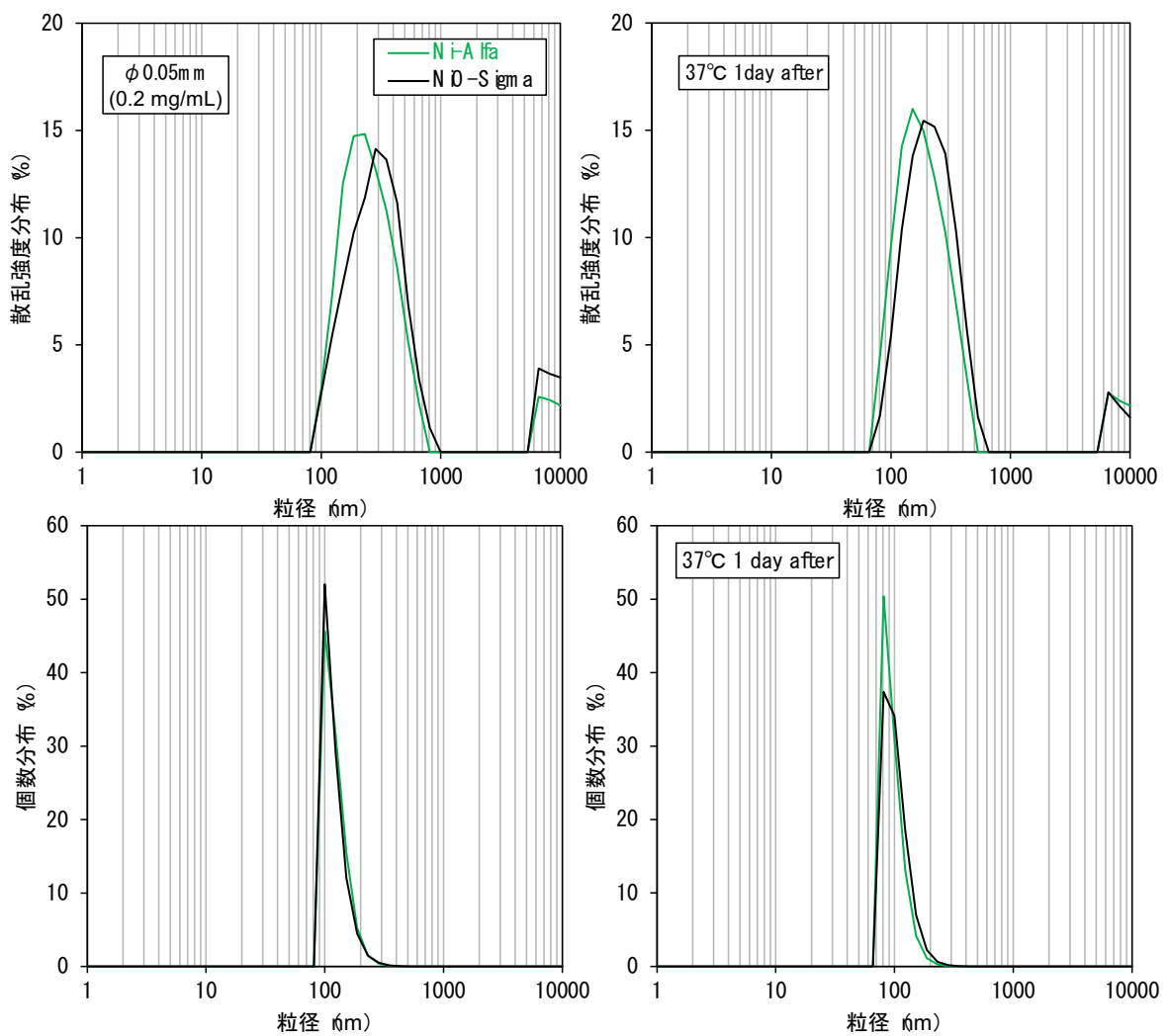


図 8. 粉碎に $\phi 0.05 \text{ mm}$ のジルコニアボールを用いた Ni-Alfa および NiO-Sigma の 10%FBS-MEM 懸濁液の調製後 (左) および 37°C で 1 日静置後 (右) の粒径分布 (上: 散乱強度分布、下: 個数分布)

