厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（H30-化学-一般-004）令和元年度分担研究報告書

生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案

分担研究課題名：ナノマテリアルの特性評価

分担研究者：林　幸壱朗　九州大学大学院歯学研究院　准教授

研究要旨：研究班内で共通に使用する 5 種類の二酸化チタンナノ粒子の粒度分布を蒸留水および細胞培養培地中で測定した。二酸化チタンナノ粒子は種類および分散濃度によらず蒸留水および細胞培地中で凝集していた。各酸化チタンナノ粒子の一次粒径は数ナノメートルから数十ナノメートルであるが、溶液中ではサブミクロンから数十マイクロメートルの凝集体として存在していることが明らかになった。

A.研究目的

研究班内で共通に使用する二酸化チタンナノ粒子の蒸留水および細胞培地中での粒度分布を測定することを目的とした。

B.研究方法

以下の 5 種類のテイカ株式会社製酸化チタンナノ粒子を使用した：AMT100、AMT600、MT150、MT500、TKP102。これらの酸化チタンナノ粒子を 15.63、 31.25、 62.5 μg/mL の濃度で蒸留水またはウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM+FBS）に分散させた。調製した懸濁液中の粒度分布およびゼータ電位をベックマンコールター製 DelsaMax Pro を用いて、動的光散乱法により求めた。懸濁液の調整条件（二酸化チタン、溶媒、濃度）を表 1 に示す。

C.研究結果

各懸濁液の蒸留水中での粒度分布を図 1 に示す。AMT100、AMT600、MT150 は 100～200 nm と 200 nm～3 μm の凝集体を形成していた。粒子濃度が高くなるにつれて、若干、粒径が増加していた。MT500 は粒子濃度によらず、100～1000 nm の凝集体を形成した。TKP102 は粒子濃度による粒度分布の違いはほとんどなく、100～200 nm、200 nm～3 μm、3～20 μm の凝集体を形成していた。つまり、いずれの二酸化チタンナノ粒子も一次粒子としては存在しておらず、凝集していることが明らかになった。

表 1. 粒度分布およびゼータ電位測定に用いた懸濁液

TiO_2サンプル名	溶媒	濃度 (μg/mL)
AMT100	蒸留水	15.6
AMT100	蒸留水	31.3
AMT100	蒸留水	62.5
AMT600	蒸留水	15.6
AMT600	蒸留水	31.3
AMT600	蒸留水	62.5
MT150	蒸留水	15.6
MT150	蒸留水	31.3
MT150	蒸留水	62.5
MT500	蒸留水	15.6
MT500	蒸留水	31.3
MT500	蒸留水	62.5
TKP102	蒸留水	15.6
TKP102	蒸留水	31.3
TKP102	蒸留水	62.5
AMT100	DMEM+FBS	15.6
AMT100	DMEM+FBS	31.3
AMT100	DMEM+FBS	62.5
AMT600	DMEM+FBS	15.6
AMT600	DMEM+FBS	31.3
AMT600	DMEM+FBS	62.5
MT150	DMEM+FBS	15.6
MT150	DMEM+FBS	31.3
MT150	DMEM+FBS	62.5
MT500	DMEM+FBS	15.6
MT500	DMEM+FBS	31.3
MT500	DMEM+FBS	62.5
TKP102	DMEM+FBS	15.6
TKP102	DMEM+FBS	31.3
TKP102	DMEM+FBS	62.5

各懸濁液の DMEM+FBS 中での粒度分布を図 2 に示す。AMT100 は濃度によらず 200 nm 以下と 200 nm～20 μ m の 2 種類の凝集体として存在していた。AMT600 も濃度によらず 200 nm 以下と 200 nm～10 μ m の 2 種類の凝集体として存在していた。MT150 は、40 nm 以下、40～400 nm、400 nm～5 μ m の 3 種類の凝集体として存在していた。MT500 は、100 nm 以下と 100～1000 nm の 2 種類の凝集体を形成していた。TKP102 は粒子濃度により粒度分布が異なり、粒子濃度が高くなるにつれて、粒径が増大していた。以上の結果から、蒸留水中と同様に、DMEM+FBS 中でもこれらの二酸化チタンナノ粒子は凝集体として存在していることが明らかになった。

表 2 に各懸濁液のゼータ電位を示す。いずれの二酸化チタンも負電荷を帯びており、蒸留水中の方が絶対値が大きくなった。MT500 および TKP102 はその他の二酸化チタンに比べゼータ電位の絶対値が小さい傾向があった。

D.考察

いずれの二酸化チタンナノ粒子も溶液中では凝集しており、実際の二酸化チタンを使用する際に、一次粒子として存在する二酸化チタンナノ粒子に暴露されることは少ないと考えられる。これは酸化チタンナノ粒子に限らず、他組成のナノ粒子にも言えることである。ナノ粒子の毒性を評価するにあたり、二次粒子の毒性を評価している可能性があることを考慮に入れる必要があると思われる。