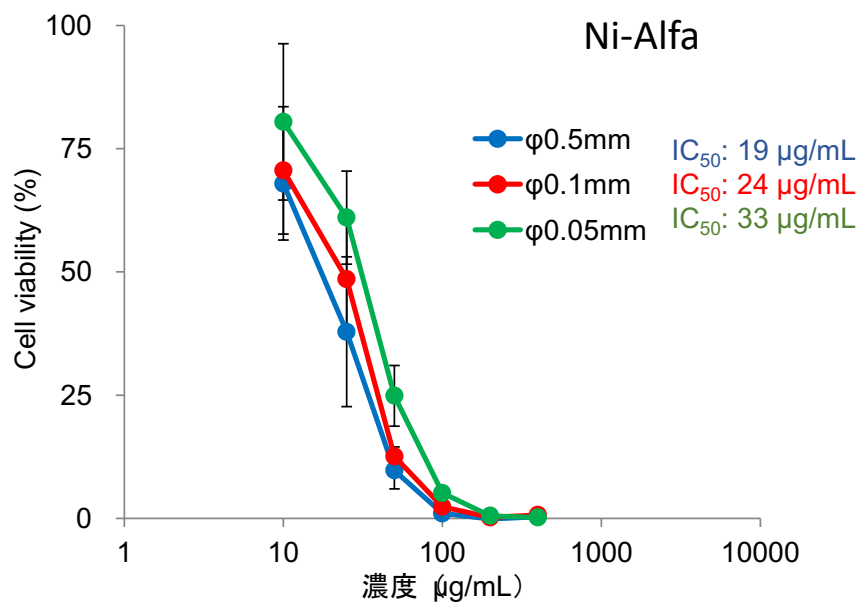
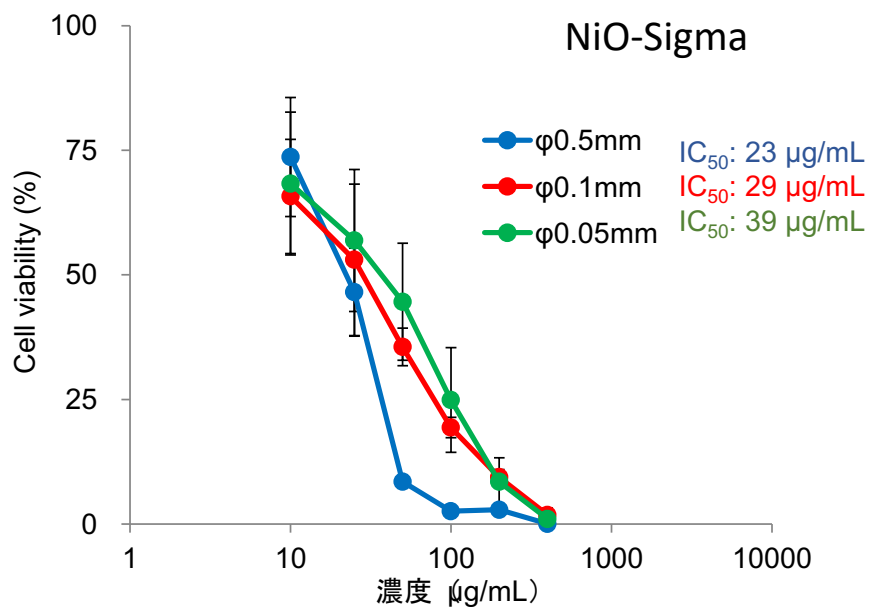


図 9. 径の異なるジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 懸濁液の細胞毒性曲線 (エラーバーは標準偏差)

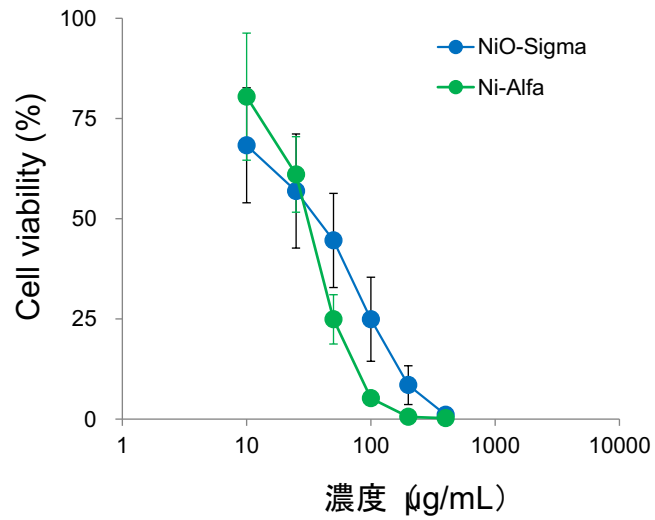


図 10. 径 0.05 mm のジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 懸濁液の細胞毒性曲線 (エラーバーは標準偏差)