E. 結論

今回測定に用いた 5 種類の二酸化チタンナノ粒子はいずれも蒸留水及びウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地では凝集体として存在していた。

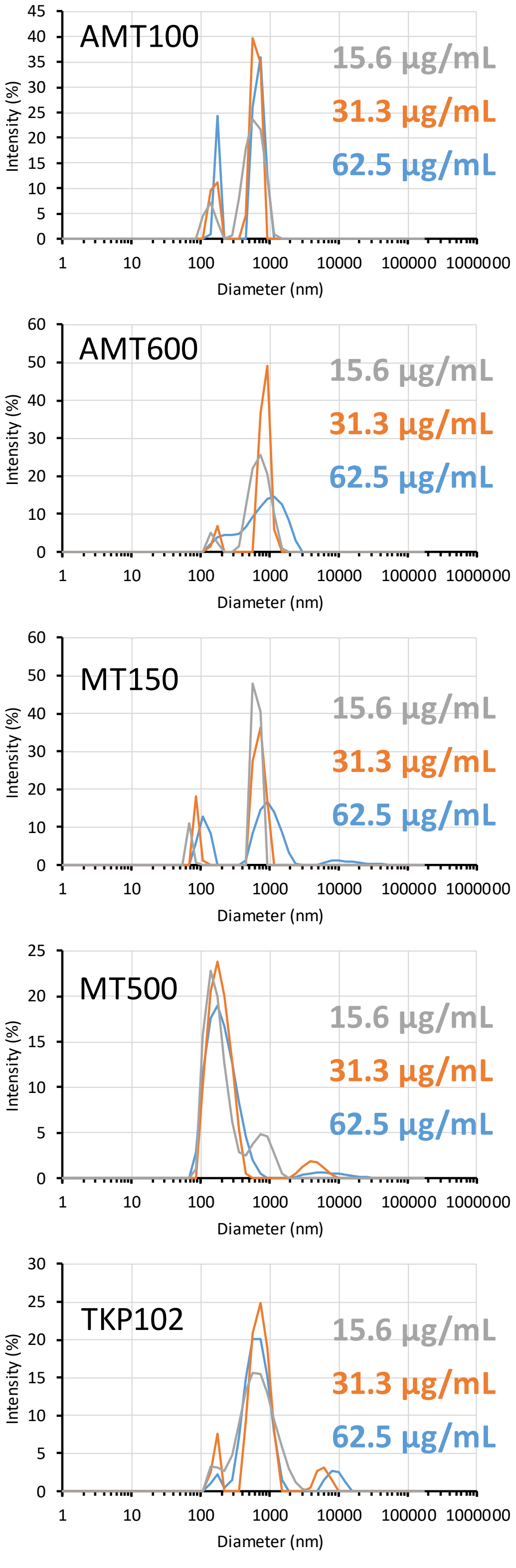

図 1. 各懸濁液の蒸留水中での粒度分布

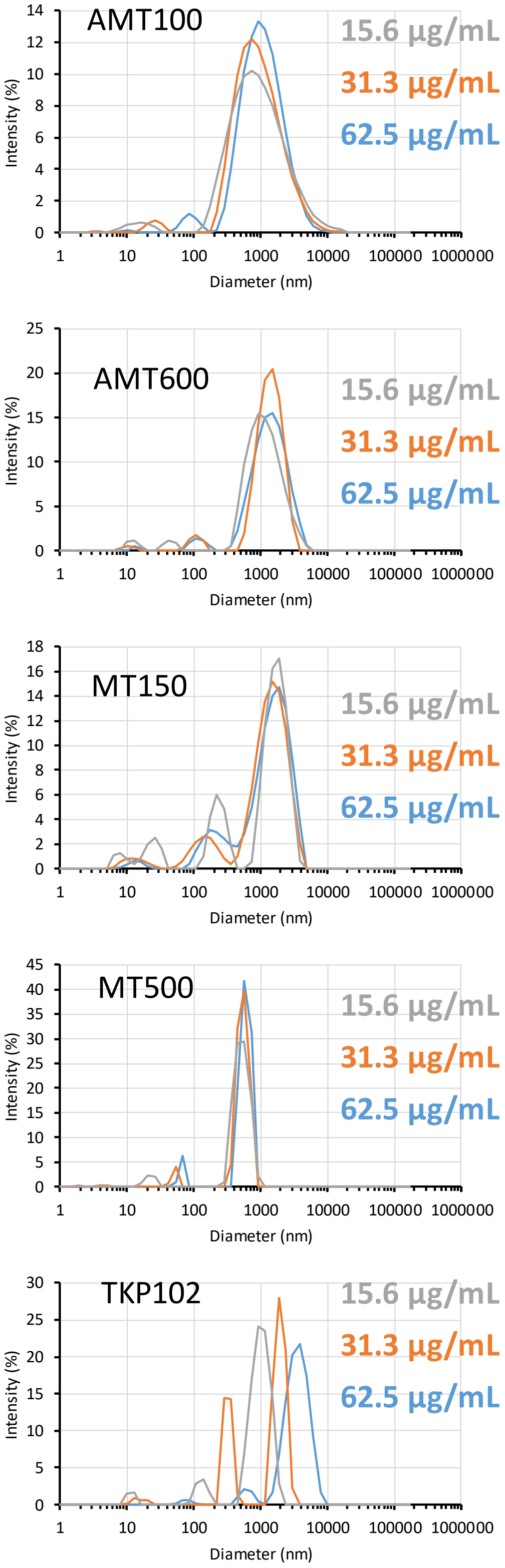

図 1. 各懸濁液の **DMEM+FBS** 中での粒度分布

表 2. 各懸濁液のゼータ電位

TiO_2サンプル名	濃度 (μg/mL)	蒸留水のゼータ電位 (mV)	DMEM+FBS中でのゼータ電位 (mV)
AMT100	15.6	－64.4	－4.9
AMT100	31.3	－75.9	－5.6
AMT100	62.5	－56.6	－6.4
AMT600	15.6	－24.9	－6.2
AMT600	31.3	－99.5	－4.6
AMT600	62.5	－89.6	－6.9
MT150	15.6	－45.3	－1.4
MT150	31.3	－77.6	－7.2
MT150	62.5	－68.4	－5.8
MT500	15.6	－30.3	－3.0
MT500	31.3	－32.0	－4.8
MT500	62.5	－22.8	－6.7
TKP102	15.6	－25.9	－2.3
TKP102	31.3	－26.1	－0.4
TKP102	62.5	－27.8	－3.1

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hayashi K, Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Carbonate Apatite Micro-Honeycombed Blocks Generate Bone Marrow-Like Tissues as well as Bone. Adv Biosys, 3, 1900140, 2019.
2. Hayashi K, Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Honeycomb blocks composed of carbonate apatite, β-tricalcium phosphate,and hydroxyapatite for bone regeneration: effects of composition onbiological responses, Mater Today Bio, 4, 100031, 2019.
3. Hayashi K, Munar ML, Ishikawa K. Carbonate apatite granules with uniformly sized pores that arrange regularly and penetrate straight through granules in one direction for bone regeneration. Ceram Int, 45, 15429-15434. 2019.
4. Shi R, Hayashi K, Bang LT, Ishikawa K. Effects of surface roughening and calcite coating of titanium on cell growth and differentiation. J Biomater Appl, 34, 917-927, 2019.
5. Ishikawa K, Arifta T, Hayashi K, Tsuru K. Fabrication and Evaluation of Interconnected Porous Carbonate Apatite from Alpha Tricalcium Phosphate Spheres. J Biomed Mater Res B, 107, 269-277, 2019.
6. Sakemi Y, Hayashi K, Tsuchiya A, Nakashima Y, Ishikawa K. Fabrication and Histological Evaluation of Porous Carbonate Apatite Block from Gypsum Block Containing Spherical Phenol Resin as a Porogen. Materials, 2019, 12, 3997, 2019.
7. Hayashi K, Munar L.M, Ishikawa K. Effects of macropore size in carbonate apatite honeycomb scaffolds on bone regeneration. Mat Sci Eng C, 111, 110848, 2020.

8. Hayashi K, Kishida R, Tsuchiya A, Ishikawa K. Granular Honeycombs Composed of Carbonate Apatite, Hydroxyapatite, and β-Tricalcium Phosphate as Bone Graft Substitutes: Effects of Composition on Bone Formation and Maturation. ACS Appl Bio Mater, 3, 1787-1795, 2020
9. Putri TS, Hayashi K, Ishikawa K. Bone regeneration using β-tricalcium phosphate (β-TCP) block with interconnected pores made by setting reaction of β-TCP granules, J Biomed Mater Res A, 108A, 625-632, 2020.
10. Swe TT, Shariff KA, Mohamad H, Ishikawa K, Hayashi K, Bakar MHA. Behavioural response of cells and bacteria on single and multiple doped Sr and Ag S53P4 Sol-Gel Bioglass. Ceram Int https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.04.094
11. 林幸壱朗, "骨髄様組織を形成するハニカムスキャフォールド" *BIO INDUSTRY*, シーエムシー出版, 2 月号, 24–33, 2020.

G.知的財産権の出願・登録状況

1. 石川 邦夫、林　幸壱朗、土谷　享、岸田 良、中島 康晴、医用ハニカム構造体、成形型、および製造方法、特願 2020-38167、2020 年 3 月 5 日
2. 石川 邦夫、林　幸壱朗、土谷　享、岸田 良、中島 康晴、炭酸アパタイト被覆材料およびその製造方法、特願 2020-063503、2020 年 3 月 31 日