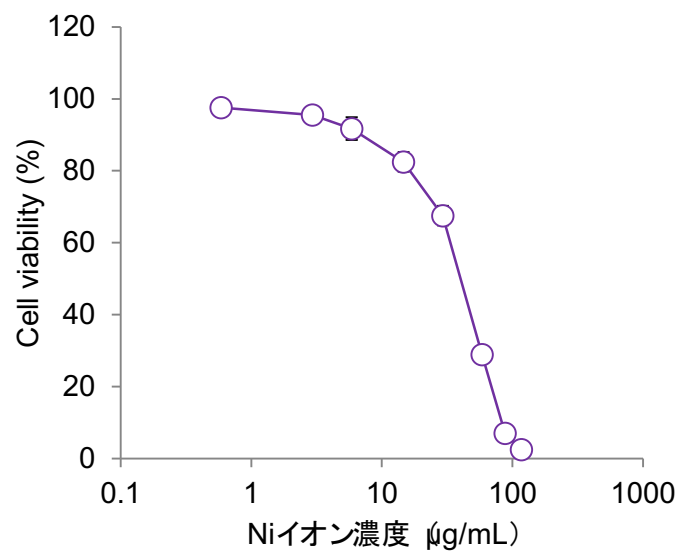


図 11. Ni イオンの細胞毒性試験結果

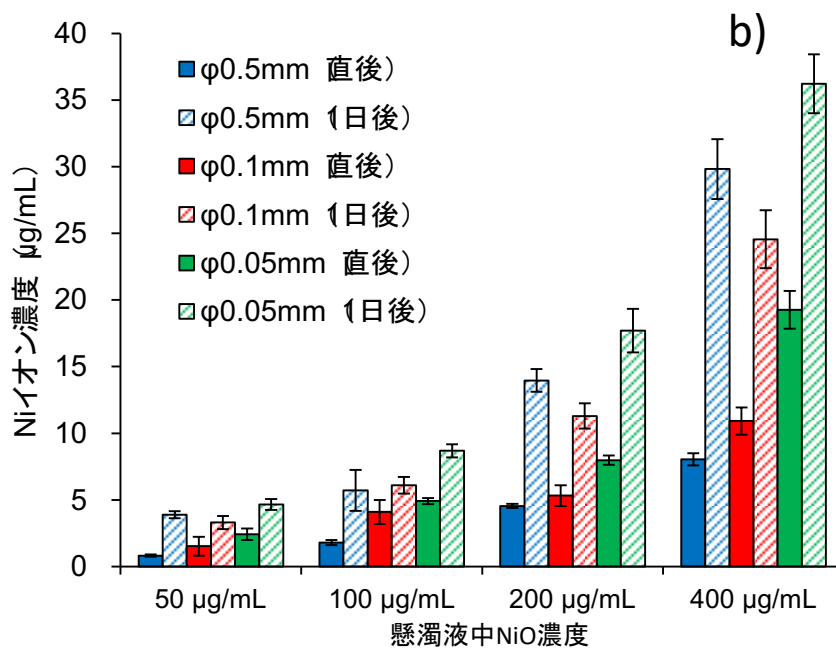
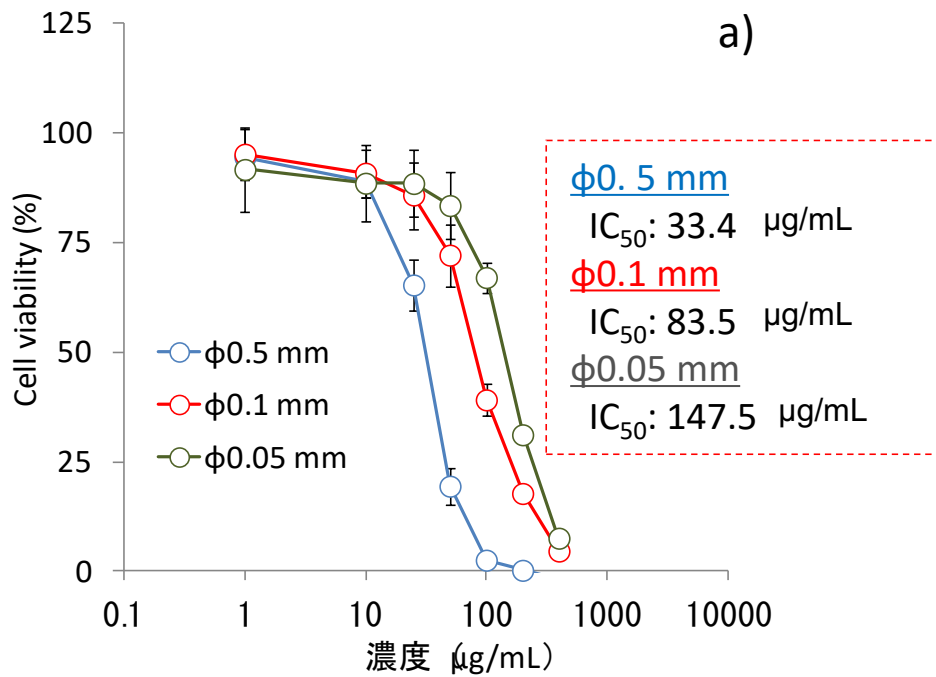


図 12. 二次粒子径の異なる NiO-Sigma 懸濁液を用いた a) 細胞毒性試験 (A549 細胞、48 時間 MTS アッセイ)¹⁰⁾及び b) 懸濁液中 Ni イオン濃度